CAROLINA MARTINS DO PRADO

**Desenvolvimento de metodologia para a
determinação dos genótipos principais dos
genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*:
aplicação na Farmacogenética**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo

2009

CAROLINA MARTINS DO PRADO

**Desenvolvimento de metodologia para a
determinação dos genótipos principais dos
genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*:
aplicação na Farmacogenética**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Elida Paula
Benquique Ojopi

São Paulo

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carolina Martins do Prado

Dissertação: Desenvolvimento de metodologia para a determinação dos genótipos principais dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*: aplicação na Farmacogenética.

Orientador (a): Profa. Dra Elida Paula Benquique Ojopi

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador (a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador (a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Presidente Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Folha de Reprodução do Certificado/Parecer da Comissão de Ética

zelinda

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 10.02.06, **APROVOU**, *ad-referendum*, o Protocolo de Pesquisa nº **1148/05**, intitulado "O uso de polimorfismos de DNA e análise da expressão gênica no estudo da Depressão em humanos e em animais", apresentado pelo Departamento de **PSIQUIATRIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Wagner Farid Gattaz**

Pesquisador(a) Executante: **Dra. Elida Paula Benquique Ojopi**

CAPPesq, 10 de Fevereiro de 2006.

Recebido: 13/02/06, às 10h
Departamento de Pesquisa da FMUSP

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

À minha mãe Edna pelo amor, paciência e ajuda em todos os momentos dessa jornada. Ao meu pai Luiz Carlos, irmão Carlos Guilherme e ao vovô Remo, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Elida por acreditar em mim e por conta da sua capacidade profissional me mostrar o caminho do aprendizado.

Ao Prof. Dr Wagner F. Gattaz por oferecer um laboratório com todos os recursos para que eu pudesse desenvolver o meu projeto.

Ao Prof. Dr Ricardo Moreno e a toda equipe do GRUDA por terem fornecido além de pacientes, informações necessárias ao trabalho.

Ao Dr. Ulrich M. Zanger que prontamente me enviou da Alemanha amostras que possibilitaram a identificação do CNV.

A toda equipe do Laboratório de Neurociências (LIM 27 HC-FMUSP) pelo carinho e convivência. Às minhas amigas Vanessa e Maria Carolina pela inestimável ajuda, pelo incentivo nos momentos difíceis e pelas longas conversas (sem vocês eu estaria perdida!). A Giselle e Julien pela amizade e ajuda quando precisava de socorro. A Leda pela sua sabedoria, a Dona Edivany por sempre ter uma palavra de atenção e cuidado comigo, a Lú, a Sandra, a menina Helena pela atenção e ajuda.

Ao Eduardo pela valiosa ajuda com a estatística.

À minha enorme família e todos os meus amigos que de alguma maneira, contribuíram para que mais uma etapa do meu aprendizado fosse concluída, sempre dando amor, força e alegrias.

À Juliana por sempre estar ao meu lado.

Ao meu querido amigo e tio Dr Laerte, pelos sábios conselhos e por sempre me incentivar a continuar nos momentos em que tudo parecia estar perdido.

Beware Of Darkness

Watch out now, take care
Beware of falling swingers
Dropping all around you
The pain that often mingles
In your fingertips
Beware of darkness

Watch out now, take care
Beware of the thoughts that linger
Winding up inside your head
The hopelessness around you
In the dead of night

Beware of sadness
It can hit you
It can hurt you
Make you sore and what is more
That is not what you are here for

Watch out now, take care
Beware of soft shoe shufflers
Dancing down the sidewalks
As each unconscious sufferer
Wanders aimlessly
Beware of Maya

Watch out now, take care
Beware of greedy leaders
They take you where you should not go
While Weeping Atlas Cedars
They just want to grow, grow and grow
Beware of darkness.

George Harrison

RESUMO

Prado CM. Desenvolvimento de metodologia para a determinação dos genótipos principais dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*: aplicação na farmacogenética [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

É comum pacientes responderem de maneiras diferentes a um mesmo tratamento e essa variabilidade na resposta pode ser atribuída a múltiplos fatores como idade, gênero, etnia, fatores genéticos, ambientais entre outros. A superfamília do Citocromo P450 (CYP) representa as enzimas responsáveis pelo metabolismo de substâncias endógenas e xenobióticos e, dentre os últimos, inclui-se mais de 60% de todas as medicações utilizadas. Sozinhas, as enzimas *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* são responsáveis pelo metabolismo de aproximadamente metade dos 200 medicamentos mais prescritos nos EUA. Os polimorfismos do gene *CYP2D6* têm grande importância na farmacogenética da Depressão Unipolar e atualmente alguns grupos de pesquisa recomendam ajustes de doses baseadas no seu genótipo, visto que muitos antidepressivos tricíclicos são metabolizados mais eficientemente pela enzima *CYP2D6*. Além dessa enzima, há a participação de *CYP2C19* e *CYP2C9* no metabolismo de outros medicamentos o que também torna interessante a avaliação de polimorfismos nos genes que as codificam. Desse modo, padronizamos ensaios de genotipagem para os genes *CYP2D6* (alelos *1, *2, *3, *4, *5, *6, *9, *10, *15, *17, *29, *35, *39, *40, *41), *CYP2C19* (alelos *1, *2, *3 e *17) e *CYP2C9* (alelos *1, *2 e *3) baseados na discriminação alélica com o sistema *TaqMan*[®]. De um total de 198 indivíduos, 148 foram genotipados para o gene *CYP2D6*. Os alelos *1 e *2 foram os mais frequentes (39,2 e 17,2% respectivamente), seguidos pelos alelos *4 (14,5%), *41 (5,4%), *35 (4,1%), *17 (3,4%), *5 (2,7%), *10 (2,4%), *6 (0,7%), *29 (0,7%) e *9 (0,3%). Desenvolvemos também uma nova metodologia para a determinação do número de cópias do gene *CYP2D6* e as duplicações do gene representaram 9,5% da amostra. Para o gene *CYP2C19*, 198 indivíduos foram genotipados e o alelo *1 foi o mais frequente (63,7%), seguido pelos alelos *17 (20,7%), *2 (15,3%) e *3 (0,3%). Nosso estudo foi o primeiro a determinar a

freqüência alélica do gene *CYP2C19* no Brasil. Para o gene *CYP2C9*, 152 indivíduos tiveram seus genótipos determinados e o alelo *1 foi o mais frequente (86,8%) seguido pelos alelos *2 (9,2%) e *3 (3,9%). Com este projeto, conseguimos desenvolver uma nova metodologia reprodutível e acessível para a genotipagem dos polimorfismos principais dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*. A identificação precoce de indivíduos suscetíveis a efeitos adversos, bem como de metabolizadores rápidos pode trazer grandes benefícios aos pacientes possibilitando assim uma medicina personalizada.

Palavras-chave: *CYP2D6*. *CYP2C19*. *CYP2C9*. Número de cópias do gene *CYP2D6*. Discriminação alélica. PCR em tempo real. Farmacogenética.

ABSTRACT

Prado CM. Development of methodology for determining the major genotypes of *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP2C9* genes: application in pharmacogenetics [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

It is a common thing for patients to respond differently to the same treatment. Thus, the variability in drug response can be attributed to multiple factors such as age, gender, ethnicity, genetic and environmental factors among others. The cytochrome P450 (CYP) superfamily contains the enzymes that are responsible for the metabolism of endogenous substances and xenobiotics, including more than 60% of all medications used. It is known that the enzymes *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP2C9* metabolize approximately half of the 200 most prescribed drugs in the USA. The genetic polymorphisms of *CYP2D6* have a major importance in the pharmacogenetics of the Unipolar Depression and recently some research groups already suggest dose adjustments based on the individual's *CYP2D6* genotypes, since many tricyclic antidepressants are mainly metabolized by the *CYP2D6* enzyme. Besides this enzyme, *CYP2C19* and *CYP2C9* also contribute for the metabolism of others drugs, fact that makes important the analysis of polymorphisms in these genes. Thus, we standardized genotyping tests for the genes *CYP2D6* (alleles *1, *2, *3, *4, *5, *6, *9, *10, *15, *17, *29, *35, *39, *40, *41), *CYP2C19* (alleles *1, *2, *3 and *17) and *CYP2C9* (alleles *1, *2 and *3) based on allelic discrimination, using TaqMan[®] genotyping system. Among 198 individuals, 148 were genotyped for the *CYP2D6* gene. Allele *1 and *2 were the most frequent (39.2 and 17.2% respectively), followed by alleles *4 (14.5%), *41 (5.4%), *35 (4.1%), *17 (3.4%), *5 (2.7%), *10 (2.4%), *6 (0.7%), *29 (0.7%) and *9 (0.3%). We have also developed a new methodology for determining the copy number variations of the *CYP2D6* gene that accounted for 9.5% of the duplications in our sample. For the *CYP2C19* gene, 198 subjects were genotyped and the allele *1 was the most common (63.7%), followed by the alleles *17 (20.7%), *2 (15.3%) and *3 (0.3%). In our concern, our study was the first to determine the allele frequency of the *CYP2C19* gene in Brazil.

For *CYP2C9*, 152 individuals were genotyped and the allele *1 was the most common (86.8%) followed by the alleles *2 (9.2%) and *3 (3.9%). With this project, we were able to develop a new methodology, which is reproducible and accessible for genotyping the most important polymorphisms of the genes *CYP2D6*, *CYP2C19* and *CYP2C9*. The previous identification of individuals at risk to develop adverse drug reactions as well as ultrarapid-metabolizers may bring benefits to the patients, thus leading to a personalized therapy.

Keywords: *CYP2D6*. *CYP2C19*. *CYP2C9*. Copy number variations. Allelic discrimination. Real-time PCR. Pharmacogenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de fatores que podem contribuir para a variabilidade na resposta terapêutica.....	21
Figura 2 - Localização das CYPs na célula..	28
Figura 3 - Polimorfismos de DNA.....	29
Figura 4 - Fenótipos da enzima CYP2D6.	30
Figura 5 - Representação esquemática da atividade enzimática da CYP2D6	31
Figura 6 - Esquema de dose e resposta terapêutica baseada no genótipo de <i>CYP2D6</i>	32
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 de <i>CYP2D6</i> e o <i>steady-state</i> da paroxetina	45
Figura 10 - Relação entre o genótipo de <i>CYP2D6</i> e o índice metabólico	46
Figura 11 - Distribuição do índice metabólico do omeprazol e S/R-mefenitoína em relação ao genótipo <i>CYP2C19*17</i>	50
Figura 12 - Concentrações plasmáticas de escitalopram em relação ao genótipo <i>CYP2C19</i>	51
Figura 13 - Distribuição dos polimorfismos investigados no gene <i>CYP2D6</i>	65
Figura 14 - Distribuição dos polimorfismos investigados no gene <i>CYP2C19</i>	65
Figura 15 - Esquema da <i>long PCR</i> para a detecção do alelo <i>CYP2D6*5</i>	73
Figura 16 - Esquema da <i>long template PCR</i> para a detecção da amplificação do gene <i>CYP2D6</i>	74
Figura 17 - Esquema de <i>long template PCR</i>	74
Figura 18 - Curva de amplificação das triplicatas dos genes <i>CYP2D6</i> e <i>RNase P</i>	80
Figura 19 - Cálculo das médias dos <i>Cts</i> dos genes <i>CYP2D6</i> e <i>RNase P</i>	81
Figura 20 - Representação o cálculo do $\Delta\Delta CT$ e do $2^{-\Delta\Delta CT}$	82
Figura 21 - Gel de agarose mostrando o fragmento amplificado que contém o polimorfismo 100C>T	90
Figura 22 - Gel de agarose mostrando o fragmento amplificado que contém o polimorfismo -3402 G>T.....	90
Figura 23 - Exemplos de eletroferogramas.....	91
Figura 24 - Gel de agarose mostrando resultado da <i>long template PCR</i>	92
Figura 25 - Gel de agarose mostrando resultados da <i>multiplex long PCR</i>	93
Figura 26 - Representação gráfica da curva de amplificação do gene <i>CYP2D6</i> e <i>albumina</i>	94
Figura 27 - Representação gráfica da curva de amplificação dos genes <i>CYP2D6</i> e <i>RNase P</i>	95
Figura 28 - Gráfico que ilustra a classificação do CNV.....	96
Figura 29 - Representação da curva de amplificação de uma amostra heterozigona para o polimorfismo -3402C>T do gene <i>CYP2C19</i>	97
Figura 30 - Representação da curva de amplificação de uma amostra homozigota CC para o polimorfismo 100 C>T do gene <i>CYP2D6</i>	97
Figura 31 - Representação da curva de amplificação de uma amostra homozigota TT para o polimorfismo 100 C>T do gene <i>CYP2D6</i>	98
Figura 32 - Representação da curva de amplificação de uma amostra homozigota GG para o polimorfismo 31 G>A do gene <i>CYP2D6</i>	98
Figura 33 - Representação da curva de amplificação de uma amostra heterozigota A>C para o polimorfismo 42614 A>C do gene <i>CYP2C9</i>	99
Figura 34 - Discriminação alélica	99

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.....	26
Quadro 4 - Reações de fase 2.....	26
Quadro 5 - Medicamentos metabolizados pelas enzimas CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9.....	37
Quadro 6 - Polimorfismos selecionados no gene <i>CYP2D6</i> e suas seqüências-alvo..	66
Quadro 7 - Polimorfismos avaliados no gene <i>CYP2C19</i> e suas seqüências-alvo..	66
Quadro 8 - Polimorfismos avaliados no gene <i>CYP2C9</i> e suas seqüências-alvo..	66
Quadro 9 - Variações alélicas estudadas do gene <i>CYP2D6</i>	67
Quadro 10 - Variações alélicas estudadas do gene <i>CYP2C19</i>	67
Quadro 11 - Variações alélicas estudadas do gene <i>CYP2C9</i>	68
Quadro 12 - Pares de oligonucleotídeos para amplificar seqüências-alvo do gene <i>CYP2C19</i>	68
Quadro 13 - Pares de oligonucleotídeos para amplificar seqüências-alvo do gene <i>CYP2D6</i>	69
Quadro 14 - Pares de oligonucleotídeos para amplificar seqüências-alvo do gene <i>CYP2C9</i>	69
Quadro 15 - Oligonucleotídeos para identificação do alelo <i>CYP2D6</i> *5.....	75
Quadro 16 - Oligonucleotídeos para identificação da amplificação do gene <i>CYP2D6</i>	75
Quadro 17 - Oligonucleotídeos utilizados na determinação do <i>CNV</i>	78
Quadro 18 - Sondas utilizadas na determinação do <i>CNV</i>	78
Quadro 19 - Ensaio <i>TaqMan</i> [®] <i>Drug Metabolism SNP Genotyping Assays</i> e <i>Custom TaqMan</i> [®] <i>SNP Genotyping Assays</i> utilizados para detecção dos polimorfismos no gene <i>CYP2C19</i>	85
Quadro 20 - Ensaio <i>TaqMan</i> [®] <i>Drug Metabolism SNP Genotyping Assays</i> e <i>Custom TaqMan</i> [®] <i>SNP Genotyping Assays</i> utilizados para detecção dos polimorfismos no gene <i>CYP2D6</i>	85
Quadro 21 - Seqüências de oligonucleotídeos e sondas dos ensaios feitos sob encomenda (<i>Custom TaqMan</i> [®] <i>SNP Genotyping Assays</i>).....	85
Quadro 22 - Identificação dos ensaios <i>TaqMan</i> [®] <i>Drug Metabolism SNP Genotyping Assays</i> utilizados para detecção dos polimorfismos no gene <i>CYP2C9</i>	86
Quadro 23 - Determinação do fenótipo predito para <i>CYP2D6</i>	87
Quadro 24 - Determinação do fenótipo predito para <i>CYP2C19</i>	88
Quadro 25 - Determinação do fenótipo predito para <i>CYP2C9</i>	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais alelos <i>CYP2D6</i> , efeito no metabolismo enzimático e frequências (%) alélicas em algumas populações	42
Tabela 2 - Frequências (%) fenotípicas de UMs e PMs para <i>CYP2D6</i> em diferentes populações.....	44
Tabela 3 - Principais alelos <i>CYP2C19</i> , efeito no metabolismo enzimático e frequências (%) alélicas em algumas populações.	43
Tabela 4 - Frequências (%) alélicas para <i>CYP2C9</i> em diferentes populações.....	54
Tabela 5 - Médias de idade (anos) da amostra de 198 pacientes e controles.. ..	62
Tabela 6 - Regras de classificação (pontos de cortes) utilizadas para a determinação do <i>CNV</i>	68
Tabela 7 - Frequências alélicas identificadas em nossa amostra para o gene <i>CYP2D6</i>	100
Tabela 8 - Frequências dos genótipos amplificados encontrados em nossa amostra.....	101
Tabela 9 - Frequências alélicas identificadas em nossa amostra para o gene <i>CYP2C19</i>	101
Tabela 10 - Frequências alélicas identificadas em nossa amostra para o gene <i>CYP2C9</i>	102
Tabela 11 - Frequências fenotípicas para <i>CYP2D6</i> encontradas em nossa amostra.....	102
Tabela 12 - Frequências fenotípicas para <i>CYP2C19</i> encontradas em nossa amostra.....	103
Tabela 13 - Frequências fenotípicas para <i>CYP2C9</i> encontradas em nossa amostra.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADR – Reação adversa a medicamento (*adverse drug reaction*)
CNVs – Variações no número de cópias (*copy number variations*)
COOH – Ácido carboxílico
CYP – Citocromo P450
CYP2C19 – Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 19
CYP2C9 – Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 9
CYP2D6 – citocromo P450, família 2, subfamília D, polipeptídeo 6
EHs – Epóxe-hidrolases
EM – Metabolizador extensivo ou normal (*extensive metabolizer*)
FMOs – Flavina monooxigenases
GST - Glutathione-S-transferase
IM – Metabolizador intermediário (*intermediate metabolizer*)
kb – Quilobase
MR – Índice metabólico (*metabolic ratio*)
MT – Metiltransferases
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAT - N-acetiltransferase
NH₂ – Amina
OH – Hidroxila
Pb – Pares de bases
PM – Metabolizador lento (*poor metabolizer*)
PPIs – Inibidores de bomba de próton (*proton pump inhibitors*)
RE – Retículo endoplasmático
RH – Substrato orgânico
SH – Tiol
SNP – Polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms*)
SSRIs - Inibidores seletivos de recaptação de serotonina (SSRI – *selective serotonin re-uptake inhibitors*)
STAR*D - *Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression*
SULT – Sulfotransferase
TCA – Antidepressivos tricíclicos (*tricyclic antidepressants*)
UGT - UDP-glucuronil transferase
UM – Metabolizador ultra-rápido (*ultrarapid metabolizer*)
xN – Amplificação do gene CYP2D6

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Histórico	19
1.2 Considerações gerais.....	21
1.2.1 Aspectos farmacológicos	22
1.2.3 Metabolismo dos fármacos	23
a) metabolismo de Fase 1	23
b) metabolismo de Fase 2	25
c) locais de metabolismo de medicamentos	27
1.3 FARMACOGENÉTICA	28
1.3.1 Sistema do citocromo P450.....	33
a) gene <i>CYP2D6</i>	40
b) gene <i>CYP2C19</i>	48
c) gene <i>CYP2C9</i>	53
2 JUSTIFICATIVA.....	57
3 OBJETIVOS.....	59
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.1 Casuística.....	62
4.2 Extração de DNA.....	63
4.3 Análise dos alelos.....	63
4.4 <i>PCR</i> e reação de seqüenciamento.....	68
4.5 <i>Long template PCR</i>	72
4.6 <i>PCR</i> em tempo real – determinação do número de cópias do gene <i>CYP2D6</i>	77
4.7 Discriminação alélica com o sistema <i>TaqMan</i> [®]	84
4.8 Determinação dos fenótipos preditos	86
5 RESULTADOS	89
5.1 Padronização das <i>PCRs</i> e reações de seqüenciamento.....	90
5.2 <i>Long template PCR</i> para detecção da duplicação do gene <i>CYP2D6</i> e do alelo <i>CYP2D6*5</i>	92
5.3 Padronização da <i>PCR</i> em tempo real para a quantificação do número de cópias do gene <i>CYP2D6</i>	93
5.4 Análises dos resultados – cálculo do número teórico de cópias do gene <i>CYP2D6</i>	95
5.5 Discriminação alélica com o sistema <i>TaqMan</i> [®]	96
5.6 Frequências alélicas	100
5.7 Frequências fenotípicas	102

6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÃO	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
ANEXO A - Haplótipos do gene <i>CYP2D6</i> encontrados em nossa amostra.....	132
ANEXO B - Haplótipos do gene <i>CYP2C19</i> encontrados em nossa amostra.....	136

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A década de 1950 foi a época na qual a farmacogenética emergiu como uma nova ciência, quando iniciou-se a idéia de que fatores genéticos poderiam alterar a farmacocinética e a farmacodinâmica do medicamento (Meyer, 2004; Eichelbaum et al., 2006). Nesse período, novas técnicas permitiram medidas mais acuradas das atividades enzimáticas, dos metabólitos e conseqüentemente, da resposta a fármacos.

Em 1959, o pesquisador alemão Friedrich Vogel utilizou pela primeira vez o termo 'farmacogenética' (Nebert et al., 2008) mas somente em 1962, no livro escrito por Kalow, que a farmacogenética foi definida como estudo da hereditariedade e resposta às drogas (Meyer, 2004).

Durante a Segunda Guerra Mundial, pesquisadores observaram que soldados afro-americanos apresentaram grave hemólise quando expostos a doses habituais de primaquina (medicamento antimalárico). Mais tarde constatou-se que esta hemólise era causada por uma deficiência hereditária da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) a qual, alterava o metabolismo eritrocitário (Meyer, 2004). Esta descoberta explicou porque a hemólise foi observada principalmente em afro-americanos nos quais a deficiência é comum e raramente em caucasianos descendentes do Norte, Oeste e Leste Europeu (Eichelbaum et al., 2006). O fármaco succinilcolina, um relaxante muscular administrado como adjuvante da anestesia, é outro exemplo de que uma variação genética pode causar uma resposta anormal ao medicamento – neste caso, uma prolongada apnéia em alguns pacientes (Motulsky et al., 2006). Investigações subseqüentes atribuíram esse efeito adverso a uma alteração da enzima butiril-colinesterase que mais tarde mostrou ser uma alteração genética autossômica recessiva (Enson et al., 2001; Meyer, 2004).

Em 1968, foram realizados estudos com grupos de gêmeos idênticos e fraternos com o intuito de se determinar a contribuição genética na taxa da concentração plasmática de vários medicamentos. Estes estudos promoveram uma evidência convincente de que, para muitos medicamentos, os fatores genéticos são responsáveis pela maioria da variabilidade na meia-vida plasmática entre diferentes indivíduos (Meyer, 1994; Meyer, 2004).

Apesar dos primeiros eventos na pesquisa farmacogenética envolverem algumas deficiências comuns em enzimas metabolizadoras de medicamentos, esta área de estudo foi impulsionada pela descoberta, nos anos 1970, do polimorfismo na enzima reponsável pela oxidação dos medicamentos debrisoquina (anti-hipertensivo) e esparteína (antiarrítmico). Dois grupos independentes observaram reações adversas inesperadas para estes medicamentos em participantes de estudos farmacocinéticos; análises do plasma destes indivíduos identificaram uma diferença na concentração sérica do medicamento maior do que os participantes que não apresentaram as reações adversas e desse modo dois fenótipos de resposta foram identificados: os metabolizadores extensivos ou normais (EMs – *extensive metabolizers*) e os metabolizadores lentos (PMs – *poor metabolizers*) (Eichelbaum et al., 1979; Smith et al., 1986). Na mesma época, Bertilsson et al. (1985), mostrou que o metabolismo da nortriptilina e desmipramina apresentava esta variação. Estudos subseqüentes mostraram que estes medicamentos eram metabolizados pela mesma enzima, P450 citocromo monooxidase que mais tarde foi denominada de CYP2D6. As bases genéticas do polimorfismo debrisoquina/esparteína foram elucidadas apenas 15 anos mais tarde, quando os alelos *CYP2D6*3* e *CYP2D6*4* foram identificados. Em seguida um terceiro grupo (Johansson et al., 1993), identificou indivíduos com metabolismo muito rápido para a debrisoquina o que, mais tarde, originaria a primeira descrição de um gene multiplicado, estável e ativo, e assim foi definido o termo metabolizador ultra-rápido (UM - *ultrarapid-metabolizers*) (Meyer, 1994; Meyer, 2004).

Devido a limitações técnicas, os primeiros trabalhos de farmacogenética eram focados em cuidadosas observações de idiosincrasias no fenótipo. No entanto, com o avanço das técnicas moleculares, tornou-se possível a identificação e caracterização de variações específicas no DNA. Os mais importantes alvos da farmacogenética são os genes que codificam enzimas responsáveis pela farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos (Hines et al., 2008). Portanto, a estratégia primária da farmacogenética é estudar variações nas seqüências em genes com potencial de afetar a resposta aos medicamentos (Enson et al., 2001).

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 95% 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).

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 freqüentemente 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.

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

Os efeitos que os fármacos causam resultam de um conjunto complexo de processos em que intervêm fatores diversos. 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.

1.2.3 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 dos fármacos são compostos lipofílicos os quais, 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. 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 tornem-se 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, dessulforilação, 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	$RNHCH_3 \rightarrow RNH_2 + CH_2O$	Imipramina, diazepam, codeína, morfina, tamoxifeno, eritromicina
O-desalquilação	$ROCH_3 \rightarrow ROH + CH_2O$	Codeína, dextrometorfano
Hidroilação alifática	$RCH_2CH_3 \rightarrow RCHOHCH_3$	Fenobarbital, midazolam, tolbutamida
Hidroilação aromática		Fenitoína, fenobarbital, propanolol, anfetamina, warfarina
N-oxidação	$RNH_2 \rightarrow RNHOH$	Meperidina, dapsona,
S-oxidação		Omeprazol, cimetidina, tioridazina
Desaminação		Diazepam, anfetamina
2. Reações de Hidrólise
	Carbamazepina
	$R_1COR_2 \rightarrow R_1COOH + R_2OH$	Meperidina, enalapril, aspirina, procaina, cocaína
	$R_1CNHR_2 \rightarrow R_1COOH + R_2NH_2$	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 glutatona-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-gulcuronil 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 elétrons de um grupo funcional hidrofílico (glutathione, ácido glucurônico, sulfato ou um grupamento acetil) que é unido por ligações covalentes ao aceptor 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'-fosfossulfato 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.

c) locais de metabolismo de medicamentos

As enzimas metabolizadoras de medicamentos são expressas na maioria dos tecidos. Contudo, os maiores níveis de expressão são encontrados no trato gastrointestinal (fígado, intestino delgado e cólon). Desse modo, medicamentos administrados por via oral, sofrem o metabolismo de primeira passagem (também conhecido como metabolismo pré-sistêmico ou efeito de primeira passagem) que é um fenômeno no qual a concentração do medicamento é significativamente reduzida pelas enzimas hepáticas, antes de atingir a circulação sistêmica. Enquanto alguns medicamentos não sofrem esse efeito, as passagens subsequentes no fígado resultam em posterior metabolismo do medicamento até sua eliminação.

As enzimas de Fase 1 (CYPs, FMOs e EHs), e algumas de Fase 2, principalmente UGTs, estão localizadas no retículo endoplasmático das células. O lúmen do retículo endoplasmático é fisicamente diferente dos outros componentes do citosol que é perfeitamente ajustado para a função metabólica dessas enzimas: moléculas hidrofóbicas entram na célula e encaixam na bicamada lipídica, onde elas encontram as enzimas de Fase 1 (Neve e Ingelman-Sundberg, 2008) (Figura 2).

Uma vez oxidados, os fármacos são conjugados na membrana pelas UGTs ou pelas transferases e os metabólitos são então transportados para a corrente sanguínea. Hepatócitos, que constituem mais de 90% das células do fígado, são responsáveis pela maioria do metabolismo, produzindo os substratos conjugados que podem também ser transportados pela membrana do canal biliar para a bile e para a eliminação no intestino (Brunton e Parker, 2008).

Figura 2 - Localização das CYPs na célula. As CYPs estão encaixadas na bicamada lipídica do retículo endoplasmático (RE). A maioria das enzimas está localizada na superfície citoplasmática do RE. Uma segunda enzima, a NADPH-citocromo P450 oxirredutase, transfere elétrons para a CYP que oxida substratos xenobióticos, na presença do O_2 , muitos dos quais são hidrofóbicos e solubilizados no RE. Uma única espécie de NADPH-CYP oxirredutase transfere elétrons para todas as isoformas CYPs no RE (adaptado de 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 microsatélites, 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.

- **Microsatélites** → exemplo de uma repetição trinucleotídica que varia em número entre os indivíduos.
 Indivíduo 1 cagtc**caacaacaacaacaacaaca**---gtcga
 Indivíduo 2 cagtc**caacaacaacaacaacaacaaca**agtcga
 Indivíduo 3 cagtc**caacaacaacaacaaca**-----gtcga
- **Inserções e deleções** → exemplo de uma deleção de três nucleotídeos.
 cagtc**caatg**ctag**tag**ctagctactagctagcagc
 Cagtc**caatg**ctag---ctagctactagctagcagc
- **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. Microsatélites são seqüências de bases que se repetem. Existe uma grande diversidade de microsatélites em nosso genoma, dentre eles microsatélites de 2, 3 ou 4 bases, ou de maior número de bases. Inserções ou deleções de seqüências 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; McCarthy 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. 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 freqüência 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 ultra-rápidos (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 - Esquema de dose e resposta terapêutica baseada 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 (indicado pela linha rosa). A dose baseada nos genótipos (barra clara no gráfico) também varia em relação à dose padrão (barra escura no gráfico) (Adaptado de Kirchheiner et al., 2006).

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 fenocópia (*phenocopying*) (Eichelbaum et al., 2006).

Liao et al. (2008) recentemente, mostrou uma simulação quantitativa indicando que a utilização da informação farmacogenômica melhoraria significativamente o tratamento e reduziria acentuadamente 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, foram melhoradas quando testes farmacogenéticos foram utilizados 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 significativamente a qualidade e a segurança dos medicamentos, a eficiência do desenvolvimento de medicamentos e o tratamento de pacientes.

1.3.1 Sistema do citocromo P450

Citocromo P450 pertence a um grupo de enzimas conhecidas como monooxigenases, às quais incorporam um átomo de oxigênio em substratos orgânicos (Martinus et al., 2000). As enzimas do citocromo P450 (CYPs), integram uma superfamília de enzimas do tipo heme. Elas são encontradas nos cinco reinos

biológicos, possivelmente, indicando que as P450s podem ter evoluído a partir de um ancestral comum (Ito et al., 2008).

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).

Essas enzimas diferem umas das outras na sua seqüência de aminoácidos, na regulação por inibidores e agentes indutores e na especificidade das reações que catalisam. As enzimas P450 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 a similaridade das suas seqüências (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, reação catalisada pelas enzimas do citocromo P450 apresentam a seguinte estequiometria (Poolsup et al., 2000):

Esta reação exige a presença do substrato ("RH"), da enzima P450, de oxigênio molecular (O_2), 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 co-fator, NADPH. O metabolismo de um substrato pela CYP consome uma molécula de O_2 e produz 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 $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}\cdot\text{RH}$. Esse complexo combina-se com outro próton, produzindo água e um complexo oxeno férrico $(\text{FeO})^{3+}\cdot\text{RH}$. O $(\text{FeO})^{3+}$ 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. Isto é devido 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 CYPs podem metabolizar um único composto em várias posições (Hang et al., 2003). Esta promiscuidade das CYPs é devida 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 a alta frequência 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.

Os polimorfismos das enzimas do citocromo P450 têm um grande efeito nas variações das respostas a medicamentos utilizados no tratamento de muitas doenças tais como: depressão, psicoses, câncer, doenças cardiovasculares e gastrintestinais, dor, epilepsia, entre outras. Estas enzimas são responsáveis por cerca de 80% de todo o metabolismo de fase 1 (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

As enzimas CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 são responsáveis pelo metabolismo de mais de 40% dos 200 medicamentos mais prescritos nos EUA (Figura 8) (Quadro 5) (Zanger et al., 2008).

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

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	
ANTICONVULSIVANTES			
Fenitoína		X	X
Valproato			X

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

Medicamentos	Metabolismo		
	CYP2D6	CYP2C19	CYP2C9
ANTIPSICÓTICOS			
Aripiprazol	X		
Haloperídol	X		
Risperidona	X		
Tioridazina	X		
ANTIARRÍTMICOS			
Flecainida	X		
Propafenona	X		
ANTI-HIPERTENSIVOS			
Ibesartan			X
Losartan			X
ANTICOAGULANTES			
Warfarina			X
Clopidogrel		X	
BETA BLOQUEADORES			
Metoprolol	X		
Carvedilol	X		
HIPOGLICEMIANTES			
Glimepirida			X
Glipizida			X
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			
Ondasedron	X		

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

No que diz respeito à psiquiatria, o tratamento é caracterizado por uma grande diferença na resposta ao medicamento e na dose requerida entre os pacientes. Todos os antipsicóticos e antidepressivos são moléculas altamente lipofílicas, que estão sujeitas a metabolização extensiva principalmente pelas enzimas do citocromo P450, antes de serem excretadas. Estima-se que 50 a 60% da dose do medicamento é dependente das enzimas CYP2D6 e CYP2C19 (van der Weide et al., 2006) e cerca de 80% dos antidepressivos e antipsicóticos são metabolizados pela CYP2D6 e CYP2C19, CYP2C9 (Maier et al., 2008).

A dose do medicamento é freqüentemente ajustada na base da tentativa e erro e o ajuste da dose de acordo com o genótipo melhoraria este processo consideravelmente (van der Weide et al., 2006).

Os polimorfismos do gene *CYP2D6* têm grande importância na farmacogenética da Depressão Unipolar (Binder et al., 2006) e recomendações de doses baseadas no genótipo *CYP2D6* já foram sugeridas (Kirchheiner et al., 2004). 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).

Muitos dos 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 (Brøsen, 2004; 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 re-uptake 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).

No caso dos benzodiazepínicos, seu metabolismo é influenciado pela enzima *CYP2C19*. Esta é uma classe de medicamentos com propriedades sedativas, ansiolíticas e anticonvulsivantes (Inomata et al., 2005).

a) gene *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 beta-bloqueadores, 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 alcalóides 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.

Populações	Alelos CYP2D6												Referência
	Funcionais		Não-funcionais				Função reduzida						
	*1	*2	*3	*4	*5	*6	*9	*10	*17	*29	*41	XN	
África Subsaariana	24,4	32,7	-	2,8	5,9	-	0	4,3	12,2	6,7	2,8	6,7	Sistonen et al. (2007)
África Oriental (A)	-	27,2	0,1	3,0	3,9	0	0	5,2	18,4	18,2	0	13	Sistonen et al. (2009)
Oriente Médio	35,1	25,0	-	6,8	3,7	1,4	0	0,7	2,0	-	16,9	7,1	Sistonen et al. (2007)
Sul da Índia	-	34,8	0	7,3	1,9	-	-	10,2	0	-	-	-	Naveen et al. (2006)
Ásia central/sul	43,3	29,0	-	8,1	3,8	-	0	3,8	-	0,2	10,5	1,0	Sistonen et al. (2007)
Ásia ocidental (C)	-	30,1	0	7,0	2,6	1,1	0,1	4,1	1,5	0	16,9	7,8	Sistonen et al. (2009)
China e Japão	-	15,8	0	3,5	6,4	0	0	38,3	0	0	3,8	1,6	Sistonen et al. (2009)
Japão	-	12,9	0	0	6,2	-	-	38,6	0	-	-	-	Kubota et al. (2000)
Europa	34,4	28,7	0,3	17,2	3,2	0,6	2,5	2,9	-	-	7,0	2,8	Sistonen et al. (2007)
Sul da Europa (B)	-	30,2	1,5	16,8	2,1	1,1	1,5	2,4	0,1	0	4,5	2,7	Sistonen et al. (2009)
França e Alemanha	-	29,3	1,1	18,9	5,1	0,5	3,5	2,9	0	0	7,1	2,3	Sistonen et al. (2009)
América	60,2	30,1	-	3,2	0,9	-	0	-	0,5	-	-	5,1	Sistonen et al. (2007)
América central	-	22,2	0,4	9,6	1,0	0,1	0	5,6	1,1	0	0	6,1	Sistonen et al. (2009)
Argentina e Paraguai	39,9	23,8	0	17,8	-	-	-	2,5 a 14,3	-	-	-	-	Baillet et al. (2007)
Brasil (D)	38,4	18,3	1,1	13,2	2,2	0,5	1,6	2,1	1,3	-	8,2	4,6	Kohlausch et al. (2008)

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

A atividade enzimática da *CYP2D6* abrange desde a completa deficiência enzimática até o metabolismo ultra-rápido 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, dexametorfano ou esparteína) (Zanger et al., 2008).

De acordo com a atividade enzimática de CYP2D6, pode-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; Brockmöller 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 a 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	8,9		Lopez et al. (2005); Bernard et al. (2006)
Suíços	10		Lopez et al. (2005); Bernard et al. (2006)
África	0-19		Lopez et al. (2005); Bernard et al. (2006)
Norte da África		40	Sistonem et al. (2007)
América		8	Sistonem et al. (2007)
Afro-americanos	1,9-7,3		Lopez et al. (2005); Bernard et al. (2006)
Hispânicos	2,2-6,6		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 para o 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 ultra-rápidos.

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.

Já está bem estabelecido que polimorfismos no gene *CYP2D6* afetam a farmacocinética do metoprolol e do carvedilol. Assim, a genotipagem para *CYP2D6* em pacientes que necessitam utilizar esses fármacos pode ser útil na predição da resposta terapêutica (Tomalik-Scharte et al., 2008). A *CYP2D6* também metaboliza os antiarrítmicos encainida, flecainida, propafenona.

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 co-administração 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). A co-administração 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 (Jin et al., 2005).

Segundo Goetz et al. (2008), mulheres tratadas com tamoxifeno que apresentam alelos *CYP2D6* associados com a ausência ou redução da atividade enzimática (*CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*41*), apresentam menor tempo de reincidência e piora na progressão da doença quando comparadas com mulheres que possuem alelos funcionais. As pacientes PMs também podem sofrer ADRs devido à grande exposição ao tamoxifeno que inclui trombose venosa e câncer endometrial (Beverage et al., 2007).

Cerca de 40% das lactantes nos EUA fazem uso da codeína para o alívio de dores associadas ao parto. A codeína é um pró-fármaco e seu efeito analgésico depende da biotransformação em morfina pela *CYP2D6*. Após o relato da morte de um neonato devido a intoxicação por opióide, amamentado por uma mãe UM que fazia uso de codeína. Manadi et al. (2009) estudou mães e bebês com ou sem sinais de intoxicação após a exposição à codeína enquanto amamentados. Os pesquisadores constataram uma concordância de 71% entre intoxicação materna e dos neonatos. Duas mães com bebês que apresentaram severa intoxicação eram UMs para *CYP2D6*. Desse modo, mães UMs que fazem uso de codeína, quando amamentam, podem oferecer risco aos seus filhos recém nascidos.

b) gene *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 21 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-hidroxi-metilfenitoína 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 conseqüentemente 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 (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 (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 Rosenberg 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*).

Inibidores de bomba de próton são metabolizados extensivamente pela enzima CYP2C19. A farmacocinética e o efeito da inibição ácida já estão bem correlacionados com o genótipo *CYP2C19 in vivo* (Schwab et al., 2004). Assim, o genótipo *CYP2C19* é um forte determinante no sucesso do tratamento de refluxo gastroesofágico, e úlceras gástricas *H. pilory* positivas. De acordo com Kurzawski et al. (2006), o efeito de alelos EMs é a baixa concentração plasmática dos *PPIs* e a diminuição da taxa de cura em pacientes quando comparados com pacientes PMs. No Japão onde aproximadamente 20% das pessoas são PMs, Furuta et al. (2007), constatou que a terapia baseada no genótipo de *CYP2C19* levava a 96% de sucesso no tratamento da *H. pilory* enquanto apenas 70% dos pacientes se beneficiaram do tratamento padrão. O custo dos dois tratamentos foi similar, indicando assim que, a eficiência do tratamento pode ser atingida sem custos adicionais.

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).

De acordo com Kim et al. (2008), o genótipo de *CYP2C19* afeta a concentração plasmática do pró-fármaco clopidogrel, um antiagregante plaquetário, sendo responsável pela variação na resposta a este medicamento. Alelos PMs para *CYP2C19* levam a uma reduzida bioativação deste fármaco (Hulot et al., 2006).

Cerca de 3-5% 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 negróides; 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 freqüente em chineses (5%) e menos freqüente em afro-americanos (0,4%) e caucasianos (0,04%). O alelo *CYP2C19**17 está presente em chineses, suecos e etíopes em freqüências 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	-	-	-	18,0	Sim et al. (2006)
Etiópia	-	-	-	18,0	Sim et al. (2006)
Noruega	59,3	18,1	0,6	22,0	Rudberg et al. (2007)
China	69,7	24,7	3,3	1,2	Chen et al. (2008)
Japão	57,9	27,9	12,8	1,3	Sugimoto et al. (2008)
Sul da África	-	21,7	0	-	Sistonen et al. (2009)
África Oriental	-	14,9	0,7	-	Sistonen et al. (2009)
Sul da Europa	-	13,3	0	-	Sistonen et al. (2009)
Europa Oriental	-	14,0	0,2	-	Sistonen et al. (2009)
América central	-	9,7	0,1	-	Sistonen et al. (2009)

c) gene *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, antiinflamatórios 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 freqüentes 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 freqüências 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 freqüência é menor (4% e 2% respectivamente). Em asiáticos, a freqüência do alelo *3 é de 3% e o alelo *2 não foi encontrado.

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

Populações	Alelos		Referência
	*2	*3	
África Oriental	4,3	1,2	Sistonen et al. (2009)
Norte da África	13,4	10,2	Sistonen et al. (2009)
Europa	13,1	6,7	Sistonen et al. (2009)
Oeste da Ásia	8,6	9,0	Sistonen et al. (2009)
Sul da Ásia	0,6	3,0	Sistonen et al. (2009)
Norte da América	1,5	3,0	Sistonen et al. (2009)
América Central	7,0	4,0	Sistonen et al. (2009)
América do Sul	5,7	4,4	Sistonen et al. (2009)
Brasil	8,6	6,5	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, fenitoina (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, tolbitamida 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 antiinflamatórios 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.

O antagonista de vitamina K, warfarina, é o anticoagulante oral mais prescrito para o tratamento de tromboembolismo venoso e das trombozes arteriais. Este anticoagulante é caracterizado por um pequeno índice terapêutico que varia muito entre os pacientes. A warfarina inibe a enzima vitamina K epóxi-redutase codificada pelo gene *VKORC1* (Singh et al., 2007). No metabolismo da warfarina os alelos *2 e *3 codificam enzimas que apresentam aproximadamente 12% e 5%, respectivamente, da capacidade enzimática normal. Desse modo, ambos os alelos têm um efeito substancial na depuração deste medicamento. Indivíduos homozigotos para o alelo *3 mostraram uma redução de 90% na eliminação da S-warfarina em comparação com homozigotos para o alelo selvagem (Zhou et al., 2008). Deste modo, a presença dos alelos de atividade diminuída *CYP2C9**2 e *3 está associada a um aumento da concentração plasmática da warfarina, aumentando o risco de sangramentos. Polimorfismos no gene *VKORC1* também estão associados com a dose requerida de warfarina. Indivíduos com risco elevado

de hemorragia e trombose poderiam ser previamente identificados com um teste genético para os genes *CYP2C9* e *VKORC1* antes do início da terapia (Singh et al., 2007). Desse modo, polimorfismos genéticos do *CYP2C9* são uns dos fatores que mais podem afetar a segurança e a eficácia do tratamento (Tomalik-Scharte et al., 2008).

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.

2 JUSTIFICATIVA

A existência de vários estudos comprova a importância dos polimorfismos genéticos de *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* no metabolismo de diversos medicamentos. Tratamentos com doses-padrão provocam diferentes efeitos adversos e com frequência causam uma remissão parcial de sintomas ou até mesmo nenhum efeito.

Sabendo que a resposta ao tratamento com antidepressivos também varia entre pacientes e que tais respostas podem diferir em função de polimorfismos nas enzimas *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* aliados à inexistência de um teste acessível no Brasil, justifica-se esse estudo.

3 OBJETIVOS

Desenvolvimento de metodologia para a determinação dos genótipos principais dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*.

Objetivos específicos

1. Estabelecer uma metodologia para a análise de polimorfismos de nucleotídeo único, inserções, deleções e variações no número de cópias em *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*.
2. Determinar os alelos mais freqüentes e com repercussão funcional mais importante dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* em nossa amostra.
3. Disponibilizar a metodologia desenvolvida no item 2 para a prática clínica na Psiquiatria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Coletamos um total de 198 amostras de DNA sendo 147 mulheres e 51 homens, com idade média de 43,0 anos (DP 1,6; mínimo 19; máximo 74) para mulheres e 42,7 anos (DP 11,6; mínimo 21; máximo 63) para homens. Desses, 117 indivíduos [85 mulheres, idade média 42,1 anos (DP 12,0; mínimo 19; máximo 72) e 32 homens, idade média 40,5 anos (DP 11,9; mínimo 21; máximo 60)] são provenientes de pacientes do Grupo de Estudos de Doenças Afetivas (GRUDA) do Departamento e Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Dr. Ricardo A. Moreno. Estes pacientes inicialmente foram diagnosticados com Depressão Maior. Os demais 81 [62 mulheres, idade média 45,2 anos (DP 11,2; mínimo 27; máximo 74) e 19 homens, idade média 45,2 anos (DP 11; mínimo 26, máximo 63)] são indivíduos sem histórico pessoal/familiar de doença psiquiátrica obtidos do banco de DNA do Laboratório de Neurociências – LIM 27 (IPq-HCFMUSP) (Tabela 5). Todos os participantes foram informados sobre o protocolo do estudo e somente participaram aqueles que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Tabela 5 - Médias de idade (anos) da amostra de 198 pacientes e controles.

	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
Controles					
Feminino	62	45.18	11.23	27	74
Masculino	19	45.21	11.01	26	63
Pacientes					
Feminino	85	42.19	11.98	19	72
Masculino	32	40.52	11.93	21	60
Total	198	43.19	11.69	19	74

NOTA: DP – desvio padrão.

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 ressuspendido 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 *MultilImage Light Cabinet*, *Chemilmager v 5.5*, (*Alpha Innotech Corporation*, San Leandro, CA, EUA).

4.3 Análise dos alelos

- 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.

Para a identificação das variações alélicas *CYP2D6**1, *CYP2D6**2, *CYP2D6**3, *CYP2D6**4, *CYP2D6**5, *CYP2D6**6, *CYP2D6**9, *CYP2D6**10, *CYP2D6**15, *CYP2D6**17, *CYP2D6**29, *CYP2D6**35, *CYP2D6**39, *CYP2D6**40, *CYP2D6**41 e duplicações do gene *CYP2D6* [AY545216 <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>>] (Figura 13); *CYP2C19**1, *CYP2C19**2, *CYP2C19**3 e *CYP2C19**17 do gene *CYP2C19* [NT_030059 <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>>] (Figura 14) e *CYP2C9**1, *CYP2C9**2, *CYP2C9**3 do gene *CYP2C9* [NM_000771 <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>>] os polimorfismos (Quadros 6, 7 e 8), foram identificados inicialmente pelo método de seqüenciamento direto e posteriormente por discriminação alélica no aparelho de *PCR* em tempo real com o sistema *TaqMan*[®]. Para a identificação da duplicação e deleção do gene *CYP2D6*, foi realizada inicialmente a *Long-template PCR*. 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 seqüência 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 Comittee* <www.imm.ki.se/CYPalleles/cyped6.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.

Quadro 6 - Polimorfismos selecionados no gene *CYP2D6*, os alelos a que fazem parte e suas seqüências-alvo. (Ref SNP – SNP referência).

<i>CYP2D6</i>			
Polimorfismo	Alelos	Ref SNP ID	Seqüência
-1584 C>G	*2, *35, *41	rs1080985	CCAGCCTGGACAACCTTGGGAAGAACC[C / G] GGTCTCTACAAAAATACAAAATTA
31 G>A	*35	rs769258	GCTAGAAGCACTGGTGCCCTGGCC[G / A] TGATAGTGGCCATCTTCCTGCTCCT
100 C>T	*4, *10	rs1065852	GCGCCAACGCTGGGCTGCACGCTAC[C / T] CACCAGGCCCCCTGCCACTGCCCGG
137_138insT	*15	107707653	TGTGTTCTGGAAGTCCACATGCAGC[- / A] AGGTTGCCAGCCCGGGCAGTGCCA
1023 C>T	*17, *40	rs28371706	GCCGACCGCCCGCCTGTGCCCATCA[C / T] CCAGATCCTGGGTTTCGGGCCGCGT
1661 G>C	*2, *4, *10, *17, *35, *40, *41		GGCGCGAGCAGAGGCGCTTCTCCGT[G / C] TCCACCTTGCGCAACTTGGGCGCTGG
1707 del T	*6	rs5030655	AGGAGGCGGCGCTCCTCGGTCACCC[A / -] CTGCTCCAGCGACTTCTTGCCAGG
1846 G>A	*4	rs3892097	CCCTTACCCGCATCTCCCACCCCCA[G / A] GACGCCCTTTCGCCCAACGGTCT
1863_1864 ins(TTTCGCCCC)2	*40		TGTCCAAGAGACCGTT[GGGGCGAAAGGGCGGAAA / -] GGGGCGAAAGGGGCGGTC
2549 delA	*3	rs35742686	GCTGGATGAGCTGCTAAGTGCAGC[A / -] GGATGACCTGGGACCCAGCCAGCC
2613_2615delAGA	*9		CCACCGTGGCAGCCACTCTCACCT[TCT / -] CCATCTTGCCAGGAAGGCTCAG
2850 C>T	*2, *4, *17, *34, *35, *40, *41	rs16947	GAGAACAGGTCAGCCACCACTATGC[C / T] CAGGTTCTCATCTGAAGCTGCTC
2988 G>A	*41	rs28371725	GGAAACAGTGCAGGGGCCGAGGGAG[G / A] AAGGGTACAGGCGGGGGCCCATGAA
3183 G>A	*29	rs59421388	TCTGGTCGCGCACCTGCCCTATCA[C / T] GTCGTGATCTCCTGTTGGACACGG
4180 G>C	*2, *4, *6, *10, *17, *35, *40, *41	rs1135840	CATGGTGTCTTTGCTTTCTGGTGA[G / C] CCCATCCCCCTATGAGCTTTGTGCT

Quadro 7 - Polimorfismos avaliados no gene *CYP2C19* e suas seqüências-alvo. (Ref SNP – SNP referência).

<i>CYP2C19</i>			
Polimorfismo	Alelos	Ref SNP ID	Seqüência
-806 C>T	*17	rs12248560	AAATTTGTGTCTTCTGTTCTCAAAG[C / T] ATCTCTGATGTAAGAGATAATGCGC
-3405 C>T	*17	rs11188072	AATGGGCAACGGGTCTGAACAGACA[C / T] CTCACCAAGAAGACATACAGATACC
17948 G>A	*3	rs4986893	ACATCAGGATTGTAAGCACCCCCTG[G / A] ATCCAGGTAAGGCCAAGTTTTTTGTC
19154 G>A	*2	rs4244285	TTCCCACTATCATTGATTATTTCCC[G / A] GGAACCCATAACAAATTACTTAAAA

Quadro 8 - Polimorfismos avaliados no gene *CYP2C9* e suas seqüências-alvo. (Ref SNP – SNP referência).

<i>CYP2C9</i>			
Polimorfismo	Alelos	Ref SNP ID	Seqüência
3608C>T	*2	rs1799853	GATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGAC[C / T] GTGTTCAAGAGGAAGCCCCGCTGCC
42614A>C	*3	rs1057910	TGTGGTGCACGAGGTCCAGAGATAC[A / C] TTGACCTTCTCCCAACAGCTGCC

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 9, 10 e 11).

Quadro 9 - 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.

<i>CYP2D6</i>		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 ; 1977G>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 10 - 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.

<i>CYP2C19</i>		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 11 - 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.

<i>CYP2C9</i>		Atividade enzimática
Alelos	Polimorfismos	
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 e reação de seqüenciamento

➤ Escolha das regiões dos oligonucleotídeos

Para *PCRs* e reações de seqüenciamento, foram escolhidas regiões delimitadas pelos oligonucleotídeos para amplificar as seqüências-alvo que identificam polimorfismos que compõem cada alelo determinado segundo o site *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee* <<http://www.cypalleles.ki.se>> (Quadros 12, 13 e 14). Oligonucleotídeos que não foram obtidos na literatura foram determinados com a ferramenta *Primer3* <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi>.

Quadro 12 - Pares de oligonucleotídeos escolhidos para amplificar as seqüências-alvo do gene *CYP2C19* Todos os pares foram selecionados com a ferramenta *Primer 3*.

<i>CYP2C19</i>			
Nome	Seqüência (5'-3')	Fragmento	Polimorfismo
2C19_2_F	CAACCAGAGCTTGGCATATT	298pb	19154G>A
2C19_2_R	CAAATACGCAAGCAGTCACA		
2C19_3_F	CCCTGTGATCCCACTTTCAT	248pb	17948G>A
2C19_3_R	TGTACTTCAGGGCTTGGTCA		
2C19_17_1	TGACAAGACACAGACTGGGATAA	230pb	-3042 C>T
2C19_17_2	GTCATCGGGGTTTGTAGCTTG		
2C19_17_3	ATGTCTGGAGGAGACCAGGA	497pb	-806 C>T
2C19_17_4	ACGTGAAGGCAGGAATTGTT		

Quadro 13 - Pares de oligonucleotídeos escolhidos para amplificar as seqüências-alvo do gene *CYP2D6*.

<i>CYP2D6</i>				
Nome	Seqüência (5'-3')	Fragmento	Polimorfismo	Referência
1new	TCCCAGCTGGAATCCGGTGTCG	750 pb	1661 G>C; 1707 del T; 1846 G>A; 1863_1864 ins(TTT CGC CCC)2	Hersberger et al. (2000)
2new	GGAGCTCGCCCTGCAGAGACTCCT			Hersberger et al. (2000)
2D6*3_F	GCGGAGCGAGAGACCGAGGA	789 pb	2549 delA; 2613_2615 del AGA	Hersberger et al. (2000)
2D6*3_R*	GTCCCAGATATGCTCTCG G			Renata Canalle
2D6*10_F	GTGCTGAGAGTGTCCTGC	343 pb	31 G>A; 100 C>T; 137_138 insT	Naveen et al. (2006)
2D6*10_R	CACCCACCATCCATGTTTGC			Naveen et al. (2006)
2D6*41_F	CCGTTCTGTCCCGAGTATGC	340 pb	2850 C>T; 2988 G>A	Hinrichs et al.(2007)
2D6*41_R	CGGCCCTGACACTCCTTCTT			Hinrichs et al. (2007)
2D6*17_F	GATCCTGGCTTGACAAGAGG	280 pb	1023 C>T	
2D6*17B_R	AGCTCGGACTACGGTCATCA			
2D6_2_F	TCTTCTTACCTCCCTGCTG	250 pb	4180 G>C	
2D6_2_R	CTGAGGAGGATGATCCCAAC			
2D6_2P_F	CCTCCACAAAAGACAGGAT	292 pb	-1584 C>G	
2D6_2P_R	CATGTTGGCCAGGCTAGT			

* oligonucleotídeo gentilmente cedido pela Dra Renata Canalle.

Quadro 14 - Pares de oligonucleotídeos escolhidos para amplificar as seqüências-alvo do gene *CYP2C9*. Todos os pares foram desenhados com o auxílio da ferramenta *Primer 3*.

<i>CYP2C9</i>			
Nome	Seqüência (5'-3')	Fragmento	Polimorfismo
2C9_2_F	AATTGTTTTTCAGCAATGGAAAGAA	195 pb	3608C>T
2C9_2_R	AGATAGTAGTCCAGTAAGGTCAGT		
2C9_3_F	GCTAAAGTCCAGGAAGAGATTGA	250 pb	42614A>C
2C9_3_R	GATACTATGAATTTGGGGACTTC		

Mais de um polimorfismo pode ser identificado nas seqüências delimitadas pelos oligonucleotídeos 1new e 2new [1661G>C, 1707 delT, 1864G>A, 1863_1864 ins(TTT CGC CCC)2], pelos oligonucleotídeos 2D6*41_F e 2D6*41R (2850C>T, 2988G>A), 2D6*10_F e 2D6*10_R (31 G>A, 100 C>T, 137_138 insT), 2D6*3_F e 2D6*3_R (2549 delA, 2613_2615 del AGA) (Quadro 13).

➤ Padronização das PCRs e reações de seqüenciamento

O método desenvolvido por Sanger e colaboradores (1977), envolve a utilização de 2', 3' – dideoxynucleosídeos trifosfatos (ddNTP), que não apresentam o

grupo 3' hidroxila em suas estruturas. Cada ddNTP é marcado com uma molécula fluorescente diferente. Durante a elongação da fita de DNA, quando um ddNTP é incorporado ele impede a continuidade de extensão da fita. Fragmentos de diferentes tamanhos são gerados dependendo da posição onde um ddNTP foi incorporado. Estes fragmentos são submetidos à eletroforese capilar no seqüenciador ABI3100 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), que detecta a fluorescência emitida pelos ddNTPs e transforma os resultados da eletroforese em um eletroferograma.

Para a identificação do polimorfismo -1584G>C, na região promotora do gene *CYP2D6*, a *PCR* foi padronizada segundo as seguintes condições: Buffer MgCl_2 free 1x (Invitrogen, CA, USA); 0,125 mM de dNTPs; 2,25 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen, CA, USA); 0,2 μM de cada oligonucleotídeo 2D6_2P_F e 2D6_2P_R (Dialab, Belo Horizonte, MG, Brasil); 0,45 M de betaína (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA); 0,05 U/ μL de *Platinum*[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA); 0,5 ng/ μL de DNA; e água Milli Q q.s.p. 10,00 μL . A termociclagem utilizada foi a seguinte: 3 minutos a 94 °C seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 20 segundos a 60,0 °C, 30 segundos a 72 °C e, por fim, 5 minutos a 72 °C.

O produto amplificado foi aplicado em gel de agarose 1% corado com de brometo de etídio [0,4 $\mu\text{L/mL}$] e visualizado sob luz UV.

Depois de realizada a *PCR*, seus produtos foram seqüenciados segundo a reação: 1,0 μL de *Big Dye Terminator* v.3 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*); 2,0 μL de *Buffer* (200 mM Tris HCl pH 9.0; 5 mM MgCl_2); 0,32 μM de oligonucleotídeo *sense*; 0,45 M de betaína; 1,0 μL do produto de *PCR* previamente amplificado e água Milli Q q.s.p. 10,00 μL . A termociclagem utilizada foi a seguinte: 3 minutos a 95 °C seguido de 37 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 20 segundos a 55 °C e, por fim, 4 minutos a 60 °C.

A reação de seqüenciamento foi então precipitada com Isopropanol 70% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e Etanol 75% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). As amostras são analisadas no aparelho seqüenciador de DNA *ABI PRISM*[®] 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems, Foster City, CA*).

A identidade dos produtos da amplificação foi confirmada utilizando-se a ferramenta *BLAST* (Altschul et al., 1990) para busca por seqüências similares em bancos de dados.

Para os demais polimorfismos investigados nos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*, as *PCRs* foram padronizadas nas mesmas condições: Buffer MgCl_2 free 1x (Invitrogen, CA, USA); 0,125 mM de dNTPs; 2,25 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen, CA, USA); 0,2 μM de cada oligonucleotídeo *sense* e *antisense* (Dialab, Belo Horizonte, MG, Brasil); 5% de Dimetilsulfóxido –DMSO– (Merck KGaA, Darmstadt, Germany); 0,05 U/ μL de *Platinum*[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA); 0,5 ng/ μL de DNA; e água Milli Q q.s.p. 10,0 μL . A termociclagem utilizada foi a seguinte: 3 minutos a 94 °C seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 20 segundos a 63,0 °C, 30 segundos a 72 °C e, por fim, 5 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados foram então verificados em gel de Agarose 1% corado com brometo de etídio [0,4 $\mu\text{L/mL}$] e visualizado sob luz UV.

A seguir, foram realizadas as reações de seqüenciamento também padronizadas nas mesmas condições para todos os polimorfismos: 1,0 μL de *Big Dye Terminator* v.3 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA); 2,0 μL de *Save Money Buffer* (200 mM Tris HCl pH 9.0; 5 mM MgCl_2); 0,32 μM de oligonucleotídeo; 5% de Dimetilsulfóxido –DMSO– (Merck KGaA, Darmstadt, Germany); 1,0 μL do produto de *PCR* e água Milli Q q.s.p. 10,0 μL . A termociclagem utilizada foi a seguinte: 3 minutos a 95 °C seguido de 37 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 20 segundos a 55 °C e, por fim, 4 minutos a 60 °C.

As reações de seqüenciamento foram precipitadas conforme descrito anteriormente. Ao término da precipitação, as amostras foram analisadas no seqüenciador de DNA *ABI PRISM*[®] 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

A identidade dos produtos da amplificação foi também confirmada utilizando-se a ferramenta (Altschul et al., 1990).

Os eletroferogramas gerados pelo seqüenciador foram então analisados nos programas Chromas[®] (2001 Technelysium Pty Ltd) e FinchTV[®] (2004 - 2006 Geospiza, Inc.).

4.5 Long template PCR

➤ **Long template PCR para detecção da duplicação do gene CYP2D6 e do alelo CYP2D6*5**

Steen et al. (1995) foi o primeiro a utilizar a *long template PCR* com sucesso para a identificação do alelo CYP2D6*5. Devido à grande homologia com os pseudogenes CYP2D8 e CYP2D7, torna-se difícil a escolha de oligonucleotídeos para a *long template PCR*. Baseado nesta informação, Steen et al. (1995) selecionou dois pares de oligonucleotídeos que se anelam a regiões não homólogas do DNA. O oligonucleotídeo sense, anela na inserção de 1,6 kb *downstream* do gene CYP2D7 e o oligonucleotídeo antisense, possui uma seqüência que anela em uma região aproximadamente 3,5 kb *downstream* do gene CYP2D6 (Figura 15). Com estes oligonucleotídeos foi possível amplificar um produto de PCR de 3,5 kb na presença do alelo deletado de 13 kb. Um produto de 15 kb indicaria a presença do alelo selvagem entretanto, devido a limitações da reação, a formação deste produto é ignorada. Johansson et al. (1996) descreveu um diferente método de *long PCR* no qual um fragmento de 6 kb é gerado na presença do alelo *5. O oligonucleotídeo sense utilizado neste ensaio é específico para o éxon 9 do CYP2D7, enquanto que o antisense está localizado na mesma região que flanqueia CYP2D6 como o oligonucleotídeo utilizado por Steen et al. (1995) (Figura 15). O método desenvolvido por Johansson et al. (1996) não amplifica nenhum fragmento que indica a presença do alelo selvagem. Na reação de *multiplex long PCR* descrita por Hersberger et al. (2000), dois produtos de amplificação são gerados simultaneamente: um indica a deleção do gene CYP2D6 (fragmento de 3,2 kb) e o outro, indica o alelo selvagem (fragmento de 5,1 kb) (Figura 15). Ambos os oligonucleotídeos sense e antisense utilizados para a identificação do alelo *5 estão localizados na mesma região não-homóloga usada por Steen et al. (1995) (Meijerman et al., 2007).

Figura 15 - Esquema da *long PCR* para a detecção do alelo *CYP2D6**5. Dois pseudogenes, *CYP2D7* e *CYP2D8* *upstream* do gene *CYP2D6*. As seqüências do gene e dos pseudogenes possuem grande homologia e a escolha de oligonucleotídeos para a *PCR* torna-se difícil. As áreas pretas e cinzas são regiões quase idênticas de nucleotídeos na região intergênica. A linha tracejada mostra o ponto da deleção. A Figura (A) representa o tipo selvagem de gene (normal). A Figura (B) indica a deleção do gene *CYP2D6*. As setas escuras indicadas com a letra S são os oligonucleotídeos escolhidos por Steen et al. (1995). As setas indicadas com a letra J, são os oligonucleotídeos desenhados por Johansson et al. (1996) e as setas indicadas com a letra H representam os oligonucleotídeos segundo Hersberger: 5,1 kb para o alelo selvagem e 3,5 kb o alelo deletado (Meijerman et al., 2007).

Para a identificação da amplificação do gene *CYP2D6*, Johansson et al. (1996) utilizou um par de oligonucleotídeos: o sense que se anela a uma região do éxon 9 e o antisense anela a uma região do intron 2 do gene *CYP2D6* (Figura 16) juntos, estes oligonucleotídeos geram um produto de amplificação de 10 kb que indica a duplicação do gene. Lundqvist et al. (1999) desenvolveu um método que amplifica um fragmento específico de 3,5 kb que também indica a duplicação do gene. Este fragmento de 3,5 kb foi obtido por meio da combinação de um específico oligonucleotídeo sense para a região que flanqueia o gene *CYP2D6* e um oligonucleotídeo antisense para uma região do pseudogene *CYP2D7*.

Figura 16 - Esquema da *long template PCR* para a detecção da amplificação do gene *CYP2D6*. As setas indicadas com a letra J representam os oligonucleotídeos utilizados por Johansson et al. (1996) e as setas indicadas com a letra L os oligonucleotídeos utilizados por Lundqvist et al. (1999) (fonte: Meijerman et al., 2007).

Lovlie et al. (1996) desenvolveu um método baseado na identificação de uma sequência homóloga de 3,4 kb presente na região *downstream* do gene *CYP2D6* e do pseudogene *CYP2D7*. Um par de oligonucleotídeos foi utilizado como um controle interno da *PCR* gerando um fragmento de 5,2 kb da região entre os genes *CYP2D7* e *CYP2D6*. Este mesmo par de oligonucleotídeo amplifica um fragmento de 3,6 kb na presença da duplicação do gene *CYP2D6* (Figura 17) (Meijerman et al., 2007).

Figura 17 - Esquema de *long template PCR* para a detecção da amplificação do gene *CYP2D6* segundo o método descrito por Lovlie et al. (1996). As áreas de cor cinza e preta são praticamente idênticas às seqüências de nucleotídeos localizados na região intergênica. As setas cinza indicam a posição dos oligonucleotídeos que detectam a amplificação (3,6 kb). As setas pretas representam os oligonucleotídeos que amplificam o controle interno da reação (5,2 kb) (fonte: Meijerman et al., 2007).

Em nosso estudo, o primeiro método escolhido para a identificação do alelo *CYP2D6*5* e da duplicação do gene *CYP2D6* foi a *long template PCR*. Para esta técnica, oligonucleotídeos foram selecionados a partir de uma revisão da literatura (Quadros 15 e 16) (Figuras 15, 16 e 17). Devido ao grande número de oligonucleotídeos, cada par (sense + antisense) foi designado como um conjunto representado por um número.

Quadro 15 - Oligonucleotídeos para identificação do alelo *CYP2D6**5.

Conjunto	Nome	Oligonucleotídeo	Fragmento (Kb)		Referência
		Seqüência (5'- 3')	Deleção	Wild-type	
1	2D6_del_Sf	ACCGGGCACCTGTACTCTCA	3,5 kb	15,0 kb	Steen et al. (1995)
	2D6_del_Sr	GCATGAGCTAAGGCACCCAGA			Steen et al. (1995)
2	2D6_del_Jf	GCCACTCTCGTGTCTCAGCTTT	6,0 kb	-	Johansson et al. (1996)
	2D6_del_Jr	GGCATGAGCTAAGGCACC			Johansson et al. (1996)
3	2D6_del_H2r*	GCCGACTGAGCCTGGGAGGTAGGTA	-	5,1 kb	Hersberger et al. (2000)
	DPK up	GTTATCCCAGAAGGCTTTCAGGCTTCA			Hersberger et al. (2000)
3	D low	CAGGCATGAGCTAAGGCACCCAGAC	3,2 kb	-	Hersberger et al. (2000)
	D up	CACACCGGGCACCTGTACTCTCA			Hersberger et al. (2000)

* DPKlow modificado

Quadro 16 - Oligonucleotídeos para identificação da amplificação do gene *CYP2D6*.

Conjunto	Nome	Oligonucleotídeo	Fragmento (Kb)		Referência
		Seqüência (5'- 3')	Duplicação	Wild-type	
4	2D6_dup_Jf	GCCACCATGGTGTCTTTGCTTTC	10,0 kb	-	Johansson et al. (1996)
	2D6_dup_Jr	ACCGGATTCCAGCTGGGAAATG			Johansson et al. (1996)
5	2D6_dup_Lf	CCTGGGAAGGCCCATGGAAG	3,5 kb	-	Lundqvist et al. (1999)
	2D6_dup_Lr	CAGTTACGGCAGTGGTCAGCT			Lundqvist et al. (1999)
6	2D6_dup_CNf	TCCCCACTGACCCAACCTCT	3,6 kb	5,2 kb	Lovlie et al. (1996)
	2D6_dup_CNr	CACGTGCAGGGCACCTAGAT			Lovlie et al. (1996)

O kit GeneAmp® XL (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) foi utilizado nas reações de identificação da duplicação do gene *CYP2D6* e do alelo *CYP2D6**5. As amostras empregadas nestas reações são amostras apresentando possível deleção e possível duplicação de acordo com a *PCR* em tempo real que determina o CNV do gene *CYP2D6*.

Seis *long template PCRs* foram realizadas, cada qual com um conjunto diferente de oligonucleotídeo. Nas reações dos conjuntos 1, 2 e 3, utilizou-se uma amostra de DNA com uma possível deleção do gene *CYP2D6*. Nos conjuntos 4, 5 e 6, o DNA empregado foi uma amostra com uma possível duplicação do gene *CYP2D6*. Para que a reação ocorresse, fez-se necessária preparação dos chamados “*lower mix*” e do “*upper mix*”. Depois do *lower mix* ser submetido à etapa de *hot start* o *upper mix* é adicionado à reação. O *lower* e o *upper mix* de cada reação foram compostos de:

- *lower mix*: 0,5x de 3.3XL buffer; 2 mM de dNTP Blend; 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo “F” e “R”; 3,75 mM de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ e água DEPC (Invitrogen, CA, USA) q.s.p. 20 μ L.

- *upper mix*: 0,5x de 3.3XL buffer; 2 U/ μ L de *rTh DNA Polymerase*, XL (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA); 2,5 ng/ μ L de DNA e água DPEC (Invitrogen, CA, USA) q.s.p. 30 μ L.

O termociclador usado foi o Gene Amp[®] PCR System 9700 (*Applied Biosystems*). Após o *hot start* de 80 °C por 10 minutos e 4 °C por 5 minutos, a seguinte termociclagem ocorreu: 94 °C por 1 minuto seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 68 °C por 10 minutos e, por fim, 10 minutos a 72 °C. O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose a 0,5% corado com brometo de etídio [0,4 μ L/mL] e visualizado sob luz UV.

A seguir, um novo teste foi realizado com o conjunto de oligonucleotídeos 3, com a finalidade de verificar se a *multiplex long PCR* (que utiliza dois pares de oligonucleotídeos) descrita por Hersberger et al. (2000) funcionaria apropriadamente com o Kit GeneAmp[®] XL (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). A reação é descrita a seguir:

- *lower mix*: 0,5x de 3.3XL buffer; 0,18 mM de dNTP Blend; 0,34 mM dos oligonucleotídeos Dup e Dlow e, 0,68 mM dos oligonucleotídeos 2D6_del_H2R e DPKup; 3,4 mM de $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, volume final de 22 μ L.

- *upper mix*: 0,5x de 3.3XL buffer; 2 U/ μ L de *rTh DNA Polymerase*, XL (*Applied Biosystems*); 5,36 ng/ μ L de DNA e água DEPC (Invitrogen, CA, USA) q.s.p. 28 μ L.

Empregamos as mesmas amostras da reação anterior. O termociclador utilizado foi o Gene Amp[®] PCR System 9700 (*Applied Biosystems*). Após o *hot start* de 80 °C por 10 minutos e 4 °C por 5 minutos, a ciclagem foi a seguinte: 94 °C por 2 minutos seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 45 segundos e 68 °C por 5 minutos. O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio [0,4 μ L/mL] e visualizado sob luz UV.

O termociclador utilizado foi o Gene Amp[®] PCR System 9700 (*Applied Biosystems*). A ciclagem foi a seguinte: 94 °C por 2 minutos seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 45 segundos e 68 °C por 5 minutos. O produto de

PCR foi aplicado em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio [0,4 µL/mL] e visualizado sob luz UV.

4.6 *PCR* em tempo real – determinação do número de cópias do gene *CYP2D6*

➤ Padronização da *PCR* em tempo real para a quantificação do número de cópias do gene *CYP2D6*

As técnicas de *PCR* em tempo real para a quantificação de DNA permitiram o desenvolvimento de métodos sensíveis que são capazes de discriminar deleções de genes, duplicações e multiplicações (Meijerman et al., 2007).

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 utilizados 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 (Meijerman et al., 2007).

Um dos sistemas mais comumente utilizados são as sondas *TaqMan* para amplificar seqüências-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 (Meijerman et al., 2007).

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 haplóide que é usado como normalizador. Para o gene *CYP2D6* o primeiro controle endógeno adotado foi o gene da *albumina*, mas posteriormente, outro controle endógeno foi selecionado, o gene *RNase P* (*TaqMan endogenous control kit – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) (Quadros 17 e 18).

Quadro 17 - Oligonucleotídeos utilizados na determinação do *CNV*.

Gene	Oligonucleotídeo	Seqüência (5'- 3')	Referência
<i>CYP2D6</i>	2D6/ex9/f3 (2D6_F)	CTTCACCTCCCTGCTGCAG	Schaeffeler et al.(2003)
	2D6/ex9/r3 (2D6_R)	TCACCAGGAAAGCAAAGACA	Schaeffeler et al.(2003)
<i>Albumina</i>	alb/ex12/f (ALB_F)	TGTTGCATGAGAAAACGCCA	Schaeffeler et al.(2003)
	alb/ex12/r_b (ALB_R_B)*	GTCGCCTGTTACCAAGGAT	Schaeffeler et al.(2003)

*ALB_R modificado.

Quadro 18 - Sondas utilizadas na determinação do *CNV*.

Gene	Sonda	Seqüência (5'- 3')	Fluoróforo
<i>CYP2D6</i>	2D6/ex9/p (probe 2D6)	CCGGCCCCAGCCACCATGG	FAM
<i>Albumina</i>	ALB/ex12/p (probe ALB)	AAGTGACAGAGTCACCAATGCTGCAG	VIC
<i>RNase P*</i>			VIC

**TaqMan*[®] *RNase P Control Reagents* P/N: 4316844 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

A primeira tentativa de padronização dessa reação foi realizada com o gene da *albumina* como controle endógeno. As condições de reação tanto para o gene-alvo como para o controle endógeno foram as seguintes: 1,25x de *TaqMan*[®] *Universal Master Mix* (P/N 4304437; *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*); 1 µM de cada oligonucleotídeo (F) e (R); 0,367 µM de *TaqMan*[®] *probe*; 1,25 ng/µL de DNA e água Milli Q q.s.p. 15 µL. 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.

Realizou-se a *PCR* 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 triplicata.

Devido a uma grande diferença de eficiência de amplificação entre a sequência escolhida do gene da *albumina* e o fragmento do *CYP2D6*, o controle endógeno passou a ser o gene *RNase P*. As condições de reação foram as seguintes: 1,25x de *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix* (P/N: 4374657; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA); 1 µM de cada oligonucleotídeo *sense* e *antisense*; 0,367 µM de *TaqMan*[®] *probe* [11,76 µM]; 1,25 ng/µL de DNA; 0,08 M de betaína (*Sigma*, Saint Louis, Missouri, USA) e água DEPC (*Invitrogen*, CA, USA) q.s.p. 15 µL. A reação do controle endógeno *RNase P* foi a seguinte: 1,25x de *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix* (P/N: 4374657; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA); 1x de *RNase P*; 1,25 ng/µL de DNA e água DEPC (*Invitrogen*, CA, USA) q.s.p. 15 µL. 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.

➤ Cálculo do número teórico de cópias do gene *CYP2D6*

O objetivo da *PCR* em tempo real foi separar as amostras em diferentes grupos, de acordo com o número de cópias do gene *CYP2D6* que elas possuem. Estes grupos são: presença de um alelo ou deleção de ambos, presença dos dois alelos (genótipo “normal”) e a presença de três ou mais alelos (duplicação, amplificação ou multiplicação). A separação das amostras nestes três grupos foi possível após a elaboração de um modelo de regressão logística multinomial

Os resultados obtidos na *PCR* em tempo real foram determinados segundo o método $\Delta\Delta CT$ de Livak e Schmittgem (2001). Que será explicado a seguir.

Para o cálculo, foi utilizada uma média do valor do *Ct* (*threshold cycle*) das triplicatas. *Ct* é definido como ciclo no qual a amplificação do gene de uma dada amostra ultrapassa o limite de amplificação estabelecido. Realizadas as médias, calcula-se o ΔCt pela diferença do valor da média do *Ct* do gene alvo (*CYP2D6*) e da média do *Ct* do controle endógeno (*albumina* ou *RNase P*). Depois, o $\Delta\Delta Ct$ foi

calculado pela diferença do valor de ΔCt de cada amostra e o valor do ΔCt do calibrador (uma amostra normal – dois alelos do gene *CYP2D6*) e, por fim, aplica-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

As etapas para a obtenção do resultado do ΔCt são expostas a seguir:

- a) a quantificação relativa das amostras é feita em triplicata na mesma placa, tanto para o gene-alvo como para o controle endógeno *RNase P*;
- b) após a reação de cada amostra, obtemos as curvas de amplificação (Figura 18) dos genes *CYP2D6* e *RNase P*;
- c) terminada a reação que determina a quantificação relativa fazemos o estudo da quantificação relativa (Figura 18) onde verificamos se alguma amostra da triplicata será excluída da análise. O Critério de exclusão é um desvio padrão maior que 1,0. Esta etapa também nos informa o Ct de cada amostra [$Ct = Threshold\ cycle$ ou ciclo no qual a amplificação do gene alvo e do controle endógeno de uma dada amostra ultrapassa o limite de amplificação estabelecido (*threshold*)];

Figura 18 - Curva de amplificação das triplicatas dos genes *CYP2D6* e *RNase P*. Estudo da quantificação relativa. O valor o desvio padrão das triplicatas da *RNase P* é 0,043.

- d) os resultados obtidos no estudo da quantificação relativa são então transferidos para uma planilha do programa *Excel* (versão 2007, *Microsoft Corporation, USA*). Onde as médias dos *Ct*s das triplicatas do gene *CYP2D6* e da *RNase P* são calculadas (Figura 19);
- e) cálculo do $\Delta CT \rightarrow \Delta CT = \text{média do } CT \text{ do gene } CYP2D6 - \text{média do } CT \text{ da } RNase P$ (Figura 19);

<i>CYP2D6</i>						<i>RNaseP</i>			
Sample	Ct	Ct std err	média Ct	desv p	ΔCt	Ct	Ct std err	média Ct	desv p
345	24,226	0,009	24,210	0,016	-2,921	27,312	0,1	27,131	0,172
345	24,209	0,009				26,969	0,1		
345	24,195	0,009				27,113	0,1		
130	24,536	0,031	24,521	0,054	-2,871	27,405	0,043	27,392	0,074
130	24,462	0,031				27,459	0,043		
130	24,566	0,031				27,312	0,043		
1507	24,619	0,045	24,636	0,078	-2,864	27,403	0,054	27,500	0,093
1507	24,568	0,045				27,508	0,054		
1507	24,722	0,045				27,589	0,054		
2336	25,122	0,009	25,137	0,015	-2,124	27,251	0,024	27,261	0,042
2336	25,152	0,009				27,307	0,024		
2336	25,138	0,009				27,225	0,024		
2341	25,079	0,01	25,086	0,017	-2,367	27,568	0,058	27,453	0,101
2341	25,074	0,01				27,377	0,058		
2341	25,106	0,01				27,415	0,058		
1515	24,286	0,018	24,293	0,031	-2,808	27,054	0,027	27,100	0,046
1515	24,326	0,018				27,101	0,027		
1515	24,266	0,018				27,146	0,027		

Figura 19 - Cálculo das médias dos *Ct*s dos genes *CYP2D6* e *RNase P*. Valores de ΔCT .

- f) para o cálculo do $\Delta\Delta CT$, precisamos de calibradores, no nosso caso, os calibradores são amostras sabidamente normais, ou seja, amostras com apenas duas cópias do gene *CYP2D6*. O valor do $\Delta\Delta CT$ é calculado segundo a seguinte fórmula: $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ da amostra} - \Delta CT \text{ do calibrador}$ (amostra normal, com duas cópias do gene), fazemos este cálculo três vezes pois temos três calibradores (Figura 20);
- g) cálculo do $2^{-\Delta\Delta CT}$ de cada calibrador (Figura 20);
- h) média do $2^{-\Delta\Delta CT}$ dos três calibradores (Figura 20);

- i) a média do valor do $2^{-\Delta\Delta CT}$ da amostra em relação aos três calibradores é utilizada na equação do modelo de regressão logística multinomial (Figura 20).

Figura 20 – Representação do cálculo do $\Delta\Delta CT$ e do $2^{-\Delta\Delta CT}$ que é utilizado no modelo de regressão logística multinomial.

Primeiramente, a escolha do melhor calibrador, isto é, a amostra que aparentava apresentar apenas duas cópias do gene *CYP2D6* foi baseada na estatística de Kappa. Para isso 101 amostras tiveram seus resultados de $\Delta\Delta Ct$ analisados. Escolheu-se três calibradores que possuíam valores de $\Delta\Delta Ct$ em perfeita concordância com os três grupos de genótipo: presença de um alelo ou deleção de ambos, dois alelos (indivíduo considerado “normal”), três ou mais alelos. Para a separação de tais grupos, utilizou-se os resultados de corte sugeridos por Schaeffeler et al. (2003).

Entretanto, só pudemos validar o método de determinação do *CNV* depois que amostras controle [duas amostras de genótipo sabidamente duplicados (*CYP2D6**2*2xN; *1*2xM), três normais (*CYP2D6**1*1), três heterozigotos deletados

(*CYP2D5**1*5) e uma homozigota deletada (*CYP2D6**5*5)], foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ulrich M. Zanger (*Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany*). Também utilizamos uma amostra amplificada do nosso banco de amostras. Esta amostra deve sua amplificação confirmada pela técnica de *long template PCR*.

Para determinar os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que separam os três grupos de classificação das amostras, (presença de um alelo ou deleção de ambos, presença dos dois alelos e a presença de três ou mais alelos), as seguintes etapas foram realizadas:

- as amostras controles foram submetidas à reação para que seu delta-delta *CT* fosse determinado;
- para os cálculos do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ as três amostras controles com dois alelos foram determinadas como calibradores, desse modo, foram utilizados três calibradores por amostra;
- a média dos valores dos três calibradores foi utilizada para o cálculo do CNV de cada amostra;
- os pontos de cortes para a classificação do número teórico de cópias do gene *CYP2D6* foram obtidos baseando-se numa amostra de três indivíduos com duas cópias, três heterozigotos para a deleção e três indivíduos com duplicação (as nossas amostras controle);
- com base no resultado das médias dos $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos três calibradores para estes nove indivíduos, os pontos de cortes foram obtidos por meio de um modelo de Regressão Logística Multinomial, considerando uma probabilidade de 99% para a classificação isto é, a amostra só é classificada se a mesma apresentar uma probabilidade mínima de 99% de pertencer a algum dos três grupos (Tabela 6). Com este modelo espera-se que 1% das amostras não sejam classificadas.

Tabela 6 – Regras de classificação (pontos de cortes) utilizadas para a determinação do CNV.

Classificação (CNV)	Valores de corte
Deletado	$2^{-\Delta\Delta Ct} \leq 0,711$
Sem classificação	$0,711 < 2^{-\Delta\Delta Ct} \leq 0,801$
Normal (dois alelos)	$0,801 < 2^{-\Delta\Delta Ct} \leq 1,367$
Sem classificação	$1,367 < 2^{-\Delta\Delta Ct} \leq 1,541$
Duplicado	$2^{-\Delta\Delta Ct} > 1,541$

As fórmulas utilizadas para a probabilidade de classificação (Modelo de Regressão Logística Multinomial) são apresentadas a seguir:

$$P[\text{Deletado}] = \frac{\exp(73,948 - 95,331 \times 2^{-\Delta\Delta Ct})}{1 + \exp(73,948 - 95,331 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}) + \exp(-113,228 + 92,557 \times 2^{-\Delta\Delta Ct})}$$

$$P[\text{Normal}] = \frac{1}{1 + \exp(73,948 - 95,331 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}) + \exp(-113,228 + 92,557 \times 2^{-\Delta\Delta Ct})}$$

$$P[\text{Duplicado}] = \frac{\exp(-113,228 + 92,557 \times 2^{-\Delta\Delta Ct})}{1 + \exp(73,948 - 95,331 \times 2^{-\Delta\Delta Ct}) + \exp(-113,228 + 92,557 \times 2^{-\Delta\Delta Ct})}$$

4.7 Discriminação alélica com o sistema *TaqMan*[®]

Cada polimorfismo nos genes *CYP2D6* [-1584 C>G, 31 G>A, 100 C>T, 137_138 ins T, 1023 C>T, 1707 del T, 1846 G>A, 1863_1864 ins(TTTCGCCCC)2, 2549 del A, 2613_2615 del AGA, 2850 C>T, 2988 G>A, 3183 G>A, 4180 G>C], *CYP2C19* [-806 C>T, 17948 G>A, 19154 G>A] e *CYP2C9* [3608 C>T, 42614 A>C] passou a ser determinado utilizando ensaios *TaqMan*[®] tipo *Drug Metabolism SNP Genotyping Assays* (P/N: 4362691, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Para os polimorfismos 1661 G>C do gene *CYP2D6* e -3402 C>T do gene *CYP2C19*, são empregados ensaios *Custom TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assays* (P/N: 4331349, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) (Quadros 19, 20, 21 e 22).

Quadro 19 - Identificação dos ensaios *TaqMan® Drug Metabolism SNP Genotyping Assays* e *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays* utilizados para detecção dos polimorfismos no gene *CYP2C19*.

CYP2C19			
Identificação do ensaio	Polimorfismo	Alelos CYP2C19	Disponibilidade
C__25986767_70	19154 G>A	*2	Inventariado
C__27861809_10	17948 G>A	*3	Inventariado
C____469857_10	-806 C>T	*17	Inventariado
	-3402 C>T	*17	Sob encomenda

Quadro 20 - Identificação dos ensaios *TaqMan® Drug Metabolism SNP Genotyping Assays* e *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays* utilizados para detecção dos polimorfismos no gene *CYP2D6*.

CYP2D6			
Identificação do ensaio	Polimorfismo	Alelos CYP2D6	Disponibilidade
C__32407252_30	-1584 C>G	*2, *35, *41	Inventariado
C__27102444_80	31 G>A	*35	Inventariado
C__11484460_40	100 C>T	*4, *10	Inventariado
C__32407245_40	137_138 ins T	*15	Inventariado
C____2222771_40	1023 C>T	*17, *40	Inventariado
	1661 G>C	*2, *4, *10, *17, *35, *40, *41	Sob encomenda
C__32407243_20	1707 del T	*6	Inventariado
C__27102431_D0	1846 G>A	*4	Inventariado
C__32407240_20	1863_1864ins(TTTCGCCCC)2	*40	Inventariado
C__32407232_50	2549 del A	*3	Inventariado
C__32407229_60	2613_2615 del AGA	*9	Inventariado
C__27102425_10	2850 C>T	*2, *4, *17, *34, *35, *40, *41	Inventariado
C__34816116_20	2988 G>A	*41	Inventariado
C__34816113_20	3183 G>A	*29	Inventariado
C__27102414_10	4180 G>C	*2, *4, *6, *10, *17, *35, *40, *41	Inventariado

Quadro 21 – Sequências de oligonucleotídeos e sondas dos ensaios feitos sob encomenda (*Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays*).

Polimorfismo	CYP2C19_-3402	CYP2D6_1661
Oligonucleotídeo 3' - 5'	AAATGGGCAACGGGTCTGA	TCCTGGCGCGCTATGG
Oligonucleotídeo 5' - 3'	AGTTCCTAATGACATTTAATGATTAGTACTTTTCATATATT	TGCCCAGGCCCAAGTTG
Sonda 1 (VIC)	CTTGGTGAGGTGTCTGT	CTTCTCCGTGTCCACC
Sonda 2 (FAM)	TTCTTGGTGAGATGTCTGT	CTTCTCCGTCTCCACC

Quadro 22 - Identificação dos ensaios *TaqMan® Drug Metabolism SNP Genotyping Assays* utilizados para detecção dos polimorfismos no gene *CYP2C9*.

CYP2C9			
Identificação do ensaio	Polimorfismo	Alelos CYP2C9	Disponibilidade
C_25625805_10	3608 C>T	*2	Inventoriado
C_27104892_10	42614 A>G	*3	Inventoriado

As reações para a identificação dos polimorfismos 100 C>T, 137_138 ins T, 1846 G>A, 1863_1864 ins(TTTCGCCCC)2, 2613_2615 del AGA , 3183 G>A , 4180 G>C, 31 G>A, 1661 G>C, 1707 del T do gene *CYP2D6*; -3402 C>T, -806 C>T, 17948 G>A, 19154 G>A do gene *CYP2C19* e 3608 C>T, 42614 A>C do gene *CYP2C9* foram padronizadas segundo a reação: 1x de *TaqMan® Universal Master Mix* (P/N 4304437; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 1x de assay, 5 ng de DNA e água DEPC (*Invitrogen*, CA, USA) q.s.p. 5 µL. A termociclagem utilizada foi a seguinte: primeira desnaturação de 10 minutos a 95 °C seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento a 60 °C por um minuto. O processo de discriminação alélica foi realizada por 1 minuto a 60 °C no aparelho de 7500 Real-Time System (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

Para os polimorfismos 1023 C>T, 2549 del A, 2850 C>T, 2988 G>A do gene *CYP2D6* as reações padronizadas foram: 1x de *TaqMan® Universal Master Mix* (P/N 4304437; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 1x de assay, 5 ng de DNA e água DEPC (*Invitrogen*, CA, USA) q.s.p. 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 realizada por 1 minuto a 60 °C no aparelho de 7500 Real-Time System (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

4.8 Determinação dos fenótipos preditos

- **CYP2D6**

Na classificação dos fenótipos preditos para *CYP2D6* a presença de um alelo funcional (*CYP2D6**1 ou *CYP2D6**2) determinou o fenótipo EM (Bernard et al., 2006; Sabbagh et al., 2006). Homozigotos para dois alelos funcionais ou 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 ou, a combinação de um alelo de atividade intermediária com uma variante não funcional foi classificado como IM. 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) (Quadro 23).

Quadro 23 - Determinação do fenótipo predito para *CYP2D6* de acordo com a combinação alélica.

Fenótipo predito	Combinação de alelos
EM	EM+EM; EM+PM; EM+IM; EM x N +PM
IM	IM+IM; IM+PM
UM	EM x N
PM	PM+PM

- **CYP2C19**

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 (Quadro 24).

Quadro 24 - Determinação do fenótipo predito para *CYP2C19* de acordo com a combinação alélica.

Fenótipo predito	Combinação de alelos
EM	EM+EM; UM+PM
IM	EM+PM
UM	UM+UM
UM heterozigoto	UM+EM
PM	PM+PM

- **CYP2C9**

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 (Quadro 25).

Quadro 25 - Determinação do fenótipo predito para *CYP2C9* de acordo com a combinação alélica.

Fenótipo predito	Combinação de alelos
EM	EM+EM
IM	EM+IM
PM	IM+IM

5 RESULTADOS

5.1 Padronização das *PCRs* e reações de seqüenciamento

Todas as *PCRs* e reações de seqüenciamento descritas anteriormente foram padronizadas com sucesso e os produtos de cada reação foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio [0,4 µg/mL] (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio [0,4 µg/mL] mostrando o fragmento amplificado que contém o polimorfismo 100C>T no gene *CYP2D6*. A letra P simboliza o padrão molecular utilizado, 100 pb (GIBCO - Invitrogen, CA, USA).

Figura 22 - Gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio [0,4 µg/mL] mostrando o fragmento amplificado que contém o polimorfismo -3402 G>T no gene *CYP2C19*. A letra P simboliza o padrão molecular utilizado, 100 pb (GIBCO - Invitrogen, CA, USA).

Os eletroferogramas gerados pelo programa 3100 *Detection Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foram visualizados no programa FinchTV® (2006 Geospiza, Inc.) (Figura 23).

Figura 23 - Exemplos de eletroferogramas referentes aos seqüenciamentos para identificação dos polimorfismos 100C>T no alelo *CYP2D6**10, 2850C>T no alelo *CYP2D6**41, 1023C>T no alelo *CYP2D6**17, 19154 G>A no alelo *CYP2C19**2 e 42614 A>C no alelo *CYP2C9**3.

5.2 Long template PCR para detecção da duplicação do gene *CYP2D6* e do alelo *CYP2D6*5*

Long template PCRs (Figura 24) foram realizadas com a finalidade de identificar o alelo *CYP2D6*5* e a duplicação do gene *CYP2D6*.

Figura 24 - Gel de agarose 0,5%, corado com brometo de etídio [0,4 µg/mL] mostrando resultados das PCRs. Os números 1, 2 e 3 correspondem aos oligonucleotídeos que detectam o alelo *CYP2D6*5* e, os números 4, 5 e 6 aos que detectam a duplicação do gene *CYP2D6*. A letra P simboliza o padrão molecular utilizado: 1000 pb (*1Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen, CA, USA).

As reações 1 e 2 (Figura 24) não funcionaram porque os fragmentos esperados de 3,5 Kb e 6,0 Kb não apareceram. Na reação 3, eram esperadas uma banda de 3,2 Kb (indicando o alelo *CYP2D6*5*) e outra de 5,1Kb (indicando o alelo selvagem). Somente a banda de 3,2 Kb apareceu. A banda de 5,1Kb também deveria ter aparecido porque esta amostra não é homozigota para o alelo *CYP2D6*5* como já foi confirmado em PCRs e reações de seqüenciamento para a identificação de polimorfismos; o fato de somente uma banda ter aparecido mostra que a reação

funcionou apenas parcialmente. As reações 4, 5 e 6 funcionaram. Os fragmentos de 10 Kb e 3,5 Kb esperados para as reações 4 e 5 respectivamente, amplificaram. Na reação 6 os produtos da amplificação de 3,6 Kb e 5,2 KB, também foram detectados.

Tivemos muita dificuldade na padronização da *multiplex long PCR*. Não houve amplificação do fragmento esperado de 3,1 Kb que identifica o alelo *CYP2D6*5* na amostra homozigota “deletada”. Entretanto, para a amostra multiplicada, a banda esperada de 5,1 Kb pode ser identificada (Figura 25). A replicabilidade foi comprometida e decidimos, então, determinar o número de cópias utilizando *PCR* em tempo real.

Figura 25 - Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio [0,4 µL/mL] mostrando resultados da *multiplex long PCR*. A letra P simboliza o padrão molecular utilizado: 1000 pb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, CA, USA).

5.3 Padronização da *PCR* em tempo real para a quantificação do número de cópias do gene *CYP2D6*

O primeiro teste para a padronização da reação de determinação do CNV foi realizado com o gene da *albumina* como controle endógeno. Ao se calcular o $2^{-\Delta\Delta C_t}$ das amostras, fizemos algumas repetições do experimento e os resultados de CNV

das mesmas amostras variavam cada vez que a reação era feita fazendo com que uma mesma amostra ora fosse classificada como normal (dois alelos), ora como possuindo deleção de um alelo ou como amplificada. Após compararmos as curvas de amplificação do gene *CYP2D6* e da albumina (Figura 26), verificou-se que a amplificação da albumina foi bastante instável e pouco reprodutível e que isto poderia interferir nos cálculos do CNV.

Figura 26 - Representação gráfica da curva de amplificação dos genes *CYP2D6* e *albumina*. A curva de amplificação do gene endógeno albumina apresenta uma amplificação tardia em relação ao gene *CYP2D6*.

Desse modo, o controle endógeno albumina foi substituído pelo kit *TaqMan*[®] *RNase P Control Reagents* (VIC dye), (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ao se comparar as curvas de amplificação, observou-se que a curva da *RNase P* e do gene *CYP2D6* apresentavam um padrão de amplificação similar (Figura 27).

Figura 27 - Representação gráfica da curva de amplificação dos genes *CYP2D6* e *RNase P*.

Ao se substituir o controle endógeno, o problema da variação dos resultados de *CNV* de uma mesma amostra foi resolvido. Assim, todas as amostras que já haviam sido feitas com a *albumina* como controle endógeno foram refeitas.

5.4 Análises dos resultados – cálculo do número teórico de cópias do gene *CYP2D6*

As amostras foram submetidas à *PCR* em tempo real utilizando a *RNase P* como controle endógeno. Após o cálculo do $2^{-\Delta\Delta C_T}$, obtemos os valores que são utilizados para o cálculo do modelo de Regressão Logística Multinomial. Nele as amostras são classificadas em grupos de uma cópia, duas cópias, três ou mais cópias do gene e amostras sem classificação (Figura 28).

Figura 28 – Gráfico que ilustra a classificação do número teórico de cópias (CNV) para 149 amostras como o previsto pelo modelo de regressão. Algumas amostras não foram classificadas (losangos).

5.5 Discriminação alélica com o sistema *TaqMan*[®]

Dos 15 os ensaios selecionados para a determinação dos polimorfismos nos genes *CYP2D6*, todos foram padronizados com sucesso. Os quatro ensaios para os polimorfismos do gene *CYP2C19* e dois ensaios para o gene *CYP2C9* também foram padronizados com sucesso. A seguir, são demonstrados exemplos gráficos de curvas de amplificação de uma amostra heterozigota para o polimorfismo -3402 C>T do gene *CYP2C19* (Figura 29), uma amostra homozigota CC e outra homozigota TT para o polimorfismo 100 C>T do gene *CYP2D6* (Figura 30 e 31); uma amostra homozigota GG para o polimorfismo 31 G>A (Figura 32) e uma amostra heterozigota para o polimorfismo 42614 A>C do gene *CYP2C9* (Figura 33).

Figura 29 - Representação da curva de amplificação de uma amostra heterozigota CT para o polimorfismo -3402 C>T do gene *CYP2C19*, indicada segundo as fluorescências VIC e FAM crescentes.

Figura 30 - Representação da curva de amplificação de uma amostra homozigota CC para o polimorfismo 100 C>T do gene *CYP2D6*, indicada segundo a fluorescência FAM crescente.

Figura 31 - Representação da curva de amplificação de uma amostra homozigota TT para o polimorfismo 100 C>T do gene *CYP2D6*, indicada segundo a fluorescência VIC crescente.

Figura 32 - Representação da curva de amplificação de uma amostra homozigota GG para o polimorfismo 31 G>A do gene *CYP2D6*, indicada segundo a fluorescência VIC crescente.

Figura 33 - Representação da curva de amplificação de uma amostra heterozigota A>C para o polimorfismo 42614 A>C do gene *CYP2C9*, indicada segundo as fluorescências VIC e FAM crescentes.

Também mostramos resultados (Figura 34) ilustrativos obtidos para o polimorfismo 4180 G>C do gene *CYP2D6* analisados por meio da técnica de *PCR* em tempo real para discriminação alélica.

Figura 34 – Discriminação alélica. Gráfico de amostras analisadas para o polimorfismo 4180 G>C do gene *CYP2D6*. Os losangos indicam amostras homozigotas CC, triângulos amostras heterozigotas G>C e círculos amostras homozigotas GG.

5.6 Frequências alélicas

De um total de 198 indivíduos, 148 foram genotipados para o gene *CYP2D6* (anexo A). Os alelos *CYP2D6*1* e *CYP2D6*2* foram os mais frequentes em nossa amostra (39,2 e 17,2% respectivamente), seguidos pelos alelos *CYP2D6*4* (14,5%), duplicações do gene (9,5%), *CYP2D6*41* (5,4%), *CYP2D6*35* (4,1%), *CYP2D6*17* (3,4%), *CYP2D6*5* (2,7%), *CYP2D6*10* (2,4%), *CYP2D6*6* (0,7%), *CYP2D6*29* (0,7%) e *CYP2D6*9* (0,3%). Os alelos *CYP2D6*3*, *CYP2D6*15*, *CYP2D6*39*, *CYP2D6*40* não foram encontrados nesse estudo (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequências alélicas identificadas em nossa amostra para o gene *CYP2D6*. Intervalo de confiança (IC) de 95%.

Alelo <i>CYP2D6</i>	%	IC 95%	Número de alelos
*1	39,2	(33,6 ; 44,8)	116
*2	17,2	(12,9 ; 21,5)	51
*3	0,0	---	0
*4	14,5	(10,5 ; 18,5)	43
*5	2,7	(0,9 ; 4,6)	8
*6	0,7	(0,0 ; 1,6)	2
*9	0,3	(0,0 ; 1,0)	1
*10	2,4	(0,6 ; 4,1)	7
*15	0,0	---	0
*17	3,4	(1,3 ; 5,4)	10
*29	0,7	(0,0 ; 1,6)	2
*35	4,1	(1,8 ; 6,3)	12
*39	0,0	---	0
*40	0,0	---	0
*41	5,4	(2,8 ; 8,0)	16
*duplicação	9,5	(6,1 ; 12,8)	28
Total	100		296

NOTA: IC 95% = $p \pm 1,96(p(1-p)/n)^{1/2}$, onde p é a proporção do alelo observado.

De todas as amostras genotipadas, 14 delas foram classificadas como amplificadas para o gene *CYP2D6*. O genótipo amplificado com maior frequência foi o *CYP2D6*1* *2 x N (42,9%), seguido dos genótipos *CYP2D6*2* *2 x N (21,4%),

*CYP2D6**2 *10 x N (14,3%), *CYP2D6**1*10 x N (7,1%), *CYP2D6**2 *4 x N (7,1%) e *CYP2D6**2 *41 x N (7,1%) (Tabela 8).

Tabela 8- Frequências dos genótipos amplificados encontrados em nossa amostra. Intervalo de confiança (IC) de 95%.

Alelos amplificados	%	IC 95%	Número de indivíduos
*1 *2 x N	42,9	(16,9 ; 68,8%)	6
*2 *2 x N	21,4	(0,0 ; 42,9)	3
*2 *10 x N	14,3	(0,0 ; 32,6)	2
*1 *10 x N	7,1	(0,0 ; 20,6)	1
*2 *4 x N	7,1	(0,0 ; 20,6)	1
*2 *41 x N	7,1	(0,0 ; 20,6)	1
Total	100		14

NOTA: IC 95% = $p \pm 1,96(p(1-p)/n)^{1/2}$, onde p é a proporção do alelo observado.

Para o gene *CYP2C19* os 198 indivíduos (anexo B) foram genotipados, sendo o alelo *CYP2C19**1 foi o mais frequente (65,2%), seguido pelo alelo *CYP2C19**17 (19,9%), *CYP2C19**2 (14,6%) e *CYP2C19**3 (0,3%) (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequências alélicas identificadas em nossa amostra para o gene *CYP2C19*. Intervalo de confiança (IC) de 95%.

Alelo <i>CYP2C19</i>	%	IC 95%	Número de alelos
*1	65,2	(60,5 ; 69,8)	258
*17	19,9	(16,0 ; 23,9)	79
*2	14,6	(11,2 ; 18,1)	58
*3	0,3	(0,0 ; 0,7)	1
Total	100		396

NOTA: IC 95% = $p \pm 1,96(p(1-p)/n)^{1/2}$, onde p é a proporção do alelo observado.

Para o gene *CYP2C9*, 152 indivíduos foram genotipados, sendo o alelo *CYP2C9**1 foi o mais frequente (86,8%), seguido pelo alelo *CYP2C9**2 (9,2%) e *CYP2C9**3 (3,9%) (Tabela 10).

Tabela 10 - Freqüências alélicas identificadas em nossa amostra para o gene *CYP2C9*. Intervalo de confiança (IC) de 95%.

Alelo <i>CYP2C9</i>	%	IC 95%	Número de alelos
1	86,8	(83,0 ; 90,6)	264
2	9,2	(6,0 ; 12,5)	28
3	3,9	(1,8 ; 6,1)	12
Total	100		304

NOTA: IC 95% = $p \pm 1,96(p(1-p)/n)^{1/2}$, onde p é a proporção do alelo observado.

5.7 Freqüências fenotípicas

O fenótipo predito mais freqüente em nossa amostra para o gene *CYP2D6* é o metabolizador extensivo (83,1%) seguido dos fenótipos IM (6,1%), UM (6,1%), e PM (4,7%) (Tabela 11).

Tabela 11 - Freqüências fenotípicas para *CYP2D6* encontradas em nossa amostra. Intervalo de confiança (IC) de 95%.

Fenótipo predito	% (N)	IC 95%
EM	83,1 (123)	(26,5 ; 35,6)
IM	6,1 (9)	(0,8 ; 3,7)
PM	4,7 (7)	(0,0 ; 3,1)
UM	6,1 (9)	(0,8 ; 3,7)
Total	100 (148)	

NOTA: IC 95% = $p \pm 1,96(p(1-p)/n)^{1/2}$, onde p é a proporção do alelo observado.

Para o gene *CYP2C19* (Tabela 12), o fenótipo mais freqüente encontrado em nossa amostra foi o EM (51,5%), seguidos do heterozigoto UM (26,3%), IM (16,2%), PM (3,0%) e UM (3,0%).

Tabela 12 - Frequências fenotípicas para *CYP2C19* encontradas em nossa amostra. Intervalo de confiança (IC) de 95%.

Fenótipo predito	% (N)	IC 95%
EM	51,5 (102)	(44,6 ; 58,5)
UM het	26,3 (52)	(20,1 ; 32,4)
IM	16,2 (32)	(11,0 ; 21,3)
PM	3,0 (6)	(0,6 ; 5,4)
UM	3,0 (6)	(0,6 ; 5,4)
Total	100 (198)	

NOTA: IC 95% = $p \pm 1,96(p(1-p)/n)^{1/2}$, onde p é a proporção do alelo observado.

Para o gene *CYP2C9* (Tabela 13), o fenótipo mais freqüente encontrado em nossa amostra foi o EM (77,0%), seguidos do IM (19,7%) e do PM (3,3%).

Tabela 13 - Frequências fenotípicas para *CYP2C9* encontradas em nossa amostra. Intervalo de confiança (IC) de 95%.

Fenótipo predito	% (N)	IC 95%
EM	77,0 (110)	(33,0 ; 44,0)
IM	19,7 (30)	(6,5 ; 13,2)
PM	3,3 (5)	(0,2 ; 3,1)
Total	100 (152)	

NOTA: IC 95% = $p \pm 1,96(p(1-p)/n)^{1/2}$, onde p é a proporção do alelo observado.

6 DISCUSSÃO

A primeira geração de testes farmacogenômicos está disponível para a prática clínica e compreende atualmente (março/2009) e, de acordo com uma revisão extensiva da literatura feita por de Leon et al. (2008), cinco testes principais já comercializados ou prestes a serem comercializados.

Apenas o *AmpliChip CYP 450 Test (Roche Molecular Systems Inc.)*, o qual utiliza tecnologia da *Affymetrix*, foi aprovado pelo FDA. Esse *microarray* contém cerca de 15.000 sondas e permite a análise de 20 alelos de *CYP2D6*, 7 duplicações de *CYP2D6*, além de 3 alelos para o *CYP2C19*. O teste não inclui o alelo *CYP2C19*17*, o qual é responsável pelo metabolismo ultra-rápido dos medicamentos metabolizados pela enzima *CYP2C19*.

O *Luminex Tag-It™ Mutation Detection Kit* para *CYP450* utiliza a plataforma de genotipagem universal baseada em microesferas do *Luminex* e detecta atualmente 7 alelos nulos para o *CYP2C19* e identifica o genótipo de 12 alelos do *CYP2D6*, bem como rearranjos associados com deleções e duplicações do gene, e ainda, 5 variantes do *CYP2C9*.

Arranz et al. (2000) despertou um grande interesse quando desenvolveu um sistema que combinava a determinação de variantes dos genes dos receptores 5-HT_{2A} (*HTR2A*), 5-HT_{2C} (*HTR2C*) e *H2* e também do transportador de serotonina 5-HTT (*SLC6A4*) para a predição de resposta a clozapina. Essa foi a primeira tentativa de desenvolvimento de um teste de farmacogenética específico para a Psiquiatria. O estudo STAR*D (McMahon et al., 2006; Paddock et al., 2007; Perlis et al., 2008; Peters et al., 2008) e outros similares (Binder et al., 2006; Uhr et al., 2008) levaram a uma explosão de estudos de farmacogenética de antidepressivos. A genotipagem de receptores de serotonina e as variantes do transportador são oferecidos por 2 laboratórios nos Estados Unidos (*Mayo Clinic Laboratory*; *Pathway Diagnostics*), mas ainda não há literatura científica que suporte as associações encontradas com receptores de serotonina.

Posteriormente, foram desenvolvidos um teste para a predição de agranulocitose induzida pela clozapina, o *PGxPredict™* (PGxHealth, 2008) e um teste para prever a síndrome metabólica, o *Phyziotype* (Genomas, 2008). O *PGxPredict™* identifica um polimorfismo (do tipo *SNP*) no íntron 4 do gene *HLA-DQB1* (6672G>C) associado com a agranulocitose induzida pela clozapina, onde

portadores do genótipo GG teriam menor risco e os genótipos GC e CC teriam um risco maior (Athanasίου, *in preparation*).

Quando iniciamos esse estudo, o kit P450 *AmpliChip* não estava disponível comercialmente e aqueles indivíduos que quisessem conhecer seus genótipos de *CYP2D6* e *CYP2C19* teriam que enviar suas amostras aos Estados Unidos.

O seqüenciamento direto é o padrão ao qual outras técnicas são comparadas porque ele pode detectar a maioria dos polimorfismos. Atualmente, a genotipagem das CYPs pode ser realizada por meio de inúmeros métodos sendo os mais usuais o *microarray* (como o *P450 AmpliChip*), *PCR* alelo específica, seqüenciamento direto e discriminação alélica com sistema *TaqMan*[®].

Como no caso do chip de *Microarray* que é um sistema de análise “fechado”, este não permite a inclusão de novos alelos logo que eles são identificados. Um exemplo dessa limitação é o caso do alelo *CYP2C19**17, responsável pelo metabolismo ultra-rápido de medicamentos e apresenta uma freqüência importante na população, e que ainda não foi incluído no chip de *microarray*.

O sistema desenvolvido em nosso estudo possibilita a inclusão de qualquer alelo assim que o mesmo é identificado. Este fato é considerado uma vantagem em relação à técnica de *microarray*. Outra vantagem é o preço inferior, o que proporciona acesso a um número maior de indivíduos.

Em função das desvantagens da determinação do índice metabólico e da indisponibilidade do *P450 AmpliChip* (Roche) no Brasil, necessitávamos de um método de genotipagem sensível, específico, rápido e com preços acessíveis, dada a importância dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* no metabolismo dos medicamentos psicotrópicos e outros utilizados com freqüência no Brasil. Desse modo, padronizamos ensaios de genotipagem para o gene *CYP2D6* (alelos *1, *2, *3, *4, *5, *6, *9, *10, *15, *17, *29, *35, *39, *40, *41, além do número de cópias), *CYP2C19* (alelos *1, *2, *3 e *17) e *CYP2C9* (alelos *1, *2 e *3) em nosso laboratório, utilizando inicialmente a técnica de seqüenciamento direto, e posteriormente, *PCR* em tempo real e discriminação alélica com o sistema *TaqMan*[®].

Iniciamos o estudo buscando (1) aqueles alelos com repercussões funcionais importantes e (2) também aqueles mais prevalentes no Brasil. Verificamos na literatura a variabilidade de freqüências alélicas nas populações estudadas.

Encontramos apenas um estudo que utilizou uma amostra brasileira do Rio Grande do Sul (Kohalusch et al., 2008) e, portanto, havia uma carência de informações de frequências alélicas para *CYP2D6* e *CYP2C19* em amostra brasileira. A frequência alélica do gene *CYP2C9* já havia sido determinada em uma amostra do Rio de Janeiro por Vianna et al. (2004).

Em princípio, as genotipagens foram determinadas por seqüenciamento direto dos produtos de *PCR* das seqüências-alvo para os genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*. A determinação do número de cópias seria investigada pela *long-template PCR*, com amplificação de todo o gene, cerca de 5 Kb. O seqüenciamento nos auxiliou enormemente na identificação de homozigotos e heterozigotos para vários dos alelos encontrados em nossa população. A *long-template PCR* se mostrou pouco reprodutível na determinação dos indivíduos amplificados para o gene *CYP2D6*. Partimos, então, para a determinação dos genótipos e número de cópias utilizando o sistema *TaqMan*[®] (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) no equipamento de *PCR* em tempo real. Essa metodologia se mostrou mais rápida, sensível e reprodutível. Durante a padronização do teste contamos com a preciosa colaboração do Dr. Ulrich M. Zanger, do Instituto de Farmacologia Clínica *Dr. Margarete Fischer-Bosch, Stuttgart*, Alemanha, que respondeu prontamente à nossa solicitação e nos enviou amostras-controle para os alelos *CYP2D6**2*2xN, *1*2xN e *2*4xN, *CYP2D6**1*1, *CYP2D5**1*5 e *CYP2D6**5*5.

Como já constatado por outros pesquisadores, a *long template PCR* apresenta desvantagens como a impossibilidade da determinação do exato número de cópias do gene *CYP2D6*. Além disso, esta técnica é muito trabalhosa, demorada o que a torna pouco eficiente quando se quer estudar um grande número de amostras (Meijerman et al., 2007).

Sendo assim, buscamos na literatura outros métodos para a determinação do CNV, já que a *long template PCR* também se mostrou trabalhosa e pouco reprodutível. Fundamentados em dois estudos de padronização de metodologia para a determinação do CNV, por meio da técnica de *PCR* em tempo real com o sistema *TaqMan*[®] (Schaeffeler et al., 2003; Bodin et al., 2005), decidimos utilizar a mesma metodologia em nosso estudo. Schaeffeler et al. (2003) validou sua metodologia com 64 amostras previamente genotipadas para o CNV de *CYP2D6* e demonstrou

que a técnica de *PCR* em tempo real com o sistema *TaqMan*[®] é sensível e confiável. Bodin et al. (2005) comparou seus resultados obtidos com a sua metodologia com 43 amostras genotipadas previamente pelo método de *Southern Blotting-RFLP* e mostrou que o método é válido e reprodutível. Os métodos de Schaeffeler et al. (2003) e Bodin et al. (2005) diferem quanto à região de anelamento dos oligonucleotídeos e quanto ao uso de controle endógeno. Schaeffeler et al. (2003) utilizou a albumina como controle endógeno enquanto Bodin et al. (2005) utilizou o a *RNase P*.

Em nosso estudo, desenvolvemos um método para o cálculo do número de cópias do gene *CYP2D6* baseado nos ensaios desenvolvidos por Schaeffeler et al. (2003) e Bodin et al. (2005) que consiste em determinar o número de cópias do gene *CYP2D6* segundo um modelo de regressão logística multinomial.

O nosso modelo de regressão logística multinomial é baseado no cálculo do $2^{\Delta\Delta CT}$ (média do $2^{\Delta\Delta CT}$ dos três calibradores) de 9 amostras; 3 deletadas (1 cópia de gene *CYP2D6*), 3 amplificadas (3 ou mais cópias do gene *CYP2D6*) e 3 normais (2 cópias do gene *CYP2D6*) sendo que, as 3 amostras normais foram utilizadas como calibradores no cálculo do $2^{\Delta\Delta CT}$. Com base nestas 9 amostras, podemos considerar nosso modelo robusto por apresentar excelentes níveis de sensibilidade (e especificidade), classificando corretamente todas as amostras (100% de acerto).

O modelo é baseado na probabilidade (99%) da amostra ser classificada em algum grupo (deletado, normal ou amplificado). Diferentemente de outros métodos descritos (Schaeffeler et al., 2003; Bodin et al., 2005) que são baseados em valores de corte de médias do $2^{\Delta\Delta CT}$ de amostras deletadas, amplificadas e normais, nosso método para o cálculo do *CNV* é baseado na probabilidade.

Uma limitação existente é a impossibilidade de confirmar a especificidade do método para todas as outras amostras que não foram submetidas à long template *PCR* (nas amostras que não são controles). Devido ao desconhecimento do genótipo, não é possível determinar a taxa de acerto para a classificação desses novos valores. Uma proposta futura para melhorar a precisão de nosso cálculo, é inserir no modelo mais amostras controles.

Ao se executar a reação de *CNV*, sempre analisávamos nas placas uma amostra sabidamente deletada e outra amplificada, para funcionar como uma

espécie de controle da reação e até mesmo do modelo de regressão. Estas amostras sempre foram classificadas corretamente. Os DNAs utilizados para esse fim foram as amostras que tiveram seu resultado confirmado na *long template PCR*. (método de controle interno padronizado para esta reação). Quando estas amostras não eram classificadas corretamente, repetíamos a reação.

O uso da *PCR* em tempo real, especialmente com o sistema *TaqMan*[®] apresenta vantagens em comparação aos métodos mais tradicionais como *Southern Blotting* e *long template PCR*, sendo mais rápido, menos trabalhoso, reprodutível e mais específico (Meijerman et al., 2007, Lee e Jeon, 2009). Entretanto, a determinação do *CNV* por meio do sistema *TaqMan*[®] ainda apresenta alguma limitação como a necessidade de bons controles e de um DNA de boa qualidade.

No decorrer do nosso estudo, pudemos observar que a qualidade da amostra de DNA interfere tanto no resultado do cálculo do *CNV* como no resultado da discriminação alélica pelo sistema *TaqMan*[®]. Cukier et al. (2009), constatou que o DNA pode sofrer degradação em condições normais de armazenamento, causando um aumento do número de resultados errados de *CNV*. Desse modo, a necessidade de uma amostra íntegra e de boa qualidade para a determinação do *CNV* é imprescindível.

Ao se determinar as freqüências alélicas dos genes estudados, os resultados obtidos em nossa amostra para o gene *CYP2D6* foram semelhantes às freqüências alélicas encontradas em outros estudos com diferentes populações: de 198 amostras; 148 indivíduos foram genotipados para o gene *CYP2D6*, os alelos *CYP2D6**1 e *CYP2D6**2 foram os mais freqüentes em nossa amostra amostra (39,2 e 17,2% respectivamente), seguidos pelos alelos *CYP2D6**4 (14,5%), duplicações do gene (9,5%), *CYP2D6**41 (5,4%), *CYP2D6**35 (4,1%), *CYP2D6**17 (3,4%), *CYP2D6**5 (2,7%), *CYP2D6**10 (2,4%), *CYP2D6**6 (0,7%), *CYP2D6**29 (0,7%) e *CYP2D6**9 (0,3%). Os alelos *CYP2D6**3, *CYP2D6**15, *CYP2D6**39, *CYP2D6**40 não foram encontrados na amostra estudada.

Das duplicações do gene *CYP2D6* encontradas em nossa amostra, os genótipos mais freqüentes foram o *1 *2 x N (42,9%), *2 *2 x N (21,4%) e *2 *10 x N

(14,3%). Encontramos uma frequência de 7,1 % para cada um dos genótipos $*1 *10 \times N$, $*2 *4 \times N$ e $*2 *41 \times N$.

Como o esperado, a frequência dos alelos *CYP2D6**1 e *2 em nossa amostra é superior a 50%, dado este, de acordo com Sistonen, et al. (2007) que identificou estes alelos como os mais frequentes e amplamente distribuídos em diferentes regiões do planeta. Bailliet et al. (2007) também identificou tais alelos como os mais frequentes em nativos da Argentina e Paraguai estando presentes em ambas as populações, com frequências de 39,9% e 23,8% respectivamente. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, com uma amostra de 4532 pacientes psiquiátricos, composta por caucasianos e afro-americanos, de Leon et al. (2009) encontrou uma frequência de 36,8% para o alelo *1 e 14,8% para o alelo *2. No Brasil, uma amostra de 186 indivíduos naturais do Rio Grande do Sul, também apresentou resultados parecidos: 38,4% para o alelo *1 e 18,2% para o alelo *2 (Kohlausch et al., 2008). A frequência encontrada para o alelo *CYP2D6**4 em nossa amostra (14,5%) também é semelhante à descrita por Kohlausch et al. (2008) sendo esta 13,2%. Este alelo também apresenta uma frequência de 17,8% na Argentina e Paraguai (Bailliet et al., 2007). Na França e na Alemanha este alelo está presente em 18,9% da população (Sistonen et al., 2009). A frequência do alelo *4 encontrada por de Leon et al. (2009) foi de 19,3%. As duplicações do gene *CYP2D6* tiveram uma frequência de 9,5% em nossa amostra, dado este, similar ao encontrado em populações do Oriente médio (7,8%) e da África subsaariana (6,7%) (Sistonen et al., 2007; Sistonen et al., 2009). Na região sul do Brasil, a frequência das duplicações foi de 4,6% (Kohlausch et al., 2008). O alelo IM *CYP2D6**41 tem uma frequência de 5,4% em nossa amostra, frequência esta muito próxima da encontrada na região sul da Europa (4,5%) (Sistonen et al., 2009). No Brasil a frequência encontrada por Kohlausch et al. (2008) foi de 8,3% enquanto que de em Kentucky, USA, a frequência do alelo *41 foi de 10,3% (de Leon et al., 2009). Para o alelo *CYP2D6**17 encontramos uma frequência de 3,4% na população estudada enquanto que Kohlausch et al. (2008) identificou uma frequência de 1,3% entretanto, a frequência de nossa amostra para este alelo é similar à encontrada por de Leon et al. (2009) (3,9%). Este alelo é muito comum em populações africanas onde sua frequência pode chegar até 18,4% (Sistonen et al., 2009). A deleção total do gene (*CYP2D6**5)

está presente em 2,7% de nossa amostra, sendo semelhante à frequência de 2,2% encontrada na população estudada por Kohlausch et al. (2008) e a frequência de 2,4% encontrada por de Leon et al. (2009). O alelo *CYP2D6**5 está presente em uma frequência de 3,2% na Europa e de 3,8% na Ásia central (Sistonen et al., 2009). Em nossa amostra, a frequência do alelo *CYP2D6**10 (2,4%) foi similar à encontrada por Kohlausch et al. (2008) (2,1%). Este alelo é mais comum em populações asiáticas. Sua frequência é de 38,6% na China e no Japão (Sistonen et al., 2009; Kubota et al., 2000). Para ambos os alelos *6 e *29, a frequência em nossa amostra foi de 0,7%. Estes dois alelos estão presentes em 1,0 % da amostra estudada por de Leon et al. (2009). Na população estudada por Kohlausch et al. (2008), o alelo *6 representa apenas 0,5% da amostra enquanto que o alelo *29 não foi identificado. O alelo *9 está presente em uma frequência de 0,3% em nossa amostra. de Leon et al. (2009) encontrou uma frequência de 2,6% para o alelo *9 e Kohlausch et al. (2008) encontrou 1,6% do alelo *9. Para o alelo *35, Kohlausch et al. (2008) indentificou uma frequência e 6,2% em sua amostra, similar a frequência encontrada em nosso estudo (6,3%); para este mesmo alelo, de Leon encontrou uma frequência de 4,4% em sua população. Neste estudo não identificamos nenhum alelo *CYP2D6**3 o que somente confirma o fato deste alelo ser raramente encontrado em populações não Européias e mesmo lá não atingem uma frequência maior que 1% (Sistonen et al., 2007). Os alelos *CYP2D6**15, e *CYP2D6**40 também foram investigados, mas não foram identificados em nossa amostra. O mesmo fato ocorreu com de Leon et al. (2009) que também não encontrou nenhum desses alelos em seu estudo. Contudo, na população estudada por Kohlausch et al. (2008), foram encontrados 1,6% do alelo *CYP2D6**15 e 0,5% do alelo *CYP2D6**40. Após a realização do teste Qui-quadrado de Pearson, para a comparação das frequências encontradas em nosso estudo e as encontradas por Kohlausch et al. (2008), verificamos que existe uma diferença significativa somente para a multiplicação do gene ($p < 0,05$) e para o alelo *15 ($p < 0,05$).

Das frequências fenotípicas para o gene *CYP2D6* encontradas na nossa amostra, a mais freqüente é o EM (83,1%) que é justificado pela elevada frequência dos alelos *1 e *2. Este fenótipo é encontrado na maioria da população mundial

(Sabbagh et al., 2006). Os fenótipos IM, UM e PM foram encontrados nas respectivas frequências: 6,1%; 6,1% e 4,7%.

Após entrarmos em contato com pesquisadores com experiência em Farmacogenética, verificamos que nosso trabalho foi o primeiro a identificar as frequências alélicas do gene *CYP2C19* no Brasil. Em nossa amostra de 198 indivíduos genotipados, o alelo *CYP2C19*1* é o mais frequente (62,5%), seguido pelo alelo *CYP2C19*17* (19,9%) e pelo alelo *CYP2C19*2* (14,6%). O alelo *CYP2C19*3* foi encontrado em apenas uma amostra (0,3%). As frequências encontradas em nossa amostra são similares às encontradas na Noruega: 59,3%; 18,1%, 0,6% e 22,0% para os alelos *1, *2, *3 e *17 respectivamente (Rudberg et al., 2008). O teste Qui-quadrado de Pearson foi realizado para a comparação das frequências encontradas em nosso estudo e as encontradas por Ragia et al. (2009), na Grécia, em 238 indivíduos (67,3%; 13,0%, 0 e 19,6% para os alelos *1, *2, *3 e *17 respectivamente). Não houve diferença significativa ($p=0,567$) entre as frequências alélicas das duas amostras. O alelo *3 é comum em japoneses com uma frequência de 12,8%, e o alelo *17 é raramente encontrado (1,3%) (Suginoto et al., 2008). A frequência do alelo de atividade aumentada *17 em suecos e etíopes é de 18% (Sim et al., 2006). O alelo *2 é frequente no sul da Europa (13,3%), sul da África (21,7%) e América Central (9,7%); nessas populações, o alelo *3 está presente em frequências menores que 1% (Sistonen et al., 2009).

Devido a recente descoberta do alelo UM *CYP2C19*17* (Sim et al., 2006), a determinação da atividade enzimática predita para as combinações alélicas de *CYP2C19* ainda é controversa. No geral, o fenótipo de resposta ao medicamento é realizado segundo a medida do índice metabólico de uma droga teste (Justenhoven et al., 2008). A literatura ainda não disponibilizou modelos confiáveis de resposta ao medicamento (como os que já existem para *CYP2D6*). Desse modo, para a determinação da frequência fenotípica nos baseamos na classificação proposta por Ragia et al. (2009). Ele genotipou 238 gregos e encontrou as seguintes frequências fenotípicas: EM (48,41%), IM (17,67%), PM (2,12%), heterozigoto UM (28,62%) e UM (3,18%). As frequências encontradas em nossa amostra são bastante similares sendo EM o fenótipo mais frequente encontrado (51,5%), seguidos do heterozigoto UM (26,3%), IM (16,2%), PM (3,0%) e UM (3,0%).

Para o gene *CYP2C9*, as freqüências alélicas encontradas em nosso estudo foram semelhantes às descritas em estudos prévios no Brasil. Em 152 amostras genotipadas, o alelo *1 foi o mais freqüente (86,8%), seguido dos alelos *2 (9,2%) e *3 (3,9%). No Brasil, Vianna et al. (2004), genotipou 662 indivíduos e encontrou as seguintes freqüências: 84,9% para o alelo *1, 8,6% para o alelo *2 e 6,5% para o *3. Outro estudo realizado no Brasil, Perini et al. (2008), encontrou os alelos *2 e *3 em 11,8% e 5,4% respectivamente, na amostra estudada. Após a realização do teste Qui-quadrado de Pearson, constatamos que não existe diferença entre os freqüências encontradas em nosso estudo e as encontradas por Vianna et al. (2004) ($p=0,279$).

Para o gene *CYP2C9*, o fenótipo mais freqüente encontrado em nossa amostra foi o EM (77,0%), seguidos do IM (19,7%) e do PM (3,3%). Scott et al. (2007), genotipou 250 indivíduos e encontrou as seguintes freqüências fenotípicas: 60,8% EMs, 32,8% IMs e 6,4% PMs.

Outro método freqüentemente utilizado para a determinação do fenótipo é o índice metabólico (MR) entre o medicamento não metabolizado e seu metabólito que é calculado depois da quantificação de ambos os compostos por uma técnica analítica como HPLC (*high-performance liquid chromatography*).

A fenotipagem é utilizada para determinar o efeito de um determinado polimorfismo *in vitro* ou *in vivo*. Para o gene *CYP2C9*, algumas substâncias-teste foram descritas como diclofenaco, tolbutamida; e para o gene *CYP2C19*, mefenitoína e omeprazol. Para a fenotipagem de *CYP2D6*, debrisoquina, esparteína e dextrometorfano são utilizados como substâncias-teste. (Frank et al., 2007; Sin et al., 2007; Black et al., 2007).

Contudo, uma determinação confiável do fenótipo pode ser comprometida pela habilidade de certos medicamentos e outras substâncias inibirem ou induzirem a enzima. (Bernard et al., 2006) ou por fatores como presença de alguma doença hepática ou renal (Gaedigk et al., 2008). Segundo Borges et al. (2005), a associação do índice metabólico do dextrometorfano com seu metabólito, medidos na urina ou no plasma ainda é contraditória.

Um exemplo de interferência na fenotipagem é o caso da enzima *CYP2D6* que é inibida por algumas substâncias e que apresenta uma alta afinidade pelo

substrato sendo facilmente saturada por ele. Nestes casos, a metabolização da substância teste pode ser reduzida, chegando até mesmo a mudar o fenótipo do indivíduo de EM para PM (Bernard et al., 2006).

Para Black et al. (2007), a fenotipagem e genotipagem das CYPs são procedimentos complementares na análise da função dos alelos. A fenotipagem é um processo relativamente simples, entretanto, os resultados podem ser influenciados tanto pelo genótipo quanto por fatores ambientais ou a utilização de substâncias indutoras ou inibidoras da atividade enzimática. Contudo, podem existir diferenças na fenotipagem relativas à substância teste utilizada. Além do mais, quando muitas isoformas das CYPs estão envolvidas na depuração da substância, a determinação acurada da depuração por uma isoforma específica é comprometida. A genotipagem mostra uma análise definitiva do *status* de metabolização do indivíduo, e pode ser realizada utilizando uma variedade de técnicas. Historicamente, a genotipagem pode ser realizada por meio de técnicas como RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) seguida de *Southern blotting* ou eletroforese de fragmentos de DNA obtidos com a *PCR*.

A predição do genótipo de *CYP2D6* é sobretudo proposta para individualizar a terapia medicamentosa. Esquemas de doses baseadas no genótipo já foram desenvolvidos e propostas para os tratamentos com antidepressivos e antipsicóticos. Estes esquemas são baseados na distinção dos genótipos PMs UMs, IM, e EMs. Dependendo do impacto da atividade enzimática da *CYP2D6* no metabolismo de uma droga específica, a dose recomendada para PMs pode ser 30 a 70% menor que a dose usual ou no caso de UMs, a dose pode ser 130 a 180% mais elevada (Maier et al., 2008). Outra consequência prática na identificação de genótipos PMs, tanto para *CYP2D6* quanto para *CYP2C19*, é a escolha de medicamentos que não são metabolizados por estas enzimas.

De acordo com Maier et al. (2008), a identificação das variações alélicas que influenciam a atividade enzimática são relevantes 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*.

Os ADRs associados ao tratamento com nortriptilina, um TCA metabolizado via CYP2D6, incluem boca seca, taquicardia, constipação, sedação, hipotensão ortostática. Estes ADRs geralmente estão relacionados a concentrações tóxicas dos TCAs (Lee et al., 2004). Pacientes que apresentam os genótipos PM podem apresentar severos ADRs devido a alta concentração plasmática de nortriptilina e UMs podem não apresentar resposta devido ao rápido metabolismo da droga. Lee et al. (2004) relatou o caso de um paciente que apresentava o genótipo *CYP2D6*5/CYP2D6*10* que provoca um fenótipo IM. Para este paciente, o tratamento com doses preconizadas de nortriptilina (100 mg/dia) por um mês, levou a um nível plasmático tóxico provocando ADRs como tontura, constipação, dentre outros. Após a genotipagem, a dose de nortriptilina foi reduzida a 50 mg/dia. O paciente relatou melhora de seu estado depressivo e diminuição dos ADRs.

A Amitriptilina é metabolizada em seu metabólito ativo nortriptilina via CYP2C19. E, a nortriptilina metabolizada pela CYP2D6. Para a nortriptilina, a não adesão à terapia e o surgimento de ADRs está associado ao genótipo PM de *CYP2D6* e a falha terapêutica é mais freqüente em UMs devido à concentração plasmática abaixo no nível terapêutico (Thuerauf, 2006).

Steimer et al. (2005), estudou 50 pacientes diagnosticados com Depressão Maior tratados com amitriptilina e constatou que a genotipagem para *CYP2D6* e *CYP2C19* pode correlacionar o genótipo-fenótipo com o surgimento de ADRs em pacientes que possuem 2 ou apenas 1 alelo funcional para esses genes, apresentando um grande impacto na relação custo-benefício do tratamento.

A fluoxetina é uma mistura racêmica de S- e R-fluoxetina que, é metabolizada pela CYP2D6 em R/S-norfluoxetina. A dose inicial de fluoxetina para pacientes PMs deve ser 70% menor que a dose usual (Thuerauf, 2006).

O TCA imipramina é metabolizado principalmente pelas enzimas CYP2D6 e CYP2C19. Schenk et al. (2007), estudou os principais alelos PMs de CYP2D6 e CYP2C19 além dos alelos IM para CYP2D6 em 181 pacientes com Depressão Maior tratados com imipramina. Este estudo constatou que os níveis plasmáticos do metabólito desimipramina e da imipramina eram diferentes nos quatro fenótipos de CYP2D6 e para PMs de CYP2C19. O autor sugere que o conhecimento do genótipo do indivíduo pode prever o resultado do tratamento, permitindo que os ajustes de

dose sejam realizados, evitando assim *ADRs* ou atraso na recuperação que levaria a uma hospitalização prolongada.

Na Alemanha, Rau et al. (2004), investigaram 200 pacientes com a finalidade de estabelecer a relação de *ADRs* após administração de antidepressivos metabolizados pela CYP2D6 em pacientes que possuíam um genótipo PM ou IM. Estes eram tratados com a dose máxima diária do medicamento recomendada pelo fabricante. Nos pacientes que apresentaram *ADRs*, a frequência do genótipo PM era quatro vezes maior do que a apresentada na população alemã, sugerindo assim, uma associação do fenótipo PM com o aumento da ocorrência de *ADRs*. Os *ADRs* foram responsáveis pela interrupção do tratamento de aproximadamente 80% dos pacientes. Também foi encontrada uma associação do fenótipo UM com propensão à falha terapêutica.

Na Holanda existe um grupo (KNMP - *Royal Dutch Society for the Advancement of Pharmacy*) cuja finalidade é oferecer recomendações de doses baseadas na farmacogenética, segundo uma revisão sistemática da literatura, integrando estas recomendações em um sistema computadorizado de prescrição de medicamento e farmacovigilância. As recomendações de dose estão disponíveis aos clínicos para o tratamento de pacientes genotipados. Este sistema inclui os genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* (Swen et al., 2008).

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 sozinho não explica toda a variação no metabolismo do medicamento porque, muitas substâncias podem induzir ou inibir a atividade enzimática das CYPs.

Segundo Black et al. (2007), a divisão em categorias fenotípicas não reflete cuidadosamente o fato de alguns alelos apresentam uma variada atividade dependendo do medicamento envolvido no metabolismo ou seja, alelos podem ter influências diferentes sob determinados substratos. A contribuição relativa de cada enzima no metabolismo de um determinado fármaco *in vivo* ainda deve ser determinada. Estudos clínicos de indivíduos com genótipos específicos ou estudos utilizando inibidores de CYPs específicas serão necessários a menos que modelos

in silico possam ser desenvolvidos e validados. A aceitação da genotipagem pelos clínicos ainda é pouca devido a alguns fatores como: insuficiente evidência baseada em pesquisas, incerteza de que o teste trará algum benefício econômico, insegurança na interpretação de resultados da genotipagem principalmente com mais de dois genes (Black et al., 2007).

Acreditamos que a utilização dos genótipos de *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* para prever a dose ideal de um medicamento em psiquiatria ainda é precoce. Mas acreditamos também que a determinação dos genótipos pode trazer benefícios clínicos ao identificar os metabolizadores lentos, que muitas vezes abandonam o tratamento por não suportar os *ADRs* causados pelo medicamento e também na identificação dos metabolizadores rápidos que não precisariam mais esperar 4 semanas para terem sua resposta a um antidepressivo identificada. Aproximamos, assim, a 'bancada' do 'leito' e caminhamos em direção à medicina personalizada.

7 CONCLUSÃO

Com este projeto, conseguimos desenvolver uma nova metodologia reprodutível e acessível para a genotipagem dos polimorfismos principais dos genes CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9 em nosso laboratório, além da determinação do número de cópias do gene CYP2D6.

Foram avaliados no total 23 alelos para os 3 genes e identificamos as frequências de cada um deles em nossa população (HC-FMUSP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*¹

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- Arranz MJ, Bolonna AA, Munro J, Curtis CJ, Collier DA, Kerwin RW. The serotonin transporter and clozapine response. *Mol Psychiatry.* 2000 Mar;5(2):124-5
- 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.
- 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, Aberg-Wistedt A, Gustafsson LL, Nordin C. Extremely rapid hydroxylation of debrisoquine: a case report with implication for treatment with nortriptyline and other tricyclic antidepressants. *Ther Drug Monit.* 1985;7(4):478-80.
- 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.
- Black JL 3rd, O'Kane DJ, Mrazek DA. The impact of CYP allelic variation on antidepressant metabolism: a review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007 Feb;3(1):21-31.
- Bodin L, Beaune PH, Lorient MA. Determination of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene copy number by real-time quantitative PCR. *J Biomed Biotechnol.* 2005 Mar;(3):248-53.

*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].

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.

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

Brockmüller 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.

Brøsen K. Some aspects of genetic polymorphism in the biotransformation of antidepressants. *Therapie*. 2004 Jan-Feb;59(1):5-12.

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

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.

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.

Cukier HN, Pericak-Vance MA, Gilbert JR, Hedges DJ. Sample degradation leads to false-positive copy number variation calls in multiplex real-time polymerase chain reaction assays. *Anal Biochem*. 2009 Mar 15;386(2):288-90. Epub 2008 Dec 7

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

Dorado P, Berecz 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.

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

Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol*. 1979 Sep;16(3):183-7

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

Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007 Apr;63(4):321-33.

Furuta T, Shirai N, Kodaira M, Sugimoto M, Nogaki A, Kuriyama S, Iwaizumi M, Yamade M, Terakawa I, Ohashi K, Ishizaki T, Hishida A. Pharmacogenomics-based tailored versus standard therapeutic regimen for eradication of *H. pylori*. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Apr;81(4):521-8.

Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Feb;83(2):234-42.

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.

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

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

Hines RN, Koukouritaki SB, Poch MT, Stephens MC. 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.

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

Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvallée C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2244-7.

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, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007 Dec; 116(3):496-526.

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.

Inomata S, Nagashima A, Itagaki F, Homma M, Nishimura M, Osaka Y, Okuyama K, Tanaka E, Nakamura T, Kohda Y, Naito S, Miyabe M, Toyooka H. CYP2C19 genotype affects diazepam pharmacokinetics and emergence from general anesthesia. *Clin Pharmacol Ther*. 2005 Dec;78(6):647-55.

Ito Y, Kondo H, Goldfarb PS, Lewis DF. Analysis of CYP2D6 substrate interactions by computational methods. *J Mol Graph Model*. 2008 Feb;26(6):947-56.

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.

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

Jorgensen A, Alfirevic 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.

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

Kim KA, Park PW, Hong SJ, Park JY. The effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel: a possible mechanism for clopidogrel resistance. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Aug;84(2):236-42.

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.

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, Brockmüller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 Jan;77(1):1-16. Review.

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.

Kohlrausch FB, Gama CS, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Callegari-Jacques SM, Gesteira A, Barros F, Carracedo A, Hutz MH. Naturalistic pharmacogenetic study of treatment resistance to typical neuroleptics in European-Brazilian schizophrenics. *Pharmacogenet Genomics.* 2008 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.

Korolkovas A, Burckhalter JH. *Química Farmacêutica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.

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.

Kurzawski M, Gawrońska-Szklarz B, Wrześniewska J, Siuda A, Starzyńska T, Drożdżik M. Effect of CYP2C19*17 gene variant on *Helicobacter pylori* eradication in peptic ulcer patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006 Oct;62(10):877-80.

Laika B, Leucht S, Heres S, Steimer W. Intermediate metabolizer: increased side effects in psychoactive drug therapy. The key to cost-effectiveness of pretreatment CYP2D6 screening? *Pharmacogenomics J.* 2009 May 19. [Epub ahead of print].

Lee JH, Jeon JT. Methods to detect and analyze copy number variations at the genome-wide and locus-specific levels. *Cytogenet Genome Res.* 2008;123(1-4):333-42. Epub 2009 Mar 11.

Lee SY, Ki CS, Hong KS, Kim JW. A case report of a poor metabolizer of CYP2D6 presented with unusual responses to nortriptyline medication. *J Korean Med Sci.* 2004 Oct;19(5):750-2.

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.

Løvlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Steen VM. Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Lett.* 1996 Aug 19;392(1):30-4.

Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene.* 1999 Jan; 21;226(2):327-38.

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.

Madadi P, Ross CJ, Hayden MR, Carleton BC, Gaedigk A, Leeder JS, Koren G. Pharmacogenetics of neonatal opioid toxicity following maternal use of codeine

during breastfeeding: a case-control study. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Jan;85(1):31-5. Epub 2008 Aug 20.

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.

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

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.

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

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.

Motulsky AG, Qi M. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006 Feb;7(2):169-70.

Murray M. Role of CYP pharmacogenetics and drug-drug interactions in the efficacy and safety of atypical and other antipsychotic agents. *J Pharm Pharmacol.* 2006 Jul;58(7):871-85.

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.

Nebert DW, Zhang G, Vesell ES. From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. *Drug Metab Rev.* 2008 Apr;40(2):187-224. Review.

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.

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.

Paddock S, Laje G, Charney D, Rush AJ, Wilson AF, Sorant AJ, Lipsky R, Wisniewski SR, Manji H, McMahon FJ. Association of GRIK4 with outcome of antidepressant treatment in the STAR*D cohort. *Am J Psychiatry.* 2007 Aug;164(8):1181-8.

Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Santana IS, Rangel F, Ojopi EB, Dias-Neto E, Suarez-Kurtz G. Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Dec;84(6):722-8. Epub 2008 Aug 27.

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.

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.

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

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.

Rau T, Wohlleben G, Wuttke H, Thuerlauf N, Lunkenheimer J, Lanczik M, Eschenhagen T. CYP2D6 genotype: impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressants-a pilot study. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 May;75(5):386-93.

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.

Schaeffeler E, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR. *Hum Mutat.* 2003 Dec;22(6):476-85.

Schenk PW, van Fessem MA, Verploegh-Van Rij S, Mathot RA, van Gelder T, Vulto AG, van Vliet M, Lindemans J, Bruijn JA, van Schaik RH. Association of graded allele-specific changes in CYP2D6 function with imipramine dose requirement in a large group of depressed patients. *Mol Psychiatry.* 2008 Jun;13(6):597-605.

Schwab M, Schaeffeler E, Klotz U, Treiber G. CYP2C19 polymorphism is a major predictor of treatment failure in white patients by use of lansoprazole-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Sep;76(3):201-9.

Scott SA, Edelman 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.

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.

Signature Genetics. Available from:
<http://www.signaturegenetics.com/public/4/411.html#21112> [2009 Apr 05].

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.

Singh A. Pharmacogenomics--the potential of genetically guided prescribing. *Aust Fam Physician.* 2007 Oct;36(10):820-4

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

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

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

Steimer W, Muller B, Leucht S, Kissling W. Pharmacogenetics : a new diagnostic tool in the management of antidepressive drug therapy. *Clin Chim Acta.* 2001 Jun;308:33-41.

Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, Kissling W, Leucht S. 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.

Swen JJ, Wilting I, de Goede AL, Grandia L, Mulder H, Touw DJ, de Boer A, Conemans JM, Egberts TC, Klungel OH, Koopmans R, van der Weide J, Wilffert B, Guchelaar HJ, Deneer VH. Pharmacogenetics: from bench to byte. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 May;83(5):781-7. Epub 2008 Feb 6. Erratum in: *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Jul;84(1):175.

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].

Thuerauf 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.

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.

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.

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

Vianna-Jorge R, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Jul;76(1):18-26.

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

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.

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.

ANEXO A - Haplótipos do gene *CYP2D6* encontrados em nossa amostra.

	alelo	-1584	31	100	137_138	1023	1661	1707	1846	1863_1864	2549	2613_2615	2850	2988	3183	4180	CNV
130	*1*2XN	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	3
155	*1*17	CC	GG	CC	-	CT	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
161	*1*4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
165	*1*35	CG	GA	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
345	*1*2XN	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	3
407	*35*41	CG	GA	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GA	GG	CC	2
462	*1*41	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CG	2
503	*1*1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
569	*2*2	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	2
584	*1*2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
594	*1*5	C	G	C	-	C	G	T	G	-	A	AGA	C	G	G	G	1
595	*1*1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
616	*1*4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
629	*1*41	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CG	2
633	*1*17	CC	GG	CC	-	CT	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
634	*2*41	CC	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GA	GG	CC	2
637	*1*2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
639	*1*1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
642	*1*5	C	G	C	-	C	G	T	G	-	A	AGA	C	G	G	G	1
643	*1*4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
646	*4*41	CC	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CC	2
647	*1*17	CC	GG	CC	-	CT	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
656	*2*4	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
662	*4*4	CC	GG	TT	-	CC	CC	TT	AA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CC	2
664	*4*17	CC	GG	CT	-	CT	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
666	*1*2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
667	*1*2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
668	*1*1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
669	*2*4	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
670	*1*1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
671	*1*1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
674	*1*35	CG	GA	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
677	*29*41	CC	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GA	GA	CC	2
680	*1*1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
683	*1*10	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
686	*2*4	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
688	*2*4	CC	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2

ANEXO A – Haplótipos do gene *CYP2D6* encontrados em nossa amostra (continuação).

	alelo	-1584	31	100	137_138	1023	1661	1707	1846	1863_1864	2549	2613_2615	2850	2988	3183	4180	CNV
693	*4 *4	CC	GG	TT	-	CC	CC	TT	AA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CC	2
702	*17 *35	CG	GA	CC	-	CT	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	2
704	*4 *4	CC	GG	TT	-	CC	CC	TT	AA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CC	2
705	*2 *2	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	2
709	*1 *2 x N	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	3
715	*6 *17	CC	GG	CC	-	CT	GC	T -	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
719	*2 *4	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
720	*1 *2	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
726	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
739	*1 *35	CG	GA	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
740	*2 *2	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	2
743	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
751	*4*35	CG	GA	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
769	*1 *35	CG	GA	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
771	*1 *2 x N	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	3
792	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
794	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
817	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
821	*4 *41	CC	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CC	2
838	*1 *41	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CG	2
849	*4 *6	CC	GG	CT	-	CC	CC	T -	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CC	2
854	*2 *4	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
948	*1 *35	CG	GA	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
949	*2 *41	CG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GA	GG	CC	2
956	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
990	*5 *1	C	G	C	-	C	G	T	G	-	A	AGA	C	G	G	G	1
999	*1 *2 x N	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	3
1003	*2 *4	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
1172	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1494	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1495	*1 *2 xN	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	3
1496	*4 *10	CC	GG	TT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
1497	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1498	*2 *2 x N	CG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	3
1499	*2 *2	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	2
1501	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1502	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2

ANEXO A – Haplótipos do gene *CYP2D6* encontrados em nossa amostra (continuação).

	alelo	-1584	31	100	137_138	1023	1661	1707	1846	1863_1864	2549	2613_2615	2850	2988	3183	4180	CNV
1503	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1504	*1 *5	C	G	C	-	C	G	T	G	-	A	AGA	C	G	G	G	1
1505	*1 *2	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1507	*2 *10 XN	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	3
1508	*4 *5	C	G	T	-	C	C	T	A	-	A	AGA	C	G	G	C	1
1509	*2 *41 x N	CG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GA	GG	CC	3
1510	*2 *2 x N	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	3
1511	*1 *35	CG	GA	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1512	*1 *10	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1513	*1 *5	C	G	C	-	C	G	T	G	-	A	AGA	C	G	G	G	1
1514	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1515	*2 *10 x N	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	3
1516	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1517	*1 *35	CG	GA	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1518	*1 *10 x N	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	3
1519	*2 *2	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	2
1520	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1561	*1 *17	CC	GG	CC	-	CT	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1568	*2 *41	CG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GA	GG	CC	2
1571	*2 *4	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
1578	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1583	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1599	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1606	*5 *1	C	G	C	-	C	G	T	G	-	A	AGA	C	G	G	G	1
1657	*1 *35	CG	GA	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1658	*1 *17	CC	GG	CC	-	CT	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1659	*1 *9	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA/del	CC	GG	GG	GG	2
1661	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1662	*1 *5	C	G	C	-	C	G	T	G	-	A	AGA	C	G	G	G	1
1663	*2 *2	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	2
1664	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1665	*1 *41	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CG	2
1697	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1698	*2 *4	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
1699	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1700	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1701	*2 *2 x N	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	3

ANEXO A – Haplótipos do gene *CYP2D6* encontrados em nossa amostra (conclusão).

	alelo	-1584	31	100	137_138	1023	1661	1707	1846	1863_1864	2549	2613_2615	2850	2988	3183	4180	CNV
1702	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1716	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1717	*1 *17	CC	GG	CC	-	CT	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1718	*4 *4	CC	GG	TT	-	CC	CC	TT	AA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CC	2
1719	*2 *10	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
1720	*1 *10	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1721	*1 *41	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CG	2
1722	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1723	*2 *29	CG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GA	CC	2
1726	*1 *17	CC	GG	CC	-	CT	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1728	*2 *41	CG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GA	GG	CC	2
1729	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1739	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1740	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1741	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1742	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1743	*2 *4 x N	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	3
1761	*2 *4	CG	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CC	2
1762	*4 *41	CC	GG	CT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CC	2
1859	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1860	*2 *2	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	2
1861	*1 *41	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CG	2
1862	*4 *4	CC	GG	TT	-	CC	CC	TT	AA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CC	2
1864	*1 *35	CG	GA	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1865	*1 *4	CC	GG	CT	-	CC	GC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CG	2
1871	*4 *10	CC	GG	TT	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	CC	2
1872	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1873	*4 *41	CC	GG	ct	-	CC	CC	TT	GA	-	AA	AGA AGA	CT	GA	GG	CC	2
1930	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1933	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
1932	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
1934	*1 *10	CC	GG	CT	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
2079	*1 *1	CC	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CC	GG	GG	GG	2
2133	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
2134	*2 *2	GG	GG	CC	-	CC	CC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	TT	GG	GG	CC	2
2233	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2
2342	*1 *2	CG	GG	CC	-	CC	GC	TT	GG	-	AA	AGA AGA	CT	GG	GG	CG	2

ANEXO B - Haplótipos do gene *CYP2C19* encontrados em nossa amostra.

DNA	genótipo	-3402	-806	17948	19154
130	*1*1	CC	CC	GG	GG
155	*1*1	CC	CC	GG	GG
161	*1*1	CC	CC	GG	GG
165	*1*17	CT	CT	GG	GG
345	*17*17	TT	TT	GG	GG
407	*17*17	TT	TT	GG	GG
462	*2*17	CT	CT	GG	GA
503	*1*2	CC	CC	GG	GA
567	*1*17	CT	CT	GG	GG
569	*1*17	CT	CT	GG	GG
584	*1*1	CC	CC	GG	GG
594	*2*2	CC	CC	GG	AA
595	*2*17	CT	CT	GG	GA
616	*1*2	CC	CC	GG	GA
629	*1*1	CC	CC	GG	GG
633	*1*1	CC	CC	GG	GG
634	*1*17	CT	CT	GG	GG
637	*1*17	CT	CT	GG	GG
639	*1*1	CC	CC	GG	GG
642	*1*1	CC	CC	GG	GG
643	*1*1	CC	CC	GG	GG
646	*1*17	CT	CT	GG	GG
647	*1*1	CC	CC	GG	GG
656	*17*17	TT	TT	GG	GG
662	*1*2	CC	CC	GG	GA
664	*1*17	CT	CT	GG	GG
666	*1*17	CT	CT	GG	GG
667	*1*2	CC	CC	GG	GA
668	*1*17	CT	CT	GG	GG
669	*1*1	CC	CC	GG	GG
670	*1*2	CC	CC	GG	GA
671	*1*17	CT	CT	GG	GG
674	*2*17	CT	CT	GG	GA
677	*1*1	CC	CC	GG	GG
680	*1*1	CC	CC	GG	GG
683	*1*1	CC	CC	GG	GG
686	*1*1	CC	CC	GG	GG
688	*1*17	CT	CT	GG	GG

ANEXO B – Haplótipos do gene *CYP2C19* encontrados em nossa amostra (continuação).

DNA	genótipo	-3402	-806	17948	19154
693	*1*1	CC	CC	GG	GG
702	*1*17	CT	CT	GG	GG
704	*2*17	CT	CT	GG	GA
705	*1*1	CC	CC	GG	GG
709	*1*17	CT	CT	GG	GG
715	*1*1	CC	CC	GG	GG
719	*1*2	CC	CC	GG	GA
720	*1*17	CT	CT	GG	GG
724	*1*17	CT	CT	GG	GG
726	*1*17	CT	CT	GG	GG
739	*1*1	CC	CC	GG	GG
740	*2*17	CT	CT	GG	GA
743	*1*2	CC	CC	GG	GA
751	*1*1	CC	CC	GG	GG
769	*1*1	CC	CC	GG	GG
771	*1*2	CC	CC	GG	GA
791	*1*17	CT	CT	GG	GG
792	*17*17	TT	TT	GG	GG
794	*1*17	CT	CT	GG	GG
817	*1*17	CT	CT	GG	GG
821	*1*2	CC	CC	GG	GA
838	*1*2	CC	CC	GG	GA
849	*1*17	CT	CT	GG	GG
854	*1*1	CC	CC	GG	GG
948	*1*17	CT	CT	GG	GG
949	*1*17	CT	CT	GG	GG
956	*1*17	CT	CT	GG	GG
990	*17*17	TT	TT	GG	GG
999	*1*2	CC	CC	GG	GA
1003	*1*1	CC	CC	GG	GG
1172	*1*1	CC	CC	GG	GG
1494	*1*17	CT	CT	GG	GG
1495	*1*1	CC	CC	GG	GG
1496	*1*1	CC	CC	GG	GG
1497	*1*17	CT	CT	GG	GG
1498	*1*1	CC	CC	GG	GG
1499	*1*17	CT	CT	GG	GG
1500	*1*1	CC	CC	GG	GG

ANEXO B – Haplótipos do gene *CYP2C19* encontrados em nossa amostra (continuação).

DNA	genótipo	-3402	-806	17948	19154
1501	*1*1	CC	CC	GG	GG
1502	*1*1	CC	CC	GG	GG
1503	*1*1	CC	CC	GG	GG
1504	*2*17	CT	CT	GG	GA
1505	*1*17	CT	CT	GG	GG
1506	*1*17	CT	CT	GG	GG
1507	*1*17	CT	CT	GG	GG
1508	*1*1	CC	CC	GG	GG
1509	*1*17	CT	CT	GG	GG
1510	*1*17	CT	CT	GG	GG
1511	*2*17	CT	CT	GG	GA
1512	*1*2	CC	CC	GG	GA
1513	*1*1	CC	CC	GG	GG
1514	*1*1	CC	CC	GG	GG
1515	*1*17	CT	CT	GG	GG
1516	*1*1	CC	CC	GG	GG
1517	*1*1	CC	CC	GG	GG
1518	*2*2	CC	CC	GG	AA
1519	*1*1	CC	CC	GG	GG
1520	*1*1	CC	CC	GG	GG
1550	*1*2	CC	CC	GG	GA
1561	*1*2	CC	CC	GG	GA
1568	*1*17	CT	CT	GG	GG
1571	*1*1	CC	CC	GG	GG
1578	*1*2	CC	CC	GG	GA
1583	*2*2	CC	CC	GG	AA
1599	*2*17	CT	CT	GG	GA
1600	*1*1	CC	CC	GG	GG
1606	*2*17	CT	CT	GG	GA
1657	*1*17	CT	CT	GG	GG
1658	*1*1	CC	CC	GG	GG
1659	*1*2	CC	CC	GG	GA
1661	*1*1	CC	CC	GG	GG
1662	*1*17	CT	CT	GG	GG
1663	*1*2	CC	CC	GG	GA
1664	*1*1	CC	CC	GG	GG
1665	*1*1	CC	CC	GG	GG
1697	*2*17	CT	CT	GG	GA

ANEXO B – Haplótipos do gene *CYP2C19* encontrados em nossa amostra (continuação).

DNA	genótipo	-3402	-806	17948	19154
1698	*1*17	CT	CT	GG	GG
1699	*1*1	CC	CC	GG	GG
1700	*1*2	CC	CC	GG	GA
1701	*1*17	CT	CT	GG	GG
1702	*1*2	CC	CC	GG	GA
1716	*1*2	CC	CC	GG	GA
1717	*1*2	CC	CC	GG	GA
1718	*1*17	CT	CT	GG	GG
1719	*1*1	CC	CC	GG	GG
1720	*2*2	CC	CC	GG	AA
1721	*1*1	CC	CC	GG	GG
1722	*1*2	CC	CC	GG	GA
1723	*2*17	CT	CT	GG	GA
1726	*1*17	CT	CT	GG	GG
1727	*1*17	CT	CT	GG	GG
1728	*1*1	CC	CC	GG	GG
1729	*1*1	CC	CC	GG	GG
1739	*1*1	CC	CC	GG	GG
1740	*1*1	CC	CC	GG	GG
1741	*2*2	CC	CC	GG	AA
1742	*1*17	CT	CT	GG	GG
1743	*2*2	CC	CC	GG	AA
1761	*1*1	CC	CC	GG	GG
1762	*1*1	CC	CC	GG	GG
1859	*1*1	CC	CC	GG	GG
1860	*1*1	CC	CC	GG	GG
1861	*1*1	CC	CC	GG	GG
1862	*1*1	CC	CC	GG	GG
1864	*1*17	CT	CT	GG	GG
1865	*1*1	CC	CC	GG	GG
1871	*1*2	CC	CC	GG	GA
1872	*1*1	CC	CC	GG	GG
1873	*1*17	CT	CT	GG	GG
1930	*1*1	CC	CC	GG	GG
1932	*1*2	CC	CC	GG	GA
1933	*1*1	CC	CC	GG	GG
1934	*1*1	CC	CC	GG	GG
2079	*1*1	CC	CC	GG	GG

ANEXO B – Haplótipos do gene *CYP2C19* encontrados em nossa amostra (continuação).

DNA	genótipo	-3402	-806	17948	19154
2133	*1*1	CC	CC	GG	GG
2134	*1*17	CT	CT	GG	GG
2139	*1*1	CC	CC	GG	GG
2233	*1*2	CC	CC	GG	GA
2342	*1*3	CC	CC	GA	GG
2381	*1*1	CC	CC	GG	GG
2384	*1*1	CC	CC	GG	GG
2386	*1*2	CC	CC	GG	GA
2390	*2*17	CT	CT	GG	GA
2392	*1*1	CC	CC	GG	GG
2407	*1*1	CC	CC	GG	GG
2412	*1*1	CC	CC	GG	GG
2419	*17*17	TT	TT	GG	GG
2420	*1*2	CC	CC	GG	GA
2422	*1*1	CC	CC	GG	GG
2436	*1*1	CC	CC	GG	GG
2444	*1*1	CC	CC	GG	GG
2448	*1*1	CC	CC	GG	GG
2449	*1*1	CC	CC	GG	GG
2474	*1*1	CC	CC	GG	GG
2475	*1*2	CC	CC	GG	GA
2482	*2*17	CT	CT	GG	GA
2488	*1*17	CT	CT	GG	GG
2490	*1*2	CC	CC	GG	GA
2492	*1*17	CT	CT	GG	GG
2494	*1*1	CC	CC	GG	GG
2495	*1*17	CT	CT	GG	GG
2497	*1*2	CC	CC	GG	GA
2498	*1*1	CC	CC	GG	GG
2501	*1*1	CC	CC	GG	GG
2500	*1*1	CC	CC	GG	GG
2486	*1*17	CT	CT	GG	GG
2507	*1*1	CC	CC	GG	GG
2496	*1*17	CT	CT	GG	GG
2489	*1*1	CC	CC	GG	GG
2487	*1*1	CC	CC	GG	GG
2512	*1*1	CC	CC	GG	GG
2516	*1*1	CC	CC	GG	GG

ANEXO B – Haplótipos do gene *CYP2C19* encontrados em nossa amostra (conclusão).

DNA	genótipo	-3402	-806	17948	19154
2502	*1*1	CC	CC	GG	GG
2505	*1*17	CT	CT	GG	GG
2517	*2*17	CT	CT	GG	GA
2514	*1*1	CC	CC	GG	GG
2515	*1*17	CT	CT	GG	GG
2513	*1*17	CT	CT	GG	GG
2509	*2*17	CT	CT	GG	GA
2510	*1*2	CC	CC	GG	GA