JUAN GONZALO ALIAGA GAMARRA

ESTUDO PARA A CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUBFAMÍLIA CITOCROMO P450 CYP2D6 DE VOLUNTÁRIOS SADIOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Versão original

São Paulo
2011

RESUMO

Gamarra JGA. Estudo para a caracterização Genotípica e Fenotípica da atividade enzimática da Subfamília Citocromo P450 CYP2D6 de voluntários sadios. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

As enzimas CYP450 são as principais enzimas metabolizadoras de fármacos. Elas são codificadas por genes que apresentam polimorfismos gênicos que lhes confere características fenotípicas diversas. Estes fenótipos são: Metabolizadores Lentos ou PM, Metabolizadores Normais ou EM, Metabolizadores Intermediários ou IM e Metabolizadores Ultra-rápidos ou UM. A Farmacogenética é a ciência que estuda estas variações gênicas e sua relação com a resposta terapêutica no organismo. Entre as enzimas CYP450 se encontram as enzimas CYP2D6, que são responsáveis pelo metabolismo de 25% dos fármacos clinicamente prescritos. O objetivo principal deste estudo foi a identificação dos polimorfismos mais importantes deste gene: *CYP2D6*1*, *CYP2D6*2*, *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*6*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17* e *CYP2D6*41* pelos métodos de Genotipagem (PCR Tetra Primer e Seqüenciamento) e Fenotipagem (analisado pelo Índice Metabólico) em 75 voluntários sadios da região de Campinas. Para a caracterização da Fenotipagem foi usada a substância teste Dextrometorfano (DM). Esta foi monitorada por espectrometria de massa mediante a determinação da concentração do seu principal metabólito o Dextrorfano (DX), que foi extraída das amostras de urina. Os resultados foram comparados entre estas duas metodologias e apresentaram alta correlação. Os resultados obtidos são a identificação das freqüências dos alelos *1, *3 e *4 pelo método PCR Tetra Primer (30.66%, 1.3% e 14%, respectivamente). O método de seqüenciamento detectou também outros alelos que não foram detectados pela PCR Tetra Primer. A avaliação do número de cópias do gene CYP2D6 também foi avaliada, detectando em um voluntário 3 cópias do gene *CYP2D6,* característica de metabolizadores Ultra-rápidos. Podemos afirmar que os métodos usados forneceram perfis dos polimorfismos de maneira rápida e prática.

Palavras-chaves: Polimorfismos. Citocromo P450. Metabolismo de fármacos.

ABSTRACT

Gamarra JGA. Study to Genotype and Phenotype characterization of enzymatic activity of Subfamily Cytochrome P450 CYP2D6 of health volunteers. [Ph. D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The CYP450 enzymes are the major drug metabolizing enzymes. They are encoded by genes that show genetic polymorphisms which gives them several phenotypic characteristics. These phenotypes are Poor Metabolizers or PM, or Extensive Metabolizers or EM, Intermediate Metabolizers or IM, and finally, Ultra-rapid Metabolizers or UM. Pharmacogenetics is the science that studies these genetic variations and its relationship to therapeutic response in the body. One of CYP450 enzymes is CYP2D6 enzyme, which are responsible for the metabolism of 25% of clinically prescribed drugs. The main objective of this study was to identify the most important polymorphisms of this gene: CYP2D6 * 1, CYP2D6 * 2, CYP2D6 * 3, CYP2D6 * 4, CYP2D6 * 5, CYP2D6 * 6, CYP2D6 * 10, CYP2D6 * 17 and CYP2D6 * 41 by genotyping methods (PCR Tetra Primer and Sequencing) and phenotyping (by metabolic rate monitoring) in 75 healthy volunteers in Campinas region. To characterize the phenotyping was used to test substance Dextromethorphan (DM). This was monitored by mass spectrometry by determining the concentration of its major metabolite the Dextrorphan (DX), which was extracted from urine samples. The results were compared between these two methods and showed high correlation. We can obtain the identification of allelic frequencies of alleles * 1, * 3 and * 4 by Tetra Primer PCR (30.66%, 1.3% and 14% respectively). The sequencing method has also detected other alleles that were not detected by PCR Tetra Primer. The assessment of the number of copies of the *CYP2D6* gene was also assessed. This method detected a volunteer which carrying three copies of CYP2D6 gene, characteristic of Ultra-rapid metabolizers. We can say that the methods used in this study provide polymorphism profiles quickly and conveniently.

Keywords: Polymorphisms. Cytochrome P450. Drug metabolism.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos evolutivos

As enzimas monoxigenases Citocromo P450 ou CYP450 (do inglês *Cytochrome P450*) são parte de uma enorme família ou "superfamília" de enzimas microssomais que, acredita-se, existem há 3.5 bilhões de anos. Organismos primários, provavelmente, usaram estas enzimas para metabolizar ou sintetizar moléculas esteróides importantes para a integridade da sua membrana celular[1]. Estas enzimas são encontradas em diversos organismos, incluindo bactérias, plantas e animais, implicando a existência de um ancestral comum antes da divergência eucariota-procariota[2]. Estas enzimas apresentam, principalmente, duas funções importantes: a biossíntese de compostos endógenos (xenobióticos) e o metabolismo de fármacos. Para poder realizá-las, elas utilizam os elétrons provenientes da molécula nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) ou, algumas vezes, a partir de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) para a ativação de oxigênio molecular. A sua capacidade de ativar o oxigênio molecular e posteriormente de inserir um átomo de oxigênio em um substrato foi explorado por muitos organismos para diversos propósitos[2].

A função de metabolizar compostos exógenos apareceu, provavelmente, há 400 a 500 milhões de anos e, acredita-se, que esta função foi desenvolvida para a detoxificação celular de compostos químicos de origem vegetal tais como alcalóides, entre outros[1].

As enzimas CYP450 são os agentes oxidantes mais poderosos *in vivo*, capazes de realizar a oxidação de uma grande variedade de substratos química e biologicamente não relacionados[3, 4, 5]. Acredita-se que estas enzimas humanas estão envolvidas na oxidação de 70-90% dos fármacos utilizados clinicamente, e também participam do metabolismo de um vasto número de agentes químicos como carcinogênicos e pesticidas[6]. Algumas das CYP450 são extra-hepáticas e têm importante função em diversas vias de síntese, incluindo a biossíntese de esteróides nas glândulas supra-renais e a biossíntese de prostaciclinas e tromboxanos entre outros compostos[7, 8].

A maioria dos fármacos lipossolúveis (hidrofóbicos) que ingressa em nosso organismo sofre dois processos de eliminação bem conhecidos, a excreção e o metabolismo. Os principais órgãos através dos quais os fármacos e seus metabólitos são removidos do corpo

são os rins, o sistema hepatobiliar e os pulmões[9, 10]. Outros órgãos com capacidade metabólica significativa incluem o trato gastrintestinal, pâncreas, cérebro, pulmão, glândulas adrenais, rins, medula, mastócitos, pele, ovários e testículos[11]. Os compostos hidrofóbicos não são eliminados eficientemente pelo rim. Portanto, a maioria dos fármacos lipofílicos é convertida a produtos mais polares (com maior hidrossolubilidade), posteriormente são excretadas na urina. O metabolismo destes compostos ocorre principalmente no fígado pelo sistema enzimático CYP450[12], e por outras enzimas não microssomais[9].

1.2 Metabolismo de fármacos

O metabolismo dos fármacos envolve duas classes de reações bioquímicas, de Fase I e de Fase II que acontecem, principalmente, no fígado. Alguns destes fármacos também são metabolizados no plasma, pulmão ou no intestino. As reações de fase I se caracterizam por aumentar a polaridade dos compostos lipofílicos e, geralmente, consistem de reações químicas como oxidação, redução e hidrólise, e os produtos são, com freqüência, mais reativos e, paradoxalmente, mais tóxicos ou mais carcinogênicos que os fármacos originais[13, 14,15]. As reações de fase II envolvem a conjugação (glicuronidação, sulfonação, entre outros, e inclusive a adição de aminoácidos) que, geralmente, resultarão em compostos inativados. Com freqüência, as reações da fase I introduzem um grupo relativamente reativo, como por exemplo, o grupo hidroxila, na molécula (processo chamado de funcionalização). Posteriormente, este grupo funcional serve como ponto de ataque para o sistema de conjugação, fixando um substituinte como glicuronídeo. Em geral, ambas as etapas diminuem a lipossolubilidade, aumentando assim a eliminação renal do fármaco[9, 10, 15].

Muitas enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo de fármacos –incluindo as CYP450- encontram-se no retículo endoplasmático liso e são conhecidas como enzimas microssomais. Para atingir essas enzimas metabolizadoras, o fármaco precisa atravessar a membrana plasmática do hepatócito. As moléculas polares fazem isso mais lentamente do que as moléculas não polares, exceto quando existem mecanismos específicos de transporte, de modo que o metabolismo hepático é, em geral, menos importante para fármacos polares que para os lipossolúveis. A excreção se dá, em maior proporção, do fármaco na forma inalterada na urina que do seu metabólito[9].

1.3 Enzimas Citocromo P450

As enzimas CYP450 são proteínas monooxigenases que possuem um grupo heme e possuem propriedades redox únicas, as quais são fundamentais para as suas diversas funções. Compreendem uma superfamília de enzimas relacionadas, porém distintas, que diferem uma da outra pela seqüência de aminoácidos, na regulação por inibidores e agentes indutores e na especificidade das reações que catalisam[16, 17]. Todas estas enzimas são produtos da mesma superfamília de genes[18]. A purificação das enzimas P450 e a clonagem de cDNA formam o esqueleto do atual sistema de classificação, que é baseada nas semelhanças das seqüências de aminoácidos[19].

O seqüenciamento do genoma humano mostrou a presença de 57 genes funcionais e 58 pseudogenes[20, 21] dispostos em 18 famílias (enzimas que compartilham uma identidade ≥ de 40%) e 42 subfamílias (enzimas que compartilham uma identidade ≥ 55%). São três famílias principais (Famílias 1, 2 e 3) as responsáveis pelo metabolismo de fármacos terapêuticos[11, 22].

A nomenclatura das CYP450 que é usada por convenção é a que seguiremos neste trabalho. Usaremos como exemplo a denotação do gene *CYP2D6*4*. Aqui observamos a sigla CYP, esta se refere ao citocromo P450. Logo continua o número 2 que significa o número da família, depois prossegue a letra D que identifica a subfamília, seguido do número 6 que indica a isoenzima 6. A continuação vem o símbolo estrela (asterisco) que indica uma variante alélica, é seguido de um número correspondente à variante alélica, neste exemplo 4[23].

As diferentes isoformas das enzimas CYP450 variam em abundância dentro do fígado, embora as proteínas CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 estão envolvidos em 70 – 80% de todas as oxidações metabólicas de Fase I dos fármacos clinicamente prescritos[6, 24].

1.4 Farmacogenética e Polimorfismos de DNA

A farmacogenética é a ciência que estuda a existência de variações nas seqüências de DNA que possam alterar a maneira como o nosso organismo responde ao tratamento com

fármacos. De maneira geral, estas variações podem acontecer em genes que codificam para transportadores de fármacos, enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos ou a proteínas que estão relacionados com o alvo de fármacos[25]. A farmacogenética ostenta o potencial de identificar um fármaco em particular e a dose deste que será o mais adequado para se obter um efeito terapêutico bem sucedido para cada paciente. Este é um dos principais objetivos da moderna terapia com fármacos, a qual é descrita como a "medicina personalizada"[26, 27].

Em todos os organismos ocorrem variações naturais na seqüência do DNA do genoma. Foi estimado que em seres humanos diferenças de nucleotídeos entre indivíduos podem ser detectadas mais ou menos a cada 200 nucleotídeos. Essas variações na seqüência do DNA são conhecidas como *polimorfismos.* A definição do termo polimorfismo foi mudando com o decorrer do tempo. Em 1971 se definia como alguma situação onde os membros de uma população podem apresentar distintos fenótipos, onde os fenótipos têm uma apreciável incidência maior que 2%[28]. Atualmente, o termo polimorfismo é usado para descrever variantes alélicas que são detectadas em mais de 1% da população[29].

A origem dos polimorfismos se deve a existência de mutações espontâneas ou não na seqüência de DNA, sendo que algumas destas mutações ocorrem nas seqüências codificadoras, levando à produção de seqüências protéicas defeituosas. Outras ocorrem em seqüências não-codificadoras que, geralmente, não afeta a expressão gênica. Em muitos organismos e incluindo seres humanos, os polimorfismos parecem estar associados a mudanças em apenas uma base (chamados de SNPs do inglês *Single Nucleotide Polymorphism* ou polimorfismo de um único nucleotídeo), e geralmente próximos aos sítios com seqüência do dinucleotídeo CG. Conseqüentemente, sítios de clivagem de enzimas de restrição que contenham esse dinucleotídeo são geralmente polimórficos, podendo ser facilmente detectadas e amplificadas pela técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando seqüências de DNA franqueadoras específicas como iniciadoras (*primers*). Por outro lado, seqüências repetidas polimórficas darão origem a variantes alélicas diferentes e, portanto, serão de uso mais geral no mapeamento de *loci* de doenças[30, 31, 32].

Todos os genes que codificam para as diversas enzimas CYP450 das famílias 1 a 3 são polimórficos, mas os genes polimórficos clinicamente mais importantes são *CYP2C9*, *CYP2C19* e *CYP2D6* sendo que os genes *CYP1A1* e *CYP2E1* são relativamente menos

polimórficos no ser humano[33]. Este polimorfismo gênico gera respostas interindividuais diversas devido à constante exposição a agentes químicos na população, causando em muitos casos, vários tipos de patologias. Devido principalmente à grande abrangência das diferentes enzimas CYP450 a seus substratos são usados no tratamento de depressão, pânico, psicose, desordens gastrintestinais e/ou úlceras, câncer, desordens cardiovasculares e epilepsia[17].

As mutações nos genes *CYP450* podem codificar para enzimas com atividades nula, reduzidas, alteradas ou incrementadas. A atividade nula geralmente é observada quando o gene é deletado, mas também por diversas causas como amadurecimento do mRNA (*splicing*) alterado, códons de parada, sítios de início transcricional abolido e trocas para aminoácidos deletérios. A atividade reduzida é observada quando há uma mutação nos sítios de reconhecimento de substrato, causando a síntese de enzimas com especificidade alterada para o substrato, este fenótipo é também evidenciado quando acontece uma mutação no sítio de dobragem ou *folding*. O incremento da atividade é observado em pacientes que carregam uma ou mais cópias de um gene ativo da *CYP450*[33]. A evidência deste polimorfismo significa que a capacidade metabólica do sistema das enzimas CYP450 não é igual em todos os indivíduos de uma população. Como resultado disto, os índices de conversão metabólica e de excreção dos fármacos varia entre indivíduos em condições que vão desde extremamente lento até ultra-rápidos[16, 22, 34].

De acordo a uma classificação convencional de fenótipos baseados na aceitação das relações de dominância e recessividade alélicas, sendo que o fenótipo é determinado pelo haplótipo (combinação completa de polimorfismos em um cromossomo) mais eficiente do genótipo[35]. Podem ser identificados quatro fenótipos mediante o uso de técnicas de genotipagem: Metabolizadores Lentos (PM de *poor metabolizers*) são aqueles que carecem da enzima funcional; metabolizadores intermediários (IM de *intermediated metabolizers*) que são heterozigotos para um alelo deficiente ou carregam dois alelos que causam atividade reduzida; metabolizadores extensivos ou normais (EM de *extensive metabolizers*) que têm dois alelos selvagens; e Metabolizadores ultra-rápidos (UM de *ultrarapid metabolizers*) que têm duas ou mais cópias do mesmo gene funcional com atividade intensa, uma característica de herança dominante[17, 21]. Para as pessoas que apresentam o fenótipo PM, o tratamento com doses normais causará aumento das concentrações plasmáticas do metabólito atingindo até níveis tóxicos, observando-se, portanto, um acúmulo do fármaco no organismo, podendo

causar sérias conseqüências[36]. No grupo de pessoas que apresentam o fenótipo UM, o tratamento com doses normais de um fármaco não atingirá o efeito farmacológico esperado, pois este será metabolizado muito rapidamente, impossibilitando o sucesso terapêutico. Isto pode ser observado na Figura 1, onde a relação genótipo-fenótipo e suas conseqüências farmacocinéticas e clínicas são mostradas[37].

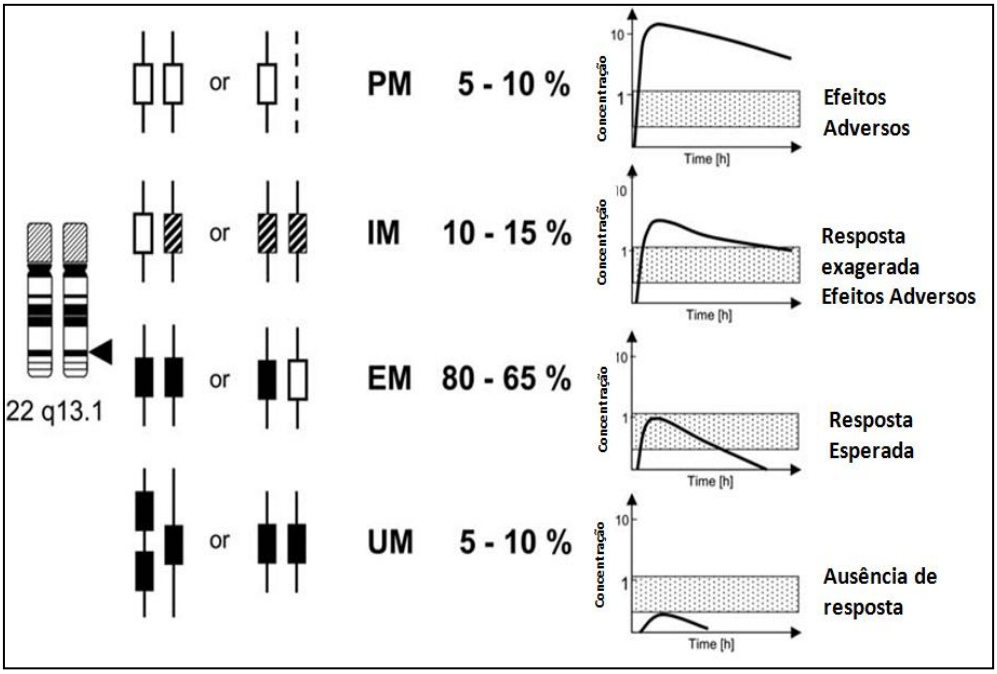


Figura 1. Esquema onde se evidencia a forte relação genótipo-fenótipo. A partir do esquema do cromossoma humano onde se localiza o gene *CYP2D6*, se observam os alelos e suas possíveis combinações que podem evidenciar um fenótipo específico. Alelos nulos são representados com caixas brancas, alelos funcionais normais com caixas pretas e alelos com função alterada com caixas riscadas. O porcentual de cada fenótipo é de uma população caucasiana.
Fonte: Adaptado de Zanger, 2004.

1.5 Genotipagem

Aproximadamente 20 – 25% do metabolismo de todos os fármacos da fase I são realizados pela enzima CYP2D6[21] (Figura 2). O gene *CYP2D6* está localizado no cromossomo 22q13.1. O lócus contém dois pseudogenes vizinhos, *CYP2D7* e *CYP2D8* formando um *cluster*. A evolução do lócus *CYP2D* envolveu a eliminação de três genes e a inativação de dois (*CYP2D7* e *CYP2D8*) e a parcial inativação de um gene *CYP2D6*[38].

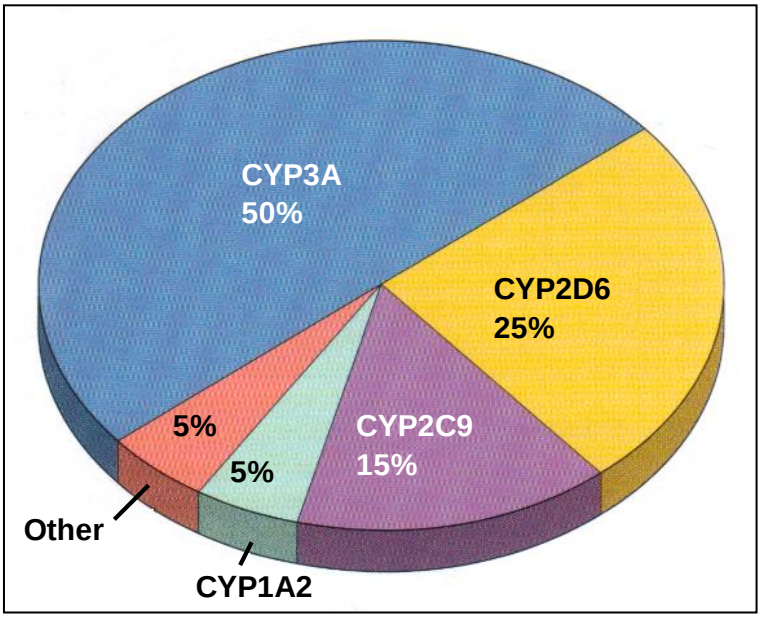


Figura 2. Diversos Genes *CYP450* e seu porcentual de metabolismo de fármacos mais prescritos clinicamente nos Estados Unidos de América.

Na atualidade, 74 alelos polimórficos diferentes do gene *CYP2D6* foram descritos na literatura. O gene consiste de 9 éxons e 8 íntrons, com uma seqüência de leitura aberta ou ORF (do inglês *Open reading Frame*) de 1491 pares de bases que, por sua vez, codificam para um polipeptídeo de 497 aminoácidos[21]. A enzima é parte de uma pequena porcentagem de todas as CYP450 hepáticas (2 – 4%), porém seu papel no metabolismo de fármacos é muito maior do que sua porcentagem relativa[21, 35]. Antes da cristalização da CYP2D6, a idéia que se tinha sobre a sua estrutura era baseada na estrutura tridimensional do citocromo P450 BM-3 ou CYP2C5. Porém, o uso de algumas técnicas como mutação sítio dirigida e também aleatória mostraram que elas mantinham muitas diferenças moleculares entre si[14,38]. Contudo, em 2006 foi publicada a cristalização desta enzima em humanos[39]. A expressão foi realizada em modelo bacteriano *(Escherichia coli)*, e a análise cristalográfica revelou aspetos desconhecidos na época. A enzima CYP3A4 apresenta maior afinidade por muitos substratos, geralmente atribuído a sua grande cavidade de sítio de ligação, a CYP2D6 reconhece só substratos que contenham nitrogênio básico protonado e um anel aromático planar. Esta característica é encontrada em grande número de fármacos do sistema nervoso central e Sistema cardiovascular, que agem na superfamília de proteínas de receptores acoplados a proteínas G. Portanto, antes desta publicação, o que se tinha como referência de estrutura da CYP2D6 era pela comparação com isoformas cristalizadas de CYP2C e CYP3A4, que mostravam uma homologia de 40% e 18%, respectivamente (Figura 3)[39]. Hoje se sabe que a

reação de hidroxilação das CYP2D6 acontecem a uma distância de aproximadamente 5 a 7 Å[17, 37]. Atualmente existem trabalhos *in silica* de modelos computacionais desta enzima que visam poder fazer previsões de sítio metabólico para substratos novos[40].

Um aspecto importante que diferencia esta enzima das outras CYP450 é o fato de não ser regulado por nenhum agente ambiental e não é induzível por nenhum hormônio. Outra característica foi a respeito do fenótipo deste gene em sujeitos que carecem da enzima e entre sujeitos com inclusive 13 cópias do mesmo gene, isto leva a concluir que a CYP2D6 não tem uma função endógena importante. Para muitos fármacos, especialmente os psicotrópicos, se considera a CYP2D6 como uma enzima de alta afinidade e de baixa capacidade, isto implica que esta enzima metabolizará, preferencialmente, os fármacos a concentrações mais baixas[38].

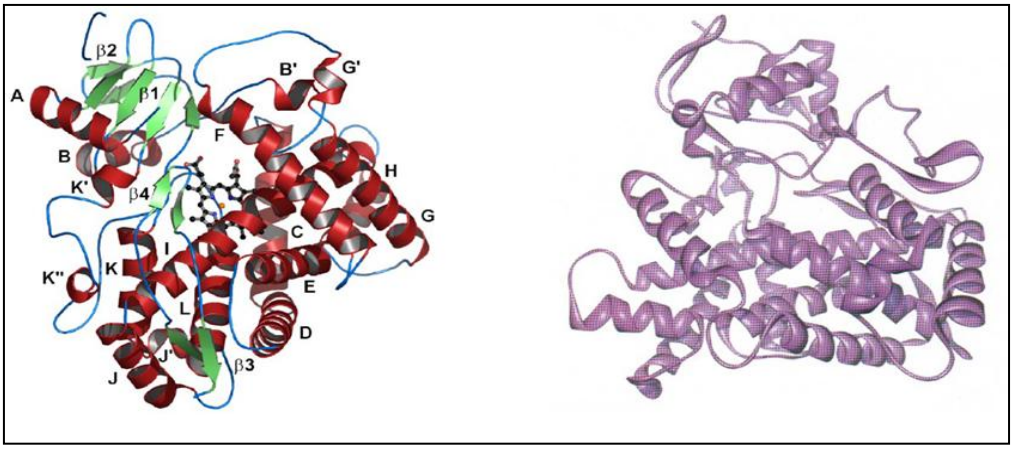


Figura 3. Diagramas representando dois modelos cristalográficos. À esquerda, a estrurura da enzima CYP2D6, à direita a estrutura da enzima CYP2C9. Nota-se a diferença entre as duas estruturas, especialmente do sítio de ligação de substrato, sendo da enzima CYP2D6 menor em tamanho.
Fonte**:** Adaptado de Rowland, 2006.

Com o decorrer do tempo, desenvolveram-se várias técnicas que permitem identificar o polimorfismo dos genes *CYP450*. Estas técnicas são usadas para caracterizar o polimorfismo de um único nucleotídeo ou para detectar variantes alélicas em amostras de DNA genômico de humanos. Estas técnicas incluem: seqüenciamento direto, métodos baseados na extensão de *primers* (*primer extension*), métodos de hibridação (que incluem "*Chips"* de DNA de vários tipos) e, análise com enzimas de restrição entre outras[41]. As técnicas mais utilizadas são: Estudos de restrição por Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição ou RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), geralmente

depois de ter amplificado uma região específica de um dos genes da P450 pela técnica PCR, amplificação de um alelo específico pelas técnicas ARMS (*The amplification refractory mutation system* em inglês) e Tetra Primer[42, 43, 44, 45] que permitem genotipar polimorfismos de nucleotídeos pontuais, a técnica de Multiplex PCR[46] e a técnica de Real Time PCR[47, 48]. Atualmente, têm sido desenvolvidas técnicas que permitem analisar muitos SNPs e de vários genes *CYP450* ao mesmo tempo, usando técnicas de espectrometria de massa MALDI-TOF[49] (do inglês, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight) e que já foi usada para a análise de 50 SNPs dos genes *CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 e CYP1A2*[50].

Existe correlação entre as diferenças étnicas e a distribuição dos fenótipos EM, PM e UM. Os PM estão presentes em aproximadamente 5 – 14% dos caucasianos. Em asiáticos, africanos e afro-americanos tem uma alta porcentagem de diminuição de função ou sem nenhuma função (entre 40% e 50%) do que dos caucasianos (26%) para a enzima CYP2D6. Os fenótipos UMs apresentam uma duplicação completa funcional do alelo *CYP2D6*, que resulta em maiores níveis de enzimas CYP2D6. Devido a estes níveis enzimáticos maiores, os UMs precisam de uma dose maior para manter um nível terapêutico do fármaco no sangue. Os UMs são geralmente raros e representam 1–3% da população caucasiana[11, 17].

Em um estudo realizado por Sistonen et al. em 2007, foram genotipados 1060 indivíduos de diferentes regiões do planeta, agrupados em oito regiões geográficas: África subsaariana, África do norte, Oriente médio, Europa, Ásia central/sul, Este da Ásia, Oceania, e América. Eles analisaram um grande número de haplótipos do gene *CYP2D6* (*1, *2, *3, *4, *5, *6, *9, *10, *17, *29, *39 e *41, assim como o número de cópias destes genes. Os resultados mostraram que Europa apresentava uma grande freqüência de fenótipo PM (8%), e foi o único continente que apresentou uma distribuição bimodal. Nos outros casos a distribuição foi unimodal, mas a única característica comum foi a predominância do fenótipo EM. O segundo maior grupo metabólico em América do Norte, Oceania, foi o fenótipo UM (40, 26, 12 e 8%, respectivamente). Ademais, indivíduos da Oceania e americanos se enquadraram nos fenótipos UM ou EM, que prevê alta capacidade metabólica, enquanto o fenótipo PM foi completamente ausente. As variantes alélicas comuns de função diminuída, tais os casos dos alelos *10, *17 e *41, mostraram um número maior de fenótipo IM no Este da Ásia, África e Oriente Médio quando comparados a outras regiões, um fato já conhecido

mas, a genotipagem do haplótipo *41 permitiu identificar um número relevante de fenótipos IM no Oriente Médio[35] (Figura 4) .

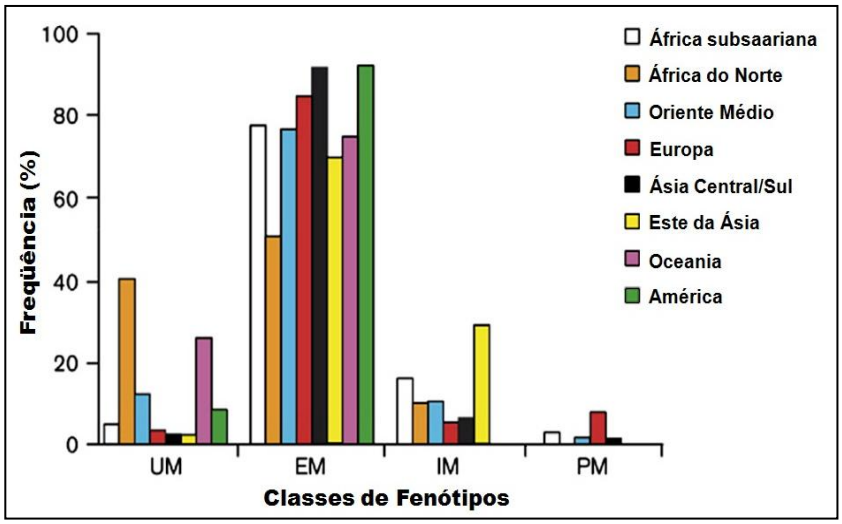


Figura 4. São mostradas as freqüências das classes de fenótipos em diferentes regiões geográficas. Os fenótipos foram previstos a partir dos genótipos. UM: Metabolizadores ultrarápidos; EM: Metabolizadores Normais ou completos; IM: Metabolizadores intermediários; PM: Metabolizadores lentos.
Fonte: Adaptado de Sistonen, 2007

As variantes alélicas nulas que não codificam para uma enzima funcional e que não apresentam nenhuma atividade enzimática residual detectável e que se correlacionam com o fenótipo PM são *3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *13, *14, *15, *16, *18, *19, *20, *21, *38, *40, *42, *44, *56 e *62. Sendo que os alelos *3, *4, *5 e *6 compreendem quase 97% dos alelos que causam o fenótipo PM em caucasianos[21].

O alelo *2 apresenta duas mutações, a primeira na posição 1661 do íntron 3, trocando a G por C (1661G>C) e a segunda na posição 2850 do íntron 6, trocando a C por T (2850C>T). Apresenta uma troca de C por G na posição 1548 (1548C>G), e esta mudança leva a substituição de dois aminoácidos, um na posição 296 (mRNA) de Arginina para Serina (R296C), a segunda na posição 486 (mRNA) de Serina para Treonina (S486T).

O alelo *3 contém uma deleção de Adenina (A) na posição 2549 do éxon 5, levando a uma ruptura do marco de leitura do mRNA, sem a produção da enzima. O impacto funcional deste alelo ainda é desconhecido.

O alelo *4 tem uma freqüência de 22%, e em algumas populações como a sueca, representa 75% dos alelos mutantes. Entretanto, apresenta uma baixa freqüência na população chinesa (~1%) e africana (3,9%). Este alelo apresenta uma mutação na posição 100, trocando a citosina (C) pela timina (T) (C>T) e também outra mutação na posição 4180, trocando a guanina (G) por C (4180G>C).

O alelo *5 se refere à deleção do gene inteiro e sua freqüência (4–7%) é similar em diferentes grupos étnicos. Este alelo é o segundo alelo de inativação mais comum na população do Reino Unido e a freqüência nas populações caucasianas é de 4%.

O alelo *6 apresenta uma deleção na posição 1707 que impede a formação da enzima.

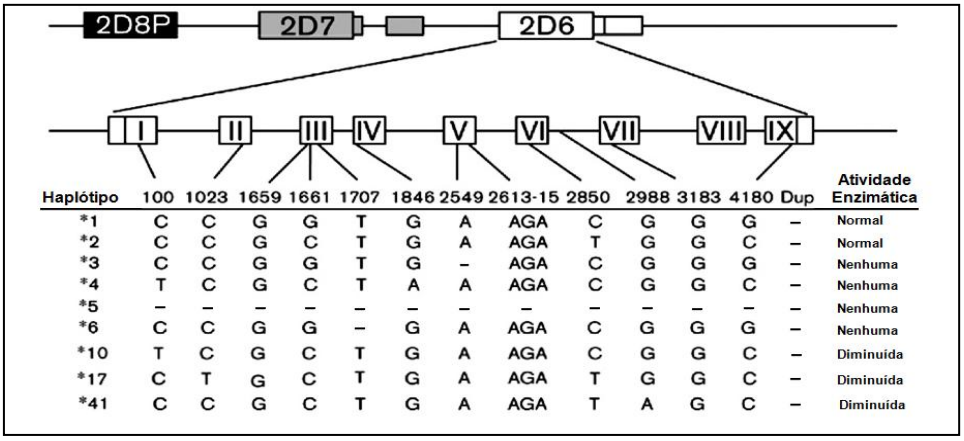
Os alelos *10, *17, *41 apresentam uma atividade significativamente diminuída atribuída a uma pouca estabilidade da enzima, alteração no reconhecimento do substrato e a diminuição da afinidade enzima-substrato. A mudança da atividade enzimática pode ser substrato-dependente como é o caso do alelo *17.

Geralmente os indivíduos apresentam um fenótipo PM ou IM. O alelo *10 acontece em 33–43% dos asiáticos, incluindo japoneses, coreanos e chineses e residentes das ilhas do pacífico. No entanto, este alelo apresenta uma baixa freqüência em caucasianos, afro-americanos e outros grupos populacionais como índios e ameríndios (2 – 5 %). Sujeitos homozigotos *10/*10 precisam de doses menores de fármacos como metoprolol do que sujeitos homozigotos selvagens *1/*1 para poder atingir o mesmo efeito terapêutico.

O alelo *17 apresenta freqüências altas em africanos e afro-americanos, mas é praticamente ausente em caucasianos. As freqüências são variáveis, dependendo do país de origem, sendo de 34% para residentes de Zimbábue, 17 para os de Tanzânia, 28% para os Ganeses e 9 % para os etiopianos. Mais de 10% de zimbabuenses são homozigotos para este alelo.

O alelo *41 é uma variante do alelo *2, também apresenta uma troca de C por G na posição 1548 (1548C>G), e esta mudança leva a substituição de dois aminoácidos, um na posição 296 (mRNA) de Arginina para Cisteína (R296C), a segunda na posição 486 (mRNA) de Serina para Treonina (S486T). Dois estudos recentes têm demonstrado que a substituição 1548C>G se encontra em desequilibrio de ligação com o polimorfismo 2988G>A, ocasionando um *splicing* defeituoso do mRNA. No entanto, os indivíduos homozigotos para

CYP2D6 são fenotipicamente similares a IMs com um único alelo deficiente. Os alelos *CYP2D6*2* e *CYP2D6*41* são os haplótipos mais comuns que apresentam duplicação e multiduplicação, como resultado de pressão seletiva, que pode haver acontecido na África do Norte[21]. A Figura 5 mostra um esquema com os diferentes sítios de mutação, analisados neste estudo, correlacionados com seus respectivos haplótipos e, ainda, o efeito que elas causam na atividade enzimática[35].



Haplótipo	100	1023	1659	1661	1707	1846	2549	2613-15	2850	2988	3183	4180	Dup	Atividade Enzimática
*1	C	C	G	G	T	G	A	AGA	C	G	G	G	–	Normal
*2	C	C	G	C	T	G	A	AGA	T	G	G	C	–	Normal
*3	C	C	G	G	T	G	–	AGA	C	G	G	G	–	Nenhuma
*4	T	C	G	C	T	A	A	AGA	C	G	G	C	–	Nenhuma
*5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Nenhuma
*6	C	C	G	G	–	G	A	AGA	C	G	G	G	–	Nenhuma
*10	T	C	G	C	T	G	A	AGA	C	G	G	C	–	Diminuída
*17	C	T	G	C	T	G	A	AGA	T	G	G	C	–	Diminuída
*41	C	C	G	C	T	G	A	AGA	T	A	G	C	–	Diminuída

Figura 5. Esquema das variantes alélicas do gene CYP2D6 com suas respectivas atividades enzimáticas. Mostra-se somente os haplótipos analisados neste trabalho.
Fonte: Figura adaptada de Sistonen, 2007.

A Figura 6 mostra um esquema onde se comparam os alelos *CYP2D6*1* (selvagem) e o alelo *CYP2D6*2*. Notam-se, ainda, as substituições ou trocas de aminoácidos no alelo *2.

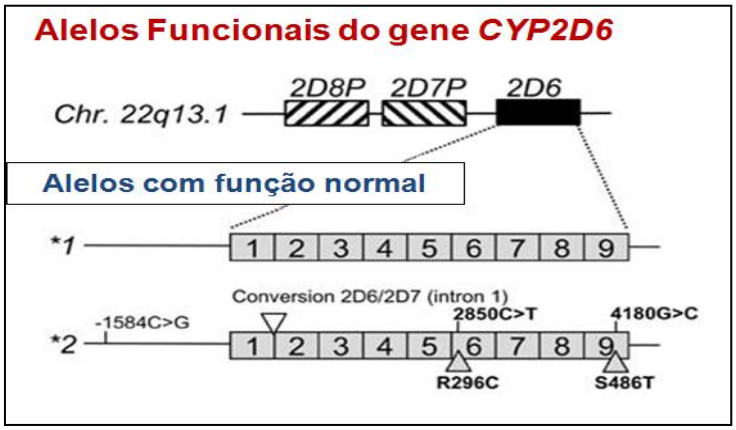


Figura 6. Esquema do gene CYP2D6*1 (selvagem) e o alelo *2. Observam-se as substituições de Arginina por Cisteína (R296C) e Serina por Treonina.
Fonte: Figura adaptada de Zanger, 2004

1.6 Fenotipagem

O procedimento mais comum de fenotipagem é a determinação do índice metabólico (MR do inglês *Metabolic Ratio*), que é o índice das quantidades do fármaco inalterado e o metabólito fármaco que aparece na urina durante um intervalo de tempo, após a administração de uma única dose da substância teste[37]. Em estudos de populacionais, o MR é uma medição sensível de polimorfismos, que é baseado de maneira inversa a sua depuração plasmática (ou *clearance*, em inglês), demonstrado por considerações teóricas por Jackson e outros[51].

A determinação do fenótipo do gene *CYP2D6* foi amplamente estudada em farmacogenética clínica. Os fármacos debrisoquina, esparteína, metoprolol e dextrometorfano (DM), entre outros, têm sido usados tradicionalmente como substância teste ou *probe* para medir a atividade da CYP2D6 *in vivo* e *in vitro*. DM [D-(+)-3-methoxy-17-methyl-(9α,13α,14α)-morphinan] é um antitussígeno não-narcótico de ação central, administrado por via oral e amplamente prescrito como hidrobrometo de DM. O DM está estruturalmente relacionado ao opióide morfínico levorfanol, possui sítios de ligação no Sistema Nervoso Central tais como os receptores N-metil-D-aspartato e os receptores sigma. Na clínica médica, ele é usado para atenuar a tolerância analgésica produzida pela substância morfina, pois não causa dependência. Este fármaco é metabolizado em seu metabólito ativo dextrorfano (DX), portanto este fármaco é um pró-fármaco[10]. Ele é bem absorvido pelo sistema digestivo e não se liga às proteínas plasmáticas. Seus efeitos adversos do DM são muito raros e sua toxicidade é muito baixa. Dado que a debrisoquina e a esparteína estão disponíveis somente em um número limitado de mercados e algumas vezes eles causam efeitos colaterais, o DM parece ser a substância de escolha que muitos laboratórios utilizam como substância teste para determinar o fenótipo do *CYP2D6*[52].

Embora as concentrações dos compostos parentais e dos metabólitos podem ser determinadas em diferentes fluídos biológicos (por exemplo, plasma e saliva), seu índice metabólico (DM/DX) na urina é o método mais freqüentemente usado para avaliar o metabolismo da CYP2D6 *in vivo*. Alguns estudos sugerem que existe uma boa correlação nos resultados da medição do índice metabólico nestes diferentes tecidos[53]. Em um estudo mais recente foi levantada a hipótese que as proporções metabólicas urinárias não refletiriam o *clearance* oral do DM[54]. Desta maneira, a razão metabólica urinária DM/DX é rotineiramente

aplicada para segregar as populações em dois grupos principais de fenótipos: Completos (EM do inglês *Extensive Metabolizer*) e Lentos[46] (PM do inglês Poor Metabolizer). É consenso o uso do anti-modal com valor de 0.3, que é o ponto de corte entre EMs e PMs. Valores maiores ou iguais a 0.3 são característicos de pessoas com fenótipo PM, valores menores de 0.3 consideram-se como fenótipo EM. A razão DM/DX pode ser medida na urina pelos métodos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês High Performance/Pressure Liquid Chromatography), Cromatografia de Gás Líquido/Sólido (GC), entre outros[55, 56].

A principal enzima que catalisa a *O*-desmetilação do dextrometorfano é a CYP2D6[57], gerando seu principal metabólito o DX[55, 58]. Mas esta via não é a única, existe outra via de metabolismo do DM, mediado por CYP3A3/4, CYP3A5, CYP2A7, CYP2C9 e CYP2C19. Todas elas catalisam a biotransformação de DM a 3-metoximorfina (MM) que é um composto inativo, via *N*-desmetilação. Ambas a DX e a MM são desmetiladas a 3-hidroximorfina (HM) a qual é excretada na urina, principalmente conjugado com glicuronídeo[21, 52, 53], isto é mostrado na Figura 7.

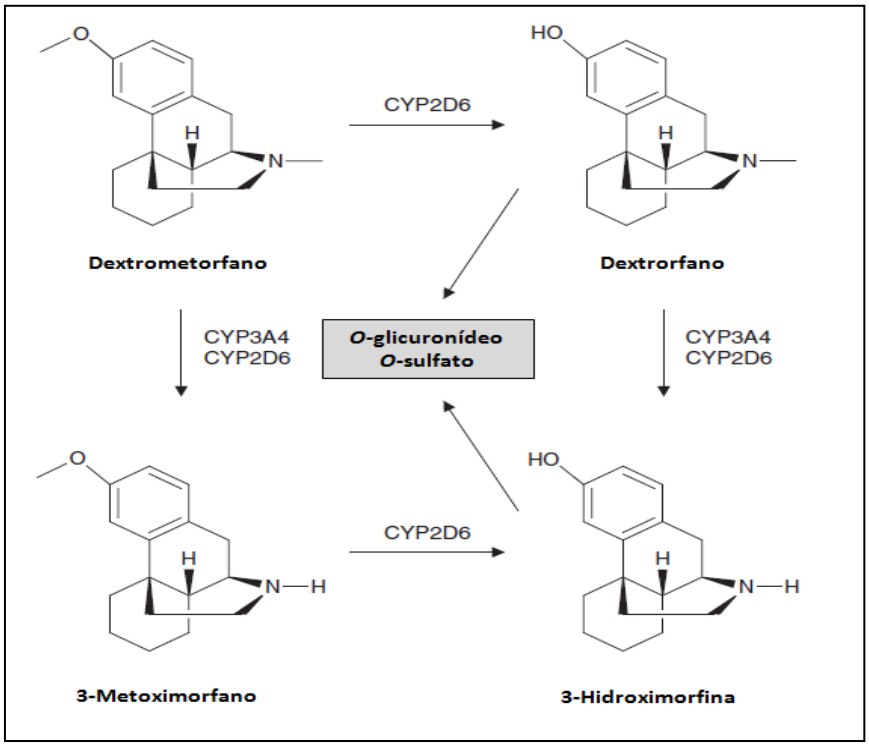


Figura 7. Metabolismo de dextrometorfano pela CYP2D6. A formação de dextrorfano a partir de dextrometorfano é principalmente mediada pela CYP2D6 via *O*-desmetilação. As reações por *N*-desmetilação são mediadas principalmente pela enzima CYP3A4.
Fonte: Adaptado de Zhou, 2009.

1.6.1 Farmacocinética

Após a administração oral, o DM é absorvido rapidamente, entrando na circulação sangüínea e atravessando a barreira hematoencefálica. O fármaco DM é metabolizado por várias enzimas do fígado e, em seguida, processado através de *O*-demetilação (responsável pela produção do DX), de *N*-desmetilação, e de conjugação parcial com ácido glicurônico e íons sulfato[21, 52, 53].

A primeira passagem através da veia porta hepática resulta na metabolização do DM em DX, o derivado 3-hidroximorfina, através da enzima CYP2D6. Algumas horas após a terapia com DM em seres humanos, os metabólitos 3-hidroxi-N-metilmorfina e 3-morfina, assim como os traços da droga inalterada DM, são detectáveis na urina[52, 53].

1.6.2 Farmacodinâmica

Em doses terapêuticas, o DM possui ação central, elevando o ponto inicial da tosse, sem inibir a atividade ciliar. O DM é absorvido rapidamente e inicia sua atividade entre 15 e 60 minutos após a ingestão. A duração da ação após a administração oral é de 3 a 8 horas. A dosagem média necessária para uma terapia eficaz desse antitussígeno é de 10 mg a 30 mg a cada 4 ou 6 hs[10].

1.6.3 Bioequivalência

A bioequivalência se refere à comparação da biodisponibilidade de dois fármacos de origem diferentes, ou seja, como estes se comportam no organismo em termos de disponibilidade para exercer sua ação terapêutica. São considerados bioequivalentes quando são semelhantes para ambos os parâmetros Concentração plasmática Máxima e Tempo para alcançar a Concentração Máxima no plasma e as respectivas áreas sob a curva de concentração plasmática versus tempo são equiparáveis.

Algumas questões de bioinequivalência têm sido observadas entre fármacos, justificando a importância dos estudos comparativos de diferentes preparações quanto à biodisponibilidade, a fim de garantir ao paciente equivalência terapêutica entre os diferentes

medicamentos comercializados, principalmente quando se trata de terapias de risco, onde as substituições entre formulações podem resultar em graves problemas.

A continuação descrevem-se os parâmetros mais usados para a determinação da bioequivalência entre fármacos:

1.6.3.1 Concentração plasmática máxima (Cmáx)

A Cmax representa a maior concentração plasmática atingida pelo fármaco após a administração oral, ela é diretamente proporcional à absorção. Portanto, depende diretamente da extensão, da velocidade de absorção e da velocidade de eliminação. Para um efeito terapêutico ótimo e seguro, esse parâmetro deve estar posicionado, sobre a curva de concentração sangüínea versus tempo, entre a concentração mínima efetiva e a concentração máxima tolerada[9].

1.6.3.2 Tempo para alcançar a concentração máxima no plasma (Tmáx)

A Tmáx tem apresenta relação estreita com a velocidade de absorção do fármaco e pode ser usado como simples medida da absorção. É alcançada quando a velocidade de entrada do fármaco na circulação é excedida pelas velocidades de eliminação e distribuição[9].

1.6.3.3 Área sob a curva de concentração plasmática versus tempo (AUC)

A AUC indica a quantidade total de fármaco absorvido. Para fármacos administrados cronicamente, é um parâmetro mais crítico do que a velocidade de absorção. É considerado o parâmetro mais importante na avaliação da biodisponibilidade, sendo expresso em quantidade/volume versus tempo (mgh/mL) e é representativo da quantidade total de fármaco absorvido após administração de uma dose única da substância ativa. A AUC é proporcional à quantidade de fármaco que entra na circulação sistêmica e independe da velocidade[9].

1.7 Reação Adversa a Fármacos

Os diversos fenótipos foram correlacionados com a presença das denominadas reações adversas a fármacos (ADR, do inglês *Adverse Drugs Reaction*) que na linguagem coloquial são chamados de alergias a fármacos. A literatura revela vários casos em pacientes não relacionados e descrevem a ocorrência de ADR na presença de polimorfismo. Um estudo de revisão de casos de ADR reportados nos Estados Unidos, cujo objetivo foi avaliar o papel potencial da farmacogenômica na diminuição de incidências de ADR. O estudo sugere que a terapia farmacológica personalizada pode causar uma importante diminuição nos casos de ADR[5]. As enzimas CYP1A2 e CYP2D6 que metabolizam 5% e 25% respectivamente de todas as drogas prescritas e estas foram relacionadas com o metabolismo de 75% e 38% das drogas ADR[59]. Isto sugere que a alteração da dose de um determinado fármaco administrado a um paciente previamente genotipado pode prevenir a ocorrência de ADR. Unicamente 20% das drogas que são substratos para enzimas não polimórficas são reportadas como ADR. Foi estimado que: ADR custa à sociedade americana aproximadamente US$ 100 bilhões, causando mais de cem mil mortes anualmente nos Estados Unidos, atingindo até um 7% das admissões hospitalares no Reino Unido e Suécia por causa de ADR[17].

7 CONCLUSÃO

1. Foram genotipados 75 voluntários sadios da região da cidade de Campinas. O estudo mostrou uma alta correlação entre os dos métodos de fenotipagem e genotipagem.

2. O método de genotipagem Tetra Primer mostrou freqüências alélicas similares aos publicados por vários grupos de pesquisa para os alelos *CYP2D6*1, *3* e **4*.

3. O método Tetra Primer não foi satisfatório para a análise dos alelos *CYP2D6*5* e **6*, precisando de alguma amostra de DNA controle que possa validar nossos resultados.

4. A freqüência alélica para o alelo selvagem *CYP2D6*1* foi 30,66.

5. A freqüência alélica para o alelo *CYP2D6*3* foi 1.3%

6. A freqüência alélica para o alelo selvagem *CYP2D6*4* foi 14%.

7. O método de seqüenciamento para a caracterização dos alelos *CYP2D6*1, *2, *3, *4, *5, *6, *10, *17* e **41* mostrou resultados que ajudaram interpretar resultados que não podiam ser entendidos pelo método Tetra Primer.

8. O estudo de número de cópias demonstrou que das 19 amostras seqüenciadas, só uma amostra apresentou 3 cópias do gene *CYP2D6*, gerando uma atividade enzimática possivelmente aumentada. Uma amostra mostrou correlação entre os métodos de fenotipagem e os dois métodos de genotipagem, sendo considerado um metabolizador lento ou PM.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

1 Gonzalez FJ, Gelboin HV. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. Drug Metab Rev. 1994;26(1-2):165-83.

2 Nelson DR, Strobel HW. Evolution of Cytochrome P-450 Proteins. Mol Biol Evol. 1998;5:199.

3 Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. J Biol Chem. 1991;266(21):13469-72.

4 Coon MJ, Ding XX, Pernecky SJ, Vaz AD. Cytochrome P450: progress and predictions. FASEB J. 1992;6(2):669-73.

5 Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. JAMA. 2001;286(18):2270-9.

6 Chen Q, Zhang T, Wang JF, Wei DQ. Advances in human cytochrome p450 and personalized medicine. Curr Drug Metab. 2011;12(5):436-44.

7 Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. Clin Pharmacokinet. 1997;32(3):210-58.

8 Nakamura H, Torimoto N, Ishii I, Ariyoshi N, Nakasa H, Ohmori S, Kitada M. CYP3A4 and CYP3A7-mediated carbamazepine 10,11-epoxidation are activated by differential endogenous steroids. Drug Metab Dispos. 2003;31(4):432-8.

9 Rang HP, Dale, MM, Ritter JM, et al. Farmacologia. Rio de Janeiro. Elsevier Editora Ltda. Tradução da Quinta Edição Americana. 2004.

10 Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

11 Wijnen PA, Op den Buijsch RA, Drent M, Kuijpers PM, Neef C, Bast A, Bekers O, Koek GH. Review article: The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. Aliment Pharmacol Ther. 2007;26 Suppl 2:211-9. Review. Erratum in: Aliment Pharmacol Ther. 2009;29(3):350.

12 Roden DM, Altman RB, Benowitz NL, Flockhart DA, Giacomini KM, Johnson JA, Krauss RM, McLeod HL, Ratain MJ, Relling MV, Ring HZ, Shuldiner AR, Weinshilboum RM, Weiss ST; Pharmacogenetics Research Network. Pharmacogenomics: challenges and opportunities. Ann Intern Med. 2006;145(10):749-57.

13 Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? Am J Hum Genet. 1997;60(2):265-71.

---

[1]De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

14 Guengerich FP, Parikh A, Yun CH, Kim D, Nakamura K, Notley LM, Gillam EM. What makes P450s work? Searches for answers with known and new P450s. Drug Metab Rev. 2000;32(3-4):267-81.

15 Rodríguez Arcas MJ, García-Jiménez E, Martínez-Martínez F, Conesa-Zamora P. Role of CYP450 in pharmacokinetics and pharmacogenetics of antihypertensive drugs. Farm Hosp. 2011;35(2):84-92.

16 van der Weide J, Steijns LS. Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. Ann Clin Biochem. 1999;36(6):722-9.

17 Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. Trends Pharmacol Sci. 2004;25(4):193-200.

18 Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. Lancet. 2002;360(9340):1155-62.

19 Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. Nature. 1988;331(6155):442-6.

20 Nelson, DR. The Cytochrome P450 Homepage. Human Genomics 2009;4:59-65 Available from: http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html [2011 Jun 8].

21 Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. Clin Pharmacokinet. 2009;48(11):689-723.

22 Pirmohamed M, Park BK. Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. Toxicology. 2003;192(1):23-32.

23 Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. Pharmacogenetics. 2004;14(1):1-18.

24 Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. Pharmacol Ther. 2007;116(3):496-526.

25 Lopes-Cendes I, Guerreiro CA. Pharmacogenetics: reality or fiction? Or are we there yet? Arq Neuropsiquiatr. 2011;69(2A):151-2.

26 Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. Trends Pharmacol Sci. 1999;20(8):342-9.

27 Meyer UA. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. Nat Rev Genet. 2004;5(9):669-76.

28 Harris H. Polymorphism and protein evolution. The neutral mutation-random drift hypothesis. J Med Genet. 1971;8(4):444-52.

29 Roden DM. Principles in pharmacogenetics. Epilepsia. 2001;42(Suppl 5):44-8.

30 Lodish H, Berk A, Matsudaira P, et al. Biologia Celular e Molecular. Quinta edição. São Paulo. Artmed Editora S.A. 2005.

31 Hanioka N, Kimura S, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. Am J Hum Genet. 1990;47(6):994-1001.

32 Bracco L, Kearsey J. The relevance of alternative RNA splicing to pharmacogenomics. Trends Biotechnol. 2003;21(8):346-53.

33 Ingelman-Sundberg M. Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. Toxicology. 2002;181-182:447-52.

34 McKinnon RA, Evans AM. Cytochrome P450: Pharmacogenetics. Aust J. Hosp Pharm. 2000;30:102-5.

35 Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G, Fuselli S. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. Pharmacogenet Genomics. 2007;17(2):93-101.

36 Steen VM, Molven A, Aarskog NK, Gulbrandsen AK. Homologous unequal cross-over involving a 2.8 kb direct repeat as a mechanism for the generation of allelic variants of human cytochrome P450 CYP2D6 gene. Hum Mol Genet. 1995;4(12):2251-7.

37 Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004;369(1):23-37.

38 Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. Pharmacogenomics J. 2005;5(1):6-13.

39 Rowland P, Blaney FE, Smyth MG, Jones JJ, Leydon VR, Oxbrow AK, Lewis CJ, Tennant MG, Modi S, Eggleston DS, Chenery RJ, Bridges AM. Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. J Biol Chem. 2006;281(11):7614-22.

40 Unwalla RJ, Cross JB, Salaniwal S, Shilling AD, Leung L, Kao J, Humblet C. Using a homology model of cytochrome P450 2D6 to predict substrate site of metabolism. J Comput Aided Mol Des. 2010;24(3):237-56.

41 Lesko LJ, Salerno RA, Spear BB, Anderson DC, Anderson T, Brazell C, Collins J, Dorner A, Essayan D, Gomez-Mancilla B, Hackett J, Huang SM, Ide S, Killinger J, Leighton J, Mansfield E, Meyer R, Ryan SG, Schmith V, Shaw P, Sistare F, Watson M, Worobec A. Pharmacogenetics and pharmacogenomics in drug development and regulatory decision

making: report of the first FDA-PWG-PhRMA-DruSafe Workshop. J Clin Pharmacol. 2003;43(4):342-58.

42 Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hänseler E. Rapid detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4, and CYP2D6*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6*5 allele by multiplex long PCR. Clin Chem. 2000;46(8 Pt 1):1072-7.

43 Ye S, Humphries S, Green F. Allele specific amplification by tetra-primer PCR. Nucleic Acids Res. 1992;20(5):1152.

44 Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res. 2001;29(17):E88-8.

45 Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res. 1989;17(7):2503-16.

46 Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. Am J Hum Genet. 1997;60(2):284-95.

47 Stamer UM, Bayerer B, Wolf S, Hoeft A, Stüber F. Rapid and reliable method for cytochrome P450 2D6 genotyping. Clin Chem. 2002;48(9):1412-7.

48 Müller B, Zöpf K, Bachofer J, Steimer W. Optimized strategy for rapid cytochrome P450 2D6 genotyping by real-time long PCR. Clin Chem. 2003;49(10):1624-31.

49 Pusch W, Wurmbach JH, Thiele H, Kostrzewa M. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. Pharmacogenomics. 2002;3(4):537-48.

50 Shi Y, Xiang P, Li L, Shen M. Analysis of 50 SNPs in CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 and CYP1A2 by MALDI-TOF mass spectrometry in Chinese Han population. Forensic Sci Int. 2011;207(1-3):183-7.

51 Jackson PR, Tucker GT, Lennard MS, Woods HF. Polymorphic drug oxidation: pharmacokinetic basis and comparison of experimental indices. Br J Clin Pharmacol. 1986;22(5):541-50.

52 Wojtczak A, Rychlik-Sych M, Krochmalska-Ulacha E, Skretkowicz J. CYP2D6 phenotyping with dextromethorphan. Pharmacol Rep. 2007;59(6):734-8.

53 Chládek J, Zimová G, Beránek M, Martínková J. In-vivo indices of CYP2D6 activity: comparison of dextromethorphan metabolic ratios in 4-h urine and 3-h plasma. Eur J Clin Pharmacol. 2000;56(9-10):651-7.

54 Borges S, Li L, Hamman MA, Jones DR, Hall SD, Gorski JC. Dextromethorphan to dextrorphan urinary metabolic ratio does not reflect dextromethorphan oral clearance. Drug Metab Dispos. 2005;33(7):1052-5.

55 Schmid B, Bircher J, Preisig R, Küpfer A. Polymorphic dextromethorphan metabolism: co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. Clin Pharmacol Ther. 1985;38(6):618-24.

56 Basci NE, Bozkurt A, Kayaalp SO, Sayal A, Isimer A. Omission of the deconjugation step in urine analysis and the unaltered outcome of CYP2D6 phenotyping with dextromethorphan. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1998;23(1):1-5.

57 Dayer P, Leemann T, Striberni R. Dextromethorphan O-demethylation in liver microsomes as a prototype reaction to monitor cytochrome P-450 db1 activity. Clin Pharmacol Ther. 1989;45(1):34-40.

58 Küpfer A, Schmid B, Pfaff G. Pharmacogenetics of dextromethorphan O-demethylation in man. Xenobiotica. 1986;16(5):421-33.

59 Wolf CR, Smith G. Pharmacogenetics. Br Med Bull. 1999;55(2):366-86.

60 Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Børresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. Pharmacogenetics. 1995;5(4):215-23.

61 Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, Daly AK, Garte S, Nebert DW. Human cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001;10(12):1307-8.

62 Prado CM. Desenvolvimento de metodologia para a determinação dos genótipos principais dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*: aplicação na Farmacogenética. 2009. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

63 Naveen AT, Prasanna T, Farzana BL, Rajan S, Adithan C. CYP2D6 genotype and phenotype relationship in South Indians. J Postgrad Med. 2006;52(4):253-6.

64 Hinrichs JW, Smallegoor WD, van Baalen-Benedek EH, Welker C, van der Weide J. Detection of CYP2D6 polymorphisms *9, *10, and *41 using ARMS-PCR and their allelic frequencies in 400 psychiatric patients. Clin Chem Lab Med. 2007;45(4):555-7.

65 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(12):5463-7.

66 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215(3):403-10.

67 Johansson I, Lundqvist E, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M. PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. Pharmacogenetics. 1996;6(4):351-5.

68 Meijerman I, Sanderson LM, Smits PH, Beijnen JH, Schellens JH. Pharmacogenetic screening of the gene deletion and duplications of CYP2D6. Drug Metab Rev. 2007;39(1):45-60.

69. Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. Gene. 1999;226(2):327-38.

70. Løvlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Steen VM. Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. FEBS Lett. 1996;392(1):30-4.

71 Bernard S, Neville KA, Nguyen AT, Flockhart DA. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population: clinical implications. Oncologist. 2006 Feb;11(2):126-35.

72 Sabbagh A, Darlu P. Data-mining methods as useful tools for predicting individual drug response: application to CYP2D6 data. Hum Hered. 2006;62(3):119-34.

73 Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J, Roots I, Brockmöller J. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. Mol Psychiatry. 2004;9(5):442-73.

74 Lee W, Lockhart AC, Kim RB, Rothenberg ML. Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. Oncologist. 2005;10(2):104-11.

75 de Leon J, Susce MT, Johnson M, Hardin M, Maw L, Shao A, Allen AC, Chiafari FA, Hillman G, Nikoloff DM. DNA microarray technology in the clinical environment: the AmpliChip CYP450 test for CYP2D6 and CYP2C19 genotyping. CNS Spectr. 2009;14(1):19-34.

76 Sistonen J, Fuselli S, Palo JU, Chauhan N, Padh H, Sajantila A. Pharmacogenetic variation at CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 at global and microgeographic scales. Pharmacogenet Genomics. 2009;19(2):170-9.

77 Kohlrausch FB, Gama CS, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Callegari-Jacques SM, Gesteira A, Barros F, Carracedo A, Hutz MH. Naturalistic pharmacogenetic study of treatment resistance to typical neuroleptics in European-Brazilian schizophrenics. Pharmacogenet Genomics. 2008;18(7):599-609.