



U

C

FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Variação genética do gene *CYP2D6* na
analgésia do parto: abordagem
farmacogenómica**

Ana Cristina Baptista Raposo

2011



FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Variação genética do gene *CYP2D6* na analgesia do parto: abordagem farmacogenómica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Investigação Biomédica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Manuela Grazina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Copyright©, 2011 todos os direitos reservados. Ana Raposo e Manuela Grazina.

Ana Cristina Baptista Raposo

2011

Agradecimentos

Este trabalho não seria possível sem a contribuição de inúmeras pessoas. A elas agradeço pessoalmente:

À Professora Doutora Manuela Grazina, minha orientadora, o meu muito obrigado pela sua disponibilidade, atenção e conhecimentos científicos transmitidos ao longo deste ano.

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira por ter autorizado a que a realização do meu trabalho experimental no Instituto de Bioquímica Genética da Faculdade de Medicina e no Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra.

À Doutora Ana do Rosário Caleiro Valentim pela colaboração na obtenção das amostras e respectiva informação clínica, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho. Agradeço também por todo o apoio e disponibilidade em me esclarecer todas as minhas dúvidas na área da obstetrícia.

À Carolina Ribeiro e Daniela Luís, pelo apoio, paciência, disponibilidade e todo o conhecimento científico transmitido, foram incansáveis e contribuíram para o meu crescimento a nível científico e pessoal.

Agradeço igualmente à Carolina Ribeiro e Daniela Luís mas também as minhas colegas, Carla Pereira, Teresa Viegas, Catarina Bonifácio e Vera Baptista por todos os bons momentos passados e pelas muitas conversas ao longo do ano.

Ao Dr João Pratas e às Dras Maria João Santos, Cândida Mendes, Carla Veríssimo e Marta Simões, do LBG, pelo apoio prestado.

Aos meus amigos que me acompanharam em mais uma fase importante da minha vida.

Em especial à minha família pelo apoio e compreensão que me foram transmitindo nesta nova etapa.

Ao Paulo, pela paciência, compreensão e confiança transmitida em todos os momentos.

A todos, muito obrigada!

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Farmacogenómica e analgesia do parto por cesariana.....	2
1.2 Opióides.....	6
1.3 Morfina e os efeitos secundários associados.....	8
1.4 Metabolização dos opióides – Citocromo P450 hepático.....	10
1.5 Acção da morfina.....	13
1.6 CYP2D6 no cérebro.....	15
1.7 Gene <i>CYP2D6</i>	16
1.8.1 Fenótipos de metabolização associados ao gene <i>CYP2D6</i>	19
1.8.1.1 Metabolizador lento.....	20
1.8.1.2 Metabolizador intermédio.....	21
1.8.1.3 Metabolizador extensivo.....	22
1.8.1.4 Metabolizador ultra rápido.....	23
1.8.2 Variabilidade inter-étnica.....	24
1.8.3 Haplótipos <i>CYP2D6</i> *2E, *4A e *10A.....	25
1.8.3.1 <i>CYP2D6</i> *4A.....	25
1.8.3.2 <i>CYP2D6</i> *10A.....	26
1.8.3.3 <i>CYP2D6</i> *2E.....	27
2. Amostragem e Metodologia.....	30
2.1 Amostragem.....	31
2.2 Metodologia.....	32
2.2.1 Análise do gene <i>CYP2D6</i> por PCR.....	32
2.2.2 Electroforese de DNA em gel de agarose.....	34
2.2.3 Registo imagiológico dos resultados.....	35
2.2.4 Purificação dos produtos da PCR.....	36
2.2.5 PCR de sequenciação.....	36
2.2.6 Purificação pelo método do etanol.....	37
2.2.7 Sequenciação automática.....	37
2.2.8 Análise de Sequências e análise <i>in silico</i>	38
2.2.9 <i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)</i>	38
2.2.10 Análise de <i>SNPs</i> por PCR em tempo real.....	39
2.2.11 Análise estatística.....	40
3. Resultados.....	41

3.1	Análise de variações de sequência por sequenciação automática.....	42
3.2	Análise do rs#1065852 por PCR-RFLP.....	45
3.3	Análise das variações de sequência dos haplótipos por <i>PCR</i> em tempo real	46
3.4	Estudos dos haplótipos <i>CYP2D6*4A</i> , <i>CYP2D6*10A</i> e <i>CYP2D6*2E</i>	47
3.5	Estudos de associação por genótipo e por alelo.....	48
3.5.1	Dor.....	48
3.5.2	Prurido.....	52
3.5.3	Peso do Recém-nascido.....	55
3.6	Perfil de metabolização.....	58
3.6.1	Dor.....	59
3.6.2	Prurido.....	60
3.6.3	Dor e prurido	60
3.6.4	Peso do recém-nascido	61
4.	Discussão.....	62
5.	Conclusão	69
6.	Referências bibliográficas	72

Índice de tabelas

Tabela I. Descrição dos <i>SNPs</i> presente nos haplótipos <i>CYP2D6*4A</i> , <i>CYP2D6*10A</i> e <i>CYP2D6*2E</i>	37
Tabela II. Resumo das características de todos os <i>SNPs</i> encontrados	43
Tabela III. Análise <i>in silico</i> para as variações de sequência.....	44
Tabela IV. Frequência genotípica e alélica para as variações de sequência em estudo.....	48
Tabela V. Resumo da análise estatística dos valores de p dos estudos de associação para as três variações de sequência em estudo.	55
Tabela VI. Número e percentagem de recém-nascidos por percentil.....	56
Tabela VII. Número de indivíduos para cada perfil metabólico.....	59
Tabela VIII. Número de indivíduos por fenótipo de metabolização de acordo com a dor e prurido.	61

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura da morfina	7
Figura 2. Estrutura 3D da proteína CYP2D6.....	12
Figura 3. Acção da morfina nos neurónios sensoriais pré-sinápticos	14
Figura 4. Locus <i>CYP2D6</i> e os <i>SNPs</i> (<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>) mais frequentes de cada um dos 9 exões.....	18
Figura 5. Correlação genótipo-fenótipo e as suas consequências farmacocinéticas e associadas à dose terapêutica e efeitos secundários.	20
Figura 6. Variabilidade entre as frequências fenóticas por região geográfica	24
Figura 7. Haplótipo <i>CYP2D6*4</i>	25
Figura 8. Haplótipo <i>CYP2D6*10</i>	27
Figura 9. Haplótipo <i>CYP2D6*2</i>	28
Figura 10. Esquema da reacção de PCR.....	34
Figura 11. Representação esquemática da electroforese	35
Figura 12. Reconhecimento específico de alelos pelas sondas <i>TaqMan</i> [®]	40
Figura 13. Exemplo de um electroferograma.....	45
Figura 14. Resultado do <i>PCR-RFLP</i>	46
Figura 15. Gráfico de <i>PCR</i> em tempo real	47
Figura 16. Representação gráfica da análise de associação da alteração IVS3-1G>A, (rs#3892097) e o parâmetro da dor. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a dor inferior ou igual a 3 ou superior a 3.	49
Figura 17. Representação gráfica da análise de associação da alteração c.100C>T, (rs#1065852) e o parâmetro da dor. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a dor inferior ou igual a 3 ou superior a 3.....	50

Figura 18. Representação gráfica da análise de associação da alteração c.294C>G, (rs#28371705) e o parâmetro da dor. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a dor inferior ou igual a 3 ou superior a 3.....	51
Figura 19. Representação gráfica da análise de associação da alteração IVS3-1G>A, (rs#3892097) e o parâmetro do prurido. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a presença <i>versus</i> ausência de prurido.	52
Figura 20. Representação gráfica da análise de associação da alteração c.100C>T, (rs#1065852) e o parâmetro do prurido. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a presença <i>versus</i> ausência de prurido.	53
Figura 21. Representação gráfica da análise de associação da alteração c.294C>G, (rs#28371705) e o parâmetro do prurido. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a presença <i>versus</i> ausência de prurido.	54
Figura 22. Relação do peso e o genótipo para a variação de sequência IVS3-1G>A, (rs#3892097).....	56
Figura 23. Relação do peso e o genótipo para a variação de sequência c.100C>T, (rs#1065852).....	57
Figura 24. Relação do peso e o genótipo para a variação de sequência c.294C>G, (rs#28371705).....	58
Figura 25. Número de indivíduos em cada fenótipo de metabolização, de acordo com o <i>score</i> de dor.	59
Figura 26. Número de indivíduos em relação à presença e ausência de prurido por fenótipo.....	60
Figura 27. Relação entre o peso do recém-nascido e o fenótipo da parturiente.....	61

Abreviaturas

μl	microlitro
A	Adenina
aa	Aminoácidos
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
C	Citosina
CYP450	Citocromo P450 (<i>Cytochrome</i> P450) – família de proteínas hémicas
CYP2D6	Gene que codifica a proteína <i>CYP2D6</i>
CYP2D6	Proteína da família CYP450, família genética 2, subfamília D, gene 6
ddNTPs	di-desoxi-nucleótidos (<i>Dideoxynucleotide Triphosphates</i>)
DNA	Ácido Desoxi-ribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>) (N=A, T, G, C)
dNTPs	Desoxi-nucleótidos (<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>)
EM	Metabolizador Extensivo (<i>Extensive Metabolizer</i>)
G	Guanina
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G (<i>G Protein-Coupled Receptor</i>)
IM	Metabolizador Intermédio (<i>Intermediate Metabolizer</i>)
OPRM1	Gene que codifica o receptor opióide μ (<i>mu-opioid receptor gene</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacção de Polimerase em Cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)

RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
PM	Metabolizador Lento (<i>Poor Metabolizer</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Único (<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>)
SSRIs	Inibidores Selectivos da Recaptação de Serotonina (<i>Selective serotonin reuptake inhibitor</i>)
T	Timina
UGT	Uridina Difosfato Glucuronosiltransferase (<i>Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase</i>)
UM	Metabolizador Ultra rápido (<i>Ultrarapid Metabolizer</i>)
μOR	Receptor dos opióides μ (<i>Opiod Receptor μ</i>)

Resumo

Nas parturientes, a dor, moderada ou severa, é comum após o trabalho de parto por cesariana. A administração intravenosa de morfina no período imediato à operação é um procedimento usual para o alívio da dor. Contudo, verifica-se uma grande variabilidade inter-individual na sua eficácia, conduzindo a perfis de tolerância e diversidade de aparecimento de efeitos secundários, como o prurido, náuseas e vômitos.

A grande variabilidade inter-individual é devida a variações genéticas que influenciam a metabolização e/ou a acção dos fármacos, ou seja, está relacionado com a farmacogenómica.

A enzima CYP2D6 tem uma elevada importância neste processo, por ser responsável pela metabolização oxidativa de vários fármacos e substâncias endógenas. O precursor da dopamina e da serotonina, dois neurotransmissores, são um exemplo de substâncias endógenas metabolizadas pela CYP2D6.

A morfina promove a actividade dos neurónios dopaminérgicos, levando a um aumento na libertação de dopamina, responsável pelo controlo da dor.

O gene *CYP2D6* responsável pela codificação desta enzima é altamente polimórfico, resultando numa grande variabilidade de fenótipos de metabolização. A combinação de vários *SNPs* resulta em diferentes haplótipos que estão associados igualmente a diferentes perfis de metabolização.

O presente estudo é pioneiro ao relacionar os três haplótipos (*CYP2D6*4A*, *CYP2D6*10A* e *CYP2D6*2E*) do gene *CYP2D6* que definem diferentes perfis de metabolização (lento, intermediário e extensivo) com a dor e o surgimento de efeitos secundários, como o prurido, numa amostragem de parturientes sujeitas a analgesia com morfina após a cesariana.

Os resultados mais evidentes deste estudo sugerem que estes haplótipos, quando presentes em heterozigotia ou homozigotia para o alelo variante, levam a um aumento da dor após a cesariana. O aumento da incidência do prurido está associado ao haplótipo *CYP2D6*10A* quando presente em heterozigotia ou homozigotia para o alelo variante.

Este trabalho contribui para uma melhor compreensão do modo como as variantes alélicas do *CYP2D6* poderão afectar a dor e o surgimento de efeitos secundários na analgesia do trabalho de parto.

Abstract

In pregnant women, pain, moderate or severe, is common, after caesarean. Intravenous administration of morphine, immediately following the surgery is an usual procedure for the relief of pain. However, there is a large inter-individual variability in efficacy, leading to profiles of tolerance and side effects like pruritus, nausea and vomiting.

The large inter-individual variability is due to genetic variations that influence metabolism and/or the action of drugs; in other word, it is related to pharmacogenomics.

The CYP2D6 enzyme has high importance in this process, given the fact that it is responsible for the oxidative metabolism of various drugs and endogenous substances. The precursor of dopamine and serotonin, two neurotransmitters, are an example of endogenous substances metabolized by CYP2D6.

Morphine promotes the activity of dopaminergic neurons, causing an increase in the release of dopamine, responsible for pain control.

The gene *CYP2D6* responsible for encoding this enzyme, is highly polymorphic, causing a considerable variability of metabolic phenotypes. The combinations of several *SNPs* that are associated to in different haplotypes are also related to with different metabolic profiles.

This study is original, considering the correlation of the three haplotypes (*CYP2D6*4A*, *CYP2D6*10A* e *CYP2D6*2E*) of the *CYP2D6* gene, that define different profiles of metabolism (poor, intermediate and extensive), with pain and the incidence of secondary effects, such as pruritus, in a population of pregnant women submitted to analgesia with morphine after cesarean section.

The most prominent results of this study suggest that these haplotypes, when present in heterozygous or homozygous for the variant allele, lead to an increase

prevalence of pain after cesarean section. The increase of pruritus is associated with the *CYP2D6*10A* haplotype, when heterozygous or homozygous for the variant allele.

This work contributes to a better understanding of how the *CYP2D6* allelic variants may affect pain and treatment of secondary effects on analgesia of labor.

1.Introdução

1.1 Farmacogenómica e analgesia do parto por cesariana

As parturientes após o trabalho de parto normal ou cesariana, geralmente, demonstram uma dor moderada ou severa (Landau, 2010).

Actualmente a dor já não é considerada apenas um sintoma, mas sim uma condição que necessita de ser considerada e tratada. Está associada a efeitos curtos e/ou longos que afectam a mulher, tendo sido estimado que entre 10-15% das mulheres sofrem dor crónica persistente após cesariana (Landau, 2010; Sinatra, 2005).

O impacto do desenvolvimento de dor persistente é significativo, pois pode prejudicar, não só a capacidade da mãe em cuidar do seu filho no período imediato após o parto, mas também o seu próprio bem-estar por um longo período de tempo (Landau, 2010).

O alívio da dor aguda no período pós-operatório está a cargo dos anesthesiologistas. Deste modo, é recomendado o tratamento da dor, às parturientes no período imediato à operação. Por administração intravenosa de opióides, estão entre os fármacos mais utilizados para o tratamento da dor aguda e crónica (Aubrun *et al.*, 2003; Landau *et al.* 2008; Landau, 2010).

Durante as últimas décadas, os métodos recorrentes para a administração de opióides, na analgesia do trabalho de parto e tratamento da dor pós-operatória, é por via epidural e subaracnóidea (Landau *et al.*, 2008).

No entanto, é necessário ter em consideração que a dor é influenciada pelas condições obstétrica, por factores psicológicos, pela idade e, além disso pela genética, que poderá envolver diferentes sensibilidades a endorfinas endógenas e opióides exógenos. Verifica-se, deste modo, uma grande variabilidade inter-individual na eficácia do tratamento com opióides, levando à ocorrência de perfis de tolerância e

toxicidade e efeitos secundários diversos, como o prurido, vômitos e náuseas (Landau 2005; Landau *et al.*, 2008; Landau, 2010).

A dor após cesariana é um excelente modelo de estudo da dor pós-operatória, devido ao facto de ser realizado, por norma, às mulheres jovens e saudáveis (Landau *et al.*, 2010).

A variabilidade inter-individual na resposta à terapêutica farmacológica é, em parte, devido à idade, sexo, peso, função hepática e renal, co-medicação, heterogeneidade de doenças, nutrição e ser ou não fumador, entre outros. Contudo, há variantes genéticas importantes, que podem influenciar a metabolização e acção dos fármacos, sejam os receptores, os transportadores, moléculas de transdução de sinal, entre outros, conduzindo a um grande impacto na resposta terapêutica (Tomalik-Scharte *et al.*, 2008).

Foi em meados dos anos 50 do século XX, que a Farmacogenómica foi reconhecida como uma ciência, quando foi demonstrado que os factores genéticos influenciavam a resposta a vários fármacos. Werner Kalow, em 1956, demonstrou a ocorrência de um relaxamento profundo do músculo esquelético no pós operatório após administração de succinilcolina (um anestésico usado para facilitar a intubação orotraqueal). Uma variação genética associada à metabolização de fármacos, envolvendo a enzima butirilcolinesterase, foi a causa responsável da resposta ao anestésico, causando uma apneia prolongada (Kalow, 1956; Kalow, 2006; Landau, 2009).

Surgiu, deste modo, uma nova área de investigação, a Farmacogenómica, que se refere à variabilidade na resposta a fármacos devido a factores genéticos (Landau, 2005; Landau, 2009).

Considerando o conceito de Farmacogenética, ambas definem a influência dos factores genéticos na eficácia dos fármacos e reacções adversas aos mesmos. Porém, a Farmacogenética foca-se nas consequências de uma única variação genética, enquanto a Farmacogenómica considera numerosas variações genéticas e a sua interacção. O maior progresso nestas áreas deve-se em grande parte ao projecto do genoma humano e ao desenvolvimento de técnicas modernas de Genética Molecular (Palmer *et al.*, 2005; Tomalik-Scharte *et al.*, 2008).

A complexidade da Farmacogenómica envolve a conceitos de farmacocinética e da farmacodinâmica, nomeadamente relacionados com a absorção, distribuição, metabolização, transporte e acção dos fármacos (Kim *et al.*, 2008).

Todos os genes que codificam proteínas com função a qualquer um destes níveis são potenciais alvos de estudo farmacogenómico.

A farmacocinética descreve de que modo o fármaco se distribui no organismo e é metabolizado, levando igualmente à variabilidade na resposta terapêutica, afectando a biodisponibilidade de um fármaco, a produção de metabolitos activos ou inactivos e a sua eliminação pelo organismo. A farmacodinâmica, por sua vez, é o modo como o fármaco afecta o organismo, relacionado com os seus efeitos ao nível fisiológico. Consoante a especificidade dos receptores, há uma variabilidade de respostas conduzindo a diferenças inter-individuais. (Smith, 2009).

Sendo assim, os efeitos da maioria dos fármacos são determinados pela influência dos polimorfismos na farmacocinética e na farmacodinâmica dos fármacos. As variações de sequência podem levar a diferenças na função dos alvos dos fármacos, como receptores e enzimas metabolizadora, entre outros. Esta interacção pode resultar em poligenia, que envolve várias combinações genótípicas possíveis no metabolismo, transporte e acção dos fármacos, originando respostas fenotípicas diferentes e

igualmente uma grande variedade de índices terapêuticos (rácios de eficácia/toxicidade) para um determinado medicamento (Landau, 2005; Ingleman-Sundberg *et al.*, 2007).

O grande objectivo da Farmacogenómica é promover uma prática clínica mais ajustada de forma a ajudar os clínicos a adequar as doses de fármacos a cada indivíduo e, de acordo com o perfil genético, prever a resposta a um determinado fármaco (Landau, 2005).

Até à data, na maior parte dos casos, a escolha de um medicamento em detrimento de outro não tem em consideração a variabilidade genética inter-individual. Contudo, os avanços da ciência na área da Genética têm sido uma grande ajuda, permitindo aos investigadores identificar associações entre o perfil genético de um indivíduo e a resposta a um determinado fármaco (Palmer *et al.*, 2005; Landau, 2005). Para que tal seja possível é necessário conhecer qual o fármaco e a dosagem que pode ser mais eficaz para cada indivíduo, assim como os fármacos que podem provocar reacções adversas idiossincráticas (reacção enzimática a determinados fármacos que provocam uma reacção contrária à desejada), de modo a melhorar as abordagens terapêuticas (Palmer *et al.*, 2005).

Neste momento, é evidente que a variabilidade nos genes que codificam enzimas metabolizadoras de fármacos afecta, geralmente, o resultado do tratamento farmacológico uma vez que só as enzimas citocromo P450 (CYP450) hepáticos, são responsáveis por 80% do metabolismo de fase I. (Ingleman-Sundberg *et al.*, 2007).

No que diz respeito à eficácia na terapia analgésica, têm sido numerosos os estudos na área da Genética, que tentam explicar esta variabilidade. Actualmente, a investigação da terapia com opióides e os efeitos analgésicos está direccionado para variantes genéticas associadas a transportadores dos fármacos, a estruturas envolvidas na percepção e processamento da informação nociceptiva, variantes do receptor opióide

μ , a enzimas da metabolização dos fármacos analgésicos (citocromo P450) e, que têm impacto na sua farmacocinética e na farmacodinâmica (Kim, 2008; Landau 2009).

Os opióides são os analgésicos mais usados para o controlo da dor aguda e crónica no pós-operatório, nomeadamente, após a cesariana. No entanto, não deixam de apresentar uma grande variabilidade inter-individual na sua acção terapêutica. Uma causa importante nesta variabilidade na resposta aos analgésicos está relacionada com a farmacogenómica (Landau, 2005).

1.2 Opióides

A definição de “opióide” refere-se a todos os compostos, naturais ou sintéticos, com acção idêntica à morfina (**Fig.1**), enquanto se designam por opiáceos os compostos derivados da planta *Papaver somniferum*, ou papoila do ópio, como a morfina, codeína e os seus análogos sintéticos como a oxicodona e a buprenorfina (Somogyi *et al.*, 2007)

Os opióides são acumulados em estruturas celulares da papoila do ópio, os laticíferos. Nestas células é produzido um látex branco leitoso que quando seco, se transforma numa resina sólida, conhecida como ópio. Estas substâncias contêm analgésicos potentes como a morfina e a codeína (Weid *et al.*, 2004)

Tradicionalmente, os opióides foram subdivididos em três grupos: compostos derivados de *Papaver somniferum* (como a morfina, codeína, heroína e naloxona), piperidinas e fenilpiperidinas (com a meperdina, loperamida e fentanil) e difenil heptilaminas (como a metadona e dextropropoxifeno) (Somogyi *et al.*, 2007).

Embora sejam fármacos com estruturas, mecanismos, taxas de distribuição e eliminação diferentes, a sua característica comum é a interacção com o receptor de opióides μ (μ OR), como alvo principal de interacção (Somogyi *et al.*, 2007).

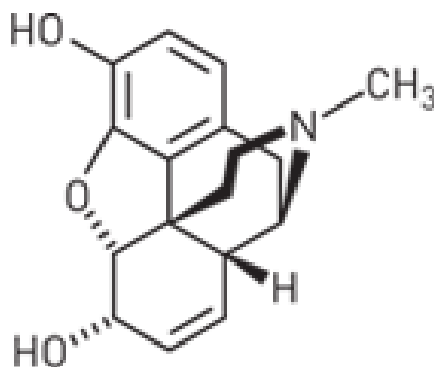


Figura 1. Estrutura da morfina (Adaptado de: <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/>)

O receptor opióide μ possui 7 domínios transmembranares e pertence à família dos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). O gene *OPRM₁* é responsável pela sua codificação e tem sido foco de vários estudos genéticos, por ser o receptor principal para muitos peptídeos dos opióides endógenos, incluindo as endorfinas e opióides analgésicos como a morfina, heroína, fentanil e metadona (Landau, 2005).

Os opióides são usados no tratamento da dor aguda e crónica em casos com cancro e no pós-operatório, como analgésicos potentes. Porém têm um índice terapêutico restrito e uma grande variabilidade na resposta inter-individual; podem, inclusivamente, causar toxicidade grave, que pode levar a depressão respiratória fatal. Assim, para a maioria dos opióides, tem de haver um equilíbrio na dosagem administrada e no controlo da dor, para que não haja depressão respiratória nem efeitos sedativos letais ou prejudiciais (Somogyi *et al.*, 2007).

Até há pouco tempo, a contribuição dos factores genéticos na sensibilidade à dor em humanos era pouco conhecida. A identificação dos genes envolvidos no processo da dor trouxe grandes avanços nesta área. Porém, na prática clínica, atribuir um factor genético para a dor continua a ser complexo e moroso, impossível de concretizar em tempo útil (Somogyi *et al.*, 2007).

Assim, a compreensão do metabolismo dos fármacos, nomeadamente dos opióides analgésicos, é cada vez mais importante para o estudo das diferentes sensibilidades à terapia analgésica. A maior importância sobre a diversidade de respostas recai nas diferenças da capacidade metabolizadora dos CYP450, causada pelos polimorfismos genéticos, que difere de indivíduo, para indivíduo e no desenvolvimento de reacções adversas à terapia farmacológica (Ingelman-Sundberg, 2004; Lotsch, Geisslinger, 2006; Somogyi *et al.*, 2007; Smith, 2009).

1.3 Morfina e os efeitos secundários associados

Os efeitos da morfina dependem, em parte, do estado funcional central, nomeadamente dos sistemas relacionados com os opiáceos endógenos. A acção da morfina, por administração intravenosa ou epidural, é máxima após 90-120 minutos. Este analgésico atenua a ansiedade, tanto por uma acção directa como por acção indirecta, por diminuição da dor. A depressão da respiração é um efeito secundário detectável mesmo após doses subanalgésicas de morfina em indivíduos sãos, que resulta de um efeito directo sobre o centro respiratório bulbar, que se torna menos sensível à estimulação fisiológica da pressão parcial de CO₂ no sangue. Este analgésico também estimula o centro do vômito, justificando a grande percentagem de indivíduos que tomam morfina sentirem náuseas. (Guimarães *et al.*, 2006).

O prurido é o efeito secundário mais frequente, decorrente da administração de morfina na obstetrícia, com uma incidência de 60-100% (Horta *et al.*, 2000; Szarvas *et al.*, 2003). Quanto aos processos fisiopatológicos subjacentes, tem origem a partir dos terminais nervosos localizados na pele, sendo mais concentrado nos pulsos e tornozelos. A sensação de prurido é transmitida através de neurónios nociceptivos, as fibras

nervosas do tipo C (não mielinizadas e propagam o impulso nervoso a baixa velocidade) até à medula espinhal que conduz a informação até ao tálamo (Moses, 2003).

Não há um mecanismo fisiológico único para explicar o surgimento de prurido. Há estudos que sugerem que este efeito, durante a gravidez parece estar associado à interacção dos estrogénios com os receptores μ dos opióides (Szarvas *et al.*, 2003). Outros estudos referem a serotonina como um componente chave no surgimento deste efeito secundário pela administração de morfina, nomeadamente pela sua possível interacção com o receptor dos opióides no SNC (Horta *et al.*, 2000; George *et al.*, 2009).

Com base nestes estudos, já são usados antagonistas do receptor da serotonina, no tratamento da náusea e vômito, que também foram propostos para um possível tratamento do prurido induzido por opióides. Verificaram que, apesar de não reduzirem a incidência de prurido, diminuem significativamente a gravidade e necessidade de tratamento, sugerindo que estes devem ser usados na rotina clínica para as parturientes submetidas a analgesia com opióides (George *et al.*, 2009).

Na administração de morfina por via epidural, cerca de 3,6% passa para o líquido cefalo-raquidiano (LCR), onde atinge concentrações máximas aos 60-90 minutos e de onde é eliminada com uma semivida bifásica de 73 e 369 minutos. Estas baixas concentrações plasmáticas assim atingidas reduzem ao mínimo a secreção de morfina e dos seus metabolitos no leite materno, pelo que se prevê que o seu uso como adjuvante, na analgesia epidural durante o parto, não terá reflexos nocivos para o recém-nascido (Guimarães *et al.*, 2006).

1.4 Metabolização dos opióides – Citocromo P450 hepático

O projecto do genoma humano permitiu a identificação de 57 citocromos (CYPs) humanos funcionais e 58 pseudogenes, organizados em 18 famílias e 43 subfamílias (Zhou, 2009; Preissner *et al.*, 2010).

As enzimas CYP450 representam uma super-família de enzimas monooxigenases. Têm uma elevada importância devido ao seu papel na metabolização grande número de substâncias endógenas (por exemplo: eicosanóides e esteróides) e de xenobióticos, isto é, compostos químicos estranhos ao organismo, mas com capacidade de actuar no seu interior (por exemplo: fármacos, aditivos alimentares, componentes ambientais e do fumo do tabaco). São responsáveis por cerca de 70-80% do metabolismo de fármacos usados na prática clínica diariamente (Ingelman-Sundberg, 2004; Zanger *et al.*, 2004; Zhou, 2009; Preissner *et al.*, 2010).

O metabolismo refere-se ao processo de biotransformação pelo qual os fármacos são transformados para que possam ser eliminados pelo organismo (Smith, 2009).

Alguns fármacos exercem as suas funções e são eliminados intactos mas, a maioria requer um processo metabólico que lhe permite atingir o seu alvo terapêutico e actuar durante um período de tempo adequado e somente depois é eliminado, como é o caso dos opióides (Smith, 2009).

A maioria dos opióides sofre primeiro uma metabolização no fígado antes de entrar na circulação sistémica.

O facto de os fármacos serem compostos lipofílicos permiti-lhes uma primeira passagem pelo fígado, que reduz a sua biodisponibilidade, e de seguida, atravessar as membranas celulares de modo a alcançar os tecidos alvo. Por fim, a última metabolização do fármaco tem como objectivo torná-lo num composto hidrofílico de modo a ser excretado pela urina. Deste modo, é possível dividir a metabolização em

duas fases: metabolismo de fase I (reações de modificação) e metabolismo de fase II (reações de conjugação) (Smith, 2009).

No metabolismo de fase I há envolvimento das CYP450, que são consideradas as enzimas maioritárias desta fase. Os fármacos, passam normalmente, por reações de oxidação, redução ou hidrólise, como é o caso das reações de O-desalquilação, N-desalquilação, cetoredução ou desacetilação, a que a maioria dos opióides estão sujeitos (Landau, 2005; Smith, 2009; Zhou, 2009).

No metabolismo de fase II os metabolitos são conjugados e transformados em ácido glucurónico, sulfato, glicina ou glutatona, substâncias hidrofílicas. A reação mais importante é a glucuronidação, catalisada pela enzima uridina difosfato glucuronosiltransferase (UGT), que produz moléculas altamente hidrofílicas, que são deste modo, facilmente excretadas. A morfina é maioritariamente sujeita a glucorinização pela enzima UGT, originando morfina-3-glicuronídeo e morfina-6-glicuronídeo (Smith, 2009).

Cerca de 90% dos fármacos catalisados pelas CYP450 está atribuída ao: 1A2 (4%), 2A6 (2%), 2C9 (10%), 2C19 (2%), 2E1 (2%), 2D6 (30%) e 3A4 (50%). A maioria dos CYPs podem ser sujeitos a indução/inibição por fármacos e alterações genéticas influenciam a sua actividade enzimática, em particular para os CYPs 2A6, 2C9, 2C19 e 2D6 (Zhou, 2009). As enzimas CYP3A4 e CYP2D6 do CYP450 são as de maior relevância no processo metabólico de fase I (Smith, 2009).

A enzima CYP2D6 (**Fig. 2**) é das mais importantes, devido ao grande número de fármacos que metaboliza. Esta representa menos de 2% do conteúdo total do fígado, mas é responsável pela metabolização de quase 25% dos fármacos comuns, influenciando a farmacocinética de muitos medicamentos utilizados na prática clínica

diária (Dorado *et al.*, 2005; Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007; Kim, 2008; Correia *et al.*, 2009; Zhou, 2009).

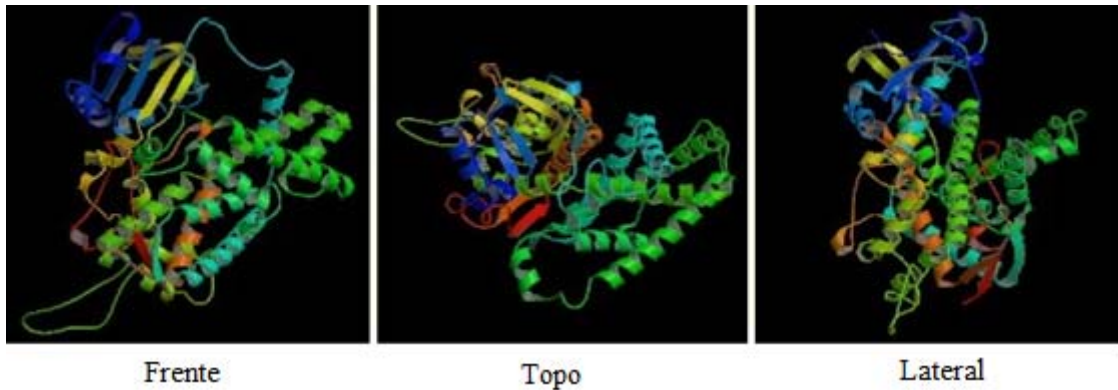


Figura 2. Estrutura 3D da proteína CYP2D6 (Adaptado de: <http://genome.ucsc.edu>)

A CYP2D6 é responsável pelo metabolismo oxidativo de numerosos fármacos, na sua maioria lipofílicos, com alvos no sistema nervoso central (SNC), nomeadamente antidepressivos tricíclicos e não-tricíclicos, antipsicóticos, antieméticos, inibidores selectivos do *reuptake* de serotonina (SSRIs), neurolépticos, opióides e ainda fármacos com alvo no sistema cardiovascular, como anti-rítmicos e antagonistas dos adrenoreceptores- β (bloqueadores β), o tamoxifeno para o tratamento do cancro, antihistaminicos, agentes anti-HIV e halofantrina, para a malária (Lotsch, Geisslinger, 2006; Arneth *et al.*, 2009; Zhou, 2009).

É de referir ainda que, de entre os opióides analgésicos, a CYP2D6 é ainda responsável pela metabolização da hidrocodona, codeína, dihidrocodeína nos seus metabolitos activos (hidromorfona, morfina, e dihidromorfina, respectivamente). É de notar que estes opióides têm uma interacção potencial com inibidores selectivos da recaptação de serotonina, anti-depressivos tricíclicos, bloqueadores- β e anti-rítmicos (Smith, 2009).

No presente estudo, a morfina é o opióide analgésico usado no controlo da dor no pós-operatório da cesariana.

1.5 Acção da morfina

A administração intratecal ou epidural de morfina na obstetrícia tem como objectivo promover a analgesia em mulheres sujeitas a cesariana (George *et al.*, 2009).

Exerce o seu efeito analgésico ligando-se aos μ OR nos neurónios sensoriais pré-sinápticos, mimetizando a acção das endorfinas devido à sua semelhança na estrutura.

Estes receptores estão na sua maioria associados a proteínas G inibitórias. Deste modo, quando a morfina se liga, há inibição da adenil ciclase, provocando diminuição dos níveis de adenosina monofosfato cicílico (AMPC) intracelular. Outra consequência é a estimulação dos canais de K^+ e a inibição dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, diminuindo o influxo deste catião. Como consequência, há hiperpolarização do neurónio e redução da libertação de neurotransmissores, nomeadamente, serotonina e dopamina, bloqueando a percepção dos sinais de dor (**Fig.3**) (Tavares & Lima, 2007).

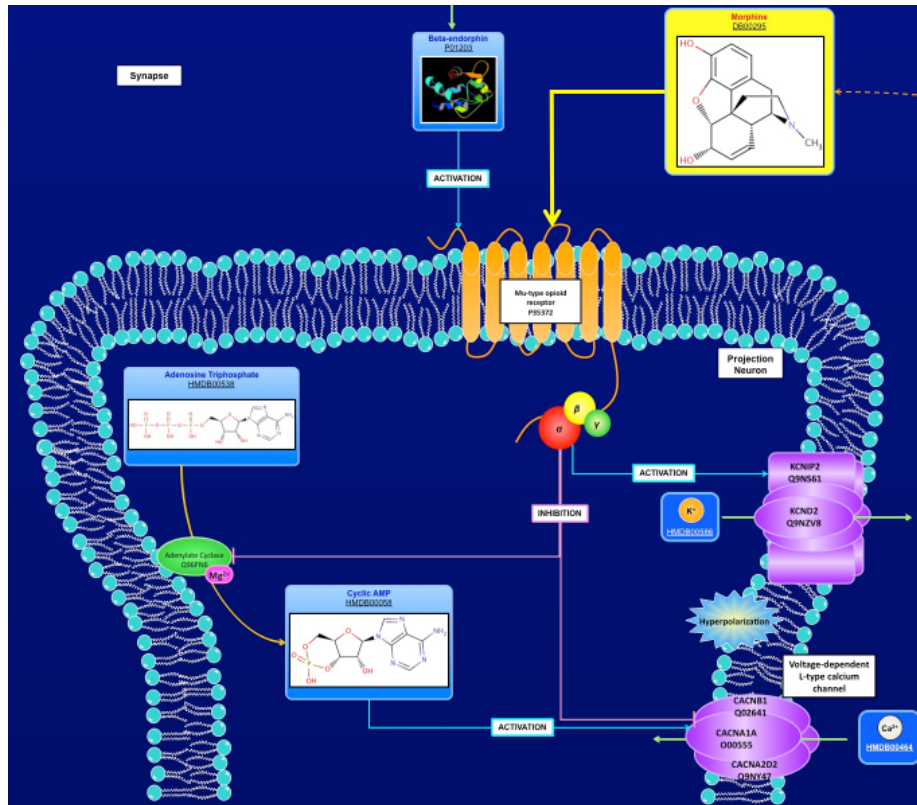


Figura 3. Acção da morfina nos neurónios sensoriais pré-sinápticos. (Adaptado de: <http://pathman.smpdb.ca/pathways/SMP00406/pathway?level=3>)

Está demonstrado que as drogas de abuso como o álcool, anfetaminas, cocaína, marijuana e morfina promovem a actividade dos neurónios dopaminérgicos. Os corpos celulares destes neurónios surgem no mesencéfalo e os axónios são projectados para uma zona particular do prosencéfalo, o núcleo *accumbens*, designado por sistema mesolímbico, envolvido na recompensa emocional, em que a dopamina é o mediador principal (Fox, 2008).

A morfina activa a via mediada pelos receptores opióides no mesencéfalo, de modo a aumentar a libertação de dopamina nos neurónios pré-sinápticos, havendo inibição da recaptção de dopamina para os neurónios pré-sinápticos (Fox, 2008). Deste modo, a dopamina para além das inúmeras funções que tem no cérebro, é também responsável pela modulação da dor (Fox, 2008).

Sabendo que a administração de morfina promove actividade dos neurónios dopaminérgicos de modo a controlar a dor, torna este facto importante para o presente estudo pois está demonstrado que a dopamina, entre outras substâncias endógenas, é substrato da enzima CYP2D6 no cérebro.

1.6 CYP2D6 no cérebro

As isoformas da subfamília CYP2D não estão presentes somente nos tecidos hepáticos, também exercem actividade enzimática em substâncias endógenas e xenobióticos noutros locais do organismo. Foram observadas predominantemente no cerebelo, córtex, amígdala, bulbos olfactivos, bem como no hipocampo e na substância nigra (Dorado *et al.*, 2007; Bromek *et al.*, 2009).

A sua expressão no cérebro é de especial interesse porque o CYP2D6 metaboliza muitos fármacos de acção central e substâncias endógenas. Diversos estudos demonstraram que a expressão desta enzima é confinada a certas regiões e a alguns tipos de neurónios, incluindo os neurónios dopaminérgicos pigmentados da substância nigra (mesencéfalo), (Zanger *et al.*, 2004).

Os substratos endógenos, como precursores da serotonina, dopamina, morfina endógena e endocanabinóides esteróides neuronais têm uma elevada afinidade por esta enzima (Zanger *et al.*, 2004; Bromek, *et al.*, 2009; Stingl & Viviani, 2011).

Os primeiros estudos foram realizados em microssomas hepáticos humanos em que se verificou que a enzima CYP2D6 era capaz de catalisar a hidroxilação aromática da tiramina em dopamina (Hiroi *et al.*, 1998). Estudos mais recentes (Niwa *et al.*, 2004), já referem a ocorrência deste processo no cérebro, mas também a metabolização da progesterona (Ozdemir *et al.*, 2007, González *et al.*, 2008; Shyman *et al.*, 2010).

Yu *et al.* (2003; 2004) publicaram estudos *in vitro* e *in vivo*, sobre o envolvimento da *CYP2D6* na biotransformação do metabolito 5-metoxitriptamina em serotonina (Zanger *et al.*, 2004; Peñas-Lledó *et al.*, 2009; Bromek, *et al.*, 2009; Shyman *et al.*, 2010).

Além disso, tem sido sugerido que os polimorfismos do gene *CYP2D6* podem influenciar a personalidade, devido a características anatómicas e fisiológicas que evidenciam a actuação do sistema serotoninérgico e dopaminérgico de uma forma inversa nalgumas funções fisiológicas do organismo. Estudos recentes sugerem que indivíduos com um perfil de metabolização mais lento, em comparação com indivíduos normais, apresentam uma baixa da serotonina, que, por sua vez, pode causar um ligeiro aumento da dopamina (Peñas-Lledó *et al.*, 2009).

Deste modo, os polimorfismos do gene *CYP2D6* terão efeito na metabolização das aminas endógenas, como a dopamina libertada no processo de modulação da dor.

1.7 Gene *CYP2D6*

O *CYP2D6* está localizado no braço longo do cromossoma 22, na região 1, banda 3 e sub-banda 1, 22q13.1 (Lotsch & Geisslinger, 2006).

Segundo a base de dados *Genome Bioinformatics* (UCSC) já foram descritas pelos menos três isoformas do gene *CYP2D6*. Uma delas é considerada a isoforma de referência, com 9 exões e codificante de uma proteína com 497 aminoácidos (aa); uma segunda isoforma tem apenas 8 exões (falta do exão 3, em comparação com a primeira isoforma) e codifica uma proteína de 446 aa; uma terceira isoforma, com apenas os 4 últimos exões, codifica uma proteína de 180 aa. Contudo, esta terceira isoforma dá origem a um RNAm que é degradado prematuramente por um mecanismo celular

designado por *nonsense mediated decay*, não havendo tradução da proteína. Há outras isoformas descritas, no entanto, ainda estão em estudo.

Este locus, (22q13.1) contém dois pseudogenes vizinhos, *CYP2D7* e *CYP2D8*. A evolução dos loci *CYP2D* envolveu a eliminação de três genes e a inactivação de outros dois (*CYP2D7P* e *CYP2D8P*) e parcial inactivação do gene *CYP2D6* (Lotsch & Geisslinger, 2006).

A presença de pseudogenes semelhantes, localizados perto do gene *CYP2D6* leva à possibilidade de ocorrência de variações de sequência que podem ocorrer devido a reacções de *crossing over* desiguais, resultando daí variações alélicas do gene (Lotsch & Geisslinger, 2006).

A evolução dos loci *CYP2D* levou a que exista uma grande diferença entre os ratos e os seres humanos, em relação ao número de genes *CYP2D* activos. O rato tem nove genes diferentes activos e os humanos apenas um (que está ausente em 7% dos caucasianos). A enzima codificada por este gene é conhecida por ter uma elevada afinidade para toxinas de plantas e alcalóides. Deste modo, é razoável supor que o rato tenha mantido os genes activos devido à necessidade de uma dieta de desintoxicação, enquanto os humanos têm uma dieta mais restrita, devido à capacidade intelectual para a permuta de informação sobre a alimentação adequada, resultando numa perda de genes devido à pressão selectiva (Ingelman-Sundberg, 2004).

A característica mais importante dos genes CYP humanos é o facto de serem altamente polimórficos (**Fig.4**). As diferentes variantes alélicas foram classificadas pelo Comité para a Nomenclatura dos alelos do CYP humanos, descrevendo os alelos para várias subfamílias dos genes codificantes das enzimas CYPP450 (Ingelman-Sundbert *et al.*, 2007).

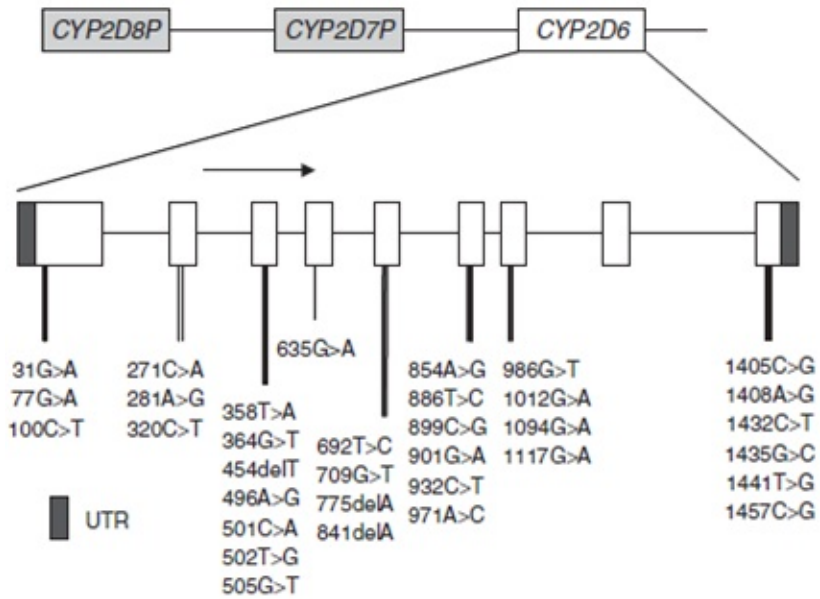


Figura 4. Locus *CYP2D6* e os SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) mais frequentes de cada um dos 9 exões (Adaptado de: Zhou, 2009).

As variações mais comuns no gene *CYP2D6* são os *Single Nucleotide Polymorphism*, (*SNPs*), polimorfismos de um único nucleótido, ou seja, alterações de uma única base (Landau, 2005). Os SNPs são variações naturais no gene que podem ter uma influência significativa sobre o metabolismo, eficácia clínica e efeitos colaterais na terapêutica com fármacos, dependendo se modifica a sequência do aminoácido da proteína codificada e se tem consequências fisiológicas. Se ocorrerem vários *SNPs* no mesmo gene, os genótipos resultantes são designados por haplótipos, combinação de *SNPs* (Landau 2005). Há outras mutações que são igualmente importantes. Mutações nos intrões podem criar diferentes locais de *splicing* e a variação do número de cópias do gene pode conduzir a um aumento do número de enzimas funcionais, que resulta num aumento do metabolismo do fármaco ou ausência de resposta a este devido a uma sobredosagem (Ingleman-Sundbert *et al.*, 2007). Deste modo, as variações genéticas, polimorfismos e/ou mutação em genes responsáveis pelo metabolismo de fármacos

podem levar a diferentes respostas à terapêutica e desenvolvimento de efeitos secundários (Zhou, 2009).

Relativamente ao gene *CYP2D6*, já estão identificadas, no ser Humano, mais de 82 variantes alélicas, ou seja, haplótipos entre *CYP2D6**2 a *83. A variante *CYP2D6**1A refere-se ao *wild-type* ou de referência. Estão descritos mais de 196 *SNPs* associados a estas variantes alélicas para este gene, em que pelo menos 52 são do tipo missense e têm impacto na actividade/estrutura da proteína. Estas podem resultar de mutações pontuais, rearranjos (deleções/inserções), deleções/multiplicações do gene inteiro (Zhou, 2009).

O grande número de variantes alélicas influencia a expressão e função da proteína correspondente resultando numa grande variabilidade na actividade enzimática e implicações na terapêutica. Além disso, está descrito que esta variabilidade pode ocorrer em diferentes frequências, consoante a população, ou seja, há uma variabilidade entre indivíduos de acordo com as etnias (Landau, 2005; Zanger *et al.*, 2004; Arneth *et al.*, 2009).

1.8.1 Fenótipos de metabolização associados ao gene *CYP2D6*

A combinação de diferentes variantes alélicas forma diferentes haplótipos e determinam o fenótipo bioquímico. Actualmente, estão definidos quatro fenótipos distintos (**Fig.5**) com base na capacidade de metabolização: indivíduos metabolizadores lentos (PM), intermédios (IM), extensivos (EM) e ultra-rápidos (UM) (Arneth *et al.*, 2009).

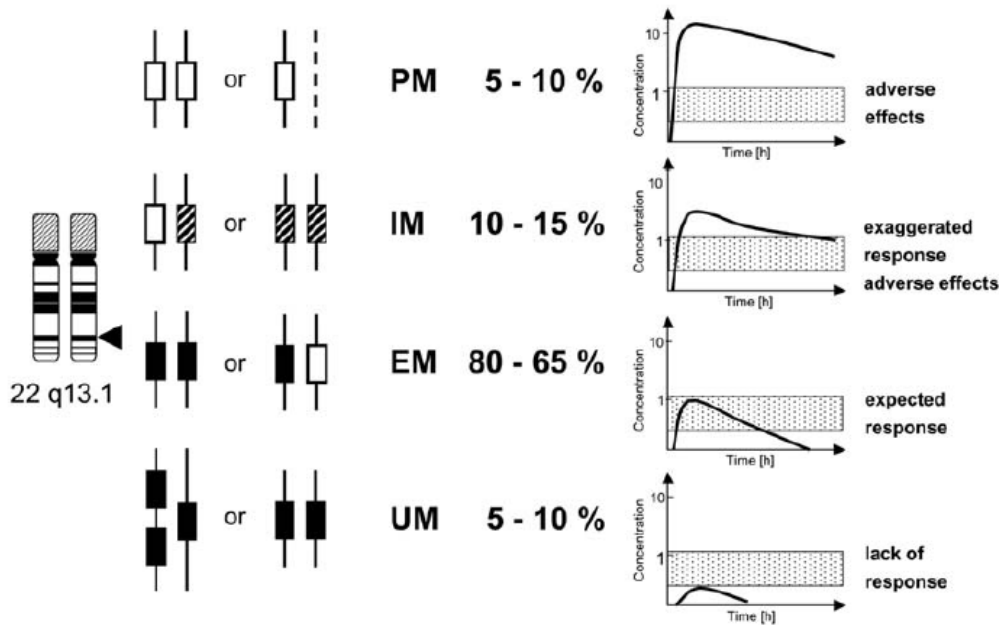


Figura 5. Correlação genótipo-fenótipo e as suas consequências farmacocinéticas e associadas à dose terapêutica e efeitos secundários. Os alelos nulos estão representados pelos rectângulos vazios, os funcionais a preto e os alelos com função reduzida a tracejado. A percentagem é uma estimativa da frequência de cada fenótipo na população Caucasiana. Os gráficos demonstram as concentrações esperadas do fármaco no plasma em relação ao tempo e o efeito terapêutico é representado pelo rectângulo no gráfico (Adaptado de: Zanger *et al.*, 2004).

1.8.1.1 Metabolizador lento

Indivíduos PM metabolizam xenobióticos e substâncias endógenas de uma forma selectiva e num ritmo mais lento, ou seja, têm uma incapacidade de usar normalmente as vias metabólicas para a metabolização dependente da enzima *CYP2D6*. Consequentemente, os indivíduos são mais susceptíveis a efeitos secundários devido a níveis plasmáticos elevados substrato, particularmente se se tratar de uma substância activa de um fármaco. Pode também haver uma redução da eficácia no tratamento quando necessário a activação de pró fármacos pela enzima (Dorado *et al.*, 2005; Zanger *et al.*, 2004; Somogyi *et al.*, 2007; Arneth *et al.*, 2009).

As variantes mais comuns deste fenótipo, responsáveis pela codificação de uma enzima não funcional, quando presentes em homozigotia, mas também em constelações de heterozigóticos são: *CYP2D6**3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *13, *14, *15, *16, *18 *19, *20, *21, *38, *40, *42, *44, *56 e *62 (Zanger *et al.*, 2004; Zhou, 2009).

As alterações mais comuns associadas ao fenótipo PM são as alterações de uma única base ou pequenas inserções/deleções que interrompem a leitura correcta da sequência codificante da sequência codificante gene (nonsense) ou interferem com os locais de *splicing*, podendo levar à formação de uma proteína truncada devido ao surgimento do codão *stop* prematuro. Tal sucede para a maioria dos alelos (*3, *4, *6, *7, *8, *11, *15, *19, *20, *38, *40, *42, *44, *56 e *62). No entanto, pode ocorrer também a codificação de alelos não funcionais em todo o comprimento do gene (*12, *14, *18) ou formação de um gene híbrido resultante da junção do gene com o pseudogene *CYP2D7* (*CYP2D7-2D6*) devido às grandes deleções formadas pelas variantes alélicas *13 e *16 (Zanger *et al.*, 2004; Zhou, 2009).

Contudo, os haplótipos *3, *4, *5 e *6 são responsáveis por 96% do fenótipo PM nos Caucasianos, sendo os mais importantes os *CYP2D6**4A (defeito no *splicing*) e *5 (deleção inteira do gene) (Zanger *et al.*, 2004; Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007 & Somogyi *et al.*, 2007; Arneth *et al.*, 2009; Zhou, 2009).

1.8.1.2 Metabolizador intermédio

O metabolizador intermédio é um subgrupo entre o fenótipo PM e EM. Devido a sobreposição entre estes dois fenótipos continua a ser de difícil definição. Sabe-se que é característico de indivíduos com um dos alelos funcionais e um alelo com função reduzida ou com dois alelos com a função reduzida parcialmente (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007; Zhou, 2009).

As variantes mais comuns do fenótipo IM são: *CYP2D6**10, *14, *17, *18, *36, *41, *49, *50, *51, *54, *55 e *57 (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007 & Zhou, 2009). Estas variantes alélicas dão origem a uma redução significativa da actividade enzimática, devido, em grande parte, à instabilidade da enzima, falta de reconhecimento entre a enzima e o substrato, ou redução desta afinidade (Zhou, 2009).

Este fenótipo foi definido por modelos matemáticos e foi estimada a sua presença em cerca de 10-15% da população Europeia. Contudo, segundo Zanger *et al.* (2004), este fenótipo não pode reflectir apenas os indivíduos heterozigóticos (alelo funcional/alelo não funcional), porque, pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* sabe-se que um heterozigótico tem uma frequência de 35-40% com base na frequência observada para PM (Zanger *et al.*, 2004).

Há estudos farmacocinéticos que sugerem que a capacidade de oxidação de fármacos é significativamente reduzida e podem ser comparáveis ao fenótipo PM, especialmente em tratamentos a longo prazo (Zanger *et al.*, 2004).

1.8.1.3 Metabolizador extensivo

O metabolizador extensivo é caracterizado como “normal”, tendo dois alelos tipo *wild-type* funcionais, *CYP2D6**1 (Arneth *et al.*, 2009; Zhou, 2009).

Posteriormente, foram estudadas outras variantes alélicas que não apresentavam alteração da actividade enzimática, ou seja, tinham uma função similar ao tipo *wild-type*, como são exemplo os haplótipos *CYP2D6**2, *17x2, *27, *35, *39, *41x2 e *48 (Arneth *et al.*, 2009; Zhou, 2009).

1.8.1.4 Metabolizador ultra rápido

O fenótipo UM tem sido menos estudado e está caracterizado com menos pormenor comparativamente ao PM, embora possa ter consequências importantes, nomeadamente na prática clínica. Não há uma definição clara para este fenótipo, excepto pela presença de mais de duas cópias activas do gene, havendo um aumento da expressão funcional da enzima (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007).

Durante a divisão celular, se houver um *crossing-over* desigual, um indivíduo poderá ter um gene duplicado num cromossoma e estar ausente no outro. Deste modo, nas gerações seguintes, os cromossomas podem ser herdados separadamente, sendo a presença de multiplicações do gene associada a eventos de *crossing-over* desiguais, já em genes duplicados (Ledesma & Agundez, 2005; Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007; Zhou, 2009).

A duplicação genética das variantes alélicas está descrita para os seguintes haplótipos: *CYP2D6**1 x N, *2 x N, *4 x N, *6 x N, *10 x N, *17 x N, *29 x N, *35 x N, *43 x N e *45 x N (Landau, 2005; Somogyi *et al.*, 2007; Arneth *et al.*, 2009; Zhou, 2009).

Assim, indivíduos UM metabolizam os fármacos mais rapidamente e os níveis terapêuticos no plasma não serão alcançados com as doses comuns. Além disso, há acumulação de metabolitos no plasma, o que leva a uma maior toxicidade e ao surgimento de efeitos secundários associados (Dorado *et al.*, 2005; Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007; Somogyi *et al.*, 2007; Zhou, 2009).

1.8.2 Variabilidade inter-étnica

De acordo com o exposto anteriormente, há uma grande variabilidade na frequência alélica do gene *CYP2D6* entre etnias (**Fig.6**), que influencia drasticamente, os fenótipos (Zhou, 2009).

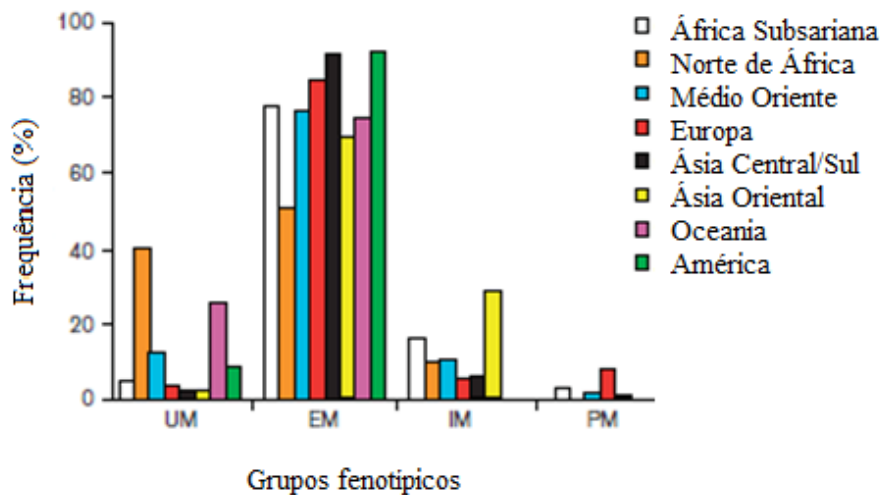


Figura 6. Variabilidade entre as frequências fenotípicas por região geográfica. UM: metabolizador ultra rápido; EM – metabolizador extensivo; IM – metabolizador intermediário; PM – metabolizador lento. (Adaptado de: Sistonen *et al.*, 2007).

Na população asiática, o fenótipo PM é pouco frequente, estando presente apenas em 1% da população. Nos afro-americanos surge até 19%, sendo, maioritariamente, encontrado nos Caucásios. Em cerca de 26% da população Caucásica, os alelos do gene *CYP2D6* são “não funcionais”, e, entre eles, as variantes alélicas *CYP2D6**3, *4, *5 e *6, são responsáveis por 96% dos casos de PM (Ingleman-Sundberg, 2005; Correia *et al.*, 2009 & Zhou, 2009). Na população portuguesa, o alelo não funcional mais comum é o *CYP2D6**4, seguidos dos alelos *CYP2D6**5,*6 e *3, indicando, deste modo, um maior risco para o desenvolvimento de efeitos tóxicos a fármacos metabolizados por esta enzima (Correia *et al.*, 2009).

O fenótipo IM é característico da população Asiática, devido a prevalência da variante *CYP2D6*10A*, sendo raro noutras populações (Ingleman-Sundberg, 2005).

O fenótipo UM é raro entre as populações Caucásicas e Afro-americanos (cerca de 1,3% e 5,75%, respectivamente). Encontra-se predominantemente distribuído no Nordeste Africano e Oceania, sendo a maior frequência observada na Etiópia (16%) e na Arábia Saudita (20%); as variantes mais comuns encontradas são *CYP2D6*4xN* e *CYP2D6*2xN* (Ingleman-Sundberg *et al.*, 2007; Zhou, 2009).

1.8.3 Haplótipos *CYP2D6*2E*, **4A* e **10A*

Dado que, para o presente trabalho analisados três haplótipos do *CYP2D6*, em particular, apresentam-se os detalhes que mais se destacam, relativamente a cada um deles.

1.8.3.1 *CYP2D6*4A*

O alelo não funcional mais frequente nos Caucásicos é o *CYP2D6*4* (**Fig.7**) e é responsável por 70 a 90% dos fenótipos PM (Zanger *et al.*, 2004).

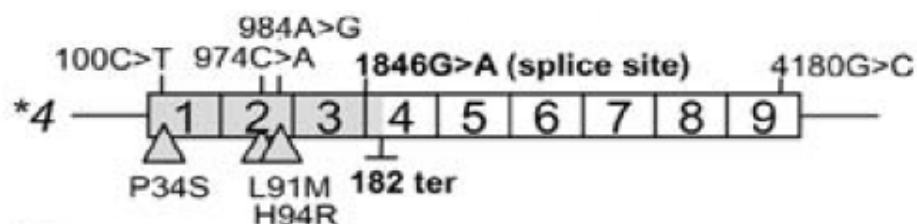


Figura 7. Haplótipo *CYP2D6*4* (Adaptado de: Zanger *et al.*, 2004). (Legenda: 974C>A = c.271C>A; 984A>G = c.281A>G; 1846G>A = IVS3-1G>A; 4180G>C = c.1457C>G)

Hanioka *et al.* (1990) identificaram uma mutação num nucleótido na junção do terceiro intrão com o quarto exão, com a substituição de guanina por adenina, no gene

CYP2D6, responsável por um transcrito de *splicing* incorrecto, que dá origem a uma proteína truncada. Deste modo, o polimorfismo chave deste haplótipo é a alteração IVS3-1G>A (#rs3892097) que resulta num mRNA com uma base adicional, alterando a leitura deste pelo surgimento de um codão *stop* prematuro (Zanger *et al.*, 2004).

Gaedigk *et al.* (2006) identificaram esta variante alélica com os SNPs c.100C>T e c.1457G>C, estando este último ausente apenas no subtipo *CYP2D6*4J*. Além disso, referiram que o fenótipo PM (*CYP2D6*4/*4*) está associado à alteração, c.100C>T, em heterozigotia (Zhou, 2009).

Na população Chinesa, este haplótipo está presente em cerca de 1% e, na população Africana, em cerca de 6-7%, explicando a baixa incidência do fenótipo PM nestas populações, cerca de 1% e 0-5%, respectivamente (Zanger *et al.*, 2004; Zhou, 2009).

Na população Portuguesa, este haplótipo está presente em 13,3% (Correia, *et al.*, 2009).

1.8.3.2 *CYP2D6*10A*

Esta variante é denominada funcionalmente por *CYP2D6*10A* (**Fig.8**). É caracterizado por um polimorfismo (c.100C>T) numa região rica em prolina no terminal NH₂ da proteína e altamente conservada entre os CYP450s (Zanger *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2007; Zhou, 2009). Deste modo, a variante alélica de c.100C>T, provoca a alteração do aminoácido prolina para serina na posição 34, distinguindo-a do haplótipo selvagem, *CYP2D6*1*. Esta alteração resulta numa proteína instável, porque a prolina é responsável pela ligação entre a zona hidrofóbica da membrana e a região do grupo heme da enzima (Zanger *et al.*, 2004; Zhou, 2009). Yu *et al.*, (2001) demonstraram que, neste haplótipo, *CYP2D6*10*, seja para indivíduos homozigóticos

ou heterozigóticos para a alteração c.100C>T, há redução dos níveis de CYP450, mas também pode observar-se actividade residual da enzima, ou seja, são fenotipicamente os indivíduos são IM. Deste modo, sujeitos com o genótipo *CYP2D6**10/*10 ou *CYP2D6**10/*nulo, apresentam uma menor actividade catalítica (Zanger *et al.*, 2004; Sakuyama *et al.*, 2008). Este haplótipo é característico por esta alteração. No entanto, também está associado às variações c.1457G>C e c.408G>C (Zhou, 2009).

Nos Caucasianos e Afro-Americanos a alteração c.100C>T tem uma frequência de 2%-5% e é responsável por 10 a 20% dos indivíduos com fenótipo IM. Nas populações orientais, a frequência deste alelo é superior a 50% (Dorado *et al.*, 2005; Sakuyama *et al.*, 2008; Zanger *et al.*, 2004; Zhou, 2009).

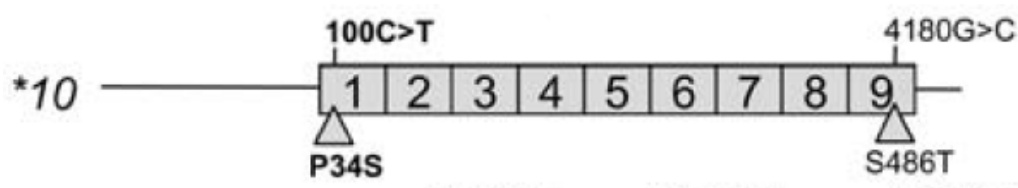


Figura 8. Haplótipo *CYP2D6**10 (Adaptado de: Zanger *et al.*, 2004). (Legenda: 4180G>C = c.1457C>G)

1.8.3.3 *CYP2D6**2E

Foi demonstrado através de estudos funcionais, que não há diferenças significativas para as variantes alélicas *CYP2D6**2, *17x2, *27, *35, *39, *41x2 e *48, em relação ao haplótipo tipo *wild type*, conferindo, deste modo, um fenótipo EM. O mesmo foi observado para vários subtipos da variante *CYP2D6**2 (**Fig.9**) como é exemplo a sub-variante *CYP2D6**2E (Zhou, 2009).

A variante *CYP2D6**2E é representada por vários *SNPs*; c.294C>G, 886T>C, 408C>G e 1457C>G.

Deste modo, indivíduos *CYP2D6*2E/*2E* exibem uma actividade metabólica semelhante ao tipo *wild-type*.

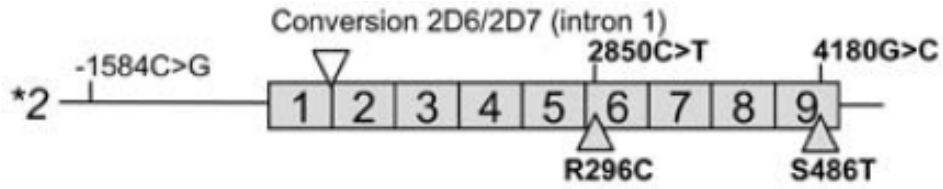


Figura 9. Haplótipo *CYP2D6*2* (Adaptado de: Zanger *et al.*, 2004). (Legenda: 2850C>T = c.886C>T; 4180G>C = c.1457C>G)

Objectivos

O objectivo principal do presente trabalho é a análise de variações genéticas associada ao gene *CYP2D6* numa população de mulheres sujeitas a analgesia com morfina após o trabalho de parto por cesariana e a sua correlação com o alívio da dor e efeitos secundários associados.

Pretende-se:

- (1) Determinar a frequência de variantes genéticas e haplótipos que modulam a actividade metabólica da enzima *CYP2D6* e análise farmacogenómica dos resultados, de modo a estudar a acção do referido fármaco, de acordo com o perfil genético;
- (2) Analisar a eficácia no alívio da dor nos diferentes grupos genéticos;
- (3) A influência no surgimento de efeitos secundários no pós-operatório, nomeadamente, o prurido, com correlação genética.

2. Amostragem e Metodologia

2.1 Amostragem

Para a realização do presente projecto usou-se DNA, obtido a partir de linfócitos de 51 mulheres sujeitas a cesariana, previamente extraído no LBG (CNC/UC).

Neste estudo usaram-se sempre placas com soluções de DNA diluídas, de modo a preservar a solução *stock*. Só assim é possível garantir o controlo da disponibilidade de DNA de cada amostra e evitar contaminações que possam colocar em risco o trabalho.

A amostragem de estudo inclui 51 parturientes com idades compreendidas entre os 21 e 42 anos (média 32 anos). As semanas de gestação variam entre as 34 semanas e as 41 semanas (média 38 semanas). Todas as mulheres são de etnia caucasiana. Foram excluídas duas mulheres de etnia Africana, devido ao facto do perfil metabólico variar consoante a etnia, como referido anteriormente (introdução).

Todas as mulheres foram seguidas nos Hospitais da Universidade de Coimbra e sujeitas a tratamento com morfina (2,5) para analgesia após o trabalho de parto por cesariana.

No pós-operatório foram avaliados vários parâmetros, nomeadamente a dor e efeitos secundários do tratamento analgésico, incluindo o prurido, vómito e náuseas. Foi usada uma escala crescente de 0 a 10. A primeira avaliação da dor foi medida imediatamente antes da administração da morfina (2,6 mg) por via epidural e na reavaliação foi feita após 4, 8 e 12 horas. Os restantes parâmetros foram avaliados simultaneamente. Contudo, as náuseas e vómitos não são abordados neste estudo porque foi administrado às parturientes um fármaco para o controlo desses sintomas.

O consentimento informado foi obtido para todas as mulheres que participaram no estudo, que foi aprovado pela Comissão de Ética dos Hospitais da Universidade de Coimbra (Projecto nº HUC-41-09).

2.2 Metodologia

2.2.1 Análise do gene *CYP2D6* por PCR

A sequência do gene foi obtida nas bases de dados habituais (p.e. NCBI) e os *primers* foram desenhados recorrendo ao *software Primer3*[®]. Foram também usados os *primers* descritos por Dorado *et al.* (2005).

A nomenclatura seguida para todas as variações de sequência foi a descrita por Dunnen & Antonarakis (2001).

A análise experimental teve início com a amplificação do DNA por PCR. A reacção da polimerase em cadeia (PCR) foi descrita por Kary Mullis em 1986, o que lhe garantiu o Prémio Nobel da Química em 1993.

Esta técnica baseia-se na amplificação exponencial selectiva de uma pequena quantidade de DNA, conferindo a grande vantagem de a partir de uma única cadeia de DNA, se obterem multiplicas cópias (Regateiro, 2007). Actualmente, é uma técnica indispensável na área da Genética Molecular.

Para a realização da PCR é necessário:

- A cadeia molde, que contem a região a amplificar;
- DNA polimerase;
- *Primers*, que consistem numa sequência de oligonucleótidos (20 a 30 bases) complementares à cadeia molde de DNA, delimitando assim, a zona pretendida de amplificação;
- Desoxinucleótidos (dNTPs; N=adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T));
- Tampão, de modo a proporcionar o meio adequado para o funcionamento da enzima (pH = 8).

- $MgCl_2$ que funciona como otimizador da condição da reacção, influenciando a sua especificidade ao aumentar substancialmente a estabilidade da enzima e da cadeia de DNA.

Após juntar todos estes componentes numa *mix* juntamente com as amostras e água, realiza-se um programa de PCR num termociclador, uma série de 20 a 35 ciclos em que cada ciclo consiste em 3 fases com diferentes temperaturas (**Fig 10**):

- Desnaturação – desnaturação das cadeias duplas de DNA. Ocorre a uma temperatura elevada ($95^{\circ}C$), para que haja clivagem das ligações de hidrogénio entre as bases das cadeias.
- *Annealing* – reconhecimento e ligação dos *primers* às sequências complementares.
- Extensão – após a ligação dos *primers*, a DNA polimerase sintetiza uma nova cadeia de DNA através da adição de dNTPs. As novas cadeias são formadas no sentido 5' para 3'.

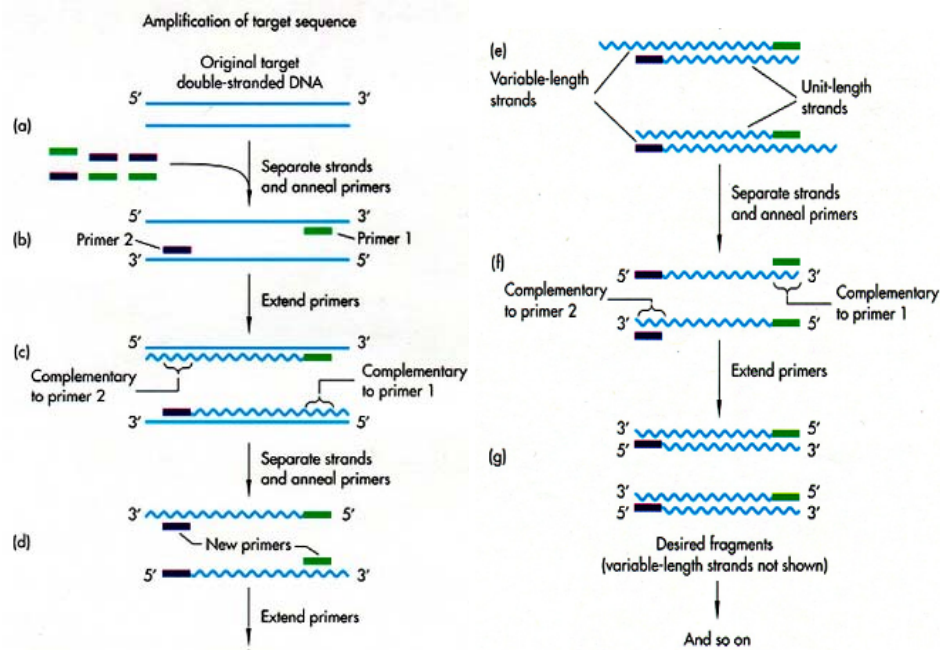


Figura 10. Esquema da reacção de PCR, representando as fases mais importantes da reacção, (a) desnaturação da dupla cadeia de DNA, (b) ligação dos *primers* à sequência complementar (c) acção da DNA polimerase, (d) extensão da cadeia, (d, f e g) repetição do processo *n* vezes (Adaptado de: Griffiths *et al.*, 2006).

No presente trabalho, foi usado um programa de PCR com 35 ciclos (95°C, 55-65°C, 72°C) para amplificar um fragmento de 6941pb

2.2.2 Electroforese de DNA em gel de agarose

A electroforese é uma técnica de separação de moléculas com carga, sob a influência de um campo eléctrico.

Para detectar a presença de DNA do produto de PCR é feita uma electroforese em gel de agarose (Griffiths *et al.*, 2006).

Moléculas lineares de DNA são colocadas nos poço do gel de agarose (preparado previamente) e este é inserido numa tina contendo tampão, aplicando depois um campo eléctrico. Como as moléculas de DNA contêm carga negativa, devido ao

grupo fosfato, os fragmentos migram para o ânodo (pólo positivo) de acordo com o peso molecular. O tampão da tina tem de estar a um pH=8 para que não haja alteração da carga do DNA (Griffiths, *et al.*, 2006)

As bandas são visualizadas corando o DNA com brometo de etídeo, o que emite fluorescência a luz ultravioleta. O tamanho do fragmento é comparado com um marcador de pesos moleculares (Griffiths, *et al.*, 2006).

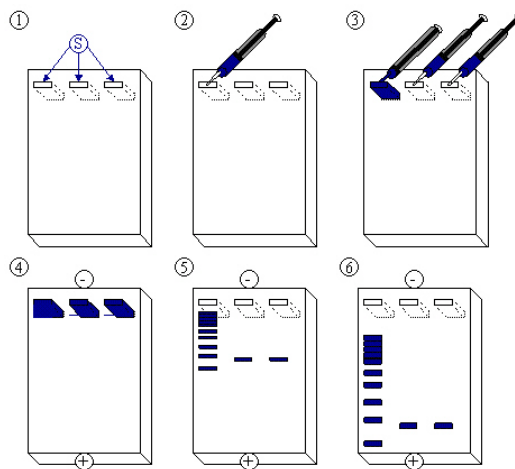


Figura 11. Representação esquemática da electroforese. (1) Gel de agarose com três poços; (2) Pipetagem do marcador de padrão de pesos moleculares; (3) Pipetagem das amostras com DNA e loading buffer nos restantes poços; (4) Aplicação de uma corrente eléctrica de modo a provocar migração do DNA para o pólo positivo; (5 e 6) Migração das cadeias de DNA consoante peso molecular, em que as maiores migram mais lentamente (Adaptado de: http://genetica.ufcspa.edu.br/biomedic/conteudo/genetica_molecular/eletroforese.pdf)

No presente trabalho, a separação por electroforese foi realizada em géis de agarose a 0,7%, em TBE 1x.

2.2.3 Registo imagiológico dos resultados

Após realizada a electroforese os resultados são observados sob radiação ultravioleta e registadas as fotografias.

2.2.4 Purificação dos produtos da PCR

Quando a reacção de PCR está concluída e após verificar se houve amplificação das amostras, os dNTPs e os *primers* livres na mistura devem ser removidos para que não haja interferência com os processos subsequentes.

Nesse sentido recorreu-se à *ExoSAP-IT*[®], que consistem uma combinação de duas enzimas hidrolíticas: a *Exonuclease 1* e a *Shrimp Alkaline Phosphatase, Recombinant* (rSAP). Ambas estão juntas numa solução especialmente formulada para remover dNTPs e *primers* livres a partir de produtos de PCR. A exonuclease 1 remove os *primers* residuais e cadeia únicas de DNA em excesso e a segunda enzima remove os restastes dNTPs (**Fig. 12**)

Este método é vantajoso devido à sua simplicidade, pouca morosidade e por permitir a purificação de várias amostras ao mesmo tempo.

São adicionados 4µl *ExoSAP-IT*[®] de a cada amostra de produto de PCR amplificado.

2.2.5 PCR de sequenciação

De seguida efectua-se uma PCR de sequenciação com os *primers* específicos (Dorado *et al.*, 2005) para detecção das variações de sequências existentes, incluindo as que estão associadas a fenótipos de metabolização (haplótipos) (**Tab.I**)

Tabela I. Descrição dos *SNP* presente nos haplótipos *CYP2D6*4A*, *CYP2D6*10A* e *CYP2D6*2E*. PM – metabolizador lento; IM – metabolizador intermédio; EM – metabolizador extensivo.

Variação de sequência	<i>CYP2D6*4A</i> (PM)	<i>CYP2D6*10A</i> (IM)	<i>CYP2D6*2E</i> (EM)
rs#1065852 (c.100C>T)	✓	✓	
rs#28371703 (c.271C>A)	✓		
rs#28371704 (c.281A>G)	✓		
rs#28371705 (c.294C>G)	✓		✓
rs#3892097 (IVS3-1G>A)	✓		
rs#1135840 (c.1457C>G)	✓	✓	✓
rs#1058164 (c.408C>G)	✓	✓	✓
rs#16947 (c.886T>C)			✓

Ao longo da reacção vão sendo adicionados, sucessivamente, dNTPs complementares à cadeia de DNA através de ligações fosfo-di-éster. No entanto, quando um ddNTP é adicionado à cadeia, aleatoriamente, a reacção pára porque não é formada uma ligação fosfodiéster, ou seja, a extensão do *primer* pára. Deste modo, formam-se fragmentos de diversos comprimentos (Regateiro, 2007). A particularidade dos ddNTPs é que estes estão marcados com fluorocromos específicos para cada nucleótido.

2.2.6 Purificação pelo método do etanol

De seguida, procede-se à purificação dos produtos de PCR de sequenciação, com objectivo remover o excesso de *primers*, com etanol.

2.2.7 Sequenciação automática

A sequenciação automática permite determinar a ordem pela qual as bases se encontram num um fragmento de DNA. Este procedimento baseia-se num método enzimático desenvolvido por Sanger, em 1977.

É um método de natureza enzimática em que a partir de um *primer* e da enzima DNA polimerase há extensão do fragmento. Nesta reacção, além dos desoxi-nucleótidos (dNTPs) são adicionados à reacção di-desoxinucleótidos (ddNTPs).

No sequenciador automático, um feixe laser incide nos fragmentos e ocorre emissão de fluorescência, com um determinado comprimento de onda, em função do fluorocromo. Cada nucleótido é, assim, identificado pela fluorescência que emite (Regateiro, 2007) e o *software* cria um electroferograma com o resultando, permitindo determinar a ordem pela qual se encontram no fragmento de DNA original.

No presente estudo as amostras foram sequenciadas num sequenciador automático, *ABI 3130 (Applied Biosystems)*.

2.2.8 Análise de Sequências e análise *in silico*

Para a análise das sequências obtidas, recorre-se *software SeqScape v.2.1 (Applied Biosystems)*, por comparação com a sequência de referência, permitindo identificar, de um modo eficaz, qualquer alteração na sequência de DNA existente na amostra.

Para o estudo das variações de sequência encontradas na região codificante, que poderão ter impacto na estrutura e função da proteína e para o estudo da conservação evolutiva, recorreu-se ao *software PolyPhen-2[®] (Adzhubei et al., 2010)*.

Para as alterações encontradas na região não codificante, que poderão influenciar o local de *splicing* do gene, recorreu-se ao *software SplicePort[®] (Dogan et al. 2007)*.,

2.2.9 PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Para a genotipagem do polimorfismo rs#1065852 (c.100C>T), foi realizado uma análise de restrição (*PCR-RFLP*) para confirmação de resultados.

É necessário proceder a uma nova reacção de PCR (Nested-PCR) de modo a obter a amplificação de um fragmento de DNA mais pequeno, recorrendo ao uso dos *primers* descritos por Dorado *et al.*, 2005. Assim, a partir de um produto de PCR de amplificação de 6941 pares de bases (pb) obteve-se um fragmento amplificado de 241pb, que foi sujeito a digestão enzimática com *ScaI* a 37°C.

A enzima reconhece a variante T, sendo produzidos dois fragmentos (206 e 35 pb). Os resultados são visualizados por electroforese.

2.2.10 Análise de SNPs por PCR em tempo real

Pela técnica de PCR em Tempo Real, a variações de sequência específicas (IVS3-1G>A, c.100C>T e c.294C>G), com o objectivo de ter um método adicional de genotipagem, dadas as dificuldades na análise dos genes *CYPs*.

Esta técnica tira partido da actividade 5'-exonuclease da *Taq* polimerase e da construção de sondas que emitem fluorescência apenas quando hidrolizadas. Este tipo de sondas é designado por *TaqMan*® e são constituídas por um oligonucleótido que possui um fluoróforo *reporter* ligado à extremidade 5' e um fluoróforo *quencher* ligado a extremidade 3' (**Fig.12**).

Recorreu-se a sondas específicas *TaqMan*® disponíveis comercialmente (*Applied Biosystems*), para os polimorfismos em estudo. Cada sonda, específica para um determinado *SNP*, detecta a substituição de bases nucleotídicas por emissão de fluorescência. Assim, no caso de homozigóticos só haverá hibridização de uma das sondas e no caso de heterozigóticos existirá a hibridização das duas sondas.

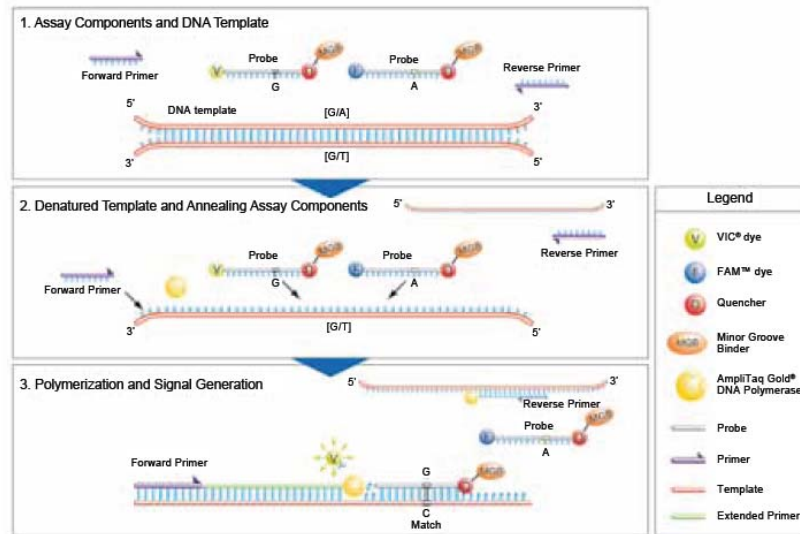


Figura 12. Reconhecimento específico de alelos pelas sondas *TaqMan*[®] (Fonte: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040597.pdf).

2.2.11 Análise estatística

A análise estatística dos resultados da análise genética e correlação com os dados clínicos foi realizada recorrendo aos testes exacto de Fisher e Qui², usando tabelas de contingência. Foi também realizada a análise por ANOVA (de uma via), seguida de um teste de Tukey. Para tal, recorreu-se ao programa *GraphPAD Prism v.5*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Análise de variações de sequência por sequenciação automática

A amostragem foi genotipada, por sequenciação automática, para os 9 exões, do gene *CYP2D6*, separadamente. Através deste método, foi possível a identificação de 26 alterações de sequência, todas descritas previamente (rs#).

Na tabela seguinte apresenta-se as alterações exónicas e intrónicas identificadas na análise da sequenciação com a respectiva localização para as duas isoformas do gene (**Tab.II**).

A análise de previsão da alteração estrutura/função da proteína para as alterações de aminoácido foi realizada com o recurso ao *software Polyphen-2*[®] (**Tab.III**). as análises das alterações intrónicas, de modo a verificar se estas alteravam o local de *splicing* foi realizada utilizando o *software SplicePort*[®].

A terceira isoforma do gene não foi analisada em detalhe porque, o seu mRNA sofre um processo de *nonsense mediated decay* (degradação prematura do mRNA) prevendo-se que não ocorra a tradução.

Tabela II. Resumo das características de todos os *SNPs* encontrados no gene *CYP2D6* e a sua localização para as duas isoformas, isoforma 1 (9 exões) e isoforma 2 (8 exões).

Nº de amostras sequenciadas	rs#	Nº de homozigóticos <i>wild type</i>	Nº de heterozigóticos	Nº de homozigóticos variantes	Isoforma 1	Isoforma 2
50	769258	45	5	0	c.31G>A (exão 1)	c.31G>A (exão1)
50	1065852	30	15	5	c.100C>T (exão1)	c.100C>T (exão1)
37	1080995	5	15	17	IVS1+34 C>G (intrão1)	IVS1+34 C>G (intrão1)
37	1080996	5	15	17	IVS1+41A>C (intrão1)	IVS1+41A>C (intrão1)
37	74644586	5	15	17	IVS1+43G>C (intrão1)	IVS1+43G>C (intrão1)
36	76312385	5	14	17	IVS1+47 C>T (intrão1)	IVS1+47 C>T (intrão1)
34	75276289	5	13	16	IVS1+52C>G (intrão1)	IVS1+52C>G (intrão1)
34	28695233	5	13	16	IVS1+53 C>A (intrão1)	IVS1+53 C>A (intrão1)
34	56011157	5	13	16	IVS1+65G>C (intrão1)	IVS1+65G>C (intrão1)
44	2871701	15	22	7	IVS1-138 G>C (intrão1)	IVS1-138 G>C (intrão1)
44	71328650	15	22	7	IVS1-40G>T (intrão1)	IVS1-40G>T (intrão1)
47	28371703	29	16	2	c.271C>A (exão 2)	c.271C>A (exão 2)
47	28371704	29	16	2	c.281A>G (exão 2)	c.281A>G (exão 2)
47	28371705	29	16	2	c.294C>G (exão 2)	c.294C>G (exão 2)
44	28371706	43	1	0	c.320C>T (exão 2)	c.320C>T (exão 2)
44	1081003	43	1	0	c.336C>T (exão 2)	c.336C>T (exão 2)
41	1058164	12	16	13	c.408C>G (exão 3)	IVS3-186C>G (intrão 2)
32	78482768	31	1	0	c.451C>G (exão 3)	IVS3-143C>G (intrão 2)
47	3892097	27	16	4	IVS3-1G>A (intrão 3)	IVS4-1G>A (intrão 2)
27	5030866	26	1	0	c.635G>A (exão 4)	c.504G>A (exão 3)
39	16947	4	22	13	c.886T>C (exão 6)	c.733T>C (exão 5)
19	61736517	18	1	0	c.1055A>G (exão 7)	c.902A>G (exão 6)
19	283510588	18	1	0	c.1064A>C (exão 7)	c.911A>C (exão 6)
17	1985842	10	6	1	IVS7+40C>A (intrão 7)	IVS6+40C>A (intrão 6)
10	4987144	4	2	4	IVS7-9T>C (intrão 7)	IVS6-9T>C (intrão 6)
36	1135840	15	14	7	c.1457C>G (exão 9)	c.1304C>G (exão 8)

Nota: O retângulo laranja assinala as variações de sequência associadas aos haplótipos relacionados com fenótipos de metabolização.

Verificam-se 10 diferenças na localização das variações de sequência entre as duas isoformas. A partir do rs#1058164 até ao rs#1135840, devido à falta do terceiro exão na segunda isoforma.

Nenhuma das alterações intrónicas altera o local de *splicing*, excepto a alteração IVS3-1G>A (rs3892097) que altera o terceiro local de *splicing* para ambas as isoformas.

Tabela III. Análise *in silico* para as variações de sequência que causam alteração de aminoácidos na proteína CYP2D6 para as isoformas 1 e 2.

rs#	Alteração de aa	Conservação evolutiva	Tipo de mutação	Análise <i>in silico</i> de patogenicidade	
				Isoforma 1	Isoforma 2
769258	V - M	n.d.	Missense	Benigna	Benigna
1065852	P - S	Sim	Missense	Benigna	Benigna
28371703	L - M	Sim	Missense	Benigna	Benigna
28371704	H - R	Não	Missense	Benigna	Benigna
28371706	T - I	Não	Missense	Benigna	Benigna
78482768	Q - E	Sim	Missense	Benigna	—
5030866	G - E	Não	Missense	Benigna	Benigna
16947	C - R	Não	Missense	Benigna	Benigna
61736517	H - R	Não	Missense	Benigna	Benigna
28510588	Y - C	Sim	Missense	Provavelmente maligna	n.d
1135840	T - S	Não	Missense	Benigna	Benigna

Legenda: V – valina; M – metionina; P – prolina, S – serina; L – leucina; H – histidina, R – arginina; T – treonina; I – isoleucina; G – glicina; Q – glutamina; E – glutamato; C – cisteína; Y – Tirosina; n.d. – não definido.

Nota: A alteração rs#28510588 esteve anteriormente descrita como variação de sequência, mas neste momento não consta das bases de dados como um *SNP*.

A análise de conservação evolutiva, que inclui 11 espécies (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Pan paniscus*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Caenorhabditi elegans* e *Drosophila melanogaster*) mostrou que para as alterações rs#1065852, rs#28371703, rs#78482768 e rs#28510588 a aminoácido nestas posições é conservado, ou seja, uma variação de sequência poderá ter um maior impacto na proteína.

Dado que os estudos disponíveis têm com a referência a isoforma 1 do gene *CYP2D6*, todos os resultados são apresentados de seguida, seguem a nomenclatura relativamente à isoforma 1.

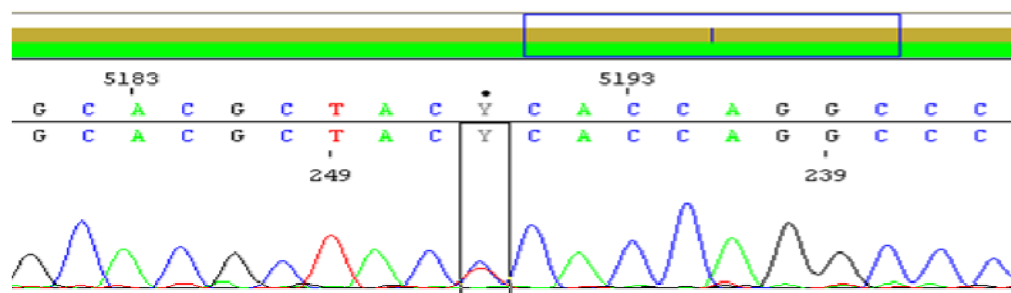


Figura 13. Exemplo de um electroferograma, que representa uma parte da sequência do exão 1 do gene *CYP2D6*, onde está indicado, uma alteração de sequência, rs#1065852 (c.100C>T), em heterozigotia.

3.2 Análise do rs#1065852 por PCR-RFLP

Todos os genótipos das amostras sequenciadas para a alteração c.100C>T (rs#1065852) foram confirmados por este método. A **figura 14** representa um exemplo dos resultados obtidos.

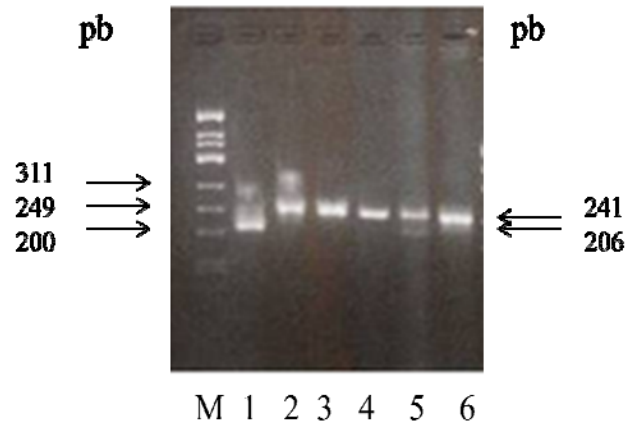


Figura 14. Resultado do *PCR-RFLP* com os três genótipos possíveis para o rs#1065852 (c.100C>T). M: Marcador de pesos moleculares; 1: Homozigótico TT; 2,3,4, 6: Homozigótico CC; 5: heterozigótico CT.

3.3 Análise das variações de sequências dos haplótipos por *PCR* em tempo real

O estudo das amostras por *PCR* em tempo real das variações de sequência (rs#3892097, rs#1065852, rs#28371705 e rs#1135840) permitiu confirmar os resultados da sequência automática e analisar as amostras em que não foi possível realizar a sequenciação automática. Na **figura 15** encontra-se um gráfico representativo de um resultado.

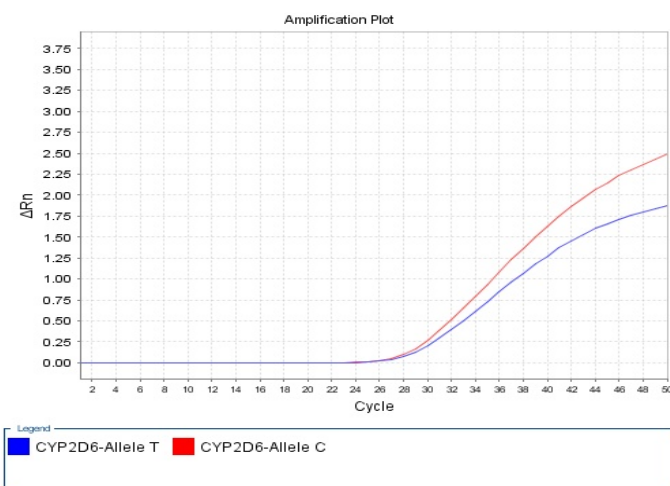


Figura 15. Gráfico de *PCR* em tempo real que representa o resultado de análise de uma amostra para um indivíduo heterozigótico para o rs#1065852 (c.100C>T). A curva azul representa o alelo Timina (T) e a curva vermelha o alelo Citosina (C).

3.4 Estudos dos haplótipos *CYP2D6*4A*, *CYP2D6*10A* e *CYP2D6*2E*

Como foi possível verificar que os 3 métodos eram concordantes (Sequenciação automática, *PCR-RFLP* e *PCR* em tempo real), nas amostras em que não se obteve resultado por sequenciação automática, foram considerados os resultados dos outros dois métodos para as variações de sequência ((rs#3892097, rs#1065852, rs#28371705 e rs#1135840).

Um dos objectivos principais do presente estudo, era analisar ao pormenor os haplótipos *CYP2D6*4A*, *CYP2D6*10A* e *CYP2D6*2E* para a amostragem em estudo.

Cada haplótipo está associado a um conjunto de *SNPs* e a um determinado perfil metabólico (PM, IM e EM), como descrito anteriormente no capítulo do métodos (**Tab.I**).

As alterações c.1459C>G (rs#1135840) e c.408C>G (rs#1058164) são comuns aos três haplótipos, ou seja, são consideradas menos específicas. Enquanto outros são mais específicos para cada haplótipo tendo, assim, uma maior relevância funcional.

De acordo com a literatura, ao haplótipo *CYP2D6*4A* está associada a alteração IVS4-1G>A, ao *CYP2D6*10A* a alteração c.100C>T e ao *CYP2D6*2E* a alteração c.294C>G, tendo estas alterações uma maior importância no presente estudo.

Para cada variação de sequência em estudo foi analisada a frequência genotípica e alélica (**Tab.IV**) e verificou-se que todos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Tabela IV. Frequência genotípica e alélica para as variações de sequência em estudo.

	Frequência genotípica			Frequência alélica		Nº de indivíduos
	CC	CT	TT	C	T	
rs#1065852 (c.100C>T)	0,59	0,31	0,10	0,75	0,25	51
rs#28371703 (c.271>A)	0,60	0,36	0,04	0,78	0,22	47
rs#28371704 (c.281A>G)	0,60	0,36	0,04	0,78	0,22	47
rs#28371705 (c.294C>G)	0,59	0,33	0,08	0,75	0,25	51
rs#3892097 (IVS3-1G>A)	0,57	0,35	0,08	0,75	0,25	51
rs#1135840 (c.1457C>G)	0,38	0,44	0,18	0,60	0,40	51
rs#1058164 (c.408C>G)	0,25	0,41	0,34	0,49	0,51	41
rs#16947 (c.886T>C)	0,11	0,61	0,28	0,38	0,62	39

3.5 Estudos de associação por genótipo e por alelo

3.5.1 Dor

Tendo em conta os 3 SNPs mais relevantes para cada haplótipo, foi analisado para cada uma delas a distribuição de genótipos e alelos de acordo com os *scores* da dor.

A amostragem, com o número total de indivíduos 51, foi dividida de acordo com dor inferior ou igual a 3 e dor superior a 3 (numa escala de 0 e 10 por ordem crescente de dor) para qualquer um dos tempos de medição após a administração da morfina.

Para a variação de sequência IVS3-1G>A, (rs#3892097), verificamos que há diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0163$) entre a frequência genotípica e a dor inferior ou igual a 3 ou superior a 3 (**Fig. 16a**), mas não para a frequência alélica (**Fig16b**), ($p = 0,2589$).

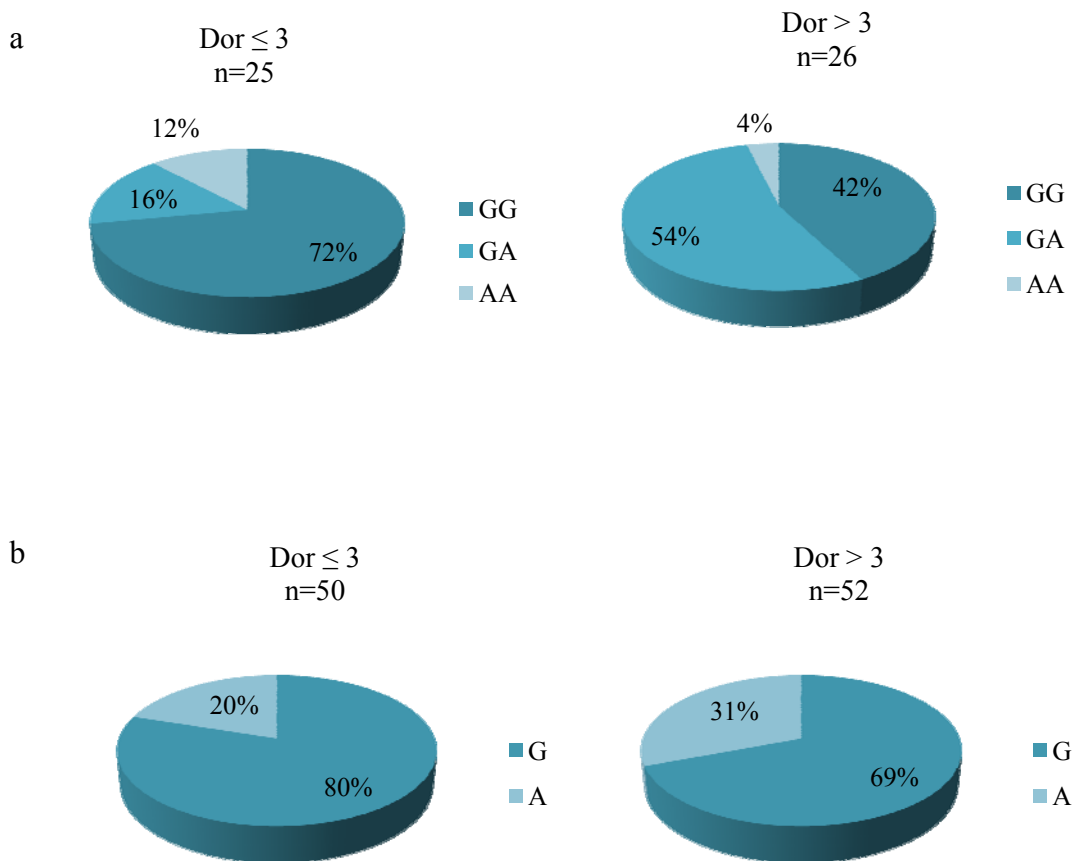


Figura 16. Representação gráfica da análise de associação da alteração IVS3-1G>A, (rs#3892097) e o parâmetro da dor. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a dor inferior ou igual a 3 ou superior a 3.

Para a variação de sequência c.100C>T, (rs#1065852), verificamos diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0099$) entre a frequência genotípica e a dor inferior ou igual a 3 ou superior a 3 (**Fig.17a**), mas não se verificou para a frequência alélica (**Fig.17b**), ($p = 0,4989$).

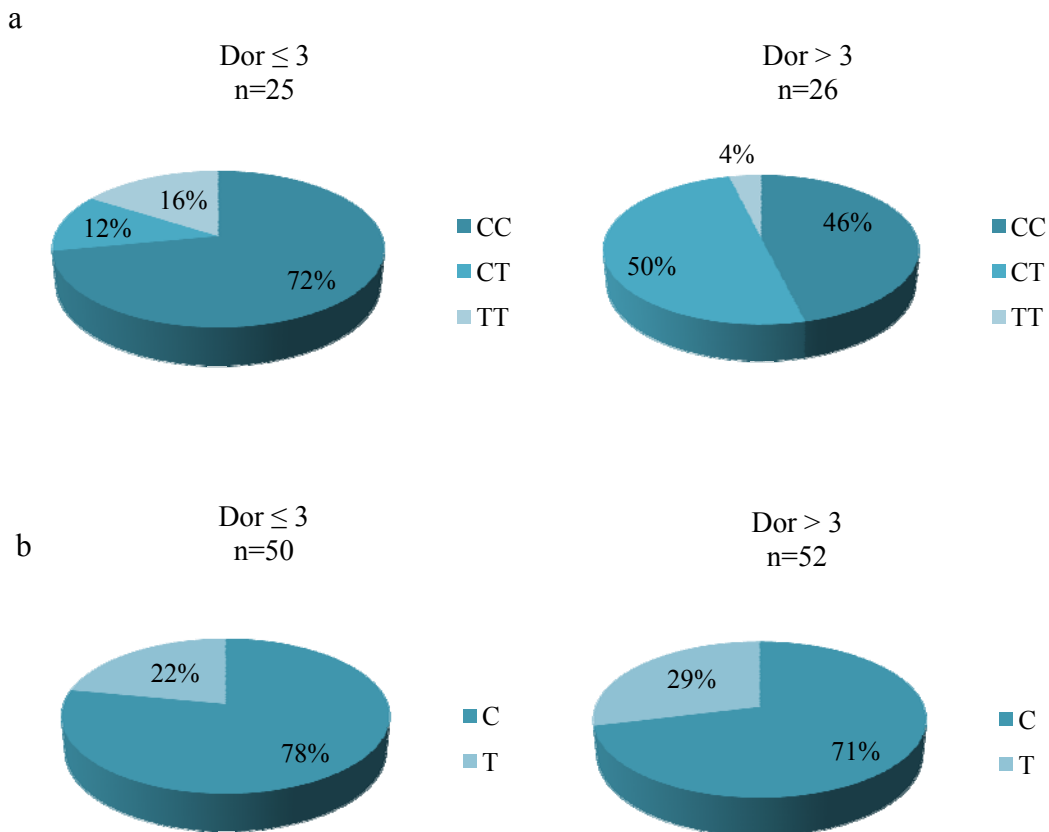


Figura 17. Representação gráfica da análise de associação da alteração c.100C>T, (rs#1065852) e o parâmetro da dor. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a dor inferior ou igual a 3 ou superior a 3.

Para a variação de sequência c.294C>G, (rs#28371705), verificamos diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0310$) entre a frequência genotípica e a dor inferior ou igual a 3 ou superior a 3 (**Fig. 18a**), mas não se verificou para a frequência alélica (**Fig. 18b**), ($p = 0,3604$).

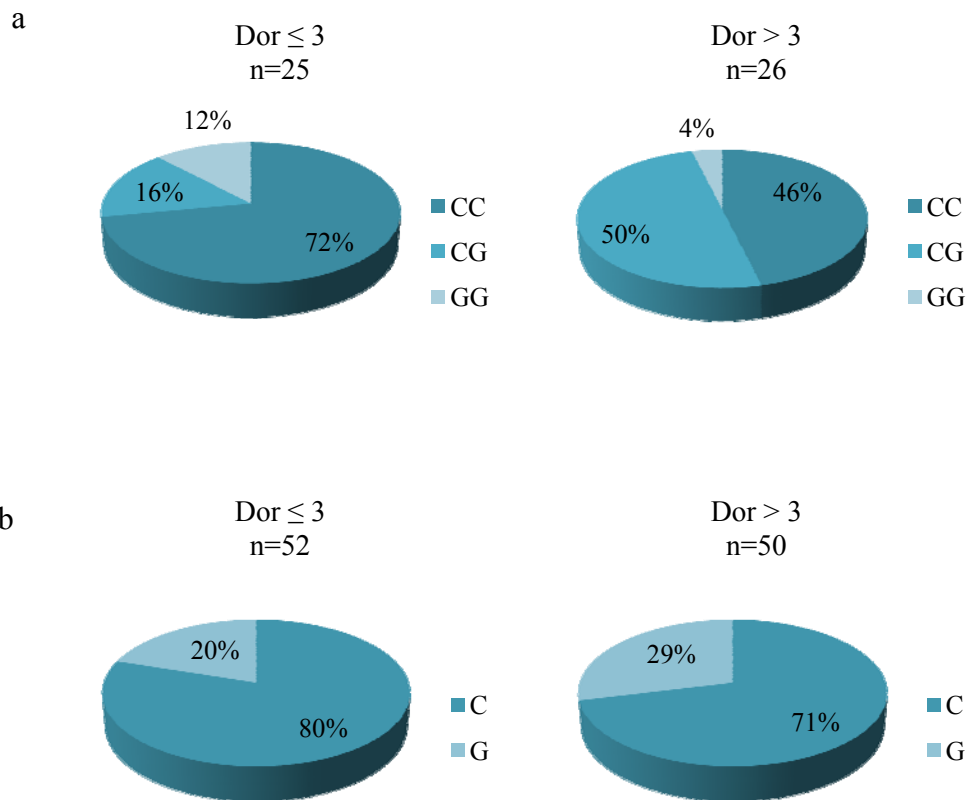


Figura 18. Representação gráfica da análise de associação da alteração c.294C>G, (rs#28371705) e o parâmetro da dor. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a dor inferior ou igual a 3 ou superior a 3.

3.5.2 Prurido

Tendo em conta, novamente os 3 *SNPs* específicos para cada haplotipo, foi analisado para cada um a distribuição genotípica e alélica de acordo com presença e ausência de prurido.

A amostragem, com o número total de indivíduos 51, foi dividida de acordo com prurido e sem prurido.

Para o polimorfismo IVS3-1G>A, (rs#3892097), não verificamos diferenças estatisticamente significativas entre a frequência genotípica (**Fig. 19a**) e alélica (**Fig. 19b**) com a presença/ausência de prurido, ($p = 0,1065$ e $p = 0,0531$, respectivamente).

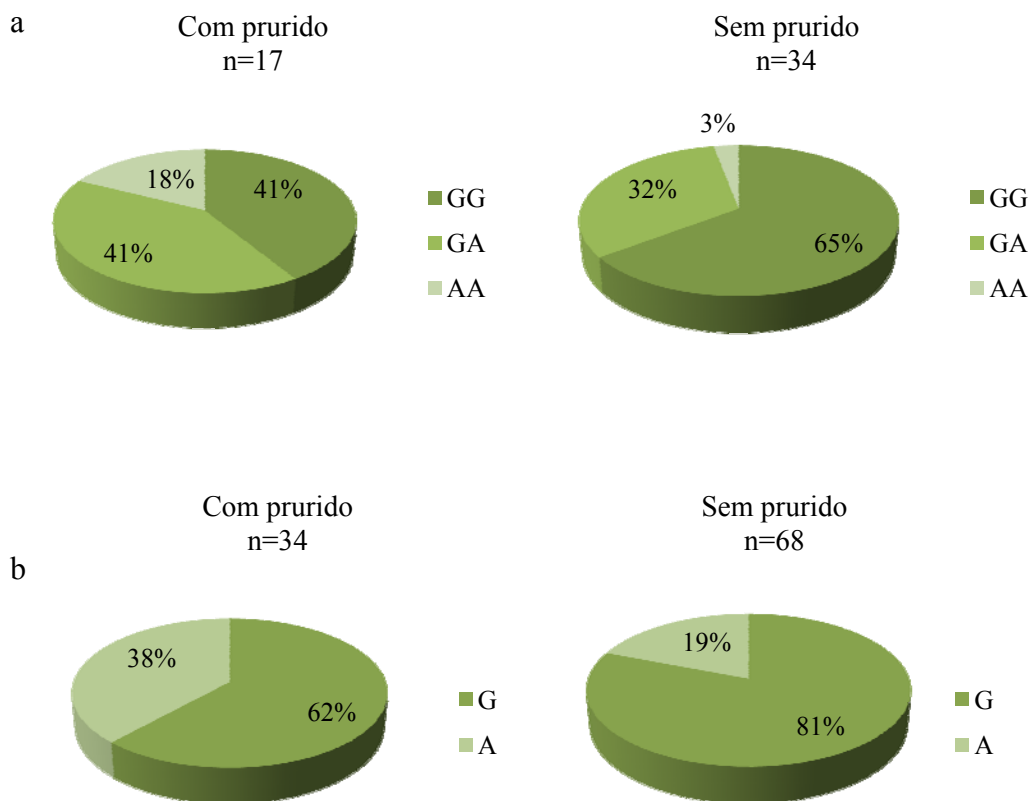


Figura 19. Representação gráfica da análise de associação da alteração IVS3-1G>A, (rs#3892097) e o parâmetro do prurido. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a presença *versus* ausência de prurido.

Para o polimorfismo c.100C>T, (rs#1065852), verificamos diferenças estatisticamente significativas entre a frequência genotípica (**Fig. 20a**) e alélica (**Fig. 20b**) e a presença/ausência de prurido, ($p = 0,0413$ e $p = 0,0154$, respectivamente).

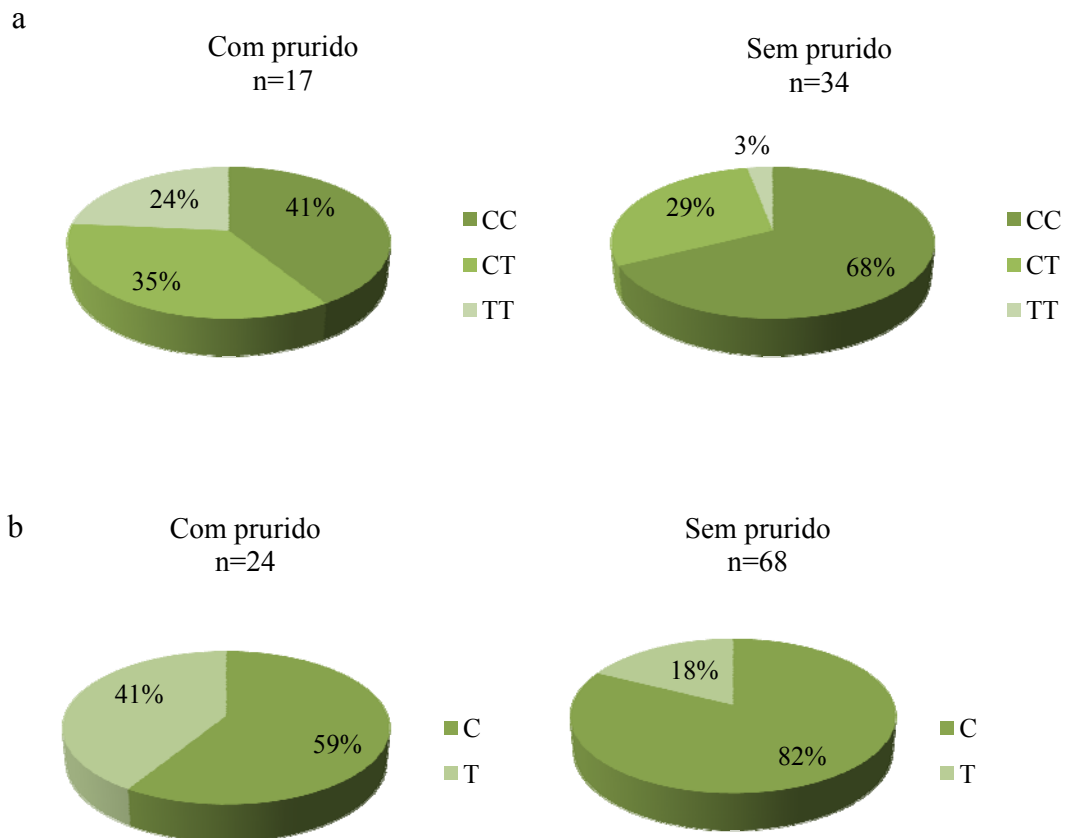


Figura 20. Representação gráfica da análise de associação da alteração c.100C>T, (rs#1065852) e o parâmetro do prurido. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a presença *versus* ausência de prurido.

Para o polimorfismo c.294C>G, (rs#28371705), não verificamos diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0843$) entre a frequência genotípica e a presença/ausência de prurido (**Fig. 21a**), mas verificamos para a frequência alélica (**Fig. 21b**), ($p = 0,0292$).

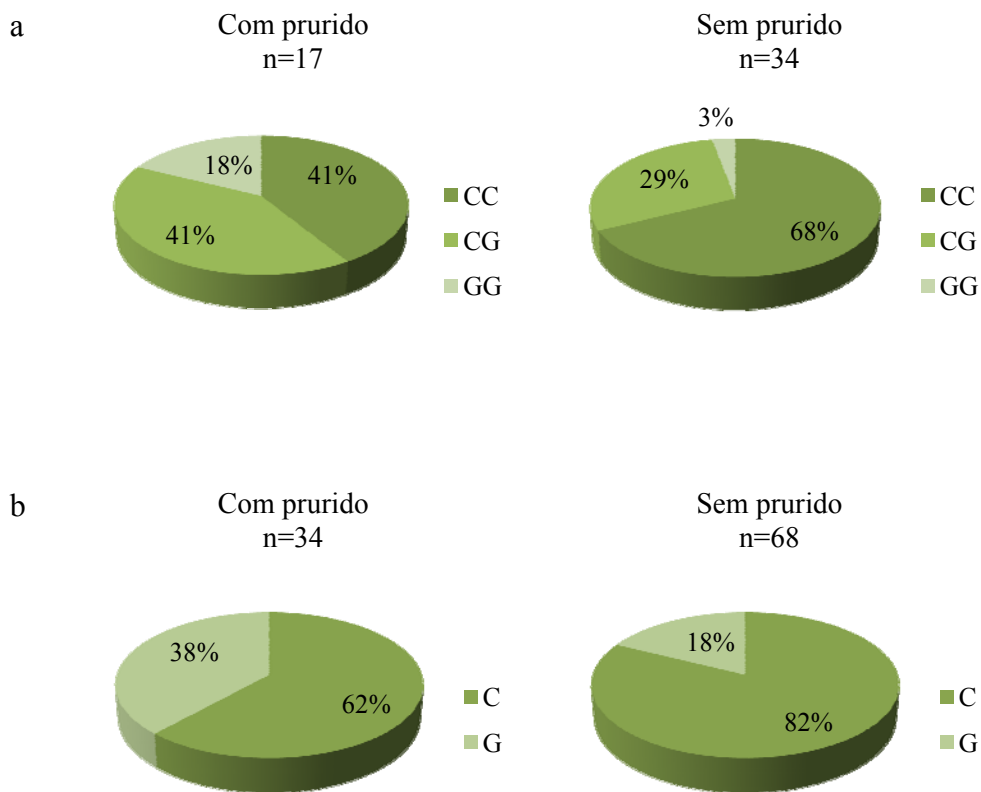


Figura 21. Representação gráfica da análise de associação da alteração c.294C>G, (rs#28371705) e o parâmetro do prurido. Relação entre a frequência genotípica (a) e alélica (b) e a presença *versus* ausência de prurido.

Tabela V. Resumo da análise estatística dos valores de p dos estudos de associação para as três variações de sequência em estudo, IVS3-1G>A, c.100C>T e c.294C>G, (rs#3892097, rs#1065852 e rs#28371705, respectivamente).

	rs#3892097 (IVS3-1G>A)		rs#1065852 (c.100C>T)		rs#28371705 (c.294C>G)	
	Genótipo	Alelo	Genótipo	Alelo	Genótipo	Alelo
Dor	0,0163	0,2589	0,0099	0,4989	0,031	0,3604
Prurido	0,1065	0,0531	0,0413	0,0154	0,0843	0,0292

3.5.3 Peso do Recém-nascido

Foi realizado um estudo de associação, para avaliar se havia diferenças significativas entre as três variações de sequência (IVS3-1G>A, c.100C>T e c.294C>G) identificadas na parturiente e o peso do recém-nascido.

A amostragem foi dividida tendo em conta os valores de referência para o peso dos recém-nascidos. Estes valores consistem no percentil 50 (P50) de 3,400Kg, isto é, o peso de 50% dos indivíduos estará acima e os restantes 50% abaixo. Outros valores de referência, são o percentil 5 (P5), em que 5% dos indivíduos estarão abaixo dos 2,600Kg e o percentil 95 (P95), em que 5% dos indivíduos pesarão mais de 4,200Kg ou 95% pesarão menos de 4,200Kg (**Tab.VI**).

A média do peso dos recém-nascidos para esta amostragem é de 3,063Kg.

Nesta análise o número total de indivíduos aumenta para 54 porque 3 das parturientes tiveram uma gravidez gemelar. Além disso, não houve distinção entre sexos porque os valores de referência são iguais para ambos.

Tabela VI. Número e percentagem de recém-nascidos por percentil.

	P < 50	P > 50	P 95	P 5
Número	40	14	2	10
Percentagem (%)	74	26	4	19

Legenda: P < 50 – 50% com menos de 3,400Kg; P > 50 – 50% com mais de 3,400Kg; P 95 -5% menos de 4,200kg; P5 – 5% menos de 2,600Kg.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,6681$) entre o peso do recém-nascido e o genótipo da parturiente para a variação de sequência IVS3-1G>A), (rs#3892097) (**Fig.22**).

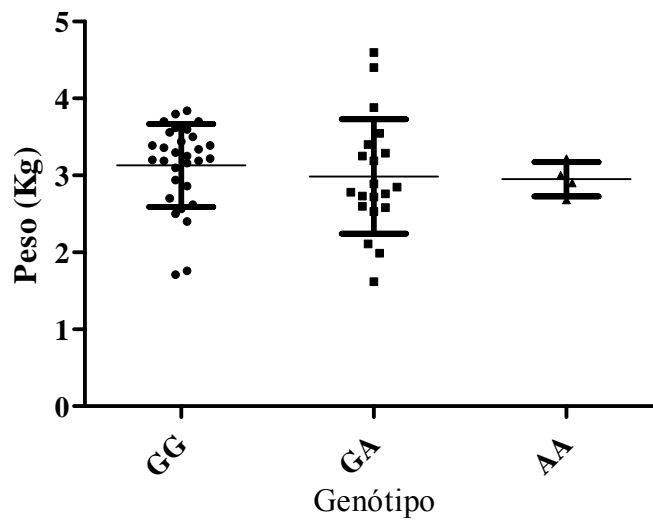


Figura 22. Relação do peso e o genótipo para a variação de sequência IVS3-1G>A, (rs#3892097). N=54 indivíduos (Genótipo GG: $3,13 \pm 0,54$; GA: $2,99 \pm 0,74$; AA: $2,95 \pm 0,22$).

Também foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,3726$) entre o peso do recém-nascido e o genótipo da parturiente para a variação de sequência c.100C>T, (rs#1065852) (**Fig.23**).

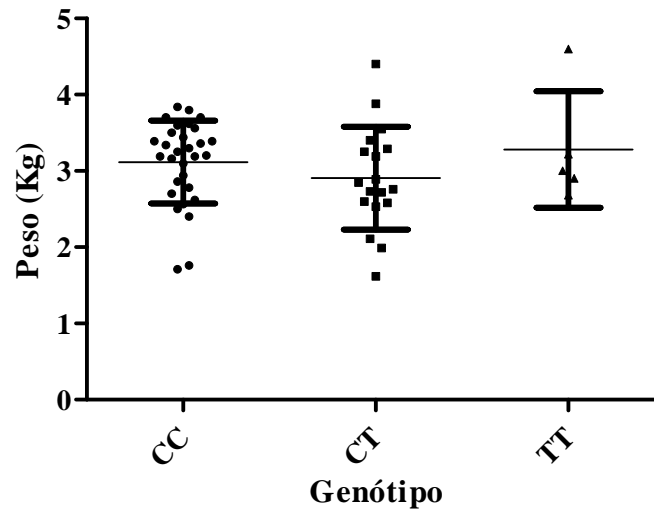


Figura 23. Relação do peso e o genótipo para a variação de sequência c.100C>T, (rs#1065852). N=54 indivíduos (Genótipo CC: $3,12 \pm 0,54$; CT: $2,91 \pm 0,67$; TT: $3,28 \pm 0,76$).

Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,7372$) entre o peso do recém nascido e o genótipo da parturiente para a variação de sequência c.294C>G, (rs#28371705) (**Fig.24**).

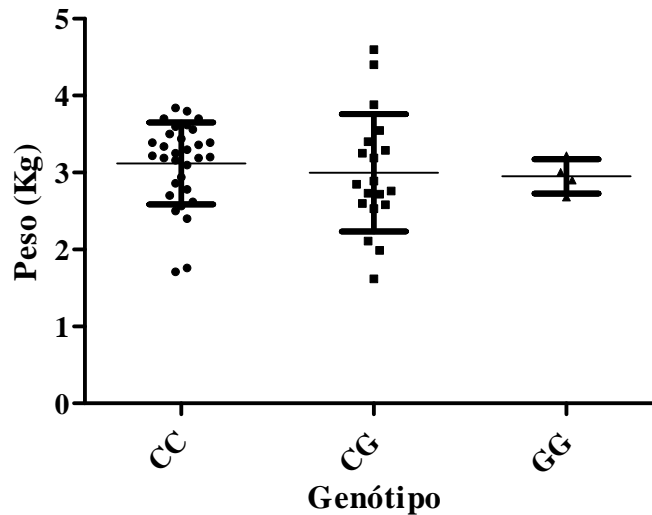


Figura 24. Relação do peso e o genótipo para a variação de sequência c.294C>G, (rs#28371705). N=54 indivíduos (Genótipo CC: $3,12 \pm 0,54$; CG: $2,99 \pm 0,76$; GG: $2,95 \pm 0,22$).

3.6 Perfil de metabolização

Os fenótipos para cada indivíduo da amostragem foram definidos pela genotipagem dos *SNPs* característicos de cada haplótipo representativo de um fenótipo de metabolização.

Segundo Zanger *et al.* (2004) e Zhou (2009), foram definidos os indivíduos PM como tendo genótipo homozigótico para o alelo menos comum na população ou em constelações de heterozigotia para o haplótipo *CYP2D6*4A*; indivíduos EM são os que apresentam homozigotia dominante para o *SNP* de relevância para o haplótipo EM; à exceção de uma amostra que apenas é heterozigótica para o *SNP* IVS3-1G>A e homozigótica para o alelo selvagem para os restantes *SNPs*, que foi considerada EM

tendo como base as definições nos estudos desenvolvidos por Sakuyama *et al.*(2008) e Correia *et al.* (2009) (**Tab.VII**).

Tabela VII. Número de indivíduos para cada perfil metabólico.

	PM	EM	Total
Nº de indivíduos	21	30	51

Legenda: PM – metabolizador lento; IM – metabolizador intermédio; EM – metabolizador extensivo

3.6.1 Dor

A amostragem, de 51 parturientes, foi classificada por fenótipo, de acordo com inferior ou igual a 3 e superior a 3: fenótipo PM - 7 indivíduos com dor ≤ 3 e 13 com dor > 3 ; fenótipo EM - 18 indivíduos com dor ≤ 3 e 12 com dor > 3 .

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,1482$) nesta análise (**Fig.25**).

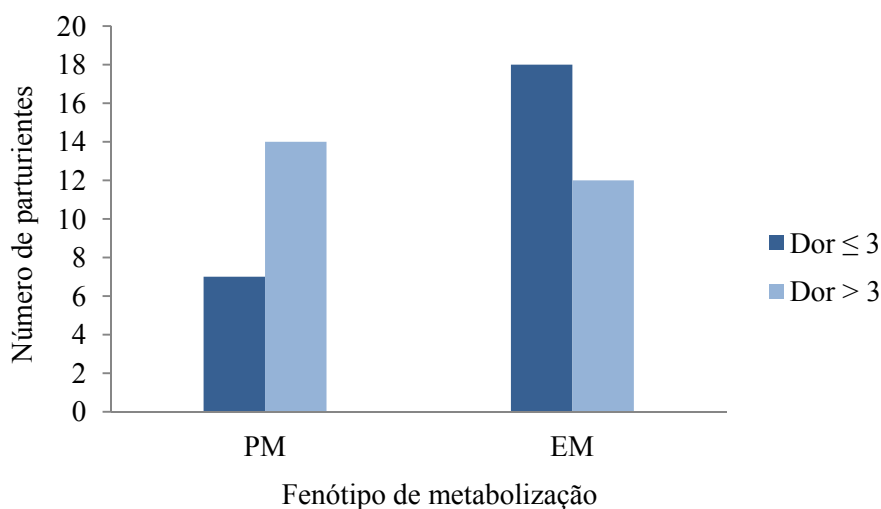


Figura 25. Número de indivíduos em cada fenótipo de metabolização, de acordo com o *score* de dor. PM – metabolizador lento (N=20); EM – metabolizador extensivo (N=31).

3.6.2 Prurido

A amostragem foi classificada de acordo com o fenótipo relativamente ao prurido: fenótipo PM - 10 indivíduos com prurido e 11 sem prurido; fenótipo EM - 7 indivíduos com prurido e 23 sem prurido.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, $p = 0,1301$

(Fig.26).

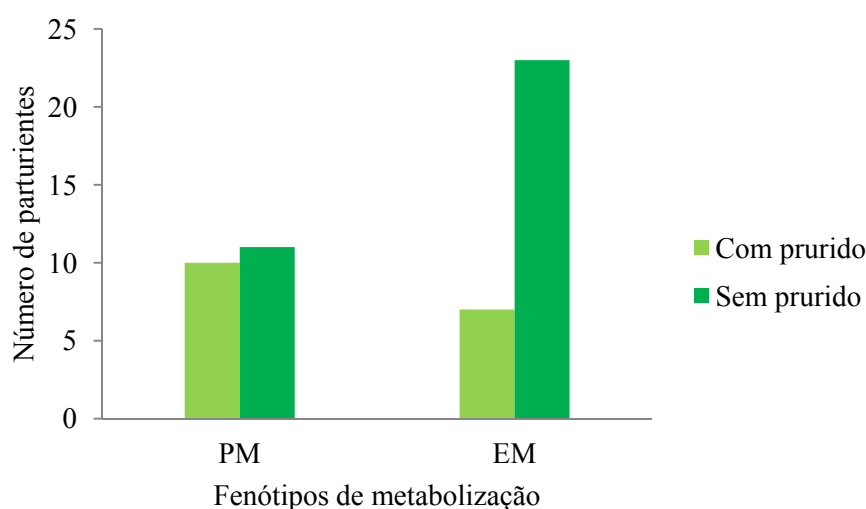


Figura 26. Número de indivíduos em relação à presença e ausência de prurido por fenótipo. PM – metabolizador lento (N=20); EM – metabolizador extensivo (N=31).

3.6.3 Dor e prurido

Posteriormente, a amostragem foi dividida consoante as quatro condições possíveis com dor e prurido (dor inferior ou igual a 3 com prurido, dor inferior ou igual a 3 sem prurido, dor superior a 3 com prurido e dor superior a 3 sem prurido).

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0652$) entre as quatro combinações possíveis e os fenótipos de metabolização, embora o resultado esteja próximo da significância (Tab.VIII).

Tabela VIII. Número de indivíduos por fenótipo de metabolização de acordo com a dor e prurido.

	Fenótipos	
	PM	EM
Dor ≤3 / Com prurido	4	5
Dor ≤3 / Sem prurido	3	13
Dor > 3 / Com prurido	6	2
Dor > 3 / Sem prurido	8	10

3.6.4 Peso do recém-nascido

A amostragem foi classificada consoante o fenótipo da parturiente, de acordo com o peso do recém-nascido. É necessário ter em consideração que, para esta análise, tal como referido anteriormente, o número de amostra aumenta para 54, estando assim, representado o fenótipo dessas mulheres duas vezes (duas com fenótipo PM e outra com fenótipo EM).

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,2090$) entre o fenótipo identificado na parturiente e o peso do recém-nascido (**Fig.27**).

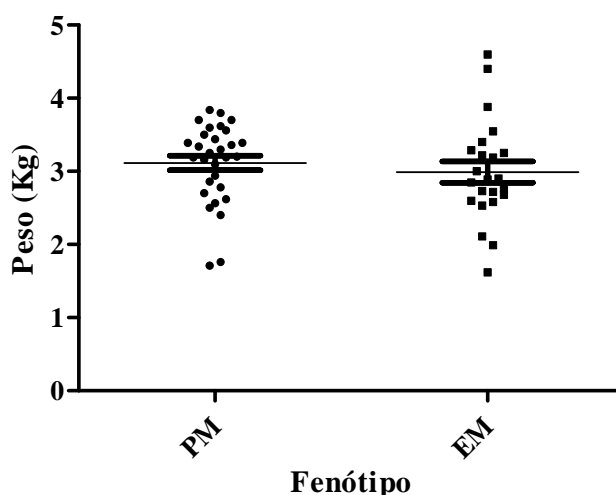


Figura 27. Relação entre o peso do recém-nascido e o fenótipo da parturiente (Fenótipo PM: $3,12 \pm 0,544$; EM: $2,99 \pm 0,695$).

4. Discussão

4.1 Amostragem de estudo

No presente estudo, foi analisado o gene *CYP2D6*, numa amostragem de 51 parturientes, nas quais foi administrado morfina para analgesia após parto por cesariana.

O objectivo principal deste trabalho foca-se essencialmente em três *SNPs*: rs3892097 (IVS4-1G>A), rs1065852 (c.100C>T) e rs28371705 (c.294C>G) que definem três haplótipos, *CYP2D6*4A*, *CYP2D6*10A* e *CYP2D6*2E*, respectivamente.

O genótipo para estes *SNPs* foi obtido a partir de dois métodos diferentes, sequenciação automática e *PCR* em tempo real, sendo que para o rs1065852, também foi realizada uma terceira técnica (*PCR-RFLP*) de confirmação. Os resultados demonstram um elevado grau de concordância para a genotipagem com os diferentes métodos. Deste modo, a técnica de *PCR* em tempo real poderá ser uma mais valia para a genotipagem de *SNPs* específicos, pois verificou-se ser um método bastante eficaz e rápido, o que poderá ser muito útil numa futura abordagem para a prática clínica.

A definição de um haplótipo específico para o gene *CYP2D6* através dos três *SNPs* em estudo, permite uma abordagem fenotípica muito aproximada, em relação ao perfil de metabolização de um indivíduo.

Na análise das três variações de sequência IVS3-1G>A (rs#3892097), c.100C>T (rs#1065852) e c.294C>G (rs#28371705) verificou-se um padrão entre heterozigóticos e homozigóticos. Em regra, o número de indivíduos é constante entre genótipos: quando um *SNP* apresenta homozigotia para o alelo selvagem, os outros dois também o são, o mesmo para homozigóticos para o alelo variante e heterozigóticos.

Para o primeiro *SNP* IVS3-1G>A, foram encontrados 29 indivíduos GG, 16 heterozigóticos GA e 4 indivíduos AA. Para o *SNP* c.294C>G, 30 homozigóticos CC, 17 heterozigóticos CG e 4 homozigóticos GG e para o *SNP* c.100C>T, 30 indivíduos CC, 16 heterozigóticos CT e 5 homozigóticos TT.

As pequenas diferenças do número de indivíduos entre os genótipos para cada *SNP* são devidas a duas amostras que se desviam do padrão comum verificado nesta amostragem. Para o rs#3892097, uma amostra apenas é heterozigótica para este polimorfismo, não apresentando, deste modo, constelações de heterozigotia como as restantes. Para o rs#1065852, há uma amostra homozigótica para o alelo variante, mas os restantes *SNPs* dos haplótipos estão presentes em constelações de heterozigotia.

O padrão de metabolização das amostras em análise foi definido através da análise de genótipos para estes três *SNPs*, conjuntamente com os genótipos dos outros *SNPs* de cada haplótipo.

Segundo Zhou e Arneth *et al.* (2009), foram definidos indivíduos EM como os que apresentam homozigotia para o alelo selvagem (*CYP2D6**2E/*2E). Também são considerados sujeitos EM, sujeitos com apenas um alelo funcional para os haplótipos *CYP2D6**1 e *CYP2D6**2 (Sakuyama *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2009). Verifica-se para algumas amostras EM homozigotia para o alelo variante dos *SNP* rs1135840 e rs1058164 (resultados não apresentados), mas como estes polimorfismos não são específicos para os haplótipos (estão presentes nas três variantes alélicas estudadas) e não têm um efeito prejudicial na proteína codificada, não tendo influência na atribuição do fenótipo de metabolização.

Haniok *et al.* (1990) identificou a alteração responsável pelo fenótipo PM que define o haplótipo *CYP2D6**4A. Esta ocorre na junção do terceiro intrão com o quarto exão, provocando um local de *splicing* diferente e o aparecimento de um codão *stop* prematuro, resultando numa proteína não funcional. No presente estudo, todos os indivíduos que apresentam homozigotia para o alelo variante (*CYP2D6**4A/4A) foram definidos com o fenótipo PM.

Contudo, Gaedigk *et al.*, (2006) identificou a variação alélica c.100C>T (específico para o haplótipo *CYP2D6*10A*) presente em heterozigotia, também estava associado a fenótipo PM. Outros dois autores, Zanger *et al.*, (2004) e Zhou (2009) referem que constelações de heterozigóticos também definiam este fenótipo.

Deste modo, considerando indivíduos com constelações de heterozigóticos como PM, o que se verificou ser constante nesta amostragem (quando um *SNP* é heterozigótico todos os restante *SNP* de qualquer haplótipo também o são), torna difícil a definição de metabolizadores intermediários.

A amostra que apenas apresentava heterozigotia para o *SNP* específico do haplótipo *CYP2D6*4A* e homozigotia para o alelo selvagem dos restantes *SNP* (nomeadamente para o *SNP* específico do haplótipo *CYP2D6*2E*) foi definida como EM.

Após esta abordagem, foram classificados 30 indivíduos EM e 21 PM, estando as frequências de acordo com os estudos realizados por Correia *et al* (2009) na população Caucasiana, que referem estes fenótipos como os mais comuns.

4.2 Actividade metabólica da CYP2D6

Após a análise da amostragem em estudo, o objectivo foi analisar os três *SNP* característicos de cada haplótipo por genótipo e alelo e respectivo fenótipo, tendo em conta os *scores* de dor e a presença *versus* ausência de prurido, registados para cada parturiente, após a administração de morfina. Além destes factores, também foi avaliado se havia ou não diferenças no peso do recém-nascido, de acordo com os perfis de metabolização.

Na análise da dor inferior ou igual a 3 e superior a 3, por genótipo, verificaram diferenças estatisticamente significativas, para os três *SNPs*.

Nos indivíduos com dor inferior ou igual a 3 há uma maior frequência de homozigóticos para o alelo *wild type*, enquanto nos indivíduos com dor superior a 3, se verificou um aumento do número de heterozigóticos para os três *SNPs*, resultando em percentagens idênticas para os heterozigóticos e homozigóticos para o alelo *wild type*.

Pela análise feita para os genótipos dos três haplótipos, observa-se que há um aumento dos *scores* da dor para as parturientes que apresentam constelações de heterozigotia, ou seja, quando há uma função reduzida da enzima.

Contudo, quanto ao alelo variante verifica-se uma diminuição do número de homozigóticos. Este facto poderá explicar porque não se observa diferenças estatisticamente significativas por alelos, não havendo um alelo mais prevalente num dos grupos. Além disso, o número de amostras homozigóticas para o alelo variante é bastante reduzido, não permitindo tirar conclusões definitivas.

Na avaliação do fenótipo e dor não houve diferenças estatisticamente significativas. No entanto, é possível verificar pelo gráfico da **figura 25** que há um maior número de parturientes PM com dor superior a 3 e uma diminuição dos *scores* da dor nas parturientes EM.

Em 1998, Hiroi *et al* realizou os primeiros estudos em microsomas hepáticos humanos, nos quais verificou que a enzima CYP2D6 metaboliza o precursor da dopamina. Estudos mais recentes, Niwa *et al.* (2004), referem a presença deste processo de metabolização no cérebro (Ozdemir *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008; Shyman *et al.*, 2010). Bromek *et al.* (2010), também referem a presença da CYP2D6 nos neurónios dopaminérgicos e que esta está relacionada com a síntese de dopamina no cérebro.

Sabe-se que a acção da morfina no SNC promove a actividade dos neurónios dopaminérgicos do sistema mesolímbico, pelo aumento da libertação de dopamina para a fenda sináptica de modo a controlar a dor.

Deste modo, podemos sugerir que indivíduos com uma função parcial ou nula da enzima *CYP2D6* não metabolizam eficazmente a tiramina, ou parte dela, ocorrendo diminuição na formação de dopamina. Consequentemente, a activação da via de transdução de sinal neuronal que controla a dor e respectivo efeito analgésico poderá estar diminuída. Contudo, não há estudos anteriores que possam comprovar esta correlação entre a função da enzima *CYP2D6* na síntese de dopamina e a dor.

A comparação entre as amostras com prurido e sem prurido, na análise por genótipo, revela resultados estatisticamente significativos apenas para o *SNP* c.100C>T. Verifica-se um aumento do número de heterozigóticos e, ainda mais considerável, um aumento de homozigóticos para o alelo variante (3% para 24%). Na análise por alelo, há resultados significativos para a variante c.100>T e c.294C>G. Para a variante IVS4-1G>A não há resultados significativos, contudo o valor de *p* é muito próximo de 0,05 (0,0531). Estes resultados demonstram que indivíduos com prurido têm maior prevalência do alelo variante, ou seja, variações alélicas influenciam o aparecimento deste efeito secundário.

Na avaliação do fenótipo e prurido, não houve diferenças estatisticamente significativas. No entanto, é possível verificar pelo gráfico da **figura 26** que há um grande número de parturientes EM sem prurido, sugerindo que um metabolizador “normal” desenvolverá menos este sintoma. Deste modo, seria de esperar que nas parturientes PM houvesse um maior número de casos com prurido, mas tal não se verifica.

O presente estudo é relevante, uma vez que não há dados na literatura que relacionem o aparecimento de prurido com os perfis de metabolização associados ao gene *CYP2D6*. Contudo, é necessário ter em conta que o conhecimento científico acerca deste efeito secundário ainda é limitado. Há várias referências que indicam a possível

interacção de estrogénios e serotonina, além dos mediadores químicos do processo inflamatório, como a histamina. Yu *et al.* (2003 e 2004) demonstram o envolvimento da enzima *CYP2D6* na síntese de serotonina pelo seu precursor 5-metoxitriptamina. Estudos mais recentes sobre a personalidade, Dorado *et al.* (2007); González *et al.* (2008) e Peñas-Lledó *et al.* (2009) mencionam que indivíduos PM apresentam baixa regeneração de serotonina.

Assim, não podemos excluir a hipótese da síntese de serotonina pela *CYP2D6* possa influenciar o aparecimento deste efeito secundário ou que outras substâncias que estejam envolvidas no processo sofram acção metabolizadora desta enzima e que também influencie.

Quando comparados os dois parâmetros, dor e prurido, por fenótipo, não se observam resultados estatisticamente significativos, sugerindo que não haverá correlação entres estes.

Na avaliação desenvolvimento intra-uterino (peso) do recém-nascido consoante os genótipos e fenótipos das mulheres não se obteve nenhum resultado estatisticamente significativo.

Neste estudo, é necessário ter em consideração determinados factores para a determinação fenotípica, que poderão explicar o facto de não haver resultados conclusivos nesta análise. Não foi averiguada a presença do fenótipo UM na amostragem, porque, tal como é referido na literatura, este é caracterizado pelo aumento do número de cópias do gene *CYP2D6*. Além disso, para uma definição clara e concreta de qualquer um dos fenótipos seria necessário avaliar a concentração no plasma de um determinado composto controlo metabolizado pelo *CYP2D6*, o que exige outros recursos, raramente disponíveis.

5. Conclusão

O presente estudo reforça a importância da correlação entre genótipo e fenótipo do gene *CYP2D6*, devido ao seu elevado grau de polimorfismos e variabilidade individual e inter-étnica, como uma base importante para predizer o fenótipo, apresentando um grande potencial para alcançar uma terapia farmacológica mais ajustadas ao indivíduo.

Cada vez mais, a genética do gene *CYP2D6* apresenta mais avanços. Contudo, para que haja uma terapia específica e ajustada seria necessário genotipar e identificar todos os *SNPs* e respectivos haplótipos mais relevantes, por etnia, e num contexto de populações individuais. Porém, o número de variantes alélicas descritas continua em expansão o que torna a este processo ainda mais complicado e moroso.

Este trabalho foi pioneiro na relação entre as variações genética do gene *CYP2D6* e o surgimento da dor e efeitos secundários numa amostragem de mulheres às quais foi administrado morfina na analgesia do parto. Este estudo evidencia que os haplótipos deste gene podem influenciar o grau de dor sentido pela parturiente, (correlação com a eficácia terapêutica) e o aparecimento de prurido (efeito secundário) no pós-operatório da cesariana.

Embora seja prematuro esperar repercussões imediatas da farmacogenómica na prática diária dos anestesistas, os avanços neste campo irão permitir uma melhor compreensão das variantes alélicas que afectam a metabolização de xenobióticos e substância endógenas pela *CYP2D6*. Estas descobertas permitirão, assim, a adequação das terapêuticas, e em particular das anestésias, de modo a melhorar a terapia da dor após o trabalho de parto por cesariana.

No futuro, seria interesse uma abordagem mais vasta desta interacção do *CYP2D6* e substância endógena,s que podem influenciar o grau da dor sentida pelas parturientes e o surgimento de efeitos secundários. Além de ser necessário uma

definição mais concisa dos fenótipos, através da análise de compostos controlo, seria interessante avaliar o nível de neurotransmissores, nomeadamente da dopamina e serotonina que estão envolvidas nestes processos.

Em todo o caso, acreditamos que o presente estudo representa uma contribuição importante na Farmacogenómica da dor.

6. Referências bibliográficas

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 7(4):248-249.
- Arneith B, Shams M, Hiemke C, Hartter S (2009). Rapid and reliable genotyping procedure for detection of alleles with mutations, deletion, or/and duplication of the *CYP2D6* gene. *Clinical Biochemistry* 42:1282-1290.
- Aubrun F, Langeron O, Quenel C, Coriat P, Riou B (2003). Relationships between Measurement of Pain Using Visual Analog Score and Morphine Requirements during Postoperative Intravenous Morphine Titration. *Pain and Regional Anesthesia* 98 (6):1415-21.
- Bromek E, Haduch A, Daniel WA (2010). The ability of cytochrome P450 2D isoforms to synthesize dopamine in the brain: An *in vitro* study. *European Journal of Pharmacology* 626:171-178.
- Correia C, Santos P, Coutinho AM, Vicente AM (2009). Characterization of pharmacogenetically relevant *CYP2D6* and *ABCB1* gene polymorphism in a Portuguese population sample. *Cell Biochemistry Function* 27:251-255.
- Dogan RI, Getoor L, Wilbus WJ, Mount SM (2007). SplicePort-An interactive splice-site analysis tool. *Nucleic Acids Research* 35:285-291.
- Dorado P, Cáceres MC, Pozo-Guisado E, Wong M-L, Licinio J, Llerena A (2005). Development of a PCR-based strategy for *CYP2D6* genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Bio Techniques* 39:571-574.
- Dorado P, Peñas-Lledó V, Llerena A (2007). *CYP2D6* polymorphism: implications for antipsychotic drug response, schizophrenia and personality traits. *Pharmacogenomics* 8(11):1597-1608.
- Dunnen JT, Antonarakis E (2001). Nomenclature for the description of human sequence variations. *Human Genetics* 109:121-124.

- Fox S (2008). *Human Physiology*. 10th Edition McGraw Hill, New York.
- George RB, Allen TK, Habib AS (2009). Serotonin Receptor Antagonists for the Prevention and Treatment of Pruritus, Nausea, and Vomiting in Women Undergoing Cesarean Delivery with Intrathecal Morphine: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Internacional Anesthesia Research Society* 109 (1):174-182.
- González I, Peñas-Lledó V, Pérez B, Dorado P, Álvarez M, Llerena A (2008). Relation between *CYP2D6* phenotype and genotype and personality in healthy volunteers. *Pharmacogenomics* 9(7):833-840.
- Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, William G (2006). *Introduction to genetic analysis*. 8th Edition W.H. Freeman and Co., New York.
- Guimarães S, Moura D, Silva PS (2006). *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas – Manual de Farmacologia e Farmacoterapia*. 5^a Edição Porto Editora, Porto.
- Hanioka N, Kimura S, Meyer UA, Gonzales FJ (1990). The Human *CYPD* Locus Associated with a Common Genetic Defect in Drug Oxidation: A G1934 ->A Base Change in Intron 3 of a Mutant *CYP2D6* Allele Results in an Aberrant 3'Splice Recognition Site. *American Journal of Human Geneicst* 47:994-1001.
- Hiroi T, Imaoka S, Funae Y (1998). Dopamine Formation from Tyramine by *CYP2D6*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249:838-843.
- Horta M, Ramos L, Gonçalves Z (2000). The inhibition of Epidural Morphine-induced Pruritus by Epidural Droperidol. *Internacional Anesthesia Research Society* 90:638-641.
- Ingelman-Sundberg M (2004). Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its application in drug therapy: the past, present and future. *Pharmacological Sciences* 25:193-200.

- Ingelman-Sundberg M (2005). Genetic polymorphism of cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 5:6-13.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics* 116:496-526.
- Kalow W (1956). The Relation of Plasma Cholinesterase to response to clinical doses of succinylcholine. *Canadian Journal of Anaesthesia* 3:22-30.
- Kalow W (2006). Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope for personalized medicine. *The Pharmacogenomics Journal* 6:162-165.
- Kim JH, Schwinn DA, Landau R (2008). Pharmacogenomics and perioperative medicine – Implications for modern clinical practice. *Canadian Journal of Anaesthesia* 55:799-806.
- Kirchheiner J (2008). *CYP2D6* Phenotype Prediction From Genotype: Which System Is the Best. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 83(2):225-227.
- Landau R (2005). Pharmacogenetics: implications for obstetric anesthesia. *International Journal of Obstetric Anesthesia* 14:316-323.
- Landau R (2009). Pain management during labor. *Medicine Reports* 1-4.
- Landau R (2010). Pharmacogenetic influences in obstetric anaesthesia. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 24:277-287.
- Landau R, Kern C, Columb MO, Smiley RM, Blouin J-L (2008). Genetic variability of the μ -opioid receptor influences intrathecal fentanyl analgesia requirements in laboring woman. *Pain* 139:5-14.

- Landau R, Kraft JC, Flint LY, Carvalho B, Richebé P, Cardoso M, Lavand'homme P, Granot DY, Cahana A (2010). An experimental Paradigm for the Prediction of Post-operative Pain (PPOP). *Journal of Visualized Experiments* 1-4.
- Ledesma MC, Agundez JAG (2005). Identification of Subtypes of *CYP2D* Gene Rearrangements among Carriers of *CYP2D6* Gene Deletion and Duplication. *Molecular Diagnostics and Genetics* 51(6):939-943.
- Lotsch J, Geisslinger G (2006). Current evidence for a genetic modulation of the response to analgesics. *Pain* 121:1-5.
- Moses S (2003). Pruritus. *American Family Physician* 68(6):1135-1142.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51:263- 273.
- Ozdemir V, Bertilsson L, Miura J, Carpenter E, Reist C, Harper P, Widén J, Svensson J-O, Albers L, Kennedy J, Endrenyi L, Kalow W (2007). *CYP2D6* genotype in relation to perphenazine concentration and pituitary pharmacodynamic tissue sensitivity in Asians: *CYP2D6*-serotonin-dopamine crosstalk revisited. *Pharmacogenomics and Genomics* 17:339-347.
- Palmer SN, Giesecke NM, Body SC, Shernan SK, Fox AA, Collard CD (2005). Pharmacogenetics of Anesthetic and Analgesic Agents. *American Society of Anesthesiologists* 102:663-671.
- Peñas-Lledó V, Dorado P, Pacheco R, González I, Llerena A (2009). Relation between *CYP2D6* genotype, personality, neurocognition and overall psychopathology in healthy volunteers. *Pharmacogenomics* 10(7):1111-1120.

- Preissner S, Kroll K, Dunkel M, Senger C, Goldsobel G, Kuzman D, Guenther S, Winnenburg R, Schroeder M, Preissner R (2010). SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Research* 38:237-243.
- Regateiro F (2007). Manual de Genética Humana. 1ª Edição Impressa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Sakuyama K, Sasaki T, Ujiie S, Obata K, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M (2008). Functional Characterization of 17 *CYP2D6* Allelic Variants (*CYP2D6.2*, 10, 14A-B, 18, 27, 36, 39, 47-51, 53-55, and 57) *Drug Metabolism and Disposition* 36(12):2460-2467.
- Schyman P, Usharami D, Wang Y, Shaik S (2010). Brain Chemistry: How does P450 Catalyze the O-Demethylation Reaction of 5-Methoxytryptamine to Yield Serotonin? *Journal of Physical Chemistry* 114:7078-7089.
- Shen H, Minxia MH, Liu H, Wrighton SA, Wang L, Guo B, Li C (2007). Comparative Metabolic Capabilities and Inhibitory Profiles of *CYP2D6.1*, *CYP2D6.10* and *CYP2D6.17*. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 35:1292-1300.
- Sinatra R (2005). Opioid Analgesics in Primary Care: Challenges and New Advances in the Management of Noncancer Pain. *Clinical Reviews* 19:165-177.
- Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G, Fuselli S (2007). *CYP2D6* worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenetics and Genomics* 17:93-101.
- Smith, H (2009). Opioid Metabolism. *Mayo Clinic Proceedings* 84(7):613-624.
- Somogyi A, Barrat D, Coller J (2007). Pharmacogenetics of Opioids. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 81:429-444.

- Stingl JC, Viviani R (2011). CYP2D6 in the Brain: Impact on Suicidality. *Nature* 89:352-353.
- Szarvas S, Harmon D, Murphy D (2003). Neuroaxial Opioid-Induced Pruritus: A Review. *Journal of Clinical Anesthesia* 15:234-239.
- Tavares I, Lima D (2007). From neuroanatomy to gene therapy: searching for new ways to manipulate the supraspinal endogenous pain modulatory system. *Journal Anatomy* 211:261-268.
- Tomalik-Scharte D, Lazar, Fuhr U, Kirchheiner J (2008). The Clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *The Pharmacogenomics Journal* 8:4-15.
- Weid M, Ziegler J, Kutchan T (2004). The Roles of Latex and the Vascular Bundle in Morphine Biosynthesis on the Opium Poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(38): 1397-13962.
- Zanger U, Raimundo S, Eichealbaum M (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Archives Pharmacology* 369:23-37.
- Zhou S-F (2009) Polymorphism of Human Cytochrome P450 2D6 and Its Clinical Significance – Part I. *Clinical Pharmacokinetics* 48(11):689-723.