Carolina Martins do Prado

**Farmacogenética em psiquiatria: busca de marcadores de refratariedade
em pacientes deprimidos submetidos à ECT**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

São Paulo

2016

Carolina Martins do Prado

**Farmacogenética em psiquiatria: busca de marcadores de refratariedade
em pacientes deprimidos submetidos à ECT**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria
Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Prado, Carolina Martins do

Farmacogenética em psiquiatria: busca de marcadores de refratariedade em
pacientes deprimidos submetidos à ECT / Carolina Martins do Prado. -- São Paulo,
2016.

Tese (doutorado) --Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.

Orientador: Wagner Farid Gattaz.

Descritores: 1.Farmacogenética 2.Antidepressivos 3.Polimorfismo genético
4.Eletroconvulsoterapia 5.Transtornos de humor 6.Marcadores genéticos

USP/FM/DBD-030/16

ERRATA

Dedico esta tese a todos os pacientes que participaram da pesquisa
pois, sem eles este trabalho não teria acontecido.

À minha mãe Edna, que nunca saiu do meu lado, como vem fazendo
desde o meu mestrado .

Ao meu pai Luiz Carlos que tanto amo, que sempre fez tudo para me ver
feliz e me preparar para a vida; ao meu irmão Carlos Guilherme, por ser meu
companheiro de todas as horas. Ao vovô Remo pela sua preocupação e pelo
melhor suco de laranja todas as manhãs.

Esta tese também é dedicada ao meu marido Leandro Mascher por fazer
todo o possível para que eu terminasse este trabalho, pela preocupação,
compreensão e amor.

Sem vocês eu teria desistido na metade do caminho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz por acreditar em mim e me mostrar o caminho do aprendizado. À minha orientadora do mestrado Prof^a. Dra. Elida Paula Benquique Ojopi por ter me introduzido no estudo da Farmacogenética.

Ao Prof. Dr. Sérgio Rigonatti que me recebeu de braços abertos no setor de eletroconvulsoterapia. À Fernanda Lopes de Jesus, pelo seu empenho em nos ajudar na pesquisa. Aos Drs. Luiz Felipe Rigonatti e Martinus van de Bilt, que foram essenciais para o recrutamento, entrevista dos pacientes, e ajuda na interpretação da parte clínica do projeto. Ao Dr. Sérgio Hototian pelas explicações e discussões de casos clínicos. Ao corpo clínico e à enfermagem do ECT, bem como, aos médicos e residentes dos ambulatórios do Instituto, que me indicaram possíveis pacientes para fazer parte do projeto.

Ao estatístico Bernardo Powaga por sua fundamental ajuda na análise estatística e por entender exatamente o que eu queria fazer com os resultados, quando sugeriu o modelo de árvore de decisão para unir os dados obtidos na pesquisa.

À equipe do Laboratório de Neurociências (LIM 27 IPq-HC-FMUSP) pelo coleguismo, incluindo a Dra. Leda Leme Talib, supervisora do Laboratório e à Sandra Cardoso pelas coletas de sangue e extração de DNA. Às minhas estagiárias pela ajuda, disposição e vontade de aprender.

À minha enorme família e todos os amigos que de alguma maneira, me ajudaram durante o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar esta pesquisa e permitir que meu trabalho fosse apresentado em congressos nacionais e internacionais. À Associação Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS) pela contribuição financeira à pesquisa científica.

Por fim, agradeço a oportunidade de fazer este Doutorado, de conhecer renomados pesquisadores e de poder conversar e trabalhar com eles. Agradeço a chance de fazer novas amizades, conhecer a realidade da pesquisa científica dentro e fora do Brasil. Por esta experiência transformadora que foi meu doutorado.

EPÍGRAFE

“Não façais aos outros o que não quereríeis que vos fosse feito, mas fazei-lhe, ao contrário, todo o bem que está em vosso poder fazer-lhe”.

Allan Kardec, Evangelho segundo o Espiritismo

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE QUADROS.....	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 TRANSTORNOS DO HUMOR E REFRATARIEDADE	18
1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
1.2.1 <i>Aspectos farmacológicos</i>	22
1.2.2 <i>Metabolismo dos Fármacos</i>	23
1.3 FARMACOGENÉTICA	27
1.3.1 <i>Farmacocinética</i>	32
1.3.2 <i>Farmacodinâmica</i>	59
2 JUSTIFICATIVA	71
3 OBJETIVOS.....	73
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	75
4.1 CASUÍSTICA	76
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	79
4.3 GENES E POLIMORFISMOS INVESTIGADOS.....	79
4.4 <i>PCR EM TEMPO REAL – DETERMINAÇÃO DO CNV DO GENE CYP2D6</i>	85
4.5 DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA COM O SISTEMA <i>TAQMAN®</i>	87
4.6 DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS PREDITOS DOS GENES <i>CYP2D6</i>	93
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	94
5 RESULTADOS	95
5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS	96
5.2 FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS, GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DE REFRATÁRIOS VERSUS RESPONDEDORES.....	96
5.3 ÁRVORE DE DECISÃO (<i>DECISION MAKING TREE</i>)	101
6 DISCUSSÃO.....	103
7 CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
ANEXO 1	132
ANEXO 2.....	133
ANEXO 3.....	134
ANEXO 4.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADRs – *Adverse drug reaction* (reação adversa a medicamento)
BHE – Barreira hematoencefálica
CVN – *Copy number variation* (variação no número de cópias)
CYP450 – *Cytochrome P450* (citocromo P450)
ECT - Eletroconvulsoterapia
EM – *Extensive Metabolizer* (metabolizador extensivo)
GWAS - *Genome-wide association study*
IM – *Intermediate Metabolizer* (metabolizador intermediário)
IMAO – Inibidor da monoamina oxidase
KDa – Quilo Dalton
Mn - nanômetro
MR – *Metabolic ratio* (taxa metabólica)
ODV - oximetildesvenlafaxina
Pb – Pares de bases
PM – *Poor Metabolizer* (metabolizador lento)
SNP – *Single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de base única)
SSRI - *Selective serotonin reuptake inhibitor* (inibidor seletivo da recaptação de serotonina)
*STAR*D* - *Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression*
TCA – *Tricyclic antidepressant* (antidepressivo tricíclico)
UM – *Ultra rapid metabolizer* (metabolizador ultrarrápido)
VNTR - *Variable Number Tandem Repeat*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática de fatores que podem contribuir para a variabilidade na resposta terapêutica.....	21
Figura 2 - Metabolismos e excreção dos medicamentos:.....	22
Figura 3 - Polimorfismos de DNA.....	27
Figura 4 - Fenótipos da enzima CYP2D6.....	29
Figura 5 - Representação esquemática da atividade enzimática da CYP2D6	30
Figura 6 - Representação do <i>steady-state</i> baseado no genótipo de CYP2D6.....	31
Figura 7 - Ciclo catalítico do CYP450.....	35
Figura 8 - Percentual de CYPs responsáveis pelo metabolismo de fase 1	37
Figura 9 - Relação entre o número de alelos funcionais do gene CYP2D6 e o <i>steady-state</i> da paroxetina.....	44
Figura 10 - Relação entre o genótipo de CYP2D6 e o índice metabólico.....	45
Figura 11 - Distribuição do índice metabólico (MR – <i>metabolic ratio</i>) do omeprazol e S/R-mefenitoína em relação ao genótipo CYP2C19*17.....	49
Figura 12 - Concentrações plasmáticas de escitalopram em relação ao genótipo CYP2C19.....	50
Figura 13 - Distribuição dos polimorfismos investigados no gene CYP2D6.....	83
Figura 14 - Distribuição dos polimorfismos investigados no gene CYP2C19.....	83
Figura 15 - Gráfico que indica o número de cópias do gene CYP2D6.....	87
Figura 16 - Gráfico que indica o número de amostras que apresentam 1, 2 ou 3 cópias de CYP2D6.....	87
Figura 17 - Curva de amplificação de uma amostra heterozigota CT para o polimorfismo rs1128503 do gene ABCB1.....	90
Figura 18 - Curva de amplificação de uma amostra homozigota CC para o polimorfismo rs1045642 do gene ABCB1.....	90
Figura 19 - Curva de amplificação de uma amostra homozigota TT para o polimorfismo rs1128503 do gene ABCB1.....	91
Figura 20 - Discriminação alélica. Gráfico de amostras analisadas para o polimorfismo rs1128503 do gene ABCB1.....	92
Figura 21 - Discriminação alélica. Gráfico de amostras analisadas para o polimorfismo rs16947 do gene CYP2D6.....	92
Figura 22 - Árvore de decisão.....	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Enzimas de fase 1 e suas principais reações.....	24
Quadro 2 - Principais reações de fase 1.....	25
Quadro 3 - Principais reações de fase 2 e as respectivas enzimas responsáveis.....	26
Quadro 4 - Reações de fase 2.....	26
Quadro 5 - Medicamentos metabolizados pelas enzimas CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9.....	37
Quadro 6 - Polimorfismos em genes relacionados à farmacocinética dos antidepressivos.....	80
Quadro 7 - Polimorfismos em genes relacionados à farmacodinâmica dos antidepressivos....	81
Quadro 8 - Variações alélicas estudadas do gene <i>CYP2D6</i>	84
Quadro 9 - Variações alélicas estudadas do gene <i>CYP2C19</i>	84
Quadro 10 - Variações alélicas estudadas do gene <i>CYP2C9</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais alelos <i>CYP2D6</i>	41
Tabela 2 - Frequências fenotípicas de UMs e PMs para <i>CYP2D6</i> em diferentes populações..	43
Tabela 3 - Principais alelos <i>CYP2C19</i>	51
Tabela 4 - Frequências alélicas para <i>CYP2C9</i>	53
Tabela 5 - Percentual dos diagnósticos de transtorno afetivo bipolar e depressão entre pacientes refratários e respondedores..	76
Tabela 6 - Idade média e tempo de doença.	77
Tabela 7 - Dados demográficos.....	78
Tabela 8 - Variáveis clínicas coletadas dos pacientes refratários e respondedores.....	78
Tabela 9 - Fenótipo predito para <i>CYP2D6</i> , <i>CYP2C19</i> e <i>CYP2C9</i> de acordo com a combinação alélica.	94
Tabela 10 - Prevalência dos fenótipos preditos das enzimas <i>CYP2D6</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2C9</i> e nos grupos de pacientes refratários e no grupo dos pacientes respondedores.....	96
Tabela 11 - Frequências alélicas identificadas nos pacientes refratários e respondedores.....	97
Tabela 12 - Comparação das frequências genotípicas entre os grupos de pacientes refratários e respondedores.....	98
Tabela 13 - Frequências alélicas de pacientes refratários e respondedores.	100

RESUMO

Prado CM. *Farmacogenética em psiquiatria: busca de marcadores de refratariedade em pacientes deprimidos submetidos à ECT* [Tese]. São Paulo: Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, 2016.

A depressão refratária é caracterizada por ciclos recorrentes de longa duração de episódios severos, que não remitem ao utilizar vários tipos de antidepressivos. Até 20% desses pacientes necessitam de tratamentos com a utilização de múltiplos antidepressivos e/ou eletroconvulsoterapia (ECT). Para minimizar a duração da doença, o surgimento de reações adversas a medicamentos e os custos médicos com o tratamento, torna-se útil o conhecimento prévio da terapia que provavelmente será mais efetiva e melhor tolerada para cada paciente. Um dos objetivos deste trabalho foi identificar polimorfismos de DNA em genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica dos antidepressivos, que poderiam estar envolvidos com a resposta terapêutica na depressão unipolar ou bipolar. Para tanto, avaliamos polimorfismos de DNA tais como: *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *ABCB1*, *SCL6A2*, *SLC6A3*, *HTR1A*, *HTR2A*, *TPH1*, *TPH2*, *COMT*. Desse modo, polimorfismos nos genes selecionados foram genotipados em pacientes com depressão que respondem ao tratamento e em pacientes com os mesmos diagnósticos que são refratários ao tratamento medicamentoso e, por esse motivo, são submetidos à ECT. Em nosso estudo, encontramos somente diferenças significativas no genótipo entre refratários e respondedores para o gene *ABCB1* [aumento da frequência do genótipo CT em pacientes refratários para o polimorfismo rs1128503 ($p=0,007$)] e para o polimorfismo rs6314 no gene *HTR2A* [aumento da frequência do genótipo AG em pacientes respondedores ($p=0,042$)]. Para os demais genes não encontramos diferenças entre as frequências alélicas e genotípicas. Para realizarmos uma análise mais abrangente, utilizamos o método *CART* (*Classification regression tree*). Com ele pudemos fazer um modelo de Árvore de Decisão que possibilitou unificar os

resultados dos genótipos dos polimorfismos estudados nos genes *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *ABCB1*, *SCL6A2*, *SLC6A3*, *HTR1A*, *HTR2A*, *TPH1*, *TPH2*, *COMT*, afim de identificar o conjunto de genótipos que poderiam mostrar o percentual de chance dos pacientes serem refratários ou respondedores, ou seja, conseguimos adequar uma metodologia estatística que avalia os genótipos de diferentes genes em conjunto, identificando assim, qual é a contribuição dos genótipos para a condição de refratário ou respondedor. Com isso, criamos um modelo de análise de vários genótipos ao mesmo tempo que seleciona aqueles que melhor classificam os grupos (refratários e respondedores). O que seria mais eficaz do que fazer associações individuais, porque, a árvore de decisão é capaz de encontrar interação entre os genótipos, além de evitar colinearidade. Com nossos dados de genotipagem, conseguimos uma árvore que apresenta uma sensibilidade de 81,6%, especificidade de 58,1% e precisão de 71,5%. Acreditamos que futuramente a utilização da combinação de genótipos de um grupo de genes relacionados à farmacocinética e dinâmica de medicamentos utilizados no tratamento de diferentes doenças, possa ser simplesmente inserido em um banco de dados que determine as possibilidades do paciente responder ou não à determinado tratamento (baseado no modelo da Árvore de Decisão). Acreditamos também que a determinação de um conjunto de polimorfismos relacionados à resposta e refratariedade ao tratamento com antidepressivos pode trazer benefícios clínicos ao paciente, contribuindo para a personalização da terapia, melhorando a eficácia do tratamento da depressão unipolar ou bipolar.

Descritores: farmacogenética; antidepressivos; polimorfismos genéticos; eletroconvulsoterapia; transtorno de humor; marcadores genéticos.

ABSTRACT

Prado CM. *Pharmacogenetics in psychiatry: search for genetics markers of refractoriness on depressed patients under electroconvulsive therapy*. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Refractory depression is characterized by recurrent cycles of long and severe episodes which did not remit even with the use various classes of antidepressants. Up to 20% of patients need treatments with the use of multiple antidepressants and/or electroconvulsive therapy (ECT). To minimize the duration of the disease, the adverse drug reactions and medical costs with treatment, it is useful to have prior knowledge of the therapy that will probably be more effective and better tolerated for each patient. One of the objectives of the work was to identify DNA polymorphisms in genes involved in pharmacokinetics and pharmacodynamics of antidepressants, which could be involved in the therapeutic response in unipolar or bipolar depression. To this end, we evaluated the DNA polymorphisms on the genes: *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *ABCB1*, *SCL6A2*, *SLC6A3*, *HTR1A*, *HTR2A*, *TPH1*, *TPH2*, and *COMT*. Thus, polymorphisms in selected genes were genotyped in patients with depression who respond to treatment and in patients with the same diagnosis who are refractory to drug treatment and, therefore, are subjected to ECT. In our study, only significant differences between the genotype of refractories and non-refractory patients were in the *ABCB1* gene [increase of the CT genotype frequency in patients refractory to the rs1128503 polymorphism ($p=0.007$)] and the rs6314 polymorphisms in the *HTR2A* gene [the increased frequency AG genotype in non-refractory patients ($p=0.042$)]. For other genes we found no differences between the allele and genotype frequencies. In order to conduct a more comprehensive analysis, we used the CART method (classification regression tree). With it, we could make a decision tree model that made it possible to unify the results of the genotypes of the polymorphisms studied in the *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *ABCB1*, *SCL6A2*, *SLC6A3*, *HTR1A*, *HTR2A*,

TPH1, *TPH2*, *COMT* genes, in order to identify a set of genotypes that could show the probability of one patient being refractory or non-refractory to treatment, i.e., we can tailor a statistical methodology that evaluates the genotypes of different genes together, thereby identifying which is the contribution of genotypes for the condition of refractory or non-refractory. Therefore, we created a model of analysis of various genotypes at the same time selecting those that best classify groups (refractory and non-refractory), what would be more effective than do individual associations, because the decision tree is able to find interaction between genotypes and avoids collinearity. With our data genotyping, we got a tree that has a sensitivity of 81.6%, specificity of 58.1% and accuracy of 71.5%. We believe that the future use of the combination of genotypes of a group of genes related to pharmacokinetics and dynamics of drugs used to treat different diseases can be simply inserted into a database to determine the chances of the patient to respond or not to the treatment (according to the decision making tree model). We also believe that the determination of a set of polymorphisms related to the response and non-response to treatment with antidepressants can bring clinical benefits to patients, contributing to customize therapy, improving the effectiveness of the treatment of unipolar or bipolar depression.

Descriptors: pharmacogenetics; antidepressive agents; polymorphisms; genetic; electroconvulsive therapy; mood disorders; genetic markers.

1.1 Transtornos do humor e refratariedade

A depressão é uma doença grave, recorrente e incapacitante, sendo considerada um problema de saúde pública, com elevada prevalência em todo mundo. Segundo a OMS – Organização Mundial da Saúde, transtornos depressivos estão entre as mais importantes causas de morte e incapacitação nos países em desenvolvimento e industrializados (revisão em Crisafulli et al., 2011; Kayser et al., 2011). A situação é particularmente alarmante porque em 2020, a depressão será a maior causa de incapacitação profissional, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (Uhr et al., 2008; Fabri et al., 2013).

Embora existam muitos medicamentos disponíveis para o tratamento da depressão, o resultado da terapêutica, geralmente, está aquém do ideal. Independente do antidepressivo inicialmente adotado, cerca de 30 a 50% dos pacientes com depressão não responderão adequadamente ao tratamento de primeira linha (Bauer et al., 2010) e, mesmo que os pacientes se comprometam com o tratamento, cerca de 60 a 70% destes não remitem completamente; mesmo após 2 anos de tratamento mais de 20% não se recuperam e 10% permanecem deprimidos apesar das múltiplas intervenções (Fagiolini e Kupfer, 2003).

O projeto *STAR*D – Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression*, constatou que aproximadamente dois terços dos pacientes só atingem remissão após quatro tentativas de tratamento com antidepressivos (Crisafulli et al., 2011). Desse modo, a eficiência do tratamento ainda permanece abaixo do ideal; os antidepressivos são eficazes em apenas um subconjunto de pacientes ou são responsáveis por respostas parciais, sendo também frequentemente associados a reações adversas debilitantes que desencorajam a adesão ao tratamento (Zandi et al., 2010).

Normalmente existe uma demora de duas a quatro semanas para que o paciente inicie a resposta ao tratamento; quando a resposta não ocorre, recomenda-se esperar de quatro a seis semanas antes da troca do antidepressivo. Esta latência para atingir a resposta aumenta os riscos de uma piora clínica e de abandono do tratamento (Kato e Serretti, 2010). Outro aspecto

importante é que os pacientes frequentemente descontinuam prematuramente o uso da medicação, devido ao surgimento de efeitos adversos intoleráveis (*ADRS* – *adverse drug reations*) (Berlim e Turecki, 2007).

De acordo com Ward e Irazoqui (2010), quatro milhões de americanos apresentam um subtipo severo da doença conhecida como depressão refratária, problema comum no tratamento do transtorno depressivo. Apesar de ainda não existir um consenso, alguns autores consideram que um paciente apresenta depressão refratária quando este não melhora depois de pelo menos duas tentativas de tratamento com duas classes de antidepressivos diferentes (sendo uma classe de inibidores seletivos de recaptção de serotonina – SSRIs) em doses terapêuticas apropriadas (Berlim e Turecki, 2007; Tierney, 2007) por tempo suficiente (mínimo de 12 semanas), sem apresentar melhora clínica adequada (Fava, 2003).

Como ainda não há um consenso, outros autores definem a depressão refratária com base na duração da doença, na duração do tratamento e no uso de tratamentos adjuvantes; outros, sugerem que a depressão refratária é um episódio de depressão maior que persiste apesar do número adequado de tratamentos com antidepressivos no episódio atual e do número de antidepressivos que falharam (Fagiolini e Kupfer, 2003). A maioria dos estudos aborda esta questão de maneira genérica, como por exemplo, “doses adequadas”, “dose efetiva mínima”, “doses terapêuticas máximas toleradas”, “doses terapêuticas aceitáveis” (Souery et al., 2006; Berlin e Turecki, 2007).

A depressão refratária é caracterizada por ciclos recorrentes de longa duração de episódios severos, que não remitem ao utilizar vários tipos de antidepressivos. Até 20% desses pacientes necessitam de tratamentos mais eficazes com a utilização de múltiplos antidepressivos ou a eletroconvulsoterapia (ECT) (Carvalho et al., 2009; Ward e Irazoqui, 2010).

A depressão bipolar, na qual ocorrem episódios de mania ou hipomania em alternância com as fases depressivas, também representa um desafio para os clínicos. Algumas características que distinguem a depressão bipolar da depressão unipolar são a idade de início dos episódios, número de episódios ao longo da vida e a distribuição entre gêneros. Pesquisadores já sugeriram que para esta população há uma maior incidência de hipersonia, aumento de apetite

e aumento de peso, além de uma provável resposta inadequada a TCAs (antidepressivos tricíclicos), bem como a maioria dos SSIRs (inibidores seletivos da recaptação de serotonina) (Fagiolini & Kupfer, 2003). Nestes casos, de uma maneira geral a resposta ao tratamento farmacológico é ruim e o processo de recuperação é lento.

Para reduzir o sofrimento e minimizar custos com o tratamento, seria conveniente saber previamente se o medicamento será efetivo e bem tolerado. A predição de respostas por exames clínicos e anamneses não é possível e a genética, apresenta-se como a ferramenta mais promissora (Porcelli et al., 2010).

Atualmente, a dose do medicamento ainda é ajustada por tentativa e erro, o que causa grande desgaste e sofrimento ao paciente e sua família, sendo que o ajuste da dose de acordo com o genótipo pode melhorar este processo consideravelmente, tornando-o mais assertivo.

1.2 Considerações gerais

É comum pacientes responderem de maneiras diferentes ao mesmo tratamento. Isto explica o fato de que nenhum fármaco é 100% eficaz para quaisquer indivíduos. A variabilidade na resposta ao medicamento pode ser atribuída a uma consequência de múltiplos fatores tais como: idade, gênero, massa corpórea, funcionamento renal e hepático, terapia concomitante, natureza da doença, etnia, fatores genéticos e ambientais (Clayton et al., 2006) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática de fatores que podem contribuir para a variabilidade na resposta terapêutica (adaptado de Poolsup et al., 2000). Quando o medicamento é absorvido, ele passa por processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos para que seu efeito terapêutico seja obtido. Múltiplos fatores podem interferir nestes processos desde como o medicamento é administrado (via de administração, forma farmacêutica), até fatores culturais, ambientais e biológicos.

Estima-se que a genética pode ser a razão de 20% a 90% da variabilidade na biodisponibilidade do medicamento e em seus efeitos (Kerb et al., 2006). O fármaco, uma vez administrado, é absorvido e distribuído até seu sítio de ação, onde interage com enzimas ou receptores, sendo metabolizado e depois excretado. Cada um desses processos pode envolver variações genéticas clinicamente significativas tendo a capacidade de influenciar a resposta terapêutica (Ingelman-Sundberg, 2004) (Figura 2).

De acordo com Zhou et al. (2008), diferenças funcionais em genes que codificam enzimas metabolizadoras, transportadores e receptores celulares de medicamentos, estão associadas à variação na depuração (*clearance*) do medicamento e na resposta terapêutica. Essas diferenças são frequentemente relevantes entre membros de uma mesma população (Kerb et al., 2006). Assim sendo, medicamentos que são eficazes ou bem tolerados por algumas pessoas podem ser ineficazes ou tóxicos a outras (Wolf et al., 2000), ocasionando

reações adversas que variam de moderadas e toleráveis a incômodas e graves (Figura 2).

Figura 2 – Metabolismos e excreção dos medicamentos: uma vez que o medicamento é administrado ele é absorvido e distribuído até seu sítio de ação.

Reação adversa a medicamento (RAM ou *ADR – adverse drug reaction*), segundo a Organização Mundial de Saúde, é “uma reação nociva e não intencional a um medicamento, que ocorre em doses normalmente utilizadas no Homem para a profilaxia, o diagnóstico ou o tratamento de uma doença, ou para a modificação de uma função fisiológica” (<http://www.who-umc.org/DynPage.aspx?id=22676>). As ADRs causam morbidade e mortalidade significativas, sendo onerosas para os sistemas de saúde e indústria farmacêutica (Shah et al., 2005; Eichelbaum et al., 2006; Jorgensen et al., 2008).

1.2.1 Aspectos farmacológicos

Na ação dos fármacos, geralmente, observam-se três fases: farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica. Na fase farmacêutica, ocorre a desintegração da forma em que o fármaco é administrado. Durante a fase farmacocinética, processa-se a absorção, distribuição, metabolismo e excreção

do fármaco. A fase farmacodinâmica compreende o processo de interação do fármaco com o seu receptor; desta interação resulta um estímulo que, após uma série de fenômenos químicos e bioquímicos, se traduz no efeito biológico esperado (Testa e Kramer, 2006).

Os fármacos e xenobióticos são armazenados no organismo ou removidos deste após um período de tempo. Desse modo, podem sofrer transformações químicas que originam os seguintes tipos de compostos: (a) menos ativos; (b) mais ativos; (c) com atividade semelhante ou diferente. Este processo de alteração química de fármacos no interior do organismo recebe o nome de metabolismo.

1.2.2 Metabolismo dos Fármacos

O metabolismo de fármacos em metabólitos mais hidrofílicos é essencial para sua eliminação do organismo, bem como para sua ação biológica e farmacológica. Muitos fármacos são compostos lipofílicos que na falta da metabolização, não seriam eliminados de maneira eficiente e se acumulariam no organismo, possivelmente causando toxicidades. Os fármacos são geralmente biotransformados em metabólitos de polaridade crescente até que possam ser excretados. A excreção consiste na eliminação da substância quimicamente inalterada ou de seus metabólitos. As principais vias de excreção são: rins, sistema hepatobiliar, pulmões.

O metabolismo dos medicamentos (ou reações de biotransformação) é classificado como: reações de fase 1 ou reações de fase 2 (vide adiante em 1.3.1.). Os sistemas enzimáticos envolvidos na biotransformação estão localizados principalmente no fígado, embora algumas aconteçam no plasma, pulmões, cérebro ou no intestino.

a) Metabolismo de Fase 1

As reações de fase 1 são catabólicas (oxidação, redução ou hidrólise) e com frequência, os produtos são quimicamente mais reativos, portanto, algumas vezes mais tóxicos do que a substância original. Estas são catalisadas pelas superfamílias das enzimas do citocromo P450 (CYPs), flavinas monooxigenases (FMOs), e epóxe hidrolases (EHs) (Brunton e Parker, 2008).

A introdução de grupos funcionais (-OH, -COOH, -SH, -O-, ou -NH₂) pelas enzimas de Fase 1 (Quadro 1) tem a finalidade de aumentar a hidrossolubilidade dos compostos, para que se tornem moléculas inativas ou para que moléculas originalmente inativas se tornem ativas. Medicamentos inativos que necessitam ser metabolizados para tornarem-se ativos são chamados de pró-fármacos (Hang et al., 2003; Brunton e Parker, 2008).

Quadro 1 - Enzimas de fase 1 e suas principais reações.

Enzimas de fase 1 (monooxigenases)	Reações
Citocromo P450 (P450 ou CYP)	C e O - oxidação, desalquilação, outras
Flavinas monooxigenase (FMO)	N, S e P oxidação
Epóxi hidrolase (EH)	Hidrólise de epóxidos

FONTE: Brunton e Parker, 2008.

Nas reações de fase 1 (Quadro 2), os fármacos polares são em geral inativados ou, em alguns casos, ativados pela introdução de grupos polares por meio de reações de: Oxidação (desalquilação, desaminação, dessulfurilação, formação de óxido, hidroxilação, oxidação alcoólica, oxidação aldeídica); redução (azorredução, nitrorredução, redução aldeídica ou cetônica); hidrólise (desaminação, desesterificação) (Korolkovas e Burckhalter, 1988).

Quadro 2 - Principais reações de fase 1. A Figura mostra os principais tipos de reações de fase 1 e alguns exemplos de medicamentos que sofrem estas reações.

Reações		Exemplos
1. Reações de Oxidação		
N-desalquilação	$\text{RNHCH}_3 \rightarrow \text{RNH}_2 + \text{CH}_2\text{O}$	Imipramina, diazepam, codeína, morfina, tamoxifeno, eritromicina
O-desalquilação	$\text{ROCH}_3 \rightarrow \text{ROH} + \text{CH}_2\text{O}$	Codeína, dextrometorfano
Hidroxilação alifática	$\text{RCH}_2\text{CH}_3 \rightarrow \text{RCHOHCH}_3$	Fenobarbital, midazolam, tolbutamida
Hidroxilação aromática		Fenitoína, fenobarbital, propanolol, anfetamina, warfarina
N-oxidação	$\text{RNH}_2 \rightarrow \text{RNHOH}$	Meperidina, dapsona,
S-oxidação		Omeprazol, cimetidina, tioridazina
Desaminação		Diazepam, anfetamina
2. Reações de Hidrólise
	Carbamazepina
	$\text{R}_1\text{COR}_2 \rightarrow \text{R}_1\text{COOH} + \text{R}_2\text{OH}$	Meperidina, enalapril, aspirina, procaína, cocaína
	$\text{R}_1\text{CNHR}_2 \rightarrow \text{R}_1\text{COOH} + \text{R}_2\text{NH}_2$	Lidocaína, indometacina

FONTE: adaptado de Brunton e Parker, 2008.

b) Metabolismo de Fase 2

As reações de fase 2 são sintéticas (anabólicas) e envolvem a conjugação, que habitualmente resulta em produtos inativos. As enzimas de Fase 2 (Quadro 3) incluem algumas superfamílias de enzimas que catalisam reações de conjugação como a glutationa-S-transferase (GSTs), UDP-glucuronil transferase (UGT), sulfotransferases (SULTs), N-acetiltransferase (NATs) e metiltransferases (MTs) (Brunton e Parker, 2008).

Quadro 3 - Principais reações de fase 2 e as respectivas enzimas responsáveis.

Enzimas de fase 2	Reações
Sulfotransferases (SULT)	Adição de sulfato
UDP-glucuronil transferase (UGT)	Adição de ácido glucurônico
Glutathione-S-transferase (GST)	Adição de glutathione
N-acetil transferase (NAT)	Adição de grupamento acetil
Metiltransferase (MT)	Adição de grupamento metil

FONTE: Brunton e Parker, 2008; Korolkovas e Burckhalter, 1988.

Estas reações de conjugação (Quadro 4) geralmente necessitam que o substrato tenha átomos de oxigênio (grupos hidroxila ou epóxido), nitrogênio ou enxofre para servirem como aceptores de elétrons de um grupo funcional hidrofílico (glutathione, ácido glucurônico, sulfato ou um grupamento acetil) que é unido por ligações covalentes ao acceptor da molécula. Geralmente, a oxidação pela fase 1 tanto adiciona quanto expõe um grupo funcional permitindo assim que os produtos sirvam como substratos para a conjugação na Fase 2 (Brunton e Parker, 2008).

Quadro 4 - Reações de fase 2. Nas reações de fase 2 os compostos polares são inativados por processos de síntese ou conjugação, tais como: metilação, acilação, formação de tiocianato, formação de ácido mercaptopúrico, conjugação com ácido glucurônico, conjugação com aminoácidos e conjugação com sulfatos.

	Reações	Exemplos
3. Reações de Conjugação		
Glucuronidação	<p>UDP-ácido glucurônico</p>	Morfina, oxazepam, loazepam
Adição de sulfato	$\text{PAPS} + \text{ROH} \rightarrow \text{R-O-SO}_2\text{-OH} + \text{PAP}$ <p>3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato</p>	Acetaminofeno, esteróides, metildopa
Acetilação	$\text{CoAS-CO-CH}_3 + \text{RNH}_2 \rightarrow \text{RNH-CO-CH}_3 + \text{CoA-SH}$	Izoniazida, dapsona, clonazepam

FONTE: adaptado Brunton e Parker, 2008.

1.3 Farmacogenética

Farmacogenética é a ciência que estuda como diferentes fatores genéticos influenciam a variação da resposta ao uso de fármacos (Meyer, 2004; Koo et al., 2006); ela associa características fenotípicas de resposta a medicamentos, a marcadores genéticos, tais como os polimorfismos de uma única base (*single nucleotide polymorphisms* – *SNPs*), inserções, deleções e repetições de microssatélites, e o *splicing* de RNA (Krejsa et al., 2006; Zhou et al., 2008).

Polimorfismos de DNA (Figura 3) são variações que ocorrem no genoma e podem afetar o fenótipo do indivíduo, determinando desde a cor da pele até a diferença na resposta a medicamentos.

- **Microssatélites** → exemplo de uma repetição trinucleotídica que varia em número entre os indivíduos.
 Indivíduo 1 cagtc**caacaacaacaacaacaaca**---gtcga
 Indivíduo 2 cagtc**caacaacaacaacaacaacaaca**agtcca
 Indivíduo 3 cagtc**caacaacaacaacaaca**-----gtcga
- **Inserções e deleções** → exemplo de uma deleção de três nucleotídeos.
 cagtc**caatgctagtag**ctagctactagctagctagcgc
 Cagtc**caatgctag**---ctagctactagctagctagcgc
- **SNPs** → exemplo de uma alteração de G para A na região codificadora de um gene (SNP não-sinônimo), que resulta na substituição de um aminoácido valina por uma metionina na proteína codificada por esse gene.
 ...GAC ACT TTC GAA CAC **GTG** ATA GAA GAG CTG...
 D T F E H **V** I E E L
 ...GAC ACT TTC GAA CAC **ATG** ATA GAA GAG CTG...
 D T F E H **M** I E E L

Figura 3 - Polimorfismos de DNA: microssatélites são sequências de bases que se repetem. Existe uma grande diversidade de microssatélites em nosso genoma, dentre eles microssatélites de 2, 3 ou 4 bases, ou de maior número de bases. Inserções ou deleções de sequências de bases podem ou não ocorrer entre indivíduos. *SNPs* são os mais comumente encontrados no genoma humano. Muitos ocorrem em regiões intrônicas ou intergênicas, não tendo grandes repercussões funcionais. Quando ocorrem em regiões codificadoras de genes, podem resultar na alteração de um aminoácido da proteína (*SNPs* não sinônimos); podem também ocorrer em regiões promotoras, resultando na alteração da expressão de genes, bem como em sítios de *splicing* do RNA.

Os alvos mais importantes da farmacogenética são os genes que codificam enzimas responsáveis pela farmacocinética (absorção, metabolismo e excreção) e também, genes responsáveis pela farmacodinâmica (interação com receptores) dos medicamentos (Enson et al., 2001; McMacarthy et al., 2005; Hines et al., 2008). A atividade das enzimas metabolizadoras de medicamentos pode ser estudada *in vivo*. Um dos métodos para a predição do fenótipo de resposta a medicamentos é a fenotipagem que consiste na determinação do índice metabólico do indivíduo, ou seja, da quantidade do medicamento excretado não metabolizado em relação à quantidade de metabólito. Uma substância teste (*probe drug*) é administrada ao indivíduo e depois de um período determinado, colhe-se urina para a verificação do índice metabólico. Uma variação deste método é a verificação da taxa metabólica no plasma. A razão entre a quantidade de medicamento não metabolizado e do seu metabólito é então determinada por meio de métodos cromatográficos. Em um experimento típico de fenotipagem, uma dose da substância-teste é administrada oralmente e a urina é coletada de 8 a 24 horas depois. As concentrações da substância não metabolizada e de seus metabólitos são determinadas e o índice metabólico é calculado. O índice metabólico é a porcentagem da substância não metabolizada excretada dividida pela porcentagem do seu metabólito excretado. Ao se estudar populações, é possível visualizar a frequência da distribuição dos fenótipos em um histograma (Figura 4) (Black et al., 2007).

Figura 4 - Fenótipos da enzima CYP2D6. Quatro fenótipos foram observados em um estudo realizado com a substância-teste esparteína. A média e o alcance do índice metabólico (MR – metabolic ratio) da esparteína correspondem aos genótipos com um, dois, três ou nenhum alelo funcional. O “1/2” indica a presença de um alelo funcional e um de atividade reduzida (adaptado de Bernard et al., 2006).

Os genes que codificam enzimas metabolizadoras de medicamentos exibem um papel importante devido a sua grande influência na eliminação de xenobióticos. De modo geral, conforme a característica observada na atividade enzimática do indivíduo, o fenótipo pode ser dividido em quatro categorias: metabolizadores lentos (PMs – *poor metabolizers*), metabolizadores intermediários (IMs – *intermediate metabolizers*), metabolizadores extensivos (EMs – *extensive metabolizers*) e metabolizadores ultrarrápidos (UMs – *ultrarapid metabolizers*) (Rogers et al., 2002) (Figura 5). Esta classificação pode mudar de acordo com o gene estudado.

Figura 5 - Representação esquemática da atividade enzimática da CYP2D6 (adaptado de: <<http://www.signaturegenetics.com/public/2/226.html>>). (a) A atividade enzimática de indivíduos com duas cópias normais do gene é a padrão, apresentando um fenótipo normal. (b) em indivíduos com alelos variantes que codificam uma proteína de atividade reduzida, a atividade enzimática não consegue ser suficiente para atingir o padrão caracterizando um fenótipo intermediário. (c) Indivíduos com alelos não funcionais, não codificam uma proteína com atividade apresentando um fenótipo lento. (d) Três ou mais cópias funcionais do gene provocam um aumento além do padrão normal, da atividade enzimática.

Indivíduos que possuem enzimas não funcionais ou inativas, são considerados PMs. Pró-fármacos, que requerem biotransformação para serem ativados, com frequência não cumprem seu papel terapêutico nestes pacientes. A toxicidade do fármaco também pode ser observada em pacientes PMs devido à depuração insatisfatória dos medicamentos. IMs são os pacientes que apresentam atividade enzimática deficiente e desse modo, diminuído metabolismo. EMs são os pacientes com atividade enzimática normal (extensiva), no qual é esperado que a resposta ao medicamento seja observada em doses usuais (padrão). UMs são pacientes que tem atividade enzimática

aumentada, devido a uma maior expressão enzimática (Figura 6). Doses normais de medicamentos para pacientes UMs podem ocasionar uma resposta reduzida ao medicamento, levando a falha terapêutica ou reações tóxicas ao se utilizar pró-fármacos (Rogers et al., 2002).

Figura 6 - Representação do *steady-state* baseado no genótipo de CYP2D6. PMs apresentam uma elevada concentração plasmática em relação ao normal e UMs apresentam uma diminuída concentração não atingindo o nível terapêutico (Adaptado de Steimer, 2010).

Polimorfismos que conduzem à perda de função de enzimas metabolizadoras de medicamentos resultam em uma maior concentração plasmática dos mesmos. Se tais concentrações são associadas à grande probabilidade de efeitos tóxicos, é altamente provável que o paciente que possui este genótipo, desenvolva os efeitos tóxicos com a mesma dose administrada a pacientes que possuem o tipo selvagem (*wild-type*) de alelos desse gene. Contudo, se um paciente que não possui o polimorfismo é concomitantemente

tratado com um medicamento que inibe a enzima, mostrará um fenótipo (alta concentração da droga) igual ao de pacientes que possuem dois alelos não funcionais para o gene, um fenômeno chamado fotocópia (*phenocopying*) (Eichelbaum et al., 2006).

Liao et al. (2008), mostrou uma simulação quantitativa indicando que a utilização da informação farmacogenômica melhoraria o tratamento e reduziria a suspensão dos estudos de novos medicamentos na fase clínica. Durante esta simulação de ensaio clínico, a duração do tratamento, bem como a determinação do número de indivíduos que atingiram o nível terapêutico, melhoraram quando testes farmacogenéticos foram usados para individualização da dose. Desse modo, a pesquisa em farmacogenética visa ajudar na prescrição do medicamento correto em doses apropriadas, a fim de atingir a máxima eficácia com a mínima toxicidade, baseada em um teste genético, geralmente realizado antes do início da terapia.

Sendo assim, ao se investigar os polimorfismos associados com o efeito do medicamento no paciente, podem-se adaptar as decisões clínicas e terapêuticas para o fenótipo. Esta estratégia de determinar a terapia medicamentosa de acordo com a constituição genética do paciente é chamada de “medicina personalizada” (McMacarthy et al., 2005; Koo et al., 2006). Portanto, a farmacogenética e a farmacogenômica têm o potencial de melhorar a qualidade e a segurança dos medicamentos, a eficiência do desenvolvimento de medicamentos e o tratamento de pacientes.

1.3.1 Farmacocinética

A farmacocinética engloba a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco. Polimorfismos em genes responsáveis por estes processos podem resultar em mudanças na biodisponibilidade do medicamento, ou seja, variações no nível plasmático ou na concentração do medicamento e seus metabólitos no sítio de ação (Binder e Holsboer, 2006; Arranz e Kapur, 2008).

O metabolismo dos medicamentos (ou reações de biotransformação) é classificado como: reações de fase 1 ou reações de fase 2.

As reações de fase 1 são catabólicas (oxidação, redução ou hidrólise) e tem a finalidade de aumentar a hidrossolubilidade dos compostos, para que se tornem moléculas inativas ou para que moléculas originalmente inativas tornem-se ativas (pró-fármacos). As reações de fase 2 são sintéticas (anabólicas) e envolvem a conjugação, que habitualmente resulta em produtos inativos. Tais enzimas podem apresentar polimorfismos genéticos relevantes para o metabolismo de fármacos.

a) Sistema do citocromo P450 (CYP450)

A superfamília das CYPs tem sido o foco da maioria das pesquisas farmacogenéticas. Isso é devido ao fato delas representarem as mais importantes enzimas de fase 1 e por serem responsáveis pelo metabolismo de substâncias endógenas e xenobióticos, incluindo mais de 60% de todas as medicações geralmente utilizadas (Zhou et al., 2008). Os polimorfismos das enzimas do citocromo P450 têm mostrado um grande efeito nas variações das respostas a medicamentos usados no tratamento de muitas doenças, tais como: depressão, psicoses, câncer, doenças cardiovasculares e gastrintestinais, dor, epilepsia, entre outras (Zanger et al., 2008).

As enzimas CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 e são responsáveis por aproximadamente 75% do metabolismo de fase 1 dos duzentos medicamentos mais vendidos (psicotrópicos ou não) Cerca de 40% do metabolismo é realizado principalmente pelas enzimas altamente polimórficas CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 (Zanger et al., 2008). As bases genéticas dos polimorfismos nestes genes são SNPs, inserções, deleções e variações no número de cópias, *CVN – Copy Number Variations*.

As enzimas do citocromo P450 diferem umas das outras na sua sequência de aminoácidos, na regulação por inibidores e agentes indutores e na especificidade das reações que catalisam. Estas enzimas possuem

propriedades espectrais singulares; quando reduzidas e ligadas ao monóxido de carbono apresentam um composto rosado (daí o “P” de *pink*, rosa), com absorção de luz máxima no comprimento de onda 450 nm (Hang et al., 2003).

A nomenclatura para as isoenzimas do CYP450 é baseada no agrupamento das enzimas e genes em famílias e subfamílias com o prefixo CYP designando citocromo P450 (*mammalian cytochrome* P450). As famílias são identificadas por um número arábico (exemplo: CYP2) e as subfamílias são indicadas por uma letra (CYP2D). A enzima individual é caracterizada por um algarismo arábico, como em CYP2D6 (Poolsup et al., 2000). Membros únicos das subfamílias representam um gene em particular (*CYP2D6*, por exemplo). Um asterisco seguido de um número designa o alelo (*1 e *2, dois alelos). O alelo *1 é conhecido como o tipo-selvagem (*wild-type*) e denota atividade enzimática normal (Rogers et al., 2002). Os alelos das isoenzimas P450 são descritos em um site internacional e de livre acesso: <<http://www.cypalleles.ki.se/>>.

Existem pelo menos 57 genes CYP em humanos e aproximadamente o mesmo número de pseudogenes, os quais estão agrupados em 18 famílias e 44 subfamílias de acordo com a similaridade das suas sequências (Zanger et al., 2008).

O fígado contém a maior quantidade das CYPs; elas também são expressas no trato gastrointestinal e em pequenas proporções nos pulmões rins e sistema nervoso central (Neve e Ingelman-Sundberg, 2008).

O mecanismo da oxidação das substâncias pelo sistema do citocromo P450 envolve um complexo ciclo (Figura 7), porém o efeito final global da reação é simples. Em geral, a reação catalisada pelas enzimas do citocromo P450 apresenta a seguinte estequiometria (Poolsup et al., 2000):

Esta reação exige a presença do substrato (“RH”), da enzima P450, de oxigênio molecular (O₂), NADPH e uma flavoproteína (NADPH-P450 redutase). O ferro heme se liga ao oxigênio no sítio ativo da CYP, onde a oxidação dos substratos ocorre. Elétrons são cedidos pela enzima NADPH-P450 redutase e seu cofator, NADPH. O metabolismo de um substrato pela CYP consome uma

molécula de O_2 produzindo um substrato oxidado e uma molécula de água (Martinus et al., 2000; Hang et al., 2003).

Figura 7 - Ciclo catalítico do CYP450. O P450, que contém ferro na forma férrica (Fe^{3+}), combina-se com uma molécula de medicamento (RH), recebe um elétron da NADPH-P450 redutase, que reduz o ferro a Fe^{2+} , combina-se com o oxigênio molecular, um próton e um segundo elétron (da NADPH-P450 redutase ou do citocromo b_5) para formar um complexo $Fe^{2+}OOH \cdot RH$. Esse complexo combina-se com outro próton, produzindo água e um complexo oxeno férrico $(FeO^{3+})RH$. O (FeO^{3+}) extrai um átomo de hidrogênio do RH, com formação de um par de radicais livres de vida curta, liberação do medicamento oxidado (ROH) do complexo e regeneração da enzima P-450 (adaptado de Hang et al., 2003).

Entre as diversas reações feitas pelas CYPs em mamíferos, estão a *N*-desalquilação, *O*-desalquilação, hidroxilação aromática, *N*-oxidação, *S*-oxidação, desaminação e desalogenação (Brunton e Parker, 2008).

As CYPs estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos, componentes alimentares, além da síntese de substâncias endógenas derivadas do colesterol (hormônios esteroidais e ácidos biliares). As CYPs que metabolizam xenobióticos possuem a capacidade de metabolizar um grande número de moléculas estruturalmente diferentes, o que se deve às múltiplas formas de CYPs e à capacidade de uma única CYP metabolizar substratos estruturalmente

diferentes. Um único composto pode ser metabolizado por várias CYPs e várias CYPs podem metabolizar um único composto em várias posições (Hang et al., 2003). A grande flexibilidade de metabolização das CYPs deve-se ao seu grande e fluído sítio de ligação ao substrato, ocorrendo a um custo de relativa diminuição nas taxas de catalisação. A grande especificidade de substratos das CYPs é uma das razões para as altas frequências de interações medicamentosas. Quando dois medicamentos que são metabolizados pela mesma CYP são administrados em conjunto, eles competem pelo sítio ativo da enzima. Isto pode resultar na inibição do metabolismo de um ou ambos os medicamentos, levando ao aumento dos níveis plasmáticos. Para medicamentos com um pequeno índice terapêutico, uma elevada concentração plasmática pode causar toxicidade. Interações medicamentosas são as principais causas de *ADRs* (Brunton e Parker, 2008).

De acordo com Lynch et al. (2007), o conhecimento do fenótipo de resposta ao medicamento deve ser aplicado para evitar as interações medicamentosas que podem resultar em alterações no metabolismo das enzimas CYP450. Em indivíduos PMs, os *ADRs* podem ser agravados com a adição de um inibidor das enzimas do citocromo na sua terapia. Medicamentos que causam interações metabólicas com o P450 são referidos como inibidores ou indutores.

As principais enzimas da família do citocromo P450 são as enzimas CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6, responsáveis pelo metabolismo de mais de 40% dos 200 medicamentos mais prescritos nos Estados Unidos (Figura 8) (Quadro 5) (Zanger et al., 2008). As enzimas CYP3A4 e CYP3A5, apesar de serem responsáveis por cerca de 37% do metabolismo dos fármacos, são pouco específicas, e provavelmente tem um pequeno impacto no metabolismo.

Figura 8 - Percentual de CYPs responsáveis pelo metabolismo de fase 1 dos 200 medicamentos mais prescritos.

Quadro 5 - Medicamentos metabolizados pelas enzimas CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9 (continua).

Medicamentos	Metabolismo		
	CYP2D6	CYP2C19	CYP2C9
ANTIDEPRESSIVOS			
Amitriptilina	X	X	
Clomipramina	X	X	
Desimipramina	X		
Imipramina	X	X	
Nortriptilina	X	X	
Citalopram		X	
Escitalopram		X	
Fluoxetina	X	X	X
Fluvoxamina	X		
Paroxetina	X		
Sertralina		X	
Venlafaxina	X		
ANSIOLÍTICOS			
Diazepam		X	
Flunitrazepam		X	

Quadro 5 - Medicamentos metabolizados pelas enzimas CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9 (continuação).

Medicamentos	Metabolismo		
	CYP2D6	CYP2C19	CYP2C9
ANTICONVULSIVANTES			
Fenitoína		X	X
Valproato			X
ANTIPSICÓTICOS			
Aripiprazol	X		
Haloperidol	X		
Risperidona	X		
Tioridazina	X		
ANTIARRÍTMICOS			
Flecainida	X		
Propafenona	X		
ANTI-HIPERTENSIVOS			
lbesartan			X
Losartan			X
ANTICOAGULANTES			
Warfarina			X
Clopidogrel		X	
BETA BLOQUEADORES			
Metoprolol	X		
Carvedilol	X		
HIPOGLICEMIANTES			
Glimepirida			X
Glipizida			X

Quadro 5 - Medicamentos metabolizados pelas enzimas CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9 (final).

Medicamentos	Metabolismo		
	CYP2D6	CYP2C19	CYP2C9
ANALGÉSICOS/ANTIINFLAMATÓRIOS			
Codeína	X		
Tramadol	X		
Hidrocodona	X		
Ibuprofeno			X
Meloxicam			X
Piroxicam			X
QUIMIOTERAPIA CONTRA O CÂNCER			
Tamoxifeno	X		
Vimblastina	X		
INIBIDORES DE BOMBA DE PRÓTON			
Omeprazol		X	
Lanzoprazol		X	
Pantoprazol		X	
ANTAGONISTA DE 5-HT3			
Ondasedrona	X		

FONTE: Zanger et al., 2008; Preskorn et al., 2008; <<http://www.signaturegenetics.com/public/4/411.html#21112>>.

- **CYP2D6**

Entre os genes que codificam enzimas metabolizadoras de medicamentos, *CYP2D6* (citocromo P450, família 2, subfamília D, polipeptídeo 6) é um dos melhores caracterizados (Sabbagh et al., 2006; Naveen et al., 2006a). Este gene codifica a enzima CYP2D6 que é responsável pelo metabolismo de aproximadamente 25% dos medicamentos mais utilizados que incluem os betabloqueadores, antiarrítmicos, opióides e um grande número de antidepressivos (TCAs, SSRIs), antipsicóticos e fármacos utilizados na

quimioterapia do câncer (Ingelman-Sundberg, 2005; Sabbagh et al., 2006; Goetz et al., 2008).

A enzima CYP2D6, polipeptídeo composto por 497 aminoácidos, representa uma pequena porcentagem de todas as CYPs hepáticas. Os substratos da CYP2D6 são bases lipofílicas com um átomo de nitrogênio protonável. A reação de hidroxilação acontece a uma distância de 5 ou 7 Å do átomo de nitrogênio (Ingelman-Sundberg, 2004). Esta enzima tem uma grande afinidade por alcaloides e é a única entre as CYPs que não sofre indução e, portanto, sua variação genética contribui para a variação da atividade enzimática (Ingelman-Sundberg, 2005).

O gene *CYP2D6* está localizado no cromossomo 22q13.1 e é constituído por nove éxons e 4.378 pb (pares de bases) (Kimura et al., 1989). *CYP2D6* pertence a um cluster gênico de dois pseudogenes altamente similares: *CYP2D7* e *CYP2D8* (Zou et al., 2008).

CYP2D6 é um gene altamente polimórfico com mais de 90 variações e subvariações alélicas identificadas até o momento. As frequências alélicas do gene *CYP2D6* mostram-se bastante diferentes dentro de uma mesma população e entre diferentes grupos étnicos (Sistonen et al., 2007) (Tabela 1). Essas variações alélicas são resultantes de alterações pontuais (*SNPs*), deleções ou inserções, deleção ou multiplicação do gene inteiro (Sabbagh et al., 2006). O efeito causado por tais polimorfismos depende do medicamento e da variante alélica envolvida.

Tabela 1 - Principais alelos *CYP2D6*. Efeito no metabolismo enzimático e frequências (%) alélicas em algumas populações.

	Alelos <i>CYP2D6</i> (%)												
	Funcionais			Não-funcionais			Função reduzida						
Populações	*1	*2	*3	*4	*5	*6	*9	*10	*17	*29	*41	XN	Referência
África Subsaariana	24	33	-	3	6	-	0	4	12	7	3	7	Sistonen et al. (2007)
África Oriental (A)	-	27	0	3	4	0	0	5	18	18	0	13	Sistonen et al. (2009)
Oriente Médio	35	25	-	7	4	1	0	1	2	-	17	7	Sistonen et al. (2007)
Sul da Índia	-	35	0	7	2	-	-	10	0	-	-	-	Naveen et al. (2006)
Ásia central/sul	43	29	-	8	4	-	0	4	-	0	11	1	Sistonen et al. (2007)
Ásia ocidental (C)	-	30	0	7	3	1	0	4	2	0	17	8	Sistonen et al. (2009)
China e Japão	-	16	0	4	6	0	0	38	0	0	4	2	Sistonen et al. (2009)
Japão	-	13	0	0	6	-	-	39	0	-	-	-	Kubota et al. (2000)
Europa	34	29	0	17	3	1	3	3	-	-	7	3	Sistonen et al. (2007)
Sul da Europa (B)	-	30	2	17	2	1	2	2	0	0	5	3	Sistonen et al. (2009)
França e Alemanha	-	30	1	19	5	1	4	3	0	0	7	2	Sistonen et al. (2009)
América	60	30	-	3	1	-	0	-	1	-	-	5	Sistonen et al. (2007)
América central	-	22	0	10	1	0	0	7	1	0	0	6	Sistonen et al. (2009)
Argentina e Paraguai	40	24	0	18	-	-	-	3 a 14	-	-	-	-	Baillet et al. (2007)
Brasil (D)	38	18	1	13	2	1	2	2	1	-	8	5	Kohlausch et al. (2008)

(A) Zimbábue, Tanzânia, Etiópia, (B) Grécia, Croácia, Itália, Espanha; (C) Turquia, Israel, Arábia Saudita, Iêmen; (D) Rio Grande do Sul, Brasil. "XN" significa alelo multiplicado.

A atividade enzimática da *CYP2D6* abrange desde a completa deficiência enzimática até o metabolismo ultrarrápido de substâncias (Bernard et al., 2006; Sabbagh et al., 2006).

O fenótipo da metabolização do medicamento pela CYP2D6 pode ser determinado segundo o índice metabólico (medicamento não metabolizado/metabólito) na urina ou plasma de uma substância-teste (debrisoquina, dextrometorfano ou esparteína) (Zanger et al., 2008).

De acordo com a atividade enzimática de CYP2D6, podem-se identificar quatro fenótipos: PMs, IMs, EMs e UMs. Desse modo, as variações alélicas podem ser associadas com ausência, redução, extensiva (normal) ou aumento de atividade enzimática. Alelos não funcionais são aqueles que não codificam um produto gênico funcional e, portanto, não geram uma enzima com atividade funcional (Bernard et al., 2006; Beverage et al., 2007; Brockmüller et al., 2008).

O alelo IM *CYP2D6**10 apresenta um *SNP* não sinônimo que leva a uma substituição de aminoácido (Pro34Ser) gerando uma proteína instável e assim, uma enzima com atividade reduzida (Zhou et al., 2008). Os alelos não funcionais mais importantes são o *CYP2D6**4 (defeito de *splicing* levando a não formação da proteína) e o *CYP2D6**5 (deleção total do gene), enquanto que, os alelos IMs mais comuns são representados por *10, *17 e *41 (defeito de *splicing*) (Zhou et al., 2008). Este gene está sujeito a muitas variações no número de cópias (*CNVs* – *copy number variations*); já foram identificados alelos com 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 13 cópias. A amplificação do gene pode acontecer com alelos PMs, IMs e EMs (Ingelman-Sundberg et al., 2005; Bertilsson, 2007).

O fenótipo EM é encontrado na maioria da população mundial e é por isso considerado normal. Indivíduos definidos como PMs metabolizam os medicamentos mais lentamente. O fenótipo IM possui uma taxa de metabolismo entre EM e PM. Já o fenótipo UM apresenta um excesso de atividade enzimática e pode levar à perda do efeito terapêutico do medicamento em doses usuais (Sabbagh et al., 2006; Bernard et al., 2006) ou reações tóxicas ao se utilizar pró-fármacos (Rogers et al., 2002). Estes quatro fenótipos principais ocorrem em diferentes frequências entre distintos grupos étnicos (Sistonen et al., 2007).

A Europa é caracterizada pela mais alta frequência de fenótipos PM (8%) (Sistonen et al., 2007). Geralmente, caucasianos têm a frequência mais alta do fenótipo PM, com britânicos e suíços representando incidências de 8,9% e 10% respectivamente (Lopez et al., 2005; Bernard et al., 2006). Na população asiática, a frequência de PMs é relativamente baixa entre chineses e japoneses

(0-1% ,2%) (Kubota et al., 2000; Bernard et al., 2006). A prevalência de PMs na população africana difere muito, com uma estimativa de variação entre 0-19%. Em afro-americanos a incidência de PMs está entre 1,9-7,3%. Em hispânicos, a prevalência de PMs está entre 2,2%-6,6% (Lopez et al., 2005; Bernard et al., 2006). O segundo grupo metabólico mais comum no norte da África, parte da Europa e América é o fenótipo UM (40%, 12% e 8% respectivamente). As variações de função diminuída, *10, *17 e *41, levam a um elevado número de IMs no leste da Ásia, África e parte da Europa, maiores que em outras regiões (Sistonem et al., 2007). Enquanto os alelos PMs são encontrados principalmente na Europa, os UMs (multiplicação de alelo ativo) são comuns no norte da África (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequências (%) fenotípicas de UMs e PMs para *CYP2D6* em diferentes populações.

Populações	Fenótipos <i>CYP2D6</i> (%)		Referência
	PM	UM	
Europa	8	12	Sistonem et al. (2007)
Britânicos	9		Lopez et al. (2005); Bernard et al. (2006)
Suíços	10		Lopez et al. (2005); Bernard et al. (2006)
África	0 a 19		Lopez et al. (2005); Bernard et al. (2006)
Norte da África		40	Sistonem et al. (2007)
América		8	Sistonem et al. (2007)
Afro-americanos	2 a 7		Lopez et al. (2005); Bernard et al. (2006)
Hispânicos	2 a 7		Lopez et al. (2005); Bernard et al. (2006)
Chineses	1		Kubota et al. (2000); Bernard et al. (2006)
Japoneses	2		Kubota et al. (2000); Bernard et al. (2006)

Estudos farmacoepidemiológicos com antidepressivos metabolizados pela *CYP2D6* confirmam que as variações do nível plasmático dos medicamentos e metabólitos, são muitas vezes determinados pelo gene *CYP2D6*. A maioria dos *ADRs* graves ocorre na prática clínica quando são

prescritos tratamentos com SSRIs dependentes do metabolismo da CYP2D6 e podem ser correlacionados com alelos CYP2D6 UMs ou PMs (Maier et al., 2008).

No Japão, Ueda et al. (2006), estudou a influência dos genótipos de *CYP2D6* na concentração plasmática do antidepressivo paroxetina em 55 pacientes. Foram administradas doses de 10 a 40 mg de paroxetina por dia e estas foram mantidas por duas semanas para que a concentração plasmática constante (*steady-state*) fosse atingida. Os indivíduos foram genotipados para os alelos *1, *2, *10, *5 e *41 e a determinação da concentração plasmática da paroxetina foi realizada por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência). Este estudo constatou que, existe uma diferença significativa dos níveis plasmáticos de paroxetina entre os três grupos de genótipos (dois alelos funcionais, um alelo funcional e nenhum alelo funcional) observados. Contudo, esta diferença somente foi detectada nos pacientes tratados com 30 mg/dia do medicamento (Figura 9). Os autores concluíram que possuir um alelo não funcional pode ser um indicador de uma elevada concentração plasmática de paroxetina quando doses relativamente altas (30 mg/dia) são administradas.

Figura 9 - Relação entre o número de alelos funcionais do gene *CYP2D6* e o *steady-state* da paroxetina corrigidas para a dose diária e massa corpórea (BW). Diferenças significativas na concentração plasmática de paroxetina foram encontradas em pacientes tratados com 30 mg/dia do medicamento. As concentrações plasmáticas em pacientes com apenas um alelo funcional foram superiores às de pacientes com um ou nenhum alelo funcional (adaptado de Ueda et al., 2006). Os números 2, 1 e 0 correspondem a 2 alelos funcionais, 1 alelo funcional e nenhum alelo funcional.

A venlafaxina (V), um antidepressivo que inibe a recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina, é metabolizada pela enzima CYP2D6 em O-desmetilvenlafaxina (ODV) (um metabólito também ativo) que sofre ação de outras enzimas CYPs, entre elas a CYP2C19, para a formação de metabólitos inativos. A concentração plasmática de venlafaxina e ODV depende principalmente da atividade enzimática da CYP2D6, sugerindo que a resposta ao tratamento e os *ADRs* também estão relacionados ao genótipo *CYP2D6* (Thuerlauf, 2006). Shams et al. (2006) realizou um estudo com 100 pacientes tratados com venlafaxina; os que apresentaram índices metabólicos anormais foram genotipados para o gene *CYP2D6*. Este estudo revelou uma correlação significativa entre o genótipo-fenótipo de *CYP2D6* (Figura 10) com UMs apresentando uma elevada concentração plasmática do metabólito ODV quando comparado a EMs; PMs e IMs, apresentaram uma pequena concentração do metabólito. O ajuste da dose ou a seleção de um antidepressivo alternativo (que não seja substrato da enzima CYP2D6), foi considerado para pacientes com o genótipo PM e que por isso, apresentavam *ADRs* induzidos pela elevada concentração plasmática de venlafaxina.

Figura 10 - Relação entre o genótipo de *CYP2D6* e o índice metabólico ODV/V em pacientes que atingiram o steady-state para o medicamento venlafaxina (adaptado de Shams et al., 2006). PM, IM, EM e UM correspondem aos genótipos de metabolizadores lentos, intermediários, extensivos e ultrarrápidos.

Laika et al. (2009), realizou um estudo com o objetivo de verificar o impacto do gene *CYP2D6* na resposta terapêutica e nos efeitos colaterais, apresentados por pacientes psiquiátricos que eram tratados com neurolépticos ou antidepressivos (30% estavam tomando pelo menos um substrato da *CYP2D6*). Foram coletadas informações quanto à dose, resposta terapêutica e efeitos colaterais em 4 semanas de tratamento para 353 pacientes. A genotipagem do *CYP2D6* encontrou 8,5% PMs, 37,8% IMs, 50,6% EMs e 3,0% UMs. O grupo constatou que pacientes tratados com medicamentos substratos da *CYP2D6* tiveram um maior tempo de internação e atraso na resposta terapêutica quando comparados a pacientes tratados com outros medicamentos. A comparação entre IMs e EMs mostrou que IMs tratados com doses máximas de substratos da *CYP2D6* apresentaram mais efeitos colaterais que IMs tratados com doses mínimas; EMs tratados com doses máximas de substratos da *CYP2D6* e IMs tratados com outras medicações. Os resultados encontrados pelo grupo indicam que a genotipagem pode ser útil, não somente para pacientes PMs (devido aos efeitos colaterais) ou para os UMs (falha terapêutica) mas também para IMs e EMs. Enquanto EMs podem tolerar doses máximas de medicamentos, IMs apresentam uma maior tendência a sofrer de efeitos colaterais quando tratados com doses máximas. Assim, concluiu-se que não apenas PMs e UMs são beneficiados com a genotipagem, mas todos os pacientes tratados com medicamentos metabolizados pela *CYP2D6*. A genotipagem prévia melhora a relação custo-benefício do tratamento, pois, além de prevenir o aparecimento de efeitos colaterais, pode ajudar a reduzir o tempo e o custo do tratamento.

Muitos antidepressivos tricíclicos (TCAs - *Tricyclic Antidepressants*) são melhores metabolizados pela *CYP2D6* do que qualquer outra CYP (Steimer et al., 2005; Zanger et al., 2008); entretanto, alguns TCAs como a amitriptilina, imipramina, e clomipramina são também metabolizados pela *CYP2C19* (Steimer et al., 2005; Bertilsson, 2007). Segundo Kirchheiner et al. (2004), pacientes que utilizam TCAs podem se beneficiar da genotipagem se forem indivíduos PMs ou UMs para *CYP2D6*. PMs têm neste caso, 50% ou mais dos valores diminuídos na depuração para amitriptilina, clomipramina, desipramina, imipramina e nortriptilina.

Alguns inibidores seletivos de recaptação de serotonina (SSRI – *selective serotonin reuptake inhibitors*) como a fluoxetina, fluvoxamina, e paroxetina são potentes inibidores da enzima CYP2D6. Portanto, múltiplas doses causam uma auto inibição da CYP2D6 e uma conversão do EM ao fenótipo IM ou do fenótipo UM para o fenótipo EM. Os mesmos autores observaram que nenhuma influência foi descrita para os polimorfismos de *CYP2D6* sob parâmetros farmacocinéticos dos SSRIs sertralina e citalopram. No grupo dos SSRIs, a inibição da CYP é um problema para as interações medicamentosas, mas para os polimorfismos do gene *CYP2D6* têm menos efeito e o ajuste de dose baseado no genótipo não parece ser útil para este grupo de antidepressivos (com exceção da paroxetina) (Tomalik-Scharte et al., 2008).

Muitos antipsicóticos como a risperidona, clorpromazina, tioridazina (Murray, 2006), também são metabolizados pela CYP2D6 (Bertilsson, 2007). Os níveis plasmáticos da flufenazina e do haloperidol são influenciados por esta enzima. Estes medicamentos têm um pequeno índice terapêutico e os *ADRs* são influenciados pelos polimorfismos do gene *CYP2D6* (Dorado et al., 2007).

• **CYP2C19**

O gene *CYP2C19* (Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 19), codifica a enzima CYP2C19 responsável pelo metabolismo de aproximadamente 10% dos medicamentos mais comumente utilizados, incluindo os inibidores de bomba de próton (*PPIs – Proton Pump Inhibitors*) como omeprazol, lansoprazol e pantoprazol; benzodiazepínicos (diazepam, flunitrazepam) e os anticonvulsivantes fenitoína, fenobarbital (Brockmöller et al., 2008; Zhou et al., 2008). O fenótipo de CYP2C19 também afeta a farmacocinética dos antidepressivos tricíclicos amitriptilina, nortriptilina e clomipramina e dos SSRIs sertralina e citalopram (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Zanger et al., 2008).

A enzima CYP2C19 é uma proteína de 490 aminoácidos, codificada pelo gene *CYP2C19* que possui 9 éxons, 90.209 pares de bases e está localizado no

cromossomo 10 (10q24. 1-q24.3). Até o momento, cerca de 20 variações alélicas foram identificadas para *CYP2C19* (Zhou et al., 2008). Os substratos da *CYP2C19* são bases fracas ou amidas (Zanger et al., 2008).

As relações entre genótipo e fenótipo para *CYP2C19* conhecidas são baseadas na identificação do fenótipo EM e PM para o substrato 4-hidroximetilfenitoína que são determinados por polimorfismos genéticos (Justenhoven et al., 2008). O fenótipo PM é o resultado de dois alelos não funcionais, o que leva a codificação de uma proteína inativa, enquanto que EMs possuem pelo menos um alelo funcional (Sugimoto et al., 2008; Zanger et al., 2008).

O alelo *CYP2C19**2 foi a primeira variação alélica a ser identificada e apresenta um *SNP* no éxon 5 que leva a um defeito de *splicing* e consequentemente uma proteína sem atividade funcional. O alelo *CYP2C19**3 apresenta um *SNP* que resulta em um *stop códon* prematuro no éxon 4. Ambos *CYP2C19**2 e *3 são alelos não funcionais, que resultam em ausência de atividade enzimática. A maioria dos PMs de *CYP2C19* deve-se a estas duas variações alélicas (Justenhoven et al., 2008; Zhou et al., 2008).

O fenótipo UM foi identificado por Sim et al. (2006), com base em observações de variações na resposta a medicamento em indivíduos EMs, sendo provocado pelo alelo *CYP2C19**17 que apresenta *SNPs* na região promotora do gene, levando a um aumento da sua transcrição. Para este estudo, os indivíduos tiveram sua taxa metabólica determinada com as substâncias-teste para o gene *CYP2C19* no caso, omeprazol e mefenitoína. O índice metabólico (MR – *Metabolic Ratio*) do omeprazol para homozigotos *CYP2C19**1 foi duas vezes maior do que em homozigotos para o alelo *17 e 1,2 vezes maior do que em heterozigotos *1*17 [Figura 11, item (A)]. Para o fármaco mefenitoína (mistura racêmica S/R-mefenitoína), o índice metabólico em homozigotos para o alelo *1 foi 4,3 vezes maior quando comparados a homozigotos *CYP2C19**17 enquanto que, a média do índice metabólico em indivíduos com o genótipo *1*17 foi 3,7 vezes maior do que em homozigotos para o alelo *17 [Figura 11, item (B)].

Figura 11 - Distribuição do índice metabólico (MR – *metabolic ratio*) do omeprazol e S/R-mefenitoína em relação ao genótipo *CYP2C19**17. As barras representam as médias. O fenótipo PM (metabolizador lento) e indivíduos com alelos *2 e *3 foram excluídos do estudo (Sim et al., 2006).

A existência do alelo *17 pode explicar porque indivíduos apresentam diferenças nas respostas a alguns antidepressivos e *PPIs* devido a uma incomum depuração acelerada nesses medicamentos (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Rudberg et al., 2007; Justenhoven et al., 2008). Os polimorfismos do alelo *17, nas posições -3402 (C>T) e -806 (C>T) estão em completo desequilíbrio de ligação (Sim et al., 2006). Homozigotos para o alelo *CYP2C19**17 metabolizam fenitoína e omeprazol, duas droga-teste da enzima *CYP2C19*, mais rapidamente que homozigotos para o alelo *CYP2C19* *1 (Ohlsson Rosenborg et al., 2008).

De acordo com Rudberg et al. (2007), indivíduos homozigotos para o alelo *CYP2C19**17 têm uma diminuição na concentração plasmática do escitalopram quando comparados a homozigotos para o alelo selvagem (*1), sugerindo que pacientes com o genótipo *17*17 atinjam menos de 2/3 do *steady-state* que pacientes *1*1. Assim, um indivíduo homozigoto para o alelo *17 necessitará de uma dose 50% maior de escitalopram para atingir uma concentração plasmática semelhante ao indivíduo *1*1. Este estudo constatou que o grupo de indivíduos PMs apresenta uma concentração plasmática de escitalopram 5 a 7 vezes maior que os EMs. Isto tem um efeito substancialmente maior do que a redução de 42% da concentração plasmática em homozigotos para o alelo *17. Além disso, alelos *CYP2C19* não funcionais parecem ter um maior efeito no metabolismo enzimático do que o alelo *17. Pacientes heterozigotos para o alelo *17 e um alelo PM possuem uma concentração plasmática similar a indivíduos com genótipo *1*1 (Figura 12).

Figura 12 - Concentrações plasmáticas de escitalopram em relação ao genótipo *CYP2C19*. ("def" neste exemplo, representa um alelo sem atividade como o *2 ou *3 do gene *CYP2C19*).

Até o momento, nenhum efeito significativo do genótipo de *CYP2C19* na resposta ao tratamento com antidepressivos foi mostrado, contudo, o risco de

ADRs foi associado com o genótipo de *CYP2C19* durante o tratamento com amitriptilina (Steimer et al., 2005).

Cerca de 3 a 5% de caucasianos e africanos e até 20% dos asiáticos possuem dois alelos não funcionais, sendo que os mais comuns são *CYP2C19**2, o qual ocorre em caucasianos e negros; e *CYP2C19**3 que ocorre principalmente em asiáticos (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Brockmöller et al., 2008).

A frequência do alelo *2 é de aproximadamente 17% em afro-americanos, 30% em chineses e cerca de 15% em caucasianos. O alelo *3 é mais frequente em chineses (5%) e menos frequente em afro-americanos (0,4%) e caucasianos (0,04%). O alelo *CYP2C19**17 está presente em chineses, suecos e etíopes em frequências de 4 a 19% (Zhou et al., 2008) (Tabela 3).

Tabela 3 - Principais alelos *CYP2C19*, efeito no metabolismo enzimático e frequências (%) alélicas em algumas populações.

	Alelos <i>CYP2C19</i>				
	Funcional	Não funcionais		Atividade aumentada	
Populações	*1	*2	*3	*17	Referência
Suécia	-	-	-	18	Sim et al. (2006)
Etiópia	-	-	-	18	Sim et al. (2006)
Noruega	59	18	1	22	Rudberg et al. (2007)
China	70	28	3	1	Chen et al. (2008)
Japão	58	28	13	1	Sugimoto et al. (2008)
Sul da África	-	22	0	-	Sistonen et al. (2009)
África Oriental	-	15	1	-	Sistonen et al. (2009)
Sul da Europa	-	13	0	-	Sistonen et al. (2009)
Europa Oriental	-	14	0	-	Sistonen et al. (2009)
América central	-	10	0	-	Sistonen et al. (2009)

- **CYP2C9**

O gene *CYP2C9* (Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 9), é expresso principalmente no fígado, em níveis que são os mais elevados entre as enzimas *CYP2C* e representa cerca de 20% de todas as *CYPs* hepáticas (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

A enzima *CYP2C9* é uma proteína de 490 aminoácidos, codificada pelo gene *CYP2C9* que possui 8 éxons e está localizado no cromossomo 10 (10q24.1-q24.3). Este gene possui 50.346 pares de bases. Até o momento, cerca de 29 variações alélicas foram identificadas para *CYP2C9* (Zhou et al., 2008). Os substratos da *CYP2C9* são ácidos fracos com um hidrogênio aceptor (Zanger et al., 2008).

Esta enzima está envolvida no metabolismo de aproximadamente 10% dos medicamentos incluindo alguns com pequeno índice terapêutico. Seus substratos incluem os hipoglicemiantes orais, anti-inflamatórios não esteroidais, diuréticos, anticonvulsivantes, inibidores de angiotensina II, antidepressivos, anticoagulantes orais (como a warfarina) entre outros. Além disso, esta enzima está envolvida no metabolismo de substratos endógenos como o ácido araquidônico e o linolênico (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Zhou et al., 2008).

A respeito das variações genéticas, é bem conhecido o fato dos polimorfismos de *CYP2C9* apresentarem consequências funcionais na farmacocinética *in vitro* e *in vivo*, na resposta terapêutica e *ADRs*. Dentre as variantes descritas para este gene, parece que apenas os alelos *2 e *3 determinam seu comportamento polimórfico (Ingelman-Sundberg et al., 2007). As variações alélicas *4 e *5 são pouco frequentes e a relevância clínica das mesmas ainda é pouco conhecida (Kim et al., 2009).

A primeira variação alélica identificada foi o *CYP2C9**2, que apresenta um *SNP* na posição 430T>C que causa uma troca de aminoácido (Arg144Cys) provocando uma diminuição de aproximadamente 20 a 30% da atividade enzimática. O alelo *CYP2C9**3 apresenta um *SNP* no éxon 7, o que também leva a uma troca de aminoácido (Ile359Leu), podendo causar uma redução de 70% da atividade enzimática (Zhou et al., 2008).

As frequências dos alelos *CYP2C9**2 e *CYP2C9**3 variam entre diferentes populações (Tabela 4). Kirchheiner e Brockmoller (2005) relatam que os alelos *2 e *3 estão presentes principalmente em caucasianos (11% e 7%

respectivamente) enquanto que em africanos, a frequência é menor (4% e 2% respectivamente). Em asiáticos, a frequência do alelo *3 é de 3% e o alelo *2 não foi encontrado.

Tabela 4 - Frequências (%) alélicas para *CYP2C9* em diferentes populações.

Populações	Alelos (%)		Referência
	*2	*3	
África Oriental	4	1	Sistonen et al. (2009)
Norte da África	13	10	Sistonen et al. (2009)
Europa	13	7	Sistonen et al. (2009)
Oeste da Ásia	9	9	Sistonen et al. (2009)
Sul da Ásia	1	3	Sistonen et al. (2009)
Norte da América	2	3	Sistonen et al. (2009)
América Central	7	4	Sistonen et al. (2009)
América do Sul	6	4	Sistonen et al. (2009)
Brasil	9	7	Vianna et al. (2004)

Os alelos *2 e *3 afetam a depuração de diferentes medicamentos tais como: S-acenocoumarol, S-warfarina, glimepirida, tolbutamina, losartam, celecoxibe, diclofenaco, ibuprofeno, tenoxicam, fluvastatina, fenitoína (Kirchheiner e Brockmoller, 2005).

O alelo *3 parece ter um maior efeito na farmacocinética do que o alelo *2. Para a maioria dos substratos, indivíduos heterozigotos com um alelo *3 têm aproximadamente 50% da depuração do alelo normal e homozigotos *3 tem uma redução de 5 a 10 vezes da depuração. Para o alelo *2, foi detectado um efeito significativo na depuração dos medicamentos S-warfarina, acenocoumarol, tolbutamida e celecoxibe. Isto sugere que existe uma diferença na especificidade de substrato para as enzimas codificadas pelos alelos *1, *2 e *3. Desse modo, os polimorfismos de *CYP2C9* são clinicamente significantes e também substrato-dependentes (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

De acordo com Zanger et al. (2008), estudos têm demonstrado a significância clínica dos alelos *2 e *3 para a maioria dos substratos já mencionados. Os autores exemplificam que indivíduos que possuem alelos *2 e

*3 tiveram maiores incidências de ADRs como hipoglicemia devido ao uso de hipoglicemiantes, sangramentos gastrointestinais decorrentes da utilização de anti-inflamatórios não esteroidais e severa hemorragia relacionada ao tratamento com warfarina, onde a resposta anticoagulante também depende de variantes no gene da vitamina K epóxi redutase.

Segundo Kirchheiner e Brockmoller (2005), o valor da genotipagem antes do início do tratamento para *CYP2C9* ainda necessita ser confirmada por estudos clínicos nos quais, um grupo de pacientes é tratado levando-se em conta a informação genotípica e outro grupo recebe o tratamento convencional. Além disso, a frequência do genótipo *CYP2C9**3*3, que é realmente um importante indicativo de atividade enzimática reduzida, possui uma prevalência de apenas 0,5% ou até mesmo menor, na maioria das populações. Desse modo, na opinião dos autores, a genotipagem de um grande número de pacientes para identificar apenas uma pequena porção de indivíduos com um real risco de apresentar ADRs não seria econômica a menos que o ADR seja severo e não detectado por meio de nenhum outro monitoramento clínico usual. Para Kirchheiner e Brockmoller (2005) a relação custo-benefício da genotipagem prévia para *CYP2C9* ainda não é evidente.

- **CYP3A4/5**

A subfamília das enzimas CYP3A facilitam o metabolismo e a eliminação de uma grande quantidade de xenobióticos de estruturas diferentes e de 40 a 50% de todos os medicamentos usados na prática clínica, entre eles, imunossupressores como ciclosporina e tacrolimus, antibióticos como eritromicina, benzodiazepínicos, sinvastatina, anestésicos entre outros. Além disso, as enzimas CYP3A também participam do metabolismo de substratos endógenos como ácido retinóico, hormônios esteroidais e ácidos biliares (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Zanger et al., 2008; Zhou et al., 2008). Estas enzimas contribuem para o metabolismo do mais diversos grupos de substratos quando comparadas com as outras CYPs. Seus sítios ativos são grandes e

flexíveis o suficiente para se ligar e metabolizar compostos preferencialmente lipofílicos (Zanger et al., 2008).

Existem quatro genes CYP3A em humanos: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e *CYP3A41*, além de três pseudogenes. Todos os genes *CYP3A* estão localizados em um locus no cromossomo 7q21-22.1 (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

As enzimas CYP3A4 e CYP3A7 apresentam um padrão de expressão oposto durante o desenvolvimento e geralmente, considera-se que a contribuição no metabolismo fetal da CYP3A4 é nula, enquanto que em adultos, o metabolismo da enzima CYP3A4 é muito maior que o da CYP3A7. Por outro lado, o gene CYP3A5 é transcrito no fígado em níveis constantes em todas as fases do desenvolvimento. Portanto, a atividade enzimática das CYP3A em fetos corresponde às enzimas CYP3A7 e CYP3A5, enquanto que em adultos, a atividade enzimática da CYP3A corresponde principalmente às enzimas CYP3A4 e CYP3A5 (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Zanger et al., 2008). O gene *CYP3A41* provavelmente não é traduzido em uma enzima ativa. As enzimas clinicamente relevantes são a CYP3A4, CYP3A5 e CYP3A7 que possuem uma expressão predominantemente hepática e especificidade de substratos semelhantes, o que torna difícil a determinação da contribuição de cada uma no metabolismo (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Zhou et al., 2008).

Muitas vias contribuem para a complexa regulação da transcrição das enzimas CYP3A4 e CYP3A5. Fatores ambientais, interações medicamentosas e fatores genéticos podem influenciar a atividade enzimática, entretanto, existem poucas evidências de que polimorfismos no gene CYP3A4 contribuam para a determinação da atividade da enzima CYP3A4 (Ingelman-Sundberg e Sim, 2010).

Devido ao fato do gene *CYP3A5* ser altamente polimórfico, a proteína codificada por ele pode ter sua atividade diminuída ou nula (alelos *CYP3A*3*, **6* e **7*). A frequência do alelo *CYP3A5*1* (*wild-type*) é baixa em caucasianos, mas em africanos, é o alelo mais frequente. Baseado em diferenças fenotípicas, já foram identificados polimorfismos importantes no gene CYP3A5, como a variante alélica *CYP3A5*3* (6986 G>A) que possui um SNP que provoca um *splicing* alternativo, o que leva a codificação de uma proteína com atividade diminuída.

*CYP3A5*3* é o alelo não funcional mais comum com uma frequência de aproximadamente 90% em caucasianos, 75% em asiáticos e 20% em africanos (Lee et al., 2003; Ingelman-Sundberg et al., 2007).

A razão da evolução polimórfica do gene *CYP3A5* na Natureza provavelmente é devida a sua pequena contribuição ao metabolismo hepático total. O impacto dos polimorfismos do gene *CYP3A5* provavelmente é pequeno devido aos poucos substratos específicos. Este fato pode ser confirmado pelo pequeno impacto das variantes nulas das enzimas *CYP3A5* no metabolismo total das enzimas *CYP3A*, mensurado por meio de drogas-teste como o Midazolam e a quinina. (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Ingelman-Sundberg e Sim, 2010).

O metabolismo de muitos medicamentos clinicamente importantes também é realizado pela enzima *CYP3A4* que atua em substratos semelhantes à enzima *CYP3A5*. O gene *CYP3A4* é muito conservado e ainda não foi identificada nenhuma variação alélica funcionalmente importante (Ingelman-Sundberg e Sim, 2010).

b) ABCB1

Esta proteína é um transportador de membrana dependente de ATP (*ATP – binding transporter protein*), pertencente à superfamília ABC (*ATP – binding cassette*), que exporta certos medicamentos e substâncias endógenas contra o gradiente de concentração e é encontrada em vários tecidos (Mihaljevic et al., 2008; Uhr et al., 2008). Desse modo, os transportadores afetam a captação, a biodisponibilidade, eficácia, toxicidade e depuração dos medicamentos. Duas superfamílias de transportadores, ABC e SLC são responsáveis pela maioria do transporte dos fármacos (Daly, 2010; Sissung et al., 2010).

O gene *ABCB1* (*ATP – binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) member 1*) é composto por 28 éxons e possui 209,664 pb, seu RNAm tem 4,5 KB (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). Em humanos, o gene *ABCB1* está localizado no cromossomo 7q21.12 e codifica uma proteína de 170 KDa, que transporta

diversas classes de medicamentos como antidepressivos, anticonvulsivantes, antibióticos, imunossupressores e estatinas (Sissung et al., 2010).

Antigamente o gene *ABCB1*, era conhecido como P-GP (glicoproteína P) ou *MDR1* (*multidrug resistance gene 1*). O nome *MDR1* surgiu com a observação de que a proteína codificada por ele (glicoproteína P) estava superexpressa em células tumorais, causando um fenômeno comum conhecido como “resistência a multidroga contra agentes antineoplásicos”. Atualmente, a nomenclatura *ABCB1* é aplicada na denominação do gene e da proteína (Cascorbi et al., 2011).

O transportador *ABCB1* é um dos principais responsáveis pela regulação de entrada e saída de substâncias pela barreira hematoencefálica (BHE). Dentre outros fatores, a resposta insuficiente a certos medicamentos pode ser devido à penetração inadequada dos mesmos no sistema nervoso central (SNC), que depende da habilidade do medicamento atravessar a BHE (Uhr et al., 2008). Portanto, a barreira hematoencefálica regula a entrada de substâncias no SNC e um dos principais responsáveis por esta regulação é o transportador *ABCB1* (Uhr et al., 2008).

Mais de 50 polimorfismos foram identificados no gene *ABCB1* entre eles, o SNP (rs1045642 – 3435C>T) que foi associado a uma expressão alterada da proteína *ABCB1* em vários tecidos. O polimorfismo rs1128503 (1236C>T) (um SNP sinônimo) no éxon 12 está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo 2677G>T (T ou A) e o SNP rs1045642, fazendo parte do mesmo haplótipo (grupo de SNPs em uma única cromátide que estão estatisticamente associados) e sugerindo que as diferenças observadas na expressão ou funcionamento do gene *ABCB1* podem estar associadas a outros polimorfismos além do SNP rs1045642 (Kato et al., 2008).

Os polimorfismos mais comuns do gene *ABCB1* são rs1128503 (1236C>T), rs2032582 (2677G>T/A/C) e rs1045642 (3435C>T). Estudos realizados em dois grupos étnicos dos EUA (americanos e afro-americanos) identificaram 10 SNPs, dos quais 6 eram variantes não sinônimas. Dos SNPs sinônimos, dois [rs1128503 (1236C>T) e rs1045642 (3435C>T)] estavam ligados a um SNP não sinônimo [rs2032582 (2677G>T)]. Este SNP ocorreu em 62% dos americanos e em apenas 13% do afro-americanos (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). No SNP sinônimo a substituição do nucleotídeo resulta em um novo códon que

codifica o mesmo aminoácido; no não sinônimo, a substituição resulta em um novo códon que codifica um aminoácido diferente. Estudos concluíram que o alelo C do *SNP* sinônimo rs1045642 (3435C>T) está associado a um aumento na expressão da proteína ABCB1 e poucos estudos reportaram que o alelo G do *SNP* não sinônimo rs2032582 (2677G>T/A) também está associado ao aumento da expressão da proteína, entretanto, esta associação ainda é controversa (Marzolini et al., 2004).

Estudos realizados com ratos *knockouts* para o gene *ABCB1* e estudos clínicos, mostram que é possível classificar os antidepressivos que são substratos do transportador ABCB1. De acordo com Binder e Holsboer (2006), a proteína ABCB1 pode regular a biodisponibilidade dos fármacos citalopram, paroxetina, imipramina, amitriptilina, nortriptilina e venlafaxina no sistema nervoso central. O estudo de ratos *knockouts* mostrou que o transportador ABCB1 não regula a entrada no SNC dos antidepressivos mirtazapina e fluoxetina (Uher et al., 2008), no entanto segundo Uher et al. (2008), ainda não é possível prever a afinidade de um substrato pelo transportador ABCB1 a partir de sua estrutura química, hidrofobicidade, lipofobicidade ou carga.

Kato et al. (2008), demonstrou que a concentração de paroxetina no cérebro de ratos *knockout* para o gene *ABCB1* era maior quando comparada aos ratos normais. Portanto, a variabilidade da proteína ABCB1 pode realmente contribuir na resposta clínica à paroxetina.

Em um estudo que procurava relacionar polimorfismos do gene *ABCB1* e a disfunção sexual em mulheres com depressão, foram analisados os polimorfismos [rs1045642 (3435 C>T), rs2032582 (2677 G>T), rs1128503 (1236C>T) e rs2235015] em pacientes tratadas com SSRIs (citalopram, paroxetina, sertralina). A hipótese do grupo era que os polimorfismos podem influenciar a função do transportador ABCB1, aumentando o risco de disfunções sexuais devido ao aumento da concentração de antidepressivos no SNC. Este estudo concluiu que o genótipo TT do polimorfismo RS1128503 parece estar relacionado à disfunção sexual em mulheres tratadas com SSRIs substratos da proteína ABCB1 (Bly et al. 2013). Contudo, o significado funcional do polimorfismo rs1128503 ainda não é conhecido. Ele pode estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos funcionais.

Estudos entre a relação da família de transportadores ABCB1 com a resposta a antidepressivos já foram realizados, mas muitos desses estudos são conflitantes. Por exemplo, Nikisch e colaboradores (2008) quantificaram citalopram no plasma e no líquido e relacionaram com variantes do gene *ABCB1* durante o tratamento. Os pesquisadores relataram que em homozigotos TT para o polimorfismo rs2032582 (2644T>A) a concentração plasmática e líquórica estava aumentada. A resposta ao tratamento com citalopram em pacientes com este genótipo foi pior em relação aos pacientes portadores do tipo selvagem do polimorfismo. Isto contradiz estudos prévios que associaram o alelo G a uma pior resposta ao tratamento (Kato et al., 2008). Tais evidências contraditórias sugerem a necessidade de mais estudos.

Assim, parece que proteína ABCB1 regula o acesso de alguns antidepressivos ao cérebro. Um prévio conhecimento do genótipo *ABCB1* pode ser relevante na administração do medicamento, pois ele pode nunca atingir o nível terapêutico no cérebro, apesar da sua concentração plasmática estar dentro dos níveis preconizados (Horstmann e Binder 2009).

1.3.2 Farmacodinâmica

A fase farmacodinâmica compreende o processo de interação do fármaco com o seu receptor; desta interação resulta um estímulo, que após uma série de fenômenos químicos e bioquímicos, se traduz no efeito biológico esperado.

Os aspectos genéticos da farmacodinâmica dos antidepressivos abrangem tanto os genes que codificam os alvos dos fármacos, como o recaptador de serotonina [5-hidroxitriptamina (5-HT)], os receptores de 5-HT, até mesmo genes que são indiretamente envolvidos na ação dos medicamentos, como os genes da ativação e modulação monoaminérgica (Binder e Holsboer, 2006).

A farmacodinâmica dos antidepressivos ainda não é totalmente conhecida. Enquanto a ligação com receptores e transportadores é identificada para a maioria dos antidepressivos, os mecanismos moleculares e celulares que

levam a uma resposta ainda não são bem definidos. A hipótese mais aceita para a ação dos antidepressivos é a normalização de uma deficiência de monoaminas, da hiperatividade do sistema de hormônios do estresse ou de um decaimento da atividade neurotrófica.

A maioria dos antidepressivos comercialmente disponíveis até o momento tem como alvo pelo menos uma parte do sistema monoaminérgico. Entretanto, dados indicam que a alteração da transmissão monoaminérgica sozinha não é suficiente para elucidar a melhora dos sintomas depressivos. Por exemplo, uma das maiores classes de antidepressivos, os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitors* – SSRIs), bloqueiam a recaptação da 5-HT via transportador de serotonina. Este efeito acontece quase que imediatamente, contudo, a melhora clínica só é vista no decorrer de algumas semanas de tratamento (Horstmann e Binder 2009).

a) Receptores de 5-HT

O sistema serotoninérgico é amplamente associado à patogênese dos transtornos de humor e no modo de ação dos antidepressivos, antipsicóticos e estabilizadores de humor (Smith et al., 2010).

Os SSRIs são amplamente usados no tratamento da depressão. O mecanismo fundamental dos efeitos dos SSRIs ainda é incerto. O que todos os SSRIs têm em comum é a atividade específica na inibição da recaptação de serotonina, o que eleva seus níveis no cérebro. Desde que os SSRIs aumentam os níveis de serotonina no espaço extracelular, seu efeito terapêutico é provavelmente mediado, pelo menos em parte, pela ação de receptores (Yu et al., 2006).

Existem múltiplos subtipos de receptores de 5-HT, com afinidades diferentes. Os subtipos HTR2A e HTR2C foram relacionados à resposta ao tratamento com antidepressivos e antipsicóticos (Arranz e Kapur, 2007; Blanc et al., 2009; Lucae et al., 2010; Zobel e Maier, 2010).

O gene *HTR1A* [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, G protein-coupled], também conhecido como 5HT1a, 5-HT1A e 5-HT-1A, codifica o receptor de serotonina 1A, uma proteína de 422 aminoácidos (Yu et al., 2006). O gene *HTR1A* está localizado no cromossomo 5q11.2-q13 e é constituído por 2.153 pb.

O receptor HTR1A está localizado na região pós-sináptica e parece influenciar a patogênese da depressão, por meio da mediação da ação da serotonina nos neurônios corticais e límbicos. Na região pré-sináptica, os receptores HTR1A atuam regulando a liberação da serotonina. Quando os receptores HTR1A são estimulados, o resultado é uma diminuição da síntese e da liberação da serotonina (Shiroma et al., 2010).

O polimorfismo rs6295 (-1019C>G) na região promotora do gene *HTR1A* altera sua expressão e também a função do receptor HTR1A. Este polimorfismo está localizado em uma região associada a uma grande regulação da atividade do gene e, portanto, o alelo G (rs6295) causa um aumento dos auto-receptores HTR1A, reduzindo assim, a transmissão da serotonina. Portanto, devido à hipótese relacionada ao mecanismo de ação dos SSRIs, é esperado que os indivíduos que possuem o alelo G tenham uma resposta diminuída aos SSRIs (Shiroma et al., 2010; Zobel et al., 2010; Porcelli et al., 2011). Assim, uma melhor resposta aos antidepressivos já foi relatada em indivíduos homozigotos para o alelo C (Levin et al., 2007; Zobel et al., 2010). Entretanto, Kato et al. (2009), mostrou que jovens asiáticos, homozigotos para o alelo G apresentaram uma melhor resposta ao tratamento com antidepressivos. O alelo G está presente em 50% dos europeus e em 21% dos asiáticos e essa variação entre tais etnias poderia explicar parcialmente este resultado contraditório (Shiroma et al., 2010). Outros polimorfismos no gene *HTR1A* já foram relacionados à resposta a antidepressivos (rs10042486 C/C e rs1364043 T/T) (Porcelli et al., 2011).

Outro gene muito estudado é o *HTR2A* [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled], também conhecido como HTR2 ou 5-HT2A. O gene *HTR2A* está localizado no cromossomo 13q14-q21 e é constituído por 63.657 pb.

Amplamente distribuído no sistema nervoso central e periférico, o receptor HTR2A tem uma provável participação nos ADRs provocados pelos SSRIs como

insônia, agitação, sintomas gastrointestinais e disfunção sexual (Myers et al., 2007).

No gene *HTR2A*, os polimorfismos rs6313 (-102C>T) e rs6311 (1438A>G), estão em quase completo desequilíbrio de ligação. O alelo T e C do polimorfismo rs6313 estão associados com os alelos A e G do polimorfismo rs6311, respectivamente (Myers et al., 2007). O alelo C (rs6313) foi associada à diminuição do mRNA e da expressão proteica quando comparada com a o alelo T (rs6313). O alelo A do polimorfismo rs6311 apresenta um aumento de atividade na região promotora em comparação ao alelo G (rs6311). Enquanto é esperada uma melhor resposta a antidepressivos em portadores dos polimorfismos A na rs6311 e T na rs6313, em europeus, resultados negativos ocorrem em asiáticos. Tais resultados inconsistentes podem ser relacionados ao fato do polimorfismo T (rs6313) ser mais frequente entre asiáticos (0,53 – 0,61%) e o polimorfismo C (rs6313) ser mais frequente entre indivíduos de ancestralidade europeia (0,31-30,49%). A frequência do polimorfismo G (rs6311) também varia entre 58 e 70% em europeus e 44,3-47,5% em japoneses (Shiroma et al.,2010).

Indivíduos portadores do polimorfismo A rs7997012 apresentaram uma redução de 18% na resposta ao citalopram (McMahon et al., 2006). O polimorfismo rs7997012 está localizado no segundo íntron do gene *HTR2A* e não está em desequilíbrio de ligação com os polimorfismos rs6313 e rs6311 (Shiroma et al.,2010).

O projeto STAR*D, que investigou 798 polimorfismos em 68 genes, associou o polimorfismo rs7997012 no gene *HTR2A* à resposta ao tratamento com citalopram (McMahon et al., 2006).

Já foi observado que o receptor *HTR2A* tem um importante papel no mecanismo de ação dos antidepressivos, pois, ele é regulado por diferentes classes de antidepressivos. O antagonismo do transportador *HTR2A* é efetivo no tratamento da depressão e em comportamentos semelhantes aos da depressão em animais. Polimorfismos no gene *HTR2A* têm sido investigados devido ao possível papel na modulação da resposta ao tratamento com antidepressivos, algumas associações já foram encontradas, porém, a maioria das associações ainda é controversa. Alguns dos polimorfismos já associados à resposta são:

rs6313 (102C>T), rs6311 (-1438A>G), rs6314 (Minov et al., 2001; Sato et al., 2002; Kato et al., 2006, Lucae et al., 2010).

Lucae et al. (2010) investigou a influência do polimorfismo rs7997012 no gene *HTR2A* em duas amostras de pacientes alemães com diagnóstico de depressão unipolar ou bipolar. A primeira amostra era constituída por 186 pacientes (82,3% com depressão unipolar e 17,7 % com transtorno bipolar); a segunda amostra era composta por 451 pacientes (87,6% com depressão e 12,4% com transtorno bipolar) e constatou que o polimorfismo rs7997012 do gene *HTR2A* estava associado à remissão depois de 5 semanas de tratamento com antidepressivos. Os critérios de resposta para os dois grupos foi uma redução de mais de 50% na HAM-D (*Hamilton depression scale*) depois de 2, 3, 4, 5 ou 6 semanas de tratamento. O valor de 10 ou menos pontos na *HAM-D* foi considerado remissão. Os pacientes foram tratados com diferentes antidepressivos. O grupo encontrou uma associação com o polimorfismo rs7997012 e a resposta ao tratamento. Pacientes homozigotos para o alelo A (rs7997012) mostraram uma pior resposta ao tratamento, resultado diferente do encontrado no projeto STAR*D que identificou portadores do alelo G (rs7997012) como piores respondedores. Segundo os pesquisadores, uma possível explicação para este resultado inverso são as diferenças étnicas entre os participantes do *STAR*D* e do estudo alemão. Outra explicação sugere que tal associação inversa pode ocorrer ao se investigar polimorfismos correlacionados com uma variante causal em outro *locus* ainda desconhecido o que só poderia ser verificado por meio do sequenciamento de todo gene *HTR2A*. Outra explicação seria a diferença no desenho dos estudos (diferentes antidepressivos, inclusão de pacientes com transtorno bipolar).

Peters et al. (2009), também mostrou que o polimorfismo rs7997012 estava associado à resposta ao citalopram. Perlis et al. (2009), não encontrou uma associação positiva entre os polimorfismos rs7997012 e rs1928040 e o tratamento com Duloxetina em pacientes com depressão.

O polimorfismo rs6311 já foi associado com a resposta a SSRIs em pacientes asiáticos com depressão (Shiroma et al., 2010). No Japão, Kishi et al. (2010), estudou 265 pacientes com depressão, e associou os polimorfismos rs6311 e rs6313 além dos polimorfismos rs7997012 e rs1928040 do gene

HTR2A com a resposta a SSRIs (fluvoxamina, sertralina e paroxetina). Maier e Zobel (2008), associou o alelo C (rs6311) à resposta desfavorável a antidepressivos além da descontinuação do tratamento com SSRIs, exceto a mirtazapina.

Em outro estudo, Wilkie et al. (2008) encontrou uma associação entre o polimorfismo rs6314 no gene *HTR2A* na resposta e remissão em pacientes com depressão tratados com paroxetina.

A falta de dados a respeito de todos os polimorfismos no gene *HTR2A* dificulta a predição de possíveis haplótipos. Parece que polimorfismos no gene *HTR2A* podem ser relevantes na predição da resposta a antidepressivos, apenas não está claro quais variantes alélicas ou quais combinações de polimorfismos serão as mais preditivas, o que pode tornar difícil o desenvolvimento de testes farmacogenéticos (Horstmann e Binder, 2009).

b) Transportador de noradrenalina

O transportador de noradrenalina é responsável pela recaptação da noradrenalina nos terminais pré-sinápticos e é também, um regulador da homeostase da noradrenalina (Porcelli et al., 2010, Shiroma et al., 2010).

O gene *SLC6A2* [*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2*], também conhecido como *NET*, *NAT1*, *NET1* ou *SLC6A5*, codifica o transportador de noradrenalina SLC6A2. Este gene está situado no cromossomo 16q12.2, é formado por 50.580 pb e codifica uma proteína de 617 aminoácidos.

Cerca de 260 variantes já foram identificadas no gene *SLC6A2*. Este sistema de transporte é o alvo dos inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina (*Serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor* – SNRIs) e antidepressivos tricíclicos (Kato e Serreti, 2010). Polimorfismos neste gene já foram associados à resposta a fármacos (Crisafulli et al., 2011).

Variações genéticas como o polimorfismo rs5569 (1287G>A) foi associado à resposta a inibidores de recaptação de noradrenalina (*NRIs*), com o

genótipo GG sendo associado a uma melhor resposta ao tratamento (Porcelli et al., 2010). Este polimorfismo é um *SNP* não sinônimo do gene *SLC6A2*. O genótipo GG também foi associado a um aumento da resposta a nortriptilina em coreanos idosos quando comparados com os genótipos AA e AG (Shiroma et al., 2010; Zobel et al., 2010). O genótipo AA (rs5569), foi associado à demora do início da resposta a antidepressivos em japoneses (Xu et al., 2011).

De acordo com Niitsu et al. (2013), três estudos, além do projeto STAR*D (que incluiu um total de 2608 indivíduos), foram analisados para a determinação da resposta terapêutica. Quando tais estudos foram comparados, nenhum mostrou uma associação evidente entre o polimorfismo rs5569 e a resposta a antidepressivos.

O polimorfismo rs2242446 também foi associado à resposta ao minalcipram, com o alelo T predizendo uma melhor resposta (Porcelli et al., 2010). O polimorfismo rs2242446 foi estudado em relação ao desfecho dos episódios depressivos em adultos. Tal polimorfismo (rs2242446) foi associado a uma melhor resposta ao antidepressivo minalcipram em uma pequena amostra de asiáticos (Yoshida et al., 2004). Localizado na região promotora do gene, este polimorfismo contém um potencial elemento transcricional que pode aumentar sua transcrição.

Em um estudo de GWAS (*genome wide association*), os polimorfismos rs36029 e rs1532701 mostraram uma associação significativa à resposta a nortriptilina, entretanto, após correções estatísticas, esta associação não foi confirmada (Porcelli et al., 2011).

c) Transportador de dopamina

O transportador de dopamina atua determinando a transmissão dopaminérgica por meio da recaptação da dopamina da fenda sináptica para o neurônio pré-sináptico (Crisafulli et al., 2011).

O gene *SLC6A3* [*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3*], também conhecido como *DAT* ou *DAT1*, codifica o

transportador de dopamina SCL6A3. Este gene é formado por 15 éxons, está localizado no cromossomo 5p15.3 e contém 52.641bp. A proteína codificada por este gene, contém 620 aminoácidos (Porcelli et al., 2011).

Existem pelo menos 502 polimorfismos conhecidos neste gene e alguns deles já foram associados a algumas doenças como o transtorno bipolar (Kirchheiner, 2006; Crisafulli et al., 2011). Este gene possui algumas *VNTRs* (*variation tandem repeat*) em regiões não codificantes. A primeira das *VNTRs* a ser identificada e, portanto, a mais estudada é a *VNTR* de 40 *bp* (rs28363170), que está localizada na 3'*UTR* (*untranslated region* – região não traduzida) e afeta a expressão do gene *SLC6A3*.

Dong et al. (2009) estudou a associação entre polimorfismos e a resposta aos antidepressivos. Em seu estudo, foram investigados 142 pacientes com depressão que estavam sendo tratados com desimipramina e fluoxetina, por um período de 8 semanas. Os pacientes que possuíam o genótipo CC para o polimorfismo rs8179029 do gene *SLC6A3*, foram aqueles que apresentaram uma redução na *HAM-D* após as 8 semanas de tratamento.

Antidepressivos, em particular os *SSRIs* modulam a disponibilidade dos receptores de dopamina logo, os mecanismos dopaminérgicos podem ter um importante papel no mecanismo de ação dos antidepressivos (Zhou et al., 2005). Entretanto, a relação entre os polimorfismos do gene *SLC6A3* e a resposta a antidepressivos ainda necessita ser estudada (Kirchheiner et al., 2006; Crisafulli et al., 2011).

d) Triptofano hidroxilase

Estudos farmacogenéticos também existem para muitos outros genes do sistema monoaminérgico como para as enzimas triptofano hidroxilase que limita a biossíntese da serotonina. Esta enzima possui duas isoformas: TPH1 e TPH2 que catalisam uma fase essencial da biossíntese da 5-HT.

O gene *TPH1* (*tryptophan hydroxylase 1*) está localizado no cromossomo 11p15.3-p14 e é formado por 24,863 pb. Ele codifica a proteína TPH1. Esse gene

está expresso no intestino, glândula pineal, fígado, timo, cérebro e na periferia do SNC. Descobertas recentes sugerem que a enzima TPH1 desempenha um importante papel no desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos (Porcelli et al., 2011; Viikki et al., 2010; Wang et al., 2011).

Um polimorfismo na posição 218 do gene *TPH1* (218G>A; rs1800532) está situado em possível local de ligação de um fator de transcrição; este polimorfismo parece influenciar a transcrição gênica e o alelo *TPH1**A sendo associado à diminuição da síntese de 5-HT. Consistente com a teoria monoaminérgica da depressão, a presença do alelo *TPH1**A foi associada ao comportamento suicida e a pior resposta ao tratamento com SSRIs. Resultados conflitantes já foram encontrados especialmente em populações não caucasianas. Outros estudos não encontraram efeitos do polimorfismo *TPH1* 218A>G na eficácia do tratamento com SSRIs ou foram relacionados à ADRS (Porcelli et al., 2010).

Polimorfismos no gene *TPH1* já foram associados a diversas condições psiquiátricas como comportamento suicida, depressão, transtorno bipolar e esquizofrenia, enquanto que em alguns estudos, tais associações não foram encontradas (Viikki et al., 2010). As evidências da relação entre o polimorfismo rs1800532 e a resposta a antidepressivos ainda é inconsistente. Já foi sugerido que este polimorfismo pode modular a resposta aos antidepressivos e o alelo A foi associado a uma pior resposta a SSRIs (paroxetina e fluvoxamina) (Ham et al., 2007, Serretti et al., 2001). Entretanto, em outros estudos, esta associação não foi encontrada (Ham et al., 2007; Peters et al., 2004).

Viikki et al. (2010) estudou a relação entre o polimorfismo rs10080532 (218A>C), do gene *TPH1* e a severidade da depressão, além da resposta ao tratamento em finlandeses. O grupo genotipou 119 com depressão resistentes ao tratamento farmacológico e que eram submetidos a ECT, 98 pacientes com depressão que eram tratados com SSRIs, além de 395 controles sadios. O polimorfismo rs1800532 foi associado ao risco de desenvolver a depressão. O genótipo CC era significativamente mais comum em pacientes (os que eram tratados com SSRIs e com tratados com ECT) do que em controles sadios (38,2% e 26,8% respectivamente; p=0,008). A frequência do genótipo CC também foi significativamente maior em pacientes com formas mais severas de

depressão (pacientes tratados com ECT) do que em pacientes tratados com SSRIs (42,0% e 33,7%; $p=0,026$). O genótipo CC também foi associado a menor probabilidade de remissão, sendo mais frequente entre pacientes tratados com ECT do que em pacientes tratados com SSRIs que remeteram (53,1% e 23,3%; $p=0,049$). A conclusão do estudo mostrou que na população finlandesa, o polimorfismo rs1800532 está associado ao aumento do risco de desenvolver depressão e a resposta ao tratamento; o genótipo CC foi associado ao aumento do risco de desenvolver depressão e à baixa probabilidade de resposta ao tratamento. Já outros autores associaram o alelo A (rs1800532) a pior resposta a SSRIs (Serretti et al., 2001; Ham et al., 2007). Tais resultados contraditórios podem parcialmente ser explicados por diferenças étnicas, já que, Viikki et al. (2010), estudou finlandeses que são uma população geneticamente homogênea que a maioria da população da Europa ocidental. Outra razão pode ser devido a espectro de gravidade da própria doença. Nos grupos de pacientes estudados por Viikki et al. (2010), a maioria dos indivíduos tratados com SSRIs eram pacientes de primeiro episódio enquanto que todos os pacientes tratados com ECT apresentavam depressão refratária e já haviam sido submetidos a múltiplas tentativas de tratamento com vários antidepressivos e combinações deles.

O gene *TPH2* (*tryptophan hydroxylase 2*), está localizado no cromossomo 12q21.1 e possui 247,773 pb. Ele parece ser mais expresso no cérebro do que o TPH1. Estudos em camundongos mostraram que uma mutação no *TPH2* reduziu a quantidade de 5-HT no sistema nervoso central enquanto que camundongos *knockout* para o gene *TPH1* não tiveram alteração (Porcelli et al., 2010; Viikki et al., 2010; Wang et al., 2011).

Os polimorfismos do *TPH2* já foram associados à depressão maior, comportamento suicida, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e transtornos obsessivos compulsivos (Zill et al., 2004; Zhou et al., 2005). Zang et al. (2005), identificou que o polimorfismo funcional 1463G>A no gene *TPH2* substitui uma arginina na posição 447 por uma histidina, que resulta em uma perda de cerca de 80% da função da enzima na produção da 5-HT.

e) COMT

A enzima COMT (*catecol-o-metiltransferase*) catalisa a degradação da dopamina e outras catecolaminas regulando assim, a sua disponibilidade (Domschke et al., 2010). O gene *COMT* apresenta muitas variações alélicas e entre elas, a mais estudada é a rs4680, que resulta em uma modificação na estrutura enzimática [Val(108/158)Met], influenciando sua atividade (maior atividade em Val/Val, atividade intermediária em Val/Met e atividade reduzida no genótipo Met/Met). Este polimorfismo foi associado ao tratamento com antidepressivos e parece influenciar a resposta à fluoxetina e paroxetina (Zobel e Maier, 2010).

O gene *COMT* (NM_000754) está localizado no cromossomo 22q11.2 e é constituído por 28.369 pb. Ele possui, entre outros, um importante polimorfismo (rs4680 - 472G>A) que causa a substituição do aminoácido valina pela metionina no códon 158 (val158met) no sítio de ligação da enzima [códon 158 (val158met) da forma solúvel]. O alelo G (val) codifica uma proteína que apresenta um aumento de cerca de 40% da atividade da enzima COMT quando comparado com o alelo A (met) (Cusin et al., 2002; Serreti et al., 2003).

O polimorfismo val158met foi extensivamente estudado porque pode apresentar uma possível associação com a depressão. Contudo, apenas resultados contraditórios foram encontrados. Alguns autores encontraram uma possível associação com o alelo G enquanto outros com o alelo A (Domschke et al., 2010).

Estudos que investigavam o papel do polimorfismo rs4680 na resposta ao tratamento com antidepressivos reportaram um possível efeito negativo do genótipo AA (158met/met) na resposta a mirtazapina e ao citalopram (Szegedi et al., 2005; Arias et al., 2006). Contudo, Baune et al. (2008), observou a influência negativa do genótipo GG (158val/val) no tratamento com antidepressivos

Domschke et al. (2010), estudou uma amostra de 104 caucasianos com depressão, resistentes ao tratamento farmacológico e o genótipo AA (rs4680) foi significativamente associado com a severidade da depressão.

Um estudo prévio sugeriu que os pacientes que apresentavam o alelo G (158val) para o polimorfismo rs4680 exibiam uma piora significativa e não resposta ao tratamento com antidepressivos, possivelmente, pelo aumento da atividade da enzima COMT que resultaria em uma diminuição da disponibilidade da dopamina e noradrenalina e assim, prejudicaria a eficácia farmacológica dos antidepressivos que atuam nos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos (Baune et al., 2008).

Variações genéticas em processos que envolvem a absorção, distribuição, metabolismo ou eliminação de um medicamento podem resultar em mudanças na biodisponibilidade do fármaco; desse modo, polimorfismos genéticos podem causar variações no nível plasmático ou na concentração do medicamento e seus metabólitos no sítio de ação. Portanto, estas variantes determinam o grau de resposta ao tratamento.

As causas mais frequentes de encaminhamento de pacientes com depressão à eletroconvulsoterapia é a resposta insuficiente a diversos tratamentos com um único fármaco, seguido da associação de outros medicamentos psicotrópicos (polifarmácia). Outro fator que também pode levar o psiquiatra a optar por este tratamento, é a não adesão do paciente devido a severos ADRs, tentativas frustradas de tratamentos medicamentosos (tentativa e erro), além do desgaste emocional do paciente e familiares. Este grupo de pacientes pode ser considerado, um grupo de pacientes refratários aos medicamentos.

Com o presente estudo almejamos identificar um conjunto de variáveis genéticas, que atuam na farmacocinética e farmacodinâmica, e que contribuiriam para esta refratariedade. A detecção destas variáveis poderia, no futuro, permitir a adoção de estratégias precoces para melhorar ou acelerar a resposta aos antidepressivos (como por exemplo, ajuste de doses, manipulação das atividades enzimáticas, prevenção de efeitos adversos dentre outros).

OBJETIVOS GERAIS

Identificar polimorfismos de DNA em genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica dos antidepressivos potencialmente envolvidos com a resposta terapêutica na depressão.

Detectar em pacientes com depressão possíveis marcadores genéticos que determinem ausência de resposta ao tratamento medicamentoso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar polimorfismos de DNA potencialmente associados à resposta ao tratamento em genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica dos antidepressivos; principalmente aqueles que compõem o sistema microsomal hepático e os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico, tais como: *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *ABCB1*, *SCL6A2*, *SLC6A3*, *SLC6A4*, *HTR1A*, *HTR2A*, *TPH1*, *TPH2*, *COMT*.

2. Avaliar os genes selecionados no item anterior em pacientes diagnosticados com depressão, respondedores e em pacientes refratários ao tratamento, que são submetidos à ECT.

3. Associar os resultados genotípicos obtidos com os dados clínicos de resposta ao tratamento farmacológico e identificar potenciais genes (polimorfismos) marcadores da refratariedade.

4.1 Casuística

Foram incluídos no estudo 86 pacientes respondedores e 115 pacientes refratários (total de 201), diagnosticados com depressão unipolar ou bipolar (DSM-IV-TR *American Psychiatric Association*, 2000) (Tabela 5).

Tabela 5 - Percentual dos diagnósticos de transtorno afetivo bipolar e depressão entre pacientes refratários e respondedores. Não houve uma diferença significativa entre pacientes com diagnóstico de depressão bipolar ou unipolar ($p=0,410$).

Diagnóstico	Refratários	Respondedores	Total
Transtorno afetivo bipolar em episódio depressivo ou em remissão.	20	10	30
Episódio depressivo leve, moderado, grave em remissão ou remitido.	95	76	171
Total	115	86	201

Os pacientes foram recrutados no serviço de eletroconvulsoterapia e em ambulatórios do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq-HC-FMUSP). Os pacientes refratários deveriam ter sido submetidos ao tratamento com no mínimo duas classes de antidepressivos diferentes (sendo uma classe de inibidores seletivos de recaptação de serotonina - ISRS) em doses terapêuticas, por no mínimo três meses sem apresentar melhora clínica adequada, além da necessidade ou indicação do tratamento com a eletroconvulsoterapia.

Os pacientes respondedores são aqueles que estão em tratamento ou que já foram previamente tratados com antidepressivos. Eles devem apresentar um escore menor que 7 pontos na *Hamilton Depression Rating Scale* (HAM-D-17) (Zimmerman et al., 2004), além de nunca terem sido submetidos à ECT.

Todos os pacientes (refratários e respondedores) foram submetidos a um questionário semiestruturado. Este questionário é constituído por perguntas a respeito da história médica pregressa do paciente como: tratamentos prévios, tipo de medicamentos, efeitos adversos, tentativas de suicídio. Esta avaliação pregressa também incluiu em alguns casos, a revisão de prontuários. Todos os

participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1)

A aplicação da SCID – I/P – Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos do Eixo I do DSM – IV, versão 2.0 (First et al., 1998), da HAM-D, e do questionário, bem como, a avaliação do ingresso do paciente no projeto, foram realizados pela aluna Carolina Martins do Prado (farmacêutica, Mestre em Biotecnologia e doutoranda em psiquiatria) e pelo psiquiatra Dr. Luiz Felipe Rigonatti com treinamento e supervisão do psiquiatra Dr. Martinus Th. van de Bilt.

Os pacientes excluídos do projeto foram os incapazes de fornecer seu próprio consentimento ou admitidos involuntariamente à hospitalização psiquiátrica; pacientes com comorbidade clínica descompensada ou com quadro psiquiátrico secundário a abuso de uma substância ou à condição clínica geral; comorbidade com doença neurológica.

A idade média dos pacientes refratários foi de 49,8 anos e dos respondedores foi de 47,3 anos. O tempo médio de doença dos refratários foi de 14,6 anos e dos respondedores foi de 10,7 anos. O tempo médio de doença dos pacientes refratários foi maior que o dos respondedores ($p=0,01$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Idade média e tempo de doença de pacientes refratários e respondedores.

Variáveis	Refratários	Respondedores	<i>P</i> *
Idade (anos)			
Anos (média $\pm$ DP)	49,7 $\pm$ 14,5	47,2 $\pm$ 13,8	0,25
Tempo de doença (anos)			
Média $\pm$ DP	14,6 $\pm$ 11,0	10,7 $\pm$ 10,6	0,010

* *Chi-quadrado de Pearson*

Não houve diferença significativa entre pacientes refratários e respondedores para as variáveis demográficas (Tabela 7).

Tabela 7 - Dados demográficos.

Variáveis	Refratários N (%)	Respondedores N (%)	Total	*P
Gênero				
Feminino	70 (60,5)	60 (70,6)	130 (64,8)	0,177
Masculino	45(39,5)	26 (29,4)	71 (35,2)	
Etnia				
Asiático	7 (6,7)	4 (5,2)	11 (5,9)	0,824
Caucasiano	91 (77,2)	71 (80,8)	162 (78,75)	
Negro	4 (3,8)	1 (1,3)	5 (2,4)	
Pardo	13 (13,0)	10 (13,0)	23 (13,0)	

* Chi-quadrado de Pearson

Os dados clínicos coletados foram: tentativas de suicídio, sintomas psicóticos, histórico familiar de doenças psiquiátricas e comorbidade clínicas (Tabela 8). Os pacientes refratários tiveram mais tentativas de suicídio ($p=0,007$) e apresentaram mais sintomas psicóticos ($p=0,001$) que os pacientes respondedores. A prevalência de pacientes com histórico familiar positivo para doenças psiquiátricas também foi maior em pacientes refratários ($p=0,034$).

Tabela 8 - Variáveis clínicas coletadas dos pacientes refratários e respondedores.

Variáveis clínicas	Refratários N (%)	Respondedores N (%)	P*
Tentativas de suicídio			
Ausente	56 (55,4)	51 (75,0)	0,007
Presente	45 (44,6)	17 (25,0)	
Sintomas psicóticos			
Ausente	71 (67,0)	59 (88,1)	0,001
Presente	35 (33,0)	8 (11,9)	
Histórico familiar			
Ausente	18 (19,1)	21 (33,3)	0,034
Presente	7667 (80,9)	42 (66,7)	

* Chi-quadrado de Pearson

4.2 Extração de dna

O DNA genômico foi extraído a partir dos leucócitos do sangue periférico, utilizando-se protocolo baseado em *salting-out* (Laitinen, 1994). O DNA foi ressuspensionado em tampão TE [Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1 mM (pH 8,0)] em quantidade que variou de acordo com o *pellet* obtido (300 a 1000 µL) e o mesmo foi armazenado a – 20 °C. A determinação da concentração de DNA extraído foi feita por espectrofotometria a 260 nm, utilizando o *NanoDrop*® ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer* (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, Delaware, EUA), com coeficiente de extinção 50 ng-cm/µL e comprimento da trajetória da luz OD₂₆₀ 0,1 cm, seguindo a equação de Beer-Lambert:

$$\text{Concentração de DNA [ng/µL]} = (\text{OD}_{260} \times 50 \text{ ng-cm/µL}) / 0,1 \text{ cm}.$$

A pureza do DNA foi determinada pela relação $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ e a integridade das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando tampão TBE 1X [Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1 mM (pH 8,0)] (Sambrook, 2001) e corado com brometo de etídio (0,4 mg/mL). A separação eletroforética foi realizada a 120 V e 60 mA por 30 minutos, em cuba de eletroforese horizontal e o DNA foi visualizado sob luz UV e fotodocumentado em sistema de captura de imagem *Multilmage Light Cabinet, Chemilmager v 5.5*, (*Alpha Innotech Corporation*, San Leandro, CA, EUA).

4.3 Genes e polimorfismos investigados

A seleção dos genes candidatos foi feita de acordo com duas vertentes principais: (A) dados da literatura e (B) estar presente em vias metabólicas envolvidas com processos suscetíveis a depressão. Assim, selecionamos polimorfismos em genes candidatos de acordo com seu papel na farmacocinética e farmacodinâmica dos antidepressivos (Quadros 6 e 7). A partir

dessa análise preliminar, selecionamos os polimorfismos que possivelmente contribuem para a refratariedade ao tratamento com antidepressivos.

Quadro 6- Polimorfismos em genes relacionados à farmacocinética dos antidepressivos

Genes relacionados à Farmacocinética			
Metabolismo de fase 1			
Gene	Polimorfismo	Antidepressivos	Referência
CYP2D6 (cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6)	CYP2D6*1, *2, *3, *4, *5, *6, *9, *10, *15, *17, *29, *35, *40, *41, e amplificação do gene	Tricíclicos e inibidores seletivos de recaptação da serotonina	Zanger et al., 2008
CYP2C19 (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19)	CYP2C19*1, *2, *3, *17	Tricíclicos e inibidores seletivos de recaptação da serotonina	Zanger et al., 2008
CYP2C9 (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9)	CYP2C9*1, *2, *3	Tricíclicos e inibidores seletivos de recaptação da serotonina	Zanger et al., 2008
Transporte de fármacos			
ABCB1 ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	rs1045642 (C3435T), rs1128503 (G2677T), rs2032583, rs2235040	Nortriptilina, paroxetina, citalopram.	Laika et al., 2007 Dong et al., 2009 Uhr et al., 2009

Quadro 7 - Polimorfismos em genes relacionados à farmacodinâmica dos antidepressivos.

Genes relacionados à Farmacodinâmica			
Genes monoaminérgicos			
Gene	Polimorfismo	Antidepressivo	Referência
SLC6A2 [solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2]	-182C/T (rs2242446), rs5569, rs36029, rs1532701	Minalcipram, Nortriptilina, Desimipramina, fluoxetina	Yoshida et al., 2004 Uher et al., 2009 Dong et al., 2009 Zobel e Maier, 2010,
SLC6A3 (DAT1) [solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3]	rs8179029, rs2550936	SSRIs, TCAs, mirtazapina, venlafaxina	Kirchheiner et al., 2006 Dong et al., 2009
SLC6A4 (5-HTT, 5-HTTLPR) [solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4]	44 bp Del/Ins (alelo curto/longo), rs25531, rs57098334	Paroxetina, citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, nortriptilina, mirtazapina, sertralina	Binder e Holsboer, 2006 Blanc et al., 2009 Arranz e Kapur, 2007, Wilkie et al., 2009 Zobel e Maier, 2010,
HTR1A (5-HT1A, HTR1A) [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A]	rs6295 (-1019 C/G), rs1364043, rs10042486	Fluoxetina, fluvoxamina, citalopram	Yu et al., 2006 Kato et al., 2009 Drago et al., 2009
HTR2A (5-HT2A, HTR2A) [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A]	rs7997012, rs6311 (-1438 A/G), rs6314 (1354 C/T), rs17288723, rs9316233, rs7324218	Citalopram, paroxetina, fluvoxamina	McMahon et al., 2006 Uher et al., 2009 Horstmann et al., 2010 Kishi et al., 2010
TPH1 (tryptophan hydroxylase 1)	rs1800532 (218A/C)	Fluvoxamina, paroxetina, citalopram	Kato et al., 2007 Viikki et al., 2010
TPH2 (tryptophan hydroxylase 2)	rs1487276	Fluoxetina, citalopram	Tzvetkov et al., 2008, Horstmann et al., 2010
COMT (catechol-O-methyltransferase)	rs4680	Fluoxetina, paroxetina, citalopram	Yoshida et al., 2008 Benedetti et al., 2009

- **Alelos avaliados para os genes CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9**

A escolha dos alelos avaliados foi baseada na seleção dos alelos com repercussões funcionais importantes e também naqueles mais frequentes em diferentes populações, segundo revisão de literatura.

As variações alélicas *CYP2D6**1, *2, *3, *4, *5, *6, *9, *10, *15, *17, *29, *35, *39, *40, *41 e duplicações do gene *CYP2D6* [AY545216 <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>>] (Figura 13); *CYP2C19**1, *2, *3 e *17 do gene *CYP2C19* [NT_030059 <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>>] (Figura 14) e *CYP2C9**1, *2, *3 do gene *CYP2C9* [NM_000771 <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>>] os polimorfismos (Quadros 8, 9 e 10), foram identificados inicialmente pelo método de sequenciamento direto e posteriormente por discriminação alélica no aparelho de *PCR* em tempo real com o sistema *TaqMan*®. A determinação do número de cópias do gene *CYP2D6* foi realizada utilizando-se *PCR* em tempo real.

Sugeriu-se, com base na reduzida diversidade haplotípica e altos níveis de desequilíbrio de ligação (*LD* – *Linkage disequilibrium*) que *CYP2D6* poderia ser tratado como um único bloco não recombinante no genoma. De fato, cada combinação de polimorfismos localizada na sequência do gene *CYP2D6* em um único cromossomo constitui um haplótipo distinto que é tratado como um alelo do sistema de haplótipos (Saggagh et al., 2006), de acordo com o *CYP Allele nomenclature Comitee* <www.imm.ki.se/CYP_alleles/cyp2d6.htm>. Além disso, o grande *LD* no gene *CYP2D6* pode ocasionar muitos polimorfismos redundantes fazendo com que não haja a necessidade da identificação de todas as variações. Somente um pequeno número de polimorfismos seria suficiente para determinar toda a informação neste locus.

Figura 13 - Distribuição dos polimorfismos investigados no gene *CYP2D6*. Alelos nomeados segundo regras do *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*. A Figura indica a variação no número de cópias do gene *CYP2D6*, com duplicação (A), deleção (B) ou cópia única no genoma haplóide (C). O item D indica as bases polimórficas distribuídas ao longo dos 9 éxons. (Adaptado de Sistonen et al., 2007).

Figura 14 - Distribuição dos polimorfismos investigados no gene *CYP2C19*. Alelos nomeados segundo regras do *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*. A Figura indica a distribuição dos principais polimorfismos ao longo dos 9 éxons.

Cada alelo das enzimas CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9 tem sua atividade enzimática determinada ou predita por experimentos *in vivo* e/ou *in vitro* e as mesmas estão disponíveis na página *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee* <<http://www.cypalleles.ki.se>> (Quadros 8, 9 e 10).

Quadro 8 - Variações alélicas estudadas do gene *CYP2D6* de acordo com a página *CYP2D6 Allele Nomenclature Committee* <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>>. Os polimorfismos em negrito são os principais *SNPs* ou alterações responsáveis pelo fenótipo correspondente a cada alelo.

CYP2D6		Atividade enzimática
Alelos	Polimorfismos	
2D6*1	ausente (alelo referência - <i>wild-type</i>)	Normal
2D6*2	-1584 G>C ; 1661G>C; 2850C>T ; 4180G>C	Normal
2D6*3	2549 delA	Nula
2D6*4	100 C>T; 1661G>C; 1846 G>A ; 4180G>C	Nula
2D6*5	deleção do gene CYP2D6	Nula
2D6*6	1707 delT ; 19776G>A; 4180G>C	Nula
2D6*9	2615_2617 delAGA	Diminuída
2D6*10	100 C>T ; 1661G>C; 4180G>C	Diminuída
2D6*15	137_138 insT	Nula
2D6*17	1023C>T ; 1661G>C; 2850C>T; 4180G>C	Diminuída
2D6*29	1661G>C; 2850C>T; 3183G>A; 4180G>C	Diminuída
2D6*35	-1584C>G; 31G>A; 1661G>C; 2850C>T; 4180G>C	Normal
2D6*40	1023C>T; 1661G>C; 1863_1864ins(TTT CGC CCC)2 ; 2850C>T; 4180G>C	Nula
2D6 *41	-1584 G>C; 1661G>C; 2850 C>T ; 2988 G>A ; 4180 G>C	Diminuída
2D6*_ XN	amplificação do gene	Alelo-dependente

Quadro 9 - Variações alélicas estudadas do gene *CYP2C19* de acordo com a página *CYP2C19 Allele Nomenclature Committee* <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>>. Os polimorfismos em negrito são os principais *SNPs* ou alterações responsáveis pelo fenótipo correspondente a cada alelo.

CYP2C19		Atividade enzimática
Alelos	Polimorfismos	
2C19*1	ausente (alelo referência - <i>wild-type</i>)	Normal
2C19*17	-3405 C>T ; -806 C>T	Aumentada
2C19*3	17948 G>A	Nula
2C19*2	19154 G>A	Nula

Quadro 10 - Variações alélicas estudadas do gene *CYP2C9* de acordo com a página CYP2C9 Allele Nomenclature Committee <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>>. Os polimorfismos em negrito são os principais SNPs ou alterações responsáveis pelo fenótipo correspondente a cada alelo.

CYP2C9	Polimorfismos	Atividade enzimática
Alelos		
2C9*1	ausente (alelo referência - <i>wild-type</i>)	Normal
2C9*2	3608 C>T	Diminuída
2C9*3	42614 A>C	Diminuída

4.4 **PCR em tempo real – determinação do número de cópias (*cnv* – *copy number variation*) do gene *CYP2D6***

No geral, toda *PCR* é caracterizada por três fases: (1) fase geométrica ou exponencial - caracterizada por apresentar precisão na duplicação do número de moléculas da reação. Todos os reagentes estão presentes em quantidades suficientes para o início da replicação. (2) fase linear – a taxa de produção de novas cadeias de DNA via *PCR* passa gradualmente para uma progressão linear. (3) platô – a eficiência de amplificação cai a níveis insignificantes.

Com a técnica de *PCR* em tempo real, compostos fluorescentes são usados para a monitorização do processo de *PCR* no momento que a reação ocorre. As curvas de amplificação da *PCR* mostram a quantidade de fluorescência na fase exponencial da reação que pode então ser utilizada para calcular a relativa quantidade do material inicial.

Um dos sistemas mais comumente usados são as sondas *TaqMan*® para amplificar sequências-alvo e simultaneamente gerar um sinal do produto de *PCR*. Em uma reação com o sistema *TaqMan*® três específicos oligonucleotídeos: um *sense* e outro *antisense* além de uma sonda *TaqMan*®. A sonda está ligada a um fluoróforo e um *quencher*. Enquanto a sonda não estiver ligada ao DNA, o sinal da fluorescência é baixo devido a presença do *quencher*. Quando a sonda está anelada ao DNA, o *quencher* é liberado do fluoróforo e o sinal fluorescente pode ser medido.

O objetivo da padronização do teste que utiliza a técnica de *PCR* em tempo real é determinar o número teórico de cópias do gene *CYP2D6* (presença de um alelo ou deleção de ambos, dois alelos, três ou mais alelos). Essa técnica

necessita de um controle endógeno que deve ser um gene de cópia única no genoma haploide que é usado como normalizador.

A determinação do número de cópias do gene *CYP2D6*, foi realizada com dois ensaios (Hs04083572_cn e Hs00010001_cn) do tipo *TaqMan® Copy Number Assays* (P/N 4400293, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). O controle endógeno (ou ensaio de referência) adotado foi o gene *RNase P* (*TaqMan® Copy Number Reference Assay RNase P*, P/N 4403326, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA).

O número de cópias da sequência alvo em cada amostra é determinado por quantificação relativa usando como método comparativo $\Delta\Delta CT$ de Livak e Schmittgem (2001).

A reação foi padronizada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA): 10 μ L de 2X *TaqMan® Genotyping Master Mix* (P/N 4304437; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 1,0 μ L de *TaqMan® CNV assay* (20x), 1,0 μ L de *TaqMan® CNV Reference Assay* (20x), 5 ng de DNA e água DEPC (Invitrogen, CA, USA) q.s.p. 20 μ L. A termociclagem utilizada é descrita a seguir: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 96 °C e 1 minuto a 60 °C.

A PCR foi reralizada no aparelho 7500 *Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) e 7500 *System SDS Software* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). As reações foram avaliadas em quadruplicata.

Após o término da reação, as informações geradas foram analisadas no programa *CopyCaller Software 2.0* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Que determinou o número de cópias do gene *CYP2D6*.

Foi utilizado como um controle interno da reação, uma amostra sabidamente amplificada e uma amostra sabidamente deletada, além de um controle negativo.

O histograma do número de cópias gerado pelo programa mostra o número de cópias de cada amostra para determinado assay (Figura 15). O programa *CopyCaller V2.0* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA) também gera um gráfico que indica o mínimo e o máximo número de cópias calculado para a amostra da replicata (Figura 16).

Figura 15 - Gráfico que indica o número de cópias do gene *CYP2D6*.

Figura 16 - Gráfico que indica o número de amostras que apresentam 1, 2 ou 3 cópias de *CYP2D6*.

4.5 Discriminação alélica com o sistema *Taqman*®

As reações para a identificação dos polimorfismos, rs1045642, rs1128503 e rs2235040 do gene *ABCB1*, rs36029 e rs1532701 do gene *SLC6A2*, rs2550936 e rs8179029 do gene *SLC6A3*, rs6295 do gene *HTR1A*, rs6311, rs7324218 e 102C>T do gene *HTR2A*, rs1800532 do gene *TPH1*, rs1487276 do gene *TPH2*, rs11188072, rs4986893 e rs4244285 do gene *CYP2C19*; rs3892097, rs769258, rs59421388 do gene *CYP2D6* e rs1799853 do gene *CYP2C9*, foram

padronizadas segundo a reação: 1,4x de *TaqMan® Universal Master Mix* (P/N 4304437; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 0,875x de assay, 9,375 ng de DNA e água DEPC (*Invitrogen*, CA, USA) q.s.p. 8 µL. A termociclagem usada foi a seguinte: primeira desnaturação de 10 minutos a 95 °C seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos e anelamento a 60 °C por um minuto. O processo de discriminação alélica foi realizado por 1 minuto a 60 °C no aparelho de *7500 Real-Time System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

Para os polimorfismos rs2242446 do gene *SLC6A2*, rs7997012 do gene *HTR2A*, rs12248560 do gene *CYP2C19* e rs1135840, rs28371725, rs1080985, rs1065852 e rs107707653 do gene *CYP2D6*, a reação padronizada foi a seguinte: 1,4x de *TaqMan® Universal Master Mix* (P/N 4304437; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 0,875x de assay, 9,375 ng de DNA, 0,21 M de betaína (*Sigma*, *Saint Louis, Missouri, USA*) e água DEPC (*Invitrogen*, CA, USA) q.s.p. 8 µL. A termociclagem usada foi a seguinte: primeira desnaturação de 10 minutos a 95 °C seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos e anelamento a 60 °C por um minuto. O processo de discriminação alélica foi realizado por 1 minuto a 60 °C no aparelho de *7500 Real-Time System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

Para os polimorfismos rs28371706, rs16947, rs5030655 do gene *CYP2D6* as reações padronizadas foram: 1,4x de *TaqMan® Universal Master Mix* (P/N 4304437; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 0,875x de assay, 9,375 ng de DNA e água DEPC (*Invitrogen*, CA, USA) q.s.p. 8 µL. A termociclagem utilizada foi a seguinte: primeira desnaturação de 10 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos e anelamento a 58 °C por 1 minuto e 30 segundos. O processo de discriminação alélica foi realizado por 1 minuto a 60 °C no aparelho de *7500 Real-Time System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

Os polimorfismos rs16947, rs28371725, rs35742686 do gene *CYP2D6*, a reação padronizada foi a seguinte: 1,4x de *TaqMan® Universal Master Mix* (P/N 4304437; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 0,875x de assay, 9,375 ng de DNA, 0,21 M de betaína (*Sigma*, *Saint Louis, Missouri, USA*) e água DEPC (*Invitrogen*, CA, USA) q.s.p. 8 µL. A termociclagem utilizada foi a seguinte: primeira desnaturação de 10 minutos a 95 °C seguida de 45 ciclos de

desnaturação a 95 °C por 20 segundos e anelamento a 58 °C por 1 minuto e 30 segundos. O processo de discriminação alélica foi realizado por 1 minuto a 60 °C no aparelho de *7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA)*.

Para identificar os polimorfismos rs1364043 e rs10042486 do gene *HTR1A*, rs6314 do gene *HTR2A*, 2613_2615 del AGA do gene *CYP2D6* e rs1057910 do gene *CYP2C9*, a reação padronizada foi a seguinte: 9,26x de *TaqMan® Universal Master Mix* (P/N 4304437; *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), 0,926x de assay, 7,4 ng de DNA e água DEPC (*Invitrogen, CA, USA*) q.s.p. 13,5 µL. A termociclagem utilizada foi a seguinte: primeira desnaturação de 10 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos e anelamento a 58 °C por 1 minuto e 30 segundos. O processo de discriminação alélica foi realizado por 1 minuto a 60 °C no aparelho de *7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA)*.

Todos os polimorfismos estão em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* exceto: rs7324218 ($p=0,039$), rs6313 ($p=0,018$), rs1487276 ($p=0,010$). Todas as padronizações acima descritas estão mais detalhadas no anexo 2.

A seguir, são demonstrados exemplos gráficos de curvas de amplificação de uma amostra heterozigota para o polimorfismo - rs1128503 do gene *ABCB1* (Figura 17), uma amostra homozigota CC para o polimorfismo rs1045642 do gene *ABCB1* (Figura 18), uma amostra homozigota TT para o polimorfismo rs1128503 do gene *ABCB1* (Figura 17), uma amostra homozigota GG para o polimorfismo rs2235040 do gene *ABCB1* (Figura 19).

Figura 17 - Curva de amplificação de uma amostra heterozigota CT para o polimorfismo rs1128503 do gene *ABCB1*, indicada segundo as fluorescências VIC e FAM crescentes.

Figura 18 - Curva de amplificação de uma amostra homozigota CC para o polimorfismo rs1045642 do gene *ABCB1*, indicada segundo a fluorescência FAM crescente.

Figura 19 - Curva de amplificação de uma amostra homozigota TT para o polimorfismo rs1128503 do gene *ABCB1*, indicada segundo a fluorescência VIC crescente.

Também mostramos resultados ilustrativos da discriminação alélica obtidos para os polimorfismos rs1128503 do gene *ABCB1* (Figura 20) e rs16947 do gene *CYP2D6* (Figura 21) analisados por meio da técnica de *PCR* em tempo real.

Figura 20 - Discriminação alélica. Gráfico de amostras analisadas para o polimorfismo rs1128503 do gene *ABCB1*. Os losangos indicam amostras homozigotas CC, triângulos amostras heterozigotas C>T e círculos amostras homozigotas TT.

Figura 21 - Discriminação alélica. Gráfico de amostras analisadas para o polimorfismo rs16947 do gene *CYP2D6*. Os losangos indicam amostras homozigotas CC, triângulos amostras heterozigotas C>T e círculos amostras homozigotas TT.

4.6 Determinação dos fenótipos preditos dos genes CYPs

Na classificação dos fenótipos preditos para *CYP2D6* a presença de dois alelos funcionais (*CYP2D6**1 ou *CYP2D6**2) determinou o fenótipo EM (Sabbagh et al., 2006, Zhou et al., 2009). Heterozigotos para um alelo funcional duplicado (*CYP2D6**1xN ou *CYP2D6**2xN) e um alelo não-funcional (*CYP2D6**3, *4, *5, *6, *15, *40) também foram classificados como EMs segundo Kirchheiner et al. (2004). Dois alelos de atividade intermediária (*CYP2D6**9, *10, *17, *41) combinados, um alelo de atividade intermediária e um alelo funcional ou, a combinação de um alelo de atividade intermediária com uma variante não funcional foi classificado como IM (Ingelman-Sundberg et al., 2004; Laika et al., 2009). Indivíduos UMs foram definidos como portadores de uma duplicação ou multiplicação de um alelo ativo em conjunto com um alelo funcional (Sistonem et al., 2007). Os PMs foram definidos como homozigotos para alelos não funcionais (*CYP2D6**3, *4, *5, *6, *15, *40) (Bernard et al., 2006; Sabbagh et al., 2006) (Tabela 5).

A determinação do fenótipo predito para *CYP2C19* foi realizada segundo Ragia et al. (2009) que classifica como UMs homozigotos para o alelo de atividade aumentada *17; “UMs heterozigotos” a presença do alelo *17 em combinação com um alelo de atividade normal (*1) porque sua capacidade metabólica está entre UMs e EMs. Indivíduos que possuem um alelo de atividade aumentada (*17) e um alelo de atividade nula (*2 ou *3) foram classificados como EMs. Heterozigotos para um alelo de atividade nula e um alelo funcional foram classificados como IMs e homozigotos de alelos não funcionais classificados como PMs (Tabela 10).

A determinação do fenótipo predito para *CYP2C9* foi realizada segundo Scott et al. (2007) que classifica como EMs homozigotos para o alelo normal *1; IMs indivíduos que possuem um alelo normal e um alelo de atividade reduzida (*2 ou *3) e PMs como homozigotos para alelos de atividade reduzida (Tabela 9).

Tabela 9 - Fenótipo predito para *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* de acordo com a combinação alélica.

Fenótipo predito	Combinação alélica
<i>CYP2D6</i>	
EM	EM+EM; EM x N +PM
IM	IM+IM; IM+PM; EM+PM; EM+IM
UM	EM x N
PM	PM+PM
<i>CYP2C19</i>	
EM	EM+EM; UM+PM
IM	EM+PM;
UM	UM+UM; EM+UM
PM	PM+PM
<i>CYP2C9</i>	
EM	EM+EM
IM	EM+IM
PM	IM+IM

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico *R* versão 2.15.2 (2012) e do programa SPSS para Windows, (versão 14 SPSS, Inc. Chicago, IL).

Para o cálculo das prevalências dos polimorfismos, genótipos ou fenótipos entre pacientes refratários e respondedores, foram usados o Teste Exato de Fisher (*Fisher's Exact Test for Count Data*), Teste da razão de verossimilhança (*Likelihood Ratio Test for Contingency Tables*), além do teste de Qui-quadrado de Pearson.

Para o cálculo da probabilidade de o paciente ser refratário ou respondedor à terapia medicamentosa baseada nos genótipos de todos os polimorfismos genéticos estudados, utilizados o método *CART* (*Classification Regression Tree*). *CART* é um método de árvore de decisão binária em que cada nó é separado em dois grupos de modo a homogeneizar a variável resposta/dependente (medido pelo índice de Gini de impureza). Em todo nó, o algoritmo escolhe a melhor separação binária para todas as variáveis e escolhe aquela que melhor separa refratários e respondedores

5.1 Frequências alélicas e genotípicas

Foram realizadas as genotipagens de 201 amostras obtidas de pacientes refratários e respondedores. Serão apresentados os resultados de frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos que tiveram as reações de *PCR* em tempo real padronizadas. São polimorfismos selecionados nos genes *COMT*, *ABCB1*, *SLC6A2*, *SLC6A3*, *HTR1A*, *HTR2A*, *TPH1* e *TPH2*; além da frequência alélica dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* (anexo 3) Todos os polimorfismos estudados estão em equilíbrio de *Wardy-Weinberg*.

5.2 Frequências fenotípicas, genotípicas e alélicas de refratários versus respondedores

Não houve, nesta amostra, associação significativa entre a distribuição dos fenótipos preditos para a atividade enzimática de *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* ($p=0,859$, $p=0,867$ e $p=0,161$ respectivamente) entre refratários e respondedores (Tabela 10).

Tabela 10 - Prevalência dos fenótipos preditos das enzimas *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9* e nos grupos de pacientes refratários (G1) e no grupo dos pacientes respondedores (G2).

Fenótipo Predito	Prevalência (%)					
	CYP2D6		CYP2C19		CYP2C9	
	G1 (%)	G2(%)	G1(%)	G2 (%)	G1 (%)	G2(%)
EM	94 (82,5)	68 (79,1)	59 (52,2)	43 (50,0)	70 (61,4)	61 (70,9)
IM	7 (6,1)	8 (9,3)	17 (15,0)	13 (15,1)	41 (36,0)	25 (29,1)
PM	6 (5,3)	5 (5,8)	1 (0,9)	2 (2,3)	3 (2,6)	0 (0,0)
UM	7 (6,1)	5 (5,8)	36 (31,9)	28 (32,6)		
<i>P</i> *	0,859		0,867		0,161	

* *Chi-quadrado de Pearson*

Para os alelos dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* não foram encontradas diferenças significativas na distribuição das frequências alélicas entre os grupos refratários e respondedores (tabela 11).

Tabela 11 - Frequências alélicas identificadas nos pacientes refratários e respondedores.

Alelos	Frequências alélicas (%)	
	Refratários	Respondedores
<i>CYP2D6</i>		
*1	99 (43,4)	63 (36,6)
*2	53 (23,2)	41 (23,8)
*3	2 (0,8)	1 (0,6)
*4	34 (14,9)	28 (16,2)
*5	3 (1,3)	2 (1,2)
*6	0 (0,0)	0 (0,0)
*9	2 (0,9)	2 (1,2)
*10	10 (4,4)	9 (5,2)
*15	0 (0,0)	0 (0,0)
*17	5 (2,2)	3 (1,7)
*29	0 (0,0)	5 (2,9)
*35	7 (3,1)	4 (2,3)
*39	1 (0,4)	0 (0,0)
*40	0 (0,0)	0 (0,0)
*41	12 (5,3)	13 (7,6)
*amplificação	9 (3,9)	18 (4,7)
<i>CYP2C19</i>		
*1	154 (67,5)	115 (66,9)
*2	23 (10,1)	20 (11,6)
*3	2 (0,9)	3 (1,7)
*17	47 (20,6)	34 (19,8)
<i>CYP2C9</i>		
*1	181 (79,4)	147 (85,5)
*2	32 (14,0)	19 (11,0)
*3	15 (6,6)	6 (3,5)

Ao investigarmos os polimorfismos no gene *ABCB1*, encontramos um aumento da frequência do genótipo CT (rs1128503) em pacientes refratários ($p=0,007$). No gene *HTR2A* (receptor serotoninérgico) encontramos um aumento

da frequência do genótipo AG em pacientes respondedores para o polimorfismo rs6314 ($p=0,042$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação das frequências genotípicas entre os grupos de pacientes refratários e respondedores (continua).

Gene	SNP	Frequência genotípica (%)			P*
		Genótipos	Refratário	Respondedor	
COMT	rs4680	AA	37 (34,9)	25 (30,1)	0,434
		AG	45 (42,5)	43 (51,8)	
		GG	24 (22,6)	15 (18,1)	
ABCB1	rs1045642	CC	28 (24,8)	23 (27,1)	0,088
		CT	65 (57,5)	37 (43,5)	
		TT	20 (17,7)	25 (29,4)	
ABCB1	rs1128503	CC	27 (24,1)	35 (41,2)	0,007
		CT	70 (62,5)	34 (40,0)	
		TT	15 (13,4)	16 (18,8)	
ABCB1	rs2235040	CC	87 (79,1)	67 (79,8)	0,970
		CT	22 (20,0)	16 (19,0)	
		TT	1 (0,9)	1 (1,2)	
SCL6A2	rs2242446	CC	7 (6,1)	10 (11,8)	0,371
		CT	48 (42,1)	33 (38,8)	
		TT	59 (51,8)	42 (49,4)	
SCL6A2	rs36029	AA	46 (40,4)	29 (34,1)	0,668
		AG	52 (45,6)	43 (50,6)	
		GG	16 (14,0)	13 (15,3)	
SCL6A2	rs1532701	AA	34 (30,1)	22 (25,9)	0,754
		AG	49 (43,4)	41 (48,2)	
		GG	30 (26,5)	22 (25,9)	
SCL6A3	rs8179029	CC	84 (74,3)	59 (69,4)	0,324
		CT	25 (22,1)	25 (29,4)	
		TT	4 (3,5)	1 (1,2)	
SCL6A3	rs2550936	AA	66 (58,4)	43 (51,2)	0,267
		AC	35 (31,0)	35 (41,7)	
		CC	12 (10,6)	6 (7,1)	
HTR1A	rs6295	CC	25 (22,1)	17 (20,0)	0,858
		CT	61 (54,0)	45 (52,9)	
		TT	27 (23,9)	23 (27,1)	
HTR1A	rs1364043	GG	10 (8,8)	8 (9,4)	0,370
		GT	43 (37,7)	24 (28,2)	
		TT	61 (53,5)	53 (62,4)	
HTR1A	rs10042486	CC	20 (17,9)	16 (18,8)	0,810
		CT	63 (56,3)	44 (51,8)	
		TT	29 (25,9)	25 (29,4)	

Tabela 12 - Comparação das frequências genotípicas entre os grupos de pacientes refratários e respondedores (final).

Gene	SNP	Frequência genotípica (%)			P*
		Genótipos	Refratário	Respondedor	
<i>HTR2A</i>	rs7997012	AA	14 (13,1)	9 (10,8)	0,143
		AG	49 (45,8)	28 (33,7)	
		GG	44 (41,1)	46 (55,4)	
<i>HTR2A</i>	rs6311	CC	33 (30,0)	20 (23,5)	0,236
		CT	61 (55,5)	45 (52,9)	
		TT	16 (14,5)	20 (23,5)	
<i>HTR2A</i>	rs6314	AA	2 (1,8)	3 (3,6)	0,042
		AG	14 (12,3)	21 (25,0)	
		GG	98 (86,0)	60 (71,4)	
<i>HTR2A</i>	rs7324218	CC	70 (61,9)	50 (58,8)	0,200
		CG	33 (29,2)	32 (37,6)	
		GG	10 (8,8)	3 (3,5)	
<i>HTR2A</i>	rs9316233	CC	49 (57,0)	37 (64,9)	0,594
		CG	32 (37,2)	18 (31,6)	
		GG	5 (5,8)	2 (3,5)	
<i>HTR2A</i>	rs6313	CC	29 (29,0)	19 (22,4)	0,152
		CT	58 (58,0)	46 (54,1)	
		TT	13 (13,0)	20 (23,5)	
<i>TPH1</i>	rs1800532	GG	47 (43,5)	30 (37,0)	0,605
		GT	51 (47,2)	41 (50,6)	
		TT	10 (9,3)	10 (12,3)	
<i>TPH2</i>	rs1487276	CC	80 (70,2)	64 (75,3)	0,236
		CT	25 (21,9)	19 (22,4)	
		TT	9 (7,9)	2 (2,4)	

* Chi-quadrado de Pearson

Na amostra, encontramos diferenças significativas na distribuição das frequências alélicas entre pacientes refratários e respondedores de polimorfismos no gene *HTR2A*. Para o polimorfismo rs6314, encontramos um aumento da frequência do alelo A nos respondedores ($p=0,011$) (tabela 13).

Tabela 13 - Frequências alélicas de pacientes refratários e respondedores.

Gene	SNP	Frequência alélica <i>N</i> (%)			<i>*P</i>
		Alelos	Refratário	Respondedor	
COMT	rs4680	A	119 (56,1)	93 (56,0)	0,983
		G	93 (43,9)	73 (44,0)	
ABCB1	rs1045642	C	121 (53,5)	83 (48,8)	0,352
		T	105 (46,5)	87 (51,2)	
ABCB1	rs1128503	C	124 (55,4)	104 (61,2)	0,246
		T	100 (44,6)	66 (38,8)	
ABCB1	rs2235040	C	196 (89,1)	150 (89,3)	0,951
		T	24 (10,9)	18 (10,7)	
SCL6A2	rs2242446	T	166 (72,8)	117 (68,8)	0,385
		C	62 (27,2)	53 (31,2)	
SCL6A2	rs36029	A	144 (63,2)	101 (59,4)	0,447
		G	84 (36,8)	69 (40,6)	
SCL6A2	rs1532701	A	117 (51,8)	85 (50,0)	0,727
		G	109 (48,2)	85 (50,0)	
SCL6A3	rs8179029	C	193 (85,4)	143 (84,1)	0,725
		T	33 (14,6)	27 (15,9)	
SCL6A3	rs2550936	A	167 (73,9)	121 (72,)	0,678
		C	59 (26,1)	47 (28,0)	
HTR1A	rs6295	T	115 (50,9)	91 (53,5)	0,602
		C	111 (49,1)	79 (46,5)	
HTR1A	rs1364043	T	165 (72,4)	130 (76,5)	0,355
		G	63 (27,6)	40 (23,5)	
HTR1A	rs10042486	T	121 (54,0)	94 (55,3)	0,801
		C	103 (46,0)	76 (44,7)	
HTR2A	rs7997012	G	137 (64,0)	120 (72,3)	0,087
		A	77 (36,0)	46 (27,7)	
HTR2A	rs6311	C	127 (57,7)	85 (50,0)	0,128
		T	93 (42,3)	85 (50,0)	
HTR2A	rs6314	G	210 (92,1)	141 (83,9)	0,011
		A	18 (7,9)	27 (16,1)	
HTR2A	rs7324218	C	173 (76,5)	132 (77,6)	0,797
		G	53 (23,5)	38 (22,4)	
HTR2A	rs9316233	C	130 (75,6)	92 (80,7)	0,309
		G	42 (24,4)	22 (19,3)	
HTR2A	rs6313	C	116 (58,0)	84 (49,4)	0,098
		T	84 (42,0)	86 (50,6)	
TPH1	rs1800532	G	145 (67,1)	101 (62,3)	0,334
		T	71 (32,9)	61 (37,7)	
TPH2	rs1487276	C	185 (81,1)	147 (86,5)	0,167
		T	43 (18,9)	23 (13,5)	

* *Chi-quadrado de Pearson*

5.3 Árvore de Decisão (*Decision Making Tree*)

Para analisar os polimorfismos genéticos em conjunto, e identificar qual é a contribuição dos seus genótipos para a condição refratariedade ou resposta, foi utilizado o método *CART* (*classification regression tree*) (Breiman et al., 1984). Este modelo reproduz a refratariedade dos pacientes, baseados nos genótipos. A árvore resultante apresenta uma sensibilidade de 81,6%, especificidade de 58,1% e precisão de 71,5% (Figura 22).

A proporção de pessoas classificadas no nó (*node*) terminal é chamada de impureza. O nó terminal acontece quando se chega ao final da árvore e a decisão refratário ou respondedor tem que ser tomada. O ideal seria que todos no final fossem da mesma classe (o que seria considerado um nó puro), mas isto raramente acontece nesse modelo estatístico. Uma árvore pode conter vários nós, o que dificulta sua interpretação. Portanto, a escolha do tamanho apropriado da árvore implica na determinação de um *cut-off* que é gerado por algoritmos apropriados (índice Gini de impureza, por exemplo). A árvore deve explorar informações que aumentem a acurácia da sua predição e ignore informações que não são relevantes. As impurezas do modelo para as amostras do estudo foram significantes nos seguintes nós: o nó “0” determina 57% de chance de os pacientes serem refratários quando apresentam o genótipo CT e 43% de chance de serem respondedores quando eles apresentam os genótipos TT ou CC no gene ABCB1 (rs1128503). Conforme os galhos se ramificam, chegamos aos nós terminais “9” e “10”. O Nó terminal “9” determina que 23,5% de chance de o paciente ser refratário e 76,5% de chance do paciente ser respondedor ao tratamento farmacológico, quando possui o genótipo CG no gene HTR24 (rs7324218). Já o nó terminal “10” determina que 61,5% de chance de o paciente ser refratário e 38,5% de ser respondedor ao tratamento farmacológico se apresentar os genótipos CC ou GG no gene HTR2A (rs7324218).

Figura 22 - Árvore de decisão. A cor verde representa a porcentagem de pacientes refratários enquanto a cor azul representa a porcentagem dos pacientes respondedores em cada nó terminal. *Improvement* significa a medida de quanto o polimorfismo melhora a divisão dos galhos em relação ao nó anterior. Com os cinco polimorfismos mostrados na árvore já é possível prever 71,5% dos casos de refratariedade ou resposta. Por este motivo não mostramos a árvore com todos os polimorfismos analisados neste trabalho.

Um dos objetivos deste trabalho foi identificar polimorfismos de DNA em genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica dos antidepressivos, que poderiam estar envolvidos com a resposta terapêutica na depressão unipolar ou bipolar. Para tanto, avaliamos polimorfismos de DNA potencialmente associados com a resposta ao tratamento, em genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica dos antidepressivos, tais como: *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *ABCB1*, *SCL6A2*, *SLC6A3*, *HTR1A*, *HTR2A*, *TPH1*, *TPH2*, *COMT*. Desse modo, polimorfismos nos genes selecionados foram genotipados em pacientes com depressão que respondem ao tratamento e em pacientes com os mesmos diagnósticos que são refratários ao tratamento medicamentoso e, por esse motivo, são submetidos à ECT. Os resultados genotípicos foram associados aos dados clínicos de resposta ao tratamento farmacológico para a identificação de potenciais polimorfismos marcadores da refratariedade.

Em nosso estudo esperávamos encontrar para os genes *CYP2D6* e *CYP2C19* uma maior frequência do fenótipo predito UM (metabolizador ultrarrápido) em pacientes refratários do que em respondedores ao tratamento com antidepressivos. Além disso esperávamos também identificar uma maior quantidade de alelos que levam a diminuição ou aumento da atividade de receptores, transportadores e enzimas em pacientes refratários quando comparados aos respondedores.

Em nosso estudo, não encontramos diferenças significativas no fenótipo predito e nos alelos de *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* entre refratários e respondedores. Nossa hipótese era que existiriam mais metabolizadores ultrarrápidos entre os pacientes refratários, o que não foi confirmado nesta amostra. Entretanto, devemos salientar a importância destas genotipagens, tendo em vista que pacientes psiquiátricos geralmente são polimedicados e apresentam comorbidades clínicas; assim, os medicamentos usados pelos pacientes podem inibir essas enzimas o que prejudicaria o tratamento, pois, um paciente com fenótipo predito *IM* pode passar a se portar como um *PM* e assim, descontinuar o tratamento devido aos *ADRS*. De fato, diversos estudos constataram que para o tratamento com antidepressivos, existe uma grande evidência de que principalmente para *CYP2D6* e em menor escala para

CYP2C19, os polimorfismos afetam a farmacocinética de muitos antidepressivos e possivelmente afetam a resposta terapêutica e os *ADRs* (Steimer et al., 2001; Stadoon et al., 2002; Steimer et al., 2005; Tomalik-Scharte et al., 2008).

De acordo com Maier et al. (2008), a identificação das variações alélicas que influenciam a atividade enzimática é relevante para tratamentos em que mais de um medicamento é necessário e quando estes interagem com as enzimas *CYP2D6* e *CYP2C19*, como o caso dos SSRIs fluoxetina e a paroxetina que inibem a atividade enzimática da *CYP2D6*.

A grande incidência de depressão em pacientes com diagnóstico de câncer de mama torna importante genotipagem de *CYP2D6*, principalmente em pacientes submetidas a tratamento com o Tamoxifeno. O Tamoxifeno é um medicamento comumente utilizado para o tratamento do câncer de mama (Borges et al., 2006). Ele é um pró-fármaco clássico, que necessita da ativação metabólica para obter a atividade farmacológica. A enzima *CYP2D6* converte os metabólitos farmacologicamente inativos (tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno) para endoxifeno (metabólito ativo com maior atividade terapêutica) (Borges et al., 2006; Beverage et al., 2007). A conversão de tamoxifeno em endoxifeno parece estar correlacionada com a frequência e a severidade de alguns efeitos adversos. A coadministração de inibidores de *CYP2D6* e tamoxifeno também possui resultados clínicos importantes. De acordo com Beverage et al. (2007), a administração de SSRIs em pacientes que recebiam tamoxifeno, demonstraram uma redução significativa do nível plasmático do endoxifeno. Estes estudos sugerem que a administração de SSRIs e tamoxifeno tem um impacto importante na função de metabolizar tamoxifeno em endoxifeno (Beverage et al., 2007), diminuindo assim seu efeito anticancerígeno. Neste sentido, Jin et al (2005) mostraram que a coadministração de fluoxetina ou paroxetina pode converter um metabolizador extensivo para um fenótipo PM, demonstrado pela redução da concentração plasmática de endoxifeno para níveis similares aos do genótipo PM.

Outro gene estudado em nosso trabalho foi o *ABCB1* (*ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*). Uma possível razão para a pouca resposta ao tratamento ou a refratariedade poderia estar associada a polimorfismos do gene *ABCB1* que codifica um transportador presente na

barreira hematoencefálica (proteína ABCB1). Essa proteína regula a concentração intracerebral de fármacos podendo afetar a resposta clínica a medicamentos que tenham o SNC como alvo (Uhr et al., 2008).

Encontramos um aumento da frequência do genótipo CT em pacientes refratários para o polimorfismo rs1128503 do gene ABCB1 ($p=0,007$). Ao compararmos as frequências alélicas do polimorfismo rs1128503 entre pacientes refratários e respondedores, não encontramos nenhuma diferença entre os grupos. Para os outros polimorfismos investigados neste gene (rs1045642, rs2235040) não obtivemos diferenças significativas entre refratários e respondedores nas frequências genotípicas e alélicas. Segundo Bly et al. (2013), o significado funcional do polimorfismo rs1128503 ainda não é conhecido. Ele pode estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos funcionais. Kato et al. (2008) e Uhr et al. (2009), constataram que polimorfismos no gene *ABCB1* podem estar relacionados a diferenças na eficácia de antidepressivos.

A neurotransmissão das catecolaminas pode contribuir na resposta individual ao tratamento farmacológico com antidepressivos enquanto que a farmacologia de muitos antidepressivos implica mecanismos de múltiplos alvos (Millan et al., 2006; Gershon et al. 2006, Xu et al., 2011). Todavia não encontramos nenhuma diferença significativa entre a distribuição genotípica e fenotípica entre pacientes refratários e respondedores para os polimorfismos investigados no gene *HTR1A* [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A]. Tais dados não corroboram com outros estudos que mostraram uma associação positiva do *HTR1A* com a resposta aos antidepressivos (Yu et al., 2006; Kato et al., 2009; Drago et al., 2009).

Em nossa amostra, encontramos diferenças significativas na distribuição das frequências genotípicas e alélicas entre pacientes refratários e respondedores no polimorfismo rs6314 no gene *HTR2A* [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A]. Encontramos um aumento da frequência do genótipo AG em pacientes respondedores ($p=0,042$). Os Pacientes refratários possuem uma frequência diminuída do alelo A, enquanto que os pacientes respondedores apresentam uma quantidade aumentada do alelo G ($p=0,011$).

O genótipo GG do polimorfismo rs6311 do gene *HTR2A* já foi associado a uma melhor resposta ao tratamento com SSRIs (Choi et al., 2005; Kato et al.,

2006). Entretanto, outros dois estudos falharam ao associar o polimorfismo rs6311 à resposta a fluvoxamina e mirtazapina (Sato et al., 2002; Kang et al., 2007).

O polimorfismo rs6313 do gene *HTR2A*, já foi investigado e não mostrou associação com a resposta a antidepressivos (Lili et al., 2009; Wilkie et al., 2009; Kato et al., 2007). Entretanto, Minov et al. (2001) constatou que pacientes portadores do alelo C (rs6313) apresentavam uma melhor resposta ao tratamento com antidepressivos. Apesar dos dados contraditórios e da diferença nas casuísticas nos diversos estudos, a investigação dos polimorfismos no gene *HTR2A* continua promissora devido ao seu possível envolvimento na depressão e no mecanismo de ação dos antidepressivos.

Com relação aos genes relacionados aos transportadores de catecolaminas avaliamos as diferenças nas frequências alélicas e genotípicas dos genes *SCL6A2* [*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2*] e *SCL6A3* [*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3*]. Porém não encontramos diferenças entre refratários e respondedores a antidepressivos. Nossos dados não corroboram com estudos de Yoshida et al. (2004), Kim et al. (2006) e Dong et al. (2009). Tais autores constataram que o alelo G (rs5569) e o alelo T (rs2242446) no gene *SLC6A2* podem estar relacionados à melhor resposta a antidepressivos. Dong et al (2009) também constatou que o genótipo CC do polimorfismo rs8179029 (gene *SLC6A3*) pode estar relacionado a melhor resposta a fluoxetina e fluvoxamina. Entretanto segundo Zobel et al. (2010), Porcelli et al. (2011) e Fabbri et al. (2013), ainda não existem estudos que repliquem de maneira convincente o impacto das variações dos genes *SCL6A2* e *SCL6A3* na resposta a antidepressivos; o pouco número de estudos sobre a farmacogenética do *SCL6A2* e *SCL6A3* ainda não possibilita nenhuma conclusão.

Analizamos ainda os genes responsáveis pelas enzimas que regulam a biossíntese da serotonina, *TPH1* (*tryptophan hydroxylase 1*) e *TPH2* (*tryptophan hydroxylase 2*), porém não encontramos nenhuma diferença na distribuição fenotípica e alélica dos polimorfismos rs1800532 do gene *TPH1* e o polimorfismo rs1487276 do gene *TPH2* corroborando com os achados de Peters et al. (2004); Ham et al. (2005); Kato et al. (2007); Kato e Serreti (2010).

Com relação à enzima COMT (*catechol-O-methyltransferase*), amplamente estudada e com achados contraditórios com relação a uma melhor resposta aos antidepressivos para portadores do alelo Val ou Met (Arias et al., 2006; Benedetti et al., 2010; Domschke et al., 2010; Gvozdic et al., 2012), também não encontramos nenhuma diferença significativa na distribuição dos genótipos e fenótipos entre pacientes refratários e respondedores a antidepressivos para a rs4680 do gene *COMT*.

Para realizarmos uma análise mais abrangente, utilizamos o método *CART* (*Classification regression tree*). Com ele pudemos fazer um modelo de Árvore de Decisão que possibilitou unificar os resultados dos genótipos dos polimorfismos estudados nos genes *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *ABCB1*, *SCL6A2*, *SLC6A3*, *HTR1A*, *HTR2A*, *TPH1*, *TPH2*, *COMT*, afim de identificar o conjunto de genótipos que poderiam mostrar o percentual de chance dos pacientes serem refratários ou respondedores, ou seja, conseguimos adequar uma metodologia estatística que avalia os genótipos de diferentes genes em conjunto, identificando assim, qual é a contribuição dos genótipos para a condição de refratário ou respondedor. Com isso, criamos um modelo de análise de vários genótipos ao mesmo tempo que seleciona aqueles que melhor classificam os grupos (refratários e respondedores). O que seria mais eficaz do que fazer associações individuais, porque, a árvore de decisão é capaz de encontrar interação entre os genótipos, além de evitar colinearidade.

Com nossos dados de genotipagem, conseguimos uma árvore que apresenta uma sensibilidade de 81,6%, especificidade de 58,1% e precisão de 71,5%.

A árvore explorou informações que aumentaram a acurácia da sua predição e ignoraram informações que não foram relevantes. As impurezas do modelo para as amostras do estudo foram significantes nos seguintes nós: o nó “0” determina 57% de chance de os pacientes serem refratários quando apresentam o genótipo CT e 43% de chance de serem respondedores quando eles apresentam os genótipos TT ou CC no gene *ABCB1* (rs1128503). Conforme os galhos se ramificam, chegamos aos nós terminais “9” e “10”. O Nó terminal “9” determina que 23,5% de chance de o paciente ser refratário e 76,5% de chance do paciente ser respondedor ao tratamento farmacológico, quando

possui o genótipo CG no gene HTR24 (rs7324218). Já o nó terminal “10” determina que 61,5% de chance de o paciente ser refratário e 38,5% de ser respondedor ao tratamento farmacológico se apresentar os genótipos CC ou GG no gene HTR2A (rs7324218).

Quando o medicamento é adequadamente estudado e a contribuição de cada isoforma das enzimas do citocromo para seu metabolismo é conhecida, torna-se possível, com a genotipagem, predizer o fenótipo do indivíduo e dividi-lo em categorias. Entretanto, o genótipo das enzimas do citocromo P450 sozinho não explica toda a variação no metabolismo do medicamento, visto que, esta variabilidade está sujeita a outros genes relacionados à farmacocinética e à farmacodinâmica além das interações medicamentosas e o uso de indutores ou inibidores enzimáticos.

Desse modo, a divisão em categorias fenotípicas não reflete cuidadosamente o fato de alguns alelos apresentarem uma variada atividade dependendo da farmacocinética ou farmacodinâmica do medicamento, ou seja, alelos podem ter influências diferentes sob determinados substratos.

Até o momento, a aceitação da genotipagem pelos clínicos ainda é pouca devido a alguns fatores como: insuficiente evidência baseada em pesquisas e insegurança na interpretação de resultados da genotipagem, principalmente com dois ou mais genes. Este último fato pode ser resolvido por meio do modelo da Árvore de Decisão.

Acreditamos que futuramente a utilização da combinação de genótipos de um grupo de genes relacionados à farmacocinética e dinâmica de medicamentos utilizados no tratamento de diferentes doenças, possa estar disponível em um grande banco de dados, o qual será acessado por plataformas computacionais que, a partir da genotipagem do paciente, possam aplicar métodos de avaliação similares ao modelo de árvore de decisão, o qual determina as possibilidades do paciente responder ou não à determinado tratamento.

No caso de pacientes com o diagnóstico de depressão, tal ferramenta traria um grande benefício ao tratamento. A utilização dos genótipos de *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*, por exemplo para prever a dose ideal de um medicamento em psiquiatria ainda é precoce. Mas acreditamos também que a determinação dos genótipos em conjunto pode trazer benefícios clínicos ao identificar os pacientes respondedores e refratários ou aqueles sujeitos a sofrerem efeitos adversos, que muitas vezes abandonam o tratamento por não os suportar. Desse modo, os pacientes não precisariam mais ter que esperar 4 semanas para que a sua resposta a um antidepressivo seja identificada. Aproximamos assim, a 'bancada' do 'leito' e caminhamos em direção à medicina personalizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

Arias B, Serretti A, Lorenzi C, Gastó C, Catalán R, Fañanás L. Analysis of COMT gene (Val 158 Met polymorphism) in the clinical response to SSRIs in depressive patients of European origin. *J Affect Disord*. 2006 Feb;90(2-3):251-6. Epub 2005 Dec 13

Arranz MJ, Kapur S. Pharmacogenetics in psychiatry: are we ready for widespread clinical use? *Schizophr Bull*. 2008 Nov;34(6):1130-44. Epub 2008 Aug 27. Review.

Baffa A, Hohoff C, Baune BT, Müller-Tidow C, Tidow N, Freitag C, Zwanzger P, Deckert J, Arolt V, Domschke K. Norepinephrine and serotonin transporter genes: impact on treatment response in depression. *Neuropsychobiology*. 2010;62(2):121-31. doi: 10.1159/000317285. Epub 2010 Jun 30.

Bailliet G, Santos MR, Alfaro EL, Dipierri JE, Demarchi DA, Carnese FR, Bianchi NO. Allele and genotype frequencies of metabolic genes in Native Americans from Argentina and Paraguay. *Mutat Res*. 2007 Mar;5;627(2):171-7.

Bauer M, Adli M, Bschor T, et al. Lithium's emerging role in the treatment of refractory major depressive episodes: augmentation of antidepressants. *Neuropsychobiology*. 2010;62(1):36-42. Epub 2010 May 7. Review

Baune BT, Hohoff C, Berger K, Neumann A, Mortensen S, Roehrs T, Deckert J, Arolt V, Domschke K. Association of the COMT val158met variant with antidepressant treatment response in major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Mar;33(4):924-32. Epub 2007 May 23.

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].

Benedetti F, Dallaspezia S, Colombo C, et al. Effect of catechol-O-methyltransferase Val(108/158)Met polymorphism on antidepressant efficacy of fluvoxamine. *Eur Psychiatry*. 2010 Dec;25(8):476-8. Epub 2010 Jul 8.

Berlim MT, Turecki G. What is the meaning of treatment resistant/refractory major depression (TRD)? A systematic review of current randomized trials. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007 Nov;17(11):696-707. Epub 2007 May 23.

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.

Bertilsson L. Metabolism of antidepressant and neuroleptic drugs by cytochrome p450s: clinical and interethnic aspects. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Nov;82(5):606-9.

Beverage JN, Sissung TM, Sion AM, Danesi R, Figg WD. CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Sci*. 2007 Sep;96(9):2224-31.

Binder EB, Holsboer F. Pharmacogenomics and antidepressant drugs. *Ann Med*. 2006;38(2):82-94.

Blanc O, Brousse G, Meary A, et al. Pharmacogenetic of response efficacy to antipsychotics in schizophrenia: pharmacodynamic aspects. Review and implications for clinical research. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010 Apr;24(2):139-60. Epub 2009 Aug 21. Review.

Bly MJ, Bishop JR, Thomas KL, Ellingrod VL. P-glycoprotein (PGP) polymorphisms and sexual dysfunction in female patients with depression and SSRI-associated sexual side effects. *J Sex Marital Ther*. 2013;39(3):280-8.

Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A, Jin Y, Storniolo AM, Nikoloff DM, Wu L, Hillman G, Hayes DF, Stearns V, Flockhart DA. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication

for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Jul; 80(1):61-74.

Brockmöller J, Tzvetkov MV. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Feb;64(2):133-57.

Brunton LL, Parker KL, editors. *Goodman & Gilman's: Manual of Pharmacology and Therapeutics.* McGraw Hill, 2008.

Carvalho AF, Machado JR, Cavalcante JL. Augmentation strategies for treatment-resistant depression. *Curr Opin Psychiatry.* 2009 Jan;22(1):7-12. Review.

Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(201):261-83. doi: 10.1007/978-3-642-14541-4_6. Review.

Chen L, Qin S, Xie J, Tang J, Yang L, Shen W, Zhao X, Du J, He G, Feng G, He L, Xing Q. Genetic polymorphism analysis of CYP2C19 in Chinese Han populations from different geographic areas of mainland China. *Pharmacogenomics.* 2008 Jun;9(6):691-702.

Choi MJ, Kang RH, Ham BJ, Jeong HY, Lee MS. Serotonin receptor 2A gene polymorphism (-1438A/G) and short-term treatment response to citalopram. *Neuropsychobiology.* 2005;52(3):155-62. Epub 2005 Aug 25.

Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, Everett JR, Nicholson JK. Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature.* 2006 Apr; 20;440(7087):1073-7.

Crisafulli C, Fabbri C, Porcelli S, et al. A Pharmacogenetics of antidepressants. *Front. Pharmacol.* 2011. 2:6. doi: 10.3389/fphar.2011.

Cusin C, Serretti A, Lattuada E, Lilli R, Lorenzi C, Smeraldi E. Association study illness time course in mood disorders of MAO-A, COMT, 5-HT2A, DRD2, and DRD4 polymorphisms with. *Am J Med Genet*. 2002 May 8;114(4):380-90.

Daly AK. Pharmacogenetics and human genetic polymorphisms. *Biochem J*. 2010 Aug 1;429(3):435-49. Review.

Domschke K, Zavorotnyy M, Diemer J, Nitsche S, Hohoff C, Baune BT, Deckert J, Arolt V, Zwanzger P. COMT val158met influence on electroconvulsive therapy response in major depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010 Jan 5;153B(1):286-90.

Dong C, Wong ML, Licinio J. Sequence variations of ABCB1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, CREB1, CRHR1 and NTRK2: association with major depression and antidepressant response in Mexican-Americans. *Mol Psychiatry*. 2009 Dec;14(12):1105-18. Epub 2009 Oct 20.

Dorado P, Berez R, Peñas-Lledó EM, Llerena A. Antipsychotic drugs and QTc prolongation: the potential role of CYP2D6 genetic polymorphism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2007 Feb;3(1):9-19.

Drago A, De Ronchi D, Serretti A. Pharmacogenetics of antidepressant response: an update. *Hum Genomics*. 2009 Apr;3(3):257-74. Review.

Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*. 2006 Feb; 57:119-37.

Enson HM, Chang TK, Patel P. Pharmacogenetics: the therapeutic drug monitoring of the future? *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(11):783-802.

Fabbri C, Di Girolamo G, Serretti A. Pharmacogenetics of antidepressant drugs: An update after almost 20 years of research. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013 Sep;162(6):487-520. doi: 10.1002/ajmg.b.32184. Epub 2013 Jul 12.

Fagiolini A, Kupfer DJ. Is treatment-resistant depression a unique subtype of depression? *Biol Psychiatry*. 2003 Apr 15;53(8):640-8. Review.

Fava M. Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry*. 2003 Apr 15;53(8):649-59. Review.

Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L. Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry*. 2007 Jan 15;61(2):145-53. Epub 2006 Aug 24. Review.

Goetz MP, Kamal A, Ames MM. Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Jan; 83(1):160-6.

Gvozdic K, Brandl EJ, Taylor DL, Müller DJ. Genetics and personalized medicine in antidepressant treatment. *Curr Pharm Des*. 2012;18(36):5853-78. Review.

Ham BJ, Lee BC, Paik JW, Kang RH, Choi MJ, Choi IG, Lee MS. Association between the tryptophan hydroxylase-1 gene A218C polymorphism and citalopram antidepressant response in a Korean population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007 Jan 30;31(1):104-7. Epub 2006 Sep 15.

Ham BJ, Lee MS, Lee HJ, Kang RH, Han CS, Choi MJ, Lee SH, Ryu SH. No association between the tryptophan hydroxylase gene polymorphism and major depressive disorders and antidepressant response in a Korean population. *Psychiatr Genet*. 2005 Dec;15(4):299-301.

Hang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 5 ed. São Paulo: Elsevier; 2003.

Hines RN, Koukouritaki SB, Poch MT, et al. Regulatory polymorphisms and their contribution to interindividual differences in the expression of enzymes influencing drug and toxicant disposition. *Drug Metab Rev*. 2008 Apr;40(2):263-301.

Horstmann S, Binder EB. Pharmacogenomics of antidepressant drugs. *Pharmacol Ther*. 2009 Oct;124(1):57-73. Epub 2009 Jun 27. Review.

Illi A, Setälä-Soikkeli E, Viikki M, Poutanen O, Huhtala H, Mononen N, Lehtimäki T, Leinonen E, Kampman O. 5-HTR1A, 5-HTR2A, 5-HTR6, TPH1 and TPH2 polymorphisms and major depression. *Neuroreport*. 2009 Aug 5;20(12):1125-8. doi: 10.1097/WNR.0b013e32832eb708.

Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW. *Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*. Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/> [2009 Nov 09].

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 Dec; 116(3):496-526. Review.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC. Intronic polymorphisms of cytochromes P450. *Hum Genomics*. 2010 Aug;4(6):402-5.

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

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

Jin, Y et al. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jan;97; 30-39.

Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec; 15;90(24):11825-9.

Jorgensen A, Alfrevic A. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: adverse drug reactions. *Pharmacogenomics*. 2008 Oct;9(10):1397-401.

Justenhoven C, Hamann U, Pierl CB, Baisch C, Harth V, Rabstein S, Spickenheuer A, Pesch B, Brüning T, Winter S, Ko YD, Brauch H. CYP2C19*17 is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 May;115(2):391-6. Epub 2008 Jun 3.

Kang RH, Choi MJ, Paik JW, Hahn SW, Lee MS. Effect of serotonin receptor 2A gene polymorphism on mirtazapine response in major depression. *Int J Psychiatry Med*. 2007;37(3):315-29.

Kato M, Fukuda T, Serretti A, Wakeno M, Okugawa G, Ikenaga Y, Hosoi Y, Takekita Y, Mandelli L, Azuma J, Kinoshita T. ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 Feb 15;32(2):398-404

Kato M, Fukuda T, Wakeno M, Fukuda K, Okugawa G, Ikenaga Y, Yamashita M, Takekita Y, Nobuhara K, Azuma J, Kinoshita T. Effects of the serotonin type 2A, 3A and 3B receptor and the serotonin transporter genes on paroxetine and fluvoxamine efficacy and adverse drug reactions in depressed Japanese patients. *Neuropsychobiology*. 2006;53(4):186-95. Epub 2006 Jul 26.

Kato M, Fukuda T, Wakeno M, Okugawa G, Takekita Y, Watanabe S, Yamashita M, Hosoi Y, Azuma J, Kinoshita T, Serretti A. Effect of 5-HT1A gene polymorphisms on antidepressant response in major depressive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009 Jan 5;150B(1):115-23.

Kato M, Serretti A. Review and meta-analysis of antidepressant pharmacogenetic findings in major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2010 May;15(5):473-500. doi: 10.1038/mp.2008.116. Epub 2008 Nov 4

Kato M, Wakeno M, Okugawa G, Fukuda T, Azuma J, Kinoshita T, Serretti A. No association of TPH1 218A/C polymorphism with treatment response and intolerance to SSRIs in Japanese patients with major depression. *Neuropsychobiology*. 2007;56(4):167-71. doi: 10.1159/000119734. Epub 2008 Mar 7.

Kato M, Zanardi R, Rossini D, De Ronchi D, Okugawa G, Kinoshita T, Colombo C, Serretti A. 5-HT2A gene variants influence specific and different aspects of antidepressant response in Japanese and Italian mood disorder patients. *Psychiatry Res.* 2009 May 15;167(1-2):97-105. doi: 10.1016/j.psychres.2007.12.012. Epub 2009 Apr 10.

Carvalho Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett.* 2006 Mar; 8; 234 (1):4-33.

Kim MJ, Huang SM, Meyer UA, Rahman A, Lesko LJ. A regulatory science perspective on warfarin therapy: a pharmacogenetic opportunity. *J Clin Pharmacol.* 2009 Feb;49(2):138-46.

Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S, Kimchi AM, Scavo D, Roma MI, Kim IW, Jones A, Arora M, Gribar J, Gurwitz D, Gottesman MM. Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics.* 2007 Jan;8(1):29-39

Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet* 1989 Dec;45(6):889-904.

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

Kirchheiner J, Seeringer A, Brockmüller J. State of the art of pharmacogenetic diagnostics in drug therapy. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2006 Oct;49(10):995-1003.

Kishi T, Yoshimura R, Kitajima T, Okochi T, Okumura T, Tsunoka T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Naitoh H, Nakamura J, Ozaki N, Iwata N. HTR2A is associated with SSRI response in major depressive disorder in a Japanese cohort. *Neuromolecular Med.* 2010 Sep;12(3):237-42.

Kohlrausch FB, Gama CS, Lobato MI, et al. Naturalistic pharmacogenetic study of treatment resistance to typical neuroleptics in European-Brazilian schizophrenics. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Jul;18(7):599-609.

Koo SH, Lee EJ. Pharmacogenetics approach to therapeutics. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 May-Jun;33 (5-6): 525-32.

Krejsa C, Rogge M, Sadee W. Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jun;5(6):507-21.

Kubota T, Yamaura Y, Ohkawa N, Hara H, Chiba K. Frequencies of CYP2D6 mutant alleles in a normal Japanese population and metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in different CYP2D6 genotypes. *Br J Clin Pharmacol*. 2000 Jul;50(1):31-4.

Laika B, Leucht S, Steimer W. ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1) gene G2677T/a sequence variation (polymorphism): lack of association with side effects and therapeutic response in depressed inpatients treated with amitriptyline. *Clin Chem*. 2006 May;52(5):893-5

Laitinen J, Samarut J, Holtta E, A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA, *BioTechniques* 1994;17:316–322.

Lee SJ, Usmani KA, Chanas B, Ghanayem B, Xi T, Hodgson E, Mohrenweiser HW, Goldstein JA. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics*. 2003 Aug;13(8):461-72.

Levin GM, Bowles TM, Ehret MJ, Langaee T, Tan JY, Johnson JA, Millard WJ. Assessment of human serotonin 1A receptor polymorphisms and SSRI responsiveness. *Mol Diagn Ther*. 2007;11(3):155-60.

Liao G., Zhang X., Clark J.D., Peltz G. A genomic “roadmap” to “better” drugs. *Drug Metab Rev*. 2008 Apr;40: 225-239.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lopez M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME. CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005 Nov; 61(10):749-54.

Lucae S, Ising M, Horstmann S, Baune BT, Arolt V, Müller-Myhsok B, Holsboer F, Domschke K. HTR2A gene variation is involved in antidepressant treatment response. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010 Jan;20(1):65-8. doi: 10.1016/j.euroneuro.2009.08.006. Epub .

Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician*. 2007 Aug; 1;76(3):391-6.

Maier W, Zobel A. Contribution of allelic variations to the phenotype of response to antidepressants and antipsychotics. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2008 Mar;258 Suppl 1:12-20. doi: 10.1007/s00406-007-1004-z. Review

Martinus C. Feiters, Alan E. Rowan and Roeland J. M. Nolte. From simple to supramolecular cytochrome P450 mimics. *Chem Soc Rev*. 2000 29, 375–384

Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Jan;75(1):13-33.

McMacarthy AD, Kennedy JL, Middleton LT. Pharmacogenetics in drug development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Aug 29;360(1460):1579-88.

McMahon FJ, Buervenich S, Charney D, Lipsky R, Rush AJ, Wilson AF, Sorant AJ, Papanicolaou GJ, Laje G, Fava M, Trivedi MH, Wisniewski SR, Manji H. Variation in the gene encoding the serotonin 2A receptor is associated with outcome of antidepressant treatment. *Am J Hum Genet*. 2006 May;78(5):804-14. Epub 2006 Mar 20.

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

Meyer UA. The molecular basis of genetic polymorphisms of drug metabolism. *J Pharm Pharmacol.* 1994 May;46 Suppl 1:409-15.

Mihaljevic Peles A, Bozina N, Sagud M, Rojnic Kuzman M, Lovric M. MDR1 gene polymorphism: therapeutic response to paroxetine among patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008 Aug 1;32(6):1439-44. doi: 10.1016/j.pnpbp.2008.03.018. Epub 2008 Apr 3.

Millan MJ. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol Ther.* 2006 May;110(2):135-370. Epub 2006 Mar 7

Min W, Li T, Ma X, Li Z, Yu T, Gao D, Zhang B, Yun Y, Sun X. Monoamine transporter gene polymorphisms affect susceptibility to depression and predict antidepressant response. *Psychopharmacology (Berl).* 2009 Aug;205(3):409-17. doi: 10.1007/s00213-009-1550-3. Epub 2009 May 26.

Minov C, Baghai TC, Schüle C, Zwanzger P, Schwarz MJ, Zill P, Rupprecht R, Bondy B. Serotonin-2A-receptor and -transporter polymorphisms: lack of association in patients with major depression. *Neurosci Lett.* 2001 May 4;303(2):119-22.

Myers RL, Airey DC, Manier DH *et al.*: Polymorphisms in the regulatory region of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor gene (*HTR2A*) influence gene expression. *Biol. Psychiatry* 61(2), 167–173 (2007).

Naveen AT, Adithan C, Soya SS, Gerard N, Krishnamoorthy R. CYP2D6 genetic polymorphism in South Indian populations. *Biol Pharm Bull.* 2006 Aug;29(8):1655-8.(a).

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

Neve EP, Ingelman-Sundberg M. Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Nov;392(6):1075-84. Epub 2008 Jun 8.

Niitsu T, et al, Pharmacogenetics in major depression: a comprehensive meta-analysis, *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013

Nikisch G, Eap CB, Baumann P. Citalopram enantiomers in plasma and cerebrospinal fluid of ABCB1 genotyped depressive patients and clinical response: a pilot study. *Pharmacol Res*. 2008 Nov-Dec;58(5-6):344-7. doi: 10.1016/j.phrs.2008.09.010. Epub 2008 Sep 30.

Ohlsson Rosenborg S, Mwinyi J, Andersson M, Baldwin RM, Pedersen RS, Sim SC, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Eliasson E. Kinetics of omeprazole and escitalopram in relation to the CYP2C19*17 allele in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008 Dec;64(12):1175-9.

Perlis R. H., Fijal B., Adams D. H., Sutton V. K., Trivedi M. H., Houston J. P. Variation in catechol-O-methyltransferase is associated with duloxetine response in a clinical trial for major depressive disorder. *Biological Psychiatry*. 2009. 65(9), 785–791.

Perlis RH, Moorjani P, Fagerness J, Purcell S, Trivedi MH, Fava M, Rush AJ, Smoller JW. Pharmacogenetic analysis of genes implicated in rodent models of antidepressant response: association of TREK1 and treatment resistance in the STAR(*)D study. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Nov;33(12):2810-9. Epub 2008 Feb 20.

Perlis RH, Purcell S, Fava M, et al. Association between treatment-emergent suicidal ideation with citalopram and polymorphisms near cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in the STAR*D study. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Jun;64(6):689-97.

Peters EJ, Slager SL, Jenkins GD, Reinalda MS, Garriock HA, Shyn SI, Kraft JB, McGrath PJ, Hamilton SP. Resequencing of serotonin-related genes and

association of tagging SNPs to citalopram response. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Jan;19(1):1-10. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283163ecd.

Peters EJ, Slager SL, Kraft JB, Jenkins GD, Reinalda MS, McGrath PJ, Hamilton SP. Pharmacokinetic genes do not influence response or tolerance to citalopram in the STAR*D sample. *PLoS One*. 2008 Apr 2;3(4):e1872.

Peters EJ, Slager SL, McGrath PJ, Knowles JA, Hamilton SP. Investigation of serotonin-related genes in antidepressant response. *Mol Psychiatry*. 2004 Sep;9(9):879-89.

Peters EJ, Slager SL, McGrath PJ, Knowles JA, Hamilton SP. Investigation of serotonin-related genes in antidepressant response. *Mol Psychiatry*. 2004 Sep;9(9):879-89.

Poolsup N, Li Wan Po A, Knight TL. Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy. *J Clin Pharm Ther*. 2000 Jun;25(3):197-220.

Porcelli S, Drago A, Fabbri C, Gibiino S, Calati R, Serretti A. Pharmacogenetics of antidepressant response. *J Psychiatry Neurosci*. 2011 Mar;36(2):87-113. doi: 10.1503/jpn.100059. Review.

Porcelli S, Drago A, Fabbri C, Serretti A. Mechanisms of antidepressant action: an integrated dopaminergic perspective. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Aug 15;35(7):1532-43. doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.03.005. Epub 2011 Mar 11. Review.

Porcelli S, Fabbri C, Serretti A. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with antidepressant efficacy. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2012 Apr;22(4):239-58. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.10.003. Epub 2011 Dec 3. Review.

Porcelli S, Fabbri C, Spina E, Serretti A, De Ronchi D. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes and antidepressant metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011 Sep;7(9):1101-15. doi: 10.1517/17425255.2011.597740. Epub 2011 Jul 8. Review.

Preskorn SH, Nichols AI, Paul J, Patroneva AL, Helzner EC, Guico-Pabia CJ. Effect of desvenlafaxine on the cytochrome P450 2D6 enzyme system. *J Psychiatr Pract*. 2008 Nov;14(6):368-78.

Ragia G, Arvanitidis KI, Tavridou A, Manolopoulos VG. Need for reassessment of reported CYP2C19 allele frequencies in various populations in view of CYP2C19*17 discovery: the case of Greece. *Pharmacogenomics*. 2009 Jan;10(1):43-9.

Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med*. 2002 Dec; 15;113(9):746-50.

Rudberg I, Hendset M, Uthus LH, Molden E, Refsum H. Heterozygous mutation in CYP2C19 significantly increases the concentration/dose ratio of racemic citalopram and escitalopram (S-citalopram). *Ther Drug Monit*. 2006 Feb;28(1):102-5.

Rudberg I, Mohebi B, Hermann M, Refsum H, Molden E. Impact of the ultrarapid CYP2C19*17 allele on serum concentration of escitalopram in psychiatric patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Feb;83(2):322-7. Epub 2007 Jul 11.

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

Sato K, Yoshida K, Takahashi H, Ito K, Kamata M, Higuchi H, Shimizu T, Itoh K, Inoue K, Tezuka T, Suzuki T, Ohkubo T, Sugawara K, Otani K. Association between -1438G/A promoter polymorphism in the 5-HT(2A) receptor gene and fluvoxamine response in Japanese patients with major depressive disorder. *Neuropsychobiology*. 2002;46(3):136-40.

Scott SA, Edelmann L, Kornreich R, Erazo M, Desnick RJ. CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 allele frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Pharmacogenomics*. 2007 Jul;8(7):721-30.

Serretti A, Cusin C, Cristina S, Lorenzi C, Lilli R, Lattuada E, Grieco G, Costa A, Santorelli F, Barale F, Smeraldi E, Nappi G. Multicentre Italian family-based association study on tyrosine hydroxylase, catechol-O-methyl transferase and Wolfram syndrome 1 polymorphisms in mood disorders. *Psychiatr Genet*. 2003 Jun;13(2):121-6

Serretti A, Zanardi R, Cusin C, Rossini D, Lorenzi C, Smeraldi E. Tryptophan hydroxylase gene associated with paroxetine antidepressant activity. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2001 Oct;11(5):375-80.

Shah RR. Pharmacogenetics in drug regulation: promise, potential and pitfalls. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Aug;29;360(1460):1617-38.

Shams ME, Arneth B, Hiemke C, Dragicevic A, Müller MJ, Kaiser R, Lackner K, Härtter S. CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther*. 2006 Oct;31(5):493-502.

Shiroma RP, Yonas E, Geda, Mrazek AD. Pharmacogenomic Implications of Variants of Monoaminergic-related Genes in Geriatric Psychiatry. *Pharmacogenomics*. 2010;11(9):1305-1330.

Signature Genetics. Available from: <http://www.signaturegenetics.com/public/2/226.html> [2009 Apr 05].

Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Jan;79(1):103-13.

Sissung TM, English BC, Venzon D, et al. Clinical pharmacology and pharmacogenetics in a genomics era: the DMET platform. *Pharmacogenomics*. 2010 Jan;11(1):89-103. Review.

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 Feb;19(2):170-9.

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 Feb;17(2):93-101.

Smith DJ, Evans R, Craddock N. Predicting response to lithium in bipolar disorder: a critical review of pharmacogenetic studies. *J Ment Health*. 2010 Apr;19(2):142-56.

Smith RL. Human genetic variations in oxidative drug metabolism. *Xenobiotica*. 1986 May;16(5):359-509.

Souery D, Papakostas GI, Trivedi MH. Treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*. 2006;67 Suppl 6:16-22.

Stadon S, Arranz J, Mancama D, Mata I, Kerwin RW. Clinical application of pharmacogenetics in psychiatry. *Psychopharmacolog*. 2002 Mar;162:18-23.

Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, et al. Amitriptyline or not, that is the question: pharmacogenetic testing of CYP2D6 and CYP2C19 identifies patients with low or high risk for side effects in amitriptyline therapy. *Clin Chem*. 2005 Feb;51(2):376-85.

Sugimoto K, Uno T, Yamazaki H, Tateishi T. Limited frequency of the CYP2C19*17 allele and its minor role in a Japanese population. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 Mar;65(3):437-9.

Szegedi A, Schwertfeger N. Mirtazapine: a review of its clinical efficacy and tolerability. *Expert Opin Pharmacother*. 2005 Apr;6(4):631-41. Review.

Testa B, Krämer SD. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 1. Principles and overview. *Chem Biodivers*. 2006 Oct;3(10):1053-101.

The Uppsala Monitoring Centre. Available from: <http://www.whoumc.org/DynPage.aspx?id=22676> [2009 Jan 08].

Thuermer N, Lunkenheimer J. The impact of the CYP2D6-polymorphism on dose recommendations for current antidepressants. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2006 Aug;256(5):287-93.

Tierney JG. Treatment-resistant depression: managed care considerations. *J Manag Care Pharm*. 2007 Jul;13(6 Suppl A):S2-7. Review

Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheiner J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenomics J*. 2008 Feb;8(1):4-15.

Tzvetkov MV, Brockmüller J, Roots I, Kirchheiner J. Common genetic variations in human brain-specific tryptophan hydroxylase-2 and response to antidepressant treatment. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Jun;18(6):495-506.

Ueda M, Hirokane G, Morita S, Okawa M, Watanabe T, Akiyama K, Shimoda K. The impact of CYP2D6 genotypes on the plasma concentration of paroxetine in Japanese psychiatric patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006 May;30(3):486-91. Epub 2006 Jan 18.

Uher R, Huetz-Diaz P, Perroud N, Smith R, Rietschel M, Mors O, Hauser J, Maier W, Kozel D, Henigsberg N, Barreto M, Placentino A, Dernovsek MZ, Schulze TG, Kalember P, Zobel A, Czerski PM, Larsen ER, Sourey D, Giovannini C, Gray JM, Lewis CM, Farmer A, Aitchison KJ, McGuffin P, Craig I (2009) Genetic predictors of response to antidepressants in the GENDEP project. *Pharmacogenomics J* 9:225–233

Uher R, Perroud N, Ng MY, Hauser J, Henigsberg N, Maier W, Mors O, Placentino A, Rietschel M, Sourey D, Zagar T, Czerski PM, Jerman B, Larsen ER, Schulze TG, Zobel A, Cohen-Woods S, Pirlo K, Butler AW, Muglia P, Barnes MR, Lathrop M, Farmer A, Breen G, Aitchison KJ, Craig I, Lewis CM, McGuffin P. Genome-wide pharmacogenetics of antidepressant response in the GENDEP project. *Am J Psychiatry*. 2010 May;167(5):555-64.

Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, Ripke S, Lucae S, Ising M, Dose T, Ebinger M, Rosenhagen M, Kohli M, Kloiber S, Salyakina D, Bettecken T, Specht M, Pütz B,

Binder EB, Müller-Myhsok B, Holsboer F. Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron*. 2008 Jan 24;57(2):203-9.

van der Weide J, Hinrichs JW. The influence of cytochrome p450 pharmacogenetics on disposition of common antidepressant and antipsychotic medications. *Clin Biochem Rev*. 2006 Feb;27(1):17-25

Viikki M, Kampman O, Illi A, Setälä-Soikkeli E, Anttila S, Huuhka M, Nuolivirta T, Poutanen O, Mononen N, Lehtimäki T, Leinonen E. TPH1 218A/C polymorphism is associated with major depressive disorder and its treatment response. *Neurosci Lett*. 2010 Jan 1;468(1):80-4. doi: 10.1016/j.neulet.2009.10.069. Epub 2009 Oct 27.

Wang HC, Yeh TL, Chang HH, Gean PW, Chi MH, Yang YK, Lu RB, Chen PS. TPH1 is associated with major depressive disorder but not with SSRI/SNRI response in Taiwanese patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 Feb;213(4):773-9. doi: 10.1007/s00213-010-2034-1.

Ward MP, Irazoqui PP. Evolving refractory major depressive disorder diagnostic and treatment paradigms: toward closed-loop therapeutics. *Front Neuroengineering*. 2010 May 31;3:7.

Wilkie MJ, Smith G, Day RK, et al. Polymorphisms in the SLC6A4 and HTR2A genes influence treatment outcome following antidepressant therapy. *Pharmacogenomics J*. 2009 Feb;9(1):61-70. Epub 2008 Feb 5.

Wolf CR, Smith G, Smith RL. Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics. *BMJ*. 2000 Apr; 8;320(7240):987-90.

Xu Z, Zhang Z, Shi Y, Pu M, Yuan Y, Zhang X, Li L. Influence and interaction of genetic polymorphisms in catecholamine neurotransmitter systems and early life stress on antidepressant drug response. *J Affect Disord*. 2011 Sep;133(1-2):165-73. doi: 10.1016/j.jad.2011.04.011. Epub 2011 Jun 16.

Yoshida K, Takahashi H, Higuchi H, Kamata M, Ito K, Sato K, Naito S, Shimizu T, Itoh K, Inoue K, Suzuki T, Nemeroff CB. Prediction of antidepressant response to milnacipran by norepinephrine transporter gene polymorphisms. *Am J Psychiatry*. 2004 Sep;161(9):1575-80.

Yu YW, Tsai SJ, Liou YJ, Hong CJ, Chen TJ. Association study of two serotonin 1A receptor gene polymorphisms and fluoxetine treatment response in Chinese major depressive disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006 Oct;16(7):498-503. Epub 2006 Feb 3

Zandi PP, Judy JT. The promise and reality of pharmacogenetics in psychiatry. *Clin Lab Med*. 2010 Dec;30(4):931-74.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Nov;392(6):1093-108. Epub 2008 Aug 10.

Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, Schwartz DA, Krishnan KR, Caron MG. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron*. 2005 Jan 6;45(1):11-6.

Zhou SF, Di YM, Chan E, Du YM, Chow VD, Xue CC, Lai X, Wang JC, Li CG, Tian M, Duan W. Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab*. 2008 Oct; 9(8):738-84.

Zhou Z, Roy A, Lipsky R, Kuchipudi K, Zhu G, Taubman J, Enoch MA, Virkkunen M, Goldman D. Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Oct;62(10):1109-18

Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Möller HJ, Bondy B, Ackenheil M. Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. *Biol Psychiatry*. 2004 Oct 15;56(8):581-6.

Zimmerman M, Chelminski I, McGlinchey JB, Posternak MA. A clinically useful depression outcome scale. *Compr Psychiatry*. 2008 Mar-Apr;49(2):131-40. Epub 2007 Dec 20.

Zimmerman M, Chelminski I, Posternak M. A review of studies of the Hamilton depression rating scale in healthy controls: implications for the definition of remission in treatment studies of depression. *J Nerv Ment Dis*. 2004 Sep;192(9):595-601.

Zimmerman M, McGlinchey JB, Posternak MA, et al. Differences between minimally depressed patients who do and do not consider themselves to be in remission. *J Clin Psychiatry*. 2005 Sep;66(9):1134-8.

Zobel A, Maier W. Pharmacogenetics of antidepressive treatment. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2010 Aug;260(5):407-17. Epub 2010 Jan 3.

Anexo 1

Genes e polimorfismos investigados

Tabela 1 - Polimorfismos padronizados nesta amostra.

GENE	POLIMORFISMO	RS	TaqMan assay ID
ABCB1	ABCB1_3435 C>T	rs1045642	C__7586657_20
ABCB1	ABCB1_2677nt G>T	rs1128503	C__7586662_10
ABCB1	C>T	rs2235040	C__15951386_20
SLC6A2	-182C/T	rs2242446	C__26354911_10
SLC6A2	A>G	rs36029	C__1232432_10
SLC6A2	A>G	rs1532701	C__9610072_10
SLC6A3 (DAT1)	C>T	rs8179029	C__25762034_10
SCL6A3 (DAT1)	A>C	rs2550936	C__15894769_10
HTR1A (5-HT1A, HTR1A)	-1019 T/C	rs6295	C__11904666_10
HTR1A (5-HT1A, HTR1A)	G>T	rs1364043	C__1393788_10
HTR1A (5-HT1A, HTR1A)	C>T	rs10042486	C__1393785_20
HTR2A (5-HT2A, HTR2A)	64185A>G	rs7997012	C__1619749_10
HTR2A (5-HT2A, HTR2A)	C>T	rs6311	C__8695278_10
HTR2A (5-HT2A, HTR2A)	1354 C>T (his452tyr)	rs6314	C__11696920_20
HTR2A (5-HT2A, HTR2A)	102 C>T	rs6313	customizado
HTR2A (5-HT2A, HTR2A)	69214G>A	rs7324218	C__29235764_10
TPH1	218A>C	rs1800532	C__8940793_10
TPH2	C>T	rs1487276	C__8376067_20
COMT	A>G (Val158Met)	rs4680	C__25746809_50
CYP2D6	2850 C>T	rs16947	C__27102425_10
CYP2D6	1846 G>A	rs3892097	C__27102431_D0
CYP2D6	2988 G>A	rs28371725	C__34816116_20
CYP2D6	100 C>T	rs1065852	C__11484460_40
CYP2D6	4180 G>C	rs1135840	C__27102414_10
CYP2D6	1023 C>T	rs28371706	C__2222771_40
CYP2D6	1707 del T	rs5030655	C__32407243_20
CYP2D6	2549 del A	rs35742686	C__32407232_50
CYP2D6	1863_1864ins(TTTCGCCCC)2		C__32407240_20
CYP2D6	-1584 C>G	rs1080985	C__32407252_30
CYP2D6	31 G>A	rs769258	C__27102444_80
CYP2D6	2613_2615 del AGA		C__32407229_60
CYP2D6	137_138 ins T	rs107707653	C__32407245_40
CYP2D6	3183 G>A	rs59421388	C__34816113_20
CYP2C9	3608 C>T (*2)	rs1799853	C__25625805_10
CYP2C9	42614 A>G (*3)	rs1057910	C__27104892_10
CYP2C19	-3402 C>T (*17)	rs11188072	customizado
CYP2C19	-806 C>T (*17)	rs12248560	C__469857_10
CYP2C19	17948 G>A (*3)	rs4986893	C__27861809_10
CYP2C19	19154 G>A (*3)	rs4244285	C__25986767_70

NOTA: TaqMan assay ID refere-se a identidade do assay na empresa Life Technologies.

ANEXO 2

Folha de reprodução do Certificado/Parecer da Comissão de Ética

Recebido em 09/02/2012
Departamento de Psiquiatria da FMUSP

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0827/11

Título: FARMACOGENÉTICA EM PSIQUIATRIA: BUSCA DE MARCADORES DE REFRATARIEDADE EM PACIENTES DEPRIMIDOS SUBMETIDOS À ECT

Pesquisador Responsável: Wagner Farid Gattaz

Pesquisador Executante: Carolina Martins do Prado

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: PSIQUIATRIA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 09/02/2012, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 09 de Fevereiro de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
 Fone: 55 11 2661-6442 ramais 16, 17, 18 e 20 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

ANEXO 3

Termo de consentimento livre e esclarecido

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "FARMACOGENÉTICA EM PSIQUIATRIA: BUSCA DE MARCADORES DE REFRATARIEDADE EM PACIENTES DEPRIMIDOS SUBMETIDOS À ECT".
2. PESQUISADOR: Wagner Farid Gattaz
 CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular/ Psiquiatra INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 25.956
 UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Psiquiatria
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Justificativa e objetivos da pesquisa – Você está convidado(a) a participar de uma pesquisa que tem o objetivo de identificar diferenças de resposta a medicamentos entre pacientes que melhoram da depressão com

antidepressivos e pacientes que não melhoram com este tipo de tratamento. Em outras palavras, algumas pessoas precisam fazer ECT (eletroconvulsoterapia) para melhorar os sintomas da depressão enquanto outras melhoram apenas com medicamentos. Com essa finalidade, faremos uma avaliação clínica que consiste em responder alguns questionários referentes ao histórico da sua doença e uma coleta de sangue. Com o presente estudo queremos identificar um conjunto de variáveis genéticas que influenciam na maneira do medicamento atuar em seu organismo. A identificação destas variáveis poderia, no futuro, permitir uma melhor adaptação da medicação antes do início do tratamento.

2 – Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais – Se você decidir participar, uma ficha de histórico e avaliação clínica será preenchida e também será feita uma coleta de 10 - 20 ml (equivalente a 3 colheres de sopa) de sangue por punção periférica da veia do antebraço. As amostras serão utilizadas para avaliações genéticas. Todo material será codificado de modo que a identidade dos participantes não seja revelada.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Desconfortos e riscos esperados – Os desconfortos e riscos esperados são mínimos e decorrentes apenas do processo da coleta de sangue. Você poderá sentir um pouco de dor ou desconforto durante a picada; este procedimento pode gerar um pequeno hematoma localizado.

5 – Benefícios que poderão ser obtidos - As informações advindas do estudo poderão beneficiar o sujeito de pesquisa e outros pacientes com Depressão no futuro, principalmente no que se refere à personalização do tratamento para estes quadros.

6 – Garantia de acesso - Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Wagner Farid Gattz que pode ser encontrado no endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 785, São Paulo – SP. Telefone 3069-8010. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas e a identidade de nenhum paciente será divulgada

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"Farmacogenética em psiquiatria: busca de marcadores de refratariedade em pacientes deprimidos submetidos à ECT"**.

Eu discuti com o Dr. Wagner Farid Gattaz sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data 24/01/12

Prof. Dr. Wagner F. Gattaz
Professor Titular
Departamento de Psiquiatria da FMUSP

ANEXO 4

Modelo de questionário respondido pelos participantes do estudo.

Entrevista no. _____

Data: ____/____/____

Entrevistador:

Identificação

Nome:

DNA:

RG: _____ Sexo: ☐ M ☐ F

Data de nascimento: ____/____/____

Etnia: ☐ caucasiano ☐ asiático ☐ pardo ☐ negro

Naturalidade:

Altura: _____ Peso: _____

Aspectos sócio econômicos

Profissão: _____ Anos de escolaridade: _____

Religião:

Estado civil: _____ Filhos: _____

Observações:

História da moléstia

Diagnóstico do prontuário:

Tempo de evolução da doença:

Data do primeiro episódio:

Número de episódios ou internações:

Sintomas psicóticos prévios:

Tentativas de suicídio:

Número de ECTs:

Histórico:

Hábitos e vícios

Antecedentes pessoais

Comorbidades Clínicas:

Comorbidades cirúrgicas:

Quais fármacos já fez uso e por quanto tempo:

Efeitos colaterais apresentados:

Antecedentes familiares

História familiar de transtornos do humor e grau de parentesco:

Observações:

SCID e Escalas

CID:

HAM-D-17: