

Farmacogenómica e Ensaio Clínicos

Pharmacogenomics and Clinical Trials

Lesseps dos Reis¹

¹ Departamento Ciências da Saúde, Universidade Lusófona, Campo Grande 376,
1749-024 Lisboa, Portugal

Resumo

Aproximadamente 40% da metabolização de fármacos pelas enzimas P450 é catalisada por enzimas polimórficas que podem conduzir a metabolismo nulo, diminuído (qualitativa ou quantitativamente) ou aumentado. O recente desenvolvimento da tecnologia de matrizes de oligonucleótidos em microchips para detecção dum elevado número de mutações nos genes pode ser útil na selecção e posologia de medicamentos mais adequados ao perfil genético dos doentes.

Contudo, antes da aplicação na prática clínica destes progressos é necessário testar a validação dos pressupostos mediante a realização de ensaios clínicos. No âmbito da terapêutica medicamentosa os ensaios clínicos continuam a ser o suporte da medicina baseada na evidência.

Por consequência, sempre que justificado, a investigação e desenvolvimento de novos medicamentos deve incluir a informação farmacogenómica obtida dos estudos pré-clínicos (*in vitro*, *in vivo* e *in silico*) de modo a que os ensaios clínicos possam confirmar a relação entre o perfil genético dos doentes e a respectiva resposta terapêutica.

Palavras chave: farmacogenómica, farmacogenética, ensaios clínicos

Abstract

Approximately 40% of human P450 dependent drug metabolism is carried out by polymorphic enzymes, which can cause abolished, quantitatively or qualitatively altered or enhanced drug metabolism. The recent development of high-through methods for mutation detection and oligonucleotide chips array technology for the detection of a multitude of mutations in the genes may help to prescription of drugs tailored to the genetic profile of the patients.

However before applying this new knowledge in the clinical practice there is a need to test the validity of the assumptions through clinical trials. Within the realm of drug therapy clinical trials remain the mainstay for the practice of evidence based medicine. Therefore whenever justified the investigation and development of new drugs shall include the pharmacogenomic information obtained from the pre-clinical investigations (*in vitro*, *in vivo* and *in silico*) so that the clinical trials may validate the relationship between the genetic profile of the patients and their response to them.

Key words: pharmacogenomics, pharmacogenetics, clinical trials

Introdução

A terapêutica medicamentosa tem por objectivo tratar os doentes com fármacos de comprovada eficácia e segurança. Com este desiderato as substâncias activas carecem de autorização de introdução no mercado, concedida pelas entidades reguladoras após prévia apreciação dos *dossiers* de estudos pré-clínicos e clínicos, comprovativos da eficácia e segurança das novas moléculas.

Até há poucas décadas atrás, as novas substâncias activas eram isoladas a partir de plantas medicinais. Mais raramente, eram extraídas de órgãos ou tecidos de animais ou do reino mineral. Os progressos da química farmacêutica permitiram obter moléculas semi-sintéticas (por modificação estrutural dos princípios activos naturais) ou mesmo resultantes de síntese *de novo*. De mencionar que até meados do século passado muitos fármacos foram descobertos por acaso e sorte dos investigadores^[1].

Após a síntese duma nova molécula, a fase de investigação e desenvolvimento (I&D) passa por **estudos pré-clínicos** efectuados em sistemas biológicos *in vitro* (células ou órgãos isolados) ou *in vivo* (*i.e.* estudos experimentais em animais). Posteriormente são realizados **ensaios clínicos**. Esta investigação clínica, efectuada em seres humanos, tem por objectivo a obtenção dos dados necessários para avaliar a eficácia e segurança das moléculas candidatas a fármacos. Ela permite obter os parâmetros da farmacocinética (resultantes dos mecanismos envolvidos na absorção, distribuição, metabolismo e excreção, no seu conjunto designados abreviadamente por ADME) e da farmacodinâmica (identificação dos alvos e respectiva interacção com as novas moléculas). Para além, obviamente, da respectiva toxicidade a curto, médio e longo prazo.

Não obstante o rigor científico inerente à investigação pré-clínica e clínica, a prática médica tem demonstrado a impossibilidade de serem evitadas reacções adversas, susceptíveis de causarem significativa morbidade ou mesmo mortalidade^[2]. Por outro lado, a eficácia terapêutica dos medicamentos nem sempre corresponde à esperada. Pelo que, no sentido de prevenir os riscos de iatrogenia medicamentosa, são de particular interesse médico e farmacêutico os programas de farmacovigilância, destinados a detectar as reacções adversas sobretudo as resultantes do prolongado uso dos medicamentos (toxicidade crónica).

De facto, a experiência clínica tem evidenciado a existência duma apreciável variação inter-individual da resposta à farmacoterapia, seja em termos de eficácia ou de ocorrência de efeitos adversos. Vários factores podem contribuir para esta variação. Excluindo os decorrentes duma incorrecta posologia

condicionados pela idade, sexo, estado fisiológico (p.ex. gravidez), doenças concomitantes, interacções medicamentosas, hábitos (álcool, tabaco, etc.). Nesta constelação multifactorial, susceptível de modular a resposta farmacológica, assumem particular importância os perfis genéticos dos doentes medicados.

Actualmente é consensual aceitar-se a influência genética nos processos intervenientes na farmacocinética e na farmacodinâmica. Na farmacocinética devido aos polimorfismos das enzimas metabolizantes de fármacos (*Drug Metabolizing Enzymes* ou *DMEs*) ou das proteínas de transporte, por exemplo. Na farmacodinâmica mediante os polimorfismos das proteínas que são alvo da acção dos fármacos (receptores, enzimas, canais, sistemas de transdução, etc.).

Em meados do século passado surgiu o conceito de farmacogenética. Vários AA. propuseram a hipótese, mais tarde confirmada, de que determinadas reacções até então consideradas como idiosincrásicas estavam associadas a certos fenótipos^[3,4,5].

Com a sequenciação completa do genoma humano e os progressos das técnicas da biotecnologia tornou-se possível proceder a um estudo mais aprofundado dos polimorfismos genéticos subjacentes às variações na resposta farmacológica. A farmacogenética evoluiu assim para a farmacogenómica^[6,7].

À medida que vão sendo identificados os referidos polimorfismos, equaciona-se a questão de conhecer se os ensaios clínicos, tal como actualmente planeados e executados, podem ser melhorados em termos de comprovação da eficácia e segurança das novas moléculas a introduzir nos formulários. Nomeadamente com estudos pré-clínicos (*in vitro* ou *in vivo*) e clínicos que tenham em conta a variabilidade geneticamente controlada. Por outras palavras, em que medida a farmacogenómica, sucessora da farmacogenética, deve ser considerada na concepção e planificação dos ensaios pré-clínicos e clínicos de novos medicamentos. Em caso afirmativo, que implicações éticas, sociais, legais, económicas ou de outra índole são suscitadas nesses casos.

A análise destas questões requer uma prévia comparação das normas de Boa Prática Clínica (BPC) actualmente seguidas e as alterações eventualmente necessárias para incluir os dados da farmacogenómica.

Breve descrição das regras de Boa Prática Clínica

Desde meados do século XX os ensaios clínicos de novos fármacos seguem as regras científicas baseadas no método estatístico^[8,9]. A metodologia dos ensaios clínicos estão definidas na chamada Boa Prática Clínica que inclui não somente os aspectos científicos, como também as normas éticas dado tratar-se de investigação em seres humanos^[10].

Em termos de metodologia científica, os ensaios clínicos de novos medicamentos desenvolvem-se em quatro fases, de acordo com os objectivos (Quadro 1).

Quadro 1 - Fases dos ensaios clínicos: características e objectivos

Fase I	Obtenção de dados sobre farmacocinética e farmacodinâmica em reduzido número de voluntários sãos (~ 30) Tratando-se de seres humanos pela primeira vez expostos ao novo fármaco, é concedida particular atenção à toxicidade Determinação das doses mínima e máxima
Fase II	Particular enfoque na eficácia, segurança e determinação das doses num limitado número de doentes a quem o novo fármaco se destina (~300) Comparação do novo fármaco com placebo ou tratamento convencional Randomização com ou sem dupla ocultação
Fase III	Amostra alargada de doentes (centenas a milhares) Comparação do novo fármaco com o tratamento convencional ou com placebo Habitualmente randomização com dupla ocultação. Os ensaios podem ser multicêntricos e multinacionais Estádio final da investigação clínica antes da aprovação pelas entidades reguladoras
Fase IV	Estudos em grande escala, de longa duração, após introdução no mercado Particularmente direccionados à identificação da morbilidade e da mortalidade devido a efeitos adversos Eventual identificação de novas indicações terapêuticas

Em princípio seja desde já referido que os ensaios clínicos são autorizados mediante comprovação prévia da eficácia e segurança nos ensaios pré-clínicos. De igual modo, a progressão por fases obedece a critérios de comprovação de eficácia e segurança, previamente definidos, em cada uma das fases.

Os ensaios podem ser interrompidos em qualquer fase se ocorrerem efeitos adversos graves ou quando a evidência da eficácia e ausência de efeitos adversos for de molde a dispensar a sua continuação.

Implicações da farmacogenómica na planificação dos ensaios clínicos

Ao nível dos estudos pré-clínicos

A sequenciação total do genoma humano tem vindo a provocar uma revolução na terapêutica medicamentosa, em todas as etapas de investigação e desenvolvimento (I&D) de novos fármacos, desde a síntese de novas moléculas até ao acto de receitar.

Por exemplo, o aparecimento da farmacologia reversa. Enquanto na farmacologia clássica, tal como a praticada até ao fim do século passado, as actividades de I&D evoluíam do isolamento e/ou síntese de novas moléculas para a identificação dos seus receptores, a tendência actual é caminhar no sentido inverso. Ou seja, identificação prévia dos alvos terapêuticos (mediante a investigação dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes às patologias, ao nível biomolecular) e, com o apoio da química combinatória, síntese das moléculas mais adequadas para com eles interagir^[11]. A biotecnologia, em conjugação com a bioinformática, permite o estudo destas interacções *in*

silico, *i.e.* em modelos virtuais computadorizados. Desta forma, os estudos pré-clínicos passam a incluir, para além dos efectuados *in vitro* e *in vivo*, os *in silico*.

Os estudos *in silico* abrangem igualmente a análise de modelos das interacções das moléculas candidatas com várias enzimas metabolizantes de fármacos (*DMEs*). Algumas enzimas da superfamília das CYP450 já foram isoladas e purificadas ao ponto de cristalização (CYP2C9, CYP3A4, por exemplo) tornando possível complementar os estudos *in vitro* efectuados com microsomas hepáticos, necessariamente mais trabalhosos e morosos, com estudos *in silico*. As inovações no domínio da biotecnologia permitem acelerar os referidos estudos, identificando as enzimas metabolizantes das novas moléculas, entre as quais as já referidas CYP450.

Polimorfismos genéticos na investigação de novos fármacos

Os processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos são basicamente interacções entre moléculas exógenas (xenobióticos) e moléculas endógenas (proteínas). Donde resulta que os polimorfismos genéticos, responsáveis pela síntese de proteínas, podem afectar ambos os tipos de processos.

Estas proteínas intervêm nos processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) dos fármacos, desempenhando funções de transporte e mica, através das proteínas alvos das acções dos fármacos (receptores, enzimas, canais iónicos) e nas vias de transdução.

catalisando as reacções de metabolização. Igualmente participam na farmacodinâmica, através das proteínas alvos das acções dos fármacos (receptores, enzimas, canais iónicos) e nas vias de transdução.

Neste contexto, as variações farmacogenómicas podem ser classificadas em dois grupos principais:

- farmacocinéticas resultantes de polimorfismos das enzimas metabolizantes (*DMEs*) e das proteínas de transporte;
- farmacodinâmicas resultantes de polimorfismos dos alvos farmacológicos ou de algum componente na sequência de reacções condutoras aos mesmos

Polimorfismos com relevância na farmacocinética

A concentração das moléculas activas na biofase, ou seja, junto dos alvos com os quais interagem, é função duma sequência dos processos farmacocinéticos acima referidos (ADME). Estes processos são controlados por proteínas sintetizadas sob controlo de genes, muitos dos quais com alelos que atingem frequências polimórficas (>1%) em diversos grupos populacionais. Entre estas proteínas figuram as enzimas metabolizantes de fármacos (*DMEs*) e as proteínas de transporte.

As proteínas de transporte são importantes pois intervêm na absorção, distribuição e excreção das moléculas xenobióticas. Muito embora sejam objecto de activa investigação, presentemente o conhecimento é maior no domínio das proteínas enzimáticas participantes no metabolismo dos fármacos.

Na maioria dos casos a metabolização é feita em duas etapas. A primeira consiste principalmente em reacções de oxi-redução ou hidrólise, que removem certos grupos funcionais e tornam as moléculas mais aptas para sofrerem as reacções da segunda etapa. As reacções de segunda etapa podem ou não ser precedidas pelas anteriores e consistem em reacções de conjugação, tais como glucoronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutathione ou amino-ácidos tais como a glicina, taurina e ácido glutâmico. Estas reacções são catalisadas por diversas enzimas que podem evidenciar variação polimórfica tais como a N-acetil-transferase^[12], S-glutathione-transferase^[13], 5-trifosfato-glucoronosil-transferase, etc.. Sem prejuízo de reconhecer a importância doutras *DMEs*, merecem referência especial as enzimas CYP450.

Até ao presente os investigadores têm dedicado maior atenção ao estudo das enzimas CYP450 por, aparentemente, serem as de maior impacto na farmacocinética. Justificam-se por tal motivo, algumas considerações sobre esta superfamília de enzimas numa perspectiva farmacogenómica.

As enzimas CYP450 são heteroproteínas com núcleo hemínico, que actuam como aceitadoras de

electrões, no termo de várias reacções de oxi-redução. ocorrência de isoenzimas (ou isoformas). Com base na homologia da sequência de amino-ácidos, estas são agrupadas em famílias (designadas por um algarismo árabe) e subfamílias (designadas por uma letra). Dentro de cada subfamília as isoenzimas individuais são identificadas por novo algarismo árabe que corresponde ao locus e precedido dum asterisco, o número do alelo. Assim, por exemplo, a CYP2D6*10 é uma isoenzima CYP450 codificada pelo alelo 10 da subfamília D da família 2. O gene é indicado pela designação da isoenzima em itálico (p.ex. *CYP2D6*10*).

A componente proteica está sujeita a variação de condicionamento genético expressa na sequência de amino-ácidos, o que se traduz na ocorrência de isoenzimas (ou isoformas). Com base na homologia da sequência de amino-ácidos, estas são agrupadas em famílias (designadas por um algarismo árabe) e subfamílias (designadas por uma letra). Dentro de cada subfamília as isoenzimas individuais são identificadas por novo algarismo árabe que corresponde ao locus e precedido dum asterisco, o número do alelo. Assim, por exemplo, a CYP2D6*10 é uma isoenzima CYP450 codificada pelo alelo 10 da subfamília D da família 2. O gene é indicado pela designação da isoenzima em itálico (p.ex. *CYP2D6*10*).

Na espécie humana foram identificadas *ca.* de 50 isoenzimas CYP450. Elas intervêm no metabolismo de compostos endógenos (esteroides, prostaciclina, tromboxano, etc.) e de compostos exógenos (fármacos e outros xenobióticos)^[14].

As isoenzimas das três primeiras famílias de CYP450 (CYP1, CYP2 e CYP3) intervêm na primeira etapa do metabolismo de fármacos, ocorrendo na família CYP2 o maior grau de polimorfismos genéticos. Um estudo de 11 genes codificantes destas enzimas, em diferentes grupos étnicos, permitiu concluir pela existência de pequenas diferenças entre os grupos étnicos, mas de grandes diferenças entre os genes e subfamílias de genes^[15].

Entre as isoenzimas pertencentes às três primeiras famílias, algumas (CYP1A2, CYP2C9/19, CYP2D6 e CYP3A4) intervêm na metabolização de *ca.* 90% dos fármacos em uso clínico. Dentro destas, algumas são altamente polimórficas tais como as CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9. No seu conjunto, estas três isoenzimas são responsáveis pela primeira etapa do metabolismo hepático de *ca.* 40% fármacos. A CYP2D6 é a mais estudada, tendo já sido identificados 48 fármacos-substrato, 25% dos quais em uso corrente na clínica^[16]. Entre estes fármacos incluem-se, por exemplo, o dextromorfano, derivados da morfina e alguns beta-bloqueantes, antiarrítmicos e antidepressivos.

A CYP2C19 metaboliza, entre outros, os inibidores da bomba de prótons, o diazepam, o propranolol, a imipramina, a amitriptilina, etc.. É de notar que muitos fármacos são metabolizados, em grau variável, por mais que uma enzima, seja da superfamília CYP450 ou não.

De mencionar que nem todos os compostos dos grupos farmaco-terapêuticos mencionados são metabolizados pelas referidas isoenzimas CYP450. Donde resulta que o médico, ao prescrever, quando existam várias alternativas, tem a opção de escolher medicamentos menos sujeitos a variações metabólicas resultantes dos polimorfismos daquelas isoenzimas.

As características funcionais das CYP450 acima pagem pode não ser suficientemente predizente do fenótipo^[17].

referidas não são equivalentes em termos de permitir a previsão do fenótipo metabolizador. Por exemplo, a CYP3A4, abundante no fígado, participa no metabolismo dum número de fármacos superior ao dos biotransformados por outras CYP450. Contudo, a sua actividade é relativamente mais influenciada por factores extra-genéticos, tais como dieta, doenças (nomeadamente hepatopatias), medicações concomitantes, etc.. Em contraste, a actividades das CYP2C19 e CYP2D6 são relativamente menos sensíveis à influência dos referidos factores extra-genéticos e mais determinadas pela variação genética e por outros fármacos que podem inibir a actividade enzimática e aumentar ou diminuir a eficácia do fármaco em estudo ou ainda o risco de reacções adversas. Donde se pode concluir que a simples genotipagem pode não ser suficientemente predizente do fenótipo^[17].

Os polimorfismos são resultantes de mutações de vários tipos, como sejam alterações dum único nucleótido (SNP ou *Single Nucleotide Polymorphism*) até cópias múltiplas dos genes codificantes das

CYP450. Estas mutações ocorrem não só nas seqüências codificantes, como também nas adjacentes (v.g. nas zonas promotoras). Em termos de consequências, as referidas mutações resultam em genes (alelos) expressos por fenótipos normo-, hipou hiperfuncionantes. Decorrente do seu grau de penetrância, do estado de homo- ou heterozigotia, de influências extra-génicas, resulta o tipo (fenótipo) de metabolizador dos respectivos portadores.

heterozigotia, de influências extra-génicas, resulta o tipo (fenótipo) de metabolizador dos respectivos portadores.

Se bem que numa população de doentes a actividade duma enzima possa ter uma distribuição normal ou gaussiana, em termos de capacidade de metabolização, os doentes são habitualmente classificados em quatro grandes tipos de fenótipos: lentos (PM ou Poor Metabolizers), intermédios (IM), extensivos (EM), rápidos (R) e ultra-rápidos (UR).

Quando o fármaco-substrato for uma molécula activa, a rápida metabolização pode impedir que sejam alcançadas concentrações plasmáticas eficazes; nos metabolizadores lentos tais concentrações podem atingir níveis de toxicidade. Quando se trate de pró-fármacos, cuja actividade depende da prévia biotransformação, sucede o inverso.

As frequências dos alelos polimórficos são variáveis em diferentes grupos populacionais. A elevada prevalência de alelos hipofuncionantes tais como *CYP2D610* (frequência de 50% entre os asiáticos) ou *CYP2D617* (30% em certas populações africanas), levam, de acordo com a distribuição prevista pela lei de Hardy-Weinberg, a uma maior percentagem de metabolizadores intermédios (IM), *i.e.* com menor actividade enzimática relativamente à expressa pelos homozigóticos para o gene selvagem. As mutações devidas a cópias múltiplas do gene *CYP2D6* levam a fenótipos de metabolizadores rápidos (R) ou ultra-rápidos (UR) (Quadro 2).

Quadro 2 - Exemplos de frequências de alelos de enzimas CYP450 em diferentes grupos populacionais

CYP450	Alelos	Caucasoides	Africanos	Asiáticos
CYP2C9	CYP2C9*2	8-14	1	0
	CYP2C9*3	4-18	1-2	2-3
CYP2D6	CYP2D6*4	12-21	2	1
	CYP2D6*5	2-7	4	6
	CYP2D6*10	1-2	6	51
	CYP2D6*17	0	34	0

Polimorfismos com relevância na farmacodinâmica

É conhecida desde há muito a ocorrência de polimorfismos ao nível dos receptores citoplásmicos, nucleares ou de membrana^[23]. Entre os mais relevantes para a prática clínica, merecem referência especial os receptores adrenérgicos β_1 ^[24] e β_2 ^[25,26].

À medida que vão sendo investigados os mecanismos de interacção entre fármacos e receptores, verifica-se que tal interacção passa por vias complexas, nas quais os compostos intermédios podem ser igualmente alvos da acção farmacológica. Tais compostos acabam por afectar os processos de transcrição e tradução dos genes, por forma a inibir os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a variados tipos de patologias. Por tal motivo, a estratégia para a descoberta de novos fármacos passa pela compreensão destes mecanismos que, segundo alguns AA., deveriam ser considerados como uma linguagem ou gramática conducente a uma lógica orientadora na investigação de novos fármacos^[27].

Neste contexto, compreender-se-á a dificuldade de se incluir, entre os critérios de inclusão/exclusão a selecção ou estratificação dos voluntários com fundamento nos marcadores relevantes para a farmacodinâmica do medicamento sob investigação.

Relevância dos polimorfismos na planificação dos ensaios clínicos

A planificação dos ensaios clínicos, tal como é efectuada presentemente, parte do pressuposto que a amostragem dos voluntários recrutados para além de ser representativa da população é suficientemente homogénea, sem enviesamentos susceptíveis de prejudicar a análise estatística dos resultados. Se bem que os critérios de inclusão/exclusão procurem garantir tal homogeneidade (em termos de idade, sexo, etc.), os factores genéticos não têm sido habitualmente considerados. Quando, na realidade, os rastreios populacionais demonstram que os polimorfismos de determinados genes são susceptíveis de afectar os processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos dum elevado número de fármacos como já referido.

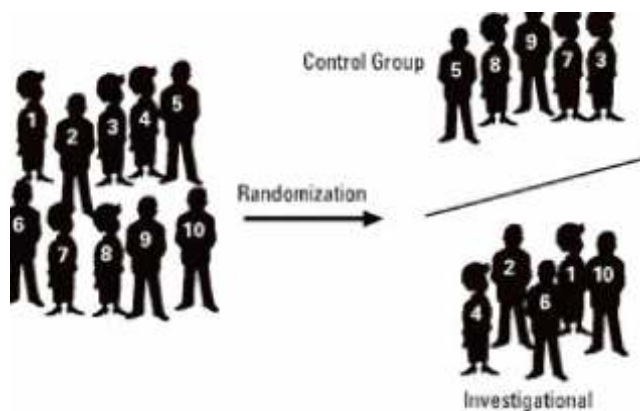
Para se comprovar em que medida estes conhecimentos da farmacogenómica podem contribuir para uma prática clínica mais segura e eficaz, torna-se necessário introduzir na planificação dos ensaios clínicos algumas modificações que tornem a amostragem dos voluntários suficientemente representativa dos principais polimorfismos que ocorrem na população em geral.

Decorre do até agora exposto, que a resposta farmacológica pode ser considerada como função dos polimorfismos susceptíveis de afectar os processos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos, além doutros factores não genéticos (v.g. idade, sexo, doenças, dieta, etc.). Ou seja

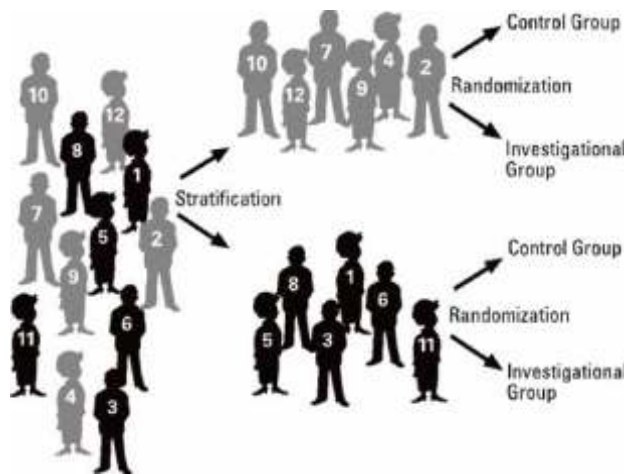
$$\text{Eficácia/Toxicidade} = f(\text{polimorfismos farmacocinéticos} + \text{polimorfismos farmacodinâmicos} + \text{factores extragenéticos})$$

Do exposto conclui-se pelo eventual interesse em introduzir, nos ensaios clínicos, a partir da fase I, a informação do perfil genético dos voluntários (tipo de metabolizador, p.ex.). Nomeadamente quando os estudos pré-clínicos fazem pressupor a influência dos factores genéticos na biotransformação ou na farmacodinamia do fármaco sob investigação.

A prévia selecção de voluntários para ensaios clínicos com dupla ocultação, por aleatorização, sem consideração dos respectivos perfis genéticos foi prática comum até ao advento da farmacogenómica (Fig.1).



Quando seja previsível a influência de factores genéticos na farmacocinética e/ou farmacodinâmica do medicamento sob investigação, justifica-se uma prévia estratificação dos sujeitos da investigação, através da qual se torne possível confirmar (ou não) a importância desses factores na resposta farmacológica (Fig.2).



Assim, a estratificação dos voluntários justifica-se quando se conhece que na primeira etapa do metabolismo do fármaco, participa uma isoenzima CYP450 com apreciável grau de polimorfismo expresso por fenótipos de metabolizadores rápidos ou ultra-rápidos, normais, intermédios ou lentos. Nomeadamente, quando factores extra-genéticos (v.g. dieta, outros fármacos, doenças) não interferiram apreciavelmente com a expressão dos genes.

Por consequência a genotipagem e/ou fenotipagem prévia dos voluntários participantes nos ensaios clínicos, ou seja a sua estratificação justifica-se quando se presume que a eficácia ou segurança do fármaco sob investigação são susceptíveis de serem influenciadas por factores genéticos. Embora se trate duma atitude prospectiva, a referida genotipagem pode aplicar-se retrospectivamente, quando haja interesse em verificar se desvios da normalidade dos parâmetros farmacocinéticos, efeitos adversos ou situações de menor eficácia, diagnosticados durante as diferentes fases dos ensaios clínicos, numa amostragem não estratificada, estão associados a polimorfismos dos genes codificantes das proteínas envolvidas nos processos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos.

Embora a variação polimórfica das enzimas CYP450 com influência na farmacocinética seja a mais investigada, não deve ser olvidado que tal variação pode igualmente afectar as proteínas de transporte envolvidas na absorção, distribuição e excreção dos fármacos e respectivos metabólitos^[20].

Nas fases II e III dos ensaios clínicos, cujos objectivos são orientados no sentido de avaliar igualmente a eficácia e a toxicidade dos fármacos, o número de marcadores genéticos deve incluir igualmente as proteínas alvo, de acordo com os seus mecanismos de acção. Ou seja:

- variação na função ou grau de expressão do alvo terapêutico

- variação na função ou grau de expressão doutros alvos com os quais o fármaco interage

- variação doutras moléculas moduladoras da interacção fármaco/alvo na biofase

Estas variações podem ser relacionadas quer com a eficácia quer com os efeitos adversos observados.

No Quadro 3 estão indicados alguns exemplos da utilização de dados farmacogenómicos nos ensaios clínicos.

Quadro 3 - Farmacogenómica nas diferentes fases dos ensaios clínicos

Fase I	<ul style="list-style-type: none"> - A genotipagem pode contribuir para a identificação e correlação com certos fenótipos tais como as propriedades farmacocinéticas (níveis séricos, AUC) e/ou farmacodinâmicas. - Alguns voluntários com determinados genótipos poderão <i>a priori</i> ser excluídos ou incluídos preferencialmente nas fases seguintes.
Fase II	<ul style="list-style-type: none"> - A genotipagem pode servir para estabelecer correlações genótipo/fenótipo - A genotipagem pode ser útil para estabelecer a associação entre determinados polimorfismos e as diferenças da eficácia do fármaco sob investigação
Fase III	<ul style="list-style-type: none"> - Utilização dos resultados das fases I e II para planeamento do estudo em maior escala - Testar os genes sob investigação em função da eficácia e metabolismo - Os resultados nesta fase podem servir para uma genotipagem em maior escala com objectivo de descobrir novos marcadores de interesse farmacogenómico - Identificação das subpopulações (subgrupos de genótipos) com maior risco de efeitos adversos - Identificação dos genótipos dos indivíduos resistentes, <i>i.e.</i> que não respondem (menor ou nula eficácia)
Fase IV	<ul style="list-style-type: none"> - Registo de efeitos adversos raros e sua incidência em subgrupos específicos de genótipos - Investigar se é justificável criar dispositivos de diagnóstico genético para seleccionar os doentes (ou adequar as doses) por forma a evitar/diminuir a ocorrência de reacções adversas.

Adaptado de ^[21]

Em resumo, existem dois objectivos principais justificativos da utilização da análise farmacogenómica em fases adiantadas dos ensaios clínicos:

- selecção dos doentes se determinados genótipos dos doentes são critérios a considerar na decisão médica. Tal será justificado quando exista evidência suficiente de que o fármaco é mais eficaz em determinada sub-população;
- ajustamento da posologia se o genótipo é útil como indicador da posologia adequada;

Mesmo quando os doentes não são incluídos pelos seus genótipos, estes podem ser considerados numa análise retrospectiva para interpretação dos resultados obtidos. O que pode justificar novos ensaios. Por exemplo, se se verificar que num subgrupo de doentes a eficácia é menor torna-se possível proceder a uma análise genética retrospectiva para identificar a possível causa. Os genes identificados tornam-se candidatos à investigação e descoberta de novos fármacos.

Se bem que a aplicação da farmacogenómica nas fases II e III dos ensaios clínicos seja mais complexa que na fase I, as bases racionais são idênticas. A extrapolação da relação entre a variação genética, eficácia e segurança na população participante nos ensaios contribui para uma melhor compreensão de como o fármaco funcionará na população em geral.

O tratamento estatístico dos resultados deve ser adequado à definição da amostragem, quando esta é estratificada, tendo em atenção as frequências génicas^[22], tal como atrás referido.

Implicações da inclusão de dados farmacogenómicos nos protocolos dos ensaios clínicos

Apesar das limitações acima indicadas, a inclusão dos dados da farmacogenómica nos ensaios clínicos (mesmo quando limitada a marcadores relevantes para a farmacocinética) é aliciante pois tem por objectivo último chegar a uma medicina personalizada. Ou seja, talhar a terapêutica (selecção do fármaco e posologia) ao perfil genético do doente, por forma a obter o máximo benefício (eficácia) com o mínimo de risco (toxicidade). Por tal razão, algumas entidades reguladoras da aprovação de novos medicamentos têm incentivado a indústria farmacêutica no sentido de incluir os dados farmacogenómicos nos ensaios clínicos.

No entanto vários factores de ordem científica, ética, económica e social carecem duma prévia ponderação.

Considerações de ordem científica

Os ensaios clínicos constituem parte integrante da investigação clínica direccionada na recolha de informação cientificamente comprovada para a prática duma medicina baseada na evidência.

Como tal, a informação deve ser válida. A validação inclui não só a validação analítica (dos métodos e técnicas utilizados), como também a validação clínica obtida através dos ensaios clínicos.

Tal como referido, a resposta farmacológica (eficácia, toxicidade) é modulada por outros factores, além dos

genéticos. Os factores constitucionais (idade, sexo), os hábitos (dieta, estilo de vida), a exposição a tóxicos (álcool, tabaco, pesticidas, disruptores endócrinos, etc.), a comorbilidade, as interacções medicamentosas, etc., são exemplos de condições susceptíveis de modificar apreciavelmente a resposta farmacológica em termos de eficácia e toxicidade.

As enzimas metabolizadoras de fármacos, entre as quais se incluem as CYP450, têm uma especificidade suficientemente abrangente para intervir no metabolismo duma grande variedade de substratos. Como já foi mencionado, um mesmo fármaco pode ser metabolizado por mais que uma enzima ou uma enzima pode intervir no metabolismo de numerosos fármacos. De certa forma, um alelo hipofuncionante ou silencioso duma enzima, determinado por genotipagem, não significa necessariamente que o respectivo portador tenha o fenótipo de metabolizador lento. Por exemplo, a fluoxetina, a imipramina e o metoprolol são metabolizados pela CYP2D6, mas os efeitos nos doentes portadores de alelos hipofuncionantes do gene *CYP2D6* podem não ser clinicamente relevantes se existirem outras enzimas vicariantes, tal como no caso da fluoxetina e da imipramina, que são também biotransformadas pela CYP1A2.

Já as variações de actividade da CYP2C9, por exemplo, assumem interesse clínico no caso de fármacos com estreita margem de segurança, como acontece com a warfarina. Nestes casos, a monitorização dos efeitos anticoagulantes é importante, particularmente nos grupos populacionais onde as frequências de variantes polimórficas são apreciáveis (de 14% a 37% entre os caucasóides, contra 0% a 1% entre os asiáticos, por exemplo).

Também as enzimas de conjugação são susceptíveis de evidenciar mutações com frequências polimórficas variáveis em diferentes grupos étnicos. É o caso, por exemplo, da N-acetil-transferase.

Outro factor a ter em atenção é a possibilidade de indução ou inibição das enzimas metabolizantes por factores extra-genéticos exógenos ou endógenos, tais como os acima referidos. Assim, a exclusão de voluntários com perfil de metabolizadores lentos pode levar a erros de amostragem pois restringem o acesso de doentes que potencialmente seriam beneficiados com os novos fármacos.

Finalmente é de referir que muitos dos efeitos adversos são detectados somente vários anos após a introdução dos fármacos no mercado, em particular quando elevado número de doentes tenha sido tratado por longo tempo. Daí as limitações dos ensaios clínicos para prever a toxicidade a longo prazo, pois a autorização de introdução no mercado dos novos medicamentos é concedida com base nos resultados da fase III.

Implicações de ordem ética e social

Os ensaios clínicos são considerados como experiências em seres humanos, pelo que a respectiva realização deca a

obedece a normas éticas e legais muito estritas, baseadas na Declaração de Helsínquia. Com pequenas variações, estas normas têm acatamento universal, desde as instâncias internacionais até ao direito interno vigente ao nível nacional. Em Portugal devem ser respeitados os requisitos estabelecidos na Lei nº 46/2004, de 19 de Agosto, que transpõe para a ordem jurídica nacional a directiva 2001/20/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 4 de Abril.

Em termos genéricos, estas normas têm como fundamento o respeito pela dignidade dos seres humanos, consubstanciado nos princípios fundamentais da bioética: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça. Destes princípios decorrem as obrigações dos investigadores: obtenção prévia do consentimento informado dos sujeitos participantes, garantia da privacidade e confidencialidade dos dados obtidos, liberdade de desistência da participação a qualquer tempo, etc.^[28].

Para além das normas éticas aplicáveis nos ensaios clínicos em geral, as que envolvem a estratificação dos voluntários, com fundamento na genotipagem devem respeitar as prevalentes em todos os tipos de investigação genética. Deve ser assegurada a privacidade dos doentes, garantida a confidencialidade dos dados recolhidos e a não utilização dos mesmos para outros fins que não os estipulados no consentimento informado. As bases de dados devem ser invioláveis e, nos casos de ensaios clínicos multicêntricos e multinacionais, torna-se necessário o reforço da segurança das mesmas, por forma que o acesso seja restrito às entidades envolvidas na investigação, devendo estas estar vinculadas à obrigação do segredo profissional.

É importante evitar a estigmatização dos voluntários com diagnósticos que os façam sentir-se marginalizados. De igual modo deve ser dada atenção ao facto da genotipagem se referir não só ao próprio voluntário, são ou doente, mas também aos seus familiares mais directos. Finalmente, quando os ensaios incidem em grupos populacionais escolhidos pela sua localização geográfica ou pela etnicidade, é de extrema importância evitar qualquer conotação com a noção de raça^[29].

Implicações legais

A necessidade de protecção dos dados genéticos recolhidos durante os ensaios clínicos justifica-se pelas consequências que a sua divulgação pode ter na vida das pessoas envolvidas, em termos de seguros, trabalho, etc.. Por tal motivo tem-se defendido a criação de regulamentação especial que, para além de salvaguardar o direito da pessoa à sua privacidade, também estabeleça a responsabilidade legal dos investigadores na protecção desse direito^[30].

Uma vez confirmadas e validadas as associações entre a eficácia/toxicidade com determinados genótipos, as entidades reguladoras podem exigir das firmas farmacêuticas a inclusão de tal informação nos folhetos informativos (bulas) dos medicamentos, seja como precauções ou como contra-indicações para o seu uso em determinados doentes.

No Infarmed encontra-se em fase de ante-projecto o Estatuto do Medicamento, que reúne a legislação dispersa sobre as normas referentes aos medicamentos, desde a autorização de introdução no mercado até aos aspectos inerentes à sua comercialização^[31]. Estas normas devem transpor para o direito interno as directivas comunitárias no âmbito da União Europeia.

Implicações económicas

A possibilidade de selecção prévia de determinados genótipos no recrutamento de voluntários para ensaios clínicos pode contribuir para melhorar as taxas de sucesso no desenvolvimento de novos fármacos, reduzir o tempo de sua realização e, eventualmente, diminuir os custos da execução dos ensaios propriamente ditos. Nesta medida são beneficiadas as rácios risco/benefício e custo/benefício.

Contudo, na perspectiva da indústria farmacêutica, prevalece uma certa ambivalência. Por um lado existe a possibilidade de segmentação do mercado potencial. Mas, por outro, a biotecnologia farmacogenómica fornece a oportunidade de reavaliação de anteriores insucessos, na medida em que os ensaios clínicos de muitos fármacos promissores são interrompidos devido a manifestações de toxicidade ou são retirados do mercado devido a efeitos adversos inesperados, provavelmente devidos à variação genética e não propriamente à sua toxicidade intrínseca^[32].

Apesar das vantagens referidas, a inclusão dos dados farmacogenómicos nos ensaios clínicos, obtidos por novas tecnologias, aumenta os custos dos mesmos. O que muito provavelmente acaba por se reflectir nos custos finais dos medicamentos, agravando as despesas de saúde.

As implicações económicas a nível da aplicação clínica da farmacogenómica ultrapassam o âmbito do presente trabalho.

Considerações finais

Um dos domínios de aplicação da farmacogenómica é o dos ensaios clínicos. Se o seu objectivo último é adequar a medicação ao perfil genético do doente, torna-se necessário investigar, através de ensaios clínicos, a natureza dos factores que, sob controlo genético, são moduladores da resposta farmacológica.

Não obstante a informação disponível ser ainda incompleta, já é suficiente para incluir no planeamento das várias fases dos ensaios clínicos modificações destinadas a esclarecer a validade de associações entre os referidos factores e a eficácia ou toxicidade de certos fármacos. Esta validação é necessária para justificar a genotipagem prévia com objectivos de selecção do fármaco e ajustamento da posologia. Ela será tanto mais importante quanto menor for a margem de segurança terapêutica (relação dose eficaz/ dose tóxica).

Os pressupostos da farmacogenómica, vistos à luz dos resultados obtidos nos ensaios clínicos, devem contribuir para uma terapêutica medicamentosa mais eficaz e mais isenta de efeitos adversos. Daí resultam o interesse e a necessidade de incluir na formação dos profissionais de saúde, seja ao nível da pré- ou pós-graduação, as noções de

genética, biologia e farmacologia molecular, para se obter o maior e melhor proveito da revolução terapêutica em curso.

Referências

- [2] Lazarou, J., Pomeranz, B.H. & Corey, P.N. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: A meta-analysis of prospective studies. *JAMA* **279**, 1200-1205 (1998).
- [3] Motulsky, A. Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *JAMA* **165**, 835-837 (1957).
- [4] Vogel, F. Moderne Problem der Humangenetik. *Ergib Inn Kinderheild* **12**, 52-125 (1959).
- [5] Kalow, W. *Pharmacogenetics - Heredity and the Responses to Drugs*, (W.B.Saunders, Philadelphia, 1962).
- [6] Bailey, D.S., Bondar, A. & Furness, L.M. Pharmacogenomics - it's not just pharmacogenetics. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 595-601 (1998).
- [7] Goldstein, D., Tate, S. & Sisodya, S. Pharmacogenetics goes genomic. *Nature Genetics* **4**, 937-947 (2003).
- [8] Bradford-Hill, A. Medical ethics and controlled trials. *BMJ* **1**, 1043-1049 (1963).
- [9] Bradford-Hill, A. *A Short Textbook of Medical Statistics*, 7 (Edward Arnold, London, 1988).
- [10] Curley, H. et al. *Good Clinical Practice*, (John Wiley & Sons, New York, 1998).
- [11] Lindpaintner, K. The impact of pharmacogenetics and pharmacogenomics on drug discovery. *Drug Discovery* **1**, 443-469 (2002).
- [12] Grant, D.M., Goodfellow, G.H., Sugamori, K.S. & Durette, K. Pharmacogenetics of the human arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacology* **61**, 204-211 (2000).
- [13] Hayes, J. & Strange, R. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* **61**, 154-166 (2000).
- [14] Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. & McLeHan, R.A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *TIPS* **20**, 342-349 (1999).
- [15] Solus, J.F. et al. Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse populations. *Pharmacogenomics* **5**, 895-931 (2004).
- [16] Ingelman-Sundberg, M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP 2D6): clinical consequences, evolutionay aspects and functional diversity. *The Pharmacogenomics Journal* **5**, 6-13 (2005).
- [17] Korn, M.A. Special Report: Genotyping for cyochrome P450 polymorphisms to determine drug-metabolizer status. *Assessment Program* **19**, 1-33 (2004).
- [18] Furman, K.D. et al. Impact of CYP2D6 Intermediate metabolizer alleles on single-dose desipramine pharmacokinetics. *Pharmacogenetics* **14**, 279-284 (2004).
- [19] Evans, W.E. & Reiling, M.V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **286**, 487-491 (1999).
- [20] Saier Jr, M.H., Barabote, R.D. & Hiller, M.B. Transport classification database. (ed. Saier Jr, M.H.) (San Diego, Cal).
- [21] Issa, A. Ethical perspectives on pharmacogenomic profiling in the drug development process. *Drug Discovery* **1**, 300-308 (2002).
- [22] Rioux, P.P. Clinical trials in pharmacogenetics and pharmacogenomics: Methods and Applications. *Am J Health-Syst Pharm* **57**, 887-901 (2000).
- [23] Weber, W.W. Human drug-receptor variants. in *Pharmacogenetics* 240-278 (Oxford University Press, Oxford, 1997).
- [24] Johnson, J. et al. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and antihypertensive response to metoprolol. *Clin Pharmacol Ther* **74**, 299-302 (2003).
- [25] Liggett, S. Pharmacogenetics of beta-1- and beta-2 adrenergic receptors. *Pharmacology* **61**, 167-173 (2000).
- [26] Liggett, S.B. beta 2-Adrenergic receptor pharmacogenetics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 197S-201 (2000).
- [27] Fishman, M. & Porter, J. A new grammar for drug discovery. *Nature* **437**, 491-493 (2005).
- [28] Reys, L.L. Deontologia e Ética nos ensaios clínicos de medicamentos. in *J Soc Ciências Médicas de Lisboa* Vol. 102 139-143 (1988).
- [29] Garte, S. The racial genetics paradox in biomedical research and public health. in *Public Health Reports* 421-425 (2002).
- [30] Palmer, L.I. Medical liability for pharmacogenomics. in *Pharmacogenomics: Social, Ethical and Clinical Dimensions* (ed. Rothstein, M.A.) 187-205 (John Wiley & Sons, Hoboken.NJ, USA, 2003).
- [31] INFARMED. Estatuto do Medicamento - Documento de Trabalho. (2005).
- [32] Reeder, C.E. & Dickson, W.M. Economic implications of pharmacogenomics. in *Pharmacogenomics: Social, Ethical and Clinical Dimensions* (ed. Rothstein, M.A.) 229-250 (John Wiley & Sons, Hoboken.NJ, USA, 2003).