

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALESSANDRA FERREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DA RIVAROXABANA E DO
POLIMORFISMO NO GENE ABCG2 EM VOLUNTÁRIOS SADIOS INCLUÍDOS EM
ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA**

Alfenas/MG

2023

ALESSANDRA FERREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DA RIVAROXABANA E DO
POLIMORFISMO NO GENE *ABCG2* EM VOLUNTÁRIOS SADIOS INCLUÍDOS EM
ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Vanessa Bergamin Boralli Marques

Alfenas/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas Biblioteca Central

Santos, Alessandra Ferreira dos.

Avaliação da farmacocinética da rivaroxabana e do polimorfismo no gene *ABCG2* em voluntários sadios incluídos em estudos de bioequivalência / Alessandra Ferreira dos Santos. - Alfenas, MG, 2023. 167 f. : il. -

Orientador(a): Vanessa Bergamin Boralli Marques.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Polimorfismo. 2. Gene transportador. 3. BCRP. 4. Anticoagulantes orais diretos. 5. Parâmetros farmacocinéticos. I. Marques, Vanessa Bergamin Boralli, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor

ALESSANDRA FERREIRA DOS SANTOS

“AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DA RIVAROXABANA E DO POLIMORFISMO NO GENE ABCG2 EM VOLUNTÁRIOS SADIOS INCLUÍDOS EM ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA”

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 31 de Julho de 2023.

Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques
Presidente da Banca Examinadora
Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Ana Leonor Pardo Campos Godoy
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor
Universidade Federal do Pernambuco

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron
Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Márcia Helena Miranda Cardoso Podestá
Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Bergamin Boralli Marques, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2023, às 11:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1047436** e o código CRC **1BC6098F**.

Dedico esse trabalho aos meus filhos Francisco e Felipa pela oportunidade de caminharmos juntos nessa vida. E aos meus pais (*in memoriam*): Moacyr e Nalda com todo meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Armando Rios, meu marido, por apoiar minhas decisões e estar ao meu lado nessa jornada.

A professora Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques, minha orientadora, por ter aceitado fazer esse trabalho comigo, pela paciência e entendimento, por ser tão especial.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da UNIFAL que abriu as portas para a realização dos experimentos. Ao professor Dr. Fabio Colombo pela colaboração, incentivo e por ter me ensinado tanto sobre biologia molecular. A Dra. Juliana Barbosa Nunes pelo cuidado e execução de algumas análises, por todos os conhecimentos compartilhados e pela enorme colaboração.

Ao Instituto Claudia Marques de Pesquisa e Desenvolvimento Ltda. e ao Grupo Cimed pela oportunidade em permitir a realização desse sonho.

Aos meus colegas de trabalho Adriano Dias Moreira, Carla Muniz, Carlos Eduardo Melo Correa, Edvaldo Capobiango Coelho e Quevellin Alves dos Santos Francisco: sem a colaboração de vocês esse trabalho não seria uma realidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Aos professores da UNIFAL que tive a oportunidade de conviver durante o processo de obtenção de créditos nas disciplinas que cursei, pelos conhecimentos compartilhados. Em especial a minha amiga professora Dra. Isarita Martins Sakakibara que me apresentou a professora Vanessa e me incentivou a fazer o doutorado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.

O que ela quer da gente é **coragem**”

João Guimarães Rosa (1908-1967). Grande sertão: Veredas

RESUMO

A rivaroxabana é um anticoagulante oral direto utilizado para tratamento de tromboembolismo venoso e prevenção de acidente vascular cerebral em pacientes com fibrilação atrial. Este fármaco atua como inibidor do fator Xa na cascata de coagulação e é metabolizado no fígado pelas enzimas CYP3A4/5 e CYP2J2, além de ser substrato da glicoproteína-P e da proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP). Muitos pacientes em terapia anticoagulante não respondem adequadamente ao tratamento ou apresentam reações adversas, como sangramento. Essa variabilidade na resposta farmacológica pode ser causada por polimorfismo genético. Portanto, o objetivo principal desse estudo foi avaliar a influência do polimorfismo genético em parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , ASC, CI, $t_{1/2}$ e Vd) e de coagulação (TP e TTPa) da rivaroxabana. Foram incluídos 117 voluntários saudáveis que participaram de dois estudos de bioequivalência com uma dose única oral de 20 mg de rivaroxabana, em condições de jejum e pós-prandial. As concentrações plasmáticas foram determinadas por método desenvolvido e validado por UHPLC-MS/MS. Foi avaliado o polimorfismo no gene *ABCG2* 421 C>A que codifica a enzima transportadora BCRP responsável pelo efluxo da rivaroxabana. O método cromatográfico desenvolvido foi preciso, exato, estável e apresentou faixa de trabalho adequada a aplicação em estudo de bioequivalência. Os voluntários com genótipo 421 A/A, comparados respectivamente a 421 C/A e 421 C/C apresentaram Vd (508,27 vs 334,45 vs 275,59 L) e $t_{1/2}$ (41,04 vs 16,43 vs 15,47 h) significativamente maior, no estudo em condições de jejum. Os valores de C_{max} (145,81 vs 176,27 vs 190,19 ng/mL), ASC^{0-t} (1193,81 vs 1374,69 vs 1570,77 ng/mL*h) e (CI 11,82 vs 14,50 vs 13,01 mL/h) foram menores para esses indivíduos, respectivamente, mas sem significância estatística. A rivaroxabana prolongou os valores de TP (17,80 vs 18,38 vs 18,62 s) e TTPa (45,90 vs 44,78 vs 47,00 s) quando comparados aos valores basais, porém sem correlação com a variante estudada. A rivaroxabana foi bem tolerada e nenhum evento grave foi detectado. Os estudos farmacogenéticos em voluntários saudáveis fornecem muitas informações sobre a influência de polimorfismos genéticos em farmacocinética, efeito biológico e dá informações sobre segurança. As informações coletadas podem ser utilizadas no desenvolvimento da medicina personalizada.

Palavras-chave: Polimorfismo; gene transportador; BCRP; anticoagulantes orais diretos; parâmetros farmacocinéticos.

ABSTRACT

Rivaroxaban is a direct oral anticoagulant used to treatment of venous thromboembolism and prevention of stroke in patients with atrial fibrillation. This drug acts as a factor Xa inhibitor in the coagulation cascade and is metabolized in the liver by CYP3A4/5 and CYP2J2 enzymes, in addition to being a substrate for P-glycoprotein and breast cancer resistance protein (BCRP). Many patients on anticoagulant therapy do not respond adequately to treatment or have adverse reactions, such as bleeding. This variability in pharmacological response may be caused by genetic polymorphism. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the influence of genetic polymorphism on pharmacokinetic (C_{max} , AUC, Cl, $t_{1/2}$ and Vd) and coagulation (PT and aPTT) parameters of rivaroxaban. We included 117 healthy volunteers who participated in two bioequivalence studies with a single oral dose of 20 mg rivaroxaban, under fasting and postprandial conditions. Plasma concentrations were determined by a method developed and validated by UHPLC-MS/MS. The polymorphism in the *ABCG2* 421 C>A gene that encodes the BCRP transporter enzyme responsible for the efflux of rivaroxaban was evaluated. The chromatographic method developed was precise, accurate, stable and presented an adequate working range for application in a bioequivalence study. Volunteers with 421 A/A genotype, compared respectively to 421 C/A and 421 C/C, presented Vd (508.27 vs 334.45 vs 275.59 L) and $t_{1/2}$ (41.04 vs 16.43 vs 15.47 h) significantly higher in the study under fasting conditions. The values of C_{max} (145.81 vs 176.27 vs 190.19 ng/mL), AUC_{0-t} (1193.81 vs 1374.69 vs 1570.77 ng/mL*h) and (Cl 11.82 vs 14 .50 vs 13.01 mL/h) were lower for these individuals, respectively, but not statistically significant. Rivaroxaban prolonged PT values (17.80 vs 18.38 vs 18.62 s) and aPTT (45.90 vs 44.78 vs 47.00 s) when compared to baseline values, but without correlation with the studied variant. Rivaroxaban was well tolerated and no serious events were detected. Pharmacogenetic studies in healthy volunteers provide a lot of information about the influence of genetic polymorphisms on pharmacokinetics, biological effect and gives information on safety. The information collected can be used in the development of personalized medicine.

Keywords: Polymorphism; transporter gene; BCRP; direct oral anticoagulants; pharmacokinetic parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Visão geral da coagulação sanguínea	30
Figura 2 – Resumo da farmacocinética da rivaroxabana	39
Figura 3 – Estrutura da proteína ABCG2 contendo seis domínios transmembrânicos e região de ligação do ATP onde se localiza o polimorfismo estudado 421 C>A (Q141K).....	51
Figura 4 – BCRP humana localizada apicalmente nas membranas celulares como as células epiteliais do intestino delgado (a), domínio canicular dos hepatócitos no fígado (b), células dos túbulos renais (c), sinciciotrofoblastos na placenta (d) e células endoteliais (e)	53
Figura 5 – Estrutura molecular da rivaroxabana (A) e linezolida (padrão interno) (B)	63
Figura 6 – Amostra de plasma normal (branco) e os 5 diferentes graus de hemólises utilizados para comparação visual entre amostras utilizadas na validação do método bioanalítico e as amostras do estudo	72
Figura 7 – Fluxograma de recrutamento e seleção dos participantes de pesquisa.....	82
Figura 8 – Espectro de identificação do íon precursor 436,2 m/z e do íon produto 145 m/z da rivaroxabana.....	87
Figura 9 – Espectro de identificação do íon precursor 338,28 m/z e espectro de fragmentação do íon produto 195,17 m/z de linezolida (PI).....	88
Figura 10 – Gráfico representativo da curva de calibração de RXA em plasma demonstrando a linearidade do método e os erros padrão dos pontos em duplicata.....	90
Figura 11 – Cromatogramas representativos das amostras branco (A), zero (B) e LIQ (C) e os respectivos tempos de retenção do analito e PI	91
Figura 12 – Amostras de controle de qualidade (CQs) avaliando o desempenho do ensaio durante a quantificação dos estudos em jejum e pós-prandial. Corridas analíticas de 117 participantes de pesquisa e quatro CQs por valor de concentração	98
Figura 13 – Amostras de controle de qualidade (CQMn1 e CQMn2) adicionados nas corridas analíticas a partir do voluntário 05 (estudo em jejum) até a quantificação final das amostras desconhecidas, para avaliação do desempenho do ensaio.....	99
Figura 14 – Curva de concentração plasmática média de rivaroxabana <i>versus</i> tempo, após administração de 20 mg em 60 voluntários sadios em condições de jejum	103
Figura 15 – Curva de concentração plasmática média de rivaroxabana log transformada <i>versus</i> tempo, após administração de 20 mg em 60 voluntários sadios em condições de jejum.....	104

Figura 16 – Curva de concentração plasmática média de rivaroxabana <i>versus</i> tempo, após administração de 20 mg em 57 voluntários sadios em condições pós-prandial	104
Figura 17 – Curva de concentração plasmática média de rivaroxabana log transformada <i>versus</i> tempo, após administração de 20 mg em 57 voluntários sadios em condições pós-prandial.....	105
Figura 18 – Diferença das médias para TP (A) e TTPa (B) no estudo em jejum.	110
Figura 19 – Diferença das médias para TP (A) e TTPa (B) no estudo pós-prandial	110
Figura 20 – Distribuição dos valores de TP e TTPa nos tempos de coleta nos estudos em condições de jejum (A e B) e pós-prandial (C e D).....	111
Figura 21 – Correlação entre as concentrações de RXA (ng/mL) em 3 horas e os ensaios TP e TTPa no estudo em jejum (A) e (B) e no estudo pós-prandial (C) e (D), respectivamente	112
Figura 22 – Eletroferograma para visualização do polimorfismo 421C>A. Resultado do sequenciamento das duas fitas com os <i>primers: forward</i> (A) e <i>reverse</i> (B) do participante da pesquisa 01, com genótipo 421CC, selvagem.....	115
Figura 23 – Eletroferograma para visualização do polimorfismo 421C>A. Resultado do sequenciamento das duas fitas com os <i>primers: forward</i> (A) e <i>reverse</i> (B) do participante da pesquisa 02, com genótipo 421CA, heterozigoto.	115
Figura 24 – Eletroferograma para visualização do polimorfismo 421C>A. Resultado do sequenciamento das duas fitas com os <i>primers: forward</i> (A) e <i>reverse</i> (B) do participante da pesquisa 07, com genótipo 421AA, homozigoto mutante.....	116
Figura 25 – <i>Box plot</i> de Vd/F (L) da rivaroxabana em condições de jejum para os genótipos 421 C>A do gene <i>ABCG2</i>	118
Figura 26 – <i>Box plot</i> de $t_{1/2}$ (h) da rivaroxabana em condições de jejum, para os genótipos 421 C>A do gene <i>ABCG2</i>	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Exames clínico laboratoriais vinculados ao processo de seleção dos voluntários.....	59
Quadro 2 – Reagentes e solventes utilizados nas análises	63
Quadro 3 – Descrição das substâncias químicas de referência rivaroxabana (analito) e linezolida (padrão interno).....	63
Quadro 4 – Descrição dos equipamentos usados no processo bioanalítico	64
Quadro 5 – Preparo dos padrões de calibração (PCs)	69
Quadro 6 – Preparo dos controles de qualidade (CQs)	70
Quadro 7 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento e o fragmento de interesse.....	79
Quadro 8 – Métodos bioanalíticos para determinação de rivaroxabana em plasma por UHPLC – MS/MS	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições do espectrômetro de massas para detecção de rivaroxabana e linezolida	66
Tabela 2 – Condições cromatográficas para análise de rivaroxabana e linezolida ..	67
Tabela 3 – Características demográficas dos participantes da pesquisa.....	83
Tabela 4 – Resultados das concentrações obtidas para as curvas de calibração no ensaio de linearidade (3 lotes) e seus desvios (EPR), as equações da reta e os respectivos coeficientes de determinação	89
Tabela 5 – Valores de precisão (CV%) e inexatidão (EPR%) intracorridas e intercorridas para RXA em plasma.....	92
Tabela 6 – Áreas do analito e padrão interno obtidas para determinação do ensaio de seletividade em matrizes distintas.....	93
Tabela 7 – Áreas do analito e padrão interno obtidas para determinação do ensaio de efeito residual	94
Tabela 8 – Fator matriz normalizado obtido para analito e padrão interno em três matrizes distintas.....	95
Tabela 9 – Dados referentes aos testes de estabilidade de rivaroxabana em plasma expressos em coeficiente de variação e erro padrão relativo utilizando amostras de CQB e CQA (n = 3).....	96
Tabela 10 – Estabilidade das soluções padrão e de trabalho através das comparações das variações médias das respostas do analito e do padrão interno	97
Tabela 11 – Média dos parâmetros farmacocinéticos de rivaroxabana após dose única oral de 20 mg da formulação teste e referência em condições de jejum (n = 60) e pós-prandial (n = 57) com delineamento dos estudos sendo 2x4	101
Tabela 12 – Intervalo de confiança de 90% dos parâmetros farmacocinéticos log-transformados para as formulações teste e referência	106
Tabela 13 – Razão entre os desvios padrão e intervalo de confiança de 90% para a razão	108
Tabela 14 – Valores médios, mínimos e máximos de TP, TTPa e concentrações de rivaroxabana em condições de jejum e pós-prandial (n = 117)	109
Tabela 15 – Frequência alélica e genotípica da população estudada (n = 117).....	113
Tabela 16 – Parâmetros farmacocinéticos e efeitos biológicos de rivaroxabana (média \pm desvio padrão) segundo os diferentes genótipos do polimorfismo analisado no gene <i>ABCG2</i>	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	transportadores de cassete de ligação de ATP (do inglês <i>ATP-binding cassette</i>)
<i>ABCB1</i>	gene que codifica a glicoproteína P
<i>ABCG2</i>	gene que codifica a proteína de resistência ao câncer de mama
ADP	adenosina difosfato
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AODs	anticoagulantes orais de ação direta
ASC	área sob a curva
ASC ^{0-inf}	área sob a curva de concentração <i>versus</i> tempo desde o tempo zero até o infinito (extrapolada)
ASC ^{0-t}	área sob a curva de concentração <i>versus</i> tempo desde o tempo zero até a última concentração determinada experimentalmente
ATP	adenosina trifosfato
AVKs	antagonistas da vitamina K
BCRP	proteína de resistência ao câncer de mama (do inglês <i>Breast Cancer Resistance Protein</i>)
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cl	clearance
C _{max}	concentração plasmática máxima
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COVID-19	infecção respiratória aguda causada pelo coronavírus
CQ	controle de qualidade
CV	coeficiente de variação
CYP	enzimas do citocromo P450
dATP	desoxiadenosina trifosfatada (abreviado em inglês como dATP, <i>deoxyadenosine triphosphate</i>)
dCTP	esoxicitidina trifosfatada (abreviado em inglês como dCTP, <i>deoxycytidine triphosphate</i>)
DCVs	doenças cardiovasculares
dGTP	desoxiguanosina trifosfatada (abreviado em inglês como dGTP, <i>deoxyguanosine triphosphate</i>)

DNA	ácido desoxirribonucleico
DPR	desvio padrão relativo
dTTP	desoxitimidina trifosfatada (abreviado em inglês como dCTP, <i>deoxythymidine triphosphate</i>)
ECG	eletrocardiograma
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EMA	agência europeia de medicamentos (do inglês <i>European Medicines Agency</i>)
EP	embolia pulmonar
EPR	erro padrão relativo
FA	fibrilação atrial
FIIa	fator II ativado ou trombina
FMN	fator matriz normalizado
FT	fator tecidual
FXa	fator X ativado
HBPMs	heparinas de baixo peso molecular
HNF	heparina não fracionada
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	intervalo de confiança
ICMP&D	Instituto Cláudia Marques de Pesquisa e Desenvolvimento
IQVIA	empresa multinacional que informa saúde e dados da pesquisa clínica (do inglês <i>Quintiles e IMS Health, Inc.</i>)
IMC	índice de massa corporal
Kel	constante de eliminação
LIQ	limite inferior de quantificação
Log P	coeficiente de partição octanol / água
LSQ	limite superior de quantificação
MRM	monitoramento de reações múltiplas
PC	padrão de calibração
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
P-gp	glicoproteína P (do inglês <i>P-glycoprotein</i>)
pH	potencial hidrogeniônico
PI	padrão interno

R	medicamento de referência
R ²	coeficiente de determinação
RAM	reação adversa a medicamento
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA _m	RNA mensageiro (ácido ribonucleico responsável pela transferência de informações)
RXA	rivaroxabana
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês <i>Single Nucleotide Polimorphism</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
T	medicamento teste
t _{1/2}	meia-vida de eliminação do fármaco
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEV	tromboembolismo venoso
T _{max}	tempo para atingir a concentração plasmática máxima
TP	tempo de protrombina
TTP _a	tempo de tromboplastina parcial ativada
TVP	trombose venosa profunda
UHPLC-MS/MS	cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas – Minas Gerais
US-FDA	Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (do inglês <i>United States Food Drug Administration</i>)
V _d	volume de distribuição
χ ²	Teste estatístico qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
3.1	DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	23
3.2	TERAPIA ANTICOAGULANTE ESTABELECIDADA	25
3.3	ANTICOAGULANTES ORAIS DIRETOS	27
3.4	FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO	29
3.5	INIBIÇÃO DO FATOR Xa.....	32
3.6	RIVAROXABANA	33
3.6.1	Mecanismo de ação.....	34
3.6.2	Efeito biológico na coagulação.....	35
3.6.3	Farmacocinética	36
3.7	MONITORAMENTO DOS INIBIDORES DIRETOS DO FATOR Xa	41
3.8	FATORES QUE INFLUENCIAM NA RESPOSTA AOS FÁRMACOS	44
3.9	FARMACOGENÉTICA E OS ANTICOAGULANTES ORAIS DIRETOS	46
3.10	POLIMORFISMO DE ENZIMAS METABOLIZADORAS	47
3.10.1	CYP 3A4 e CYP 3A5.....	47
3.10.2	CYP2J2	48
3.11	POLIMORFISMO DE TRANSPORTADORES.....	48
3.11.1	Glicoproteína P (P-gp).....	49
3.11.2	Proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP).....	51
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	56
4.1	ETAPA CLÍNICA DE BIOEQUIVALÊNCIA	56
4.1.1	População do estudo	56
4.1.2	Cálculo amostral.....	56
4.1.3	Considerações éticas.....	57
4.1.4	Recrutamento e seleção	58
4.1.5	Critérios de inclusão	59
4.1.6	Critérios de não inclusão.....	60
4.1.7	Desenho do estudo	60

4.1.8	Cronograma de coleta de amostras.....	61
4.2	ETAPA ANALÍTICA DE BIOEQUIVALÊNCIA.....	62
4.2.1	Reagentes e substâncias químicas	62
4.2.2	Equipamentos.....	64
4.2.3	Desenvolvimento do método bioanalítico.....	64
4.2.4	Validação da metodologia bioanalítica.....	67
4.2.4.1	Preparação das curvas de calibração e controles de qualidade	68
4.2.4.2	Linearidade.....	71
4.2.4.3	Seletividade.....	71
4.2.4.4	Efeito residual.....	71
4.2.4.5	Efeito matriz	72
4.2.4.6	Precisão e exatidão intra e intercorridas	73
4.2.4.7	Estabilidades em matriz biológica	74
4.2.4.8	Estabilidade em solução do analito e padrão interno	75
4.2.5	Quantificação de rivaroxabana em plasma.....	75
4.3	ANÁLISE FARMACOCINÉTICA E AVALIAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA..	75
4.4	ANÁLISE DE EFEITO BIOLÓGICO NA COAGULAÇÃO	76
4.5	GENOTIPAGEM.....	77
4.5.1	Obtenção de amostras para análise genotípica da BCRP	77
4.5.2	Seleção do polimorfismo.....	78
4.5.3	Extração de DNA	78
4.5.4	Amplificação	78
4.5.5	Sequenciamento de DNA.....	79
4.5.6	Análise estatística do polimorfismo genético.....	80
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
5.1	ETAPA CLÍNICA DE BIOEQUIVALÊNCIA	81
5.1.1	População do estudo	81
5.2	ETAPA ANALÍTICA DE BIOEQUIVALÊNCIA.....	83
5.2.1	Desenvolvimento do método.....	83
5.2.2	Validação do método bioanalítico.....	88
5.2.2.1	Curvas de calibração / Linearidade	88
5.2.2.2	Controles de Qualidade / Precisão e Exatidão	92
5.2.2.3	Seletividade.....	93
5.2.2.4	Efeito residual.....	93

5.2.2.5	Efeito matriz	94
5.2.2.6	Estabilidade em matriz biológica	95
5.2.2.7	Estabilidade em solução.....	96
5.2.3	Quantificação das amostras dos participantes da pesquisa	97
5.3	ANÁLISE FARMACOCINÉTICA E AVALIAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA	100
5.4	ANÁLISE DE EFEITO BIOLÓGICO NOS PARÂMETROS DE COAGULAÇÃO	108
5.5	GENOTIPAGEM.....	113
5.5.1	Características genóticas	113
5.5.2	Determinação do genótipo do gene <i>ABCG2</i> por sequenciamento ..	114
6	CONCLUSÃO	122
	REFERÊNCIAS.....	123
	ANEXOS	135

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no Brasil e no mundo, representando aproximadamente 30% das mortes globais, sendo assim consideradas um problema de saúde pública (SILVA *et al.*, 2020; PAIVA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2022). A terapia anticoagulante é recomendada para os eventos tromboembólicos causados pelas DCVs para prevenir e interromper o crescimento de trombos (KUBITZA *et al.*, 2005a; MUECK *et al.*, 2011; TURPIE; ESMON, 2011; REIS, 2012; MASSARO; LIP, 2016). Os avanços na compreensão da atuação do sistema da coagulação permitiram o desenvolvimento de “novos” agentes farmacológicos nesta área; apesar da eficácia e do conhecimento da farmacocinética e farmacodinâmica dos anticoagulantes tradicionais, a utilização destes é limitada principalmente pela estreita margem terapêutica e necessidade de monitorização regular. Assim, houve necessidade real de terapias antitrombóticas que apresentassem boa biodisponibilidade com administração oral, mais seguras, eficazes e convenientes a adesão do paciente (SHARMA *et al.*, 2015).

O alvo da pesquisa na terapia anticoagulante foi centrada na inibição direta de fatores específicos da coagulação. O fator Xa (FXa) foi considerado o melhor alvo uma vez que para catalisar a produção de aproximadamente 1000 moléculas de trombina é necessária apenas uma molécula deste fator (TURPIE; ESMON, 2011; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013). A inibição direta do FXa mostrou ser mais eficaz e segura, inibindo a coagulação sem interferir na hemostasia primária (SHARMA *et al.*, 2015).

Entre os compostos anticoagulantes orais diretos descobertos nos últimos 20 anos, está a rivaroxabana (RXA) que é um inibidor direto, reversível e altamente seletivo do FXa com biodisponibilidade oral de 66-100%. A ativação do fator X, mecanismo de ação da RXA, por meio das vias intrínseca e extrínseca, desempenha um papel central na cascata da coagulação sanguínea (PERZBORN *et al.*, 2010; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; SHARMA *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2016).

A inibição da atividade do FXa bloqueia a geração de trombina e está intimamente correlacionada à concentração plasmática de RXA (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2013; DINCQ *et al.*, 2014). Os tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPa) são prolongados pela RXA mostrando uma correlação direta com as

concentrações plasmáticas do fármaco. Não há necessidade de monitorar os parâmetros de coagulação durante o tratamento clínico de rotina com esse fármaco, portanto esses testes podem ser úteis em determinadas situações clínicas como suspeita de superdosagem, sangramento ou cirurgia de urgência (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2013; EIKELBOOM *et al.*, 2017; THOM *et al.*, 2018).

Fatores genéticos relacionados ao transporte e metabolismo podem afetar o perfil farmacocinético e os efeitos biológicos da RXA (CAVALLARI; SHIN; PERERA, 2011; GOUIN-THIBAUT *et al.*, 2017). A aplicação de conceitos farmacogenéticos baseados em estudos clínicos pode ser útil não apenas para a compreensão ou descrição de grandes diferenças interindividuais, mas também para esclarecer o papel *in vivo* dos transportadores (IEIRI, 2012).

O gene *ABCG2* que codifica a proteína transportadora BCRP está se tornando cada vez mais reconhecido como um importante mediador do transporte de fármacos no intestino e no túbulo renal e suas variantes genéticas têm sido implicadas no transporte reduzido de seus substratos (O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; CHEN *et al.*, 2019).

O polimorfismo C421A (rs2231142) leva à substituição do aminoácido glutamina por lisina e, está associado a baixos níveis de expressão de BCRP, reduzindo a atividade de transporte. Devido à BCRP possuir papel crucial na absorção e excreção de fármacos que são seus substratos o monitoramento farmacogenético deve ser cuidadosamente avaliado uma vez que está envolvido em etapas relevantes da farmacocinética (IEIRI, 2012; MAO; UNADKAT, 2015; MCLEAN; WILSON; KIM, 2016; FOHNER *et al.*, 2017; HIRA; TERADA, 2018). Gong; Mansell; Kim (2013) sugeriram que pacientes com maior risco de sangramento podem ter redução da função da BCRP, onde o efeito seria o aumento da absorção gastrointestinal levando a biodisponibilidade aumentada, agravada pela redução da secreção renal.

A proposta para este estudo foi determinar as concentrações de rivaroxabana em voluntários sadios participantes de estudos de bioequivalência, e verificar a possível influência do polimorfismo 421 C>A do gene *ABCG2* nos parâmetros farmacocinéticos e nos parâmetros bioquímicos da coagulação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral determinar a influência do polimorfismo genético (*ABCG2* 421 C>A) na variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos de rivaroxabana em participantes de pesquisa sadios provenientes de estudos de bioequivalência em condições de jejum e pós-prandial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um método bioanalítico para a quantificação de rivaroxabana em plasma através da técnica de UHPLC/MS-MS;
- Determinar as concentrações plasmáticas de rivaroxabana em participantes de pesquisa sadios provenientes de estudos de bioequivalência e calcular os principais parâmetros farmacocinéticos;
- Determinar os parâmetros de coagulação TP e TTPa dos participantes durante a condução dos estudos de bioequivalência;
- Realizar a genotipagem por sequenciamento das amostras dos voluntários sadios quanto ao polimorfismo 421 C>A do gene transportador *ABCG2*;
- Correlacionar os dados de concentração plasmática, parâmetros farmacocinéticos, efeito biológico e genotipagem.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCVs) afetam a qualidade de vida da população em aspectos físicos, sociais, financeiros e relativos à saúde, impactando em custos com tratamento, perda de produtividade e do bem-estar. Nos países em desenvolvimento tem sido observada tendência no aumento das DCVs concomitante ao aumento da expectativa de vida da população (SHARMA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2022). A maioria das DCVs podem ser prevenidas, por meio da abordagem de fatores comportamentais e utilizando estratégias para a população em geral (OPAS, 2017). Uma importante estratégia nacional foi o Programa Saúde da Família que, com base na atenção primária, atendeu 123 milhões de indivíduos na tentativa de reduzir a taxa de mortalidade por DCVs (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

No Brasil, as DCVs têm sido a principal causa de mortalidade desde a década de 60, sendo responsável por 30% de mortes ocorridas por doenças crônicas não transmissíveis, excedendo significativamente as mortes por causas externas e doenças infecciosas, sendo consideradas um problema de saúde pública (PAIVA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2022). Foram responsáveis pelos gastos diretos com hospitalização e pelos custos indiretos, por redução da produtividade devida à ausência no trabalho. Os principais grupos de procedimentos cardiovasculares clínicos e cirúrgicos perfizeram um total de 8.743.403 procedimentos pagos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e o gasto decorrente de hospitalizações foi de R\$ 9.378.278,00 em 2019 (OLIVEIRA *et al.*, 2020, 2022).

Cerca de 45% dos óbitos por doenças crônicas não transmissíveis no mundo, mais de 17 milhões são causados por DCVs e 82% acontecem em países de baixa e média renda (OPAS, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Estima-se que 85% desses óbitos foram por infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, eventos agudos decorrentes de DCVs e causados principalmente pelo impedimento da fluidez do sangue para o coração ou cérebro, sendo a razão mais comum para isso, os ateromas (OPAS, 2017). Os processos inflamatórios podem ter um papel importante na progressão das complicações trombóticas agudas e não apenas no início e evolução (RIVA; DONADINI; AGENO, 2015).

As DCVs são um grupo de doenças que acometem o coração e/ou os vasos sanguíneos provocando distúrbios tromboembólicos, que é a formação local ou a liberação de coágulos (trombos) na circulação sistêmica. Englobam a doença coronariana, doença cerebrovascular, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita, fibrilação atrial (FA), trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP) (OPAS, 2017; SILVA *et al.*, 2020).

Paiva *et al.*, 2021 realizaram um estudo durante a pandemia do novo coronavírus e observaram alta prevalência de COVID-19 nos pacientes hospitalizados com DCV pré-existente. Doenças crônicas podem ser consideradas fatores de risco à infecção por COVID-19 devido a associação a maior morbimortalidade (PAIVA *et al.*, 2021). A inflamação sistêmica e a trombogênese são sintomas causados pelo novo coronavírus por isso os pacientes com complicações da doença receberam anticoagulação durante internação por COVID-19 e após a alta hospitalar (ARMSTRONG *et al.*, 2022).

A combinação dos fatores de risco modificáveis que podem ser prevenidos e os não modificáveis como por exemplo a predisposição genética, influenciam na probabilidade de um indivíduo experimentar um evento trombótico clinicamente significativo. O risco inicial pode ser acentuado por uma variedade de fatores desencadeantes que afetam a tríade de Virchow (LIPPI; PLEBANI, 2010; SARVANANTHAN; DAS, 2012; SILVA *et al.*, 2022).

A teoria proposta da patogênese tromboembólica é referida como tríade de Virchow, que inclui estase venosa, lesão endotelial e hipercoagulabilidade, as quais afetam a homeostase da coagulação (TURPIE; ESMON, 2011; RIVA; DONADINI; AGENO, 2015; CERESETTO, 2016; GIORDANO *et al.*, 2017; PATEL *et al.*, 2017). A estase venosa promove a formação de trombos devido à lentidão na eliminação dos fatores de coagulação ativados. Embora cirurgia ou trauma possam causar diretamente a lesão da parede vascular e ativar a coagulação por meio da exposição do fator tecidual (FT), a lesão profunda da parede do vaso não é uma característica comum em pacientes não cirúrgicos. O estado hipercoagulável promove a formação excessiva de coágulos, estando associado às condições de doenças como câncer, inflamação e insuficiência cardíaca congestiva (TURPIE; ESMON, 2011; GIORDANO *et al.*, 2017). Cirurgia, trauma, imobilidade, período puerperal, uso de hormônios, idade avançada, obesidade, câncer, síndromes coronarianas agudas e FA são fatores de risco e podem ter como consequência TVP, EP e acidente vascular cerebral

(KUBITZA *et al.*, 2005a; REIS, 2012).

A compreensão dos fatores e da fisiopatologia da trombofilia possibilitam a avaliação adequada de risco do paciente para determinar qual medicamento será utilizado na prevenção e/ou terapia dos eventos tromboembólicos. A ativação do sistema de coagulação é a causa primária desses eventos. Os fármacos anticoagulantes que atuam direta ou indiretamente na coagulação, se tornaram a principal estratégia de prevenção e tratamento (CROSS; BOETTNER, 2009; TURPIE; ESMON, 2011; SARVANANTHAN; DAS, 2012; FERNANDES *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2015; MASSARO; LIP, 2016; SHNAYDER *et al.*, 2021).

A gestão clínica do paciente passa pela prevenção primária, tratamento da fase aguda, prevenção da recorrência e/ou tratamento prolongado. As intervenções farmacológicas estão bem estabelecidas há muito tempo e têm duração variável, dependendo da causa do evento inicial; são eficazes, porém as mais tradicionais apresentam alguns inconvenientes (TURPIE; ESMON, 2011; REIS, 2012; SHARMA *et al.*, 2015; CERESETTO, 2016).

3.2 TERAPIA ANTICOAGULANTE ESTABELECIDADA

Os principais anticoagulantes comercializados durante décadas e ainda em uso são os antagonistas da vitamina K (AVKs), incluindo a varfarina, heparina não fracionada (HNF), heparinas de baixo peso molecular (HBPMs) e inibidor indireto do FXa. Cada um desses agentes está bem estabelecido, com eficácia comprovada na prevenção e tratamento de distúrbios tromboembólicos, mas têm desvantagens que tornam a terapia difícil de ser administrada e mantida (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011; FERNANDEZ *et al.*, 2021).

Os anticoagulantes orais, AVKs como a varfarina e o acenocumarol, bloqueiam a regeneração de vitamina K oxidada à forma reduzida, limitando a ativação dos fatores de coagulação II, VII, IX e X e das proteínas C e S, dependentes da vitamina K. Os AVKs eram os únicos anticoagulantes orais disponíveis, bem como os mais frequentemente prescritos. No entanto, têm inúmeras desvantagens, incluindo farmacocinética e farmacodinâmica imprevisíveis, início e deslocamento de ação lentos, janela terapêutica estreita, múltiplas interações entre alimentos e medicamentos e alta variabilidade inter e intraindividual. Além disso, são necessários: o monitoramento regular da coagulação e o ajuste da dose devido aos polimorfismos

genéticos (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011; MUECK *et al.*, 2014).

A heparina não fracionada foi durante muito tempo a terapia padrão para a anticoagulação imediata. A HNF exerce o seu efeito anticoagulante ligando-se e ativando a antitrombina, formando com ela um complexo e inibindo os fatores IIa, IXa, Xa, XIIa e XIIIa. Uma de suas limitações é de ter como alvo vários fatores na cascata de coagulação, além da via de administração parenteral, monitoramento laboratorial frequente da atividade de coagulação e o risco para os pacientes de desenvolverem trombocitopenia induzida por heparina, que é potencialmente fatal (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011).

As HBPMs apesar de terem mecanismo de ação similar das HNFs promovem uma ação inibitória maior sobre o FXa do que em FIIa. Possuem menor risco de causar sangramento, têm boa biodisponibilidade e meia-vida mais longa. No entanto, seu uso permanece limitado pela necessidade de administração parenteral. Tanto a HNF quanto as HBPMs são inibidores indiretos da coagulação e suas atividades são mediadas por cofatores plasmáticos, principalmente a antitrombina (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011).

O fondaparinux é um inibidor indireto do FXa de uso parenteral, tem meia-vida longa (17 horas) e é excretado principalmente por via renal. Não inibe completamente o FXa e não desativa FIIa. Sua eficácia comprovada apoia o conceito de que a inibição do FXa, embora indireta, via antitrombina é um método eficaz de anticoagulação (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011).

As limitações que cercam os aspectos práticos dos anticoagulantes estabelecidos estimularam a busca por novos anticoagulantes orais. Os medicamentos pesquisados deveriam apresentar risco de sangramento reduzido; menos eventos adversos; ausência de interação com outros medicamentos e alimentos; ser de fácil administração; permitir o tratamento domiciliar; possuir custo acessível; serem administrados em doses fixas, ter amplo índice terapêutico e sem necessidade de monitoramento de coagulação de rotina. Além destas condições mencionadas, seria bastante desejável apresentarem um antídoto para reverter a anticoagulação, nos casos de sangramentos extensos e clinicamente relevantes (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2018; FERNANDEZ *et al.*, 2021).

3.3 ANTICOAGULANTES ORAIS DIRETOS

Apesar do conhecimento sobre o sistema de coagulação, sua complexidade apresentou inúmeros obstáculos no caminho para a descoberta e desenvolvimento de anticoagulantes orais. Diversos foram os desafios para que fossem eficazes e seguros com alvo mais racional para a anticoagulação e sem interferência na hemostasia primária (SHARMA *et al.*, 2015). O desenvolvimento de novos produtos se concentrou em classes de anticoagulantes que tivessem como alvo uma enzima específica ou uma etapa da cascata de coagulação. Foram pesquisados inibidores do complexo FT/fator VIIa, inibidores do fator IXa e fator XIa, inibidores diretos do fator IIa (trombina), inibidores diretos e indiretos do FXa, trombomodulina recombinante humana solúvel e proteína C ativada recombinante humana (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011).

O advento dos anticoagulantes orais de ação direta (AODs) ampliou as opções para prevenção e tratamento do tromboembolismo venoso e o controle do risco tromboembólico na fibrilação atrial. Devido ao comportamento farmacocinético previsível possuem vantagens em relação ao uso (SHARMA *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2021). Os AODs foram desenvolvidos para superar as limitações anteriormente citadas e visaram especificamente um único fator de coagulação como o FXa ou fator IIa (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; MUECK *et al.*, 2014).

O principal benefício na prática clínica em relação ao uso destes fármacos é o de não necessitarem de monitorização terapêutica de rotina, principalmente após a alta hospitalar. Além disso, esse tipo de terapia pode ser iniciada sem restrições, diferentemente dos AVKs. Os AODs apresentam farmacocinética linear, rápido início de ação, janela terapêutica ampla, menor potencial para desenvolver interações e bom perfil de segurança, tendo se tornado a atual terapia de escolha. As aplicações, descritas em guias de diversos países e direcionadas para uma variedade de condições clínicas, que vão desde a prevenção até o tratamento de eventos tromboembólicos (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011; KREUTZ, 2012; ZDOVC *et al.*, 2019; FERNANDEZ *et al.*, 2021). Uma desvantagem nesta atual terapia é a falta de experiência com estes fármacos em situações específicas, como overdose ou cirurgia de urgência; a monitorização das concentrações plasmáticas ainda não é considerada uma possibilidade pelos clínicos, além do alto custo desses produtos (DIDERIKSEN; DAMKIER; NYBO, 2017).

Até o momento estão aprovados para comercialização pelas principais agências reguladoras mundiais, incluindo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), quatro AODs: os inibidores diretos da trombina (FIIa), que inclui o etexilato de dabigatrana e os inibidores do FXa: edoxabana, apixabana e rivaroxabana (RXA) (STEFFENELLO-DURIGON *et al.*, 2018; FERNANDEZ *et al.*, 2021). A apixabana e a RXA são os dois anticoagulantes orais mais prescritos; são medicamentos de escolha para profilaxia e tratamento da TVP e EP, bem como para a redução do risco de acidente vascular cerebral e embolia na FA não valvular (DIDERIKSEN; DAMKIER; NYBO, 2017; FERNANDEZ *et al.*, 2021).

O panorama da terapia anticoagulante oral mudou significativamente nos últimos anos e cada vez mais os AODs ou “novos” anticoagulantes são usados na prática clínica em substituição aos anticoagulantes mais antigos (SENNESAEL *et al.*, 2018; SYCHEV *et al.*, 2018; FERNANDEZ *et al.*, 2021). No entanto, preocupações com a eficácia e segurança e variações interindividuais significativas na resposta terapêutica foram observadas após o uso em ambientes do mundo real e fora das condições controladas dos ensaios clínicos (LENOIR *et al.*, 2022).

O sangramento constitui o principal e mais frequente evento adverso que advém da administração dos AODs (SHARMA *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2021). A hemorragia intracraniana, apesar de ser a menos incidente, é a de maior severidade e uma das mais fatais; a gastrointestinal, de maior incidência, é mais comumente observada em pacientes que fazem uso de dabigatrana, seguido pelo uso de rivaroxabana. Por isso, a importância da farmacovigilância pós-comercialização para detectar reações adversas a medicamentos e o impacto da utilização a longo prazo (STEFFENELLO-DURIGON *et al.*, 2018; FERNANDEZ *et al.*, 2021).

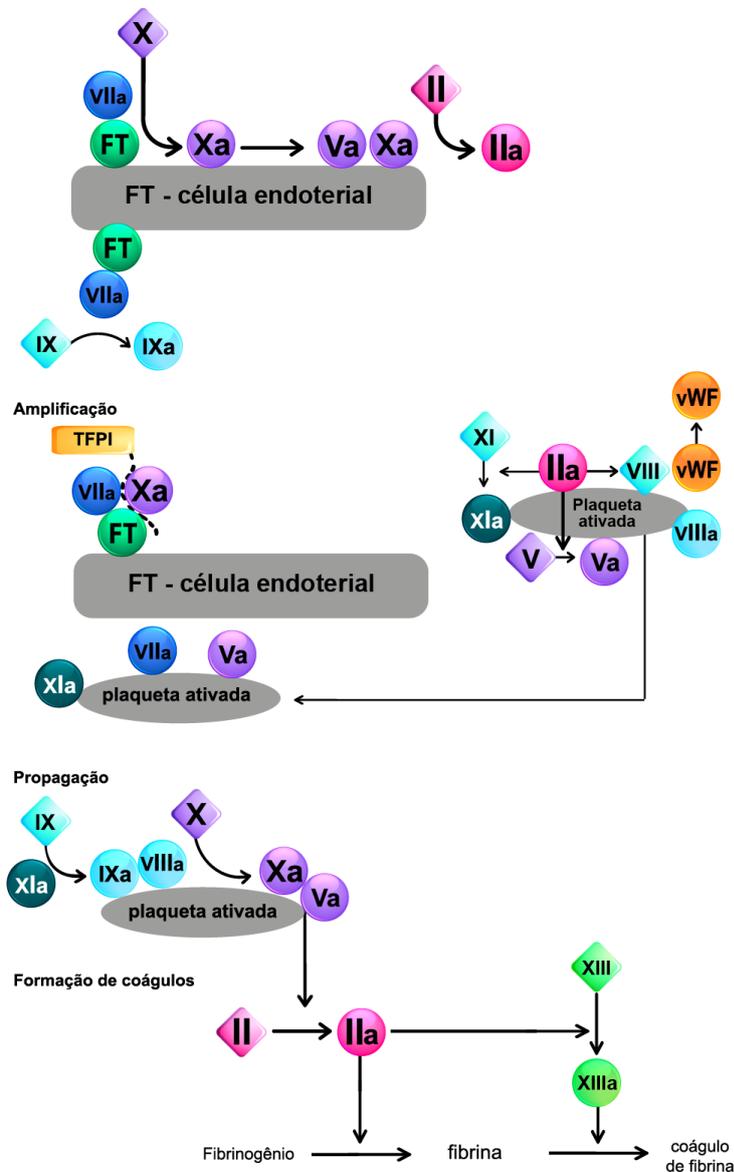
Sobre a reversão do efeito anticoagulante dos AODs, foi desenvolvido um anticorpo monoclonal, o idarucizumabe que é capaz de reverter o efeito anticoagulante da dabigatrana. Posteriormente, foi aprovado para comercialização o andexanet *alfa*, uma proteína cataliticamente inativa do fator humano X, que se liga à RXA e apixabana, revertendo os efeitos e restaurando a atividade da proteína. Mais recentemente, o aripazine que é uma molécula capaz de reverter o efeito anticoagulante de todos os anticoagulantes orais diretos e indiretos podendo ser considerado como antídoto (DUNOIS, 2021; VOLOD *et al.*, 2021).

3.4 FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO

A hemostasia é um processo fisiológico que mantém a fluidez do sangue e é regulado pelo equilíbrio existente entre reações pró-coagulantes e anticoagulantes presentes no organismo, aliado a processo de fibrinólise. Os principais componentes do sistema hemostático são os fatores de coagulação, inibidores da coagulação, plaquetas, componentes da fibrinólise e endotélio vascular. A perda do equilíbrio dinâmico desse sistema tem como consequência clínica o aparecimento de distúrbios hemorrágicos ou trombóticos (TURPIE; ESMON, 2011; HOFFBRAND; MOSS, 2013; PATEL *et al.*, 2016, PATEL, *et al.*, 2017).

O conceito de hemostasia baseado no modelo de superfícies celulares permite melhor entendimento clínico, observado em alguns distúrbios da coagulação. De acordo com esse modelo, o processo hemostático ocorre sobre superfícies celulares distintas, em uma série de três etapas simultâneas: iniciação, amplificação e propagação (FIGURA 1). Durante décadas a cascata de coagulação foi descrita como um modelo de duas vias de iniciação: intrínseca e extrínseca que culminavam na ativação do fator X. Observações experimentais demonstraram que essa hipótese apresentava várias limitações e não refletia a coagulação *in vivo* (TURPIE; ESMON, 2011; PATEL *et al.*, 2016, PATEL *et al.*, 2017).

Figura 1 – Visão geral da coagulação sanguínea



Fonte: Adaptado de TURPIE; ESMON, (2011)

Legenda: FT: fator tecidual; vWF: fator de Von Willebrand; TFPI: inibidor da via do fator tecidual.

As células que circundam a vasculatura são ricas em tromboplastina, que é o fator tecidual (FT), uma proteína transmembrana que age como cofator para o fator VII. A fase de iniciação do processo de coagulação ocorre, quando células que expressam FT em sua superfície, são expostas aos componentes do sangue. A expressão do FT é iniciada por lesão vascular ou por ativação endotelial, através de substâncias químicas, citocinas ou processos inflamatórios. Uma parte do FT tem fator

VII ligado, que é convertido em fator VIIa na presença de cálcio. Esta conversão pode ocorrer via proteases celulares, por autoativação ou pelo FXa gerado pelo complexo FT / fator VIIa, que também ativa pequenas quantidades dos fatores IX e X, tornando-os fatores IXa e Xa. O fator IXa pode se mover da superfície celular para plaquetas próximas ou para outras superfícies. O FXa pode ativar o fator V, mas o fator Va também pode ser secretado pelas plaquetas ativadas. O FXa permanecendo na superfície celular juntamente com o fator V convertem uma pequena quantidade de fator II (protrombina) em fator IIa (trombina), que é fundamental para garantir a iniciação e seguir para a amplificação da coagulação. Se o FXa se dissocia da superfície celular é inativado pela antitrombina e pelo inibidor da via do FT (TURPIE; ESMON, 2011; HOFFBRAND; MOSS, 2013; MONROE; HOFFMAN, 2014; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

A geração primária de trombina não é capaz de efetivar a coagulação; há necessidade de uma geração adicional onde participam os fatores XI, IX e VIII. O fator IXa formado durante a fase de iniciação liga-se à superfície das plaquetas, e também pode se ligar ao fator VIIIa, formado na fase de amplificação, ou a receptor de plaquetas e ser transferido para o fator VIIIa. O complexo tenase, formado por fator IXa/VIIIa, ativa o fator X na superfície das plaquetas. O FXa pode se mover rapidamente para um complexo com fator Va. O complexo protrombinase FXa/Va resultante fornece a explosão rápida de trombina, que produz estrutura adequada de fibrina e resulta em coágulo estável. A formação do FXa na superfície das plaquetas desempenha papel crítico na regulação do processo de coagulação. A taxa de ativação do fator X determina a quantidade de geração de trombina; a geração de trombina nas plaquetas inicia um ciclo de feedback positivo através do fator XI. O fator XI pode ser ativado nas plaquetas pela trombina; esta ativação da trombina é aumentada por polifosfatos liberados das plaquetas. O fator de superfície plaquetária XIa pode ativar o fator IX, levando ao aumento do FXa e gerando grande quantidade de trombina. É provável que a persistência da trombina ligada à fibrina e a capacidade prolongada de gerar trombina sejam mecanismos de proteção para estabilizar os coágulos (TURPIE; ESMON, 2011; HOFFBRAND; MOSS, 2013; MONROE; HOFFMAN, 2014; PATEL *et al.*, 2016; PATEL, *et al.*, 2017).

A trombina gerada leva à ativação do fator XIII, que é estabilizador do monômeros de fibrina. O processo de coagulação deve se limitar ao sítio da lesão para evitar a oclusão trombótica do vaso e para controlar a disseminação da ativação

da coagulação. Nesse processo há intervenção de quatro anticoagulantes naturais, o inibidor da via do fator tecidual, a proteína C, a proteína S e a antitrombina (TURPIE; ESMON, 2011; MONROE; HOFFMAN, 2014; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

A inibição direta do FXa associado ao coágulo se mostrou eficaz na abordagem localizada, para prevenir o crescimento de trombos (TURPIE; ESMON, 2011; SAMAMA *et al.*, 2013). Ainda, também é importante na prevenção da ativação, deposição e recrutamento de plaquetas nos locais de lesão do vaso, evitando a explosão na geração de trombina. Além de não afetar a atividade da trombina pré-formada, permite que funções relacionadas à trombina existente não sejam inibidas, como por exemplo a ativação da proteína C (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2013; SHNAYDER *et al.*, 2021).

3.5 INIBIÇÃO DO FATOR Xa

O fator X tem papel fundamental na hemostasia, porém, a atividade do FXa pode ser suprimida sem afetar significativamente o processo hemostático (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011). O FXa é um fator de coagulação que ocupa o papel central na cascata de coagulação e por esse motivo foi bastante estudado no desenvolvimento dos novos medicamentos anticoagulantes orais (PERZBORN *et al.*, 2010; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; PATEL *et al.*, 2016).

Durante a fase de iniciação o FXa gera quantidade de trombina que ativa os fatores XI, V, VIII e plaquetas, necessários para a formação dos complexos tenase e protrombinase. A ativação do fator X leva à propagação e amplificação da coagulação, sendo que o FXa do complexo protrombinase é mais eficiente do que o FXa livre na ativação da protrombina em trombina (superior a 300 mil vezes), e causa descarga explosiva na geração de trombina (PERZBORN *et al.*, 2010; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; PATEL *et al.*, 2016).

A trombina é a principal enzima envolvida na formação, crescimento e estabilização de trombos. Medeia a conversão de fibrinogênio em fibrina e as ativações de plaquetas, fatores de coagulação e do fator XIII estabilizador do coágulo, resultando na amplificação de sua própria formação (PERZBORN *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2016).

Em comparação com os inibidores de trombina, a inibição do FXa mostrou

menor risco de sangramento, uma vez que o nível de trombina pré-existente e a ativação e agregação de plaquetas não são afetados. Estudos pré-clínicos indicaram que os inibidores do FXa têm janela terapêutica mais ampla do que os inibidores diretos da trombina (PERZBORN *et al.*, 2010; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; PATEL *et al.*, 2016).

A atividade do FXa ligado ao coágulo foi resistente à inibição pela antitrombina, sem necessidade de um cofator, demonstrando a capacidade em inibir diretamente o FXa associado ao coágulo, tornando a abordagem eficaz e altamente localizada para a prevenção da formação, crescimento e estabilização de trombos (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011).

O FXa foi considerado um ótimo alvo a ser pesquisado no processo de desenvolvimento de anticoagulantes diretos orais, uma vez que para catalisar a produção de mil moléculas de trombina é necessária apenas uma molécula deste fator (PERZBORN *et al.*, 2010; TURPIE; ESMON, 2011; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; PATEL *et al.*, 2016). Os inibidores do FXa se ligam diretamente ao sítio ativo desse fator, bloqueando a atividade de coagulação, inibindo a geração de trombina (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2010; BRANDÃO *et al.*, 2018).

3.6 RIVAROXABANA

A rivaroxabana foi o primeiro inibidor oral, de ação direta no FXa, desenvolvido e comercializado como composto sintético. Aprovada para uso clínico em vários países, com as primeiras investigações voltadas para prevenção e tratamento de distúrbios tromboembólicos em cirurgias ortopédicas de grande porte. Os efeitos farmacodinâmicos e a previsibilidade farmacocinética foram demonstrados em estudos pré-clínicos e posteriormente no decorrer dos estudos clínicos em indivíduos saudáveis e pacientes, comprovando ser tão eficaz quanto a terapia anticoagulante padrão (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013).

A RXA pertence à classe derivada da oxazolidinona, assim como o antibiótico linezolidina. Não apresenta grupamento básico na ligação com a enzima FXa, contribuindo para sua alta biodisponibilidade oral (ALI; NAWAL, 2010). Seu nome químico é (S)-5-cloro-N-([2-oxo-3-[4-(3-oxomorfolin-4-il)fenil]oxazolidin-5-

il]metil}tiofeno-2-carboxamida, possui fórmula molecular $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$ e peso molecular de 435,85 g/mol (PERZBORN *et al.*, 2010; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; MUECK *et al.*, 2014). É molécula neutra não-ionizável, com perfil de solubilidade pH-independente (TAKÁCS-NOVÁK *et al.*, 2013); é ligeiramente solúvel em solventes orgânicos e praticamente insolúvel em água. A ligação às proteínas plasmáticas varia entre as espécies e a albumina sérica é a principal componente de ligação circulante (PERZBORN *et al.*, 2010; KREUTZ, 2012; MUECK *et al.*, 2014). No Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) é composto classe 2, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade. Tem coeficiente de partição octanol/água (log P) de 1,5, e exibe lipofilicidade moderada, que reflete em sua afinidade de baixa à moderada para os tecidos periféricos (MUECK *et al.*, 2014).

3.6.1 Mecanismo de ação

A RXA é inibidor de ação direta, seletivo e reversível do FXa, tendo início de atividade rápido. Estudos cinéticos *in vitro* mostraram que a inibição do FXa humano pela RXA foi competitiva (constante inibitória 0,4 nmol/L) com seletividade 10 mil vezes maior para o FXa, do que para outras serinoproteases. Inibe potentemente o FXa, ligado ao complexo protrombinase e associado ao coágulo, prolongando assim o tempo de coagulação. Em plasma humano, inibe a atividade do FXa endógeno de uma maneira dependente da concentração (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; MUECK *et al.*, 2014). Não afeta diretamente a agregação plaquetária induzida por trombina, ADP ou colágeno, mas inibe potentemente a agregação plaquetária induzida por FT de maneira indireta, inibindo a geração de trombina (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; MUECK *et al.*, 2014).

Em contraste com os inibidores indiretos do FXa, a RXA não requer nenhum cofator para exercer seu efeito anticoagulante. Ainda, aumenta a permeabilidade e degradação do coágulo do sangue total, sem inibir a atividade das moléculas de trombina preexistentes (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013;

MUECK *et al.*, 2014). A trombina residual gerada parece ser suficiente para garantir a hemostasia sistêmica, pois tem alta afinidade pelos receptores de plaquetas e quantidades mínimas podem fornecer ativação plaquetária suficiente, contribuindo assim para uma relação eficácia e segurança favorável (PERZBORN *et al.*, 2011).

Quando a RXA é administrada profilaticamente, apresenta efeitos antitrombóticos consistentes em modelos tromboticos venosos e arteriais em camundongos, ratos e coelhos. O tempo de sangramento não aumentou significativamente em doses antitrombóticas eficazes testadas nesses modelos, indicando uma boa relação de eficácia e segurança (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; MUECK *et al.*, 2014).

A RXA não interfere com o sistema de proteína C ativada por trombina-trombomodulina responsável por regular a formação de trombina e conseqüentemente a prevenção de formar trombos (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011).

3.6.2 Efeito biológico na coagulação

Como o FXa atua na junção das vias extrínseca e intrínseca da coagulação, a RXA como inibidora do FXa prolonga tanto o tempo de protrombina (TP) quanto o tempo de trombloplastina parcialmente ativada (TTPa), de forma dependente da concentração (ALI; NAWAL, 2010; PERZBORN *et al.*, 2010; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013). Os efeitos farmacológicos observados nos estudos pré-clínicos e confirmados nos ensaios clínicos, incluindo Fase III em larga escala, foram traduzidos em eficácia clínica e nas indicações como prevenção e tratamento de condições tromboembólicas (KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013).

A inibição máxima do FXa ocorre aproximadamente em 3h (variando de 1 a 4 horas) após a ingestão e é mantida por cerca de 12h (ALI; NAWAL, 2010; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013). No entanto, TP e TTPa não são utilizados para monitorar os efeitos biológicos da RXA na prática clínica, uma vez que o prolongamento destes parâmetros varia significativamente, dependendo de: ensaios de coagulação, reagentes e condições utilizadas (KREUTZ, 2012).

Concentrações plasmáticas de RXA mais elevadas do que o esperado não indicaram um risco aumentado de complicações hemorrágicas, mas podem sinalizar

a necessidade de vigilância para o risco de sangramento (SAMAMA *et al.*, 2013).

3.6.3 Farmacocinética

Os perfis farmacocinéticos da RXA, durante os estudos, em indivíduos saudáveis e pacientes foram previsíveis e proporcionais à dose, demonstrando segurança e tolerabilidade em uma ampla faixa de dosagem (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; MUECK *et al.*, 2014). Embora a dosagem única de RXA possa ter um bom desempenho, estudos clínicos com avaliação farmacocinética em pacientes sugerem grande variabilidade interindividual (EIKELBOOM *et al.*, 2017; XU; GE; JIANG, 2018); A variabilidade interindividual foi relatada como sendo da ordem de 30 a 40% (PERZBORN *et al.*, 2011; MUECK *et al.*, 2014; O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; DUNOIS, 2021; NAKAGAWA *et al.*, 2021; RAYMOND *et al.*, 2021).

A variabilidade intraindividual (entre 20% e 50%) foi dependente do tempo de coleta da amostra e da população estudada. A causa desta variabilidade ainda é desconhecida e pode refletir diferenças na absorção ou metabolismo, interações medicamentosas e outros fatores (SAMAMA *et al.*, 2013; EIKELBOOM *et al.*, 2017).

A associação entre exposição ao medicamento, sangramento e eventos tromboembólicos foi apontada como indicador para o ajuste de dose e consequente melhora dos resultados clínicos (EIKELBOOM, 2017).

A RXA é rapidamente absorvida, atingindo a concentração plasmática máxima (C_{max}) entre 2 e 4 horas após a administração oral em dose única ou múltipla. A biodisponibilidade oral para dose de 10 mg de RXA é de 80 a 100%, independente das condições de jejum ou alimentação (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; MUECK *et al.*, 2014). Em contrapartida, a biodisponibilidade oral para a dose de 20 mg é de 66% em condições de jejum. A biodisponibilidade aproximou-se da totalidade quando um comprimido de 20 mg foi administrado com alimentos, aumentando a área sob a curva (ASC) em 39% e a C_{max} em 76%, ao se comparar com a mesma dose em jejum (KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; STAMPFUSS *et al.*, 2013; MUECK *et al.*, 2014). A presença de alimentos atrasou em 1,25 horas o tempo para atingir a C_{max} (ALI; NAWAL, 2010;

STAMPFUSS *et al.*, 2013). Esse efeito foi observado não apenas para comprimidos, mas também para a suspensão oral, indicando uma propriedade do fármaco, independente da forma farmacêutica (STAMPFUSS *et al.*, 2013). Embora a administração de RXA com alimentos seja necessária para as doses mais elevadas, o conteúdo da refeição (ALI; NAWAL, 2010; STAMPFUSS *et al.*, 2013; MUECK *et al.*, 2014) e o horário não afetam a farmacocinética (ZHANG *et al.*, 2017).

O efeito da alimentação para as doses maiores pode ser explicado como resultado da solubilidade aquosa limitada por diminuição na absorção, além do pH independente da RXA. Enquanto o tempo de residência intestinal parece ser suficiente para a completa dissolução de até 10 mg, a taxa de dissolução *in vivo* é passo limitante para a taxa de absorção, uma vez que foi observada a redução de C_{max} e o atraso do tempo para atingir a concentração máxima (T_{max}) (STAMPFUSS *et al.*, 2013; TAO *et al.*, 2022).

Cerca de 95% do fármaco está ligado reversivelmente às proteínas plasmáticas, predominantemente à albumina impossibilitando sua retirada por diálise (ALI; NAWAL, 2010; MUECK *et al.*, 2014). O volume de distribuição (V_d) no estado estacionário é de aproximadamente 50 litros, indicando sua afinidade de baixa a moderada para os tecidos periféricos e distribuída principalmente no plasma (KREUTZ, 2012; MUECK *et al.*, 2014). Não foi observado acúmulo relevante após múltiplas doses em indivíduos saudáveis. A RXA é distribuída de forma heterogênea aos tecidos e órgãos e não penetra na barreira hematoencefálica, mas é capaz de atravessar a placenta (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; MUECK *et al.*, 2014; NAKAGAWA *et al.*, 2021).

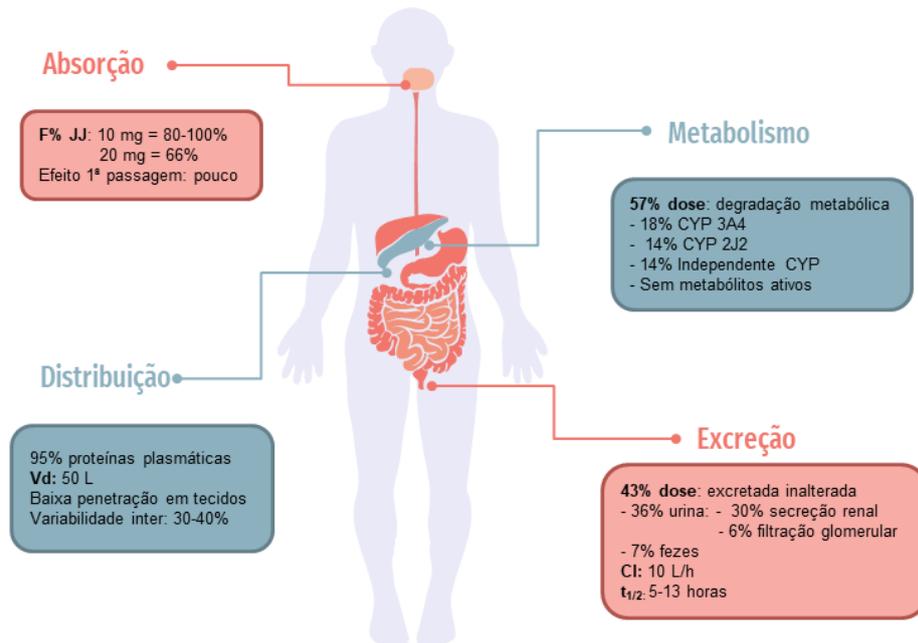
Após uma dose oral de rivaroxabana, 57% da dose sofre degradação metabólica e 43% é excretado como fármaco inalterado, sendo 36% pela urina e 7% pelas fezes. A RXA é metabolizada pelas enzimas do citocromo P450 (CYP) e por mecanismos independentes do CYP, sendo o CYP3A4 responsável por 18% e CYP2J2 por 14% da eliminação total. Além da biotransformação oxidativa, a hidrólise não mediada por CYP das ligações amida é responsável por 14%. Os metabólitos resultantes são eliminados tanto por via renal quanto por via hepatobiliar. A excreção ocorre predominantemente pela via renal (66%) e em menor extensão (28%) pelas vias fecal e biliar. Dos 36% da dose que são eliminados como fármaco inalterado na urina, a secreção renal é responsável por 30% e a filtração glomerular por 6%. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que os transportadores envolvidos na secreção renal ativa

de RXA são a glicoproteína P (P-gp do inglês *P-glycoprotein*) e a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP do inglês *Breast Cancer Resistance Protein*) (ALI; NAWAL, 2010; PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; MUECK; KUBITZA; BECKA, 2013; MUECK *et al.*, 2014; NAKAGAWA *et al.*, 2021).

A RXA é um substrato da P-gp e BCRP (ALI; NAWAL, 2010; HARDER, 2014; AŠIĆ *et al.*, 2018). Devido a RXA ser metabolizada via CYP3A4/5 e CYP2J2 e ser substrato da P-gp e BCRP, o uso concomitante de medicamentos que afetam essas vias são passíveis de interferir na sua farmacocinética (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013).

A RXA inalterada é o principal componente no plasma humano após a administração oral, sem a presença de metabólitos farmacologicamente ativos e significativamente importantes. Tem padrão farmacocinético do tipo bicompartimental, com absorção de primeira ordem e depuração derivada do compartimento central. A eliminação do plasma ocorre com uma meia-vida terminal de 5–9 h em indivíduos jovens saudáveis e 11–13 h em idosos (PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; MUECK *et al.*, 2014). A depuração ou clearance (Cl) após administração intravenosa em indivíduos saudáveis é de aproximadamente 10 L/h, classificada como fármaco de baixa depuração, sem efeito de primeira passagem relevante (MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; PERZBORN *et al.*, 2011; MUECK *et al.*, 2014; ZDOVC *et al.*, 2019). Levando em consideração a alta ligação às proteínas plasmáticas, torna-se evidente a contribuição da secreção ativa para a eliminação renal (MUECK; KUBITZA; BECKA, 2013). A Figura 2 resume a farmacocinética da rivaroxabana em humanos.

Figura 2 – Resumo da farmacocinética da rivaroxabana



Fonte: autor (2023).

Legenda: F%: biodisponibilidade oral; JJ: condições de jejum; Vd: volume de distribuição; Cl: clearance; $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação.

Os inibidores fortes do CYP3A4 e/ou da P-gp e/ou BCRP levaram à redução da eliminação aumentando as concentrações plasmáticas da RXA. Não é recomendada sua utilização em pacientes recebendo essas classes de medicamentos: antifúngicos imidazólicos, antirretrovirais e macrolídeos. Indutores fortes do CYP3A4 podem levar a concentrações plasmáticas reduzidas de RXA e devem ser coadministrados com cautela. A RXA não foi considerada inibidor e nem indutor dessas vias metabólicas (ALI; NAWAL, 2010; PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; MUECK; KUBITZA; BECKA, 2013). As interações medicamentosas com a RXA foram extensivamente avaliadas em combinação com diversos medicamentos, incluindo substratos, inibidores e indutores do CYP3A4 ou da P-gp. Os resultados demonstraram que a combinação com esses agentes pode aumentar as concentrações plasmáticas de RXA *in vivo*, permanecendo a recomendação de cautela quanto a coadministração (FERNANDEZ *et al.*, 2021; LENOIR *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2022).

A influência da função renal na eliminação da RXA foi considerada moderada; neste sentido nenhum ajuste de dose foi recomendado em casos de insuficiência renal

leve ou moderada. No entanto, deve ser usada com cautela em pacientes com insuficiência renal moderada recebendo concomitantemente outros medicamentos. Não é recomendado seu uso em pacientes com clearance de creatinina $< 15 \text{ mL / min}$ (ALI; NAWAL, 2010; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; MUECK *et al.*, 2014).

A insuficiência hepática moderada está associada à diminuição da eliminação de RXA, com aumento na ASC e efeitos esperados na atividade do FXa e em TP. Conseqüentemente, a RXA foi contraindicada em pacientes com doença hepática significativa, associada à coagulopatia, levando a risco de sangramento, clinicamente relevante. Há recomendação de utilização com cautela em pacientes cirróticos, com insuficiência hepática moderada, se não estiver associada à coagulopatia. Em pacientes com outras doenças hepáticas não foi recomendado ajuste de dose (ALI; NAWAL, 2010; KREUTZ, 2012; MUECK *et al.*, 2014).

A RXA mostrou baixa propensão para interações medicamentosas com naproxeno, ácido acetilsalicílico e clopidogrel, porém o risco de sangramento quando se combina anticoagulantes com antiagregantes plaquetários pode aumentar. Nenhuma interação farmacocinética clinicamente relevante foi demonstrada quando da utilização concomitante com atorvastatina, digoxina e midazolam (ALI; NAWAL, 2010; PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012). Os antiácidos e a ranitidina não afetaram os parâmetros farmacocinéticos e efeitos farmacológicos da RXA (ALI; NAWAL, 2010; PERZBORN *et al.*, 2010).

O risco aumentado de sangramento e a ocorrência de eventos tromboembólicos, devido à coadministração com inibidores e indutores de CYP3A e P-gp, respectivamente são relatados cada vez mais na literatura. No entanto, dados clinicamente relevantes do uso de RXA sobre interações medicamentosas e concentrações plasmáticas específicas que levariam as reações adversas ainda são escassos (FERNANDEZ *et al.*, 2021; LENOIR *et al.*, 2022).

No Brasil, assim como em outros países, a RXA é apresentada comercialmente em comprimidos de 2,5, 10, 15 e 20 mg e a dosagem depende da necessidade do paciente. É indicada para prevenção de eventos tromboembólicos, como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e morte cardiovascular em pacientes adultos com doença arterial coronariana ou doença arterial periférica sintomática em alto risco de eventos isquêmicos. Ainda, indicada para prevenção e tratamento de

tromboembolismo venoso, trombose venosa profunda e embolia pulmonar em pacientes adultos. É recomendada para prevenção de acidente vascular cerebral e embolia sistêmica em pacientes adultos com fibrilação atrial não-valvular que apresente um ou mais fatores de risco, como insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão, 75 anos de idade ou mais, diabetes mellitus, acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório anteriores. Na população pediátrica é usada para o tratamento e prevenção de tromboembolismo venoso em crianças e adolescentes com menos de 18 anos com peso igual ou superior a 30 kg após o início do tratamento padrão de anticoagulação (XARELTO, 2022).

3.7 MONITORAMENTO DOS INIBIDORES DIRETOS DO FATOR Xa

O uso dos anticoagulantes orais de ação direta cresceu exponencialmente na última década; segundo dados da IQVIA (do inglês *Quintiles e IMS Health, Inc.*) aponta o Xarelto[®], nome comercial do medicamento de referência de RXA, como o de maior crescimento em vendas no Brasil e no mundo, refletindo a incidência e prevalência das DCVs (GUIA DA FARMÁCIA, 2019). Com seu uso cada vez maior, tornou-se evidente que a avaliação dos níveis desse fármaco, por ensaios laboratoriais confiáveis mostra-se necessária em certos cenários clínicos (GOSELIN; GRANT; ADCOCK, 2016; PLATTON; BOWLES; MACCALLUM, 2017; VOLOD *et al.*, 2021).

Embora o monitoramento laboratorial de rotina e o ajuste da dose na terapia com RXA não sejam mandatários, com base nas informações farmacocinéticas e em efeito biológico disponíveis, a mensuração dos níveis do fármaco ou do efeito anticoagulante pode ser útil em situações específicas. Destacam-se a vigilância de risco, como no início do tratamento, antes de procedimentos cirúrgicos ou invasivos, durante a ocorrência de eventos hemorrágicos ou trombóticos, no acúmulo do fármaco em tratamento a longo prazo abrangendo pacientes com peso corporal extremo, insuficiência hepática ou renal, nas interações medicamentosas, suspeita sobredosagem ou sempre que a reversão imediata da coagulação for necessária (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2010, 2013; SAMAMA *et al.*, 2013; TRIPODI, 2013; CUKER *et al.*, 2014; EIKELBOOM *et al.*, 2017; SAMUELSON *et al.*, 2017; DUNOIS, 2021; VOLOD *et al.*, 2021).

O ensaio ideal para monitorar as concentrações dos anticoagulantes clinicamente relevantes, depende da disponibilidade do teste no local de atendimento,

do nível de informação necessária, podendo ser presença ou concentração do fármaco, sensibilidade e tempo de resposta do resultado (TRIPODI, 2013; CUKER *et al.*, 2014; EIKELBOOM *et al.*, 2017; DUNOIS, 2021). A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica padrão ouro para o monitoramento terapêutico de medicamentos pois determina a concentração plasmática de um fármaco. As técnicas de ensaio para medir anticoagulantes incluem aquelas baseadas em coágulos como os ensaios cromogênicos e imunoenzimáticos. A intensidade da coagulação não quantifica as concentrações plasmáticas de um anticoagulante. Pacientes com outras patologias associadas aos eventos tromboembólicos, podem sofrer interferência nos resultados de seus exames de coagulação (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2010).

A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS do inglês *Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*) possui alto grau de especificidade e sensibilidade e é considerada a técnica ideal para quantificar as concentrações plasmáticas de RXA, mas esse tipo de equipamento está disponível apenas em laboratórios de referência ou de pesquisa e é impraticável para uso clínico de rotina (CUKER *et al.*, 2014; SAMUELSON *et al.*, 2017; DUNOIS, 2021).

Os ensaios cromogênicos estão disponíveis comercialmente, mas não em todos os laboratórios e hospitais. São mais caros que os testes coagulométricos usuais e se mostraram sensíveis e específicos com medidas exatas e precisas. Requerem o uso de calibradores contendo o fármaco em questão e foram validados através de comparações com os resultados de UHPLC-MS/MS. A avaliação das concentrações de RXA deve ser interpretada em relação ao momento da administração do medicamento e as coletas das amostras, de acordo com o perfil farmacocinético (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2010, 2013; SAMAMA *et al.*, 2013).

Devido à RXA inibir diretamente a atividade do FXa e, a inibição estar correlacionada com as concentrações plasmáticas, os ensaios cromogênicos anti-FXa, quando usados com calibradores e controles específicos, são capazes de medir ampla faixa de concentração, cobrindo os níveis esperados após a dosagem terapêutica. A extensão da inibição do FXa é determinada medindo a capacidade do anticoagulante de clivar um cromóforo do substrato do FXa adicionado à amostra, a mudança de cor é inversamente proporcional a concentração do fármaco (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2010, 2013; SAMAMA *et al.*, 2013; CUKER *et al.*, 2014; SAMUELSON *et al.*, 2017; DUNOIS, 2021).

O tempo de protrombina (TP) é um teste de coagulação amplamente disponível que pode ser usado para medir a integridade das vias extrínseca e comum. Inibidores ou deficiências de fatores de coagulação dentro dessas vias causam o seu prolongamento (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2010, 2013). O prolongamento de TP se correlaciona diretamente com as concentrações plasmáticas de RXA; como a meia-vida é relativamente curta, o prolongamento de TP é de curta duração também e se altera ao longo do dia (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2010, 2013; VAN BLERK *et al.*, 2015; SAMUELSON *et al.*, 2017). A presença ou ausência do efeito anticoagulante da RXA pode ser confirmada após a realização de TP medido em segundos, desde que seja utilizado reagente sensível a este fármaco e, que o TP inicial do paciente tenha valores incluídos em valores de referência (SAMAMA *et al.*, 2013).

O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) mede a formação de coágulos de fibrina refletindo a ativação da via intrínseca e os resultados são expressos em segundos. Inibidores ou deficiências de fatores de coagulação nesta via resultam no prolongamento do TTPa. A RXA inibe diretamente a atividade do FXa e, conseqüentemente inibe a geração de trombina, prolongando assim o TTPa. Da mesma forma que o TP, o prolongamento de TTPa induzido pela RXA é de curta duração, tem correlação com a concentração do fármaco no organismo e varia significativamente entre os diferentes reagentes (LINDHOFF-LAST *et al.*, 2010, 2013; SAMAMA *et al.*, 2013; SAMUELSON *et al.*, 2017).

Os consensos internacionais sugerem que os laboratórios de análises clínicas conheçam a sensibilidade de seus ensaios ao anticoagulante de interesse e, portanto, sejam capazes de direcionar a equipe clínica sobre a interpretação dos resultados (TRIPODI, 2013; VOLOD *et al.*, 2021). Embora os resultados destes ensaios não possam ser utilizados para indicar uma medida precisa, a utilização para estimativas clinicamente relevantes do estado de anticoagulação de um paciente poderia ser recomendada (SAMAMA *et al.*, 2013; VAN BLERK *et al.*, 2015; SAMUELSON *et al.*, 2017; THOM *et al.*, 2018; DUNOIS, 2021). Esses métodos têm alto rendimento e estão disponíveis rotineiramente em todos os laboratórios clínicos e hospitalares, conferindo um importante benefício no caso de emergências para subsidiar decisões médicas (GOSSELIN; GRANT; ADCOCK, 2016; DUNOIS, 2021).

Embora o risco de sangramento não tenha sido avaliado em ensaios clínicos, é importante para o conhecimento do clínico em procedimentos urgentes ou em casos de risco de eventos adversos. Nenhuma recomendação baseada em evidências para

medição das concentrações do fármaco, testes de coagulação, padronização de ensaios ou faixas terapêuticas foi claramente estabelecida para a RXA até o momento (DUNOIS, 2021).

3.8 FATORES QUE INFLUENCIAM NA RESPOSTA AOS FÁRMACOS

É cada vez mais reconhecido que os indivíduos respondem de formas diferentes aos medicamentos. Apesar da variabilidade na resposta ser bem conhecida, sua causa não está totalmente estabelecida, mas é de grande importância tanto no desenvolvimento de novos medicamentos quanto na possível retirada do mercado após a comercialização (ZHOU *et al.*, 2018; ROLLINSON; TURNER; PIRMOHAMED, 2020). As reações adversas a medicamentos (RAMs) representam causas de morbidade e mortalidade, permanência hospitalar e custo econômico. Com a otimização do regime terapêutico selecionado, a maioria das RAMs poderiam ser evitáveis. Por outro lado, um elevado percentual de pacientes que seguem o tratamento farmacológico sofrerá falha terapêutica, devido a erros na escolha do tratamento mais adequado ou no ajuste da dose (ROLLINSON; TURNER; PIRMOHAMED, 2020; SCUDELER; RODRIGUES-SOARES, 2021).

A variabilidade interindividual na resposta ao medicamento pode ocorrer como resultado de alterações moleculares em diversas proteínas envolvidas nos processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, como nas enzimas metabolizadoras, transportadores, alvos e receptores de fármacos afetando o sucesso da farmacoterapia (KOBAYASHI *et al.*, 2005; IEIRI, 2012; JOHNSON; CAVALLARI, 2013; GOUIN-THIBAUT *et al.*, 2017; O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; HIRA; TERADA, 2018; TSENG *et al.*, 2018; ROLLINSON; TURNER; PIRMOHAMED, 2020).

A maioria dos estudos sobre alterações moleculares enfocou o impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs do inglês *Single Nucleotide Polimorphism*) na expressão e função dessas proteínas, que é uma forma de variação genética bastante comum. Os SNPs são diferenças em um nucleotídeo que é substituído por outro ao longo da sequência do DNA (KOBAYASHI *et al.*, 2005; KATSONIS *et al.*, 2014; HIRA; TERADA, 2018; ROLLINSON; TURNER; PIRMOHAMED, 2020; SCUDELER; RODRIGUES-SOARES, 2021).

A farmacogenética estuda a relação entre os polimorfismos genéticos e a variabilidade interindividual na resposta aos fármacos. Seu objetivo é usar as

informações genóticas dos pacientes para aumentar a eficácia e segurança dos tratamentos aplicando seu conceito na prática clínica e possibilitando a implementação da medicina personalizada (LEE *et al.*, 2013; O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; TSENG *et al.*, 2018; ROLLINSON; TURNER; PIRMOHAMED, 2020; SCUDELER; RODRIGUES-SOARES, 2021). O termo medicina de precisão tem sido cada vez mais usado para incluir o uso de informações genéticas a fim de desenvolver um plano de tratamento individualizado baseado na variabilidade pois reconhece que cada indivíduo é único e que não existe uma resposta uniforme ao tratamento (CAVALLARI; SHIN; PERERA, 2011; JOHNSON; CAVALLARI, 2013; O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; AŠIĆ *et al.*, 2018; HIRA; TERADA, 2018; ROLLINSON; TURNER; PIRMOHAMED, 2020; SCUDELER; RODRIGUES-SOARES, 2021).

Por meio de testes específicos é possível prever como determinado paciente responde a um tratamento, permitindo ao clínico a escolha do medicamento mais adequado, bem como sua dose e duração do efeito. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares de alto rendimento, o número de biomarcadores farmacogenéticos descritos cresceu exponencialmente (O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; TSENG *et al.*, 2018; SCUDELER; RODRIGUES-SOARES, 2021).

Os polimorfismos que afetam a farmacocinética e/ou efeitos biológicos dos fármacos, seja por alteração da expressão da atividade nos locais de ligação do fármaco, por afetarem a estabilidade do RNA mensageiro ou por modificarem a estrutura física das proteínas codificadas, têm como consequência à redução ou aumento da atividade proteica. A variável farmacocinética mais utilizada neste tipo de estudo é a área sob a curva em função do tempo. A ASC é uma medida quantitativa da exposição do organismo a uma substância ativa e representa uma boa ferramenta para comparar perfis farmacocinéticos. Além disso, está relacionada à eficácia terapêutica e à toxicidade (KATSONIS *et al.*, 2014).

No entanto, são várias as razões para a dificuldade de implementação clínica da farmacogenética (O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; TSENG *et al.*, 2018; ROLLINSON; TURNER; PIRMOHAMED, 2020; SCUDELER; RODRIGUES-SOARES, 2021). A complexidade de algumas doenças e das variações dos genes e os custos associados, podem tornar potenciais barreiras de incorporação da farmacogenética como prática habitual no diagnóstico e tratamento (O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; TSENG *et al.*, 2018; ROLLINSON; TURNER; PIRMOHAMED, 2020).

Tanto a US-FDA (do inglês *United States Food Drug Administration*) quanto a

EMA (do inglês *European Medicines Agency*) incorporaram informações sobre farmacogenética nas bulas de medicamentos registrados e comercializados, com diferentes níveis de evidência, sendo acessíveis a pacientes e profissionais de saúde (ROLLINSON; TURNER; PIRMOHAMED, 2020).

3.9 FARMACOGENÉTICA E OS ANTICOGULANTES ORAIS DIRETOS

A escolha do anticoagulante com eficácia e segurança na terapia é uma tarefa difícil, pois a variabilidade pode estar relacionada a polimorfismos de genes que codificam as proteínas responsáveis pela ativação, transporte e/ou metabolismo dos AODs (BAKER; CHAMBERLIN, 2014; RAYMOND *et al.*, 2021; SHNAYDER *et al.*, 2021).

A pesquisa farmacogenética na área de anticoagulação é baseada principalmente em estudos de associação genômica ampla que têm o objetivo de conectar variantes genéticas, como os biomarcadores SNPs, a um fenótipo específico expresso pelo paciente (ASIC *et al.*, 2018; CULLELL *et al.*, 2018; KANURI; KREUTZ, 2019). Dada a indisponibilidade de parâmetros de monitoramento de rotina com esses agentes, os protocolos de medicina de precisão são desejados, mas são poucos os dados publicados (CAVALLARI; SHIN; PERERA, 2011; CULLELL *et al.*, 2018; HIRA; TERADA, 2018; RAYMOND *et al.*, 2021).

Além do polimorfismo do CYP, o polimorfismo para transportadores, como a P-gp e a BCRP que demonstraram ter um papel chave na regulação dos níveis sanguíneos dos AODs, estão cada vez mais reconhecidos do ponto de vista farmacogenético (IEIRI, 2012; O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; AŠIĆ *et al.*, 2018).

3.10 POLIMORFISMO DE ENZIMAS METABOLIZADORAS

3.10.1 CYP 3A4 e CYP 3A5

O citocromo P450 (CYP) são hemoproteínas localizadas principalmente na superfície do retículo endoplasmático, a expressão hepática e em epitélio intestinal é abundante. As enzimas CYP de 1 a 3 são responsáveis por cerca de 75% a 80% do metabolismo de fármacos na Fase I (SEVRIOUKOVA; POULOS, 2013; ZANGER; SCHWAB, 2013).

Os genes *CYP3A4* e *CYP3A5* compartilham grande homologia na sequência de aminoácidos, razão pela qual têm especificidade para substratos semelhantes. Portanto, alguns medicamentos metabolizados por *CYP3A4*, como a RXA, também são parcialmente metabolizados por *CYP3A5*, embora esse último seja minoritário (LEE *et al.*, 2013; SAIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

Foi demonstrado que as enzimas CYP apresentaram variação genética entre os indivíduos, com deficiências ocorrendo em 1 a 30% das populações dependendo da etnia (LEE *et al.*, 2013), o que pode alterar a atividade catalítica da enzima (SEVRIOUKOVA; POULOS, 2013; ZANGER; SCHWAB, 2013). Porém, foi estimado que a sua contribuição para a variabilidade interindividual seja baixa mas não é irrelevante na resposta atípica para alguns medicamentos (SAIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

Sychev *et al.*, (2018) demonstraram que a atividade do *CYP3A4* não tem influência na eficácia do tratamento da RXA, mas afetaram as concentrações máximas e mínimas desse fármaco. Os autores afirmaram que o *CYP3A4* desempenha o papel principal no metabolismo da RXA pois há correlação entre a atividade da enzima e a concentração do fármaco. O que contradiz os achados recentes publicados por Zhao *et al.*, (2022), os quais encontraram o *CYP2J2* como a isoforma dominante no metabolismo da RXA.

Nakagawa *et al.*, (2021) avaliaram o impacto do SNP relacionado ao *CYP3A5*3* nas concentrações plasmáticas mínimas de RXA e não encontraram influência dessa variante. Embora o *CYP3A4*22* esteja associado à atividade reduzida da enzima, os autores optaram por não avaliar esse polimorfismo devido a estudos anteriores não reportarem esse alelo na população japonesa.

Lenoir *et al.*, (2022) investigaram o impacto dos genótipos e fenótipos *CYP3A*

e P-gp nas concentrações sanguíneas de RXA em pacientes hospitalizados em uso dessa medicação. Os pacientes foram classificados em metabolizadores lentos, intermediários, normais ou extensivos e ultrarrápidos. Não foram encontrados impactos relevantes dos fenótipos e genótipos na exposição a RXA.

3.10.2 CYP2J2

O *CYP2J2* é expresso em níveis elevados no coração, especialmente em miócitos cardíacos e em células endoteliais, e em níveis mais baixos nos pulmões, trato gastrointestinal e pâncreas, bem como em regiões cerebrais (BERLIN *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013; ZANGER; SCHWAB, 2013; ZHANG *et al.*, 2016). Está envolvido no metabolismo de Fase I de várias substâncias exógenas com ampla diversidade estrutural e algumas compartilhadas com o *CYP3A4* (BERLIN *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016; SOLANKI *et al.*, 2018; SHNAYDER *et al.*, 2021).

Nakagawa *et al.*, (2021) relataram que o polimorfismo *CYP2J2**7 não influenciou significativamente a concentração plasmática mínima de RXA em estudo de dose múltipla.

Zhao *et al.*, (2022) compararam as contribuições dos *CYP3A4* e *CYP2J2* no metabolismo da RXA. Os pesquisadores desse trabalho identificaram em seus estudos a predominância do *CYP2J2* na hidroxilação da RXA com contribuição de 41,1%, superior à de 27,3% do *CYP3A4*. Os autores sugerem que o *CYP2J2* pode estar intimamente relacionado à segurança da RXA, apesar de ser uma isoforma menos abundante no metabolismo de fármacos, inferior a 1%.

3.11 POLIMORFISMO DE TRANSPORTADORES

Os transportadores de membrana são proteínas responsáveis pela absorção, distribuição e eliminação de substâncias endógenas e xenobióticos. Os transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC do inglês *ATP-binding cassette*) são membros de uma família de proteínas capazes de realizar o influxo e efluxo de substratos através da membrana celular com gasto de energia. Assim como nas enzimas metabolizadoras, os polimorfismos de ocorrência natural também foram reconhecidos em genes transportadores ABC (IEIRI, 2012; MCLEAN; WILSON; KIM,

2016; CHEN *et al.*, 2019).

Os transportadores ABC são expressos na maioria dos tecidos em humanos e desempenham papéis protetores de redução da absorção do fármaco pelo trato gastrointestinal, aumento da eliminação na bile e urina e impedimento da entrada de substâncias no sistema nervoso central e na placenta (IEIRI, 2012; GONG; MANSELL; KIM, 2013; MCLEAN; WILSON; KIM, 2016; CHEN *et al.*, 2019). Polimorfismos genéticos podem alterar a função dos transportadores e configurar mudanças nos perfis farmacocinéticos de fármacos que são seus substratos (IEIRI, 2012; MCLEAN; WILSON; KIM, 2016; SENNESAEEL *et al.*, 2018). A RXA é substrato da P-gp e BCRP, as quais pertencem à família dos transportadores ABC (IEIRI, 2012; GONG; MANSELL; KIM, 2013; SENNESAEEL *et al.*, 2018).

3.11.1 Glicoproteína P (P-gp)

O gene *ABCB1* codifica a P-gp que é membro da superfamília de transportadores ABC que utilizam a energia de ligação e hidrólise do ATP para transportar substratos através das membranas celulares (CAVALLARI; SHIN; PERERA, 2011; IEIRI, 2012). Diversos SNPs foram identificados em éxons e região promotora, os mesmos foram associados à alteração farmacocinética de seus substratos (HOFFMEYER *et al.*, 2000; CAVALLARI; SHIN; PERERA, 2011).

A atividade da P-gp no controle do transporte de fármaco depende do nível de expressão do gene que controla a quantidade de proteína que é sintetizada, da sua funcionalidade que determina quais são os substratos reconhecidos e transportados e com que eficiência. Muitos fármacos são substratos da P-gp, portanto o grau de expressão e a funcionalidade do produto do gene podem afetar diretamente a farmacocinética de tais substâncias (HOFFMEYER *et al.*, 2000; IEIRI, 2012), mas nem todos os substratos são afetados (MCLEAN; WILSON; KIM, 2016).

A P-gp é expressa no epitélio do intestino delgado e grosso, glândula suprarrenal, placenta, rins, fígado, pâncreas e células endoteliais capilares do encéfalo e dos testículos. Há uma sobreposição na especificidade do substrato e na distribuição tecidual entre a P-gp e os CYPs 3A4 / 5 (IEIRI, 2012).

A expressão de *ABCB1* na membrana apical dos enterócitos limita a absorção, enquanto sua localização na membrana luminal dos hepatócitos e células tubulares renais aumenta a excreção biliar e renal, respectivamente. Em pacientes em uso de

RXA, a expressão da proteína ABCB1 nas células tubulares renais parece ser importante, uma vez que mais de um terço da dose é eliminada inalterada na urina (SENNEAEL *et al.*, 2018).

Gong; Mansell; Kim, (2013) demonstraram que a depuração de RXA foi significativamente reduzida em camundongos *knockout*, sem as expressões dos genes *ABCB1* e *ABCG2*.

Lorenzini *et al.*, (2016) descreveram um caso de hemorragia em um paciente tratado com RXA. A presença homozigótica dos alelos variantes *ABCB1* 2677–3435 (T/T) poderiam ter contribuído para a alteração na eliminação do fármaco e o aumento do risco de complicações hemorrágicas. O que está de acordo com os resultados destacados por Raymond *et al.*, (2021) onde foram encontradas C_{max} e ASC mais elevadas para esses genótipos homozigóticos. Esta observação contradiz com os resultados de Sychev *et al.*, (2019) que não encontraram diferenças significativas na C_{max} de RXA no estado de equilíbrio entre haplótipos mutantes e haplótipos selvagens do gene *ABCB1*. Resultados semelhantes foram publicados por Sennesael *et al.*, (2018), mostrando que as variações nos SNPs 1236 C>T, 2677 G>T, 3435 C>T e 1199 G>A do gene *ABCB1* não afetaram significativamente o acúmulo intracelular de RXA em comparação com o tipo selvagem e que provavelmente não contribuem para a variabilidade interindividual de RXA.

Participantes de pesquisa saudáveis foram genotipados em um estudo de Gouin-Thibault *et al.*, (2013) para os dois SNPs 2677 G>T e 3435 C>T mais estudados. Os resultados não mostraram aumento estatisticamente significativo nas C_{max} e ASC de RXA e não puderam ser consideradas como determinantes da variabilidade individual na farmacocinética desse fármaco. Nakagawa *et al.*, (2021) investigaram o impacto dos três SNPs 1236 C>T, 2677 G>T, 3435 C>T e não encontram resultado significativo nas concentrações mínimas de RXA concluindo que esses genótipos de *ABCB1* não contribuem para a variabilidade interindividual da RXA.

Zdovc *et al.*, (2019) foram os primeiros a observar diminuição na expressão do *ABCB1* após a cirurgia ortopédica, demonstrando uma correlação positiva entre a expressão do gene e a depuração de RXA. O que está de acordo com publicações sobre o envolvimento da P-gp na farmacocinética de RXA, mas a influência do polimorfismo na variabilidade do fármaco foi inconclusiva, consistente com os estudos anteriormente citados. A expressão de proteínas transportadoras de RXA pode ser

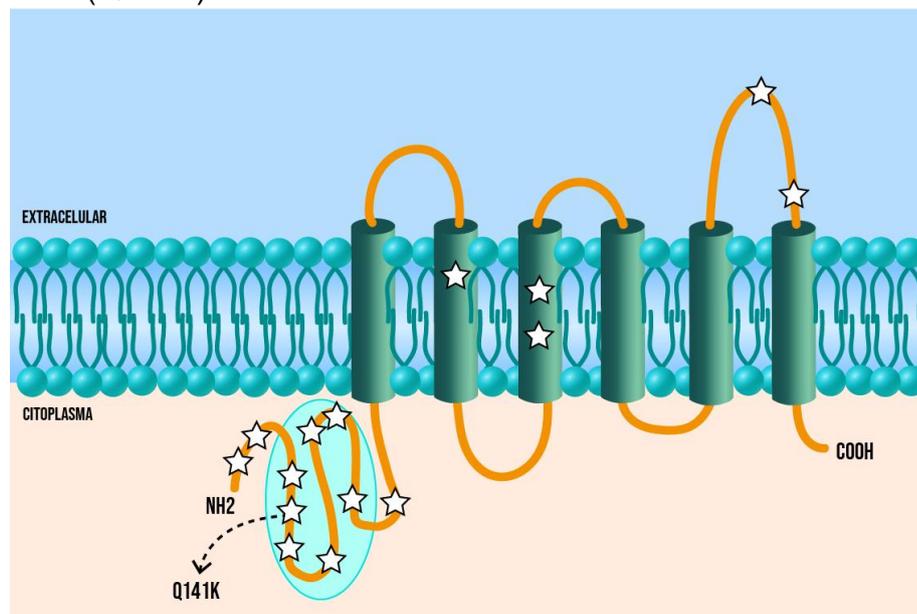
influenciada por SNPs do gene *ABCB1*, mas as informações sobre seu significado clínico ainda são inconsistentes (SHNAYDER *et al.*, 2021). No entanto, não há consenso sobre as consequências funcionais desses polimorfismos na função da P-gp (NAKAGAWA *et al.*, 2021; RAYMOND *et al.*, 2021).

Lenoir *et al.*, (2022) investigaram interações genótípicas em SNPs de interesse para *ABCB1* e concluíram que a atividade fenotípica da P-gp afeta a exposição à RXA, mais do que polimorfismos e poderia ser relevante na exposição para o ajuste de dose. Os pesquisadores mencionaram o fato da RXA ser também um substrato da BCRP codificada pelo gene *ABCG2* e sugeriram a medição da expressão dessa proteína ou avaliação por genotipagem a fim de complementar as descobertas sobre o impacto dos polimorfismos.

3.11.2 Proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP)

Em contraste com outros transportadores ABC, a BCRP tem apenas uma região de ligação ao ATP, sendo considerada meio-transportador e pode formar um homodímero ao atuar no transporte de fármacos (FIGURA 3) (CHEN, *et al.*, 2019).

Figura 3 - Estrutura da proteína ABCG2 contendo seis domínios transmembrânicos e região de ligação do ATP onde se localiza o polimorfismo estudado 421 C>A (Q141K)



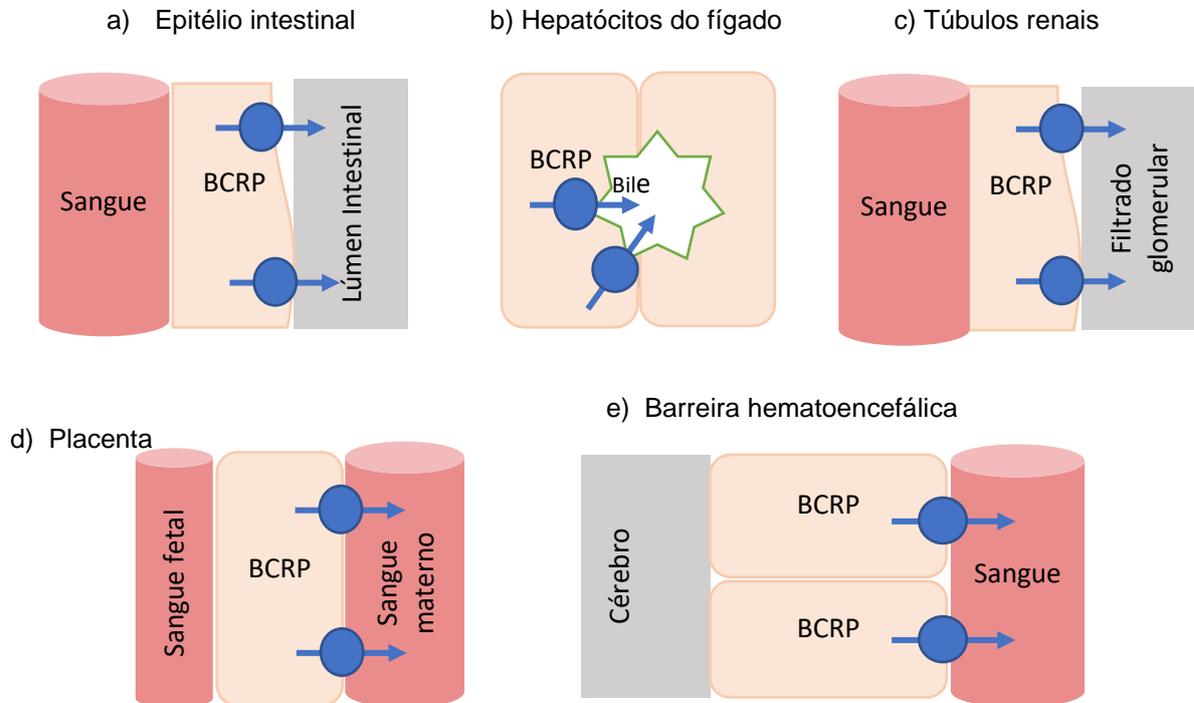
Fonte: Adaptado de CHEN *et al.*, 2019

Legenda: NH2: porção amino terminal; COOH: porção carboxi terminal; Q141K: polimorfismo do gene estudado; ATP: adenosina trifosfato

Igualmente denominada ABCG2, a BCRP é o segundo membro da subfamília G dentro da superfamília de transportadores humanos ABC, (MAO; UNADKAT, 2015; HIRA; TERADA, 2018; CHEN, *et al.*, 2019). A BCRP transporta moléculas polares endógenas e naturais, íons orgânicos conjugados, além de quimioterápicos. É um transportador de substrato com sobreposição considerável, mas não completa com a P-gp (IEIRI, 2012; MAO; UNADKAT, 2015; MCLEAN; WILSON; KIM, 2016; HIRA; TERADA, 2018).

A BCRP é expressa nas membranas celulares apicais do trato gastrointestinal, fígado, rins, sistema nervoso central, tecido mamário, testículos, ovários, glândulas adrenais e placenta como mostra a Figura 4 (MAO; UNADKAT, 2015; FOHNER *et al.*, 2017; HIRA; TERADA, 2018; CHEN *et al.*, 2019).

Figura 4 – BCRP humana localizada apicalmente nas membranas celulares como as células epiteliais do intestino delgado (a), domínio canicular dos hepatócitos no fígado (b), células dos túbulos renais (c), sinciciotrofoblastos na placenta (d) e células endoteliais (e)



Fonte: Adaptada de CHEN *et al.*, 2019.

Legenda: BCRP: proteína de resistência ao câncer de mama (do inglês *Breast Cancer Resistance Protein*).

Devido à sua ampla distribuição, possui importantes funções na proteção de tecidos e células contra xenobióticos e na manutenção da homeostase de substratos fisiológicos. No trato gastrointestinal é expressa em níveis elevados, principalmente no intestino delgado, limitando a absorção oral de substratos; também é expressa na membrana canicular hepática e, portanto, pode contribuir para a excreção biliar de medicamentos. Nos rins, está localizada nas membranas da borda em escova nos túbulos proximais, sugerindo um potencial envolvimento na secreção renal de substâncias (IEIRI, 2012; MAO; UNADKAT, 2015; HIRA; TERADA, 2018).

O gene *ABCG2* que codifica a BCRP consiste em 16 éxons e 15 íntrons e está localizado no cromossomo 4 na posição 4q22.1, codificando proteína de membrana de 72 kDa composta por 655 aminoácidos (MAO; UNADKAT, 2015; FOHNER *et al.*, 2017; HIRA; TERADA, 2018). Alguns SNPs foram identificados no gene *ABCG2*, resultando em alterações sinônimas e não sinônimas. As variantes mais comuns e amplamente estudadas são 34 G>A (rs2231137), que resulta em substituição do

aminoácido valina em metionina na posição 12; localizada no éxon 2 e não afeta a expressão, localização e função da BCRP. A variante não sinônima 421 C>A (rs2231142) no éxon 5, resultando em alteração do aminoácido glutamina para lisina, também conhecida como Q141K (IEIRI, 2012; MAO; UNADKAT, 2015; MCLEAN; WILSON; KIM, 2016; FOHNER *et al.*, 2017; HIRA; TERADA, 2018). Essa variante reduz a expressão da proteína e exibe atividade de efluxo mais baixa, podendo afetar a farmacocinética, eficácia e toxicidade de compostos que são seus substratos (IEIRI, 2012; MAO; NADKAT, 2015; MCLEAN; WILSON; KIM, 2016; FOHNER *et al.*, 2017; O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; HIRA; TERADA, 2018; SHNAYDER *et al.*, 2021).

O gene *ABCG2* é importante mediador do transporte de fármacos no intestino e no túbulo renal e as suas variantes genéticas implicam em transporte reduzido de seus substratos (IEIRI, 2012; O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; SHNAYDER *et al.*, 2021). O SNP rs2231142 tem frequência alélica maior que 10% na população global, sendo mais alta em asiáticos (FOHNER *et al.*, 2017; HIRA; TERADA, 2018; SENNESAEEL *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2019). De acordo com os dados do projeto 1000 genomas, a frequência de rs2231142 é de 29,1% e 9,7% no leste e sul asiáticos, respectivamente. A frequência do alelo menor foi de 14,1% para os nativos americanos, 6,1% europeus e 1,3% africanos. Assim, esse SNP com ampla variabilidade étnica, é considerado o polimorfismo mais importante clinicamente (FOHNER *et al.*, 2017; HIRA; TERADA, 2018; SENNESAEEL *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2019).

Em modelos de camundongos *knockout*, a ausência desse gene foi associada à diminuição significativa da depuração de RXA (IEIRI, 2012; O'CONNOR; KIERNAN; YAN, 2017; SHNAYDER *et al.*, 2021). Nakagawa *et al.*, (2021) investigaram o impacto do polimorfismo 421 C>A em concentrações de RXA, para pacientes com fibrilação atrial. Os resultados das frequências absolutas obtidas foram 421 C>A (C/C:C/A:A/A) 45:37:4, mas sem correlações entre o gene *ABCG2* e o fármaco em questão.

Estudos farmacogenéticos mostraram que os valores de ASC, após a administração oral de fármacos que são substratos BCRP, são significativamente maiores em indivíduos homocigotos para o polimorfismo 421AA do que em indivíduos do tipo selvagem 421CC. A atividade de transporte intestinal de BCRP *in vivo* é aproximadamente 23% maior em indivíduos homocigotos para o alelo A do que nos indivíduos homocigotos C (FOHNER *et al.*, 2017).

No geral, o impacto deste SNP na farmacocinética parece depender do

medicamento avaliado, do genótipo que os indivíduos carregam e da via de administração (IEIRI, 2012; MAO; UNADKAT, 2015). Autores sugeriram a possibilidade da BCRP ser o principal transportador compensatório para a RXA, quando o outro transportador é inibido (GONG; MANSELL; KIM, 2013; SENNESAEI *et al.*, 2018; SHNAYDER *et al.*, 2021).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido em parceria entre o Instituto Cláudia Marques de Pesquisa e Desenvolvimento (ICMP&D) e a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), com recursos provenientes de ambas as instituições.

4.1 ETAPA CLÍNICA DE BIOEQUIVALÊNCIA

4.1.1 População do estudo

Foram selecionados 120 participantes de pesquisa, adultos, sadios de ambos os sexos para participarem de dois estudos de bioequivalência com o fármaco RXA, divididos em grupos, balanceados por gênero e número. Os estudos em condições de jejum ($n = 60$) e pós-prandial ($n = 60$) foram realizados pelo ICMP&D. Não houve restrições de grupos étnicos. Todos os participantes da pesquisa que forneceram seu consentimento livre e informado para os estudos de bioequivalência, também o fizeram para o estudo farmacogenético.

4.1.2 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho da amostra é parte do planejamento para elaboração dos protocolos dos estudos de bioequivalência. O número de participantes de pesquisa depende do poder do teste, mínimo de 80% ($1 - \beta = 0,8$) e do nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Além, da variabilidade intraindividual expressa pelo coeficiente de variação (CV%) do medicamento de referência e da diferença esperada entre as duas médias (θ) (LIU; CHOW, 1992; CHOW; WANG, 2001; BRASIL, 2003). Em estudos de bioequivalência as hipóteses: nula (H_0) e alternativa (H_1) são definidas como não bioequivalência *versus* bioequivalência, respectivamente. O poder do teste é a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela não é verdadeira, ou seja $1 - \beta$.

A variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos reportada para a RXA é de um CV > 30% (SAMAMA *et al.*, 2013; EIKELBOOM *et al.*, 2017).

Considerando a regra de 20% de diferença entre as formulações, com $\Delta = 0,2 \mu R$, para alcançar um poder de $(1 - \beta)$ com nível de significância α , o tamanho da

amostra para cada sequência é calculado considerando uma diferença entre as formulações igual a zero:

$$\theta = 0,$$

$$n \geq [t(\alpha, 2n-2) + t(\beta/2, 2n-2)]^2 (CV/20)^2 \quad (1)$$

onde α = nível de significância (5%); CV = coeficiente de variação intraindividual do fármaco; $\beta = 0,2$; t representa o valor crítico da distribuição t de Student. O grau de liberdade (2n-2) na fórmula é desconhecido por isso é necessário um procedimento iterativo para obter o valor de n (LIU; CHOW, 1992; CHOW; WANG, 2001; BRASIL, 2003). O total de voluntários necessários para um desenho cruzado 2x4 é de $N = 4n$.

Visando garantir maior confiabilidade dos resultados estatísticos, além de avaliar a possível taxa de desistência para o estudo, é aconselhável considerar o poder do teste, para os cálculos de determinação do número de voluntários como 90%. O total de sessenta participantes de pesquisa (n = 60) sadios de ambos os sexos (30 homens e 30 mulheres) pareceu ser suficiente para que a hipótese nula de não bioequivalência (H_0), pudesse ser rejeitada com poder mínimo de 80%.

4.1.3 Considerações éticas

Os protocolos de pesquisa dos estudos de bioequivalência foram elaborados pelo Pesquisador Principal do ICMP&D (Alessandra Ferreira dos Santos) e conduzidos sob responsabilidade da mesma, perante a ANVISA e Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP). Os estudos estavam de acordo com as Boas Práticas Clínicas e as resoluções do Conselho Nacional de Saúde envolvendo seres humanos, com os princípios éticos estabelecidos nacional e internacionalmente; além das normativas publicadas pela ANVISA com as diretrizes para bioequivalência.

O projeto de pesquisa contendo os protocolos experimentais e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) foram submetidos à apreciação pelo CEP da Universidade do Vale do Sapucaí credenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O estudo em jejum possui número de aprovação 3.345.664 (Anexo A) e CAAE: 13048819.5.0000.5102 e o estudo pós-prandial foi aprovado sob número 3.446.466 (Anexo B) e CAAE: 16583119.7.0000.5102.

4.1.4 Recrutamento e seleção

Os interessados em participar dos estudos passaram por processo de recrutamento, para o qual assinaram o Termo de Recrutamento (Anexo C), após esclarecimento inicial sobre como são conduzidas as pesquisas envolvendo medicamentos e seres humanos. Nesta etapa, os voluntários foram conduzidos para a avaliação dos sinais vitais e verificação dos dados antropométricos. Sequencialmente, passaram por consulta médica para obtenção do histórico clínico e exame físico. Não havendo violação dos critérios de inclusão e não inclusão os voluntários foram encaminhados para realização de eletrocardiograma (ECG) e exames laboratoriais, conforme Quadro 1. Após recebimento e avaliação dos resultados, os voluntários foram informados quanto à sua aptidão para participação ou não nos estudos. Em caso de não apto foram fornecidas as informações pertinentes para cada um deles.

Após aprovação nas condutas acima mencionadas e considerados hígidos para a participação em estudos de bioequivalência, os participantes receberam explanação da natureza e objetivos dos estudos. Foram esclarecidas todas as dúvidas e os TCLEs (Anexos D e E) foram assinados antes do início dos estudos, no dia da internação.

Quadro 1 – Exames clínico laboratoriais vinculados ao processo de seleção dos voluntários

Categoria	Exames
ECG	Eletrocardiograma com doze derivações
Hemograma completo	Hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastões, segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos, linfócitos atípicos, monócitos, plaquetas
Coagulograma	TP e TTPa
Análise bioquímica	Glicose basal, ureia, creatinina, clearance de creatinina, bilirrubina total e frações, proteína total e frações, fosfatase alcalina, aspartato amino transferase, alanina amino transferase, colesterol total, triglicérides e ácido úrico
Urina 1	Elementos anormais do sedimento: exame físico-químico e sedimentoscopia
Sorologia	Hepatite B: HbsAg; anti-HBC IgG; anti-HBC IgM; Hepatite C: anti-HCV; HIV 1 e 2 pesquisa de antígeno e anticorpos Beta HCG quantitativo para mulheres

Fonte: Autor (2022).

Legenda: ECG: eletrocardiograma; TP: tempo de protrombina; TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada; HbsAg: antígeno de superfície da hepatite B; anti-HBC: anticorpo contra o antígeno do core viral; IgG: imunoglobulina G; IgM: imunoglobulina M; HCV: vírus da hepatite C; HIV: vírus da imunodeficiência humana; HCG: hormônio gonadotrófico coriônico.

Complementarmente aos exames laboratoriais recomendados no arcabouço legal brasileiro, relacionado a estudos de bioequivalência, no caso específico da RXA, é necessária a análise de TP e TTPa, no momento da seleção de voluntários. Ainda, somente podem ser incluídos nos estudos participantes de pesquisa em que o clearance de creatinina for > 50 mL/min, a fim de evitar sangramento.

4.1.5 Critérios de inclusão

Os seguintes critérios tiveram que ser satisfeitos para a inclusão dos voluntários:

- Voluntários de ambos os sexos com idade acima de 18 anos;
- As mulheres não poderiam estar grávidas e nem em regime de amamentação;
- Os voluntários deveriam ter seu índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 30 Kg/m²;
- Deveriam apresentar boas condições de saúde ou sem doenças clinicamente

significativas, a juízo médico, de acordo com as regras definidas no protocolo, e avaliações a que foram submetidos como história clínica, sinais vitais, exame físico, ECG e exames laboratoriais;

-Capazes de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e eventos adversos e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o estudo, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do TCLE.

4.1.6 Critérios de não inclusão

Em resposta positiva a qualquer um dos seguintes critérios os voluntários não poderiam ser incluídos no estudo:

- Hipersensibilidade conhecida a RXA ou a compostos quimicamente relacionados ou a componentes da formulação;
- História médica ou presença de doenças hepáticas ou gastrointestinais ou outra condição que interferisse na farmacocinética da RXA;
- Uso eventual, regular ou terapia de manutenção com qualquer medicamento, exceto anticoncepcionais;
- Resultados dos exames clínicos e laboratoriais com alterações clinicamente significativas;
- História de abuso de drogas e/ou consumo expressivo de álcool;
- Doação ou perda de sangue ou condições que apresentem risco de sangramento aumentado;
- Doença ou condição grave que a critério médico possa comprometer a participação no estudo.

4.1.7 Desenho do estudo

Os estudos de bioequivalência apresentaram delineamento cruzado totalmente replicado, recomendado para fármacos que possuem CV intraindividual $\geq 30\%$, como a RXA, incluindo os de forma farmacêutica com liberação imediata. Os estudos foram conduzidos de forma aberta, aleatorizada, balanceada, com dois tratamentos (medicamento teste = T e medicamento de referência = R), quatro períodos (1,2,3 e

4) e duas sequências (TRTR e RTRT). Neste tipo de delineamento, cada bloco (indivíduo) recebe duas formulações em 4 períodos distintos, sendo as sequências de medicamentos atribuídas aleatoriamente aos indivíduos visando minimizar os efeitos de sequência e período. As formulações contendo 20 mg de RXA foram administradas em dose única, por via oral em indivíduos adultos, saudáveis, de ambos os sexos e em condições de jejum e pós-prandial; e estão descritas abaixo:

- Formulação Teste (T): rivaroxabana 20 mg comprimido revestido; lote: A136/18; Cimed Indústria de Medicamento Ltda; fabricação: 12/2018 e validade: 12/2020.

- Formulação Referência (R): Xarelto® rivaroxabana 20 mg comprimido revestido; lote: BXHPKR1; Bayer S.A; fabricação 04/2017 e validade: 04/2020.

O período de jejum obedecido foi de pelo menos 8 horas e teve início na noite anterior à administração dos medicamentos nos estudos. Na manhã seguinte, em torno das 7:00 h, foram administrados comprimidos de RXA, com 200 mL de água mineral. No estudo em condições de jejum, os participantes da pesquisa permaneceram em jejum após a administração do medicamento e fizeram uma refeição (almoço) 4 horas depois. No estudo pós-prandial, foi dado desjejum padronizado, 30 minutos antes da administração da medicação. A refeição foi baseada em uma dieta hipercalórica (aproximadamente mil calorias) e hiperlipídica (aproximadamente 50% do total de caloria da refeição).

Os participantes da pesquisa permaneceram internados no ICMP&D por 24 horas e retornaram ao centro de pesquisa durante 3 dias consecutivos, para a realização das coletas referentes aos tempos 24, 48 e 72 horas.

4.1.8 Cronograma de coleta de amostras

Os períodos de tratamento obedeceram a um intervalo mínimo de 7 meias-vidas entre eles. Considerando que a meia-vida da RXA é de 5 a 13 horas, adotou-se um intervalo de 7 dias entre as administrações das medicações. O cronograma de coletas foi diferente entre os dois estudos, devido à influência da alimentação nos parâmetros farmacocinéticos.

Incluindo o tempo -01:00 (basal) coletado antes da administração do medicamento, foram coletadas 23 e 22 amostras de sangue por período, no volume de 4,9mL, sendo a heparina utilizada como anticoagulante, por participante de acordo com o estudo. Foram propostos os seguintes tempos:

Estudo jejum: - 01:00 (basal) / 00:20 / 00:40 / 01:00 / 01:20 / 01:40 / 02:00 / 02:20 / 02:40 / 03:00 / 03:20 / 03:40 / 04:00 / 04:30 / 05:00 / 05:30 / 06:00 / 08:00 / 10:00 / 12:00 / 24:00 / 48:00 / 72:00 horas.

Estudo pós-prandial: - 01:00 (basal) / 00:30 / 01:00 / 01:30 / 02:00 / 02:20 / 02:40 / 03:00 / 03:20 / 03:40 / 04:00 / 04:20 / 04:40 / 05:00 / 05:30 / 06:00 / 08:00 / 10:00 / 12:00 / 24:00 / 48:00 / 72:00 horas.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1370 g por 10 minutos, a 4°C, para obtenção de plasma e armazenadas à -20°C. Após o término dos últimos períodos dos estudos, os tubos criogênicos contendo as amostras de plasma foram transportados até a unidade analítica de bioequivalência do ICMP&D, sendo a temperatura de transporte ($\leq -20^{\circ}\text{C}$) monitorada durante todo o percurso.

4.2 ETAPA ANALÍTICA DE BIOEQUIVALÊNCIA

Na etapa analítica de bioequivalência, foi realizada a quantificação do fármaco inalterado em plasma. As concentrações plasmáticas de RXA foram determinadas através de um método bioanalítico desenvolvido e validado, utilizando UHPLC-MS/MS com interface por eletronebulização e analisador do tipo triplo quadrupolo.

4.2.1 Reagentes e substâncias químicas

O Quadro 2 descreve os reagentes e solventes utilizados durante o desenvolvimento e validação do método bioanalítico, bem como na quantificação das amostras desconhecidas.

Quadro 2 – Reagentes e solventes utilizados nas análises

Reagentes	Fabricante
Metanol (grau HPLC)	Merck
Acetonitrila (grau HPLC)	Merck
Acetato de Amônio (grau para análise)	J. T. Backer
Ácido Fórmico (grau para análise)	Sigma - Aldrich
Acetato de Etila (grau para análise)	Merck
Hexano (grau para análise)	Merck
Água ultrapura	Milli-Q

Fonte: autor (2022).

Legenda: HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*).

O resultado analítico é proveniente da razão das áreas do analito (rivaroxabana) e do padrão interno (linezolida). As substâncias químicas utilizadas como padrões analíticos nesse estudo estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3 – Descrição das substâncias químicas de referência rivaroxabana (analito) e linezolida (padrão interno)

Padrão	Finalidade	Origem	Lote	Validade
Rivaroxabana	Analito	PGS	J0962	13/08/21
Linezolida	Padrão Interno	USP	R072F0	31/01/22

Fonte: autor (2023).

Legenda: PGS: Purity Grade Standards; USP: United States Pharmacopeia.

A Figura 5 mostra a estrutura molecular das substâncias químicas de referência utilizadas como analito e padrão interno.

Figura 5 – Estrutura molecular da rivaroxabana (A) e linezolida (padrão interno) (B)



Fonte: A: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rivaroxaban>;

B: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linezolid>

4.2.2 Equipamentos

As análises foram realizadas em sistema composto por cromatógrafo líquido (Acquity Ultra Performance LC / Waters) acoplado ao detector de massas sequencial (Xevo TQ-S / Waters) com fonte de ionização por eletronebulização e analisador triplo quadrupolo. O programa para controle e aquisição dos dados usado foi o software MassLynx (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) na versão 4.1. A relação dos equipamentos e instrumentos necessários para execução da etapa bioanalítica está descrita no Quadro 4.

Quadro 4 – Descrição dos equipamentos usados no processo bioanalítico

Equipamentos	Modelo / Fabricante
Cromatógrafo líquido	Acquity Ultra Performance LC / Waters
Bomba analítica binária	Binary Solvent Manager / Waters
Sistema de injeção de amostras	Sample Manager / Waters
Organizador de amostras	Sample Organizer / Waters
Analisador	Xevo TQ-S / Waters
Mesa agitadora	Vortex Genie 2 / Scientific Instruments
Sistema de purificação de água	Elix 3 - Milli-Q Advantage A10 / Millipore
Balança analítica	AB265-S FACT / Mettler-Toledo
Lavadora ultrassônica	USC 2800 / Unique
Concentrador de amostras	Optron / Tecnal
Refrigerador	3347/4 / Fanem
Freezer -20°C	Electrolux
Centrífuga refrigerada	Mikro 220R / Hettich

Fonte: autor (2022).

4.2.3 Desenvolvimento do método bioanalítico

Um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver um método bioanalítico para quantificação de RXA em plasma humano, que fosse robusto, sensível, seletivo e rápido para análise de amostras referentes a estudos de bioequivalência. Para isso foram consultados trabalhos disponíveis na literatura para determinação de RXA em

plasma por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial.

O desenvolvimento do método consistiu na determinação do processo de extração para análise de RXA e linezolidina (padrão interno / PI) em plasma e dos parâmetros cromatográficos e espectrométricos. As bases utilizadas para o desenvolvimento do método foram as características físico-químicas e farmacocinéticas da RXA e os dados obtidos da literatura de métodos já desenvolvidos (ROHDE, *et al.*, 2008; IQBAL, *et al.*, 2014; REDDY; REDDY; REDDY, 2016; DEROGIS, *et al.*, 2017).

Foi utilizado como PI uma substância com estrutura semelhante à da RXA e, que não interferisse com os componentes da matriz biológica e nem com o analito em questão. Foram feitas infusões, através da injeção direta no espectrômetro de massas de soluções individuais de RXA e PI com 100 ng/mL, em uma mistura de metanol: água ultrapura (1:1). A massa teórica do composto de interesse, contido na solução infundida, foi confirmada através da função de *scan* MS. A partir das injeções e confirmação da massa teórica foi selecionado o modo positivo de ionização da fonte ajustando voltagem, temperatura e pressão do gás de dessolvatação, dentre outros parâmetros. Foram selecionadas as transições de massas para quantificação do íon precursor e a confirmação através do íon produto, adequadas para o analito e PI. As condições obtidas no espectrômetro de massas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições do espectrômetro de massas para detecção de rivaroxabana e linezolida

Parâmetros da fonte de ionização		Parâmetro do massas	
Parâmetro	Descrição	Parâmetro	Descrição
Fonte de ionização	ES+	Tipo de função	MRM
Capilar	3 kV	Multiplicador de sinal	673
Cone	50 V	<i>Ion Energy 1</i>	0,10
Temperatura fonte	150 °C	<i>Ion Energy 2</i>	0,50
Temperatura dessolvatação	500 °C		
Fluxo gás de dessolvatação	1000 L/h		
Fluxo gás do cone	150 L/h		
Fluxo do gás de colisão	0,10 mL/min		
Parâmetros específicos			
Parâmetro	RXA	PI	
Tempo de retenção	2,49 min	1,59 min	
Íon precursor	436,23 <i>m/z</i>	338,18 <i>m/z</i>	
Íon produto	144,97 <i>m/z</i>	195,21 <i>m/z</i>	
<i>Dwell time</i>	0,150 s	0,150 s	
Cone	50 V	50 V	
Energia de colisão	26 eV	22 eV	

Fonte: Autor (2020).

Legenda: ES+: eletronebulização positiva (*electrospray*); MRM: monitoramento de reações múltiplas; RXA: rivaroxabana; PI: padrão interno (linezolida).

Após a otimização das condições do espectrômetro de massas foram iniciados os testes para otimizar as condições cromatográficas. Inicialmente foram avaliadas a coluna cromatográfica e a composição da fase móvel; levando em consideração a simetria dos picos, a separação dos padrões analíticos, tempos de retenção e altura da linha de base. As condições cromatográficas definidas para análise de RXA e PI estão descritas na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2 – Condições cromatográficas para análise de rivaroxabana e linezolida

Itens	Descrição
Fase móvel	Acetonitrila : Acetato de amônio 2 mM + Ácido fórmico 0,025% (40:60, v/v), linhas separadas
Fluxo da fase móvel	0,200 mL / min
Pré-coluna	VanGuard Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm (2,1 x 5,0 mm)
Coluna analítica	Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm (2,1 x 100,0 mm)
Temperatura do forno	35°C ± 5°C
Temperatura do auto injetor	5°C ± 4°C
Solução de lavagem	Acetonitrila : Água ultrapura (90:10% v/v)
Volume solução de lavagem	500 µL
Volume de injeção	3 µL
Tempo de corrida	3,5 minutos

Fonte: Autor (2020).

Em seguida, foram iniciados os testes de extração das amostras, com vários solventes orgânicos verificando qual o mais adequado de acordo com a recuperação do analito. Foram avaliados os volumes de alíquota de amostra e de solvente, temperaturas de centrifugação e evaporação, entre outros.

Para o método de extração foram adicionados 25 µL de solução de PI (500 ng/mL), 50 µL de acetonitrila, 1 mL de acetato de etila/hexano (80:20 v/v) a um microtubo de 2mL contendo 100 µL de plasma; a mistura foi colocada em mesa agitadora por 3 minutos, posteriormente centrifugada por 5 minutos a 4°C a 22000 g. Foram transferidos 600 µL da fase orgânica para outro microtubo de 2 mL e evaporados sob fluxo de ar comprimido sem aquecimento. O resíduo foi ressuscendido em 200 µL água ultrapura e acetonitrila (60:40 v/v) e transferidos para vial com insert, sendo injetados 3 µL no sistema cromatográfico.

4.2.4 Validação da metodologia bioanalítica

Para garantir a confiabilidade dos dados, o método bioanalítico desenvolvido, foi validado de acordo com as recomendações da resolução RDC nº 27/2012 que trata

dos requisitos para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos (BRASIL, 2012). Para a validação total do método foram realizados os ensaios de seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão e estabilidades, conforme as especificações de cada ensaio. Adicionalmente foram avaliadas as interferências de metabólitos, fármacos de uso concomitante, produtos de degradação formados durante o preparo da amostra e outros possíveis interferentes. Os estudos de estabilidade do analito e PI na matriz biológica devem reproduzir as condições de armazenamento e manuseio das amostras, garantindo a integridade do analito na matriz escolhida desde o momento da primeira coleta até sua análise.

4.2.4.1 Preparação das curvas de calibração e controles de qualidade

A corrida analítica é representada pelos padrões de calibração (PCs), controles de qualidade (CQs) e as amostras com concentrações desconhecidas dos voluntários dos estudos. Os PCs e CQs foram preparados adicionando solução padrão de RXA ao plasma humano. As concentrações definidas para PCs e CQs estão descritas nos Quadros 5 e 6.

As curvas de calibração foram construídas utilizando os PCs contendo uma amostra branco (matriz biológica isenta do analito e do PI), uma amostra zero (PI adicionado a matriz biológica) e amostras contendo padrão do fármaco em concentrações definidas dentro da faixa de linearidade do método com adição de padrão interno. Cada curva de calibração foi preparada em duplicata no processo de validação e em 8 concentrações diferentes.

Quadro 5 – Preparo dos padrões de calibração (PCs)

Nível	Amostra	Conc. de RXA em plasma (ng/mL)	Conc. da solução de RXA	Volume da solução de RXA (µL)	Volume final (mL)
B	Branco	0	N.A	N.A	N.A
Zero	Branco + PI	0	N.A	N.A	N.A
PC 1	RXA + PI	1*	200 ng/mL	25	5
PC 2	RXA + PI	2*	200 ng/mL	50	5
PC 3	RXA + PI	10*	200 ng/mL	250	5
PC 4	RXA + PI	50*	200 ng/mL	1250	5
PC 5	RXA + PI	100	10 µg/mL	50	5
PC 6	RXA + PI	200	10 µg/mL	100	5
PC 7	RXA + PI	450	10 µg/mL	225	5
PC 8	RXA + PI	500	10 µg/mL	250	5

Fonte: Autor (2023).

Legenda: Conc. Concentração; B: plasma sem concentrações; N.A: não se aplica; PC: padrão de calibração; RXA: rivaroxabana; PI: padrão interno (linezolida); PC 1: corresponde ao limite de quantificação inferior (LIQ); PC 8: corresponde ao limite superior de quantificação (LSQ); *Preparada a partir do padrão de calibração 200 ng/mL (PC6).

As amostras de CQs foram distribuídas, entre as amostras do estudo, de forma balanceada na corrida analítica, sempre em igual número de replicatas para cada concentração. O número de amostras de CQs em cada análise não foi inferior a 5% do número de amostras desconhecidas e nem inferior a seis, sendo pelo menos uma duplicata de cada concentração baixa, média e alta (CQB, CQM e CQA). Os resultados das amostras de CQs serviram de base para aceitação ou rejeição da corrida analítica.

Quadro 6 – Preparo dos controles de qualidade (CQs)

Nível	Amostra	Conc. de RXA em plasma (ng/mL)	Conc. da solução de RXA	Volume da solução de RXA (µL)	Volume final (mL)
CQB	RXA + PI	3*	200 ng/mL	150	10
CQMn1	RXA + PI	35	10 µg/mL	35	10
CQMn2	RXA + PI	70	10 µg/mL	70	10
CQM	RXA + PI	250	10 µg/mL	250	10
CQA	RXA + PI	380	10 µg/mL	380	10
CQD	RXA + PI	225	900 ng/mL	1250	5

Fonte: Autor (2023).

Legenda: Conc: concentração; CQB: controle de qualidade baixo; RXA: rivaroxabana; PI: padrão interno (linezolida); CQMn 1 e 2: controle de qualidade médio de nova concentração; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto; CQD: controle de qualidade de diluição; *Preparada a partir do padrão de calibração 200 ng/mL (PC6).

Para aprovação da corrida analítica, no mínimo 67% do total de CQs e no mínimo 50% dos CQs de cada concentração deveriam apresentar desvio entre $\pm 15\%$ em relação aos seus respectivos valores nominais. A exatidão média e a precisão dos CQs de todas as análises dos voluntários aprovadas foram calculadas para cada nível de concentração. Os PCs e CQs devem apresentar desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o limite inferior de quantificação (LIQ). Os PCs devem ter desvio menor ou igual a 15% em relação a concentração nominal para as demais concentrações. No mínimo seis de oito, ou seja, 75% dos PCs devem apresentar desvio dentro do permitido para aprovação das análises em relação à concentração nominal.

Com base nos valores de C_{max} da RXA descritos na literatura foi definida a faixa de linearidade do método. As concentrações referentes ao LIQ e ao limite superior de quantificação (LSQ) foram escolhidas a partir da concentração mais alta que se pretendia analisar.

A resolução para bioanálises preconiza o controle de qualidade médio (CQM) como uma amostra de CQ com concentração próxima à média entre o LIQ e o LSQ. Há necessidade de avaliação criteriosa das corridas analíticas para inclusão de novos controles médios. Por isso, foram definidas outras duas concentrações de controles de qualidade (CQMn1 = 35 ng/mL e CQMn2 = 70 ng/mL). Isto permitiu monitoramento mais eficaz do método bioanalítico e homogeneidade na distribuição dos CQs entre os níveis de concentração do fármaco nas amostras de voluntários.

4.2.4.2 Linearidade

A linearidade foi definida utilizando os PCs preparados em plasma. A correlação linear entre a concentração, considerada variável independente ($1/x^2$) e a relação entre as áreas dos picos do analito e PI, considerada variável dependente (y) foi estabelecida. Os parâmetros da correlação foram estimados através do método dos mínimos quadrados.

A equação que representou a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito, foi plotada priorizando o modelo matemático mais simples. Diferentes fatores de ponderação foram avaliados: sem ponderação, $1/x$ e $1/x^2$ e o menor valor absoluto para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração *versus* seus valores obtidos pela equação da curva foi escolhido.

4.2.4.3 Seletividade

Para avaliação da seletividade foram analisadas amostras de plasma branco de seis fontes distintas, sendo quatro amostras de plasma normal, uma de plasma lipêmico e uma de plasma hemolisado. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos a partir de amostras extraídas na concentração do LIQ. A presença de picos interferentes próxima ao tempo de retenção só foi aceita quando a área sob os picos foi inferior a 20% da área do analito no LIQ e a 5% da área do PI.

4.2.4.4 Efeito residual

O efeito residual foi investigado pela análise de amostras de plasma branco após injeções do LSQ de 500 ng/mL. O objetivo do teste foi verificar o aumento do sinal do analito ou padrão interno, causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. As respostas de picos interferentes nos tempos de retenção do analito e PI, nas amostras branco injetadas após LSQ, devem ser inferiores a 20% e 5%, respectivamente, em relação à amostra processada do LIQ.

4.2.4.5 Efeito matriz

Para avaliar o fator matriz normalizado (FMN) do método bioanalítico foram utilizadas 8 amostras de plasma branco: sendo 4 amostras normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas grau 5. De acordo com procedimentos internos do ICMP&D, local em que o método foi desenvolvido e validado, estão disponíveis as definições e formas de obtenção dos plasmas lipêmico e hemolisado. Amostra lipêmica correspondeu ao plasma com alto teor de lipídeos proveniente de coleta de sangue pós-prandial, considerando o período entre 2 a 5 horas após as refeições.

Amostra hemolisada é a amostra biológica contendo hemácias lisadas em grau pré-definido e especificado pelo laboratório do ICMP&D. Os diferentes graus de hemólise são obtidos a partir de sucessivas diluições e são inspecionados visualmente, conforme Figura 6. As amostras dos voluntários nos estudos, com grau de hemólise superior ao grau de hemólise aprovado neste teste, não poderiam ser analisadas.

Figura 6 – Amostra de plasma normal (branco) e os 5 diferentes graus de hemólises utilizados para comparação visual entre amostras utilizadas na validação do método bioanalítico e as amostras do estudo



Fonte: Autor (2020).

As matrizes biológicas, isentas de analito, foram processadas e posteriormente adicionadas de soluções de analito e PI na mesma concentração das amostras de CQB e CQA. O CV dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%.

Quando o valor de FMN for igual a 1, significa que nenhum efeito de matriz foi observado, FMN menor que 1 sugere supressão de ionização, enquanto FMN maior que 1 pode ser causado por um aumento na ionização.

A fórmula para cálculo do FMN está demonstrada a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{resposta do analito em matriz} / \text{resposta do PI em matriz}}{\text{resposta do analito em solução} / \text{resposta do PI em solução}} \quad (2)$$

4.2.4.6 Precisão e exatidão intra e intercorridas

A precisão avalia o grau de repetibilidade em se tratando dos resultados de quantificações individuais quando o mesmo procedimento é aplicado repetida vezes numa mesma amostra homogênea em idênticas condições de ensaio. A exatidão está relacionada ao grau de concordância entre os resultados individuais e o valor nominal. O desvio padrão relativo (DPR) ou CV foi utilizado para expressar a precisão do método e a exatidão foi avaliada por meio do cálculo do erro padrão relativo (EPR). Não foram admitidos valores superiores a 15% entre as replicatas, exceto para o LIQ, para o qual se admitiu valores menores ou iguais a 20%.

A precisão e a exatidão foram determinadas utilizando 5 concentrações (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) em quintuplicata por concentração. Ambas foram determinadas em uma mesma corrida analítica (intracorrída) e em três corridas analíticas diferentes (intercorridas) em três dias distintos. Posteriormente, foram acompanhadas durante todo o processo de quantificação das amostras dos voluntários em análise.

$$\text{DPR ou CV (\%)} = \frac{\text{desvio padrão} \times 100}{\text{concentração média experimental}} \quad (3)$$

$$\text{EPR\%} = \frac{(\text{concentração média experimental} - \text{concentração nominal}) \times 100}{\text{concentração nominal}} \quad (4)$$

4.2.4.7 Estabilidades em matriz biológica

As estabilidades em matriz biológica são demonstradas para todas as condições abaixo descritas e avaliadas, quando não se observa desvio superior a 15% da concentração nominal. Foram empregadas triplicatas de CQB e CQA analisadas imediatamente após sua preparação e submissão às condições aplicáveis do ensaio a que representaram. As concentrações das amostras foram determinadas por meio de uma curva de calibração recém-preparada.

- Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada através dos resultados das análises de amostras de CQs mantidos à temperatura ambiente por 6 horas; tempo superior ao que as amostras em estudo foram mantidas, refletindo as condições de trabalho, sendo antes do início do procedimento de extração.

- Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento foi determinada através dos resultados de análises de amostras de CQs submetidas ao procedimento de extração e armazenadas dentro autoinjetor, por período de 26 horas. Este intervalo compreendeu o tempo entre o término do preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa.

- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi determinada através dos resultados de análises de amostras CQs submetidas a 4 ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras utilizadas neste estudo foram congeladas à -20°C e mantidas nesta temperatura durante 12 horas, e após este período foram descongeladas à temperatura ambiente. O processo de congelamento/descongelamento foi repetido por mais três vezes.

- Estabilidade longa duração

A estabilidade de longa duração foi determinada através dos resultados de análises de amostras de CQs mantidas à temperatura de armazenamento (-20°C) por

um intervalo de tempo de 178 dias. Tempo superior ao compreendido entre a coleta da primeira amostra biológica de voluntário na etapa clínica do estudo e a análise da última amostra na etapa analítica.

4.2.4.8 Estabilidade em solução do analito e padrão interno

As estabilidades das soluções padrão e de trabalho de RXA e de PI foram determinadas, por meio da comparação dos resultados de soluções recém-preparadas e imediatamente analisadas, com resultados da análise destas soluções após serem mantidas sob as mesmas condições a que foram submetidas durante seu uso e armazenamento. As soluções foram consideradas estáveis quando não se observa desvio superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém-preparadas.

As soluções padrão foram mantidas por 6 horas após o preparo, a temperatura ambiente e por 42 dias quando armazenadas em refrigerador (2 a 8 °C). As soluções de trabalho foram mantidas por 6 horas após o preparo a temperatura ambiente e por 21 dias armazenadas em refrigerador (2 a 8 °C).

4.2.5 Quantificação de rivaroxabana em plasma

Os cálculos para quantificação das amostras dos voluntários foram realizados em função das curvas de calibração construídas para a RXA e analisados no sistema de dados do software MassLynx™ versão 4.1 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). Estas funções são calculadas através da razão entre as áreas dos picos do analito e do PI. O acompanhamento da validade das corridas analítica se deu através na inserção dos controles de qualidade durante o processo de quantificação das amostras.

4.3 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA E AVALIAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas individuais de RXA obtidas experimentalmente em função do tempo, aplicando modelo não compartimental, assumindo que a eliminação do

fármaco é de primeira ordem. As análises farmacocinéticas e estatísticas para avaliação da bioequivalência foram realizadas através do software WinNonlin Professional versão 8.0 (Pharsight Corporation, Palo, Califórnia, EUA); pela análise foram obtidos os parâmetros: C_{max} , ASC^{0-t} , ASC^{0-inf} , T_{max} , K_{el} , $t_{1/2}$, Cl e V_d .

Para avaliar a bioequivalência, entre as formulações teste e referência de RXA, as análises estatísticas foram conduzidas após transformação logarítmica natural baseada em modelo aditivo, para os valores de C_{max} , ASC^{0-t} e ASC^{0-inf} . Foi empregada análise de variância (ANOVA) sob os dados de C_{max} e ASC a qual levou em conta os efeitos de sequência, voluntário dentro da sequência, tratamento e período. O nível de significância para os efeitos fixos da ANOVA foram 5% para efeito de período e tratamento e 10% para o efeito de sequência.

A avaliação estatística para os parâmetros farmacocinéticos C_{max} e ASC seguiu o critério tradicional de bioequivalência média. Foi construído um intervalo de confiança (IC) de 90% para a diferença das médias dos dados transformados, dos medicamentos teste e referência. As formulações foram consideradas estatisticamente bioequivalentes se os intervalos estivessem entre os limites 80% e 125%, conforme legislação vigente.

A variabilidade foi comparada utilizando os dados dos desvios padrão intraindividuais dos parâmetros C_{max} e ASC^{0-t} , obtidos para as formulações teste e referência. Diferenças entre as variabilidades após administração repetida das formulações foram consideradas como não significativas, somente se o limite superior do IC 90% da razão teste/referência para variância fosse $\leq 2,5$ (FDA, 2011; FDA, 2012).

Para os outros parâmetros farmacocinéticos como T_{max} , K_{el} , $t_{1/2}$, V_d e Cl foram apresentadas as medidas descritivas.

4.4 ANÁLISE DE EFEITO BIOLÓGICO NA COAGULAÇÃO

Durante a condução dos períodos 2 e 3 dos estudos de bioequivalência, foram coletadas amostras de 5 mL de sangue, em tubos contendo citrato de sódio, para dosagem de TP e TTPa. As coletas foram realizadas em todos participantes da pesquisa, aos quais administrou-se o medicamento de referência, em um dos dois períodos citados.

Imediatamente após as coletas, as amostras seguiram transportadas sob

refrigeração até o laboratório de análises clínicas, parceiro do ICMP&D, para serem processadas e analisadas. Os tempos 0 (basal), 3 e 24 horas após a administração de RXA foram escolhidos baseando-se no tempo médio em que o fármaco atinge o efeito máximo e também no tempo em que esse efeito termina.

As determinações de TP e TTPa foram feitas em um coagulômetro automático (Q-Smart Hemostasis Analyser, Grifols, Barcelona, Espanha), utilizando os reagentes provenientes dos kits, DG-PT para TP e DG-APTT Synth e DG-CaCl₂ 0,025M para TTPa (Diagnostic Grifols, Brasil). O DG-PT é um reagente de tromboplastina liofilizada feita de cérebro de coelho, além de tampão e íons cálcio. O DG-APTT Synth é composto por fosfolipídios sintéticos, ácido elálgico e tampão. Essa mistura é incubada com plasma citratado e dando início a coagulação após adição de uma quantidade determinada de cloreto de cálcio. Os resultados de TP e TTPa foram expressos em segundos e os valores de referência determinados pelo laboratório foram 12,5 a 17,9 segundos e 30 a 45 segundos, respectivamente.

O teste ANOVA foi aplicado para verificar se haveria diferença entre os resultados dos testes de coagulação (TP e TTPa) e os três tempos distintos selecionados para as coletas de amostras. Posteriormente, foi avaliada a correlação entre as concentrações de RXA obtidas nesses tempos e os parâmetros de coagulação, pelo método de Pearson e regressão linear através do software Minitab® Statistical Package versão 18.1 (Minitab, Inc., State College, Pennsylvania, EUA).

4.5 GENOTIPAGEM

4.5.1 Obtenção de amostras para análise genotípica da BCRP

Os 117 voluntários que concluíram os dois estudos de bioequivalência deram seu consentimento por escrito para participarem do estudo farmacogenético, o qual teve seu protocolo avaliado e aprovado pelo CEP da Universidade Vale do Sapucaí, sob parecer nº 3.466.733 (Anexo F) e CAAE: 16583119.7.0000.5102. Uma amostra de 4 mL de sangue venoso foi colhida em tubo contendo EDTA como anticoagulante. Todas as amostras foram transferidas para o Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas, sob condições adequadas de refrigeração.

4.5.2 Seleção do polimorfismo

A seleção do polimorfismo foi baseada na farmacocinética da RXA e na escassez de estudos publicados na literatura para esse farmacogene. O gene selecionado foi o *ABCG2* que codifica a proteína transportadora BCRP e o SNP que contém o polimorfismo 421 C>A (rs2231142).

4.5.3 Extração de DNA

As amostras de sangue total foram processadas conforme protocolo básico de extração de DNA com colunas de afinidade. Inicialmente foi adicionado tampão fosfato salino pH=7,2 e centrifugado a 492 g por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e ao precipitado, foi adicionado tampão para a lise de hemácias e, mantido sob agitação. Esse material foi centrifugado novamente a 492 g por 5 minutos, e o sobrenadante desprezado. Ao precipitado foi adicionado um tampão específico do kit (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen) seguido de incubação em banho-maria, a 56°C. A extração foi continuada de acordo com as recomendações do fabricante do kit de extração.

Todo material genético de DNA foi quantificado em comprimento de onda de 260 nm, por espectrofotômetro Genova Nano (Jenway, Stone, Reino Unido) e sua concentração corrigida para 10 ng/μL. As amostras foram congeladas a -20°C até o momento da realização das reações em cadeia da polimerase (PCR do inglês *Polymerase Chain Reaction*).

4.5.4 Amplificação

As amplificações foram realizadas utilizando um kit comercial (GoTaq®Green Master Mix, Promega) contendo 2 corantes, azul e amarelo, que permitiram monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 μL do “mix” contém 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10mM Tris-HCl, pH 8,5; 50mM KCl; 1,5 mM MgCl₂ e 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando 3 μL do DNA alvo e 50 pmol de cada marcador molecular, em um volume final de 25 μL. As amplificações foram

realizadas utilizando um termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

A detecção do material genético foi realizada utilizando um par de iniciadores também conhecidos como *primers*. São pequenos fragmentos da fita simples, sintetizados artificialmente, com uma sequência exatamente complementar a extremidade do fragmento alvo amplificado. Foram sintetizados dois *primers*, um para cada extremidade da fita, denominados *forward* (senso) e *reverse* (antisenso) (THOMAS *et al.*, 2009), mostrados no Quadro 7. O fragmento amplificado continha 345 pares de base do gene *ABCG2* (*Homo sapiens ATP binding cassette subfamily G member 2 Ref Seq Gene on chromosome 4, NCBI Reference Sequence: NG_032067.2*) (THOMAS *et al.*, 2009).

Quadro 7 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento e o fragmento de interesse

Polimorfismo	Sequência nucleotídica	Fragmento
ABCG2 421 C>A rs2231142	Fragmento 5' – CAGTTCTCAGCAGCTCTTC – 3'	345 pB
	<i>Forward</i> 5' – ACCTTAGTTATGTTATCTTTGTG – 3'	
	<i>Reverse</i> 5' – GAAACTTCTGAATCAGAGTCAT – 3'	

Fonte: Autor (2022)

Legenda: A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina; pB: pares de base

As amplificações foram constituídas de um ciclo inicial a 95°C por 15 minutos. A segunda etapa foi composta de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão 72°C, por 60 segundos, repetida por 36 ciclos. A última etapa constituiu de um ciclo de extensão final a 72°C, por 10 minutos (THOMAS *et al.*, 2009).

4.5.5 Sequenciamento de DNA

Após a amplificação do material genético as amostras foram enviadas para a empresa Myleus Biotecnologia, para realização do sequenciamento pelo método de Sanger automatizado.

O programa BioEdit Sequence Aligment Editor versão 8.1 foi utilizado para analisar e construir as sequências genéticas encontradas pelo laboratório.

4.5.6 Análise estatística do polimorfismo genético

A análise estatística foi realizada no conjunto de dados de ambas as formulações: teste e referência. Por se tratar de um estudo exploratório não foi realizado cálculo formal do tamanho da amostra.

Para comparação entre dois ou mais grupos, foi realizado o teste t de Student ou ANOVA, respectivamente. Após ANOVA o método *post hoc* de Tukey foi utilizado para identificar os grupos que possuem diferenças estatisticamente significativas através da comparação em pares. Para realização da análise estatística foi utilizado o software Minitab® Statistical Package versão 18.1 ((Minitab, Inc., State College, Pennsylvania, EUA), sendo os valores com $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

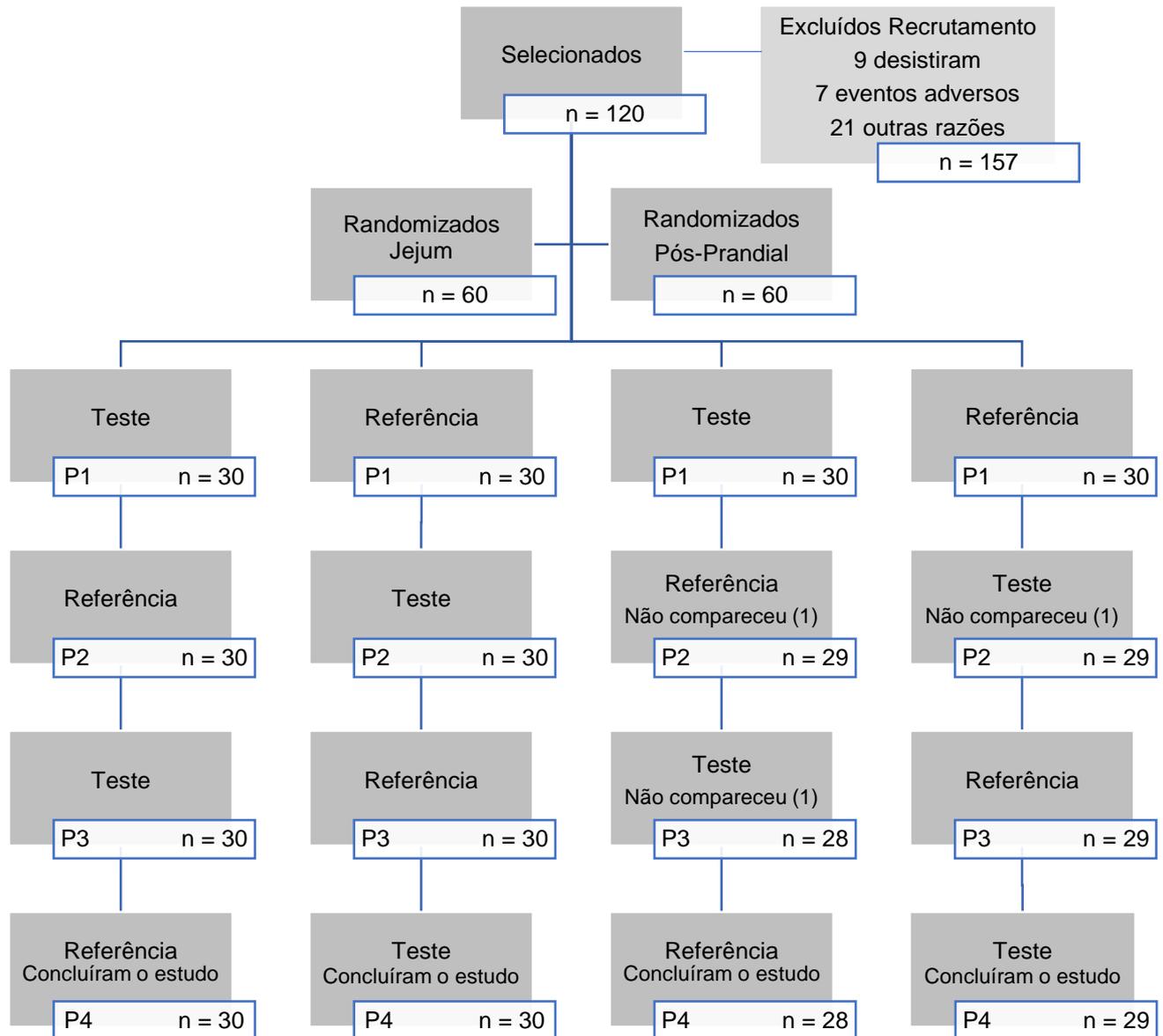
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ETAPA CLÍNICA DE BIOEQUIVALÊNCIA

5.1.1 População do estudo

Concluíram os estudos de bioequivalência 117 participantes de pesquisa de um total de 120 que satisfizeram os critérios de inclusão, conforme Figura 7. O estudo em condições de jejum foi concluído com 60 voluntários (30 homens e 30 mulheres) e o estudo em condições pós-prandial 57 voluntários (29 homens e 28 mulheres). Os três voluntários desistiram de participar por razões pessoais.

Figura 7 – Fluxograma de recrutamento e seleção dos participantes de pesquisa



Fonte: Autor (2022).

Legenda: P1, P2, P3 e P4 representam os períodos dos estudos.

As informações obtidas no momento do cadastro foram conferidas na anamnese, com o objetivo de obter informações como gênero, idade, raça/cor e também foram realizadas a pesagem e medida da altura dos participantes de pesquisa, para o cálculo do IMC (TABELA 3).

Tabela 3 – Características demográficas dos participantes da pesquisa

Dados	Estudo Jejum n = 60	Estudo Pós-prandial n = 57
Idade (anos) média ± dp	30,55 ± 7,59	32,37 ± 8,16
Peso (Kg) média ± dp	68,51 ± 10,22	70,25 ± 12,16
Altura (m) média ± dp	1,67 ± 0,11	1,68 ± 0,10
IMC (Kg/m²) média ± dp	24,53 ± 2,55	24,89 ± 2,91
Gênero		
Masculino	30	29
Feminino	30	28
Cor		
Branca	30	33
Preta	8	6
Parda	22	16
Indígena	0	2
Amarela	0	0

Fonte: Autor (2022).

Legenda: IMC: índice de massa corporal; dp: desvio padrão.

5.2 ETAPA ANALÍTICA DE BIOEQUIVALÊNCIA

5.2.1 Desenvolvimento do método

Entre as metodologias publicadas e consultadas para o desenvolvimento do método (Quadro 8), a precipitação de proteínas foi o processo mais utilizado para preparação de amostras quando comparado com outras técnicas (ROHDE 2008; GOUS *et al.*, 2014; KOROSTELEV *et al.*, 2014; SCHMITZ *et al.*, 2014; IQBAL *et al.*, 2015; KUHN *et al.*, 2015; DEROGIS *et al.*, 2017; VARGA *et al.*, 2017; WIESEN *et al.*, 2017; GAI *et al.*, 2019) como a extração em fase sólida, que é mais dispendiosa e demorada (BALDELLI *et al.*, 2016; REDDY; REDDY; REDDY, 2016; FOERSTER *et al.*, 2018; SHAIKH *et al.*, 2020). A precipitação de proteínas tende a não remover fosfolipídios que podem se acumular na coluna analítica e sujar a fonte do

espectrômetro de massa, contribuindo assim para os efeitos da matriz e redução da sensibilidade; portanto os trabalhos dos autores Rohde, (2008); Iqbal *et al.*, (2015); Kuhn, *et al.*, (2015) e Gai, *et al.*, (2019) apresentaram boa sensibilidade e um LIQ menor que o deste trabalho. O LIQ de 1 ng/mL obtido em nosso estudo garantiu a caracterização apropriada do perfil farmacocinético da RXA contemplando a fase de eliminação, sendo adequado a estudo de bioequivalência da RXA em dose única.

O método apresentou especificidade para o analito e linearidade suficiente para análise dos perfis farmacocinéticos. O LIQ, onde se obteve a menor concentração de RXA com precisão e exatidão dentro dos limites estabelecidos previamente, valores próximos aos outros métodos consultados (QUADRO 8). O método é altamente seletivo, o que é evidente a partir dos resultados do efeito da matriz e requer baixo volume de amostra de plasma para processamento, além de ter tempo de análise cromatográfica relativamente curto.

Em relação ao preparo de amostras, utilizamos a extração líquido-líquido, uma técnica rápida, de fácil execução e baixo custo que se apresentou adequada para preparação de grande número de amostras diariamente. Nenhum dos autores consultados no Quadro 8 utilizou essa técnica de extração.

Para a maioria dos estudos disponíveis na literatura, o volume de plasma utilizado na extração variou de 100 a 200 μ L sendo essa faixa adequada para ensaios clínicos (ROHDE 2008; GOUS *et al.*, 2014; KOROSTELEV *et al.*, 2014; SCHMITZ *et al.*, 2015; IQBAL *et al.*, 2015; KUHN *et al.*, 2015; BALDELLI *et al.*, 2016; REDDY; REDDY; REDDY, 2016; DEROGIS *et al.*, 2017; VARGA *et al.*, 2017; FOERSTER *et al.*, 2018; GAI *et al.*, 2019; SHAIKH *et al.*, 2020). Considerando a necessidade de estabelecer coletas de sangue seriadas para estudos farmacocinéticos, o baixo volume de plasma utilizado para bioanálises pode melhorar a proposta de tempo de amostragem. Nosso método utilizou 100 μ L de plasma e viabilizou a coleta de pouco mais que 20 pontos (amostras) por período até 72 horas após administração de RXA, além de possibilitar a execução do delineamento de 4 períodos de estudo.

Vale ressaltar que o método apresentou tempo de execução de análise cromatográfica de 3,5 minutos para cada amostra, ou seja, menor do que o apresentado pela maioria dos estudos reportados (ROHDE, 2008; GOUS *et al.*, 2014; KOROSTELEV *et al.*, 2014; SCHMITZ *et al.*, 2014; BALDELLI *et al.*, 2016; DEROGIS *et al.*, 2017; FOERSTER *et al.*, 2018; GAI *et al.*, 2019). Alguns métodos mostrados no Quadro 8 foram desenvolvidos para a determinação simultânea de AODs

necessitando de gradiente de fase móvel, tempos de análises maiores e aplicação em monitorização terapêutica (GOUS *et al.*, 2014; KOROSTELEV *et al.*, 2014; SCHMITZ *et al.*, 2014; BALDELLI *et al.*, 2016; FOERSTER *et al.*, 2018), portanto não necessitavam de tempo de análise reduzido como os estudos de bioequivalência.

Quadro 8 – Métodos bioanalíticos para determinação de rivaroxabana em plasma por UHPLC – MS/MS

Referência	Analitos	Volume plasma (µL)	Extração	Eluição	Tempo de análise cromatográfica(min)	Linearidade (ng/mL)
Rohde, 2008	Rivaroxabana	200	Precipitação proteína (MeOH)	Gradiente	6,0	0,5 – 500
Gous <i>et al.</i> , 2014	Rivaroxabana, Apixabana, Edoxabana, Dabigatrana	100	Precipitação proteína (ACN)	Gradiente	6,0	1 – 500
Iqbal <i>et al.</i> , 2014	Rivaroxabana	200	Precipitação proteína (ACN)	Isocrática	1,5	0,57 - 625
Korostelev <i>et al.</i> , 2014	Rivaroxabana, Dabigatrana	100	Precipitação proteína	Isocrática	4,5	2,5 – 500
Schmitz <i>et al.</i> , 2014	Rivaroxabana, Apixabana, Dabigatrana	...	Precipitação proteína (ACN)	Gradiente	4,5	23 -750
Kuhn <i>et al.</i> , 2015	Rivaroxabana, Dabigatrana	100	Precipitação proteína (MeOH)	...	2,5	0,8 – 800
Baldeli <i>et al.</i> , 2016	Rivaroxabana, Apixabana, Dabigatrana	200	Fase sólida	Gradiente	10	1 – 500
Reddy <i>et al.</i> , 2016	Rivaroxabana	...	Fase sólida	Isocrática	2,0	2 – 500
Derogis <i>et al.</i> , 2017	Rivaroxabana	200	Precipitação proteína (MeOH)	Isocrática	5,0	2 – 500
Varga <i>et al.</i> , 2017	Rivaroxabana	100	Precipitação proteína (MeOH)	isocrática	1,7	24 – 960
Wiesen <i>et al.</i> , 2017	Rivaroxabana, Apixabana, Edoxabana, Dabigatrana	50	Precipitação proteína (ACN)	Gradiente	2,0	2 – 500
Foerster <i>et al.</i> , 2018	Rivaroxabana, Apixabana, Edoxabana, Dabigatrana	100	Fase sólida	Gradiente	4,0	1 – 1000
Gai <i>et al.</i> , 2019	Rivaroxabana, Metformina	100	Precipitação proteína (ACN)	isocrática	7,0	0,5 – 275
Shaikh <i>et al.</i> , 2020	Rivaroxabana	100	Fase sólida	isocrática	1,8	5,96 – 801

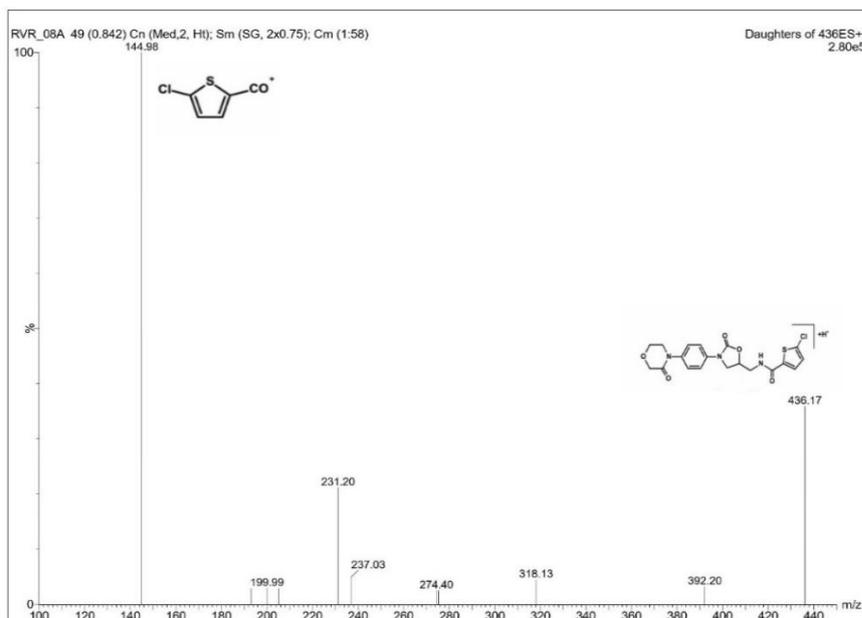
Fonte: Autor (2022).

Legenda: MeOH: metanol; ACN: acetona nitrila.

A otimização das condições cromatográficas permitiu a obtenção de resolução adequada e formato de picos simétricos para a RXA e PI, empregando eluição isocrática com tempo de execução de análise curto; sendo favorável para estudos de bioequivalência, que requerem velocidade na análise devido ao elevado número de amostras.

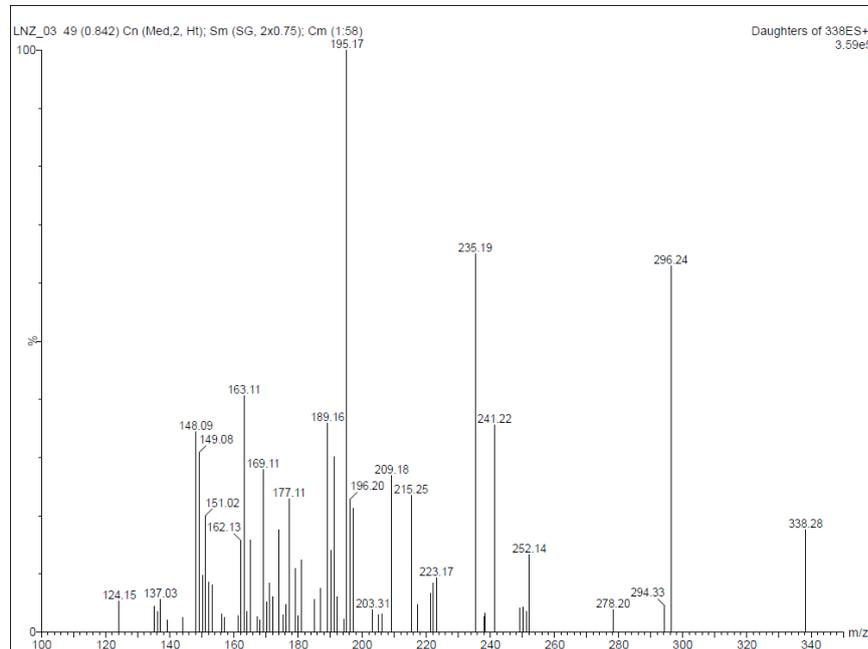
A identificação do analito e PI, separados por cromatografia líquida foi feita através do espectrômetro de massas. Após infusão direta dos padrões das substâncias na fonte do espectrômetro de massas foram obtidos os íons e seus fragmentos. Foram ajustadas e registradas as energias que promovem a ionização e fragmentação dos íons a serem monitorados e detectados. Com a obtenção dos íons e seus fragmentos foi registrada a maior intensidade, indicada por valores que correspondem aos valores de m/z , como os exemplos das Figuras 8 e 9, para a RXA e PI. Os espectros de massas foram obtidos utilizando o detector de massas do tipo triplo quadrupolo equipado com fonte de ionização por eletronebulização positiva operando no modo MRM.

Figura 8 – Espectro de identificação do íon precursor 436,2 m/z e do íon produto 145 m/z da rivaroxabana



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Figura 9 – Espectro de identificação do íon precursor 338,28 m/z e espectro de fragmentação do íon produto 195,17 m/z de linezolida (PI)



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

5.2.2 Validação do método bioanalítico

5.2.2.1 Curvas de calibração / Linearidade

As curvas de calibração se mostraram lineares e adequadas nas concentrações de 1 a 500 ng/mL, com desvios inferiores a 20% para o LIQ e a 15% para os demais níveis de concentração. Os coeficientes de determinação das equações de regressão linear obtidos para todas as análises cromatográficas que representaram as curvas de calibração foram maiores que 0,99 indicando adequada linearidade na faixa de trabalho estudada. Os dados referentes aos 3 lotes (dias distintos), em duplicata de cada ponto, utilizadas durante os ensaios de validação do método estão apresentados na Tabela 4 e a representação da curva do 1º lote é a Figura 10. Os valores dos erros padrão relativos para cada ponto da curva foram satisfatórios.

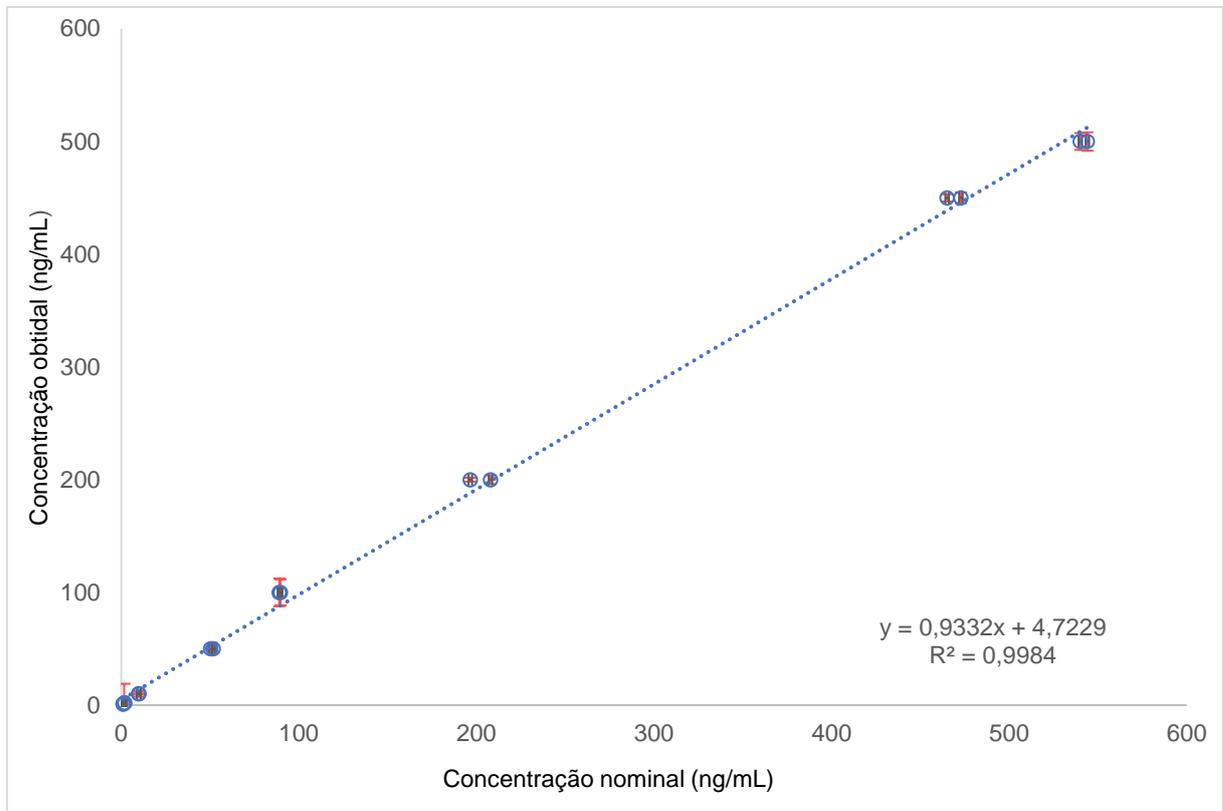
Tabela 4 – Resultados das concentrações obtidas para as curvas de calibração no ensaio de linearidade (3 lotes) e seus desvios (EPR), as equações da reta e os respectivos coeficientes de determinação

Conc. nominal (ng/mL)	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Conc. obtida (ng/mL)	EPR (%)	Conc. obtida (ng/mL)	EPR (%)	Conc. obtida (ng/mL)	EPR (%)
1	1,07	7,0	1,02	2,0	1,02	2,0
	1,01	1,0	1,05	5,0	1,01	1,0
2	1,71	-14,5	1,97	-1,5	1,96	-2,0
	1,96	-2,0	1,83	-8,5	2,01	0,5
10	9,96	-0,4	9,19	-8,1	9,28	-7,2
	9,76	-2,4	9,41	-5,9	9,25	-7,5
50	50,41	0,8	51,31	2,6	43,00	-14,0
	51,77	3,5	49,99	0,0	44,12	-11,8
100	89,73	-10,3	107,99	8,0	104,05	4,1
	89,01	-11,0	97,69	-2,3	103,81	3,8
200	207,91	4,0	194,72	-2,6	198,27	-0,9
	196,57	-1,7	201,88	0,9	191,12	-4,4
450	472,82	5,1	455,56	1,2	450,70	0,2
	465,06	3,3	462,31	2,7	454,89	1,1
500	540,07	8,0	508,27	1,7	521,18	4,2
	544,05	8,8	527,61	5,5	530,66	6,1
Equação da reta	$y = 0,9329x + 4,7302$		$y = 0,9712x + 1,3426$		$y = 0,9656x + 3,2092$	
Coefficiente de determinação	$R^2 = 0,9984$		$R^2 = 0,9993$		$R^2 = 0,9987$	

Fonte: Autor (2019).

Legenda: conc.: concentração; EPR: erro padrão relativo

Figura 10 – Gráfico representativo da curva de calibração de RXA em plasma demonstrando a linearidade do método e os erros padrão dos pontos em duplicata



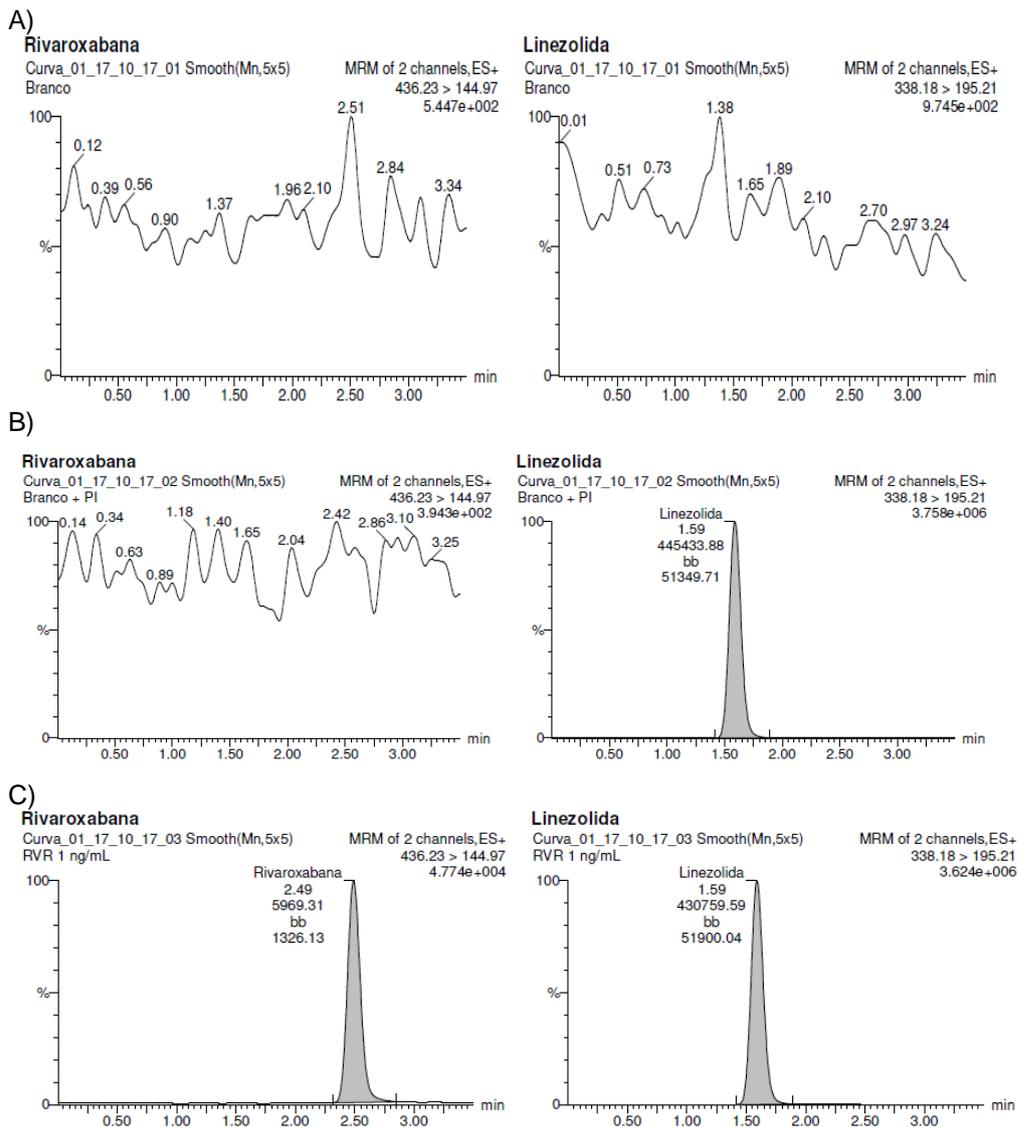
Fonte: Dados da pesquisa (2019).

A extensa faixa de concentração empregada na quantificação das amostras, resultou em variâncias diferentes entre os níveis de concentração, afetando a regressão linear. Devido a isto, as concentrações plasmáticas provenientes das amostras de voluntários foram derivadas a partir da equação de regressão linear utilizando a ponderação $1/x^2$, sendo o modelo matemático utilizado e que melhor acomodou as variações inerentes ao método experimental. Ainda, apresentou o menor valor absoluto para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração *versus* seus valores obtidos pela equação da curva.

Foi possível verificar que o método desenvolvido e validado neste trabalho apresentou sensibilidade (LIQ) e linearidade semelhantes a outros métodos de UHPLC–MS/MS aplicados em estudos para quantificação de rivaroxabana envolvendo seres humanos. Os parâmetros obtidos em nosso estudo foram adequados para as amostras analisadas em estudos de bioequivalência e similares aos da literatura consultada.

Nas amostras branco não foram verificados quaisquer picos de interferentes no tempo de retenção da RXA com áreas superiores a 20% do LIQ e a 5% da área do PI. As áreas do PI foram semelhantes em todos os pontos das curvas de calibração, incluindo o ponto zero. Como exemplos, os cromatogramas obtidos para amostras em plasma branco, zero e LIQ estão representados na Figura 11.

Figura 11 – Cromatogramas representativos das amostras branco (A), zero (B) e LIQ (C) e os respectivos tempos de retenção do analito e PI



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Legenda: A) cromatograma da amostra branco em plasma; B) cromatograma da amostra zero com adição de Linezolida em plasma; C) cromatograma do LIQ que representa 1ng/mL de RXA + PI.

5.2.2.2 Controles de Qualidade / Precisão e Exatidão

O método demonstrou ser preciso e exato nas concentrações analisadas, pois não foram encontrados desvios fora da faixa estabelecida para exatidão e acima do limite aceitável para precisão. Os valores obtidos para CQD indicam que amostras podem ser diluídas até quatro vezes com precisão e exatidão em relação a sua concentração original de 900 ng/mL. Todas as concentrações de CQs obtidas demonstraram proximidade nas medições. Os valores de CV% e EPR% intracorrída e intercorrídas calculados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de precisão (CV%) e inexatidão (EPR%) intracorrídas e intercorrídas para RXA em plasma

CQs	Lotes	Conc. nominal (ng/mL)	Intracorrída n = 5			Intercorrída n = 15		
			Conc. obtida média ± dp (ng/mL)	CV (%)	EPR (%)	Conc. obtida média ± dp (ng/mL)	CV (%)	EPR (%)
LIQ	1	1	1,04 ± 0,01	1,1	3,6	1,02 ± 0,02	2,4	1,8
	2		1,01 ± 0,01	1,0	1,0			
	3		1,01 ± 0,03	3,4	0,8			
CQB	1	3	2,85 ± 0,08	3,0	- 4,9	2,85 ± 0,10	3,5	- 5,1
	2		2,82 ± 0,17	6,1	- 5,9			
	3		2,85 ± 0,05	2,0	- 4,3			
CQM	1	250	253,08 ± 5,74	2,3	1,2	249,81 ± 7,24	2,9	- 0,1
	2		245,08 ± 6,11	2,5	- 2,0			
	3		251,94 ± 4,56	1,8	0,8			
CQA	1	380	388,12 ± 11,77	3,0	2,1	392,02 ± 10,80	2,8	3,2
	2		384,11 ± 6,16	1,6	1,1			
	3		391,99 ± 2,73	0,7	3,2			
CQD (1:3)	1	900	240,68 ± 2,5	1,0	7,0	237,59 ± 4,5	1,9	5,6
	2		232,81 ± 1,2	0,5	3,5			
	3		239,28 ± 4,3	1,8	6,3			

Fonte: Autor (2019).

Legenda: CQs: controles de qualidade; Conc.: concentração; CV%: coeficiente de variação; EPR%: erro padrão relativo; LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto; CQD: controle de qualidade de diluição (1:3).

5.2.2.3 Seletividade

Os resultados das análises das amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado foram comparados com a amostra processada do LIQ e não houve interferência nos tempos de retenção do analito e PI, como mostra a Tabela 6. Ou seja, o método é capaz de medir exatamente o composto RXA e o padrão interno (linezolida) em presença de outros componentes na matriz biológica.

Tabela 6 - Áreas do analito e padrão interno obtidas para determinação do ensaio de seletividade em matrizes distintas

Amostra	Lote	Interferência (%)			
		Analito		Padrão interno	
		Área	%	Área	%
	LIQ	6202	100	437820	100
Lipêmico	LP 164/16	48	0,8	208	0,0
Hemolisado grau 5	HS 250/16	56	0,9	25	0,0
Normal 01	NM 065/17	47	0,8	23	0,0
Normal 02	NM 074/17	30	0,5	11	0,0
Normal 03	NM 076/17	109	1,8	9	0,0
Normal 04	NM 078/17	0	0,0	13	0,0

Fonte: Autor (2019).

Legenda: LIQ: limite inferior de quantificação; %: porcentagem de interferente relativa a área obtida das diferentes amostras testadas quando comparadas com a área do LIQ.

5.2.2.4 Efeito residual

A ausência de efeito residual no método foi confirmada após verificação da inexistência de quaisquer picos de interferentes para analito e PI, nas injeções de amostra branco antes e após duas amostras de LSQ, conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Áreas do analito e padrão interno obtidas para determinação do ensaio de efeito residual

Amostra	Interferência (%)			
	Analito		Padrão Interno	
	Área	%	Área	%
Branco	133	2,2%	16	0,0
LIQ	6063	100%	451325	100%
LSQ	2579154	..	404720	..
LSQ	2561278	..	392501	..
Branco	94	1,6%	14	0,0
Branco	83	1,4%	13	0,0

Fonte: Autor (2019).

Legenda: LIQ: limite inferior de quantificação; %: porcentagem de interferência nas áreas do analito e PI proveniente de amostras analisadas anteriormente.

5.2.2.5 Efeito matriz

Os FMNs e os CVs% obtidos para todas as amostras em cada um dos tipos de matriz analisados possuem valores próximos entre si e abaixo do limite preconizado. Inferimos que a lipemia e hemólise não aumentaram a intensidade do efeito matriz, podendo esse método ser usado para quantificar RXA nos 3 tipos de plasma: normal, lipêmico e hemolisado grau 5.

De acordo com os critérios de aceitação foi possível verificar que não houve diferença entre os CVs% obtidos para amostras de CQB e de CQA, indicando que o efeito matriz no método não foi detectado.

A média do FMN obtida dos resultados da razão entre as amostras branco processadas e ressuspendidas nas soluções de concentrações do CQB e CQA sobre as amostras em solução nas concentrações do CQB e CQA foi de 0,98 com CV igual a 1,8%, contemplando os cálculos para todos os tipos de plasma (TABELA 8).

Tabela 8 – Fator matriz normalizado obtido para analito e padrão interno em três matrizes distintas

Amostra	Amostra de plasma	FMN CQB	FMN CQA
1	Lipêmico	0,96	0,98
2	Lipêmico	0,96	1,00
3	Hemolisado grau 5	0,95	0,98
4	Hemolisado grau 5	1,00	0,98
5	Normal 01	0,99	0,98
6	Normal 02	1,00	0,99
7	Normal 03	0,98	1,01
8	Normal 04	0,98	0,98
Média		0,98	0,99
CV (%)		2,2%	1,1%
Média geral (n = 16)		0,98	
CV (%)		1,8%	

Fonte: Autor (2019).

Legenda: FMN: fator de matriz normalizado; CQB: controle de qualidade baixo; CQA: controle de qualidade alto; CV%: coeficiente de variação.

5.2.2.6 Estabilidade em matriz biológica

Os resultados asseguraram confiabilidade nas análises evitando a obtenção de valores subestimados em decorrência da degradação do analito em estudo. Para os testes de estabilidade do analito em matriz biológica foram empregadas amostras de CQB e CQA cuja média dos resultados da análise imediatamente após sua preparação estavam dentro de $\pm 15\%$ do valor nominal (TABELA 9).

Tabela 9 – Dados referentes aos testes de estabilidade de rivaroxabana em plasma expressos em coeficiente de variação e erro padrão relativo utilizando amostras de CQB e CQA (n = 3)

Condições de preparo	Concentração	Conc. obtida	Precisão	Inexatidão
	nominal (ng / mL)	média ± dp (ng / mL) (n = 3)	(CV%)	(EPR%)
Amostra recém-preparada	3	2,86 ± 0,0	1,2	- 4,6
(preparo e análise imediata)	380	395,81 ± 5,0	1,3	4,2
Curta duração	3	3,06 ± 0,2	5,0	1,9
(6 horas temperatura ambiente)	380	410,33 ± 32,5	7,9	8,0
Pós-processamento	3	2,74 ± 0,1	2,2	- 8,6
(auto injetor 26 horas)	380	377,11 ± 6,9	1,8	- 0,8
4 ciclos de congelamento e	3	2,89 ± 0,0	1,6	- 3,8
descongelamento (-20°C)	380	389,68 ± 11,1	2,8	2,5
Longa duração	3	3,05 ± 0,1	4,9	1,7
(178 dias a -20°C)	380	396,19 ± 8,3	2,1	4,3

Fonte: Autor (2019).

Legenda: Conc.: concentração; dp: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação; EPR%: erro padrão relativo.

5.2.2.7 Estabilidade em solução

As soluções padrão do analito e do PI foram estáveis por 6 horas após o preparo, a temperatura ambiente e por 42 dias quando armazenadas em refrigerador (2 a 8 °C). As soluções de trabalho foram estáveis por 6 horas após o preparo a temperatura ambiente e por 21 dias quando armazenadas em refrigerador (2 a 8 °C). Os ensaios acima mencionados apresentaram variações inferiores a 10%. A Tabela 10 reporta os dados obtidos para os ensaios de estabilidade das soluções de RXA e linezolid (PI) indicando que ambos os compostos são estáveis em soluções padrão e de trabalho nas condições estudadas.

Tabela 10 – Estabilidade das soluções padrão e de trabalho através das comparações das variações médias das respostas do analito e do padrão interno

	RP	6 h	42 dias	RP	6 h	21 dias
	T° ambiente			T° ambiente		
	2 a 8 °C			2 a 8 °C		
	Soluções padrão RXA (50 µg/mL) (n = 3)			Soluções trabalho RXA (50 µg/mL) (n = 3)		
média ± dp (resposta Analito / PI)	6,51 ± 0,0	6,37 ± 0,0	6,59 ± 0,0	6,64 ± 0,0	6,66 ± 0,1	6,62 ± 0,1
CV (%)	0,1	0,4	0,3	0,6	1,7	0,1
Variação (%)	..	-2,2	1,2	..	0,3	0,3
	Soluções padrão PI (500 ng/mL) (n = 3)			Soluções trabalho PI (500 ng/mL) (n = 3)		
média ± dp (resposta Analito / PI)	0,15 ± 0,0	0,16 ± 0,0	0,15 ± 0,0	0,16 ± 0,0	0,16 ± 0,0	0,16 ± 0,0
CV (%)	0,6	0,5	0,5	0,1	0,6	0,8
Variação (%)	..	2,6	- 1,3	..	1,2	0,4

Fonte: Autor (2019).

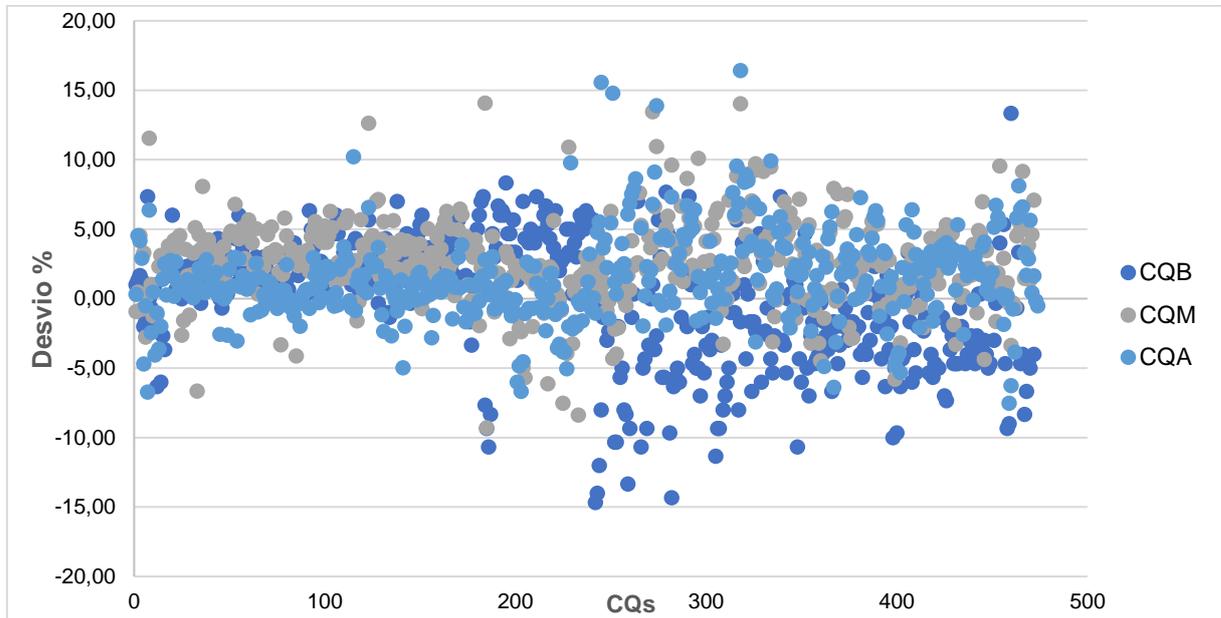
Legenda: RP: solução recém-preparada; T°: temperatura; RXA: rivaroxabana; PI: padrão interno (linezolidina); dp: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação.

5.2.3 Quantificação das amostras dos participantes da pesquisa

A quantificação da RXA em plasma foi realizada por UHPLC-MS/MS a partir do método desenvolvido e validado descrito em 3.2.3 e 3.2.4. Em cada corrida analítica foi possível a análise de três voluntários sendo aproximadamente 300 amostras diárias. As amostras de plasma dos participantes da pesquisa foram analisadas em simplicata juntamente com as curvas de calibração e os controles de qualidade em quadruplicata, e a princípio em três concentrações CQB, CQM e CQA (3, 250 e 380 ng/mL).

O desempenho a longo prazo do ensaio, totalizando a análise de 10536 amostras desconhecidas de voluntários nos estudos de bioequivalência em condições de jejum e pós-prandial, foi analisado. As amostras de CQs analisadas simultaneamente com as amostras dos estudos confirmaram os valores de precisão e exatidão que foram determinados durante o experimento de validação (FIGURAS 12 e 13).

Figura 12 – Amostras de controle de qualidade (CQs) avaliando o desempenho do ensaio durante a quantificação dos estudos em jejum e pós-prandial. Corridas analíticas de 117 participantes de pesquisa e quatro CQs por valor de concentração



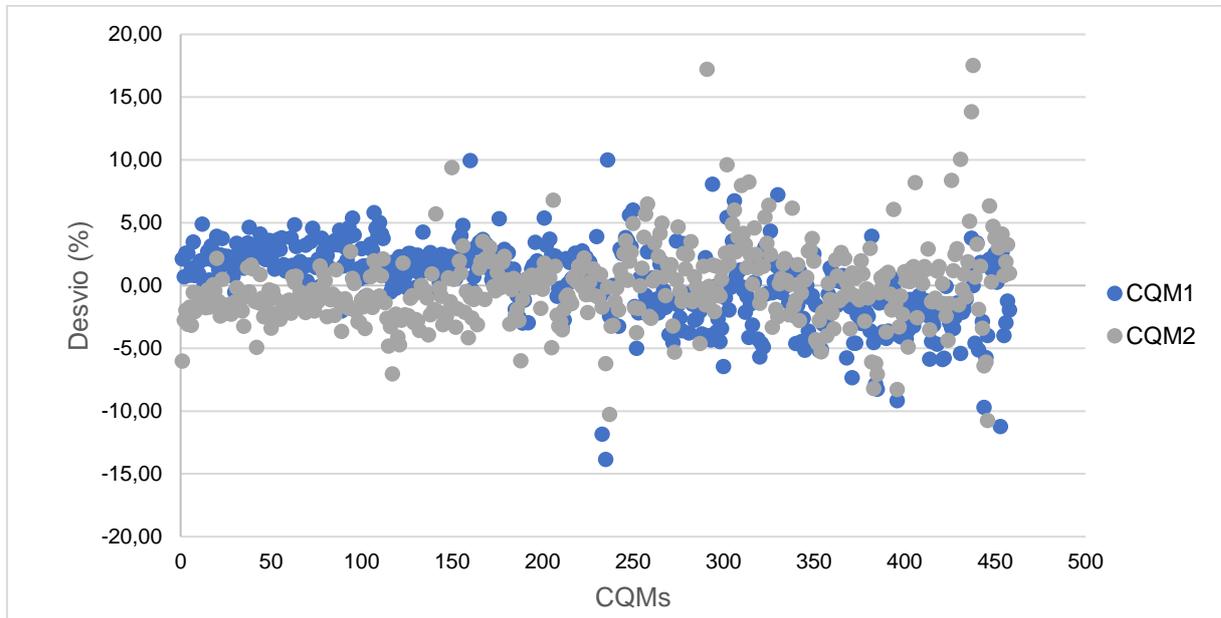
Fonte: Autor (2022).

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo (3 ng/mL); CQM: controle de qualidade médio (250 ng/mL); CQA: controle de qualidade alto (380 ng/mL).

Após a quantificação de 10% das amostras dos voluntários foram adicionados dois novos controles de qualidade médios (CQMn1 e CQMn2) de concentrações iguais a 35 e 70 ng/mL, respectivamente. Pelo menos dois CQs devem estar dentro da faixa de concentrações medidas. A curva de calibração foi muito ampla em comparação com as concentrações dos voluntários e, assim, foram acrescentados controles adicionais no momento da avaliação crítica.

As amostras dos controles de qualidade foram distribuídas regularmente ao longo das corridas analíticas. Incluindo a análise do quinto voluntário, referente ao estudo em condições de jejum e a partir dela os CQMn1 e CQMn2 (em quadruplicata) foram introduzidos nas corridas analíticas subsequentes e em todo estudo pós-prandial. Uma nova avaliação foi realizada, após quantificação de 50% das amostras dos voluntários não sendo necessária a adição de outros novos controles de qualidade.

Figura 13 – Amostras de controle de qualidade (CQMn1 e CQMn2) adicionados nas corridas analíticas a partir do quinto voluntário (estudo em jejum) até a quantificação final das amostras desconhecidas, para avaliação do desempenho do ensaio



Fonte: Autor (2022).

Legenda: CQMn1: controle de qualidade médio (35 ng/mL); CQMn2: controle de qualidade médio (70 ng/mL).

No geral, a maioria das amostras de CQs apresentaram desvio para precisão menor que 10% entre as execuções e para a exatidão também ($< \pm 10\%$).

Nenhum voluntário apresentou concentrações acima do LSQ no estudo em condições de jejum. No estudo pós-prandial, os participantes 05 e 08 (período 1) e 24 (período 2) apresentaram C_{max} acima de 500 ng/mL. As amostras dos voluntários com concentrações superiores ao LSQ foram diluídas e reanalisadas. Foram incluídos os controles de qualidade de diluição (CQD) na corrida analítica de reanálise para esses casos. Neste estudo, as amostras de participantes de pesquisa não apresentaram hemólise.

O método de extração apresentou bom desempenho, com tempo curto de preparação das amostras, simplicidade da técnica e redução do efeito de matriz. Além de proporcionar a desnaturação de proteínas, excluindo possíveis contaminações da coluna cromatográfica, aumentando sua durabilidade. As limitações do método foram a não-utilização de padrão interno deuterado, que poderia melhorar ainda mais o tempo da análise cromatográfica e o uso da extração líquido-líquido, com mistura de solventes orgânicos, gerando resíduo para descarte.

O alto custo do equipamento e a necessidade de conhecimento técnico especializado limitam a expansão do uso de UHPLC-MS/MS, mas a excelência dos resultados vem favorecendo essa tecnologia. No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método UHPLC-MS/MS rápido, preciso e exato e as condições testadas para armazenamento foram consideradas adequadas para evitar a degradação do analito.

Por fim, o método bioanalítico cumpriu a proposta de quantificação em plasma humano de rivaroxabana para aplicação em estudos de bioequivalência possibilitando traçar corretamente o perfil farmacocinético.

5.3 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA E AVALIAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA

Inicialmente, foram randomizados 60 voluntários sadios para cada estudo de bioequivalência, a fim de que finalizassem com um poder mínimo de 80%; concluíram as etapas dos estudos 117 participantes de pesquisa. Devido ao pequeno tamanho amostral nenhum teste de significância foi executado para avaliar a hipótese de normalidade dos parâmetros farmacocinéticos.

Os parâmetros farmacocinéticos descritos na Tabela 11 foram determinados utilizando o software WinNonlin conforme previsto no protocolo clínico. As análises estatísticas foram executadas no módulo Bioequivalence Wizard, que automaticamente calcula os intervalos de confiança e estima todas as estatísticas adicionais necessárias ao estudo.

Considerando os valores de p obtidos para os testes ANOVA, não foram constatadas diferenças significativas ao nível de 5% de significância para os fatores de tratamento e período e ao nível de 10% de significância para o fator sequência, para nenhum dos parâmetros farmacocinéticos.

A ANVISA, assim como a US-FDA, recomendam que sejam conduzidos dois estudos de bioequivalência com 20 mg de RXA em condições de jejum e pós-prandial. A RXA é um fármaco que sofre efeito dose dependente e complexo da alimentação sobre a absorção e possui baixa solubilidade. No caso de fármacos com as características descritas é recomendado a realização de dois estudos de bioequivalência em condições de jejum e pós-prandial, a fim de explorar os extremos da variabilidade da alimentação (GARCÍA-ARIETA; GORDON, 2012).

Para estudos de bioequivalência na condição pós-prandial, as agências

reguladoras internacionais são favoráveis a realização sob condições extremas de alimentação, com alto teor calórico e lipídico. Isso garante que os resultados obtidos possam ser extrapolados para todos os regimes alimentares (GARCÍA-ARIETA; GORDON, 2012). A ANVISA não tem sugestão para a composição das refeições portanto seguimos as orientações da US-FDA.

Devido às condições alimentares influenciarem os parâmetros farmacocinéticos de RXA, as análises estatísticas foram realizadas separadamente, por estudo em condições de jejum e pós-prandial.

Tabela 11 – Média dos parâmetros farmacocinéticos de rivaroxabana após dose única oral de 20 mg da formulação teste e referência em condições de jejum (n = 60) e pós-prandial (n = 57) com delineamento dos estudos sendo 2x4

Parâmetros Média ± EP	Jejum (n = 240)		Pós-prandial (n = 228)	
	Referência	Teste	Referência	Teste
C_{max} (ng/mL)	191,12 ± 6,59	183,98 ± 6,72	325,41 ± 7,32	299,92 ± 7,70
ASC^{0-t} (ng/mL*h)	1573,82 ± 46,21	1509,91 ± 42,11	1969,12 ± 53,73	1888,29 ± 49,99
ASC^{0-inf} (ng/mL*h)	1685,15 ± 49,35	1674,33 ± 53,55	2037,85 ± 66,70	1932,85 ± 50,24
T_{max} (h)	2,26 ± 0,11	2,48 ± 0,12	3,03 ± 0,10	3,10 ± 0,12
$t_{1/2}$ (h)	15,24 ± 0,60	17,57 ± 1,33	8,50 ± 0,41	10,11 ± 0,48
K_{el} (1/h)	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,002	0,10 ± 0,004	0,09 ± 0,004
Cl/F (mL/h)	13,00 ± 0,35	13,19 ± 0,37	10,73 ± 0,29	11,19 ± 0,31
Vd/F (L)	271,73 ± 10,15	304,77 ± 13,26	126,68 ± 6,23	158,95 ± 7,79

Fonte: Autor (2019).

Legenda: EP: erro padrão; C_{max} : concentração máxima; ASC^{0-t} : área sob a curva de zero ao último tempo determinado; ASC^{0-inf} : área sob a curva de concentração versus tempo desde o tempo zero até o infinito; T_{max} : tempo correspondente à ocorrência da concentração plasmática máxima; $t_{1/2}$: meia vida de eliminação do fármaco; K_{el} : constante de eliminação; Cl: clearance; Vd: volume de distribuição; F: biodisponibilidade.

Os valores médios de C_{max} e ASC^{0-t} foram $187,55 \pm 6,66$ ng/mL e $1541,87 \pm 44,16$ ng/mL*h, no estudo em condições de jejum ($n = 240$) e $312,67$ ng/mL e $1928,71 \pm 51,86$ ng/mL*h no estudo pós-prandial ($n = 228$), respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo, tanto para formulação teste quanto de referência, apresentaram aumento para C_{max} de 66% e ASC^{0-t} de 25% na presença de alimentos quando comparado às condições de jejum. Os dados corroboram com outros estudos descritos na literatura, quando se administrou 20 mg de RXA, por via oral, nas duas condições. Um dos primeiros estudos sobre a influência da alimentação na administração de 20 mg de RXA foi de Kubitzka *et al.* (2006), que demonstraram em condições de jejum C_{max} de 158 ng/mL e ASC^{0-t} de 1629 ng/mL*h; quando comparados ao estudo pós-prandial os valores foram 74% maior para C_{max} (273 ng/mL) e 25% mais alto para ASC^{0-t} (2021 ng/mL*h). Os dados de Stampfuss *et al.* (2013) também mostraram valores de C_{max} e ASC^{0-t} aumentados em 76% e 39%, respectivamente. E para Tao *et al.* (2022), o aumento entre as condições de jejum e pós-prandial foi de 73% para C_{max} e 50% para ASC^{0-t} . Os voluntários que participaram nesta pesquisa são diferentes entre as condições dos estudos; então variações observadas para os valores absolutos de C_{max} e ASC podem estar relacionadas não somente com o efeito da alimentação, mas também com a variabilidade interindividual.

Kubitzka *et al.* (2005b) mostraram a RXA sendo rapidamente absorvida após administração oral em condições de jejum, nas doses entre 1,25 – 80 mg, atingindo C_{max} em aproximadamente 2 horas. Sob condições pós-prandial, o tempo médio para atingir a C_{max} (T_{max}) variou entre 3 e 3,5 horas para dose orais de 10, 15 e 20 mg, conforme publicado por Stampfuss *et al.* (2013). Os dados médios obtidos neste estudo para T_{max} foram sensivelmente diferentes, entre as condições de jejum e pós-prandial, 2,37 e 3,07 horas, respectivamente. Quando comparamos nossos resultados nas duas condições, com outros trabalhos publicados é possível verificar a semelhança dos dados de T_{max} : Mueck *et al.* (2014) (2h vs 3h), Ding *et al.* (2019) (2h vs 4h) e Tao *et al.* (2022) (2,2h vs 2,9h).

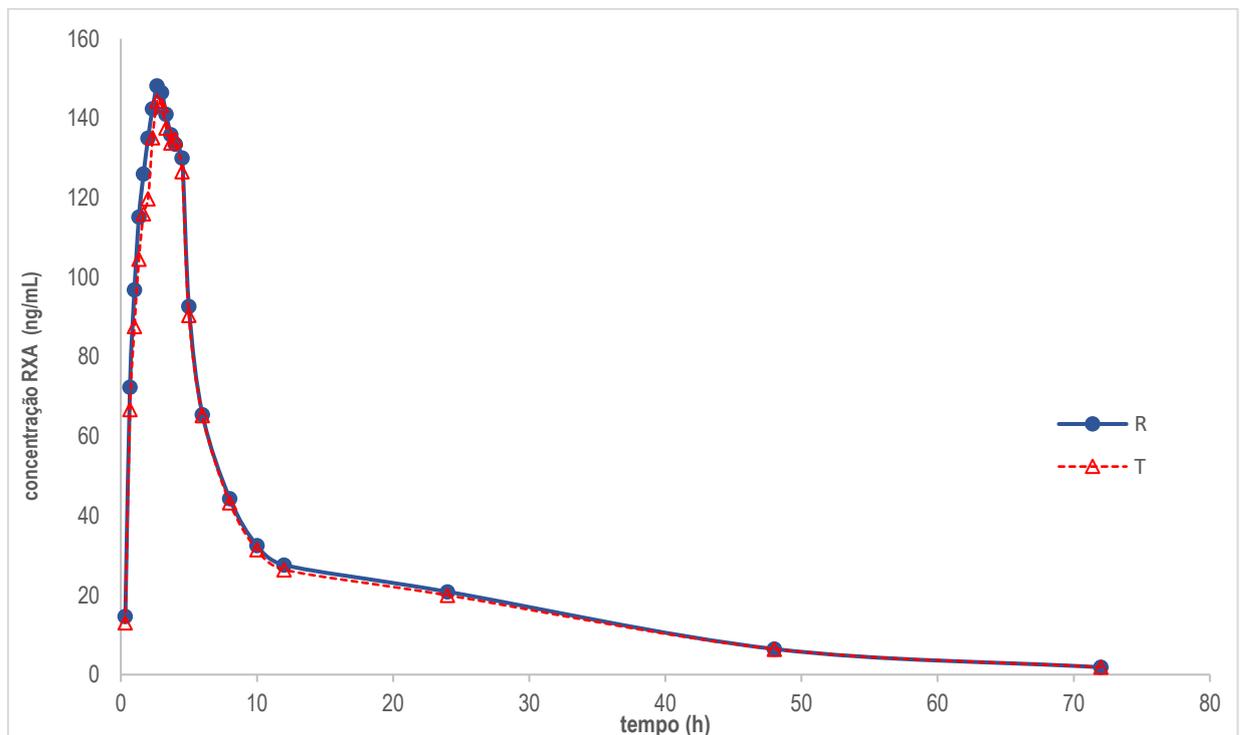
Refeições com alto teor de lipídeos retardam o esvaziamento gástrico, aumentando o tempo de trânsito para o intestino delgado e, posteriormente, retardando a absorção na circulação sistêmica (KUBITZKA *et al.*, 2006). Como esperado, os indivíduos alimentados apresentaram valores médios de T_{max} maiores do que os voluntários em jejum, e menores em relação ao valores nominais de V_d/F .

A meia-vida plasmática média para ambos os estudos mostrou-se de acordo a dados descritos em outros trabalhos. Assim como nos estudos de Ding *et al.* (2019) e Tao *et al.* (2022), $t_{1/2}$ foi prolongada em condições de jejum (TABELA 11); relacionando a taxa de absorção mais lenta do que a taxa de eliminação.

Não foram observados eventos adversos graves, intensos e inesperados ou que levassem à descontinuação dos estudos. Independente da formulação administrada (T ou R) e das condições jejum ou pós-prandial, os dados indicaram que a RXA 20 mg foi bem tolerada entre indivíduos saudáveis. A cefaleia foi o evento mais comum, sendo relatado em ambos os estudos jejum (10) e pós-prandial (3).

A partir das médias das concentrações plasmáticas de RXA quantificadas em cada tempo especificado nos protocolos de pesquisa, estratificadas por tratamento (teste e referência) foi possível a construção dos gráficos (FIGURAS 14 a 17).

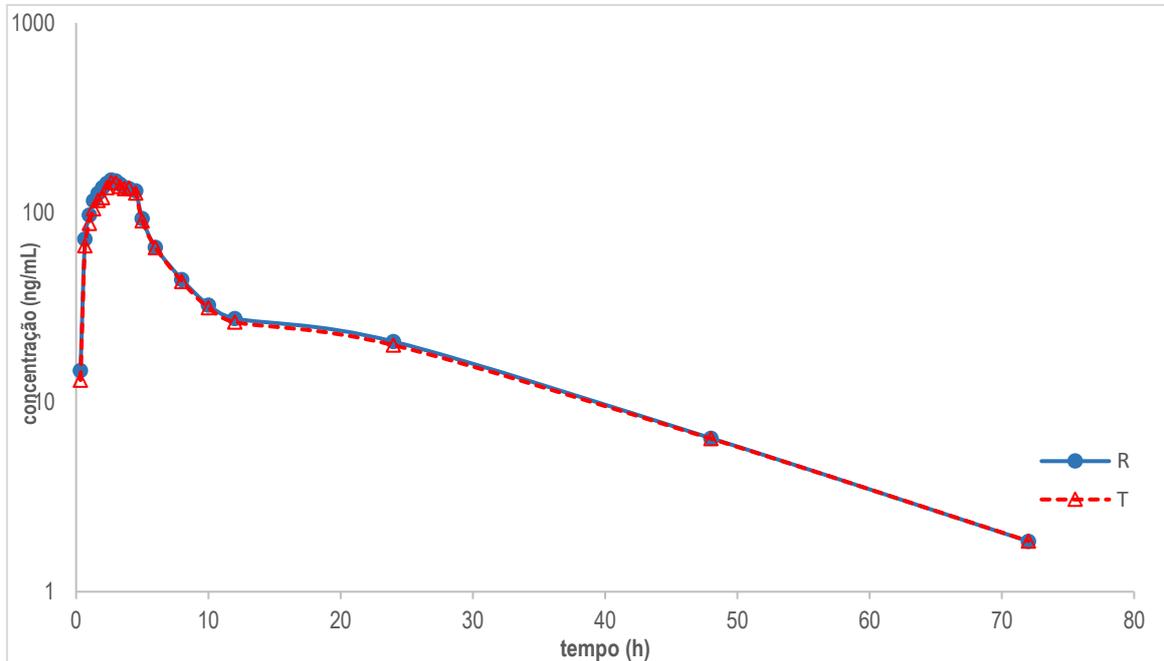
Figura 14 – Curva de concentração plasmática média de rivaroxabana *versus* tempo, após administração de 20 mg em 60 voluntários sadios em condições de jejum



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Legenda: R: medicamento de referência; T: medicamento teste.

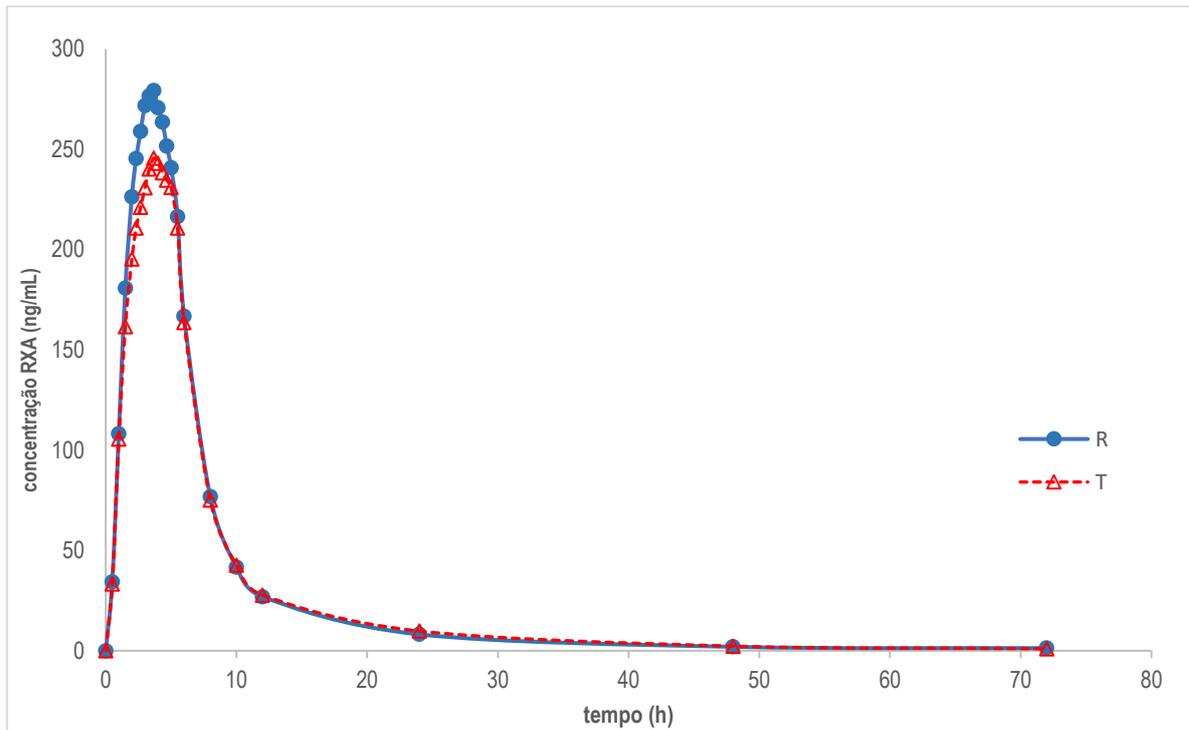
Figura 15 – Curva de concentração plasmática média de rivaroxabana log transformada *versus* tempo, após administração de 20 mg em 60 voluntários sadios em condições de jejum



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Legenda: R: medicamento de referência; T: medicamento teste.

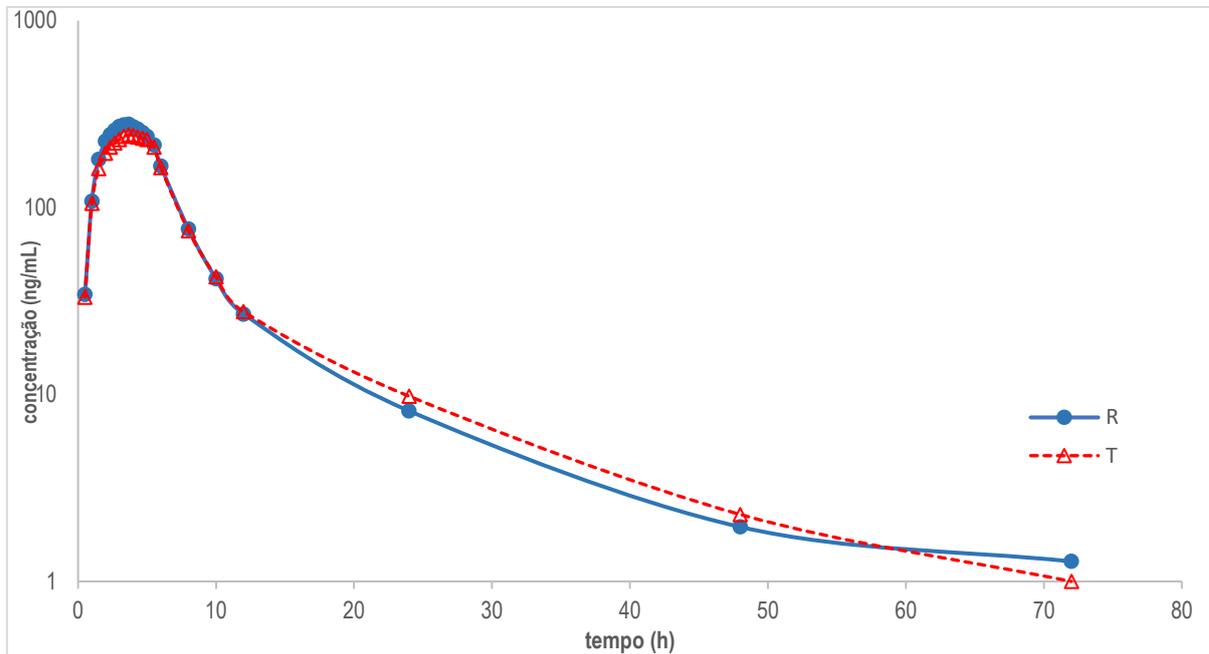
Figura 16 – Curva de concentração plasmática média de rivaroxabana *versus* tempo, após administração de 20 mg em 57 voluntários sadios em condições pós-prandial



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Legenda: R: medicamento de referência; T: medicamento teste.

Figura 17 – Curva de concentração plasmática média de rivaroxabana log transformada *versus* tempo, após administração de 20 mg em 57 voluntários sadios em condições pós-prandial



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Legenda: R: medicamento de referência; T: medicamento teste.

Para a avaliação da bioequivalência, foram calculadas as razões das médias geométricas dos parâmetros relacionados à velocidade e a extensão da absorção, C_{max} e ASC , respectivamente. A Tabela 12 mostra que os ICs 90% das razões, para os parâmetros citados se apresentaram entre 80 e 125%, portanto bioequivalentes em ambos os estudos. Embora não seja necessário demonstrar bioequivalência, a mesma conclusão pode ser estendida para ASC^{0-inf} .

Tabela 12 – Intervalo de confiança de 90% dos parâmetros farmacocinéticos log-transformados para as formulações teste e referência

Parâmetros	Razão (%)	IC 90% (%)	Poder (%)	CV_{intraindividual} (%)
Estudo Jejum (n = 60)				
C _{max}	95,53	89,91 – 101,62	100	29,95
ASC ^{0-t}	96,22	92,57 – 100,03	100	18,51
ASC ^{0-inf}	98,90	95,08 – 102,87	100	17,24
Estudo Pós-prandial (n = 57)				
C _{max}	91,42	88,82 – 94,09	100	11,40
ASC ^{0-t}	95,88	92,74 – 99,12	100	16,07
ASC ^{0-inf}	95,69	92,30 – 99,20	100	18,98

Fonte: Autor (2019).

Legenda: C_{max}: concentração máxima; ASC^{0-t}: área sob a curva de zero ao último tempo determinado; ASC^{0-inf}: área sob a curva de concentração versus tempo desde o tempo zero até o infinito; Razão: razão da média geométrica teste/referência; IC 90%: intervalo de confiança de 90%; CV_{intraindividual}: coeficiente de variação intraindividual.

Classicamente, a determinação da bioequivalência é baseada no conceito de bioequivalência média. Dois medicamentos são declarados bioequivalentes se o intervalo de confiança de 90% calculado para a razão das médias geométricas dos parâmetros farmacocinéticos, na escala log transformada, estiverem dentro do limite de 80 a 125% (TOTHFALUSI; ENDRENYI; GARCIA-ARIETA, 2009; DAVIT *et al.*, 2012; KARALIS; SYMILLIDES; MACHERAS, 2012; YU *et al.*, 2015; SONG; LEE; KIM, 2021). É geralmente aceito que uma diferença de 20% não tenha relevância clínica para a maioria dos medicamentos (TOTHFALUSI; ENDRENYI; GARCIA-ARIETA, 2009; YU *et al.*, 2015).

Para fins de bioequivalência, é considerado que a variabilidade residual reflete a variabilidade intraindividual do medicamento em estudo. Essa abordagem é amplamente utilizada, no entanto para fármacos altamente variáveis, ela se mostrou problemática (TOTHFALUSI; ENDRENYI; GARCIA-ARIETA, 2009; DAVIT *et al.*, 2012; KARALIS; SYMILLIDES; MACHERAS, 2012; YU *et al.*, 2015; SONG; LEE; KIM, 2021).

Fármacos altamente variáveis têm um coeficiente de variação (CV) intraindividual $\geq 30\%$ para um determinado parâmetro farmacocinético, geralmente C_{max}. Por isso é necessário realizar um desenho replicado para estimar sua

variabilidade intraindividual; pelo menos o medicamento de referência deve ser administrado duas vezes. À medida que a variabilidade intraindividual do produto de referência aumenta, é possível aplicar a abordagem da bioequivalência escalonada, método no qual a faixa de aceitação de bioequivalência pode ser expandida além de 80 a 125% (TOTHFALUSI; ENDRENYI; GARCIA-ARIETA, 2009; DAVIT *et al.*, 2012; GARCÍA-ARIETA; GORDON, 2012; KARALIS; SYMILLIDES; MACHERAS, 2012; SONG; LEE; KIM, 2021).

A RXA é descrita na literatura como um fármaco altamente variável e, demonstrou uma relação de dose-resposta acentuada para eficácia e segurança; portanto, não é recomendada a utilização da abordagem de bioequivalência escalonada do medicamento de referência para ampliar os limites de aceitação da bioequivalência. Apesar disso, há recomendação do desenho cruzado 2x4, totalmente replicado que permite a comparação da variabilidade além da comparação de médias.

Para a US-FDA, a sugestão do delineamento é igual para ambos, sendo os mesmos cruzados totalmente replicados (2x4). Adicionalmente, deve ser comparada a variabilidade intraindividual das formulações teste e referência, obtida neste tipo de desenho (FDA, 2011). Os estudos de bioequivalência para RXA devem usar a abordagem de bioequivalência média com limites de 80-125%. Para a comparação da variabilidade intraindividual dos produtos teste e de referência, o limite superior do intervalo de confiança de 90% para a relação teste/referência da variabilidade intraindividual deve ser $\leq 2,5$. Esse método para análise estatística que compara a variabilidade intraindividual é aplicado para fármacos que tem índice terapêutico estreito como a varfarina sódica (FDA, 2012; YU *et al.*, 2015).

A Tabela 13 contém os resultados estatísticos da comparação e avaliação da variabilidade das formulações, para os parâmetros C_{max} , ASC^{0-t} , e ASC^{0-inf} ; onde o limite superior do intervalo de confiança de 90% para a razão dos desvios padrão (teste/referência) foi $\leq 2,5$, nas duas condições.

Tabela 13 – Razão entre os desvios padrão e intervalo de confiança de 90% para a razão

Intervalo de Confiança 90%				
Parâmetros	Razão % (SwT/SwR)	Limite inferior	Limite superior	Limite superior $\leq 2,5$
Estudo Jejum (n = 60)				
C_{max}	0,95	0,76	1,18	SIM
ASC^{0-t}	1,05	0,84	1,30	SIM
ASC^{0-inf}	1,16	0,94	1,45	SIM
Estudo Pós-prandial (n = 57)				
C_{max}	1,28	1,02	1,59	SIM
ASC^{0-t}	0,85	0,68	1,06	SIM
ASC^{0-inf}	0,71	0,56	0,88	SIM

Fonte: Autor (2019).

Legenda: SwT : desvio padrão intraindividual teste; SwR : desvio padrão intraindividual referência; C_{max} : concentração máxima; ASC^{0-t} : área sob a curva de zero ao último tempo determinado; ASC^{0-inf} : área sob a curva de concentração versus tempo desde o tempo zero até o infinito.

5.4 ANÁLISE DE EFEITO BIOLÓGICO NOS PARÂMETROS DE COAGULAÇÃO

Os valores médios obtidos para TP e TTPa estão apresentados na Tabela 14, relativos ao tempo de 3 horas, que é mais próximo ao efeito máximo, foram prolongados quando comparados aos tempos zero e 24 horas; tempos esses em que não se espera efeito anticoagulante e nenhuma ou concentrações muito baixas de rivaroxabana. No estudo pós-prandial, os valores de TP e TTPa estão mais prolongados (em segundos) quando comparados ao estudo em jejum, talvez pelo efeito da alimentação na biodisponibilidade da rivaroxabana que mostra concentrações médias maiores.

Tabela 14 – Valores médios, mínimos e máximos de TP, TTPa e concentrações de rivaroxabana em condições de jejum e pós-prandial (n = 117)

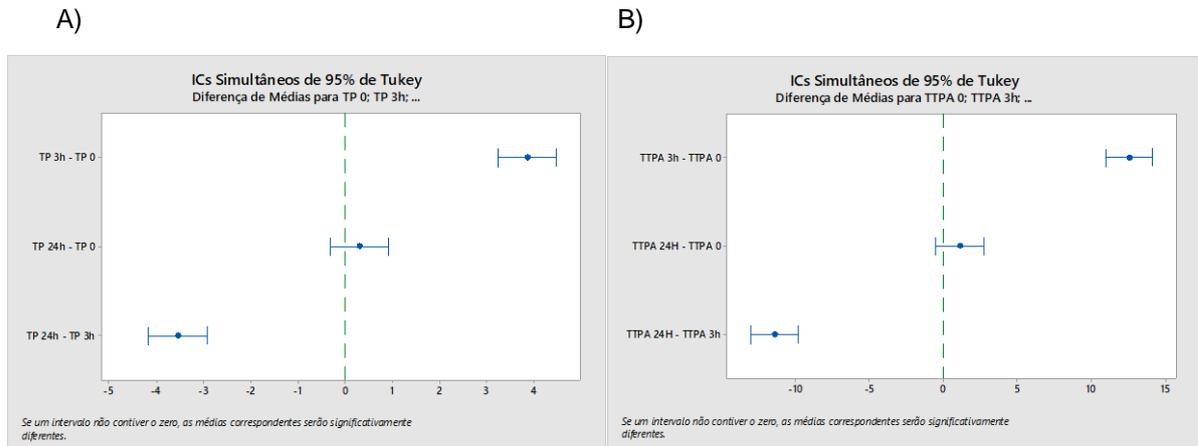
Parâmetros	Pré-dose		Pós-dose	
	0:00 h	3:00 h	24:00 h	
Estudo Jejum (n = 60)				
TP (s)	14,7 (13,1 – 18,0)	18,6 (15,2 – 23,5)	15,0 (13,1 – 17,4)	
TTPa (s)	34,2 (27,2 – 45,9)	46,8 (37,3 – 58,5)	35,4 (26,8 – 42,8)	
Conc. RXA (ng/mL)	0	149,7 (35,9 – 327,6)	20,4 (2,04 – 43,9)	
Estudo Pós-prandial (n = 57)				
TP (s)	14,8 (12,7 – 18,1)	22,7 (16,8 – 31,2)	14,8 (18,1 – 12,9)	
TTPa (s)	33,0 (26,9 – 38,2)	50,3 (33,2 – 64,3)	32,7 (27,0 – 38,9)	
Conc. RXA (ng/mL)	0	264,9 (136,7 – 419,0)	8,14 (2,2 – 27,5)	

Fonte: Autor (2019).

Legenda: s: segundos; TP: tempo de protrombina; TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada; Conc. RXA: concentração de rivaroxabana.

O teste da ANOVA foi aplicado e rejeitou-se a hipótese nula de igualdade entre as médias de TP e TTPa, nos momentos em que as amostras foram coletadas (tempo zero, 3 e 24 h); evidenciando que ao menos uma das médias diferia das demais. Foi aplicado o teste *post hoc* de Tukey, como demonstrado nas Figuras 18 e 19. Os gráficos abaixo mostram que as médias de TP e TTPa, em 3 horas, diferem das médias nos tempos zero e 24 horas. As médias de TP e TTPa nos tempos 0 e 24 horas não foram estatisticamente diferentes.

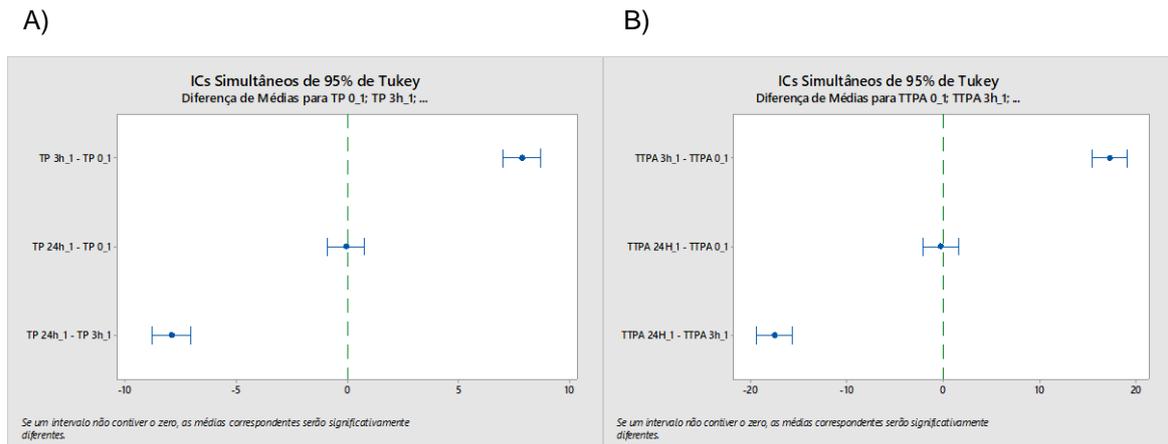
Figura 18 – Diferença das médias para TP (A) e TTPa (B) no estudo em jejum



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Legenda: IC: intervalo de confiança; TP: tempo de protrombina; TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada.

Figura 19 – Diferença das médias para TP (A) e TTPa (B) no estudo pós-prandial



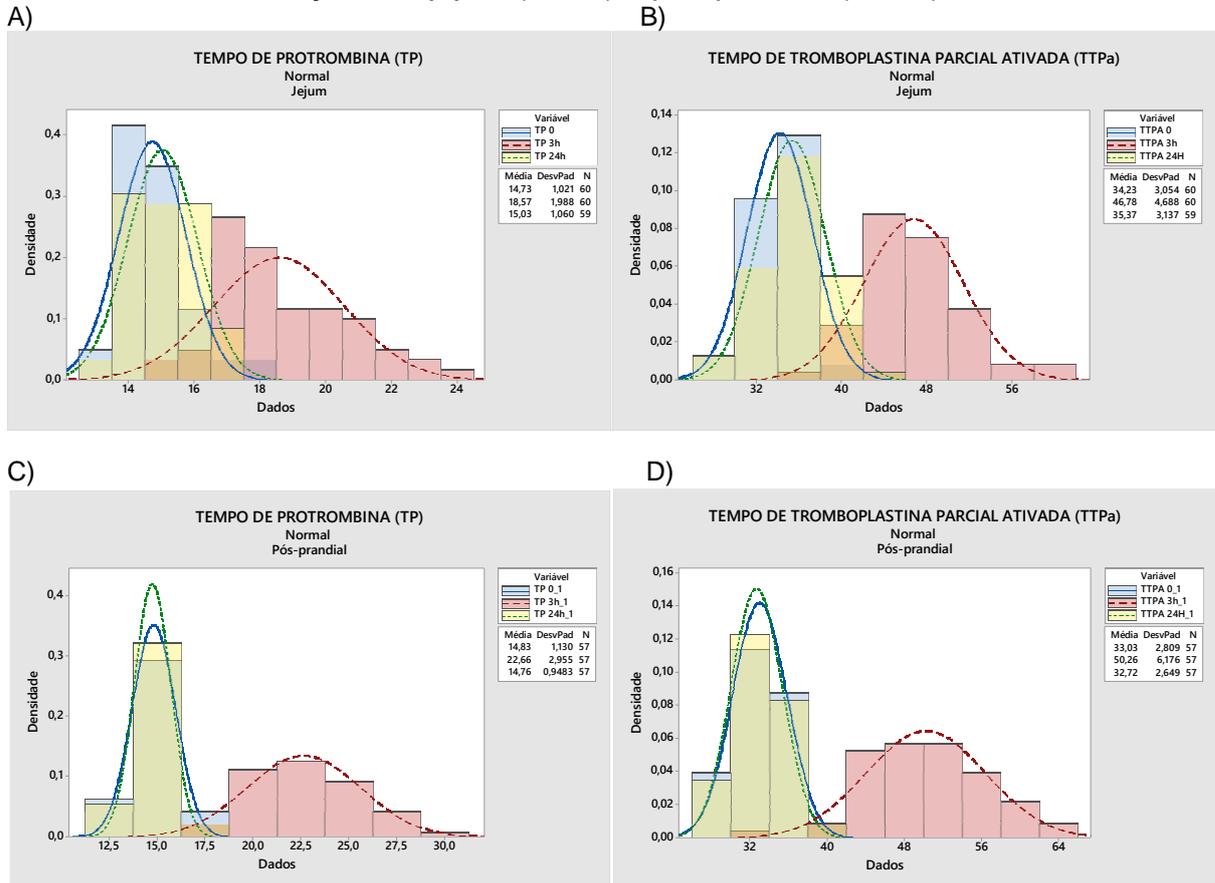
Fonte: Dados da pesquisa (2019).

Legenda: IC: intervalo de confiança; TP: tempo de protrombina; TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada.

No tempo de 3 horas, alguns participantes da pesquisa apresentaram valores de TP e TTPa dentro da faixa de referência preconizada pelo laboratório, após a administração de 20 mg de RXA. Os resultados ficaram próximos aos limites superiores dos valores de referência, mas não acima. Uma ampla faixa de concentração de RXA produziu valores normais para esses dois parâmetros, como ilustrado nos gráficos abaixo (FIGURA 20). No estudo em jejum, 26 participantes com concentrações de RXA variando entre 35,97 e 174,67 ng/mL apresentaram TP normal e 16 participantes com concentrações entre 35,97 a 263,49 ng/mL apresentaram TTPa normal. No estudo pós-prandial, dois participantes com níveis de RXA entre

136,69 e 201,90 ng/mL apresentaram TP normal e 12 com concentrações entre 136,69 a 417,93 ng/mL, apresentaram TTPa normal.

Figura 20 – Distribuição dos valores de TP e TTPa nos tempos de coleta nos estudos em condições de jejum (A e B) e pós-prandial (C e D)



Fonte: Dados da pesquisa (2019).

A Figura 21 exibe gráficos de dispersão e a análise de Pearson. Em A e C o gráfico mostra que o TP se correlaciona moderadamente com a concentração de rivaroxabana no tempo 3 horas ($r = 0,707$ e $r = 0,642$). Na mesma figura, nos gráficos B e D é mostrada uma correlação também moderada de TTPa com a concentração de rivaroxabana no tempo 3 horas ($r = 0,500$ e $r = 0,472$).

5.5 GENOTIPAGEM

5.5.1 Características genotípicas

Da população total de 117 participantes de pesquisa que concluiu os dois estudos de bioequivalência, todos participaram do estudo farmacogenético. A Tabela 15 mostra as frequências alélicas e genotípicas da população de voluntários saudáveis. Todos os indivíduos foram genotipados para a variante 421 C>A no gene *ABCG2*. A variante analisada cumpriu o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($p \geq 0,05$, teste χ^2).

Tabela 15 – Frequência alélica e genotípica da população estudada (n = 117)

Genótipo	Frequência absoluta	Frequência genotípica	Frequência alélica	χ^2
Estudo Jejum				
(n = 60)				
CC	53	0,883	0,925 (p)	0,983
CA	5	0,083		
AA	2	0,033	0,075 (q)	
Estudo Pós-prandial				
(n = 57)				
CC	53	0,930	0,917 (p)	0,989
CA	4	0,070		
AA	0	0	0,066 (q)	

Fonte: Autor (2021).

Legenda: C = alelo C; A = alelo A; p = frequência do alelo C; q = frequência do alelo A; χ^2 : teste qui-quadrado (p valor obtido > 0,05).

As frequências genotípicas e alélicas relativas da população total de indivíduos foram calculadas. As frequências alélicas (p e q) e genotípicas (p^2 , $2pq$ e q^2) permanecem constantes de uma geração para a outra. Expresso em termos algébricos, o EHW implica que a soma das frequências alélica ($p + q = 1$) e genotípica ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) é igual a um (MAYO, 2008). A detecção dos desvios do EHW foi realizada comparando-se as frequências observadas e esperadas por meio do teste estatístico qui-quadrado (χ^2).

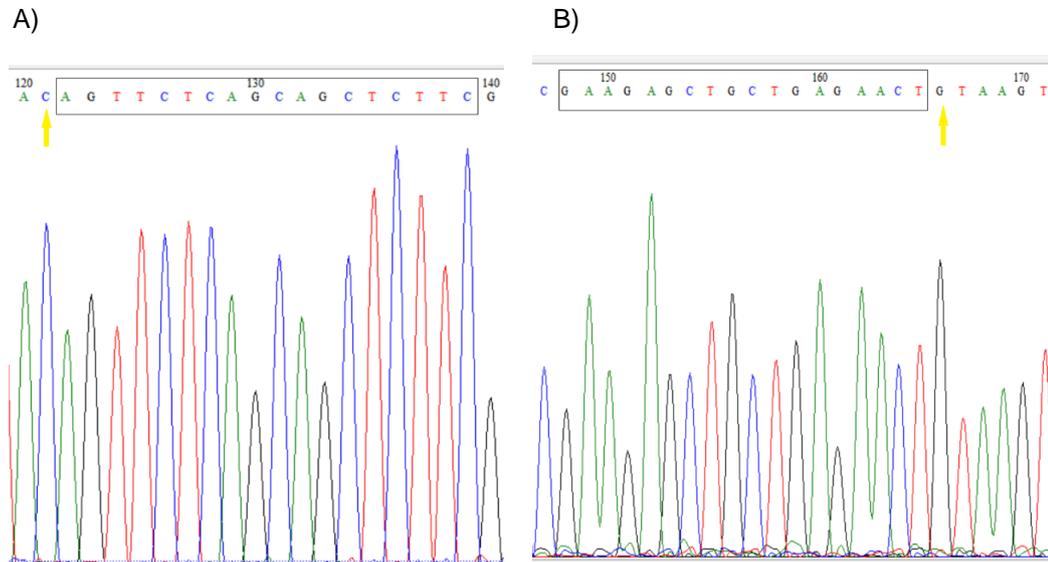
A frequência alélica de *ABCG2* 421 C>A é significativamente maior em asiáticos (30%-60%) do que caucasianos e afro-americanos (5%-10%). A variante C421A tem frequência do alelo menor em 10% da população global, sendo mais alta em asiáticos (IEIRI 2012; SAKIYAMA *et al.*, 2014; FOHNER *et al.*, 2017; HIRA; TERADA, 2018; CHEN *et al.*, 2019). Foi detectado o genótipo 421C/C em número superior na população deste estudo, e prevalência consideravelmente menor do genótipo 421 A/A. No estudo em condições de jejum, 2 participantes apresentaram o genótipo A/A e nenhum no estudo pós-prandial.

De acordo com Suarez-Kurtz *et al.* (2012), a extrapolação de dados de grupos étnicos não se aplica à maioria dos brasileiros e a distribuição de frequência de polimorfismos não é capturada pelo modo de autodeclaração proposto pelo IBGE. Não foi analisada a ancestralidade genética dos participantes de pesquisa desse estudo, utilizamos o parâmetro de autodeclaração cor/raça. Apesar de útil, a autopercepção de cor/raça no Brasil não se correlaciona com a ancestralidade genética dos brasileiros (SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2012). Não foi possível comparar as frequências alélicas encontradas na população desse estudo para polimorfismo 421 C>A com os dados Sakiyama *et al.*, (2014) e Hira; Terada, (2018) que utilizaram a população japonesa em suas pesquisas.

5.5.2 Determinação do genótipo do gene *ABCG2* por sequenciamento

As Figuras 22, 23 e 24 mostram os resultados dos eletroferogramas, obtidos das reações de sequenciamento dos participantes da pesquisa 01, 02 e 07 como exemplificação, do estudo em condições de jejum que possuem os genótipos CC, CA e AA, respectivamente.

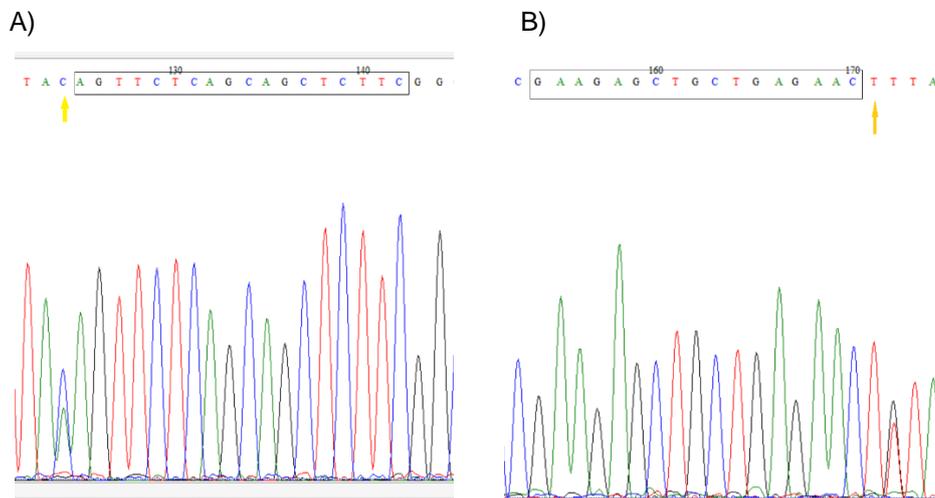
Figura 22 – Eletroferograma para visualização do polimorfismo 421C>A. Resultado do sequenciamento das duas fitas com os *primers*: *forward* (A) e *reverse* (B) do participante da pesquisa 01, com genótipo 421CC, selvagem.



Fonte: Dados da pesquisa (2021).

Legenda: A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina.

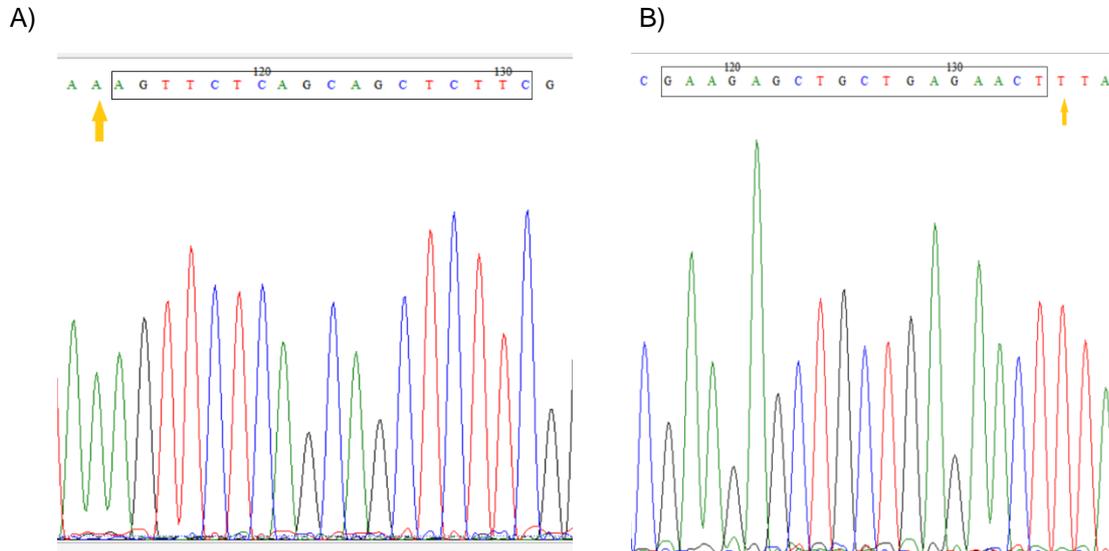
Figura 23 – Eletroferograma para visualização do polimorfismo 421C>A. Resultado do sequenciamento das duas fitas com os *primers*: *forward* (A) e *reverse* (B) do participante da pesquisa 02, com genótipo 421CA, heterozigoto.



Fonte: Dados da pesquisa (2021).

Legenda: A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina.

Figura 24 – Eletroferograma para visualização do polimorfismo 421C>A. Resultado do sequenciamento das duas fitas com os *primers*: *forward* (A) e *reverse* (B) do participante da pesquisa 07, com genótipo 421AA, homozigoto mutante.



Fonte: Dados da pesquisa (2021).

Legenda: A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina.

A Tabela 16 mostra a distribuição das médias dos dados farmacocinéticos e de efeito biológico dos parâmetros de coagulação avaliados, após administração de 20 mg de RXA em condições de jejum e pós-prandial, relacionadas aos genótipos 421 C>A analisado neste estudo para o gene *ABCG2*.

Tabela 16 – Parâmetros farmacocinéticos e efeitos biológicos de rivaroxabana (média \pm desvio padrão) segundo os diferentes genótipos do polimorfismo analisado no gene *ABCG2*

Genótipo	Estudo Jejum (n = 60)			Estudo Pós-prandial (n = 57)	
	CC n = 53	CA n = 5	AA n = 2	CC n = 53	CA n = 4
Parâmetros Farmacocinéticos (média \pm dp)					
C_{max} (ng/mL)	190,19 \pm 56,57	176,27 \pm 48,18	145,81 \pm 17,06	308,06 \pm 70,04	360,57 \pm 76,48
ASC^{0-t} (ng/mL*h)	1570,77 \pm 426,64	1374,69 \pm 391,11	1193,81 \pm 13,36	1913,44 \pm 480,09	2087,52 \pm 428,50
$t_{1/2}$ (h)	15,47 \pm 4,95	16,43 \pm 2,52	41,04 \pm 23,73*	9,51 \pm 4,14	10,23 \pm 4,84
Cl / F (mL/h)	13,01 \pm 3,34	14,50 \pm 4,47	11,82 \pm 2,13	11,08 \pm 2,95	9,71 \pm 1,74
Vd / F (L)	275,59 \pm 82,23	334,45 \pm 115,23	508,27 \pm 72,79*	144,18 \pm 60,51	128,62 \pm 40,35
Parâmetros da Coagulação em 3h (média \pm dp)					
TP (s)	18,62 \pm 1,99	18,38 \pm 2,51	17,80 \pm 1,13	22,50 \pm 2,92	24,38 \pm 3,08
TTPa (s)	47,00 \pm 4,76	44,78 \pm 4,81	45,90 \pm 0,00	49,93 \pm 5,97	53,70 \pm 7,97

Fonte: Autor (2021).

Legenda: C: alelo C; A = alelo A; C_{max} : concentração máxima; ASC^{0-t} : área sob a curva de zero ao último tempo determinado; $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação; T_{max} : tempo correspondente à ocorrência da concentração plasmática máxima; Cl: *clearance*; Vd: volume de distribuição; TP: tempo de protrombina; TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada; Foram obtidos valores de p a partir do teste ANOVA; As médias e desvios padrão em negrito e com símbolos sobrescritos (*) significam que são estatisticamente diferentes de acordo com o teste *post hoc* de Tukey; * $p \leq 0,05$.

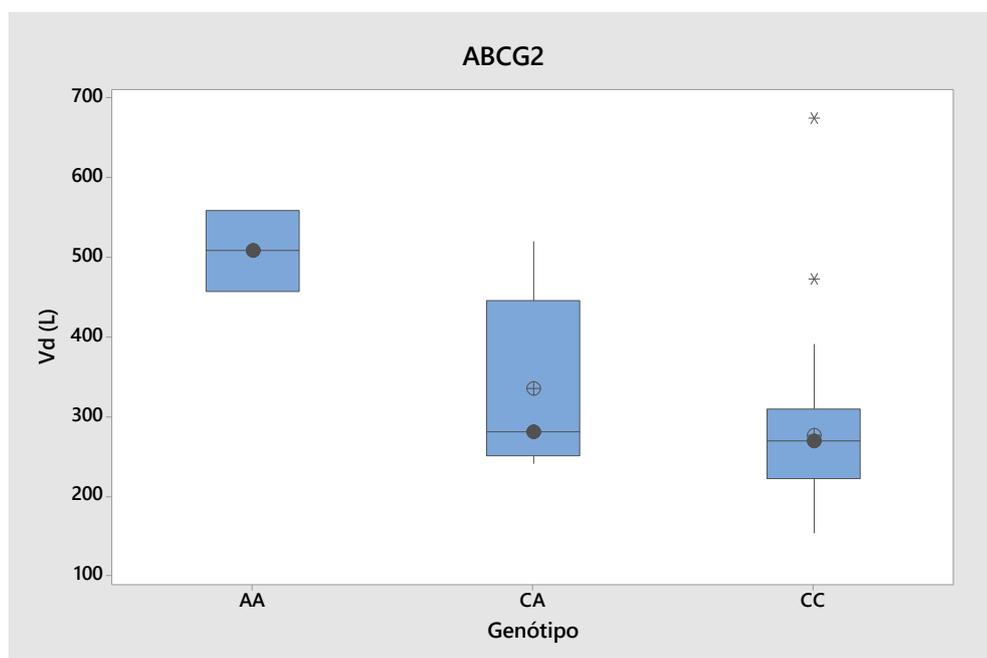
Estudos anteriores demonstraram que a RXA é transportada pela P-gp (ABCB1) e BCRP (ABCG2) (ALI; NAWAL, 2010; PERZBORN *et al.*, 2010, 2011; MISSELWITZ; BERKOWITZ; PERZBORN, 2011; KREUTZ, 2012; KUBITZA; PERZBORN; BERKOWITZ, 2013; MUECK; KUBITZA; BECKA, 2013; MUECK *et al.*, 2014; NAKAGAWA *et al.*, 2021). O polimorfismo dos transportadores ABC foi relacionado com a variabilidade da exposição aos fármacos substratos (IEIRI, 2012; MCLEAN; WILSON; KIM, 2016; SENNESAEEL *et al.*, 2018).

Foi observada, nesta pesquisa, tendência para os dois indivíduos portadores do genótipo 421A/A apresentarem as menores médias (TABELA 16) para os

parâmetros farmacocinéticos C_{max} ($p = 0,488$), ASC^{0-t} ($p = 0,307$) e *Clearance* ($p = 0,563$), embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas ($p > 0,05$); sugerindo que o polimorfismo no gene da BCRP pode não ter influência nos parâmetros farmacocinéticos da RXA: C_{max} e ASC . Ressalta-se o n baixo deste genótipo.

Ainda, nos nossos dados, portadores do genótipo *ABCG2* 421A/A apresentaram valores médios significativamente maiores de V_d/F ($508,27 \pm 72,79$ L; $p = 0,001$) e $t_{1/2}$ ($41,04 \pm 23,73$ h; $p = 0,000$) do que os outros genótipos, 421C/A e 421C/C, que não tiveram diferença estatisticamente significativa entre suas médias. As representações gráficas usando *box plot*, de cada genótipo para o V_d/F e $t_{1/2}$ dos participantes do estudo em condições de jejum, estão ilustradas nas Figuras 25 e 26.

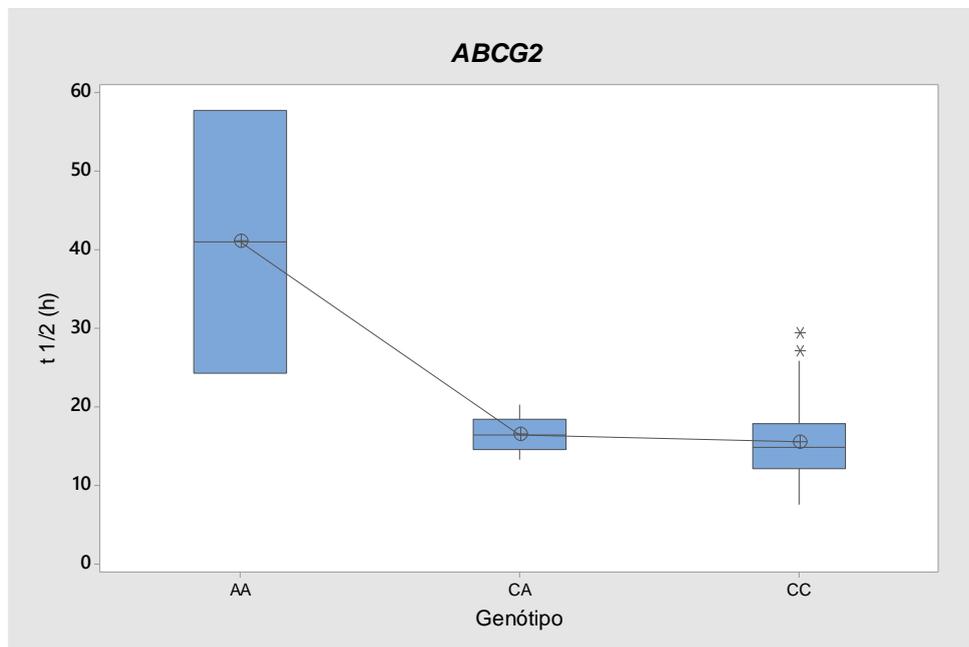
Figura 25 – *Box plot* de V_d/F (L) da rivaroxabana em condições de jejum para os genótipos 421 C>A do gene *ABCG2*



Fonte: Dados da pesquisa (2021).

Legenda: *ABCG2*: gene de interesse; V_d : volume de distribuição; F: biodisponibilidade; A = alelo A. C = alelo C. A parte inferior e superior da caixa representa o primeiro e terceiro quartis, e a faixa dentro da caixa corresponde a mediana. Os bigodes se estendem até os valores máximos e mínimos da série de dados. Os valores extremos (3 vezes o intervalo interquartil) são plotados com uma estrela (*).

Figura 26 – *Box plot* de $t_{1/2}$ (h) da rivaroxabana em condições de jejum, para os genótipos 421 C>A do gene *ABCG2*



Fonte: Dados da pesquisa (2021).

Legenda: *ABCG2*: gene de interesse; $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação; A = alelo A. C = alelo C. A parte inferior e superior da caixa representa o primeiro e terceiro quartil, e a faixa dentro da caixa corresponde a mediana. Os bigodes se estendem até os valores máximos e mínimos da série de dados. Os valores extremos (3 vezes o intervalo interquartil) são plotados com uma estrela (*).

O efeito nos parâmetros de coagulação, avaliados através do prolongamento dos tempos de TP e TTPa em 3 horas (TABELA 16), parecem não terem sido afetados pelo polimorfismo do gene *ABCG2* avaliado neste estudo; os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Não há indícios de que as medições de TP e TTPa contribuam significativamente para a estimativa das concentrações de rivaroxabana. A tomada de decisões clínicas baseadas nos resultados de TP e TTPa sem conhecer a sensibilidade e especificidade desses testes pode representar risco significativo para a segurança do paciente.

O polimorfismo *ABCG2* 421C>A é um indicador estabelecido para a farmacocinética clínica de vários medicamentos como gefitinibe e rosuvastatina (SAKIYAMA *et al.*, 2014). Ueshima *et al.* (2017), num estudo realizado em pacientes japoneses com fibrilação atrial não valvular, indicaram que o genótipo *ABCG2* 421 A/A influencia as concentrações mínimas de apixabana, que também é um AOD assim como a RXA.

Até o momento, apenas um estudo farmacogenético avaliou a relação entre as concentrações mínimas de RXA e os polimorfismos genéticos das enzimas CYP e dos

transportadores ABCB1 e ABCG2; não foi discutido no artigo publicado os dados obtidos para o polimorfismo 421 C>A do gene *ABCG2*. Nakagawa *et al.* (2021) realizaram esse estudo em pacientes japoneses com fibrilação atrial não valvar utilizando RXA em dose diária, há pelo menos uma semana. Observou-se que os indivíduos portadores dos alelos AA (4 de 86 genotipados), apresentaram concentrações mínimas de RXA mais baixas que os outros pacientes.

Diferentemente do estudo acima mencionado, nossa pesquisa foi realizada após a administração oral de 20 mg de RXA, em dose única, a participantes de pesquisa saudáveis, o que impede a avaliação de eficácia e segurança a longo prazo. A farmacocinética, farmacodinâmica e tolerabilidade podem variar em pacientes recebendo tratamento crônico, com patologias associadas e medicação concomitante. No entanto, um projeto de dose única em indivíduos saudáveis pode avaliar o efeito dos polimorfismos genéticos sobre a rivaroxabana, sem outros fatores de confusão como por exemplo: tabagismo, condições de dietas controladas, entre outros.

Os resultados de Nakagawa *et al.*, (2021) compararam os polimorfismos com as concentrações mínimas (no vale) e nosso estudo avaliou o impacto do polimorfismo em cinco parâmetros farmacocinéticos, além dos parâmetros de efeito biológico. Entretanto, a hipótese de que os alelos AA possivelmente afetam parâmetros farmacocinéticos e conseqüentemente a biodisponibilidade, sugerindo que é uma variante com perda de função, se faz presente em ambos os estudos.

O fígado e os rins expressam a maior variedade e nível de transportadores de fármacos que modulam os processos de eliminação. Alterações em transportadores de efluxo nos túbulos renais, provenientes de polimorfismos genéticos, geralmente levam ao aumento do volume de distribuição. Estas condições podem resultar em mudança significativa no efeito do fármaco ou na probabilidade de toxicidade, bem como uma mudança em meia-vida, independente de uma mudança na depuração (GROVER; BENET 2009).

Uma vez que o cálculo do tamanho amostral deste estudo não foi realizado para comparação de genótipos, mas sim para bioequivalência, é importante que os resultados sejam interpretados com cautela, dado o pequeno tamanho da amostra, para estudo farmacogenético. Observações baseadas em estudos multicêntricos com elevado tamanho amostral são preferíveis para o entendimento do impacto dos genes transportadores ABC na farmacocinética da RXA, para aumentar o número de estudos com população de indivíduos portadores de genótipos de baixa prevalência.

À medida que o interesse em medicina personalizada e farmacogenética aumenta, há necessidade de mais estudos sobre interações de agentes farmacológicos e as variantes genéticas. O futuro parece caminhar na direção da medicina de precisão, com a qual o medicamento certo é prescrito para determinado paciente, possibilitando assim otimizar o manejo da anticoagulação na crescente população de pacientes em terapia com AODs. A RXA é um anticoagulante oral direto, que vem sendo cada vez mais utilizado na prática clínica de terapias antitrombóticas. No entanto, nenhuma diretriz farmacogenética para RXA está disponível até o presente momento.

Nosso intuito foi avaliar uma possível contribuição do gene transportador *ABCG2* na farmacogenética da RXA, visando entender sua participação na variação interindividual. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer a contribuição relativa aos genótipos *ABCG2* 421 C>A para a farmacocinética de RXA e mais análises farmacocinéticas populacionais.

6 CONCLUSÃO

- O método bioanalítico para quantificação de RXA em plasma empregando a técnica UHPLC-MS/MS apresentou rapidez, sensibilidade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética e bioequivalência. O método demonstrou robustez ao ser utilizado na análise de 10.524 amostras desconhecidas.

- Considerando que o intervalo de confiança de 90% para as razões das médias geométricas dos parâmetros C_{max} e ASC^{0-t} estão dentro do intervalo (80 – 125 %) estabelecido pela ANVISA, em ambos os estudos jejum e pós-prandial conclui-se que as formulações teste e referência foram bioequivalentes. A RXA foi bem tolerada pelos participantes de pesquisa incluídos.

- Em ambos os estudos, os valores de TP e TTPa, relativos ao tempo de 3 horas, apresentaram prolongamento (em segundos) e se correlacionaram moderadamente com as concentrações de RXA.

- No estudo em condições de jejum, os parâmetros farmacocinéticos C_{max} , ASC^{0-t} e CI foram menores nos participantes com genótipo 421 A/A em relação aos genótipos 421 C/C e C/A. Os dois únicos participantes portadores do genótipo *ABCG2* 421 A/A apresentaram valores médios de Vd/F ($p = 0,001$) e $t_{1/2}$ ($p = 0,000$) maiores do que os outros genótipos e com significância estatística ($p \leq 0,05$).

REFERÊNCIAS

- ALI, M.; NAWAL, C. Rivaroxaban: A novel anticoagulant. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 64, n. 11, p. 520, 2010.
- ARMSTRONG, A. C. *et al.* Excesso de mortalidade hospitalar por doenças cardiovasculares no Brasil durante o primeiro ano da pandemia de Covid-19. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 119, n. 1, p. 37-45, 2022.
- AŠIĆ, A. *et al.* Pharmacogenetics of novel oral anticoagulants: a review of identified gene variants & future perspectives. **Personalized Medicine**, v. 15, n. 3, p. 209-221, 2018.
- BAKER, W. L.; CHAMBERLIN, K. W. New oral anticoagulants vs. Warfarin treatment: No need for pharmacogenomics? **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 17–19, 2014.
- BALDELLI, S. *et al.* Validation of an LC–MS/MS method for the simultaneous quantification of dabigatran, rivaroxaban and apixaban in human plasma. **Bioanalysis**, v. 8, n. 4, p. 275–283, 2016.
- BERLIN, D. S. *et al.* PharmGKB summary: Cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2: CYP2J2. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 5, p. 308–311, 2011.
- BRANDÃO, G. M. S. *et al.* Anticoagulantes orais diretos para o tratamento da trombose venosa profunda: revisão de revisões sistemáticas. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 17, n. 4, p. 310–317, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 27/12, de 17 de maio de 2012. Brasília, DF. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acesso em: 01 jul. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 898, de 29 de maio de 2003 (2003). Brasília, DF, Brasil. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0898_29_05_2003.html. Acesso em: 08 abr. 2019.
- CAVALLARI, L. H.; SHIN, J.; PERERA, M. A. Role of pharmacogenomics in the management of traditional and novel oral anticoagulants. **Pharmacotherapy**, v. 31, n. 12, p. 1192–1207, 2011.
- CERESETTO, J. M. Venous thromboembolism in Latin America: A review and guide to diagnosis and treatment for primary care. **Clinics**, v. 71, n. 1, p. 36–46, 2016.
- CHEN, L. *et al.* Development of precision medicine approaches based on inter-individual variability of BCRP/ABCG2. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, n. 4, p. 659–674, 2019.

CHOW, S-C.; WANG, H. On Sample size calculation in bioequivalence trials. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 28, n. 2, p. 155-169, 2001.

CROSS, M. B.; BOETTNER, F. Pathophysiology of venous thromboembolic disease. **Seminars in Arthroplasty JSES**, v. 20, n. 4, p. 210–216, 2009.

CUKER, A. *et al.* Laboratory measurement of the anticoagulant activity of the non-vitamin K oral anticoagulants. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 11, p. 1128–1139, 2014.

CULLELL, N. *et al.* Pharmacogenetic studies with oral anticoagulants. Genomewide association studies in vitamin K antagonist and direct oral anticoagulants. **Oncotarget**, v. 9, n. 49, p. 29238–29258, 2018.

DAVIT, B. M. *et al.* Implementation of a reference-scaled average bioequivalence approach for highly variable generic drug products by the us food and drug administration. **AAPS Journal**, v. 14, n. 4, p. 915–924, 2012.

DEROGIS, P. B. M. *et al.* Determination of rivaroxaban in patient's plasma samples by anti-Xa chromogenic test associated to high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–11, 2017.

DIDERIKSEN, D.; DAMKIER, P.; NYBO, M. Rivaroxaban non-responders: Do plasma measurements have a place? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 56, n. 1, p. e16–e18, 2017.

DINCQ, A. S. *et al.* Management of Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants in the Perioperative Setting. **Biomed Research International**, v. 2014, 2014.

DING, S. *et al.* Bioequivalence study of 2 formulations of rivaroxaban, a narrow-therapeutic-index drug, in healthy chinese subjects under fasting and fed conditions. **Clinical Pharmacology Drug Development**, v. 9, n. 3, p. 346-352, 2020.

DUNOIS, C. Laboratory monitoring of direct oral anticoagulants (Doacs). **Biomedicines**, v. 9, n. 5, p. 1–15, 2021.

EIKELBOOM, J. W. *et al.* Laboratory monitoring of non-Vitamin K antagonist oral anticoagulant use in patients with atrial fibrillation: A review. **JAMA Cardiology**, v. 2, n. 5, p. 566–574, 2017.

ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. **Guidance for industry - draft guidance on rivaroxaban**. White Oak, Maryland, 2011. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2011/202439s000ltr.pdf. Acesso em: 13 jan. 2020.

ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. **Guidance for industry - guidance on warfarin sodium**. White Oak, Maryland, 2012. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Warfarin_Sodium_tab_09218_RC12-12.pdf. Acesso em: 13 jan. 2020.

FERNANDES, A. L. C. *et al.* Novos anticoagulantes orais (NOACs) na prevenção de acidente vascular encefálico (AVE) e fenômenos tromboembólicos em pacientes com fibrilação atrial. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 13, n. 2, p. 98–106, 2015.

FERNANDEZ, S. *et al.* Drug-drug interactions leading to adverse drug reactions with rivaroxaban: A systematic review of the literature and analysis of vigibase. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 4, 2021.

FOERSTER, K. I. *et al.* Simultaneous quantification of direct oral anticoagulants currently used in anticoagulation therapy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 148, p. 238–244, 2018.

FOHNER, A. E. *et al.* PharmGKB summary: Very important pharmacogene information for ABCG2. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 27, n. 11, p. 420–427, 2017.

GAI, S. *et al.* LC–MSMS method for simultaneous determination of rivaroxaban and metformin in rat plasma, application to pharmacokinetic interaction study. **Bioanalysis**, v. 11, n. 24, p. 2269–2281, 2019.

GARCÍA-ARIETA, A.; GORDON, J. Bioequivalence requirements in the european union: Critical discussion. **AAPS Journal**, v. 14, n. 4, p. 738–748, 2012.

GIORDANO, N. J. *et al.* Epidemiology, pathophysiology, stratification, and natural history of pulmonary embolism. **Techniques in Vascular and Interventional Radiology**, v. 20, n. 3, p. 135–140, 2017.

GONG, I. Y.; MANSELL, S. E.; KIM, R. B. Absence of both MDR1 (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) transporters significantly alters rivaroxaban disposition and central nervous system entry. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 112, n. 3, p. 164–170, 2013.

GOSSELIN, R.; GRANT, R. P.; ADCOCK, D. M. Comparison of the effect of the anti-Xa direct oral anticoagulants apixaban, edoxaban, and rivaroxaban on coagulation assays. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 5, p. 505–513, 2016.

GOUIN-THIBAUT, I. *et al.* Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB1 genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 15, n. 2, p. 273–283, 2017.

GOUS, T. *et al.* Measurement of the direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in human plasma using turbulent flow liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 36, n. 5, p. 597–605, 2014.

GROVER, A.; BENET, L. Z. Effects of drug transporters on volume of distribution. **The AAPS Journal**, v. 11, n. 2, p. 250-261, 2009

GUIA DA FARMÁCIA. **IQVIA aponta dos dez medicamentos mais vendidos no Brasil**. São Paulo, SP, 2019. Disponível em: <https://guiadafarmacia.com.br/iqvia-aponta-os-dez-medicamentos-de-prescricao-mais-vendidos-no-brasil/>. Acesso em: 19 nov. 2021.

HARDER, S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of rivaroxaban: considerations for the treatment of venous thromboembolism. **Thrombosis Journal**, v. 12, n. 22, p. 1–13, 2014.

HIRA, D.; TERADA, T. BCRP/ABCG2 and high-alert medications: Biochemical, pharmacokinetic, pharmacogenetic, and clinical implications. **Biochemical Pharmacology**, v. 147, p. 201–210, 2018.

HOFFBRAND, A. V; MOSS, P. A. H. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 315–329.

HOFFMEYER, S. *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3473–3478, 2000.

IEIRI, I. Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2). **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 27, n. 1, p. 85–105, 2012.

IQBAL, M. *et al.* A validated high-throughput UHPLC-MS/MS assay for accurate determination of rivaroxaban in plasma sample. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 39, n. 1, p. 79–88, 2015.

JOHNSON, J. A.; CAVALLARI, L. H. Pharmacogenetics and cardiovascular disease-implications for personalized medicine. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 3, p. 987–1009, 2013.

KANURI, S. H.; KREUTZ, R. P. Pharmacogenomics of novel direct oral anticoagulants: Newly identified genes and genetic variants. **Journal of Personalized Medicine**, v. 9, n. 1, 2019.

KARALIS, V.; SYMILLIDES, M.; MACHERAS, P. Bioequivalence of highly variable drugs: A comparison of the newly proposed regulatory approaches by FDA and EMA. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 4, p. 1066–1077, 2012.

KATSONIS, P. *et al.* Single nucleotide variations: Biological impact and theoretical interpretation. **Protein Science**, v. 23, n. 12, p. 1650–1666, 2014.

KHAN, F. *et al.* Venous thromboembolism. **The Lancet**, v. 398, n. 10294, p. 64–77, 2021.

KOBAYASHI, D. *et al.* Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 1, p. 94–101, 2005.

KOROSTELEV, M. *et al.* Simultaneous determination of rivaroxaban and dabigatran levels in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 230–235, 2014.

KREUTZ, R. Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 27–32, 2012.

KUBITZA, D. *et al.* Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939 - An oral, direct Factor Xa inhibitor - After multiple dosing in healthy male subjects. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, n. 12, p. 873–880, 2005a.

KUBITZA, D. *et al.* Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct factor Xa inhibitor. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 78, n. 4, p. 412–421, 2005b.

KUBITZA, D. *et al.* Effect of food, an antacid, and the H2 antagonist ranitidine on the absorption of bay 59-7939 (rivaroxaban), an oral, direct factor Xa inhibitor, in healthy subjects. **The Journal Clinical Pharmacology**, v. 46, p. 549-558, 2006.

KUBITZA, D.; PERZBORN, E.; BERKOWITZ, S. D. The discovery of rivaroxaban: Translating preclinical assessments into clinical practice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. 145, p. 1–9, 2013.

KUHN, J. *et al.* UPLC-MRM mass spectrometry method for measurement of the coagulation inhibitors dabigatran and rivaroxaban in human plasma and its comparison with functional assays. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–19, 2015.

LEE, J. S. *et al.* Screening of genetic polymorphisms of CYP3A4 and CYP3A5 genes. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 17, n. 6, p. 479–484, 2013.

LENOIR, C. *et al.* Impact of the genotype and phenotype of CYP3A and P-gp on the apixaban and rivaroxaban exposure in a Real-World setting. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1–21, 2022.

LINDHOFF-LAST, E. *et al.* Assays for measuring rivaroxaban: their suitability and limitations. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 32, n. 6, p. 673–679, 2010.

LINDHOFF-LAST, E. *et al.* Laboratory testing of rivaroxaban in routine clinical practice: When, how, and which assays. **Annals of Medicine**, v. 45, n. 5–6, p. 423–429, 2013.

LIPPI, G.; PLEBANI, M. Proteomic analysis of venous thromboembolism. **Expert Review of Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 275–282, 2010.

LIU, J-P.; CHOW, S-C. Sample size determination for the two one-sided tests procedure in bioequivalence. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 20, n. 1, p. 101-104, 1992.

LORENZINI, K. I. *et al.* Rivaroxaban-induced hemorrhage associated with ABCB1 genetic defect. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 19, p. 1–5, 2016.

MAO, Q.; UNADKAT, J. D. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport - an update. **AAPS Journal**, v. 17, n. 1, p. 65–82, 2015.

MASSARO, A. R.; LIP, G. Y. H. Stroke prevention in atrial fibrillation: Focus on Latin America. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 6, p. 576–589, 2016.

MAYO, O. A century of Hardy – Weinberg equilibrium. **Twin Research and Human Genetics**, v. 11, n. 3, p. 249–256, 2008.

MCLEAN, C.; WILSON, A.; KIM, R. B. Impact of transporter polymorphisms on drug development: Is it clinically significant? **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56 Suppl, n. 7, p. S40–S58, 2016.

MISSELWITZ, F.; BERKOWITZ, S. D.; PERZBORN, E. The discovery and development of rivaroxaban. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1222, n. 1, p. 64–75, 2011.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. Theories of blood coagulation: basic concepts and recent updates. *In*: SABA, H. I.; ROBERTS, H. R. (Ed.). **Hemostasis and thrombosis: practical guidelines in clinical management**. Chichester: Wiley-blackwell, 2014. p. 1–13.

MUECK, W. *et al.* Rivaroxaban: Population pharmacokinetic analyses in patients treated for acute deep-vein thrombosis and exposure simulations in patients with atrial fibrillation treated for stroke prevention. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 50, n. 10, p. 675–686, 2011.

MUECK, W. *et al.* Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, n. 1, p. 1–16, 2014.

MUECK, W.; KUBITZA, D.; BECKA, M. Co-administration of rivaroxaban with drugs that share its elimination pathways: Pharmacokinetic effects in healthy subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 76, n. 3, p. 455–466, 2013.

NAKAGAWA, J. *et al.* Impact of gene polymorphisms in drug-metabolizing enzymes and transporters on trough concentrations of rivaroxaban in patients with atrial fibrillation. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 128, n. 2, p. 297–304, 2021.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem compound summary for CID 9875401;Rivaroxaban**. Bethesda, Maryland, 2004. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rivaroxaban>. Acesso em: 30 set. 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 441401;Linezolid**. Bethesda, Maryland, 2004. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linezolid>. Acesso em: 30 set. 2020.

O'CONNOR, C. T.; KIERNAN, T. J.; YAN, B. P. The genetic basis of antiplatelet and anticoagulant therapy: A pharmacogenetic review of newer antiplatelets (clopidogrel, prasugrel and ticagrelor) and anticoagulants (dabigatran, rivaroxaban, apixaban and edoxaban). **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 13, n. 7, p. 725–739, 2017.

OLIVEIRA, G. M. M. *et al.* Cardiovascular Statistics – Brazil 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 3, p. 308–439, 2020.

OLIVEIRA, G. M. M. *et al.* Cardiovascular Statistics – Brazil 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, n. 1, p. 115–373, 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Doenças cardiovasculares**. Washington, 2017. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839. Acesso em: 20 jul. 2022.

PAIVA K. M. *et al.* Prevalence and associated factors of SARS by Covid-19 in adults and aged people with chronic cardiovascular disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, n. 5, p. 968-975, 2021.

PALTA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 58, n. 5, p. 515–523, 2014.

PATEL, K. *et al.* Pathogenesis and epidemiology of venous thromboembolic disease. **Critical Care Nursing Quarterly**, v. 40, n. 3, p. 191–200, 2017.

PATEL, N. R. *et al.* Contemporary developments in the discovery of selective factor Xa inhibitors: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 671–698, 2016.

PERZBORN, E. *et al.* Rivaroxaban: a new oral factor Xa inhibitor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 3, p. 376–381, 2010.

PERZBORN, E. *et al.* The discovery and development of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 1, p. 61–75, 2011.

PLATTON, S.; BOWLES, L.; MACCALLUM, P. Effects of rivaroxaban on routine coagulation screening tests using commonly used reagents. **British Journal of Haematology**, v. 179, n. 3, p. 511–513, 2017.

RAYMOND, J. *et al.* Pharmacogenetics of direct oral anticoagulants: A systematic review. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

REDDY, G. S.; REDDY, S. L. N. P.; REDDY, L. S. K. Development and validation of hplc-ms/ms method for rivaroxaban quantitation in human plasma using solid phase extraction procedure. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 1145–1154, 2016.

REIS, A. Prevention and treatment of venous thromboembolism: the place of new oral anticoagulants. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 31 Suppl 1, p. 45–50, 2012.

RIVA, N.; DONADINI, M. P.; AGENO, W. Epidemiology and pathophysiology of venous thromboembolism: Similarities with atherothrombosis and the role of inflammation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 113, n. 6, p. 1176–1183, 2015.

ROHDE, G. Determination of rivaroxaban - a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor - in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 872, n. 1–2, p. 43–50, 2008.

ROLLINSON, V.; TURNER, R.; PIRMOHAMED, M. Pharmacogenomics for primary care: An overview. **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1–29, 2020.

SAIZ-RODRÍGUEZ, M. *et al.* Effect of the most relevant CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms on the pharmacokinetic parameters of 10 CYP3A substrates. **Biomedicines**, v. 8, n. 4, p. 1-20, 2020.

SAKIYAMA, M. *et al.* Ethnic differences in ATP-binding cassette transporter, sub-family G, member 2 (ABCG2/BCRP): genotype combinations and estimated functions. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 29, n. 6, p. 490–492, 2014.

SAMAMA, M. M. *et al.* Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. **Thrombosis Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2013.

SAMUELSON, B. T. *et al.* Laboratory assessment of the anticoagulant activity of direct oral anticoagulants: a systematic review. **Chest**, v. 151, n. 1, p. 127–138, 2017.

SARVANANTHAN, T.; DAS, S. Thrombosis : simplified. **Phlebology**, suppl. 2, p. 12–22, 2012.

- SCHMITZ, E. M. H. *et al.* Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 12, n. 10, p. 1636–1646, 2014.
- SCUDELER, M. M.; RODRIGUES-SOARES, F. Farmacogenética na América Latina. **Acta Biologica Brasiliensia**, v. 3, n. 2, p. 85–100, 2021.
- SENNESAEL, A. L. *et al.* Effect of ABCB1 genetic polymorphisms on the transport of rivaroxaban in HEK293 recombinant cell lines. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6–11, 2018.
- SEVRIOUKOVA, I. F.; POULOS, T. L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 9, p. 3116–26, 2013.
- SHARMA, M. *et al.* Efficacy and harms of direct oral anticoagulants in the elderly for stroke prevention in atrial fibrillation and secondary prevention of venous thromboembolism: systematic review and meta-analysis. **Circulation**, v. 132, n. 3, p. 194–204, 2015.
- SHAIKH, K. *et al.* Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of rivaroxaban in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 26, n. 2, p. 91–105, 2020.
- SHNAYDER, N. A. *et al.* Using pharmacogenetics of direct oral anticoagulants to predict changes in their pharmacokinetics and the risk of adverse drug reactions. **Biomedicines**, v. 9, n. 5, p. 1-19, 2021.
- SILVA, M. M. O. *et al.* Análise descritiva dos óbitos por doenças cardiocirculatórias nos sistemas de informações em saúde do Brasil. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 9, n. 1, p. 894–904, 2020.
- SILVA, M. V. B. *et al.* Caracterização do perfil epidemiológico da mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil: um estudo descritivo. **Enfermagem Brasil**, v. 21, n. 2, p. 154-165, 2022.
- SOLANKI, M. *et al.* Cytochrome P450 2J2: potential role in drug metabolism and cardiotoxicity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 46, n. 8, p. 1053–1065, 2018.
- SONG, E.; LEE, W.; KIM, B. H. Model-based approach for designing an efficient bioequivalence study for highly variable drugs. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 11, p. 1–15, 2021.
- STAMPFUSS, J. *et al.* The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 51, n. 7, p. 549–561, 2013.

STEFFENELLO-DURIGON, G. *et al.* Orientações de manejo perioperatório e no sangramento nos pacientes em uso de anticoagulantes orais diretos (AOD). **Revista de Medicina**, v. 97, n. 5, p. 476–485, 2018.

SUAREZ-KURTZ, G. *et al.* Pharmacogenomic diversity among brazilians: influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, n. 191, p. 1–7, 2012.

SYCHEV, D. *et al.* Effect of CYP3A4, CYP3A5, ABCB1 gene polymorphisms on rivaroxaban pharmacokinetics in patients undergoing total hip and knee replacement surgery. **High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention**, v. 26, n. 5, p. 413–420, 2019.

SYCHEV, D. A. *et al.* CYP3A Activity and Rivaroxaban Serum Concentrations in Russian Patients with Deep Vein Thrombosis. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 22, n. 1, p. 51–54, 2018.

TAKÁCS-NOVÁK, K. *et al.* Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 279–285, 2013.

TAO, Y. *et al.* Bioequivalence and food effect assessment of 2 rivaroxaban formulations in healthy chinese volunteers: an open, randomized, single-dose, and 4-period crossover study. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 11, n. 3, p. 358–363, 2022.

THOM, I. *et al.* Measurement of rivaroxaban concentrations demonstrates lack of clinical utility of a PT, dPT and APTT test in estimating levels. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 40, n. 4, p. 493–499, 2018.

THOMAS, F. *et al.* Population pharmacokinetics of erlotinib and its pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships in head and neck squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 13, p. 2316–2323, 2009.

TOTHFALUSI, L.; ENDRENYI, L.; GARCIA ARIETA, A. Evaluation of bioequivalence for highly variable drugs with scaled average bioequivalence. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 48, n. 11, p. 725–743, 2009.

TRIPODI, A. The laboratory and the direct oral anticoagulants. **Blood**, v. 121, n. 20, p. 4032–4035, 2013.

TSENG, A. S. *et al.* Clinical review of the pharmacogenomics of direct oral anticoagulants. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 32, n. 1, p. 121–126, 2018.

TURPIE, A. G. G.; ESMON, C. Venous and arterial thrombosis - pathogenesis and the rationale for anticoagulation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 105, n. 4, p. 586–596, 2011.

- UESHIMA, S. *et al.* Impact of ABCB1, ABCG2, and CYP3A5 polymorphisms on plasma trough concentrations of apixaban in japanese patients with atrial fibrillation. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 27, n. 9, p. 329–336, 2017.
- VAN BLERK, M. *et al.* Influence of dabigatran and rivaroxaban on routine coagulation assays a nationwide belgian survey. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 113, n. 1, p. 154–164, 2015.
- VARGA, A. *et al.* Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of rivaroxaban levels in human plasma for therapeutic drug monitoring. **Revista Romana de Medicina de Laborator**, v. 25, n. 2, p. 145–155, 2017.
- VOLOD, O. *et al.* The interlaboratory performance in measurement of dabigatran and rivaroxaban. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 146, n. 2, p. 145–153, 2021.
- WIESEN, M. H. J. *et al.* Paramagnetic micro-particles as a tool for rapid quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma by UHPLC-MS/MS. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 55, n. 9, p. 1349–1359, 2017.
- XARELTO: comprimido revestido. Responsável técnico: Dirce Eiko Mimura. Socorro, SP. Bayer S.A., 2022. Bula de remédio.
- XU, M. *et al.* Cytochrome P450 2J2: distribution, function, regulation, genetic polymorphisms and clinical significance. **Drug Metabolism Reviews**, v. 45, n. 3, p. 311–352, 2013.
- XU, R.; GE, W.; JIANG, Q. Application of physiologically based pharmacokinetic modeling to the prediction of drug-drug and drug-disease interactions for rivaroxaban. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 755–765, 2018.
- YU, L. X. *et al.* Novel bioequivalence approach for narrow therapeutic index drugs. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 97, n. 3, p. 286–291, 2015.
- ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103–141, 2013.
- ZDOVC, J. *et al.* Downregulation of ABCB1 gene in patients with total hip or knee arthroplasty influences pharmacokinetics of rivaroxaban: a population pharmacokinetic-pharmacodynamic study. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 6, p. 817–824, 2019.
- ZHANG, C. *et al.* Genetic polymorphism analysis of CYP2J2 drug-metabolizing enzyme in a chinese Zhuang population. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 9, n. 10, p. 10657–10663, 2016.

ZHANG, L. *et al.* A cross-study analysis evaluating the effects of food on the pharmacokinetics of rivaroxaban in clinical studies. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 12, p. 1607–1615, 2017.

ZHAO, T. *et al.* Identifying the dominant contribution of human cytochrome p450 2J2 to the metabolism of rivaroxaban, an oral anticoagulant. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 36, n. 1, p. 121–129, 2022.

ZHOU, Y. *et al.* Computational methods for the pharmacogenetic interpretation of next generation sequencing data. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1437, p. 1–17, 2018.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA EM CONDIÇÕES DE JEJUM

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA / BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO RIVAROXABANA COMPRIMIDO REVESTIDO DE 20 MG PRODUZIDO PELA CIMED INDÚSTRIA DE MEDICAMENTOS LTDA. ¿ MEDICAMENTO TESTE VERSUS XARELTO® COMPRIMIDO REVESTIDO DE 20 MG PRODUZIDO PELA BAYER S.A. ¿ MEDICAMENTO REFERÊNCIA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS EM CONDIÇÕES DE JEJUM.

Pesquisador: Alessandra Ferreira dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13048819.5.0000.5102

Instituição Proponente: INSTITUTO CLAUDIA MARQUES DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO LTDA.

Patrocinador Principal: CIMED INDUSTRIA DE MEDICAMENTOS LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.345.664

Apresentação do Projeto:

Seguindo a tendência mundial, o Ministério da Saúde/ANVISA implanta a política para medicamentos genéricos no país a partir de 1999, através da promulgação da Lei 9.787/99, que estabelece a obrigatoriedade de realizar estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência para medicamentos genéricos. Tal normativa representou um importante avanço sanitário visto que permitiu o estabelecimento de aspectos técnicos para a realização de estudos in vitro (equivalência farmacêutica) e in vivo (bioequivalência) que garantissem a equivalência terapêutica de formulações farmacêuticas registradas, a partir de então, como medicamentos genéricos. Além disso, a partir de 2003 os conceitos técnicos aplicados aos medicamentos genéricos foram ampliados para o registro (ou renovação de registro) de medicamentos similares, pela resolução RDC nº 33/03. O ensaio farmacocinético conduzido com o objetivo de determinar o comportamento de diferentes formulações in vivo é definido como biodisponibilidade relativa. De acordo com a RDC nº 17/07, biodisponibilidade relativa é definida como o quociente da quantidade e velocidade de princípio ativo que chega a circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um preparado e a quantidade e velocidade de princípio

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.345.664

ativo que chega a circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um produto de referência que contenha o mesmo princípio ativo.

Entretanto, o termo bioequivalência é utilizado com exclusividade para a denominação de estudos de biodisponibilidade relativa para o registro de medicamentos genéricos. Os conceitos de quantidade e velocidade da absorção apresentados na definição acima, estão relacionados, respectivamente, aos parâmetros farmacocinéticos ASC e C_{máx}. Os estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência têm por objetivo demonstrar a intercambialidade dos medicamentos teste e referência, de tal forma a garantir a premissa básica da bioequivalência: se dois medicamentos são bioequivalentes, eles apresentam equivalência terapêutica, eficácia e segurança. Adicionalmente, os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência têm por objetivo demonstrar evidências in vivo da qualidade farmacêutica dos produtos (MIDHA et al.,

2004). Assim, para que duas formulações sejam definidas como equivalentes terapêuticas de acordo com a RDC nº 16/07, essas devem apresentar

os mesmos efeitos em relação a eficácia e segurança após a administração da mesma dose molar, além disso, devem ser equivalentes

farmacêuticas. As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no Brasil e no mundo, representando aproximadamente 31%

das mortes globais, sendo assim consideradas um problema de saúde pública (OPAS, 2017). Para os eventos tromboembólicos causados pelas

DCVs, é recomendada a terapia anticoagulante para prevenir e interromper o crescimento de trombos (KUBITZA et al., 2005; MUECK et al., 2011).

Os novos anticoagulantes orais (NOACs) são indicados para o tratamento de fibrilação atrial não valvular (FANV), para o tratamento ou profilaxia de

trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP), bem como após cirurgia ortopédica de grande porte para substituição total de quadril ou

joelho (LINDHOFF-LAST et al., 2013; DINCQ et al., 2014; AŠI et al., 2018). A rivaroxabana está entre os compostos denominados novos

anticoagulantes orais descobertos nos últimos anos, com intuito de melhorar a dificuldade da autoadministração, a estreita janela terapêutica, os

ajustes de doses e o monitoramento laboratorial requeridos pelos anticoagulantes mais antigos e ainda possui farmacocinética e farmacodinâmica

previsíveis (LINDHOFF-LAST et al., 2013; AŠI et al., 2018). O presente estudo pretende comparar os parâmetros farmacocinéticos, velocidade

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

CEP: 37.554-210

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.345.664

(C_{máx}) e extensão de absorção (ASC), gerados a partir de um ensaio clínico, com o objetivo de avaliar a bioequivalência entre o comprimido revestido de 20 mg de rivaroxabana produzido pela Cimed Indústria de Medicamentos Ltda. e o comprimido revestido de 20 mg de rivaroxabana produzido pela Bayer S.A (Xarelto®). Dois medicamentos são considerados bioequivalentes quando, ao serem administrados ao mesmo indivíduo, nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar, não apresentam diferenças significativas em relação à quantidade de fármaco absorvida (ASC) e à velocidade do processo de absorção (C_{máx}). A bioequivalência entre dois produtos é estabelecida por meio do intervalo de confiança 90%, que deve estar entre 80 a 125% para os parâmetros farmacocinéticos: C_{máx} e ASC. Adicionalmente será avaliada/comparada a variabilidade das formulações de acordo com o Guia para Bioequivalência de Rivaroxabana - FDA (com recomendação no Guia para Bioequivalência de Warfarina), onde o limite superior do intervalo de confiança de 90% - IC90% para a razão $\frac{WT}{WR}$ (razão entre desvio padrão intra do produto teste para referência) deve ser 2,5.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo tem como objetivo primário avaliar a biodisponibilidade relativa de dois produtos contendo rivaroxabana a fim de determinar se são bioequivalentes. O produto teste será a rivaroxabana 20 mg comprimido revestido da Cimed Indústria de Medicamentos Ltda. O produto de referência será o Xarelto® 20 mg comprimido revestido da Bayer S.A. A biodisponibilidade comparativa das formulações após à administração oral será avaliada com base em comparações estatísticas de parâmetros farmacocinéticos relevantes, obtidos a partir das concentrações plasmáticas do fármaco inalterado provenientes de amostras de sangue a serem coletadas. As concentrações de rivaroxabana serão medidas através de um método bioanalítico desenvolvido e validado previamente. Este estudo tem como objetivo primário avaliar a biodisponibilidade relativa de dois produtos contendo rivaroxabana a fim de determinar se são bioequivalentes. O produto teste será a rivaroxabana 20 mg comprimido revestido da Cimed Indústria de Medicamentos Ltda. O produto de

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.345.664

referência será o Xarelto® 20 mg comprimido revestido da Bayer S.A.
A biodisponibilidade comparativa das formulações após à administração oral será avaliada com base em comparações estatísticas de parâmetros farmacocinéticos relevantes, obtidos a partir das concentrações plasmáticas do fármaco inalterado provenientes de amostras de sangue a serem coletadas. As concentrações de rivaroxabana serão medidas através de um método bioanalítico desenvolvido e validado previamente.
Este estudo tem como objetivo primário avaliar a biodisponibilidade relativa de dois produtos contendo rivaroxabana a fim de determinar se são bioequivalentes. O produto teste será a rivaroxabana 20 mg comprimido revestido da Cimed Indústria de Medicamentos Ltda. O produto de referência será o Xarelto® 20 mg comprimido revestido da Bayer S.A.
A biodisponibilidade comparativa das formulações após à administração oral será avaliada com base em comparações estatísticas de parâmetros farmacocinéticos relevantes, obtidos a partir das concentrações plasmáticas do fármaco inalterado provenientes de amostras de sangue a serem coletadas. As concentrações de rivaroxabana serão medidas através de um método bioanalítico desenvolvido e validado previamente.
Este estudo tem como objetivo primário avaliar a biodisponibilidade relativa de dois produtos contendo rivaroxabana a fim de determinar se são bioequivalentes. O produto teste será a rivaroxabana 20 mg comprimido revestido da Cimed Indústria de Medicamentos Ltda. O produto de referência será o Xarelto® 20 mg comprimido revestido da Bayer S.A.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A administração de medicamentos poderá causar efeitos colaterais ou reações adversas como reações alérgicas sérias e outras reações imprevisíveis. A participação em estudos de bioequivalência envolve riscos que podem ser imprevistos, relacionados ou não ao estudo em questão: sangramento prolongado ou volumoso; sangramento menstrual intensificado e/ou prolongado; fraqueza anormal; cansaço; palidez; tontura; dor de cabeça ou inchaço sem explicação; dificuldade de respiração; choque inexplicável; dor no peito (angina); pressão aumentada nos músculos das pernas ou braços após sangramento, que causa dor, inchaço, sensação alterada, formigamento ou

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470
Bairro: Campus Fátima I **CEP:** 37.554-210
UF: MG **Município:** POUSO ALEGRE
Telefone: (35)3449-9232 **E-mail:** pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.345.664

paralisia (síndrome compartimental após sangramento); mau funcionamento dos rins após sangramento; anemia (redução das células vermelhas do sangue que pode tornar a pele pálida e causar fraqueza); sangramento em seu estômago, intestino (incluindo sangramento retal) ou gengiva; dores abdominais ou gastrintestinais; indigestão; náusea; constipação; diarreia; vômito; febre; inchaço nos membros (edema periférico); fraqueza e cansaço (diminuição generalizada da força e da energia); sangramento pós-operatório (incluindo anemia pós-operatória e sangramento no local do corte da cirurgia); contusões (lesão); aparecimento de manchas vermelhas ou arroxeadas (hematomas); exames de sangue com aumento de algumas enzimas hepáticas; dores nas extremidades; sangramento do trato urogenital (incluindo sangue na urina e período menstrual prolongado ou intensificado); sangramento no nariz (epistaxe); coceira na pele (incluindo casos incomuns de coceira generalizada); aparecimento de manchas ou pápulas vermelhas na pele (equimose); sangramento nos olhos (incluindo sangramento no branco dos olhos); pressão baixa (os sintomas podem ser sensação de tontura ou desmaio ao se levantar); mau funcionamento dos rins (incluindo aumento de creatinina e ureia no sangue); sangramento cutâneo ou subcutâneo; tosse com sangue (hemoptise); boca seca; indisposição (incluindo mal-estar); reações alérgicas (hipersensibilidade); reação alérgica na pele; exames de sangue com aumento de bilirrubina e de algumas enzimas do pâncreas.

A análise dos benefícios mostrou que eles superam os riscos, que indica que o trabalho poderá ser realizado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa revela relevância científica e social, considerando a disponibilidade no contexto social de um fármaco que reunirá não só possibilidades terapêuticas de qualidade, mas também de preço adequado e compatível para seus usuários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão presentes de forma completa e adequada.

Recomendações:

Não há recomendações a serem apresentadas.

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG **Município:** POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.345.664

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Mão há pendências ou inadequações no projeto analisado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Os autores deverão apresentar ao CEP um relatório parcial e um final da pesquisa de acordo com o cronograma apresentado no projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1343484.pdf	30/04/2019 17:30:31		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ICMBEQ00119_Rivaroxabana.pdf	30/04/2019 16:47:29	Alessandra Ferreira dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE00119_Rivaroxabana.pdf	30/04/2019 16:46:20	Alessandra Ferreira dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	FR_assinada.pdf	30/04/2019 16:42:06	Alessandra Ferreira dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

POUSO ALEGRE, 24 de Maio de 2019

Assinado por:
Ronaldo Júlio Baganha
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA EM CONDIÇÕES PÓS-PRANDIAL.

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA / BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO RIVAROXABANA COMPRIMIDO REVESTIDO DE 20 MG PRODUZIDO PELA CIMED INDÚSTRIA DE MEDICAMENTOS LTDA. ¿ MEDICAMENTO TESTE VERSUS XARELTO® COMPRIMIDO REVESTIDO DE 20 MG PRODUZIDO PELA BAYER S.A. ¿ MEDICAMENTO REFERÊNCIA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS EM CONDIÇÕES PÓS-PRANDIAL.

Pesquisador: Alessandra Ferreira dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 16583519.6.0000.5102

Instituição Proponente: INSTITUTO CLAUDIA MARQUES DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO LTDA.

Patrocinador Principal: CIMED INDUSTRIA DE MEDICAMENTOS LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.446.466

Apresentação do Projeto:

Seguindo a tendência mundial, o Ministério da Saúde/ANVISA implantou a política para medicamentos genéricos no país a partir de 1999, através da promulgação da Lei 9.787/99, que estabelece a obrigatoriedade de realizar estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência para medicamentos genéricos. Tal normativa representou um importante avanço sanitário visto que permitiu o estabelecimento de aspectos técnicos para a realização de estudos in vitro (equivalência farmacêutica) e in vivo (bioequivalência) que garantissem a equivalência terapêutica de formulações farmacêuticas registradas, a partir de então, como medicamentos genéricos. Além disso, a partir de 2003 os conceitos técnicos aplicados aos medicamentos genéricos foram ampliados para o registro (ou renovação de registro) de medicamentos similares, pela resolução RDC nº 33/03. O ensaio farmacocinético conduzido com o objetivo de determinar o comportamento de diferentes formulações in vivo é definido como biodisponibilidade relativa. De acordo com a RDC nº 17/07, biodisponibilidade relativa é definida como o quociente da quantidade e velocidade de princípio ativo que chega a circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um preparado e a quantidade e

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.446.466

velocidade de princípio ativo que chega a circulação sistêmica a partir da administração extravascular de um produto de referência que contenha o mesmo princípio ativo. Entretanto, o termo bioequivalência é utilizado com exclusividade para a denominação de estudos de biodisponibilidade relativa para o registro de medicamentos genéricos. Os conceitos de quantidade e velocidade da absorção apresentados na definição acima, estão relacionados, respectivamente, aos parâmetros farmacocinéticos ASC e $C_{m\acute{a}x}$. Os estudos de biodisponibilidade relativa / bioequivalência têm por objetivo demonstrar a intercambialidade dos medicamentos teste e referência, de tal forma a garantir a premissa básica da bioequivalência: se dois medicamentos são bioequivalentes, eles apresentam equivalência terapêutica, eficácia e segurança. Adicionalmente, os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência têm por objetivo demonstrar evidências in vivo da qualidade farmacêutica dos produtos (MIDHA et al., 2004). Assim, para que duas formulações sejam definidas como equivalentes terapêuticas de acordo com a RDC nº 16/07, essas devem apresentar os mesmos efeitos em relação a eficácia e segurança após a administração da mesma dose molar, além disso, devem ser equivalentes farmacêuticas. As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no Brasil e no mundo, representando aproximadamente 31% das mortes globais, sendo assim consideradas um problema de saúde pública (OPAS, 2017). Para os eventos tromboembólicos causados pelas DCVs, é recomendada a terapia anticoagulante para prevenir e interromper o crescimento de trombos (KUBITZA et al., 2005; MUECK et al., 2011). Os novos anticoagulantes orais (NOACs) são indicados para o tratamento de fibrilação atrial não valvular (FANV), para o tratamento ou profilaxia de trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP), bem como após cirurgia ortopédica de grande porte para substituição total de quadril ou joelho (LINDHOFF-LAST et al., 2013; DINCQ et al., 2014; AŠI et al., 2018). A rivaroxabana está entre os compostos denominados novos anticoagulantes orais descobertos nos últimos anos, com intuito de melhorar a dificuldade da autoadministração, a estreita janela terapêutica, os ajustes de doses e o monitoramento laboratorial requeridos pelos anticoagulantes mais antigos e ainda possui farmacocinética e farmacodinâmica previsíveis (LINDHOFF-LAST et al., 2013; AŠI et al., 2018). O presente estudo pretende comparar os parâmetros farmacocinéticos, velocidade ($C_{m\acute{a}x}$) e extensão de absorção (ASC), gerados a partir de um ensaio clínico, com o objetivo de avaliar a bioequivalência entre o comprimido revestido de 20 mg de rivaroxabana produzido pela Cimed Indústria de Medicamentos Ltda. e o comprimido revestido de 20 mg de rivaroxabana produzido pela Bayer S.A (Xarelto®). Dois medicamentos são considerados bioequivalentes

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.446.466

quando, ao serem

administrados ao mesmo indivíduo, nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar, não apresentam diferenças significativas em relação à quantidade de fármaco absorvida (ASC) e à velocidade do processo de absorção (C_{máx}). A bioequivalência entre dois produtos é estabelecida por meio do intervalo de confiança 90%, que deve estar entre 80 a 125% para os parâmetros farmacocinéticos: C_{máx} e ASC. Adicionalmente será avaliada/comparada a variabilidade das formulações de acordo com o Guia para Bioequivalência de Rivaroxabana - FDA (com recomendação no Guia para Bioequivalência de Warfarina), onde o limite superior do intervalo de confiança de 90% - IC90% para a razão $\frac{WT}{WR}$ (razão entre desvio padrão intra do produto teste para referência) deve ser 2,5.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar comparativamente a biodisponibilidade de dois produtos contendo 20 mg de rivaroxabana, a fim de determinar se são bioequivalentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A administração de medicamentos poderá causar efeitos colaterais ou reações adversas como reações alérgicas sérias e outras reações imprevisíveis. A participação em estudos de bioequivalência envolve riscos que podem ser imprevistos, relacionados ou não ao estudo em questão: Reações descritas em bula do medicamento de referência: sangramento prolongado ou volumoso; sangramento menstrual intensificado e/ou

prolongado; fraqueza anormal; cansaço; palidez; tontura; dor de cabeça ou inchaço sem explicação; dificuldade de respiração; choque inexplicável; dor no peito (angina); pressão aumentada nos músculos das pernas ou braços após sangramento, que causa dor, inchaço, sensação alterada, formigamento ou paralisia (síndrome compartimental após sangramento); mau funcionamento dos rins após sangramento; anemia (redução das

células vermelhas do sangue que pode tornar a pele pálida e causar fraqueza); sangramento em seu estômago, intestino (incluindo sangramento retal) ou gengiva; dores abdominais ou gastrointestinais; indigestão; náusea; constipação; diarreia; vômito; febre; inchaço nos membros (edema periférico); fraqueza e cansaço (diminuição generalizada da força e da energia); sangramento pós-operatório (incluindo anemia pós-operatória e sangramento no local do corte da cirurgia); contusões (lesão);

aparecimento de manchas vermelhas ou arroxeadas (hematomas); exames de sangue com aumento de algumas enzimas hepáticas; dores nas extremidades; sangramento do trato urogenital

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.446.466

(incluindo sangue na urina e período menstrual prolongado ou intensificado); sangramento no nariz(epistaxe); coceira na pele (incluindo casos incomuns de coceira generalizada); aparecimento de manchas ou pápulas vermelhas na pele(equimose); sangramento nos olhos (incluindo sangramento no branco dos olhos); pressão baixa (os sintomas podem ser sensação de tontura ou desmaio ao se levantar); mau funcionamento dos rins (incluindo aumento de creatinina e ureia no sangue); sangramento cutâneo ou subcutâneo; tosse com sangue (hemoptise); boca seca; indisposição (incluindo mal-estar); reações alérgicas (hipersensibilidade); reação alérgica na pele; exames de sangue com aumento de bilirrubina e de algumas enzimas do pâncreas; sangramento dentro das articulações causando dor e inchaço (hemartrose); trombocitose (aumento das plaquetas no sangue, células responsáveis pela coagulação); secreção no local do corte da cirurgia urticária; funcionamento anormal do fígado (pode ser visualizado em testes feitos por médico); sangramento cerebral e intracranial; batimentos cardíacos aumentados (taquicardia); desmaio; amarelamento da pele e olhos (icterícia); exames de sangue com aumento de bilirrubina conjugada; sangramento intramuscular; edema localizado; formação de hematoma resultado de uma complicação de um procedimento cardíaco envolvendo a inserção de um cateter para tratar estreitamento de artérias coronárias (pseudoaneurisma vascular após intervenção percutânea); angioedema e edema alérgico (inchaço da face, lábios, boca, língua ou garganta); colestase (diminuição do fluxo de bile); hepatite incluindo lesão hepatocelular (inflamação do fígado, incluindo lesão do fígado; trombocitopenia (baixo número de plaquetas, que são as células que ajudam a coagular o sangue).

A retirada de sangue é um procedimento seguro e será realizado por meio de um cateter plástico que ficará em uma veia superficial de um dos braços do voluntário. A colocação desse cateter pode causar um leve desconforto, além de uma mancha roxa pequena no local da picada que frequentemente se resolve sem mais problemas. Os riscos associados à coleta de sangue em seu braço podem incluir dor, hematoma (mancha roxa), sangramento no local onde o sangue foi retirado, tontura, desmaio e, em ocasiões raras, infecção. Todos os procedimentos serão realizados por uma equipe de médicos, farmacêuticos, enfermeiros e técnicos de enfermagem capacitados e treinados.

Benefícios:

A participação neste estudo, não tem objetivo de submeter o participante da pesquisa a um tratamento terapêutico. Conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função de tratamento. De acordo com as Boas Práticas Clínicas e a

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

CEP: 37.554-210

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.446.466

Resolução CNS nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, voluntários saudáveis normalmente são pagos pela participação na pesquisa porque não recebem benefícios diretos. Os possíveis benefícios destes estudos são sempre para o bem da sociedade e para o avanço do conhecimento. Os medicamentos genéricos e similares que podem ser intercambiáveis com medicamentos de marca, passaram a fazer parte importante do arsenal terapêutico disponível no Brasil, possibilitando o acesso a medicamentos de qualidade, com um custo menor, por parte da população. A possibilidade de substituição de um medicamento por outro equivalente terapêutico (genérico ou similar) só é possível através dos estudos de bioequivalência, como este.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância social e científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão presentes.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1385550.pdf	26/06/2019 16:52:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ICMBEQ00219_RIVAROXABANA.pdf	26/06/2019 16:51:50	Alessandra Ferreira dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE00219_RXALIMENTOS.pdf	26/06/2019 16:51:27	Alessandra Ferreira dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	FR_ASSINADA.pdf	26/06/2019 16:50:55	Alessandra Ferreira dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 3.446.466

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

POUSO ALEGRE, 09 de Julho de 2019

Assinado por:
Silvia Mara Tasso
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

ANEXO C – TERMO DE RECRUTAMENTO PARA ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA.



SISTEMA DE DOCUMENTAÇÃO

FORMULÁRIO

TÍTULO	EMISSÃO	CÓDIGO	VERSÃO	DOCUMENTO DE ORIGEM	PÁGINA
TERMO DE RECRUTAMENTO	19/03/19	CLI FO 045	6.0	CLI PO 048	2/4

Você está sendo convidado a participar de um processo de recrutamento de voluntários para um protocolo de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos deste processo sejam esclarecidos.

IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

Nome completo (1)	
Nº do CPF (2)	
Data de nascimento (dd/mm/aa) (3)	

O voluntário acima declara que é de livre e espontânea vontade que está participando de um processo de recrutamento para um protocolo de pesquisa sob responsabilidade do Pesquisador Principal: **XXXXXXX(4)** e do Investigador Clínico: **XXXXXXX(5)** do Instituto Claudia Marques de Pesquisa e Desenvolvimento.

O abaixo-assinado está ciente que:

- A sua participação neste processo de recrutamento tem como objetivo avaliar suas condições de saúde para possível participação em um protocolo de pesquisa dos estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.
- Você participará de uma palestra esclarecedora, haverá posteriormente a verificação de peso, altura, índice de massa corporal, pressão arterial, pulso, temperatura e uma consulta com o médico, o qual realizará um exame físico e clínico.
- Após a consulta serão agendados exames clínico e laboratoriais: **XXXXXX(6)** e os seguintes exames laboratoriais: **XXXXXXXXXXXXXX(7)**
- Você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação no processo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e que esta desistência não implicará em qualquer penalidade.
- Obteve todas as informações necessárias para decidir conscientemente sobre a participação no referido processo.
- Os resultados obtidos durante o processo serão mantidos em sigilo, e o Centro de Bioequivalência do ICMP&D não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
- O ICMP&D fornecerá informação ao voluntário e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao processo, quando solicitado pelo mesmo.
- Caso neste processo de recrutamento tanto a avaliação clínica e/ou os exames laboratoriais não estejam “dentro dos limites da normalidade” e não sejam considerados “cl clinicamente não significativos”, você será dispensado com os devidos esclarecimentos e orientação médica. Eventualmente, algum exame poderá ser repetido ou solicitado, a critério clínico. Caso o médico considere necessário, você será encaminhado a um serviço de saúde para o devido acompanhamento.
- É condição indispensável, para participação no processo, que o voluntário não tenha doado ou perdido 450 mL de sangue, ou mais, nos meses que antecedem o estudo: 02 (dois) meses para homens e 03 (três) meses para as mulheres.
- Caso esteja sob tratamento médico no momento, ou esteja fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações (excetuando-se anticoncepcionais para estudos que não sejam hormonais) ou tenha participado de qualquer outro protocolo de pesquisa no período de 6 meses antes da assinatura deste termo de seleção prévia você não poderá ser recrutado.
- Caso seja selecionado para participar do estudo, você será convidado e receberá via contato telefonico informações necessárias para decidir conscientemente sobre a sua participação no estudo.

Rubrica responsável: _____(8)

Rubrica voluntário: _____(9)



INSTITUTO CLAUDIA MARQUES P&D

SISTEMA DE DOCUMENTAÇÃO

FORMULÁRIO

TÍTULO	EMIÇÃO	CÓDIGO	VERSÃO	DOCUMENTO DE ORIGEM	PÁGINA
TERMO DE RECRUTAMENTO	19/03/19	CLI FO 045	6.0	CLI PO 048	3/4

- É condição indispensável para participação nos protocolos de pesquisa que voluntárias mulheres não estejam grávidas (comprovado por teste rápido de gravidez (β -HCG) a cada internação) e nem em regime de amamentação.
- Caso seja selecionado para participar de um estudo, será apresentado a você um outro termo, denominado "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido", vinculado a um protocolo de pesquisa. Após as devidas explicações relativas ao protocolo de pesquisa, e caso você concorde em participar efetivamente do mesmo, deverá preenchê-lo assiná-lo e datá-lo.
- Caso seja selecionado para um protocolo de pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa responsável pela aprovação dos protocolos de pesquisa do ICMP&D para apresentar recursos ou reclamações.
- **Voluntário Reserva:** serão chamados e avisados um número de voluntários sobressalentes, baseado no número de voluntários participantes do estudo. Os voluntários chamados na condição de reserva serão convidados a comparecer ao ICMP&D no dia da internação, porém só participará do estudo caso falte algum voluntário (que não seja reserva). Você substituirá alguém que faltar ou não chegar no horário pré-estabelecido. Caso você seja dispensado, o ICMP&D se compromete a priorizar a sua participação no próximo estudo agendado e a acrescentar ao valor do seu ressarcimento (próximo estudo que você participar) referente ao tempo despendido como voluntário reserva. Caso falte um número menor do que a quantidade de reservas presentes, o método de escolha será por data de vencimento de exames laboratoriais. Os voluntários reservas devem chegar ao ICMP&D dentro do horário pré-estabelecido para que possam fazer valer a condição de reserva, independente de internarem ou não.
- Este Termo de Recrutamento consta de 2 vias, sendo uma delas entregue ao voluntário.

Contatos (10)	Endereço (11)	Telefones para contato (12)
XXXXX	XXXXX	XXXXX
XXXXX	XXXXX	XXXXX

_____ (13)
Assinatura do responsável e carimbo

___/___/___ (14)
Data

_____ (15)
Assinatura do voluntário

___/___/___ (16)
Data

ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA EM CONDIÇÕES DE JEJUM.

	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 001 19 – Versão: 1.0 – Emissão: 22/04/19	Documento de Origem ICM BEQ 001 19	Página 1/6
---	--	---------------------------------------	---------------

ESTUDO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA / BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO RIVAROXABANA COMPRIMIDO REVESTIDO DE 20 MG PRODUZIDO PELA CIMED INDÚSTRIA DE MEDICAMENTOS LTDA. – MEDICAMENTO TESTE *VERSUS* XARELTO® COMPRIMIDO REVESTIDO DE 20 MG PRODUZIDO PELA BAYER S.A. – MEDICAMENTO REFERÊNCIA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS EM CONDIÇÕES DE JEJUM

ICM BEQ 001 19

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido consta de 2 (duas) vias, sendo uma delas entregue ao voluntário. Você está sendo convidado a participar de um protocolo de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

Nome completo	
Nº do CPF	
Data de nascimento (dd/mm/aa)	

O voluntário acima declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do protocolo de pesquisa supracitado, sob responsabilidade do Investigador Clínico: Thiago Pascoal Paraizo e do Pesquisador Principal Alessandra Ferreira dos Santos. O abaixo assinado está ciente que:

OBJETIVO DO ESTUDO

Este estudo tem por objetivo avaliar comparativamente a biodisponibilidade de dois produtos contendo 20 mg de rivaroxabana a fim de determinar se são bioequivalentes. Ou seja, verificar se a formulação em teste é estatisticamente equivalente a formulação de referência. Você receberá as duas medicações, cada uma numa ocasião diferente. A ordem que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio.

Foi estabelecido estatisticamente que o estudo deve ser compreendido por 60 voluntários.

Este estudo está sendo patrocinado por Cimed Indústria de Medicamentos Ltda.

Indicação do medicamento: prevenção de derrame (AVC) e de formação de coágulo em outros vasos sanguíneos.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS

Antes de sua participação no estudo, você será convidado a comparecer ao ICMP&D, para avaliar a sua condição de saúde. Você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo, medirá o seu pulso, temperatura, pressão arterial e irá perguntar se você teve ou tem alguma doença e se faz uso de algum medicamento. Também será realizado um exame do coração (eletrocardiograma) e serão coletadas amostras de sangue e urina para exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem: hemograma completo; análise bioquímica (glicose basal, ureia, creatinina, clearance de creatinina, proteínas totais e frações (albumina e globulina), aspartato aminotransferase (TGO/AST), alanina aminotransferase (TGP/ALT), fosfatase alcalina, bilirrubina total e frações (direta e indireta), ácido úrico, colesterol total, triglicérides.); sorologia Hepatite B e C; HIV 1 e 2 ; β HCG para mulheres e exame de urina.

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 001 19 – Versão: 1.0 – Emissão: 22/04/19	Documento de Origem ICM BEQ 001 19	Página 2/6
---	---	---	-----------------------------

Se você for considerado apto para realizar o estudo, você será internado 4 vezes por aproximadamente 24 horas cada período, com intervalo de 7 dias entre as internações. Você não poderá levar consigo alimentos e bebidas e nem outros objetos que não sejam de uso pessoal (roupas íntimas, chinelo, xampu, condicionador, sabonete, pente e escova de dentes). Você terá seus pertences revestidos para assegurar que você está cumprindo o estabelecido neste parágrafo. Quando da internação propriamente dita você será encaminhado para um quarto e não poderá circular pelos corredores da Unidade Clínica.

Em cada internação:

- Será coletada uma amostra de urina para voluntárias mulheres para descartar a possibilidade de gravidez;
- Você deverá ingerir por completo os alimentos oferecidos durante o período que estiver confinado; será administrado 1 comprimido revestido contendo 20 mg de rivaroxabana acompanhado de 200 mL de água sem gás;
- Serão coletadas 22 amostras de sangue de aproximadamente 4,9 mL cada uma nos horários estipulados, através de cateter introduzido em veia superficial, para a dosagem do medicamento no sangue;
- Em intervalos regulares serão verificados sua pressão, pulso e temperatura; serão também servidas refeições padronizadas (jantar e ceia na noite da internação; almoço, lanche da tarde e jantar no dia da administração da medicação), em horários pré-estabelecidos.
- Após a coleta de 12 horas, você receberá alta da Unidade Clínica do ICMP&D. você deverá retornar durante 3 dias consecutivos a sua alta em torno das 07h para as coletas externas correspondentes aos tempos 24:00 / 48:00 / 72:00 horas.
- Cerca de 460 mL de sangue será coletado durante todo o estudo (compreendendo todos os exames realizados e as 4 internações). A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em mais ou menos 60 dias, a contar da primeira internação, após o processo de seleção, até o encerramento da etapa (exames pós-estudo).

Após a sua participação no estudo, você será convidado a voltar ao ICM P&D para avaliar sua condição de saúde após a pesquisa. Nessa ocasião, você realizará novamente hemograma completo; análise bioquímica (glicose basal, ureia, creatinina, clearance de creatinina, proteínas totais e frações (albumina e globulina), aspartato aminotransferase (TGO/AST), alanina aminotransferase (TGP/ALT), fosfatase alcalina, bilirrubina total e frações (direta e indireta), ácido úrico, colesterol total, triglicérides.); β HCG para mulheres e exame de urina. As sorologias serão realizadas somente no pré estudo.

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Todo o material biológico coletado (amostras de sangue) será utilizado exclusivamente para as análises necessárias para o estudo e para acompanhamento da sua saúde. Após as análises e, se necessário reanálise, o material será descartado.

As amostras biológicas serão armazenadas segundo a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde e serão utilizadas para avaliar se o medicamento em teste atinge os mesmos níveis no organismo do que o medicamento de referência. As amostras biológicas não serão utilizadas para investigações futuras, sua utilização será apenas para fins desta pesquisa.

As amostras biológicas serão armazenadas sob a responsabilidade do Pesquisador Principal do ICMP&D e serão descartadas após a realização da pesquisa com a autorização do Patrocinador.

As amostras biológicas serão armazenadas em frascos identificados com os códigos do voluntário e do estudo em questão, com a finalidade de manter a confidencialidade e o sigilo das informações.

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

	<p align="center">TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 001 19 – Versão: 1.0 – Emissão: 22/04/19</p>	<p align="center">Documento de Origem ICM BEQ 001 19</p>	<p align="center">Página 3/6</p>
---	---	---	---

RESPONSABILIDADES

É condição indispensável, para participação no estudo, que você esteja em boa saúde e, portanto, não esteja, no momento, sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer fármacos e que tampouco tenha participado de outro estudo clínico com medicamentos nos últimos 6 meses.

Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo:

- Não pode ser dependente de drogas ou álcool, e caso o médico tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas;
- Não pode ter doado (ou retirado/perdido por qualquer outro motivo) sangue ou plasma em quantidade superior a 450 mL nos dois meses que antecedem o estudo, para homens e nos três meses, para mulheres;
- Não pode tomar bebida contendo cafeína e xantinas (chocolate, café, chá, coca-cola etc.) nas 48 horas que antecedem as internações até a última coleta;
- Não pode tomar bebida alcoólica nas 48 horas que antecedem as internações até a última coleta ou fumar mais do que 05 (cinco) cigarros por dia.

Caso haja interesse na participação, estes hábitos deverão ser abandonados para que não interfiram no estudo. Mulheres em idade reprodutiva não poderão engravidar durante todo o período de condução do estudo porque os riscos da administração de medicamentos durante a gravidez não são totalmente conhecidos.

É, ainda, de sua responsabilidade, em relação à sua participação no estudo:

- Comparecer às internações na data e horários informados; permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 08 horas) em cada internação;
- Tomar toda a medicação prevista;
- Ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos;
- Retornar a Unidade Clínica do ICMP&D na data, horário e local combinados, para realização da consulta e exames de alta, independentemente de sua participação no estudo ter sido interrompida ou de sua desistência.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A administração de medicamentos poderá causar efeitos colaterais ou reações adversas como reações alérgicas sérias e outras reações imprevisíveis. Você deve compreender que a participação neste tipo de estudo envolve riscos que podem ser imprevistos, relacionados ou não ao estudo em questão: sangramento prolongado ou volumoso; sangramento menstrual intensificado e/ou prolongado; fraqueza anormal; cansaço; palidez; tontura; dor de cabeça ou inchaço sem explicação; dificuldade de respiração; choque inexplicável; dor no peito (angina); pressão aumentada nos músculos das pernas ou braços após sangramento, que causa dor, inchaço, sensação alterada, formigamento ou paralisia (síndrome compartimental após sangramento); mau funcionamento dos rins após sangramento; anemia (redução das células vermelhas do sangue que pode tornar a pele pálida e causar fraqueza); sangramento em seu estômago, intestino (incluindo sangramento retal) ou gengiva; dores abdominais ou gastrintestinais; indigestão; náusea; constipação; diarreia; vômito; febre; inchaço nos membros (edema periférico); fraqueza e cansaço (diminuição generalizada da força e da energia); sangramento pós-operatório (incluindo anemia pós-operatória e sangramento no local do corte da cirurgia); contusões (lesão); aparecimento de manchas vermelhas ou arroxeadas (hematomas); exames de sangue com aumento de algumas enzimas hepáticas; dores nas extremidades; sangramento do trato urogenital (incluindo sangue na urina e período menstrual prolongado ou intensificado); sangramento no nariz (epistaxe); coceira na pele (incluindo casos incomuns de coceira generalizada); aparecimento de manchas ou pápulas vermelhas na pele (equimose); sangramento nos olhos (incluindo sangramento no branco dos olhos); pressão baixa (os sintomas podem ser sensação de tontura ou desmaio ao se levantar); mau funcionamento dos rins (incluindo aumento de creatinina e ureia no sangue); sangramento cutâneo ou subcutâneo; tosse com sangue (hemoptise); boca seca; indisposição (incluindo mal-estar); reações alérgicas (hipersensibilidade); reação alérgica na pele; exames de sangue com aumento de bilirrubina e de algumas enzimas do pâncreas; sangramento dentro das articulações causando dor e inchaço (hemartrose); trombocitose (aumento das plaquetas no sangue, células responsáveis pela coagulação); secreção no local do corte da cirurgia urticária; funcionamento anormal do fígado (pode ser visualizado em testes feitos por seu médico); sangramento cerebral e intracranial; batimentos cardíacos aumentados (taquicardia); desmaio; amarelamento da pele e olhos (icterícia); exames de sangue com aumento de bilirrubina conjugada; sangramento intramuscular; edema localizado; formação de hematoma resultado de uma complicação de um procedimento cardíaco envolvendo

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

 INSTITUTO CLAUDIA MARQUES P&D	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 001 19 – Versão: 1.0 – Emissão: 22/04/19	Documento de Origem ICM BEQ 001 19	Página 4/6
--	---	---	-----------------------------

a inserção de um cateter para tratar estreitamento de artérias coronárias (pseudoaneurisma vascular após intervenção percutânea); angioedema e edema alérgico (inchaço da face, lábios, boca, língua ou garganta); colestase (diminuição do fluxo de bile); hepatite incluindo lesão hepatocelular (inflamação do fígado, incluindo lesão do fígado); trombocitopenia (baixo número de plaquetas, que são as células que ajudam a coagular o sangue).

A retirada de sangue é um procedimento seguro e será realizado por meio de um cateter plástico que ficará em uma veia superficial de um de seus braços. A colocação desse cateter pode causar um leve desconforto, além de uma mancha roxa pequena no local da picada que frequentemente se resolve sem mais problemas. Os riscos associados à coleta de sangue em seu braço podem incluir dor, hematoma (mancha roxa), sangramento no local onde o sangue foi retirado, tontura, desmaio e, em ocasiões raras, infecção.

Todos os procedimentos realizados durante a sua estadia no ICM P&D serão realizados por uma equipe de médicos, farmacêuticos, enfermeiros e técnicos de enfermagem capacitados e treinados.

BENEFÍCIOS

A participação neste estudo, não tem objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Consequentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função de tratamento.

De acordo com as Boas Práticas Clínicas e a Resolução CNS nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, voluntários saudáveis normalmente são pagos pela participação na pesquisa porque não recebem benefícios diretos.

Os possíveis benefícios destes estudos são sempre para o bem da sociedade e para o avanço do conhecimento. Os medicamentos genéricos e similares que podem ser intercambiáveis com medicamentos de marca, passaram a fazer parte importante do arsenal terapêutico disponível no Brasil, possibilitando o acesso a medicamentos de qualidade, com um custo menor, por parte da população. A possibilidade de substituição de um medicamento por outro equivalente terapêutico (genérico ou similar) só é possível através dos estudos de bioequivalência, como este que você estará participando.

INTERCORRÊNCIAS

Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento, sem qualquer custo. Não haverá, entretanto, qualquer compensação de ordem financeira em função do ocorrido, a não ser que a condição faça jus à indenização prevista no Seguro de Vida em Grupo mencionado abaixo. Contudo, ao assinar este termo, você não está renunciando a qualquer direito legal que você possui.

Durante o período de 03 (três) meses a contar da data da primeira internação (a partir da data da assinatura deste termo), os voluntários estarão sob cobertura de um Seguro de Vida em Grupo para caso de morte ou invalidez permanente e acidentes relacionados ou não ao estudo.

RESSARCIMENTO

Os voluntários serão ressarcidos no valor de no valor de R\$ 1.400,00 (um mil e quatrocentos reais) relativos às despesas e tempo despendidos durante o estudo. Caso o voluntário desista em uma das internações e/ou não compareça as coletas externas será excluído do estudo e o ressarcimento não será efetuado. Se o voluntário for dispensado antes do estudo ser finalizado receberá proporcionalmente ao tempo despendido. O ressarcimento será efetuado após a consulta de alta do estudo.

A participação do voluntário no processo de recrutamento e seleção independe de aprovação ou concordância em participar e a mesma não será ressarcida. Ou seja, a dispensa ou desistência do voluntário antes da primeira internação não dá direito ao ressarcimento.

Apenas os voluntários reservas serão ressarcidos no valor de valor de R\$ 40,00 (quarenta reais), caso não participem do estudo devido ao tempo e transporte despendidos.

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

 <small>INSTITUTO CLAUDIA MARQUES P&D</small>	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 001 19 – Versão: 1.0 – Emissão: 22/04/19	Documento de Origem ICM BEQ 001 19	Página 5/6
---	---	---	-----------------------------

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador ou a um membro da equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento por parte da nossa equipe.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função:

- Da ocorrência de eventos adversos;
- Da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo;
- Do não cumprimento das normas estabelecidas;
- De qualquer outro motivo que, a critério médico, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes;
- Da suspensão do estudo como um todo.

A Unidade Clínica do ICMP&D o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento médico pela equipe do ICMP&D. Não será fornecido atestado médico durante as internações, apenas uma “Declaração de Comparecimento” de sua participação no estudo.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. O ICMP&D não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica, ou autoridades do(s) órgão(s) governamental(ais) envolvido(s) na fiscalização e acompanhamento do estudo terão direito de acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE), você está, também, autorizando tal acesso, mesmo que desista do Estudo.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja qualquer dúvida ou problema de saúde que você apresente durante sua participação no estudo, deverá procurar a Unidade Clínica do ICMP&D e/ou entrar em contato no endereço e telefones abaixo.

Se você tiver alguma dúvida e/ou consideração sobre a ética da pesquisa, sobre seus direitos como voluntário, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa no endereço e telefones abaixo.

Contatos	Endereço	Telefones para contato
Unidade Clínica	Av. Coronel Armando Rubens Storino, 2850– Jardim Paraiso – Pouso Alegre	Pesquisador Principal: (35) 99118-4898 Unidade Clínica: (35) 98465-3612 / 99250-3322
CEP- UNIVAS Universidade do Vale do Sapucaí	Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470 – Fátima I – Pouso Alegre	(35) 3449-9232 / (35) 98856-0220

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

	<p align="center">TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 001 19 – Versão: 1.0 – Emissão: 22/04/19</p>	<p align="center">Documento de Origem ICM BEQ 001 19</p>	<p align="center">Página 6/6</p>
---	---	---	---

ASSINATURAS

Eu declaro que li cuidadosamente, todo este documento denominado “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e sobre o Estudo, e recebi explicações que responderam por completo às minhas dúvidas e reafirmo estar, livre e espontaneamente, decidindo participar do Estudo.

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, também estou certificando que toda a informação que prestei, incluindo minha história médica, é verdadeira e correta até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estou autorizando o acesso às minhas informações, conforme explicitado anteriormente.

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Assinatura do responsável e carimbo

____/____/____

Data

Assinatura do voluntário

____/____/____

Data

ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA EM CONDIÇÕES PÓS-PRANDIAL.

	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 002 19 – Versão: 1.0 – Emissão: 18/06/19	Documento de Origem ICM BEQ 002 19	Página 1/6
---	--	---------------------------------------	---------------

ESTUDO DA BIODISPONIBILIDADE RELATIVA / BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO RIVAROXABANA COMPRIMIDO REVESTIDO DE 20 MG PRODUZIDO PELA CIMED INDÚSTRIA DE MEDICAMENTOS LTDA. – MEDICAMENTO TESTE VERSUS XARELTO® COMPRIMIDO REVESTIDO DE 20 MG PRODUZIDO PELA BAYER S.A. – MEDICAMENTO REFERÊNCIA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS EM CONDIÇÕES PÓS-PRANDIAL
ICM BEQ 002 19

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido consta de 2 (duas) vias, sendo uma delas entregue ao voluntário. Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa clínica. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

Nome completo	
Nº do CPF	
Data de nascimento (dd/mm/aa)	

O voluntário acima declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, sob responsabilidade do médico Investigador Clínico - Thiago Pascoal Paraizo e da Pesquisadora Principal - Alessandra Ferreira dos Santos. O abaixo assinado está ciente que:

OBJETIVO DO ESTUDO

Este estudo tem por objetivo avaliar comparativamente a biodisponibilidade de dois produtos contendo 20 mg de rivaroxabana a fim de determinar se são bioequivalentes. Ou seja, verificar se a formulação em teste é estatisticamente equivalente a formulação de referência.

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O produto teste: Rivaroxabana, comprimido revestido de 20 mg da Cimed Indústria de Medicamentos Ltda. O produto de referência: Xarelto®, comprimido revestido de 20 mg da Bayer S.A. A biodisponibilidade comparativa das formulações em seguida à administração oral será avaliada com base em comparações estatísticas de parâmetros farmacocinéticos relevantes obtidos de dados das concentrações para o fármaco, provenientes de amostras de sangue a serem coletadas. As concentrações serão medidas através de um método analítico padronizado e validado previamente.

Você receberá as duas medicações, cada uma numa ocasião diferente e a ordem que você tomará cada medicação obedecerá a um sorteio.

Foi estabelecido estatisticamente que o estudo deve ser compreendido por 60 voluntários.

Este estudo está sendo patrocinado pela: Cimed Indústria de Medicamentos Ltda.

Indicação do medicamento: prevenção de derrame (AVC - Acidente Vascular Cerebral) e de formação de coágulo no interior dos vasos sanguíneos.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS

Antes de sua participação no estudo, você será convidado a comparecer ao ICMP&D, para avaliar a sua condição de saúde. Após participar de uma palestra esclarecedora e a realização da conferência dos seus dados cadastrais, serão medidos sua pressão arterial, pulso e temperatura corporal, você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo e irá perguntar se você teve ou tem alguma doença e se faz uso de algum medicamento.

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 002 19 – Versão: 1.0– Emissão: 18/06/19	Documento de Origem ICM BEQ 002 19	Página 2/6
---	--	---	-----------------------------

Também será realizado um exame do coração (eletrocardiograma) e serão coletadas amostras de sangue e urina para exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem: hemograma completo; tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa); análise bioquímica (glicose basal, ureia, creatinina, clearance de creatinina, proteínas totais e frações (albumina e globulina), aspartato aminotransferase (TGO/AST), alanina aminotransferase (TGP/ALT), fosfatase alcalina, bilirrubina total e frações (direta e indireta), ácido úrico, colesterol total, triglicérides.); sorologia para Hepatite B e C; HIV 1 e 2 e exame de urina (Urina I). Para as mulheres será pedido também teste de gravidez (β -HCG sanguíneo).

Se você for considerado apto para realizar o estudo, você será internado 4 vezes por aproximadamente 24 horas cada período, com intervalo de 7 dias entre as internações. Você não poderá levar consigo alimentos e bebidas e nem outros objetos que não sejam de uso pessoal (roupas íntimas, chinelo, xampu, condicionador, sabonete, pente, e escova de dentes). Você terá seus pertences revistados para assegurar que você está cumprindo o estabelecido neste parágrafo. Quando da internação propriamente dita você será encaminhado para um quarto e não poderá circular pelos corredores da Unidade Clínica.

Em cada internação:

- Será coletada uma amostra de urina para voluntárias mulheres para fazer o teste de gravidez;
- Será administrado 1 comprimido revestido contendo 20 mg de rivaroxabana acompanhado de 200 mL de água sem gás;
- Serão coletadas 22 amostras de sangue de aproximadamente 4,9 mL cada uma nos horários estipulados, através de cateter introduzido em veia superficial, para a dosagem do medicamento no sangue;
- Você deverá ingerir por completo os alimentos oferecidos durante o período que estiver confinado;
- Serão servidas refeições padronizadas em horários pré-estabelecidos: jantar e ceia na noite da internação; café da manhã (desjejum padronizado), almoço, lanche da tarde e jantar no dia da administração da medicação.
- Em intervalos regulares serão verificados sua pressão, pulso e temperatura;
- Após a coleta de 12 horas, você receberá alta da Unidade Clínica do ICMP&D. Você deverá retornar durante 3 dias consecutivos a sua alta em torno das 07h para as coletas externas correspondentes aos tempos 24:00 / 48:00 / 72:00 horas.

Cerca de 460 mL de sangue será coletado durante todo o estudo (compreendendo todos os exames realizados e as 4 internações). A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em mais ou menos 60 dias, a contar da primeira internação, após o processo de seleção, até o encerramento da etapa (exames pós-estudo).

Após a sua participação no estudo, você será convidado a voltar ao ICMP&D para avaliar sua condição de saúde após a pesquisa. Nessa ocasião, você realizará novamente o exame do coração (eletrocardiograma) e serão coletadas novas amostras de sangue e urina para exames laboratoriais. As sorologias serão realizadas somente no pré-estudo juntamente com TP, TTPa e clearance de creatinina.

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras biológicas serão armazenadas segundo a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde e serão utilizadas para avaliar se o medicamento em teste atinge os mesmos níveis no organismo do que o medicamento de referência. As amostras biológicas não serão utilizadas para investigações futuras, sua utilização será apenas para fins desta pesquisa.

As amostras biológicas serão armazenadas sob a responsabilidade do Pesquisador Principal do ICMP&D e serão descartadas após a realização da pesquisa com a autorização do Patrocinador.

As amostras biológicas serão armazenadas em frascos identificados com os códigos do voluntário e do estudo em questão, com a finalidade de manter a confidencialidade e o sigilo das informações.

RESPONSABILIDADES

É condição indispensável, para participação no estudo, que você esteja em boa saúde e, portanto, não esteja, no momento, sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer fármacos e que tampouco tenha participado de outro estudo clínico com medicamentos nos últimos 6 meses.

Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo:

- Não pode ser dependente de drogas ou álcool, e caso o médico tenha alguma suspeita, poderá solicitar exame de urina para detecção do uso de drogas;

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

 <p>INSTITUTO CLAUDIA MARQUES P&D</p>	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 002 19 – Versão: 1.0– Emissão: 18/06/19	Documento de Origem ICM BEQ 002 19	Página 3/6
--	--	---	-----------------------------

- Não pode ter doado (ou retirado/perdido por qualquer outro motivo) sangue ou plasma em quantidade superior a 450 mL nos dois meses que antecedem o estudo, para homens e nos três meses, para mulheres;
- Não pode tomar bebida contendo cafeína e xantinas (chocolate, café, chá, coca-cola etc.) nas 48 horas que antecedem as internações até a última coleta;
- Não pode tomar bebida alcoólica nas 48 horas que antecedem as internações até a última coleta ou fumar mais de 5 (cinco) cigarros por dia.

Caso haja interesse na participação, estes hábitos deverão ser abandonados para que não interfiram no estudo. Mulheres em idade reprodutiva não poderão engravidar durante todo o período de condução do estudo porque os riscos da administração de medicamentos durante a gravidez não são totalmente conhecidos.

É, ainda, de sua responsabilidade, em relação à sua participação no estudo:

- Comparecer às internações na data e horários informados;
- Permanecer em jejum pelo tempo previsto (pelo menos 8 horas) em cada internação;
- Tomar toda a medicação prevista;
- Ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos;
- Retornar a Unidade Clínica do ICMP&D na data, horário e local combinados, para realização da consulta e exames de alta, independentemente de sua participação no estudo ter sido interrompida ou de sua desistência.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A administração de medicamentos poderá causar efeitos colaterais ou reações adversas como reações alérgicas sérias e outras reações imprevisíveis. Você deve compreender que a participação neste tipo de estudo envolve riscos que podem ser imprevisíveis, relacionados ou não ao estudo em questão.

Como todos os medicamentos, a rivaroxabana pode ocasionar reações desagradáveis, embora nem todas as pessoas apresentem estas reações. Assim como outros medicamentos com ação semelhante (agentes antitrombóticos), a rivaroxabana pode causar sangramentos, que podem ser potencialmente fatais. O sangramento excessivo pode levar a uma anemia e a uma queda brusca da pressão arterial (choque). Em alguns casos esses sangramentos podem não ser perceptíveis. Os sinais, sintomas e gravidade irão variar de acordo com a localização e o grau ou extensão do sangramento e/ou anemia. A administração oral (por boca) de rivaroxabana pode causar reações como as descritas na bula do paciente:

- Reações adversas comuns (pode afetar até 1 em 10 pessoas): anemia (redução das células vermelhas do sangue que pode tornar a pele pálida e causar fraqueza); sangramento em seu estômago, intestino (incluindo sangramento retal) ou gengiva; -dores abdominais ou gastrintestinais; indigestão, náusea, constipação, diarreia, vômito; febre, inchaço nos membros (edema periférico); fraqueza e cansaço (diminuição generalizada da força e da energia); contusões (lesão); aparecimento de manchas vermelhas ou arroxeadas (hematomas); exames de sangue com aumento de algumas enzimas hepáticas; dores nas extremidades; dor de cabeça e tontura; sangramento do trato urogenital (incluindo sangue na urina e período menstrual prolongado ou intensificado); sangramento no nariz (epistaxe); coceira na pele (incluindo casos incomuns de coceira generalizada), aparecimento de manchas ou pápulas vermelhas na pele (equimose); sangramento nos olhos (incluindo sangramento no branco dos olhos); pressão baixa (os sintomas podem ser sensação de tontura ou desmaio ao se levantar); mau funcionamento dos rins (incluindo aumento de creatinina e ureia no sangue); sangramento cutâneo ou subcutâneo; tosse com sangue (hemoptise).
- Reações adversas incomuns (pode afetar até 1 em 100 pessoas): boca seca; indisposição (incluindo mal-estar); reações alérgicas (hipersensibilidade); reação alérgica na pele; exames de sangue com aumento de bilirrubina e de algumas enzimas do pâncreas; sangramento dentro das articulações causando dor e inchaço (hemartrose); trombocitose (aumento das plaquetas no sangue, células responsáveis pela coagulação); secreção no local do corte da cirurgia; urticária; funcionamento anormal do fígado (pode ser visualizado em testes laboratoriais feitos por um médico); sangramento cerebral e intracranial; batimentos cardíacos aumentados (taquicardia); desmaio.
- Reações adversas raras (pode afetar até 1 em 1.000 pessoas): amarelamento da pele e olhos (icterícia); exames de sangue com aumento de bilirrubina conjugada; sangramento intramuscular; edema localizado;
- As seguintes reações adversas foram reportadas pós-comercialização: angioedema e edema alérgico (inchaço da face, lábios, boca, língua ou garganta); colestase (diminuição do fluxo de bile), hepatite incluindo lesão hepatocelular (inflamação do fígado, incluindo lesão do fígado); Trombocitopenia (baixo número de plaquetas, que são as células que ajudam a coagular o sangue).

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

	<p style="text-align: center;">TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 002 19 – Versão: 1.0– Emissão: 18/06/19</p>	<p style="text-align: center;">Documento de Origem ICM BEQ 002 19</p>	<p style="text-align: center;">Página 4/6</p>
---	---	--	--

A retirada de sangue é um procedimento seguro e será realizado por meio de um cateter plástico que ficará em uma veia superficial de um de seus braços. A colocação desse cateter pode causar um leve desconforto, além de uma mancha roxa pequena no local da picada que frequentemente se resolve sem mais problemas. Os riscos associados à coleta de sangue em seu braço podem incluir dor, hematoma (mancha roxa), sangramento no local onde o sangue foi retirado, tontura, desmaio e, em ocasiões raras, infecção.

Todos os procedimentos realizados durante a sua estadia no ICMP&D serão realizados por uma equipe de médicos, farmacêuticos, enfermeiros e técnicos de enfermagem capacitados e treinados.

BENEFÍCIOS

A participação neste estudo, não tem objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Consequentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função de tratamento. De acordo com as Boas Práticas Clínicas e a Resolução CNS nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, voluntários saudáveis normalmente são pagos pela participação na pesquisa porque não recebem benefícios diretos.

Os possíveis benefícios destes estudos são sempre para o bem da sociedade e para o avanço do conhecimento. Os medicamentos genéricos e similares que podem ser intercambiáveis com medicamentos de marca, passaram a fazer parte importante do arsenal terapêutico disponível no Brasil, possibilitando o acesso a medicamentos de qualidade, com um custo menor, por parte da população. A possibilidade de substituição de um medicamento por outro equivalente terapêutico (genérico ou similar) só é possível através dos estudos de bioequivalência, como este que você estará participando.

INTERCORRÊNCIAS

Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento, sem qualquer custo. Não haverá, entretanto, qualquer compensação de ordem financeira em função do ocorrido, a não ser que a condição faça jus à indenização prevista no Seguro de Vida em Grupo mencionado abaixo. Contudo, ao assinar este termo, você não está renunciando a qualquer direito legal que você possui.

Durante o período de 03 (três) meses a contar da data da primeira internação (a partir da data da assinatura deste termo), os voluntários estarão sob cobertura de um Seguro de Vida em Grupo para caso de morte ou invalidez permanente e acidentes relacionados ou não ao ensaio clínico.

RESSARCIMENTO

Os voluntários serão ressarcidos no valor de no valor de R\$ 1.400,00 (um mil e quatrocentos reais) relativos às despesas e tempo despendidos durante o estudo. Caso o voluntário desista em uma das internações e/ou não compareça as coletas externas será excluído do estudo e o ressarcimento não será efetuado. Se o voluntário for dispensado antes do estudo ser finalizado receberá proporcionalmente ao tempo despendido. O ressarcimento será efetuado após a consulta de alta do estudo.

A participação do voluntário no processo de recrutamento e seleção independe de aprovação ou concordância em participar e a mesma não será ressarcida. Ou seja, a dispensa ou desistência do voluntário antes da primeira internação não dá direito ao ressarcimento.

Apenas os voluntários reservas serão ressarcidos no valor de valor de R\$ 40,00 (quarenta reais), caso não participem do estudo devido ao tempo e transporte despendidos.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador ou a um membro da equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento por parte da nossa equipe.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função:

- Da ocorrência de eventos adversos;
- Da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo;

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

 INSTITUTO CLAUDIA MARQUES P&D	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 002 19 – Versão: 1.0– Emissão: 18/06/19	Documento de Origem ICM BEQ 002 19	Página 5/6
--	--	---	-----------------------------

- Do não cumprimento das normas estabelecidas;
- De qualquer outro motivo que, a critério médico, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes;
- Da suspensão do estudo como um todo.

A Unidade Clínica do ICMP&D o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

A interrupção do estudo não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento médico pela equipe do ICMP&D.

Não será fornecido atestado médico durante as internações, apenas uma “Declaração de Comparecimento” de sua participação no estudo.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. O ICMP&D não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética e Pesquisa Clínica, ou autoridades do(s) órgão(s) governamental(is) envolvido(s) na fiscalização e acompanhamento do estudo terão direito de acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, sem no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE), você está, também, autorizando tal acesso, mesmo que desista do estudo.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja qualquer dúvida ou problema de saúde que você apresente durante sua participação no estudo, deverá procurar a Unidade Clínica do ICMP&D e/ou entrar em contato no endereço e telefones abaixo.

Se você tiver alguma dúvida e/ou consideração sobre a ética da pesquisa, sobre seus direitos como voluntário, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa no endereço e telefones abaixo.

Contatos	Endereço	Telefones para contato
Unidade Clínica	Av. Coronel Armando Rubens Storino, 2850– Jardim Paraíso – Pouso Alegre	Pesquisador Principal: (35) 99118-4898 Unidade Clínica: (35) 2102-2073 / 2102-2066 / 2102-2067 (35) 98465-3612 / 99250-3322
CEP- UNIVAS Universidade do Vale do Sapucaí	Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470 – Fátima I – Pouso Alegre	(35) 3449-9232 / (35) 98856-0220

ASSINATURAS

Eu declaro que li cuidadosamente, todo este documento denominado “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e sobre o Estudo, e recebi explicações que responderam por completo às minhas dúvidas e reafirmo estar, livre e espontaneamente, decidindo participar do Estudo.

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, também estou certificando que toda a informação que prestei, incluindo minha história médica, é verdadeira e correta até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estou autorizando o acesso às minhas informações, conforme explicitado anteriormente.

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

 <p>INSTITUTO CLAUDIA MARQUES P&D</p>	<p>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE 002 19 – Versão: 1.0 – Emissão: 18/06/19</p>	<p>Documento de Origem ICM BEQ 002 19</p>	<p>Página 6/6</p>
--	--	---	-----------------------

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Assinatura do responsável e carimbo

____/____/____

Data

Assinatura do voluntário

____/____/____

Data

Rubrica responsável: _____

Rubrica voluntário: _____

ANEXO F – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO ESTUDO DE FARMACOGENÉTICA.

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO - FACIMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPACTO DOS POLIMORFISMOS DE TRANSPORTE / METABOLISMO NAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE RIVAROXABANA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS PARTICIPANTES DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

Pesquisador: Alessandra Ferreira dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 16583119.7.0000.5102

Instituição Proponente: INSTITUTO CLAUDIA MARQUES DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO LTDA.

Patrocinador Principal: INSTITUTO CLAUDIA MARQUES DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO LTDA.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.466.733

Apresentação do Projeto:

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no Brasil e no mundo, representando aproximadamente 31% das mortes

globais, sendo assim consideradas um problema de saúde pública (OPAS, 2017). Para os eventos tromboembólicos causados pelas DCVs, é

recomendada a terapia anticoagulante para prevenir e interromper o crescimento de trombos (KUBITZA et al., 2005b; MUECK et al., 2011). Os

novos anticoagulantes orais (NOACs) são indicados para o tratamento de fibrilação atrial não valvular (FANV), para o tratamento ou profilaxia de

trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP), bem como após cirurgia ortopédica de grande porte para substituição total de quadril ou

joelho (LINDHOFF-LAST et al., 2013; DINCQ et al., 2014; AŠI et al., 2018). Entre os compostos denominados novos anticoagulantes orais

descobertos nos últimos anos está a rivaroxabana, com intuito de melhorar a dificuldade da autoadministração, a estreita janela terapêutica, os

ajustes de doses e o monitoramento laboratorial requeridos pelos anticoagulantes mais antigos e ela ainda possui farmacocinética e

farmacodinâmica previsíveis (LINDHOFF-LAST et al., 2013; AŠI et al., 2018). A rivaroxabana é um

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO - FACIMPA



Continuação do Parecer: 3.466.733

inibidor direto, reversível e altamente seletivo do fator Xa com biodisponibilidade oral. A ativação do fator X a fator Xa (FXa) por meio das vias intrínseca e extrínseca desempenha um papel central na cascata da coagulação sanguínea. O FXa converte diretamente a protrombina em trombina por meio do complexo de protrombinase e, finalmente, esta reação leva à formação do coágulo de fibrina e à ativação das plaquetas pela trombina. Uma molécula de FXa é capaz de gerar mais de 1.000 moléculas de trombina devido à natureza amplificadora da cascata da coagulação. Além disso, a taxa de reação do FXa ligado à protrombinase aumenta 300.000 vezes, em comparação à do FXa livre, e causa uma descarga explosiva de geração de trombina. Os inibidores seletivos de FXa podem encerrar a descarga amplificada de geração de trombina. Consequentemente, diversos testes de coagulação específicos e globais são afetados pela rivaroxabana. Foi observada inibição dose-dependente da atividade do fator Xa em humanos. O tempo de protrombina (TP) é influenciado pela rivaroxabana de um modo dose-dependente com uma correlação estreita com as concentrações plasmáticas, dependendo do reagente utilizado no ensaio. A leitura do TP deve ser feita em segundos porque a RNI (Relação Normalizada Internacional) é calibrada e validada somente para cumarínicos e não pode ser usada para qualquer outro anticoagulante. Em pacientes, 2-4 horas depois da ingestão do comprimido (por exemplo, no momento de efeito máximo) o TP variou de 13 a 25 segundos. O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) também se prolongou dependendo da dose. Não há necessidade de monitorar os parâmetros de coagulação durante o tratamento clínico de rotina com rivaroxabana. Aproximadamente 2/3 da dose administrada de rivaroxabana, sofrem degradação metabólica, com metade sendo eliminada via renal e a outra metade, via fecal. Os demais 1/3 da dose administrada são diretamente excretados pelos rins como fármaco inalterado na urina, principalmente por secreção renal ativa. A rivaroxabana é metabolizada por meio de CYP3A4, CYP2J2 e de mecanismos independentes do CYP. A degradação oxidativa da fração morfolinona e a hidrólise das ligações amida são os principais locais de biotransformação. Com base em investigações in vitro, a rivaroxabana é um

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO - FACIMPA



Continuação do Parecer: 3.466.733

substrato das proteínas transportadoras gp-P (glicoproteína-P) e Bcrp (proteína de resistência ao câncer de mama). Os dados atualmente disponíveis acerca da farmacocinética e da farmacodinâmica da rivaroxabana definem a importância de se conhecer o potencial de interação entre este fármaco 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 (MUECK, 2013), mas é relevante o fato de que não existem dados publicados, até o momento, sobre a farmacogenética da rivaroxabana e que genes que possam exercer influência na resposta a este agente 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). Dados na literatura mostraram grande variabilidade farmacocinética intra e interindividual da rivaroxana. Fato este que pode ser parcialmente explicado pela expressão das proteínas de transporte e/ou função dos CYPs. Neste estudo estamos propondo determinar as concentrações de rivaroxabana em voluntários saudáveis participantes de estudos de bioequivalência e avaliar sua correlação com os dados laboratoriais e os efeitos dos polimorfismos de transporte e metabolismo.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral deste trabalho é correlacionar as concentrações plasmáticas obtidas de voluntários saudáveis provenientes de estudos de bioequivalência após utilização em dose única por via oral de 20 mg de rivaroxabana, em condições de jejum e pós-prandial com os parâmetros de coagulação marcadores de efeito e os polimorfismos genéticos obtidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como risco poderia ser revelada a identidade dos indivíduos, o que será minimizado com a codificação das amostras.

Pode haver desconforto referente a colheita de sangue por punção.

Esta pesquisa poderá contribuir para a identificação dos polimorfismos dos genes relacionados ao

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO - FACIMPA



Continuação do Parecer: 3.466.733

transporte e metabolismo da rivaroxabana. E pode direcionar outros pesquisadores a continuar nesta linha de pesquisa visando a um melhor controle do manejo deste fármaco, minimizando seus riscos para os pacientes que fazem uso contínuo. Não há benefício direto para o participante da pesquisa (voluntário).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de alta relevância científica e social devido aos conhecimentos adquiridos que preencherão lacunas científicas e pelas contribuições sociais que também advirão deste estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão presentes, de forma completa e adequada.

Recomendações:

Divulgar os resultados deste estudo em revistas científicas e em outros meios de natureza também c

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Toda pesquisa envolve riscos sem mais a consideração de riscos mínimos. Portanto deve-se usar apenas o termo risco e não mais riscos mínimos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Os autores deverão apresentar ao CEP um relatório parcial e um final da pesquisa de acordo com cronograma apresentado no projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1368996.pdf	30/05/2019 20:01:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_RIVAROXABANA.pdf	30/05/2019 20:01:28	Alessandra Ferreira dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	30/05/2019 17:51:43	Alessandra Ferreira dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	FR_ASSINADA.pdf	30/05/2019 17:51:12	Alessandra Ferreira dos Santos	Aceito

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO
GARCIA COUTINHO - FACIMPA



Continuação do Parecer: 3.466.733

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

POUSO ALEGRE, 23 de Julho de 2019

Assinado por:
Ronaldo Júlio Baganha
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

Bairro: Campus Fátima I

CEP: 37.554-210

UF: MG

Município: POUSO ALEGRE

Telefone: (35)3449-9232

E-mail: pesquisa@univas.edu.br

ANEXO G – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO ESTUDO FARMACOGENÉTICO.

 <p>INSTITUTO CLAUDIA MARQUES P&D</p>	<p>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) Versão: 1.0</p>	
--	---	---

TÍTULO DO PROJETO

IMPACTO DOS POLIMORFISMOS DE TRANSPORTE / METABOLISMO NAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE RIVAROXABANA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS PARTICIPANTES DE ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido consta de 2 (duas) vias, sendo uma delas entregue ao voluntário. Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre a influência de características genéticas humanas sobre o comportamento do fármaco rivaroxabana no organismo. Sua participação não é obrigatória, mas voluntária. Você pode se recusar a participar da pesquisa ou, a qualquer momento, desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que este fato cause qualquer constrangimento ou penalidade. Os pesquisadores se obrigam a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, e também poderão interromper sua participação a qualquer tempo por razões técnicas ou médicas. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos.

IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

Nome completo	
Nº do CPF	
Data de nascimento (dd/mm/aa)	

O voluntário acima declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, sob responsabilidade da pesquisadora principal, Alessandra Ferreira dos Santos e da pesquisadora professora Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques. O abaixo assinado está ciente que:

Neste projeto os pesquisadores irão comparar as variáveis de genes que são responsáveis por transportar e eliminar os medicamentos do organismo, entre pessoas que tomaram rivaroxabana durante estudos de bioequivalência. O objetivo é verificar se há influência destes genes nas concentrações da rivaroxabana no organismo e se estas concentrações correspondem ao efeito esperado. O efeito pretende ser medido pela análise de exames de coagulação, uma vez que a rivaroxabana é um anticoagulante.

Sua participação neste estudo poderá não trazer benefícios diretos para você, mas você estará contribuindo para aumentar os conhecimentos da reação do nosso organismo na resposta ao tratamento de anticoagulantes orais, neste caso a rivaroxabana. Os resultados obtidos poderão contribuir para a melhora da qualidade do tratamento em outros indivíduos e trazer conhecimento sobre este tema para outros pesquisadores.

Sua participação nessa pesquisa consistirá em fornecer quatro (4) amostras de 5 mL sangue que serão retiradas da veia do seu braço, este procedimento será realizado durante a condução do estudo de bioequivalência com o medicamento rivaroxabana.

Você poderá ser convidado a fornecer novas amostras de sangue, caso o material seja insuficiente ou sofra algum tipo de alteração (hemólise, etc).

A coleta de sangue causará um pequeno desconforto (semelhante à picada de inseto), com pequena ardência no local da coleta. Este procedimento não implica nenhum risco, pois faz parte dos procedimentos de rotina para a coleta de sangue, podendo ocorrer pequenas manchas roxas (extravasamento de sangue da veia para o tecido) no local da punção.

As amostras biológicas serão armazenadas em frascos identificados com os códigos do voluntário e do estudo de bioequivalência correspondente, com a finalidade de manter a confidencialidade e o sigilo das informações.

Todo o material biológico coletado (amostras de sangue) será utilizado exclusivamente para as análises necessárias para a pesquisa. Após as análises será descartado, não sendo utilizado para pesquisas futuras.

Por participar dessa pesquisa, seus registros no estudo de bioequivalência serão usados como fonte de informação para a condução do estudo, mas as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os

	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) Versão: 1.0	
---	--	---

resultados serão divulgados em apresentações ou publicações com fins científicos ou educativos, e sua identidade não será jamais exposta.

Participar dessa pesquisa não implicará em nenhum custo para você, e, como voluntário, você não receberá qualquer valor em dinheiro como compensação pela participação, a não ser o ressarcimento referente ao estudo de bioequivalência que você estará participando e quem tem outro TCLE.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço da pesquisadora responsável, podendo tirar dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou em qualquer momento.

ASSINATURAS E CONSENTIMENTO

Eu declaro que li cuidadosamente e ouvi a leitura de todo este documento denominado "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e sobre a pesquisa científica, e recebi explicações que responderam por completo às minhas dúvidas e reafirmo estar, livre e espontaneamente, decidindo participar do Estudo.

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estou autorizando o acesso às minhas informações, conforme explicitado anteriormente e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar desta pesquisa.

Fui informado de que dados confidenciais envolvidos na pesquisa serão tratados com sigilo e privacidade e que não terei qualquer despesa com minha participação. Estou ciente que este estudo não me beneficiará diretamente.

Assinatura do pesquisador e carimbo

____/____/____
Data

Assinatura do voluntário

____/____/____
Data

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja qualquer dúvida ou problema de saúde que você apresente durante sua participação no estudo, deverá procurar a Unidade Clínica do ICMP&D e/ou entrar em contato no endereço e telefones abaixo.

Se você tiver alguma dúvida e/ou consideração sobre a ética da pesquisa, sobre seus direitos como voluntário, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa no endereço e telefones abaixo.

Contatos	Endereço	Telefones para contato
Pesquisador Principal - Instituto Claudia Marques de Pesquisa e Desenvolvimento	Av. Coronel Armando Rubens Storino, 2850- Jardim Paraíso - Pouso Alegre / MG	Alessandra (35) 99118-4898
Pesquisadora - Universidade Federal de Alfenas	Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas / MG	Prof. Dra Vanessa Bergamin Boralli Marques (35) 3701 - 9508
CEP- UNIVAS Universidade do Vale do Sapucaí	Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470 - Fátima I - Pouso Alegre / MG	(35) 3449-9232 / (35) 98856-0220