



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS
POLIMORFISMOS DO GENE CYP2B6 EM DOENTES VIH
SUJEITOS À TERAPÊUTICA ANTIRRETROVIRAL COM
EFAVIRENZ**

Trabalho submetido por
Rita Maria Tomaz Pinto
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Novembro de 2015



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS
POLIMORFISMOS DO GENE CYP2B6 EM DOENTES VIH
SUJEITOS À TERAPÊUTICA ANTIRRETROVIRAL COM
EFAVIRENZ**

Trabalho submetido por
Rita Maria Tomaz Pinto
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro

Novembro de 2015

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Ana Clara Ribeiro, pela oportunidade, pela disponibilidade e apoio incondicionais.

Um agradecimento muito especial à minha colega de laboratório, Mestre Ana Fernandes, por todos os conhecimentos transmitidos, toda a disponibilidade e, principalmente, paciência. Por toda a dedicação, os meus mais sinceros agradecimentos.

A todos os colegas e professores de laboratório, à Mestre Susana Bandarra e Mestre Paulo Mascarenhas que em todos os momentos me encaminharam e ajudaram no decorrer do projeto.

Aos meus professores do curso - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas – pelos conhecimentos transmitidos e empenho na formação de bons profissionais.

A todos a equipa da farmácia Sália, por todos os ensinamentos, pelas sugestões e amizade.

A todos os colegas do Centro Hospitalar de Setúbal, pelo interesse e apoio durante este percurso, bem como pela amizade e disponibilidade demonstradas.

Aos meus avós, que sempre me deram força para seguir em frente. Um obrigada muito especial.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo que sempre me deram. Obrigada por estarem sempre a meu lado.

A todos os meus amigos, desde aqueles mais próximos até aos mais distantes, pelo apoio e incentivo incondicional, os meus mais sinceros agradecimentos.

Resumo

O CYP2B6 pertence à família de enzimas do citocromo P450 que catalisam a metabolização de uma enorme variedade de fármacos. Os fármacos, que são metabolizados por este enzima, pertencem a diversas classes e incluem, entre outros, o antirretroviral efavirenz (EFV). O gene CYP2B6 é altamente polimórfico e alguns dos seus *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), como é o caso do 516G>T e 785A>G, estão relacionados com a diminuição da expressão e atividade da proteína do gene. Estas variantes em específico estão relacionadas com fenótipos caracterizados como metabolizadores lentos do fármaco EFV e estão, possivelmente, associados a episódios de toxicidade ao nível do sistema nervoso central.

O presente trabalho, integrado num projeto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia PTDC/DTP-FTO/1747/2012, teve como objetivo a pesquisa, identificação e caracterização da mutação 516G>T e 785A>G do gene CYP2B6 em doentes sujeitos à terapia com EFV.

Na amostra estudada, para o SNP 516G>T, obteve-se a seguinte distribuição genotípica: 43,75% para o genótipo 516GG e 56,25% para o genótipo 516GT. As frequências alélicas para os alelos G e T foram 71,88% e 28,12%, respetivamente. Não foram encontradas diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre géneros e raças ($p > 0,05$). Todos os indivíduos apresentaram ser heterozigóticos para a mutação 785A>G.

Tendo em conta os resultados obtidos e, como mera suposição, classificaram-se 27 indivíduos como possuindo o haplótipo CYP2B6 *1/*4 (metabolizadores intermédios) e 21 como possuindo o haplótipo CYP2B6 *1/*6 ou *6*6 (metabolizadores intermédios ou lentos).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os principais polimorfismos do gene CYP2B6, que se sabem envolvidos na alteração da metabolização do fármaco efavirenz, encontravam-se presentes na amostra estudada.

Palavras-chave: CYP2B6, Efavirenz, Polimorfismos, Genótipo

Abstract

The CYP2B6 belongs to the family of cytochrome P450 enzymes that catalyze the metabolism of a wide variety of drugs. Drugs which are metabolized by this enzyme, and belong to several classes include, among others, antineoplastic cyclophosphamide, phenobarbital antiretroviral antiepileptic and efavirenz (EFV). It is known that the CYP2B6 gene is highly polymorphic, both in their coding and promoter region. It is known that some of its single nucleotide polymorphisms (SNPs), as is the case of 516G> T and 785A> G, are associated with decreased expression and protein activity of CYP2B6 gene. These particular variants are related to phenotypes characterized as poor metabolizers of efavirenz drug and are possibly associated with episodes of toxicity to the central nervous system.

This study, part of a project funded by the Fundação para a Ciência e Tecnologia PTD / DTP-FTO / 1747/2012, aimed to the research, identification and characterization of 516G > T and 785A> G mutations of the CYP2B6 gene in patients subject to therapy with EFV.

In the studied sample, the 516G>T SNP, obtained the following genotype distribution: 43.75% for 516GG genotype and 56.25% and for 516GT genotype. Allele frequencies for the G and T alleles were 71,88% and 28,13%, respectively. No significant differences were found in allele and genotype frequencies between genders and races ($p > 0.05$). All the subjects were heterozygous for the 785A> G mutation.

Taking into account the results obtained and, as a mere guess, classified 27 subjects as having CYP2B6 *1/*4 haplotype (intermediate metabolisers) and 21 as having CYP2B6 *1/*6 or *6/*6 haplotype (metabolisers intermediate or slow).

The results of this study showed that the main polymorphisms of the CYP2B6 gene, which are known for being involved in the alteration of efavirenz's metabolism, were present in the sample.

Key-words: CYP2B6, Efavirenz, Polymorphism, Genotype

Índice Geral

I - Introdução	15
1 - Citocromo P450	17
2 - Citocromo P450 CYP2B6 – CYP2B6	20
2.1 - Localização e estrutura do gene	20
2.2 - Regulação do gene CYP2B6	22
2.3 - Substratos	24
2.4 - Farmacogenética do CYP2B6	25
3 - Vírus da imunodeficiência Humana 1	27
3.1 - Ciclo replicativo do VIH-1	29
3.2 - Infecção VIH-1 e progressão para SIDA	29
4 - Tratamento Antirretroviral	31
4.1 - Terapêutica HAART	32
4.2 - Agentes Antiretrovirais	37
4.3 - Efavirenz	41
4.4 - Influência dos SNPs CYP2B6 516G>T e 785A>G no metabolismo do EFV	44
II - Materiais e métodos	49
1 - Seleção e caracterização da amostra	49
2 - Procedimento	49
2.1 - SNP 516G>T	50
2.2 - SNP 785A>G	54
III - Resultados e discussão	59
1 - SNP 516G>T	59
2 - SNP 785A>G	67
IV - Conclusões	73
V - Referências Bibliográficas	75

Índice de Figuras

Figura 1 – Reação de redox dos enzimas CYPs.	17
Figura 2 – Filogenia dos CYPs no rato, humano e peixe-balão (adaptado de Waterston et al., 2002).	18
Figura 3 – Localização do gene CYP2B6 no cromossoma 19 (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2B6).....	20
Figura 4 – Modelo simplificado da regulação dos genes do citocromo P450 por indução (adaptado de Creveling, 2001).....	23
Figura 5 – Grupos e subtipos do VIH-1 (adaptado de (Guerra et al., 2009).	28
Figura 6 – Esquema do metabolismo mono-oxidativo e dioxidativo do EFV (adaptado de (Avery, VanAusdal, Hendrix, & Bumpus, 2013)	42
Figura 7 – Influência do polimorfismo CYP2B6 516G>T no metabolismo do EFV (adaptado de Rodríguez-Nóvoa et al., 2006).	46
Figura 8 – Perfil eletroforético do marcador de pesos moleculares <i>BioLabs™ 100bp ADN Ladder</i>	51
Figura 9 – Esquema do gel de eletroforese e bandas esperadas para cada genótipo.....	52
Figura 10 - Esquema do gel de eletroforese e tamanho da banda esperada.	55
Figura 11 – Perfil eletroforético do marcador de pesos moleculares <i>Lambda ADN- Hind III</i>	56
Figura 12 – Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do gene CYP2B6, utilizando o marcador <i>BioLabs™100bp ADN Ladder</i>	60
Figura 13 – Perfil eletroforético de alguns produtos da restrição enzimática do gene CYP2B6 com o enzima <i>BsrI</i> , utilizando o marcador <i>BioLabs™100bp ADN Ladder</i>	61
Figura 14 – <i>Electrophoretogram</i> de uma amostra com o genótipo homozigótico 516 GG e heterozigótico 516GT.	62
Figura 15 – Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do gene CYP2B6, utilizando o marcador <i>Lambda ADN- Hind III</i>	67
Figura 16 – Perfil eletroforético dos produtos da genotipagem por <i>Allele-Specific PCR</i> onde se observou a presença do alelo A	68
Figura 17 – Perfil eletroforético dos produtos da genotipagem por <i>Allele-Specific PCR</i> onde se observou a presença do alelo G	68

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Percentagem de metabolização de fármacos pelos enzimas do citocromo P450 (adaptado de (Rogers et al., 2002; Singh et al., 2011).....	19
Tabela 2 – Estrutura dos 29 alelos do CYP2B6 (adaptado de (Honda et al., 2011; M Rotger et al., 2007; Margalida Rotger et al., 2007)	21
Tabela 3 – Regimes preferenciais da HAART em doentes adultos e adolescentes com infecção crónica por VIH-1 (adaptado de Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA, 2015).....	35
Tabela 4 – Sequência de oligonucleótidos dos <i>primers forward e reverse</i>	50
Tabela 5 – Local de hidrólise enzimática pelo enzima <i>BrsI</i>	52
Tabela 6- Primers multiplex para amplificação dos fragmentos do gene CYP2B6	54
Tabela 7 – <i>Primers</i> específicos dos alelos da CYP2B6.....	57
Tabela 8 – Frequência genótípicas e alélicas na amostra de 48 indivíduos.	62
Tabela 9 – Frequências dos polimorfismos CYP2B6 516G>T em diferentes estudos (adaptado de Anwar Mulugeta, 2012).	63
Tabela 10 – Distribuição das frequências genótípicas no sexo masculino e feminino...	64
Tabela 11 – Distribuição das frequências alélicas no sexo masculino e feminino.....	64
Tabela 12 – Distribuição das frequências genótípicas em caucasianos e negros.	64
Tabela 13 – Distribuição das frequências alélicas em caucasianos e negros.	64
Tabela 14 – Frequência dos polimorfismos CYP2B6 516G>T em caucasianos e negros (adaptado de (Anwar Mulugeta, 2012).....	65
Tabela 15 – Valores de p obtidos no equilíbrio de Hardy-Weinberg baseados no teste χ^2	66
Tabela 16 – Frequência dos diferentes genótipos na amostra de 50 indivíduos.....	68
Tabela 17 – Número de indivíduos associados a cada um dos diferentes genótipos estudados.....	69
Tabela 18 – CYP2B6 haplótipos (adaptado de (Gatanaga et al., 2007)	69
Tabela 19 – Relação entre o haplótipo CYP2B6 e as concentrações plasmáticas de EFV (adaptado de (Sukasem et al., 2013).....	70

Lista de Abreviaturas

- ADE** – Água destilada esterilizada
- ARN** – Ácido ribonucleico
- AUC** – Área sob a curva
- BSA** – Bovine serum albumin
- CAR** – *Constitutive androstane receptor*
- CCR5** - *C-C chemokine receptor type 5*
- CRFs** -*circulating recombinante forms*
- CXCR4** - *C-X-C chemokine receptor type 4*
- dNTPs** – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- dPXRE** – *Distal xenobiotic- responsive element*
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetraacético
- EFV** – Efavirenz
- HAART** – *Highly active antiretroviral therapy*
- IP** – Inibidor da *protease*
- ITRN** – Inibidor da *transcriptase reversa* nucleósido
- ITRNN** – Inibidor da *transcriptase reversa* não nucleósido
- mARN** – Ácido ribonucleico mensageiro
- MDR1** – *multi-drug resistance gene 1*
- Nested PCR** - *nested polimerase chain reaction*
- PBREM** – *Phenobarbital-responsive enhancer module*
- PCR** – *Polimerase chain reaction*
- PXR** – *Pregnane X receptor*
- RFLP** – *Restriction fragment lenght polymorphism*
- SIDA** – Síndrome da imunodeficiência humana
- SNP** - *Single nucleotide polymorphism*

TAE – Tampão tris-acetato EDTA

Taq – *Polimerase Thermus aquaticus*

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

VIH -1 – Vírus da imunodeficiência humana 1

VIH-2 – Vírus da imunodeficiência humana 2

XREM – *Distal xenobiotics-responsive enhancer module*

I - Introdução

Em Portugal, até ao ano de 2013, existiam cerca de 48,657 pessoas infetadas com o vírus da imunodeficiência humana (VIH). Em 2012, ocorreram 107,621 óbitos entre indivíduos infetados, sendo que 501 óbitos deveram-se a doença causada pelo VIH (Dinis et al., 2014). No sentido de diminuir as taxas de mortalidade associadas à infeção pelo VIH, desenvolveu-se a *highly active antiretroviral therapy* (HAART). Desde 1996, esta terapêutica tem vindo a demonstrar-se extremamente eficaz e bem tolerada. (Aquaro et al., 2006; Bhaskaran, Johnson, Lambert, & Porter, 2008; Braitstein et al., 2006).

O EFV é um dos principais agentes antirretrovirais utilizados na HAART. Pertence ao grupo dos inibidores da transcriptase reversa não nucleósidos (ITRNN) e, apesar de ter uma elevada eficácia e tolerabilidade, frequentemente, alguns doentes desenvolvem toxicidade ou ocorre falha na obtenção de níveis de supressão viral duráveis. Concentrações plasmáticas de EFV acima dos 4µg/ml têm sido relacionadas com o aumento do risco de efeitos adversos ao nível do sistema nervoso central (Kwara, Lartey, Sagoe, Rzek, & Court, 2009).

Tal como a maioria dos fármacos, o EFV sofre metabolização hepática que é mediada pelos enzimas do citocromo P450 (CYPs). Os enzimas do citocromo P450 são uma família de enzimas que intervêm no metabolismo de uma grande variedade de substratos endógenos e exógenos. Nos humanos, a subfamília CYP2B consiste apenas numa proteína funcional: o CYP2B6. O CYP2B6 participa no metabolismo de um elevado número de substratos, onde está incluído o antirretroviral EFV (Ward, Gorski, Jones, Hall, & Flockhart, 2003).

Inicialmente, o CYP2B6, a nível hepático, foi considerado como sendo expresso com níveis baixos e apenas presente numa pequena fração da população. Porém, estudos mais recentes, que utilizaram anticorpos mais seletivos e específicos, verificaram a existência da proteína CYP2B6 em quantidades significativas no fígado humano. A variação interindividual e interétnica foi presenciada na expressão e atividade do CYP2B6. Uma vez que as variações da expressão e atividade do CYP2B6 podem

resultar na alteração da resposta terapêutica ou em toxicidade, torna-se essencial identificar as fontes de variabilidade do CYP2B6 (Lamba et al., 2003).

O CYP2B6 é altamente polimórfico e, até à data, estão identificados 29 alelos, alguns dos quais dão origem a um aumento, diminuição ou perda de atividade. Muitos dos alelos são raros, no entanto, alguns são bastante comuns na população. Por exemplo, o CYP2B6*6 (516G>T e 785A>G) surge com uma frequência alélica que varia entre 14 a 62% entre as diferentes populações existentes no mundo (Hofmann et al., 2008). O CYP2B6*6 tem sido associado a menores níveis de expressão da proteína CYP2B6, sendo, pois, responsável por alguma da variabilidade interindividual na expressão das proteínas CYP2B6 hepáticas (Xu, Ogburn, Guo, & Desta, 2012).

As mutações 516G>T e 785A>G no gene do CYP2B6, que provocam as substituições de aminoácidos Q172H e K262R, respetivamente, são as mais frequentes e dão origem a uma diminuição da metabolização do EFV e, conseqüentemente, ao aparecimento de efeitos adversos (Ingelman-Sundberg, Sim, Gomez, & Rodriguez-Antona, 2007).

Este trabalho de investigação teve como objetivo a identificação e caracterização das mutações CYP2B6 516G>T e 785A>G, numa amostra de 50 indivíduos infetados pelo vírus da imunodeficiência humana 1 (VIH-1) e sujeitos à terapêutica antirretroviral com EFV.

Para tal foi necessário efetuar uma extensa pesquisa, de forma a obter uma revisão da literatura relativamente à influência da genética, nomeadamente dos polimorfismos, nos efeitos terapêuticos do fármaco antirretroviral EFV; identificar, recorrendo a técnicas de biologia molecular, os SNPs 516G>T e 785A>G em 50 indivíduos infetados pelo VIH-1; e, finalmente, analisar estatisticamente as frequências genotípicas, alélicas e a sua variação entre sexos e raças.

A análise das frequências genotípicas e alélicas foi elaborada com base em técnicas de *polimerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), *real-time polimerase chain reaction* (RT-PCR), *nested polimerase chain reaction* (Nested PCR) e sequenciação.

I. INTRODUÇÃO

1 - Citocromo P450

O citocromo P450 é constituído por um grupo de enzimas que são responsáveis pela metabolização de diversas substâncias endógenas e exógenas, transformando-as em compostos mais hidrofílicos (Du, Hoffman, & Keeney, 2004; Ingelman-Sundberg, 2002; Rogers, Nafziger, & Bertino, 2002).

Os enzimas CYPs, enzimas do citocromo P450, são uma família de monoxigenases que são considerados enzimas de metabolização de xenobióticos. Estes enzimas estão envolvidos no metabolismo oxidativo de fármacos e têm um papel central na ativação e eliminação das moléculas com atividade farmacológica (Hodgson & Rose, 2007; Singh, Kashyap, Pandey, & Saini, 2011). A oxidação catalítica dos enzimas CYPs permite a conversão de um substrato num produto oxidado, de acordo com a reação representada na Figura 1: (Creveling, 2001; Guan et al., 2006).

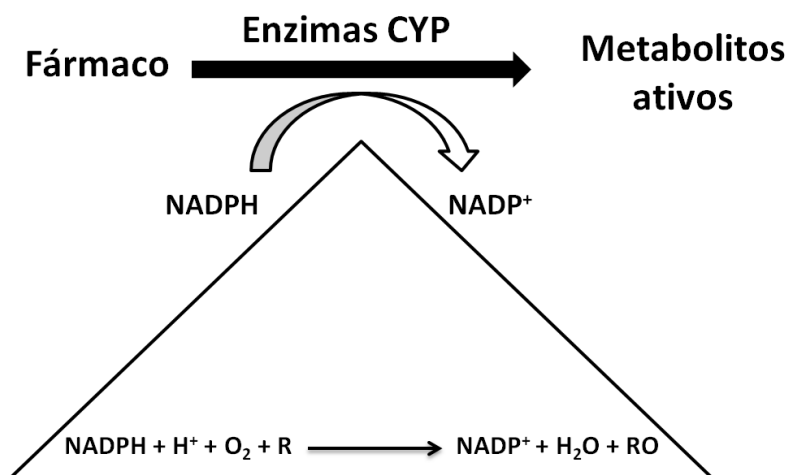


Figura 1 – Reação de redox dos enzimas CYPs.

A oxidação e redução catalisadas pelos CYPs dão origem a metabolitos mais polares que são diretamente excretados na urina e bÍlis, podendo ainda ser convertidos em conjugados pelos enzimas de fase II (Guan et al., 2006). Entre as substâncias endógenas temos, como exemplos, ácidos gordos saturados e insaturados, eicosanóides, esteróis e esteróides, ácidos biliares, vitamina D e retinóides (Nebert & Russell, 2002; Singh et al., 2011).

O número de CYPs é bastante variável entre diferentes espécies. (Waterston et al., 2002). Os CYPs são uma das famílias de genes com uma maior diversidade nos eucariotas. Os anaeróbios, como é o caso dos parasitas *Plasmodium* e *Giardia*, apresentam um reduzido número de genes CYP. Pelo contrário, nos organismos aeróbios é possível observar um intervalo no número de CYPs que varia entre 2 genes (*Schizosaccharomyces pombe*) até 400 genes CYP, como é o caso da planta da soja (Nelson, Goldstone, Stegeman, & B, 2013).

Num estudo de 2002, a comparação entre as famílias do citocromo P450 no rato, humano e peixe-balão (*Takifugu rubripes*) permitiu a identificação de expansões em quatro subfamílias (CYP2B, CYP2C, CYP2D e CYP4A) no rato em comparação com o humano, como se pode observar na Figura 2. Estas expansões parecem estar relacionadas com diferenças entre sexos no metabolismo de androgénios e xenobióticos (Waterston et al., 2002).

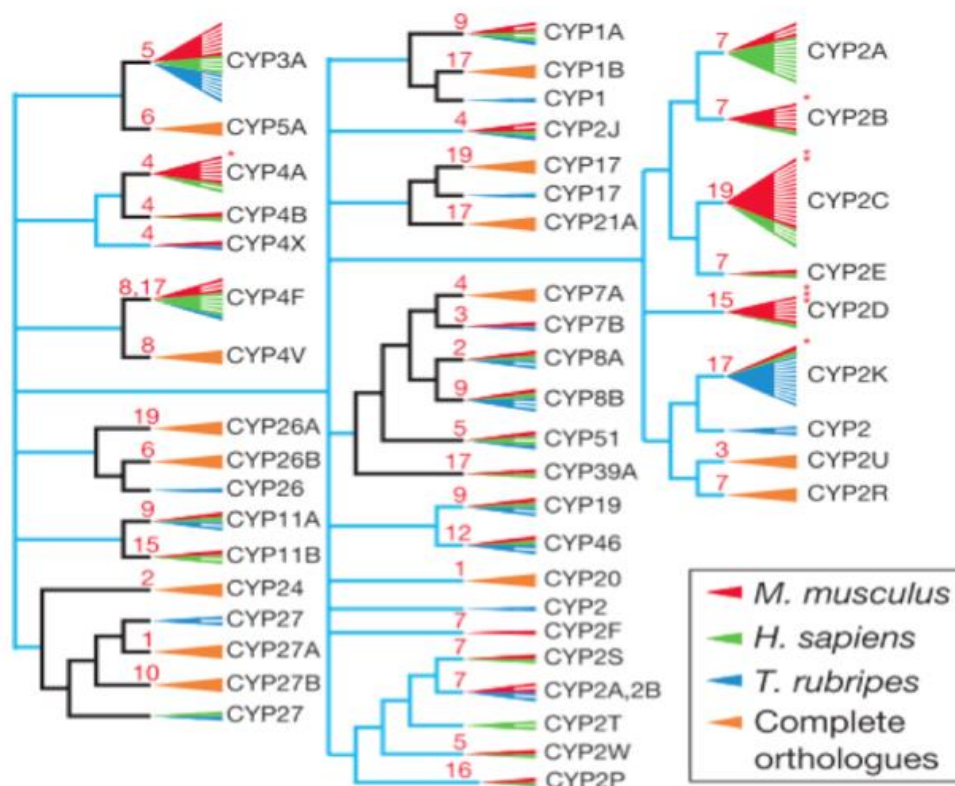


Figura 2 – Filogenia dos CYPs no rato, humano e peixe-balão (adaptado de Waterston et al., 2002).

Legenda: Cada triângulo representa uma família do citocromo P450. Os asteriscos próximos dos triângulos representam pseudogenes no rato. Quando a família apresenta um membro de cada um dos organismos indicados, o triângulo possui a cor laranja. A altura dos triângulos é proporcional ao número de proteínas (indicadas pelas subdivisões brancas). A localização dos CYPs no cromossoma do rato estão indicadas nos ramos de cada subfamília.

I. INTRODUÇÃO

Na espécie humana existem cerca de 57 genes CYP funcionais e 58 pseudogenes que estão agrupados em 18 famílias e 42 subfamílias. As famílias CYP classificadas como CYP1, CYP2 e CYP3 são responsáveis por 70-80% do metabolismo dependente de fase I de xenobióticos (incluindo fármacos), enquanto as famílias CYP4, CYP11, CYP17, CYP 19 e CYP21 estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos (Hodgson & Rose, 2007; Ingelman-Sundberg, 2005; Nebert & Russell, 2002; Singh et al., 2011). Dentro destas famílias, existem subfamílias e isoformas que têm uma influência substancial no metabolismo de xenobióticos. Nas mais importantes incluem-se a CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2E1 (Hodgson & Rose, 2007; Ingelman-Sundberg, 2005; Singh et al., 2011).

Existem mais de 350 alelos CYP funcionais, isto é, genes mutados funcionais que alteram a função e/ou atividade dos produtos resultantes da expressão genética. Atualmente, o maior número de alelos mutados estão descritos para o CYP2D6 (63 alelos), o CYP2B6 (29 alelos), o CYP1B1 (26 alelos) e o CYP2A6 (22 alelos) (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

Os principais isoenzimas (enzimas com uma sequência de aminoácidos diferentes mas que catalisam as mesmas reações) pertencentes ao citocromo P450 que metabolizam um vasto leque de agentes com atividade farmacológica nos humanos podem ser observados na Tabela 1 (Rogers et al., 2002; Singh et al., 2011).

Tabela 1 - Percentagem de metabolização de fármacos pelos enzimas do citocromo P450 (adaptado de (Rogers et al., 2002; Singh et al., 2011))

Enzima	Metabolização de Fármacos (%)
CYP3A4	47
CYP2D6	27,5
CYP2C9	10
CYP2C19	5
CYP2E1	4
CYP2B6	4
CYP1A2	2

Através da observação dos dados apresentados na Tabela 1 é possível verificar que o isoenzima com maior peso no metabolismo de fármacos é o CYP3A4. O isoenzima CYP2B6, ainda que detenha uma percentagem aparentemente muito reduzida (4%), possui uma enorme influência no metabolismo de determinados fármacos, nomeadamente o EFV, como será demonstrado mais adiante.

2 - Citocromo P450 CYP2B6 – CYP2B6

2.1 - Localização e estrutura do gene

A família de genes CYP2 possui múltiplas famílias que estão fisicamente agrupadas no genoma. O CYP2B está localizado num grupo com 6 subfamílias: CYP2A, CYP2B, CYP2F, CYP2G, CYP2S e CYP2T, no cromossoma 19 (Jacob, Johnstone, Neville, & Walton, 2004). O gene CYP2B6 e o pseudogene CYP2B7 humanos localizam-se num bloco de 112kb, no meio da CYP2A18P, entre as posições 19q12 e 19q13.2, como ilustrado na Figura 3 (Du et al., 2004; Guan et al., 2006; Jacob et al., 2004). O gene CYP2B6 tem uma extensão de aproximadamente 28 kb e é composto por 9 exões que codificam uma proteína com 491 aminoácidos (Du et al., 2004; Jacob et al., 2004; Rodríguez-Nóvoa, Barreiro, Jiménez-Nácher, & Soriano, 2006). O pseudogene CYP2B7 é expresso no tecido pulmonar, no entanto apresenta um codão STOP precoce (CGA>TGA) devido à mutação 1132C>T no exão 7, motivo pelo qual, se presume que os seus produtos não tenham qualquer atividade catalítica (Caroline F. ThoARN, Jatinder K. Lambac, Vishal Lambad, Teri E. Kleina & Altmana, 2011; Du et al., 2004).

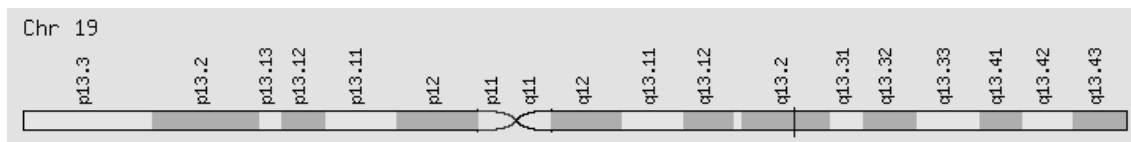


Figura 3 – Localização do gene CYP2B6 no cromossoma 19 (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2B6>)

Até aos dias de hoje, foram identificados 29 alelos do gene CYP2B6 (Tabela 2). Nos portadores dos alelos CYP2B6*6, *9, *16, *26, *27 e *28 é possível observar uma menor taxa de *clearance* do fármaco EFV. O alelo CYP2B6*6 (516G>T e 785A>G)

I. INTRODUÇÃO

está associado a maiores concentrações plasmáticas de EFV e, por consequência, a um maior risco de toxicidade (Sukasem et al., 2012).

Tabela 2 – Estrutura dos 29 alelos do CYP2B6 (adaptado de (Honda et al., 2011; M Rotger et al., 2007; Margalida Rotger et al., 2007)

Alelo	Exão	Mutação
CYP2B6*1		Wild-type
CYP2B6*2	1	64C>T (R22C)
CYP2B6*3	5	777C>A (S259R)
CYP2B6*4	5	785A>G (K262R)
CYP2B6*5	9	1459C>T (R487C)
CYP2B6*6	4	516G>T (Q172H)
	5	785A>G (K262R)
CYP2B6*7	4	516G>T (Q172H)
	5	785A>G (K262R)
		1459C>T (R487C)
CYP2B6*8	3	415A>G (K139E)
CYP2B6*9	4	516G>T (Q172H)
CYP2B6*10	1	62A>T (Q21I)
	2	216G>C (R22C)
CYP2B6*11	1	136A>G (M46V)
CYP2B6*12	2	296G>A (G99E)
CYP2B6*13	3	415G>A (K139E)
	4	516G>T (Q172H)
	5	785A>G (K262R)
CYP2B6*14	3	419G>A (R140Q)
CYP2B6*15	8	1172T>A (B91N)
CYP2B6*16	5	785A>G (K262N)
	7	983T>C (B28T)
CYP2B6*17	1	76A>T (T26S)
		83A>G (D88G)
		85C>A (R29T)
		86G>C
	6	933C>T (sem alteração)
CYP2B6*18	7	983T>C (I328T)
CYP2B6*19	4	503C>T (T168I)
CYP2B6*20	4	503C>T (T168I)
		516G>T (Q172H)
	5	785A>G (K262R)
CYP2B6*21	8	1282C>A (P428T)
CYP2B6*22		
CYP2B6*23	9	1375A>G (M459V)
CYP2B6*24	9	1427G>A (G476D)
CYP2B6*25	9	1454A>T (Q485L)
CYP2B6*26	4	499C>G (P167A)
		516G>T (Q172H)
	5	785A>G (K262R)
CYP2B6*27	4	593T>C (M198T)
CYP2B6*28		917C>G (T306S)
	7	1132C>T (R378X)
CYP2B6*29	Híbrido CYP2B7/CYP2B6 (<i>crossover</i> no intrão 4)	-

2.2 - Regulação do gene CYP2B6

Devido ao facto de possuir diversas isoformas, o CYP2B6 é expresso em diferentes tecidos, nomeadamente, no fígado, rins, pulmões, pele, intestinos, endométrio, macrófagos broncoalveolares, linfócitos do sangue periférico e cérebro (Croom, Stevens, Hines, Wallace, & Hodgson, 2009; Guan et al., 2006; Hodgson & Rose, 2007). Alguns estudos relativos à expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mARN) verificaram a presença do CYP2B6 em todos os fígados adultos analisados, porém, não foi possível identificar a sua presença em 16 amostras de fígado fetal e 10 placentas, embora no epitélio uterino o gene fosse expresso (Hodgson & Rose, 2007).

Um estudo que utilizou um anticorpo monoclonal para detetar a presença do CYP2B6 em 40 indivíduos confirmou a presença deste CYP em todos os indivíduos analisados com uma concentração média de proteína de 10.9 pmol/mg. Porém, a análise de mais 19 indivíduos com características diferentes dos anteriores (nomeadamente ao nível da raça e sexo) com este anticorpo demonstrou uma variação interindividual muito significativa (Croom et al., 2009; Hodgson & Rose, 2007). Assim, demonstrou-se que os níveis da proteína CYP2B6 variam não só entre grupos étnicos, mas também entre sexos, sendo que as mulheres apresentaram níveis 1,6 vezes superiores aos dos homens (Hodgson & Rose, 2007).

A ativação da transcrição dos genes CYP pelos xenobióticos é mediada pelas interações entre os complexos ligando-recetor nuclear e sequências potenciadoras que se encontram a montante dos promotores dos genes (Wang et al., 2003).

O modelo de regulação dos genes do citocromo P450 baseia-se na ligação de um recetor com um ligando, de forma a alterar a sua conformação, movendo-se posteriormente para o núcleo. Já no núcleo, este liga-se a uma região específica a montante do local de iniciação, modificando o ácido desoxirribonucleico (ADN) para que este se torne mais acessível às proteínas envolvidas na transcrição, como se pode observar pelo esquema da Figura 4 (Creveling, 2001).

I. INTRODUÇÃO

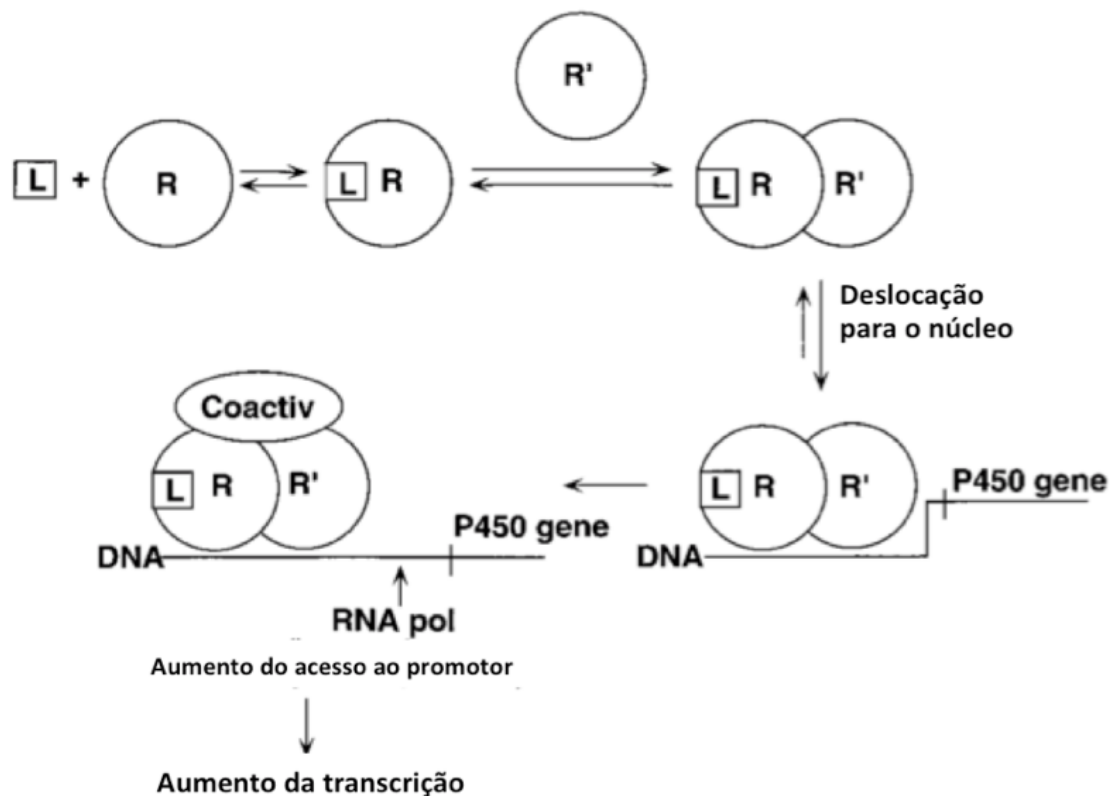


Figura 4 – Modelo simplificado da regulação dos genes do citocromo P450 por indução (adaptado de Creveling, 2001)

Legenda: L= ligando; R= receptor; R'= proteína par para o heterodímero do R; Coactiv = coativador; RNA pol = ARN polimerase.

Diversos estudos evidenciaram que a indução do CYP2B6 estava associada à ativação de vários fatores hepáticos como o *pregnane X receptor* (PXR), *constitutive androstane receptor* (CAR), recetor glucocorticoide e o recetor da vitamina D, de uma forma direta ou indireta (Wang & Tompkins, 2009). O PXR e o CAR são dois membros da família de recetores nucleares que intervêm na expressão de genes envolvidos no metabolismo e eliminação de xenobióticos. (Drocourt, Ourlin, Pascussi, Maurel, & Vilarem, 2002; Faucette et al., 2006; Goodwin, Moore, Stoltz, McKee, & Kliever, 2001; Wang et al., 2003). Inicialmente, os recetores PXR e CAR foram considerados os responsáveis pela regulação da expressão hepática do CYP3A e CYP2B, respetivamente. Estudos mais recentes sugeriram que existe uma interação entre os dois recetores provocando uma ativação recíproca dos dois genes (Faucette et al., 2004, 2006). Deste modo, compostos indutores podem ativar diferencialmente um único ou múltiplos recetores nucleares de forma a induzir diferentes genes do citocromo P450 (Faucette et al., 2004).

O PXR é ativado por um grande número de xenobióticos e esteróides, provocando a indução do CYP3A4 e do CYP3A7 através de dois elementos específicos de resposta presentes na região regulatória destes genes. O primeiro elemento de resposta é o PXR proximal que, sendo necessário não é suficiente para a completa transativação do promotor do CYP3A4. Assim, a indução mediada pelo PXR requer a presença do segundo elemento de resposta distal, o *distal xenobiotic-responsive element* (dPXRE) (Drocourt et al., 2002). O recetor PXR também contribui para a indução do CYP2B6 via *distal xenobiotics-responsive enhancer module* (XREM). O recetor CAR é o capaz de regular o CYP2B6 através de fármacos e outros xenobióticos via *phenobarbital-responsive enhancer module* (PBREM) na posição 1,7kb do promotor do gene. Vários estudos identificaram o elemento de resposta complexo que consiste em dois locais de ligação nucleares (NR1 e NR2). O NR1 e o NR2 são essenciais para a indução dos genes CYP2B pelo fenobarbital. (Drocourt et al., 2002; Zanger & Schwab, 2013).

Algumas substâncias demonstraram ter a capacidade de induzir a expressão do CYP2B6 em hepatócitos humanos *in vitro*, como é o caso, da carbamazepina, fenobarbital, fenitoína (antiepiléticos), clotrimazol (antifúngico), rifampicina (antituberculoso) e ritonavir (antirretroviral) (Faucette et al., 2004).

2.3 - Substratos

O CYP2B6 é responsável pela metabolização de diversos substratos, incluindo fármacos de variadas classes terapêuticas, nomeadamente: ciclofosfamida (antineoplásico citotóxico), promazina (antipsicótico), EFV (antirretroviral), imipramina (antidepressor tricíclico), midazolam (ansiolítico benzodiazepina) e tamoxifeno (antineoplásico antiestrogénio). Foram descritos alguns inibidores potentes e específicos da expressão do CYP2B6 incluindo-se neste grupo o fármaco etinilestradiol (anticoncepcional) e clopidogrel (antiagregante plaquetário) (Bumpus, Kent, & Hollenberg, 2006; Guan et al., 2006).

I. INTRODUÇÃO

2.4 - Farmacogenética do CYP2B6

As diferentes apresentações de alguns genes dão origem a uma variabilidade da expressão genética que, quando verificadas em mais de 1% da população são denominadas por polimorfismos farmacogenéticos (Cressey & Lallemand, 2007; Rogers et al., 2002).

Atualmente são conhecidos vários polimorfismos que alteram a expressão de proteínas transportadoras ou enzimas que metabolizam os fármacos antirretrovíricos. Assim, estes polimorfismos ocorrem designadamente em: genes de transportadores de fármacos, como é o caso da glicoproteína-P (P-gp), produto do *multi-drug resistance gene 1* (MDR1), que assegura o transporte de vários compostos; enzimas metabolizadores de fase I do citocromo P450; e enzimas metabolizadores de fase II (Cressey & Lallemand, 2007).

Inicialmente, o CYP2B6 não era considerado como um enzima com relevância ao nível do metabolismo de fármacos. No entanto, novos estudos demonstraram a importância deste CYP no metabolismo de fármacos utilizados no tratamento do cancro, como a ciclofosfamida, e antirretrovirais como o EFV e a nevirapina (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Jacob et al., 2004).

O gene CYP2B6 é um dos mais polimórficos do citocromo P450 e, atualmente, os polimorfismos deste gene incluem mutações *missense*, inserções, deleções e mutações que afetam a atividade e expressão do gene (Ilic et al., 2013).

Alguns estudos que analisaram tecidos hepáticos, demonstraram que o sexo feminino tende a expressar níveis mais elevados do CYP2B6 no fígado do que o sexo masculino. Este evento deve-se à expressão do CYP2B6 ser regulada pela secreção da hormona de crescimento, que possui concentrações plasmáticas mais elevadas nas mulheres do que nos homens. (Daraki et al., 2014).

Diferenças ao nível da raça e étnica foram detetadas entre mulheres mas não entre homens. A atividade do CYP2B6 é maior em mulheres hispânicas do que em caucasianas e afro-americanas (Ilic et al., 2013).

Existe uma elevada variação interindividual na expressão do mRNA do CYP2B6, variando entre 20 e 288 vezes, podendo este facto dever-se tanto a diferenças

na regulação da transcrição como a variações genéticas herdadas (Caroline F. ThoARN, Jatinder K. Lambac, Vishal Lambad, Teri E. Kleina & Altmana, 2011; Guan et al., 2006)

Apesar de altamente polimórfico, não foram encontradas mutações que criassem uma perda de função significativa no gene CYP2B6 (Ingelman-Sundberg et al., 2007). Existem, porém, um conjunto de alelos que parecem estar associados a uma diminuição da atividade/expressão, sendo eles o CYP2B6*6, CYP2B6*16 e CYP2B6*18. O CYP2B6*6 é relativamente comum em algumas populações com uma frequência de 20-30%. O CYP2B6*16 e o CYP2B6*18 são mais frequentes em indivíduos de raça negra (7-9%). Estudos demonstraram que indivíduos homozigóticos com os alelos CYP2B6*6, CYP2B6*4, CYP2B6*16 e CYP2B6*18 exibiam uma menor capacidade para metabolizar substratos da CYP2B6, como é o caso do fármaco antirretroviral EFV (Hodgson & Rose, 2007; Ingelman-Sundberg et al., 2007).

Alelos que possuem os polimorfismos 415A>G, 516G>T, 136A>G, 296G>A, 785A>G, 419G>A e 1172T>A têm sido associados a variações na expressão das proteínas codificadas por este gene (Rodríguez-Nóvoa et al., 2006).

O fenótipo de um indivíduo é determinado pela atividade enzimática que existe no seu organismo, sendo denominados como “metabolizador lento”, “metabolizador intermédio”, “metabolizador rápido” e “metabolizador ultrarrápido”(Rogers et al., 2002). Um metabolizador lento, apresenta uma alteração na expressão dos seus enzimas, dando assim origem a enzimas disfuncionais ou inativos. No caso de pró-fármacos, ou seja, fármacos que necessitam de ser metabolizados, passando por uma fase onde são biotransformados nos seus metabolitos ativos para poderem exercer as suas ações terapêuticas, não são eficazes em indivíduos classificados como metabolizadores lentos. Um metabolizador intermédio, é aquele que apresenta uma diminuição do metabolismo do fármaco devido a uma diminuição da atividade enzimática. Normalmente, o metabolizador intermédio possui um alelo funcional e um alelo não funcional, podendo em alguns casos possuir dois alelos parcialmente não funcionais (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Ingelman-Sundberg, 2005). Os metabolizadores rápidos apresentam uma atividade enzimática normal, possuem dois genes funcionais, pelo que o efeito terapêutico nestes indivíduos é obtido com a administração de doses *standart*. Os metabolizadores ultrarrápidos, apresentam uma intensa atividade enzimática, uma vez

I. INTRODUÇÃO

que apresentam mais que dois genes ativos (Ingelman-Sundberg et al., 2007). Nestes casos, a administração da dose *standart* poderá proporcionar um efeito terapêutico muito reduzido ou mesmo nulo e, por outro lado, poderá causar uma situação de toxicidade devido à rápida metabolização do fármaco (Rogers et al., 2002).

Deste modo, a genotipagem ou fenotipagem para alguns dos enzimas do citocromo P450 são relevantes para fármacos com uma estreita margem terapêutica ou quando os efeitos adversos incluem situações de risco para o doente e que podem ser evitadas com um simples ajuste de dose (Cressey & Lallemand, 2007; Rogers et al., 2002).

Atualmente, as doses *standart* são obtidas através de estudos de farmacocinética onde os participantes são voluntários saudáveis e, muito provavelmente, metabolizadores rápidos. A investigação na área da genética clínica abre caminho para a inclusão da farmacogenética na fase de desenvolvimento de novos fármacos. Num futuro próximo, será possível ao clínico antever a resposta que um indivíduo terá a um determinado fármaco consoante o seu genótipo (Rogers et al., 2002).

3 - Vírus da imunodeficiência Humana 1

O VIH-1 é um *Retrovirus* do género *Lentivirus* pertencente à família *Retroviridae*, que tem a capacidade de infetar as células do sistema imunitário do hospedeiro (Smith, de Boer, Brul, Budovskaya, & van Spek, 2012).

Cada partícula viral contém material genético em duas cadeias de ácido ribonucleico (ARN), bem como enzimas que são necessários ao ciclo replicativo do vírus. O ARN viral sofre uma retrotranscrição, passando a ADN viral de forma a permitir a reprodução viral. Cada partícula viral contém um enzima denominado por *transcriptase reversa* que medeia este processo (Petroll, Hare, & Pinkerton, 2008).

Apesar de exibir poucos genes e um genoma com menos de 10 kb, o VIH-1 é capaz de neutralizar os diferentes componentes do sistema imunitário. Tem a capacidade de infetar os linfócitos T CD4⁺ e os macrófagos, existindo a possibilidade de provocar a destruição completa das células CD4⁺, dando origem ao síndrome da imunodeficiência

humana (SIDA) (Arendt & Littman, 2001; Simon, Ho, & Karim, 2010; Stevenson, Stanwick, Dempsey, & Lamonica, 1990).

O VIH-1 é caracterizado por uma ampla diversidade genética. As estirpes do vírus estão divididas em 4 grupos (M,N,O e P). Os grupos O, N e P estão restritos à África Central, enquanto o grupo M é o responsável pela atual pandemia. No grupo M estão inseridos cerca de 95% dos isolados de HIV-1 descritos até ao momento e está dividido em 9 subtipos (*clades*) distintos (Figura 5). Para além dos subtipos, existem também 15 *circulating recombinante forms* (CRFs). (de Oliveira Santos, Villela Romanos, & Dutra Wigg, 2008; Guerra, de Lara, Malizia, & Díaz, 2009).

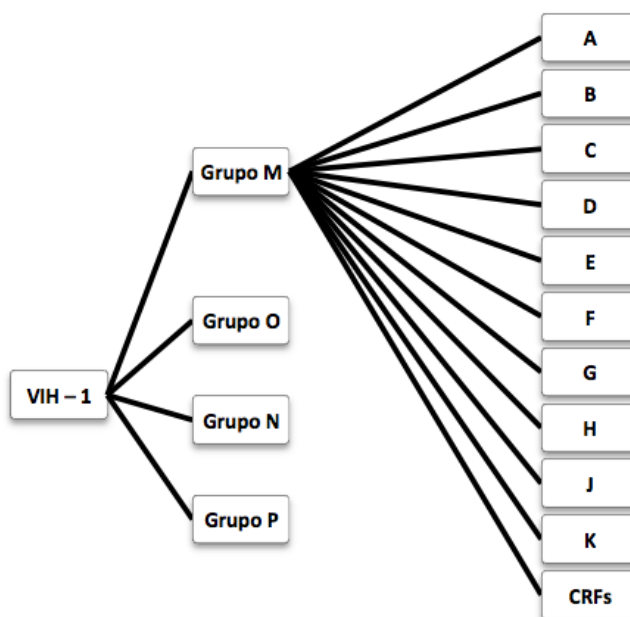


Figura 5 – Grupos e subtipos do VIH-1 (adaptado de (Guerra et al., 2009).

A contínua evolução e diversidade deste vírus representam um desafio para a comunidade científica para a criação de novas medidas preventivas e terapêuticas. O subtipo C continua a ser o mais comum, com uma percentagem de 55-60% de todas as infeções a nível global. Embora os “subtipos não B” apresentem características virológicas diferentes do subtipo B, não são claras as diferenças existentes ao nível clínico. (Simon et al., 2010).

I. INTRODUÇÃO

3.1 - Ciclo replicativo do VIH-1

O ciclo replicativo deste vírus é bastante complexo e a sua duração está dependente do tipo de célula alvo e da ativação celular. O ciclo tem início com a penetração do genoma ARN viral no citoplasma. A glicoproteína exterior (gp120) e a proteína transmembranar (gp41) do envelope do VIH-1 têm afinidade para o recetor CD4 que direciona o vírus para as células CD4⁺. A interação da subunidade gp120 com o recetor CD4 é seguida de uma ligação adicional a um coreceptor que pode ser o *C-C chemokine receptor type 5* (CCR5) ou *C-X chemokine receptor type 4* (CXCR4). O arranjo destes coreceptores na superfície dos linfócitos e macrófagos e o reconhecimento do coreceptor pelo envelope viral, são os principais determinantes do tropismo para diferentes tipos de células. Esta ligação entre envelope e coreceptor provoca alterações conformacionais no vírus, expondo o domínio hidrofóbico na gp41 que promove a fusão com a membrana celular. A entrada e fusão do vírus com a membrana da célula permitem a descapsulação do core viral. Já no interior da célula, o enzima *transcriptase reversa* inicia a transcrição do ARN viral em ADN viral. O processo da retrotranscrição é necessário para formar o complexo de preintegração viral. Este complexo é transportado até ao núcleo da célula e inicia-se o processo de integração do ADN viral com ADN da célula hospedeira com o auxílio do enzima *integrase*. Uma vez terminado o processo de integração, a reprodução viral inicia-se, e o ADN viral é transcrito em ARN. A elongação da transcrição requer a ligação da proteína Tat do vírus ao elemento de ARN. O ARN, por sua vez, é traduzido em proteínas necessárias à formação de novas partículas virais. As cadeias de ADN são separadas pelo enzima *protease* que permite a obtenção do seu invólucro. Todos os três enzimas referidos ao longo do ciclo de vida viral são alvos das terapêuticas antirretrovirais (Arendt & Littman, 2001; Arts, Hazuda, Bushman, Nabel, & Swanstrom, 2012; Gomez & Hope, 2005; Petroll et al., 2008; Simon et al., 2010; Smith et al., 2012).

3.2 - Infecção VIH-1 e progressão para SIDA

O vírus infeta, inicialmente, as células T ou os macrófagos. As células infetadas migram para a região dos tecidos linfáticos, tornando possível o acesso das novas

partículas virais a outras célula (Petroll et al., 2008; Schnell, Joseph, Spudich, Price, & Swanstrom, 2011). Num intervalo de 4 a 10 dias, as partículas virais são libertadas para a corrente sanguínea. Segue-se um período de intensa replicação viral, provocando um aumento extenso dos níveis de vírus no plasma e diminuindo o número de células T CD4⁺. Este estado inicial da infeção é, normalmente, acompanhado de alguns sintomas como febre, faringite, artralgia, anorexia, exantema maculopapular, linfadenopatia e fadiga. Este quadro clínico é, igualmente, conhecido como síndrome retroviral agudo e ocorre, aproximadamente, 2 a 4 semanas após a exposição ao vírus. A maioria dos sintomas resolvem-se no período de 1 a 2 semanas. Nesta fase, os níveis de anticorpos anti-VIH tornam-se detetáveis (seroconversão) uma vez que o sistema imunitário começa a “responder”, e ocorre o aumento dos níveis das células CD4 enquanto a carga viral diminui. O intervalo de tempo que decorre entre a infeção inicial e a seroconversão é designado por infeção aguda ou primária. (Petroll et al., 2008).

Após a seroconversão, a carga viral e o número de células CD4 mantém-se estável durante um período de 5 a 10 anos. Durante este tempo, os indivíduos apresentam poucos ou nenhuns sintomas associados ao VIH, ainda que a replicação se mantenha dinâmica. Com o passar do tempo, a carga viral aumenta e os níveis de células CD4 começam a diminuir. Assim que os níveis das células CD4 diminuem para níveis inferiores a 200 células/ml, os indivíduos infetados ficam mais suscetíveis a desenvolverem infeções oportunistas (Petroll et al., 2008; Simon et al., 2010).

Para além das infeções oportunistas, os doentes com VIH têm um maior risco de adquirirem algumas doenças, como é o caso do sarcoma de Kaposi, linfoma não-Hodgkin, cancro cervical e cancro anal (Petroll et al., 2008).

O VIH é transmitido através de 4 fluídos corporais: sangue, sémen, fluídos vaginais e leite materno. Existem 3 vias pelas quais esta transmissão pode ocorrer, sendo elas: exposição a sangue contendo VIH, ocorrendo muitas vezes entre utilizadores de drogas injetáveis devido à partilha de agulhas ou entre profissionais de saúde devido a uma exposição ocupacional; contacto sexual sem utilização de um método contraceptivo de barreira (preservativo), possibilitando a passagem direta do vírus para a corrente sanguínea através das mucosas ou por infeção dos macrófagos que revestem as mucosas vaginais e rectais; transmissão vertical, em que ocorre da mãe para o filho

I. INTRODUÇÃO

devido à exposição a sangue ou secreções vaginais durante o parto ou durante a amamentação (Petroll et al., 2008).

A possibilidade de transmissão do vírus de um indivíduo infetado para um não infetado está diretamente dependente da quantidade de vírus existente nos fluídos associados à transmissão (Petroll et al., 2008; Simon et al., 2010). Esta probabilidade é amplamente diminuída quando há uma supressão viral através do tratamento antirretroviral adequado. De igual forma, a terapêutica antirretroviral aplicada a mulheres infetadas e grávidas permite diminuir a taxa de transmissão vertical (Petroll et al., 2008). Existem ainda outras medidas que devem ser tomadas para impedir a transmissão vertical, designadamente, a administração da TAR intravenosa durante o parto, administração de TAR aos recém-nascidos e desencorajar a amamentação nestes casos (Petroll et al., 2008; Simon et al., 2010).

A transmissão do VIH é aumentada num fator de 5 a 10 quando estão presentes outras infeções como a gonorreia, a clamídia ou a sífilis (Petroll et al., 2008; Simon et al., 2010).

Considerando que as principais vias de transmissão do VIH são através do contacto sexual e partilha de agulhas, as modificações comportamentais são essenciais na redução da taxa de infeção. A utilização consistente de preservativo durante as relações sexuais e a redução no número de parceiros sexuais, diminuem significativamente o risco de transmissão sexual. Utilizadores de drogas injetáveis podem reduzir o risco de infeção ao utilizarem agulhas e seringas estéreis. Alguns estudos efetuados indicam que programas de troca de seringas/agulhas, nos quais os utilizadores de drogas são estimulados a trocarem as suas seringas usadas por seringas estéreis, podem reduzir substancialmente o risco de transmissão entre estes utilizadores (Petroll et al., 2008; Simon et al., 2010).

4 - Tratamento Antirretroviral

Os avanços científicos efetuados ao nível dos fármacos antirretrovirais possibilitaram criar esquemas terapêuticos com menos efeitos adversos e com um menor número de tomas diárias, promovendo melhores resultados clínicos (Petroll et

al., 2008; Rodríguez-Nóvoa et al., 2006). A grande maioria dos doentes *naive* tem a oportunidade de aderir a uma terapêutica em que existe apenas uma toma diária de um comprimido que contém múltiplos fármacos na sua formulação (Petroll et al., 2008).

Contudo, dado o caso da infeção por VIH ser incurável até ao momento, e, consequentemente, inevitável o tratamento por tempo indefinido, os aspetos relacionados com a variabilidade genética interindividual associada à eficácia e toxicidade dos fármacos é cada vez mais um alvo de estudo para a comunidade científica (Rodríguez-Nóvoa et al., 2006).

As resistências do VIH aos fármacos antirretrovirais é frequentemente testada ainda antes do início da terapêutica antirretroviral. Os testes de genotipagem identificam mutações genéticas no genoma viral que conferem a resistência aos fármacos. Cerca de 10 a 18% dos doentes *naive* apresentam vírus com mutações de resistência indicando, pois, que estes indivíduos entraram em contacto com uma estirpe de vírus já resistente à terapêutica (Petroll et al., 2008).

Hoje em dia, a terapêutica antirretroviral é considerada bastante eficaz, conveniente e, em geral, bem tolerada, sendo capaz de reduzir a carga viral até níveis indetetáveis ao fim de poucas semanas após o início do tratamento.

4.1 - Terapêutica HAART

As *guidelines* recomendam a associação de três ou mais fármacos antirretrovirais no tratamento de indivíduos VIH-1 positivos imunocomprometidos. Esta combinação tripla é conhecida como HAART (Cressey & Lallemand, 2007). Quando comparada com os regimes utilizados anteriormente, a HAART possibilita uma maior supressão viral ao mesmo tempo que diminui as taxas de abandono pois apresenta maior tolerância e conveniência (Maggiolo, 2009).

Embora o ciclo de vida do VIH apresente uma série de excelentes alvos para intervenção terapêutica, apenas alguns destes foram até hoje explorados. O primeiro passo do ciclo viral, a entrada do vírus na célula, é um dos principais alvos para uma série de classes de fármacos antirretrovirais, designadamente: inibidores de entrada,

I. INTRODUÇÃO

antagonistas dos recetores CCR5 e inibidores da fusão (Arts et al., 2012; Simon et al., 2010).

Após o diagnóstico de infeção por VIH, o primeiro passo é conhecer os valores relativos ao número de células CD4. Os valores normais, usualmente, estão entre as 500 e as 200 células/ml. A terapêutica antirretroviral é iniciada se o indivíduo apresenta valores abaixo das 350 células/ml. No entanto, a terapêutica pode ser iniciada mesmo se os valores estiverem acima deste número se o doente apresentar sintomas relacionados com a infeção (Maggiolo, 2009; Petroll et al., 2008; Simon et al., 2010; Williams et al., 2014). Existem evidências de que o início precoce da HAART pode melhorar a recuperação da resposta imunológica, a resposta virológica ao tratamento e o prognóstico geral da doença. Porém, o início precoce exige algumas considerações, particularmente, a exposição do organismo ao fármaco, a durabilidade da eficácia e possíveis efeitos adversos (Maggiolo, 2009).

Desde 1987, ano em que foi aprovado o primeiro fármaco antirretroviral (azidotimidina), muitos outros fármacos utilizados no tratamento da infeção pelo VIH têm sido inseridos no mercado. Embora a combinação de fármacos em regimes triplos tenha a capacidade de suprimir a replicação viral, nem todos os doentes são capazes de aderir de igual forma ao tratamento (Rodríguez-Nóvoa et al., 2006). É bastante comum surgir a falha terapêutica devido à toxicidade e adesão parcial ou nula ao tratamento.

Embora a HAART não seja capaz de erradicar o vírus possibilita a supressão da replicação viral durante décadas, prevenindo a progressão da SIDA, e aumentando, significativamente, a esperança média de vida dos indivíduos infetados com VIH (Arts et al., 2012; Cressey & Lallemand, 2007). Todavia, a terapêutica HAART, por si só, não é capaz de eliminar a infeção pelo VIH. O efeito terapêutico pode ser grandemente prejudicado pela não adesão, baixa tolerabilidade aos fármacos e interações entre fármacos antirretrovirais e outros fármacos que possam ser utilizados em simultâneo. Qualquer um destes fatores pode levar ao aparecimento de resistências e falência virológica (Arts et al., 2012).

Existem seis classes de agentes antirretrovirais que estão disponíveis para a terapêutica de combinação HAART: inibidores da transcriptase reversa nucleósidos (ITRN), ITRNN, inibidores da *protease* (IP), inibidores da fusão, antagonistas CC5 e inibidores da *integrase* (Figura 6) (Natella Y. Rakhmanina, b, 2011). A terapêutica

HAART, consiste, frequentemente, na utilização simultânea de 3 fármacos de 2 classes diferentes: dois ITRN juntamente com um ITRNN ou dois ITRN e um IP (Arts et al., 2012; Cressey & Lallemand, 2007; Maggiolo, 2009; Petroll et al., 2008).

A HAART possibilita a supressão da replicação viral e reduz de forma eficaz a carga viral abaixo dos limites de deteção (<50 ARN cópias/ ml) e aumenta o número de linfócitos T CD4⁺ em circulação, restaurando o sistema imunitário (Arts et al., 2012).

Existem vários critérios para o início da HAART que se baseiam, essencialmente, nos benefícios relativos do tratamento tendo em conta o estado da doença, no impacto do tratamento na qualidade de vida do doente, na necessidade de uma adesão de longa duração e no risco de desenvolvimento de resistências. Outras casos a ter em conta e que dão preferência ao início deste regime são: doentes de idade avançada em que a progressão da doença é mais rápida, doentes com um elevado risco cardiovascular e presença de comorbilidades (Maggiolo, 2009; Simon et al., 2010).

Relativamente à HAART, o seu início tem por base uma decisão do clínico que deve ser sustentada tendo em conta diferentes elementos, nomeadamente: manifestações clínicas, contagem de linfócitos T CD4⁺, carga vírica plasmática, presença de comorbilidades e grau de colaboração do doente. Em termos gerais, a HAART está recomendada para todos os indivíduos que apresentem uma infeção crónica com um número de linfócitos T CD4⁺ ≤ 500 células/ μ l. (Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA, 2015).

A prescrição da HAART assenta nos seguintes princípios: os regimes baseiam-se na associação de um ARV da coluna A com uma das conformações da coluna B (Tabela 3); sempre que possível o regime inicial deve incluir um análogo não nucleósido inibidor da transcriptase reversa; os inibidores da *protease* potenciados (IP/r) são recomendados em casos de doentes com contraindicações para a prescrição de EFV, RPV e NVP ou naqueles que a opção terapêutica mais adequada não esteja contemplada na Tabela 3.

I. INTRODUÇÃO

Tabela 3 – Regimes preferenciais da HAART em doentes adultos e adolescentes com infeção crónica por VIH-1 (adaptado de Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA, 2015)

A	B	Observações
ITRNN	ITRN	
Efavirenz Rilpivirina	Tenofovir/Entricitabina Ou Abacavir/Lamivudina	Tenofovir/Entricitabina coformulado em comprimido único Abacavir/Lamivudina coformulado em comprimido único. efavirenz /Tenofovir/ Entricitabina coformulado em comprimido único. Rilpivirina/ Tenofovir/ Entricitabina coformulado em comprimido único
Nevirapina	Tenofovir / Entricitabina Abacavir/Lamivudina	Tenofovir / Entricitabina coformulado em comprimido único
IP potenciado com Ritonavir	ITRN	
Atazanavir/ Ritonavir Darunavir/ Ritonavir	Tenofovir / Entricitabina Abacavir/Lamivudina	Atazanavir/ Ritonavir: 300/100 mg <i>qd.</i> Darunavir/ Ritonavir: 800/100 mg <i>qd.</i>

O objetivo da HAART é melhorar o prognóstico da infeção pelo VIH-1, no entanto, a replicação viral que ocorre sob tratamento antirretroviral pode dar origem ao aparecimento de resistências. Na grande maioria dos casos o aparecimento destas resistências resulta na falência virológica. Quando na presença de falência virológica é necessário mudar o regime HAART e, ainda que existam mais de 20 fármacos disponíveis, as resistências virais podem ser resistências cruzadas que afetam vários fármacos de uma mesma classe, o que limita em muito as opções de tratamento (Cressey & Lallemand, 2007; Simon et al., 2010).

Uma das estratégias utilizadas para evitar o aparecimento de resistências virais é a utilização de 3 fármacos que atuem diretamente em dois alvos moleculares distintos. Dado o *turnover* do vírus e o tamanho da população, modelos matemáticos previram que as combinações em que sejam necessárias pelo menos 3 mutações virais para o

aparecimento de resistências, asseguram uma inibição da replicação duradoura (Arts et al., 2012).

A falha do tratamento é resultado, na grande maioria dos casos, da fraca adesão por parte dos indivíduos infetados. Mesmo em alguns casos de adesão estrita, a falha terapêutica pode ser justificada pela variabilidade interindividual da farmacocinética que ocasiona níveis plasmáticos subterapêuticos do fármaco (Cressey & Lallemand, 2007).

A variabilidade ao nível da farmacocinética pode afetar a absorção, distribuição, metabolismo, ligação às proteínas e interações entre fármacos. Muitos estudos foram feitos na tentativa de investigar a relação existente entre as concentrações plasmáticas dos fármacos e a resposta terapêutica e toxicidade. Para os ITRN, a relação entre a resposta terapêutica e as concentrações plasmáticas é pouco compreendida, uma vez que se tratam de pró-fármacos e necessitam de uma biotransformação intracelular para se tornarem ativos (Cressey & Lallemand, 2007). Existem evidências que as concentrações plasmáticas dos ITRNN e IP estão diretamente relacionados com o resultado terapêutico e sintomas de toxicidade. Assim, já foi discutida a proposta de administrar doses personalizadas conforme as características de cada indivíduo, de forma a otimizar os resultados terapêuticos e diminuir os efeitos adversos. De forma a conseguir aplicar esta estratégia seria necessário fazer a monitorização dos níveis plasmáticos dos fármacos escolhidos para o tratamento, no entanto, este passo ainda não faz parte das *guidelines* atualmente seguidas (Cressey & Lallemand, 2007) .

Existem diversos fatores que podem estar na origem da variabilidade existente entre diferentes indivíduos no que toca à sua resposta terapêutica, nomeadamente: interações entre fármacos, é frequente fármacos metabolizados pelos enzimas do citocromo P450 apresentarem interações entre eles; interações entre fármacos e alimentos, em que a biodisponibilidade de fármacos antirretrovirais é reduzida pelos alimentos; comorbilidades, em que a insuficiência hepática pode dar origem a alterações da farmacocinética dos agentes antirretrovirais; gravidez, no segundo e terceiro mês da gravidez a exposição a concentrações plasmáticas com ação terapêutica dos fármacos antirretrovirais é inferior quando comparada com uma mulher não grávida (Cressey & Lallemand, 2007).

I. INTRODUÇÃO

De salientar, a importância das diferenças a nível genético que desempenham um papel fulcral na variabilidade de respostas terapêuticas entre indivíduos. Constatou-se que indivíduos de diferentes grupos étnicos apresentam uma farmacocinética e respostas clínicas significativamente diferentes (Cressey & Lallemand, 2007).

4.2 - Agentes Antiretrovirais

O desenvolvimento de fármacos antirretrovirais passa pela pesquisa de moléculas capazes de inibir eventos específicos do ciclo de vida do vírus sem interferir com o metabolismo normal da célula hospedeira. Entre os agentes antirretrovirais anti-VIH-1 encontram-se os ITRN, que são fosforilados por enzimas celulares, sofrem incorporação no ADN proviral e provocam a terminação da cadeia: os ITRNN, que possuem um mecanismo de inibição, ligando-se a perto do *site* ativo da enzima; os IP, que bloqueiam a clivagem proteolítica das poliproteínas precursoras Gag e Gag-pol, o que faz com que o vírus seja libertado na sua forma imatura e não infecciosa; o inibidor da fusão e o antagonista do recetor CCR5 que impedem a entrada do vírus na célula.

a) Inibidores da protease

A *protease* é o enzima responsável pela clivagem dos precursores das poliproteínas virais gag e gag-pol durante o processo de maturação. Dentro desta classe existem 10 fármacos aprovados: amprenavir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir e tipranavir (Arts et al., 2012).

Nas últimas etapas do ciclo viral, os produtos genéticos *Gag* e *Gag-Pol* são traduzidos em poliproteínas que se transformam em partículas virais imaturas. A *protease* é responsável pela clivagem desses componentes precursores, produzindo as proteínas estruturais finais do cerne do virão maduro (Katzung, Masters, & Trevor, 2009). Esta classe de antirretrovirais tem como mecanismo o bloqueio da proteólise da poliproteína viral, um passo essencial para a produção de partículas virais infecciosas. Os IP estão entre os agentes mais potentes utilizados no combate à infeção, porém, os seus componentes péptidos requerem a coadministração de um agente de *boosting*. Este

agente tem a função de impedir o seu metabolismo, permitindo manutenção concentrações plasmáticas mais elevadas. Deste modo, regimes terapêuticos que contenham um IP, contêm também um quarto fármaco associado, que não tem ação antirretroviral direta, mas que potencia os efeitos do IP. Atualmente, o fármaco ritonavir é o único agente de *boosting* disponível (Arts et al., 2012).

Inicialmente não eram esperadas resistências aos IP devido ao seu papel essencial no ciclo de vida viral e pequeno tamanho (11 kDa). Porém, o gene da *protease* está relacionado com uma série de polimorfismos e substituições que se sabe estarem relacionadas com o aparecimento de resistências (Arts et al., 2012).

Algumas das principais mutações que conferem resistência aos agentes IP são a L101/R/V, M46I/L, I154/M/L, V82A/F/T/S e I84V (Katzung et al., 2009).

A resistência aos IP é criada através de três passos principais: o gene *protease* adquire mutações de resistência primária; a seleção de mutações secundárias/compensatórias da *protease* para corrigir a função enzimática e reiniciar a replicação viral; seleção de mutações nos principais locais de clivagem dos precursores das proteínas *Gag* e *Gag-pol*, que aumentam a produção da *protease* do VIH-1 (Arts et al., 2012; Natella Y. Rakhmanina, b, 2011).

b) Inibidores nucleosídios da transcriptase reversa

Os IRTN possuem ação antirretroviral por meio da inibição competitiva da *transcriptase reversa* viral ou, ainda, através da sua incorporação na cadeia de ADN viral durante a sua formação de forma a ocorrer a interrupção deste processo (Katzung et al., 2009). Os IRTN são pró-fármacos, pelo que necessitam de sofrer uma fosforilação pelas quinases celulares para serem farmacologicamente ativos. A carência de um grupo 3'-hidroxil no açúcar dos IRTN impede a formação da ligação 3'-5'-fوسفодиéster entre os IRTN e as 5'-fosfatases, provocando a paragem da formação da cadeia de ADN viral (Arts et al., 2012).

Esta classe é muitas vezes associada à toxicidade mitocondrial, devido à inibição do ADN gamapolimerase mitocondrial. Por outro lado, estes fármacos também podem

I. INTRODUÇÃO

aumentar o risco de acidose láctica com esteatose hepática, podendo em alguns casos ser fatal (Katzung et al., 2009).

Atualmente, existem 8 fármacos ITRN aprovados pela FDA: abacavir, didanosina, entricitabina, lamivudina, estavudina, zalcitabina, zidovudina, e tenofovir (Arts et al., 2012).

c) Inibidores não nucleosídios da transcriptase reversa

Esta classe de antirretrovirais, tem a capacidade de inibir a *transcriptase reversa* do HIV-1 resultando num bloqueio da ADN polimerase dependente de ARN e ADN. Esta inibição ocorre através da ligação e indução da formação de um “*pocket*” hidrofóbico próximo do local ativo. A ligação dos ITRNN cria uma alteração na conformação espacial do local de ligação do substrato e reduz a atividade da polimerase. O “*pocket*” de ligação dos ITRNN é composto por resíduos hidrofóbicos (Y181, Y188, F227, W229 e Y232) e resíduos hidrofílicos (K101, K103, S105, D192, E224 e E138) (Arts et al., 2012).

Ao contrário dos ITRN, os ITRNN não competem com trifosfatos de nucleosídios, nem necessitam de sofrer fosforilação para se tornarem ativos. A resistência a esta classe de fármacos sucede rapidamente em esquemas de monoterapia e pode ser causada por uma mutação viral isolada (K103N). As mutações K103N e Y181C conferem resistência a toda a classe, enquanto as mutações L100I, Y188C e G190A conferem resistência ao EFV e à nevirapina (Katzung et al., 2009).

Atualmente, estão aprovados 5 ITRNN : etravirina, delavirdina, EFV, nevirapina e rilpivirina (Arts et al., 2012).

d) Inibidores da *integrase*

Todos os inibidores da *integrase* têm como alvo a reação de transferência da cadeia, pelo que são denominados também por inibidores de transferência da cadeia da *integrase*. A seletividade destes fármacos deve-se ao completo conhecimento do seu mecanismo de ação: o inibidor liga-se apenas ao complexo, formado pela *integrase* e o

ADN viral, e interage com dois cofatores de iões metálicos essenciais de magnésio no centro ativo da *integrase* e do ADN. Assim, todos os fármacos desta classe, possuem dois componentes principais: um farmacóforo de ligação ao metal e um grupo hidrofóbico que interage com o ADN viral e o enzima, tornando esta classe a única a interagir com dois elementos fundamentais do vírus (Arts et al., 2012).

Mutações ao nível do centro ativo da *integrase*, perto dos resíduos de aminoácidos que coordenam os cofatores de magnésio, parecem ser o principal mecanismo de resistência existente em relação a estes fármacos (Arts et al., 2012).

e) Inibidores da entrada (inibidores da fusão e antagonistas do CCR5)

O enfuvirtida, um inibidor da fusão que impede a entrada do vírus na célula, é o representante desta classe de fármacos antirretrovíricos. Trata-se de um péptido sintético com 36 aminoácidos que forma uma ligação com a subunidade gp41 da glicoproteína do envelope viral, impedindo que sucedam as alterações de conformação necessárias para a fusão com a membrana celular. O metabolismo desta molécula parece não beneficiar da participação do citocromo P450 e tem por base uma hidrólise proteolítica (Katzung et al., 2009).

O CCR5, que pertence ao recetor acoplado à proteína G, é um recetor β -quimiocina expresso pelas células T CD4+ ativadas e macrófagos derivados de monócitos envolvidos na quimiotaxia. O CCR5 é o principal coreceptor aquando da entrada do VIH-1 na célula (Aquaro et al., 2006).

O antirretroviral maraviroc é capaz de inibir a adsorção do HIV-1 e é um antagonista da interação entre o co-recetor CCR-5 e a glicoproteína gp120 do envelope do vírus, impedindo a entrada do vírus em células não-infetadas. Este fármaco é recomendado em doentes que estejam infetados com o vírus com tropismo para esse recetor (correspondendo a cerca de 50-60% dos doentes que já receberam tratamento antirretroviral). O seu uso não é aconselhado em doentes que apresentem infeção mista ou vírus com tropismo para o recetor CXCR4 (de Oliveira Santos et al., 2008).

I. INTRODUÇÃO

Relativamente aos seus efeitos adversos, os mais comuns são tosse, febre, problemas respiratórios e dor abdominal. Dentro dos mais graves, temos a hepatotoxicidade e o risco de problemas cardiovasculares. A dose recomendada nos adultos é de 150, 300 ou 600mg, duas vezes ao dia (de Oliveira Santos et al., 2008).

4.3 - Efavirenz

O EFV é um ITRNN que é utilizado na terapêutica de combinação para tratar a infeção por VIH-1 mas não é eficaz na infeção pelo vírus da imunodeficiência humana 2 (VIH-2). EFV liga-se diretamente à *transcriptase reversa* e inibe as atividades da *polimerase* ADN e ARN dependente viral (Natella Y. Rakhmanina, b, 2011).

Existem algumas recomendações especiais relacionadas com a prescrição de EFV. O EFV só deve ser prescrito em casos em que haja a ausência de mutações que conferem resistência a ITRNN e em mulheres que não pretendam engravidar (não é recomendado a mulheres grávidas, exceto no 3º trimestre de gravidez). Doentes que possuam distúrbios neuropsiquiátricos e/ou que possuam infeção pelo VIH-2 ou VIH-1 do grupo O não devem ser considerados como candidatos à terapêutica com EFV (Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA, 2015).

Diversos estudos demonstraram que o EFV é um fármaco com uma potente ação antirretroviral, uma vez que possui um tempo de semivida de 40 a 55 horas após múltiplas doses e, quando administrado segundo num esquema HAART, cerca de 80% dos doentes atingem uma carga viral abaixo do limite de deteção (50 cópias/ml). O facto de possuir um elevado tempo de semivida, torna possível um regime de toma única diária, sendo a dose diária recomendada de 600 mg. Atualmente, não existe nenhuma recomendação para ajuste de dose de acordo com o sexo e a raça (Anwar Mulugeta, 2012; Bumpus et al., 2006; Burger et al., 2006; Maggiolo, 2009; Natella Y. Rakhmanina, b, 2011; Sukasem et al., 2013).

O máximo da concentração plasmática do EFV é atingido após 3-5 horas da administração oral e o estado estacionário é atingido em 6-10 dias. A farmacocinética do EFV envolve uma extensa ligação às proteínas (> 99%), especialmente à albumina (Bumpus et al., 2006; Maggiolo, 2009; Natella Y. Rakhmanina, b, 2011).

O EFV possui um perfil de absorção atípico, tendo um modelo que mistura absorção de ordem zero e primeira ordem sequencial, facto que poderá resultar da taxa de absorção limitada pela sua dissolução. O modelo de farmacogenética/farmacocinética demonstrou a influência do sexo e das variações genéticas nos parâmetros farmacocinéticos do fármaco. Em relação ao sexo, quando comparados, indivíduos do sexo feminino apresentam um maior volume de distribuição periférico, possivelmente devido à maior percentagem de massa gorda ou às diferenças existentes entre sexos na ligação às proteínas plasmáticas (Mukonzo et al., 2009).

O EFV é sujeito à clearance hepática maioritariamente pelo CYP2B6 e, em menor extensão, pelos CYP1A2, CYP2A6 e CYP2A4 e CYP3A5 (Anwar Mulugeta, 2012; Bienvenu, Swart, Dandara, & Ashton, 2014; Bumpus et al., 2006; Natella Y. Rakhmanina, b, 2011).

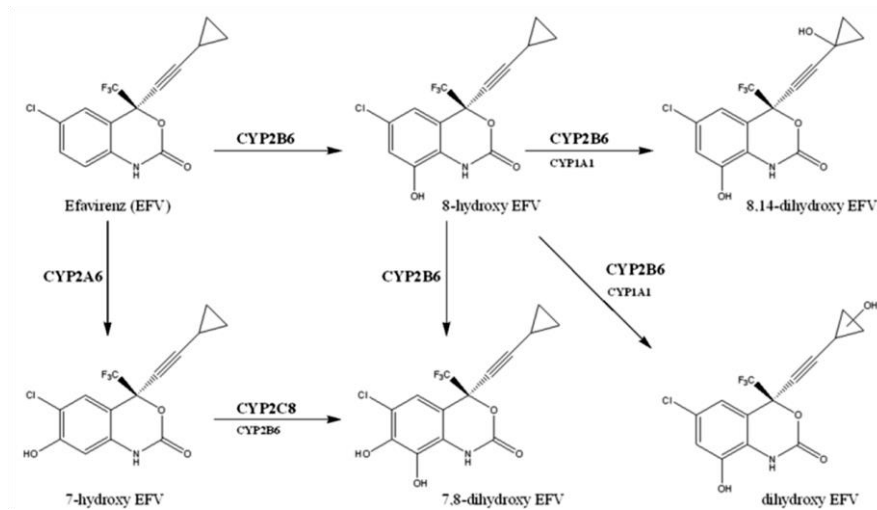


Figura 6 – Esquema do metabolismo mono-oxidativo e dioxidativo do EFV (adaptado de (Avery, VanAusdal, Hendrix, & Bumpus, 2013)

O CYP2B6 é responsável pela hidroxilação do EFV a 8-hidroxi-efavirenz e 7-hidroxi-efavirenz, metabolitos formados em maior e menor quantidade, respetivamente. O CYP2B6 catalisa a segunda hidroxilação do 8-hidroxi-metabolito a 8,14-hidroxi-efavirenz. Os metabolitos são excretados pela urina e bÍlis após sofrerem conjugação (glucoronidação). Aproximadamente 14-34% da dose administrada de EFV é recuperada na urina (menos de 1% da dose é EFV que não sofreu biotransformação) e cerca de 16-61% é recuperada nas fezes (Anwar Mulugeta, 2012; Bumpus et al., 2006;

I. INTRODUÇÃO

Maggiolo, 2009; Natella Y. Rakhmanina, b, 2011; Sukasem et al., 2012; Xexemeku et al., 2009).

Até à data, ainda não foi totalmente explicado o contributo dos metabolitos do EFV na sua ação antirretroviral. Avery e seus colaboradores, 2013, analisaram o impacto do 8-hidroxiefavirenz, 7-hidroxiefavirenz e 8,14-hidroxiefavirenz na infecção por VIH-1. Com base nas concentrações observadas foi possível concluir que os metabolitos monoxidados e dioxidados não são farmacologicamente ativos contra o VIH-1, uma vez que existe uma extensa ligação às proteínas pelo que não existe metabolito livre suficiente para contribuir com a ação farmacológica (Avery et al., 2013).

Os efeitos secundários mais notórios associados à toma de EFV estão relacionados com sintomas ao nível do sistema nervoso central e urticária. A urticária é considerada um efeito adverso bastante frequente provocando a descontinuação da terapêutica em cerca de 2% dos doentes. Distúrbios ao nível do sistema nervoso central e do foro neuropsiquiátrico têm sido reportados em cerca de 25-70% dos doentes. Os sintomas incluem tonturas, cefaleias, confusão, amnésia, anomalias do sono (sonhos e insónias). Os sintomas mencionados anteriormente surgem nos primeiros dias do tratamento e, apesar de diminuírem com a continuação da terapia, dão origem a uma descontinuação precoce da terapêutica por parte de 4-10% dos indivíduos. Outras manifestações mais graves incluem depressão, ansiedade, nervosismo, e alguns casos de morte por suicídio (Maggiolo, 2009; Natella Y. Rakhmanina, b, 2011).

O complexo enzimático do citocromo P450 é o principal metabolizador, responsável pela clearance ao nível do fígado, dos inibidores da *transcriptase reversa* não nucleósidos e inibidores da *protease*. Vários polimorfismos existentes ao nível dos enzimas do citocromo P450 são conhecidos por influenciarem o metabolismo de fármacos, provocando por vezes o aumento ou diminuição do seu metabolismo. Adicionalmente, existem ainda as glicoproteínas-P cuja atividade no efluxo da membrana celular altera a distribuição intracelular de alguns antirretrovirais, nomeadamente, os inibidores da *protease*. Polimorfismos presentes nos genes que codificam estes transportadores de proteínas modificam a sua expressão e atividade, tendo influência direta sobre a eficácia de certos fármacos (Rodríguez-Nóvoa et al., 2006).

Uma terapêutica efetiva para o tratamento da infeção pelo VIH traduz-se num esquema que inclui, frequentemente, o EFV, um inibidor da transcriptase reversa não nucleósido, juntamente com mais dois inibidores da transcriptase reversa. (Ingelman-Sundberg et al., 2007; Sukasem et al., 2013).

O EFV é um fármaco utilizado no tratamento da infeção pelo VIH devido às suas propriedades farmacológicas em termos de potência e conveniência. Este possui um intervalo terapêutico que se situa entre os 1 e 4 µg/ml, sendo, pois, um fármaco com uma estreita margem terapêutica. Estudos demonstraram que níveis plasmáticos acima dos 4 µg/ml estão relacionados a um maior número de efeitos adversos ao nível do sistema nervoso central e, por outro lado, concentrações abaixo dos 1 µg/ml estão associados a falência virológica. As variações que ocorrem no metabolismo hepático deste fármaco estão diretamente relacionadas com as variações que ocorrem ao nível plasmático (Bienvenu et al., 2014; Burger et al., 2006; Powers, Ward, & Gompels, 2009; Rodríguez-Nóvoa et al., 2006).

O EFV detém uma fraca defesa genética em relação às resistências. Uma única mutação, como é o caso da K103N no gene da *transcriptase reversa*, é suficiente para criar resistência ao EFV. O desenvolvimento de resistências ao EFV pode dever-se a uma exposição repetitiva a concentrações de fármaco subterapêuticas (Sukasem & Sungkanuparph, 2013).

4.4 - Influência dos SNPs CYP2B6 516G>T e 785A>G no metabolismo do EFV

As formas polimórficas do citocromo P450 são frequentemente responsáveis pelo desenvolvimento de efeitos adversos. Foi demonstrado que 56% dos fármacos citados nos estudos de efeitos adversos são metabolizados por enzimas polimórficos de fase I, enquanto apenas 20% dos fármacos que são metabolizados por enzimas não polimórficos são referenciados (Ingelman-Sundberg, 2005).

Estes polimorfismos devem ser tidos em consideração, uma vez que a administração de doses *standart* de um determinado fármaco na presença de um polimorfismo farmacogenético pode dar origem a toxicidade, aumento ou diminuição

I. INTRODUÇÃO

do efeito terapêutico, visto que a metabolização normal do fármaco vai estar alterada (Rogers et al., 2002). Estima-se que cerca de 20-25% de todas as terapias farmacológicas são influenciadas pela existência de determinados polimorfismos e, em última análise, a presença destas alterações poderá afetar o resultado pretendido com a terapêutica aplicada (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

Como já foi referido anteriormente, existem 29 alelos diferentes do gene CYP2B6. Os portadores das variantes CYP2B6*6, *9, *16, *26, *27 e *28 são caracterizados, por vários estudos, como metabolizadores lentos do efavirenz. O CYP2B6*6 (516G>T e 785A>G) , o alelo mais estudado, está associado a concentrações de efavirenz mais elevadas (Sukasem et al., 2012).

Vários estudos corroboraram a hipótese das concentrações plasmáticas de EFV serem afetadas por polimorfismos no CYP2B6. O SNP 516G>T está localizado no exão 4 do gene CYP2B6 e dá origem a uma mudança do aminoácido glutamina para histidina na posição 172 da sequência de aminoácidos. Este SNP é responsável por um *splicing* anormal tendo como resultado a diminuição da expressão e função da CYP2B6 (Ariyoshi, Miyazaki, Toide, Sawamura Yi, & Kamataki, 2001; Powers et al., 2009; Weber et al., 2015). Também o alelo CYP2B6*6 com duas variantes não sinónimas (516G>T e 785A>G) tem sido associado a uma menor expressão proteica (Weber et al., 2015).

O CYP2B6 516G>T é o polimorfismo com maior influência sobre a farmacocinética do EFV. Existe uma variação da expressão deste polimorfismo entre diferentes étnicas. Esta variante ocorre mais frequentemente em indivíduos negros e afroamericanos do que em caucasianos. As concentrações plasmáticas de EFV são mais elevadas em indivíduos possuidores do genótipo 516TT do que indivíduos 516GG (Anwar Mulugeta, 2012; Thorn et al., 2011).

Diferentes estudos demonstraram que o polimorfismo CYP2B6 516G>T dá origem a uma diminuição da clearance do EFV devido à redução da atividade do enzima CYP2B6 . Como resultado, as concentrações do EFV mantem-se em níveis plasmáticos elevados podendo provocar uma situação de toxicidade ao nível do sistema nervoso central, como pode ser observado na (Ribaud et al., 2010; Sukasem et al., 2013).

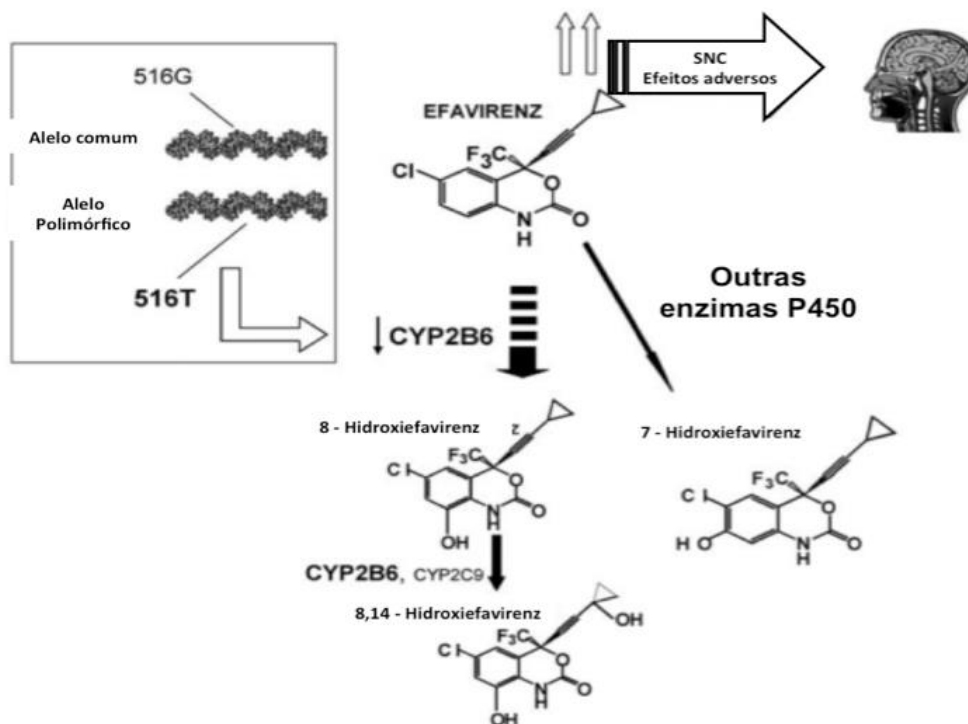


Figura 7 – Influência do polimorfismo CYP2B6 516G>T no metabolismo do EFV (adaptado de Rodríguez-Nóvoa et al., 2006).

Foi demonstrado que a média da área sob a curva (AUC), concentração plasmática de fármaco ao longo do tempo, em indivíduos infetados pelo VIH era claramente diferente na presença do genótipo CYP2B6 516G>T. Assim, os níveis plasmáticos de EFV excederam 47 ng/ml durante 121 dias em 5% dos indivíduos com genótipo GG, 5% dos indivíduos com genótipo GT e 29% dos indivíduos com genótipo TT (Ingelman-Sundberg et al., 2007). Estes dados indicam que o genótipo CYP2B6 516T está associado a um aumento das concentrações plasmáticas do EFV durante o tratamento com este fármaco, sendo de esperar o aparecimento de efeitos adversos ao nível do sistema nervoso central e aumento do risco de desenvolvimento de resistências em indivíduos que abandonem a terapêutica (Caroline F. Thoarn, Jatinder K. Lambac, Vishal Lambad, Teri E. Kleina & Altmana, 2011; Ingelman-Sundberg et al., 2007; Maggiolo, 2009; Natella Y. Rakhmanina, b, 2011; Rodríguez-Nóvoa et al., 2006).

Um estudo japonês, indivíduos homocigóticos para o alelo CYP2B6*6 que contém os polimorfismos 516G>T e 785A>G, verificou que existia um aumento significativo das concentrações plasmáticas de EFV (25 µM) quando comparados com indivíduos que eram heterocigóticos (10 µM) ou que não tinham o alelo *6 (8 µM). Em

I. INTRODUÇÃO

síntese, os polimorfismos estão associados a alterações nas concentrações plasmáticas de EFV e, naturalmente, com efeitos tóxicos ao nível do sistema nervoso central, razão pela qual, a prescrição de doses de EFV mais baixas em indivíduos com o genótipo TT de forma a minimizar os efeitos adversos, sem nunca comprometer a eficácia da terapêutica. (Rodríguez-Nóvoa et al., 2006).

Por outro lado, o alelo CYP2B6*16 é bastante comum na população africana (16%), e a sua expressão produz um enzima que é menos eficiente que o enzima CYP2B6*1. Apesar, dos indivíduos que possuem este alelo, em especial aqueles com possuem em combinação o alelo CYP2B6*6, atingem concentrações plasmáticas de EFV mais elevadas do que o que seria de esperar com uma dose dita *standart*, mas não tóxicas. Nestes casos, é possível utilizar este tipo de alteração como uma estratégia para melhorar a eficácia do tratamento antirretroviral (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

A variante CYP2B6 785A>G é observada sozinha no alelo CYP2B6*4 e também em combinação como parte de outros haplótipos como o CYP2B6*6. É encontrada em cerca de 15% dos Asiáticos e até 50% dos negros e afro-americanos (Thorn et al., 2011).

Sukasem e seus colaboradores, observaram que os SNPs mais frequentes numa população de 100 tailandeses infetados pelo VIH-1 eram o CYP2B6 785A>G (63%) e o 516G>T (56%). (Sukasem et al., 2013). Num outro estudo, os mesmos investigadores observaram que indivíduos com a substituição de nucleótido 785A>G apresentavam concentrações plasmáticas de EFV mais elevadas do que as concentrações otimizadas e consideradas terapêuticas, enquanto os indivíduos com a variante homocigótica 785GG tinham as concentrações plasmáticas mais elevadas do que as encontradas nos outros genótipos (785AA e 785AG) (Sukasem et al., 2012).

A redução da dose de EFV deve ser considerada em indivíduos homocigóticos CYP2B6*6 516TT e 785GG, de forma a diminuir os efeitos adversos e o risco de desenvolvimento de resistências. Assim, deve ser recomendada a identificação do genótipo CYP2B6 em doentes que fazem EFV de forma a prever qual o seu tipo de metabolismo. No sentido de obter as concentrações de estado-estacionário dentro do intervalo terapêutico (1-4 mg/L), é aconselhada a implementação gradual de uma redução da dose para 400 ou 200 mg/dia para indivíduos que são metabolizadores intermédios ou lentos, respetivamente (Sukasem & Sungkanuparph, 2013) .

Gatanaga e seus colaboradores, 2007, comprovaram que a redução da dose de EFV para 400 ou 200 mg, em indivíduos com o SNP CYP2B6 516G>T que apresentavam concentrações plasmáticas superiores a 6000 ng/ml com a dose *standart*, teve como resultado a descida das concentrações de EFV para valores dentro do intervalo considerado terapêutico. Para além disso, também ocorreu uma significativa melhoria dos efeitos adversos ao nível do sistema nervoso central. A carga viral foi eficazmente diminuída para níveis abaixo dos limites de deteção (50 cópias/ml) mesmo com a diminuição da dose de 600 para 400 ou 200 mg (Gatanaga et al., 2007a; Sukasem & Sungkanuparph, 2013).

Desta forma, o teste de genotipagem para variantes funcionais como CYP2B6*6, que contém os polimorfismos 516G>T e 785A>G, antes do início da terapêutica com EFV, é recomendado para identificar doentes que possam estar em risco de sofrer neurotoxicidade. Apesar do custo económico ser um problema para a identificação do genótipo CYP2B6, já foi desenvolvido um teste no *Laboratory for Pharmacogenomics* na Tailândia que tem por base um sistema de deteção com base num ensaio de PCR e que custa apenas \$67 (aproximadamente 60 euros) por teste (Sukasem & Sungkanuparph, 2013).

Num futuro próximo, a genotipagem do CYP2B6 poderá fazer parte da prática clínica comum. Pela primeira vez, será possível prescrever a dose correta de EFV para cada doente. A utilização de medicação antirretroviral tornar-se-á mais segura e mais efetiva (Sukasem & Sungkanuparph, 2013).

II - Materiais e métodos

1 - Seleção e caracterização da amostra

Os consentimentos informados para as colheitas de sangue e determinação de testes genéticos dos 50 indivíduos do estudo foram previamente aprovados pela comissão de ética do Centro Hospitalar Lisboa Norte/ Faculdade de Medicina de Lisboa.

Após obtenção de consentimento informado escrito, foram incluídos na amostra analisada 50 indivíduos infetados pelo VIH seguidos na consulta de doenças infecciosas no Hospital Santa Maria.

Os participantes que fizeram parte deste estudo tiveram de se adequar aos critérios de inclusão, sendo estes: infeção pelo VIH e submetido a tratamento com EFV. Os critérios de exclusão foram: o abandono da terapêutica, morte e ausência de comparência às consultas de acompanhamento.

2 - Procedimento

Extração do ADN

A extração de ADN foi efetuada a partir de amostras de 1 ml de sangue, recolhidas em tubos que foram congeladas a -80°C até à extração. A extração do ADN (*Perfectpure ADN Blood kit – 5prime*) inclui diferentes processos: lise dos eritrócitos para isolar os glóbulos brancos, seguida da lise dos glóbulos brancos para ocorrer a libertação do ADN para a solução, ligação a uma fase sólida que permite a eliminação de contaminantes, lavagem da coluna e, por fim, eluição do ADN purificado. A etapa da lise dos glóbulos vermelhos remove a hemoglobina e uma grande quantidade da fração proteica da amostra. A lise dos glóbulos brancos rompe as membranas celulares e desnatura as proteínas celulares, libertando o ADN para a solução. O ADN liga-se a um suporte sólido de fibra de vidro e os contaminantes são removidos através da lavagem

da coluna, sendo o ADN purificado eluído num tampão de baixa força iónica e com pH neutro (10mM Tris-Cl, 1mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)).

2.1 - SNP 516G>T

Amplificação por PCR-RFLP

PCR-RFLP é uma técnica de amplificação *in vitro* de uma sequência específica de ADN. Um PCR típico contém um molde de ADN que contém a sequência alvo a ser amplificada, 2 *primers* que são complementares à sequência alvo, nucleótidos, e um *ADN polimerase* termoestável. A mistura de reação passa repetidamente por várias etapas, como períodos de desnaturação pela temperatura, *annealing*, e extensão, resultando na amplificação exponencial da sequência de ADN alvo.

A amplificação por PCR foi realizada utilizando o kit *Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads*. As sequências foram amplificadas em tubos do kit, contendo a seguinte mistura reacional, sob a forma de esferas termoestáveis: estabilizadores, *bovine serum albumin* (BSA), desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), *puReTaq ADN polimerase* e tampão de reação. A este kit apenas é necessário adicionar água, ADN e *primers* para um volume final de 25µl. Cada *bead* foi adicionada de 20µl de ADE, 1µl de *primer reverse*, 1µl de *primer forward* e 3µl de amostra. Foi igualmente necessário preparar um controlo negativo, no qual a mistura reacional era a mesma, mas com a devida substituição por água destilada estéril do volume equivalente de ADN utilizado nas amplificações.

As sequências de oligonucleótidos iniciadores, utilizados na amplificação dos fragmentos de ADN estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Sequência de oligonucleótidos dos *primers forward e reverse*

<i>Primers</i>	Sequência de oligonucleótidos
<i>Forward</i>	5'-TGTTGTAGTGAGAGTTCAATG-3'
<i>Reverse</i>	5'-CTATCCCTGTCTCACCGTC-3'

II. MATERIAIS E MÉTODOS

As condições de reação utilizadas, num termociclador *Mastercycler personal* (*Eppendorf*) foram: 95°C, 15 minutos- 1 ciclo; 94°C, 30 segundos, 55°C, 1 minuto, 72°C 50 segundos- 35 ciclos; 72°C, 10 minutos- 1 ciclo.

Para preparar as amostras a aplicar nos poços do gel foram preparados tubos com 1µl de produto de PCR e 4µl de *loading buffer*. O *loading buffer* tem como função dar densidade ao ADN para este correr ao longo do gel.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão de tris-acetato-EDTA (TAE) 1x, e a migração ocorreu a 90 Volts durante aproximadamente 40 minutos. O marcador de pesos moleculares (M) utilizado foi o *BioLabs™ 100bp ADNLadder*, com o perfil electroforético apresentado na Figura 8.

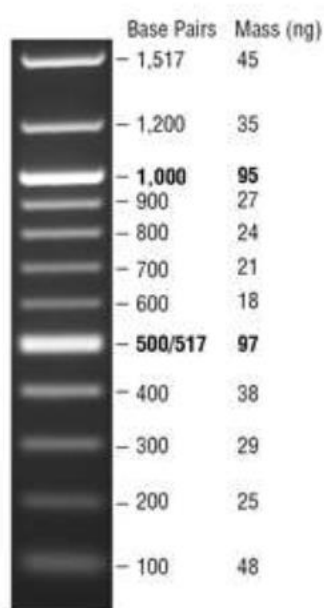


Figura 8 – Perfil electroforético do marcador de pesos moleculares *BioLabs™ 100bp ADN Ladder*

Restrição enzimática

Para a restrição enzimática das amostras utilizou-se o enzima *BsrI*, sendo os produtos da restrição enzimática analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1x, a 90 Volts durante aproximadamente 45 minutos. O marcador de pesos moleculares utilizado foi o *BioLabs™ 100bp ADN Ladder*.

O local de hidrólise enzimática pelo enzima *BsrI* está descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Local de hidrólise enzimática pelo enzima *BsrI*

Enzima de Restrição	Local de hidrólise enzimática
<i>BsrI</i>	$5' \dots \text{ACTGGN}^{\nabla} \dots 3'$ $3' \dots \text{TGAC}^{\blacktriangle} \text{CN} \dots 5'$

Na reação de restrição para cada reação utilizou-se 5µl de produto de PCR, 1µl de enzima de restrição *BsrI*, 1,5µl de *buffer* 3.1 e 7,5µl de ADE, sendo o volume final de cada reação de 15µl.

A observação do gel de agarose permite verificar a existência de três resultados possíveis: presença de 2 bandas (310 pb e 207 pb) em que o indivíduo seria *wild-type* G/G, uma banda (517 pb) em que o indivíduo seria homocigótico para a mutação e três bandas (517 pb, 310 pb, 207 pb) em que o indivíduo seria heterocigótico para a mutação, como pode ser observado pelo esquema da Figura 9.

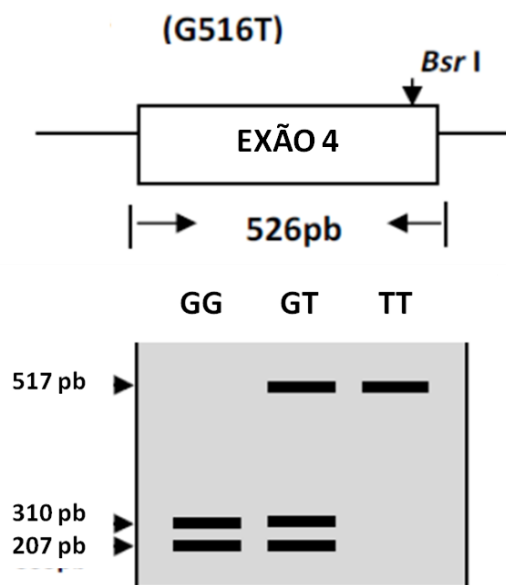


Figura 9 – Esquema do gel de eletroforese e bandas esperadas para cada genótipo

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Purificação dos produtos da PCR para sequenciação

No sentido de obter dados de sequenciação com elevada qualidade é necessário que a reação do PCR seja específica. Deste modo, procede-se à remoção dos *primers* de PCR e de nucleótidos não incorporados antes do produto ser sequenciado.

Assim, antes da sequenciação propriamente dita, foi necessário fazer a purificação dos produtos de PCR. Para a purificação dos produtos de PCR, utilizou-se o *kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*. Este kit permite uma rápida purificação de produtos de PCR, bem como, a extração de fragmentos de ADN a partir de géis de agarose. O *kit* tem por base três etapas principais:

Ajuste das condições de ligação do ADN: adicionou-se 50µl de mistura de produto de PCR (26µl de água e 24µl de produto de PCR) com 100µl de *buffer* NTI;

Ligação do ADN: colocou-se a coluna de lavagem do *kit* num tubo coletor de 2 ml e adicionou-se 150µl da mistura de amostra mais *buffer*, centrifugou-se durante 1 minuto a 14000 rpm;

Lavagem através da membrana de sílica: adicionou-se 700µl de *buffer* NT3 à coluna, seguida de centrifugação durante 1 minuto a 14000 rpm.

Sequenciação

Os produtos de PCR purificados foram encaminhados para os laboratórios da STAB-VIDA com intuito de serem submetidos à sequenciação pelo método de Sanger, em que apenas se utilizou o *primer forward* (sequenciação de 5' para 3').

As sequências obtidas após a sequenciação foram analisadas com o programa *BioEdit*. O *BioEdit* é uma ferramenta que permite analisar as amostras através do seu *electrophoretogram* com possibilidade de identificação de genótipos.

2.2 - SNP 785A>G

Para a identificação da mutação 785A>G utilizou-se um procedimento com duas etapas baseado no procedimento descrito no artigo de Jacob e seus colaboradores., 2004).

A amplificação e a genotipagem dos fragmentos pretendidos nas regiões codificantes do gene CYP2B6 foram realizadas por Nested PCR, que possui duas fases: o PCR *multiplex* e *Allele-Specific* PCR utilizando diferentes *primers*. A reação de PCR *multiplex* teve como objetivo amplificar os fragmentos de genes nas regiões regulatórias e com exões, de forma a garantir que apenas se amplificou o gene CYP2B6, e não o pseudogene CYP2B7.

Posteriormente e, no sentido de confirmar os genótipos obtidos para cada amostra, realizou-se a técnica TaqMan[®] RT-PCR.

Amplificação por PCR *multiplex*

O PCR *multiplex* possui a vantagem de ter a capacidade de amplificar simultaneamente diferentes sequências numa única reação.

A reação de PCR *multiplex* efetuou-se com o auxílio do kit *Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads*. A cada *bead* foi adicionado 1µl de *primer* mpr-5F, 1µl de *primer* mpr-6R, 5µl de amostra e 18µl de água destilada esterilizada (ADE).

As sequências de oligonucleótidos utilizados nesta reação apresentam-se na Tabela 6.

Tabela 6- Primers multiplex para amplificação dos fragmentos do gene CYP2B6

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Exão amplificado	Tamanho do produto (bp)
mpr-5F	GTAGTCCTAACATGTCAGCAG	5 + 6	1524
mpr-6R	AGAGCCTACAGTGCTCCCA		

II. MATERIAIS E MÉTODOS

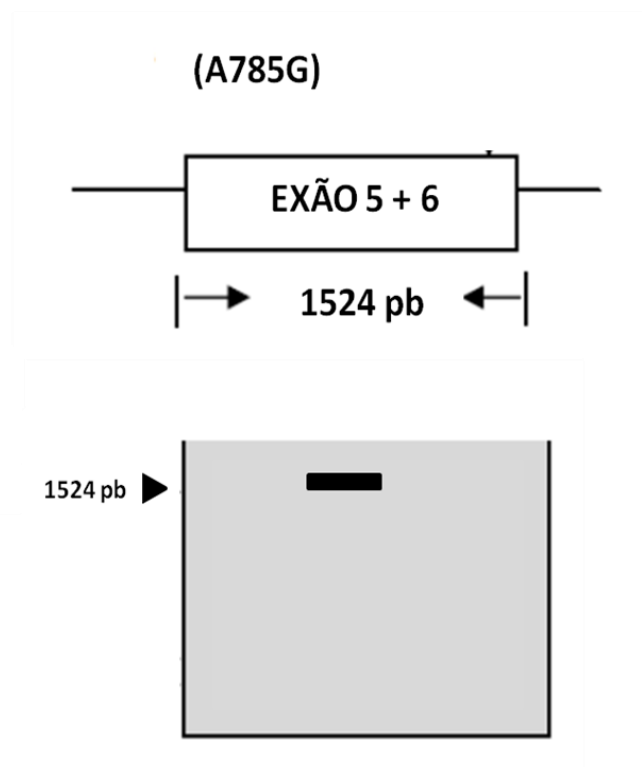


Figura 10 - Esquema do gel de eletroforese e tamanho da banda esperada.

Na reação multiplex utilizaram-se as seguintes condições: 94°C durante 4 minutos – 1 ciclo; 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 68°C durante 2 minutos – 20 ciclos; 68°C durante 10 min – 1 ciclo.

Os produtos do PCR multiplex foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1x. Adicionaram-se 4µl de *loading buffer* a 1µl de produto de PCR, sendo esta mistura aplicada nos poços do gel. A migração ocorreu a 90 volts durante cerca de 40 minutos. O marcador de pesos molecular utilizado foi o *Lambda ADN- Hind III*, cujo perfil eletroforético se encontra ilustrado na Figura 11.

Lambda DNA/HindIII Marker

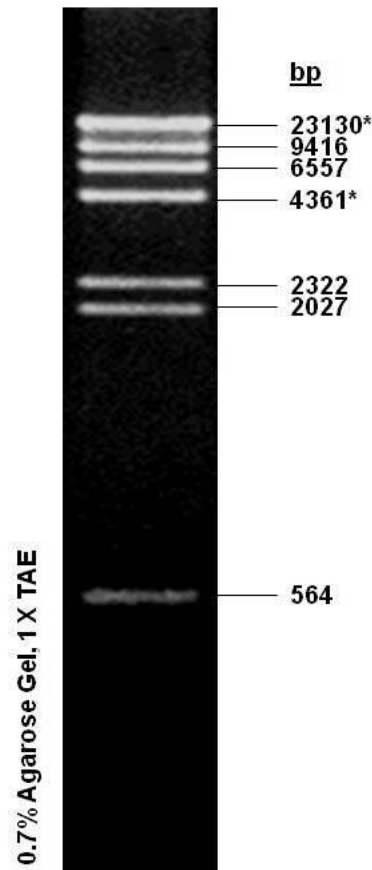


Figura 11 – Perfil eletroforético do marcador de pesos moleculares *Lambda ADN- Hind III*.

Genotipagem por *Allele-Specific PCR*

As amostras foram genotipadas através da reação de PCR que era composta por: 1µl de uma diluição de 1:100 do produto de PCR multiplex; 1µl *primer 785con*; *primer 785A* e 22µl de água milli-Q.

As 50 amostras foram também sujeitas a outra reação que continha a mesma mistura descrita anteriormente mas com a substituição do *primer 785A* pelo *primer 785G*.

Estas duas reações foram sujeitas às seguintes condições: 96°C, 1 minuto – 1 ciclo; 96°C, 20 segundos, 70°C, 45 segundos, 72°C, 25 segundos – 5 ciclos; 96°C, 25 segundos, 65°C, 50 segundos, 72°C, 30 segundos – 21 ciclos, 96°C, 30 segundos, 55°C, 60 segundos, 72°C, 30 segundos – 4 ciclos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

De seguida os produtos de PCR e respetivos controlos negativos foram sujeitos a uma eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1x, e a migração ocorreu a 90 volts durante aproximadamente 40 minutos.

Tabela 7 – *Primers* específicos dos alelos da CYP2B6

SNP	<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'
785A>G	785A-WT	GTAGGTGTCGATGAGGTCTT
	785G-MUT	TAGGTGTCGATGAGGTCCC
	785con	GAGATATAGAGTCAGTGAGTGA

Confirmação dos resultados por TaqMan[®] RT-PCR

As amostras foram sujeitas a uma análise por RT-PCR no sentido de obter uma confirmação dos resultados obtidos através do procedimento aplicado anteriormente. Esta técnica utilizou a sonda TaqMan[®] que possibilita o aumento da especificidade do RT-PCR. A técnica de RT-PCR possui uma maior sensibilidade e reprodutibilidade quando comparada com a técnica de PCR, daí a sua escolha para a confirmação dos resultados.

No TaqMan[®] RT-PCR é utilizada uma sonda fluorogénica denominada enzima termoestável ADN *polimerase Thermus aquaticus (Taq)*. A sonda possui um emissor de fluorescência ligado à sua extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3'. Se a sequência alvo está presente, então a sonda liga-se e é clivada pela atividade da nucleasse 5' da *Taq polimerase* durante a fase de extensão do PCR. Enquanto não ocorre a clivagem da sonda, a emissão de fluorescência é absorvida pelo *quencher*. A clivagem da sonda separa o emissor de fluorescência do *quencher*, pelo que ocorre a emissão de fluorescência que é medida e é proporcional à quantidade do fragmento amplificado (Arya, Shergill, Williamson, Gommersall, & Arya, 2005).

III - Resultados e discussão

Com o presente trabalho, pretendeu-se identificar a mutação 516G>T e a 785A>G numa amostra de 50 indivíduos sujeitos à TAR com EFV. Para isso, foi necessário aplicar diferentes técnicas de forma a ser possível amplificar as sequências codificantes do CYP2B6.

As informações relativas a cada um dos participantes incluídos neste estudo foram organizadas numa base de dados codificada elaborada no programa “Microsoft Excel”. A análise das amostras foi realizada tendo em conta os dados obtidos durante a investigação, comparando as frequências alélicas e genotípicas entre géneros e raças. A análise estatística foi elaborada utilizando o teste qui-quadrado a um nível de significância de 95%. O número observado em cada uma das mutações foi comparado com o resultado que seria esperado para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

1 - SNP 516G>T

Amplificação por PCR

A amplificação com recurso à técnica de PCR foi realizada com o intuito de amplificar o ADN de forma a ser possível submetê-lo às técnicas de RFLP e de sequenciação numa fase posterior. Uma vez terminado o procedimento de amplificação do ADN realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v). Assim, foi possível analisar qualitativamente a concentração do ADN, verificar se as sequências codificantes solicitadas foram amplificadas e se a amostra não apresentava indícios de contaminação por outro ADN.

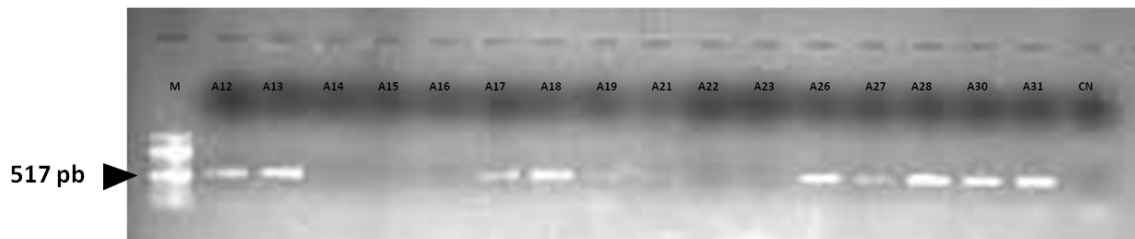


Figura 12 – Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do gene *CYP2B6*, utilizando o marcador *BioLabs™100bp ADN Ladder*.

A maior parte das amostras apresentaram uma banda com o fragmento do tamanho esperado (517pb). Algumas amostras não apresentaram nenhuma banda e esta continua ausência de bandas poderá significar que as amostras iniciais encontravam-se degradadas devido, por exemplo, a um tempo de armazenagem demasiado longo, ou ainda, a uma baixa concentração de ADN extraído.

Restrição enzimática

Procedeu-se à restrição dos produtos de PCR com auxílio da enzima *BsrI*, sendo posteriormente analisado o seu perfil eletroforético por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v). A mutação 516G>T é detetada pela visualização de uma banda de 517 pb. Assim, se o indivíduo for normal (GG) apresentar apenas duas bandas uma de 310 pb e outra de 207 pb, se o indivíduo for heterozigótico (GT) apresenta três bandas, uma com 517 pb, outra com 310 pb e uma última com 207 pb, no caso de o indivíduo ser homozigótico (TT) para a mutação apresenta apenas uma banda de 517 pb.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

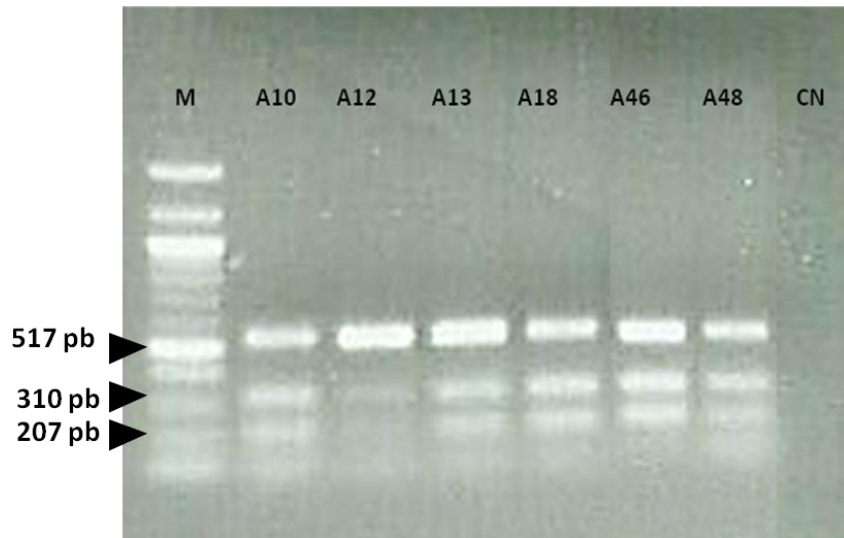


Figura 13 – Perfil eletroforético de alguns produtos da restrição enzimática do gene CYP2B6 com o enzima *BsrI*, utilizando o marcador *BioLabs™100bp ADN Ladder*.

Da observação dos perfis eletroforéticos foi possível inferir que grande percentagem das amostras apresentavam três bandas com 517, 310 e 207pb, indicando que estas possuíam o genótipo 516GT. Porém, para algumas amostras não foi possível identificar o seu genótipo com total certeza. Tomemos como exemplo a amostra A12: pela observação da Figura 13 verificou-se que apresentava uma banda com 517pb com uma elevada intensidade o que indicaria um genótipo homozigótico para a mutação (516TT), no entanto, existem algumas bandas mais ténues na zona dos 310 e 207pb, o que suscitou dúvidas relativamente ao genótipo desta mesma amostra. Efetivamente, após a confirmação dos resultados por sequenciação, ficou demonstrado que nenhuma das amostras analisadas apresentava o genótipo homozigótico 516TT.

Sequenciação

Os produtos de PCR já purificados que foram enviados para o laboratório da STABVIDA e, posteriormente, analisados com recurso ao programa *BioEdit*.

Na Figura 14 pode-se observar o *electrophoretogram* de uma amostra com o genótipo heterozigótico 516GT.

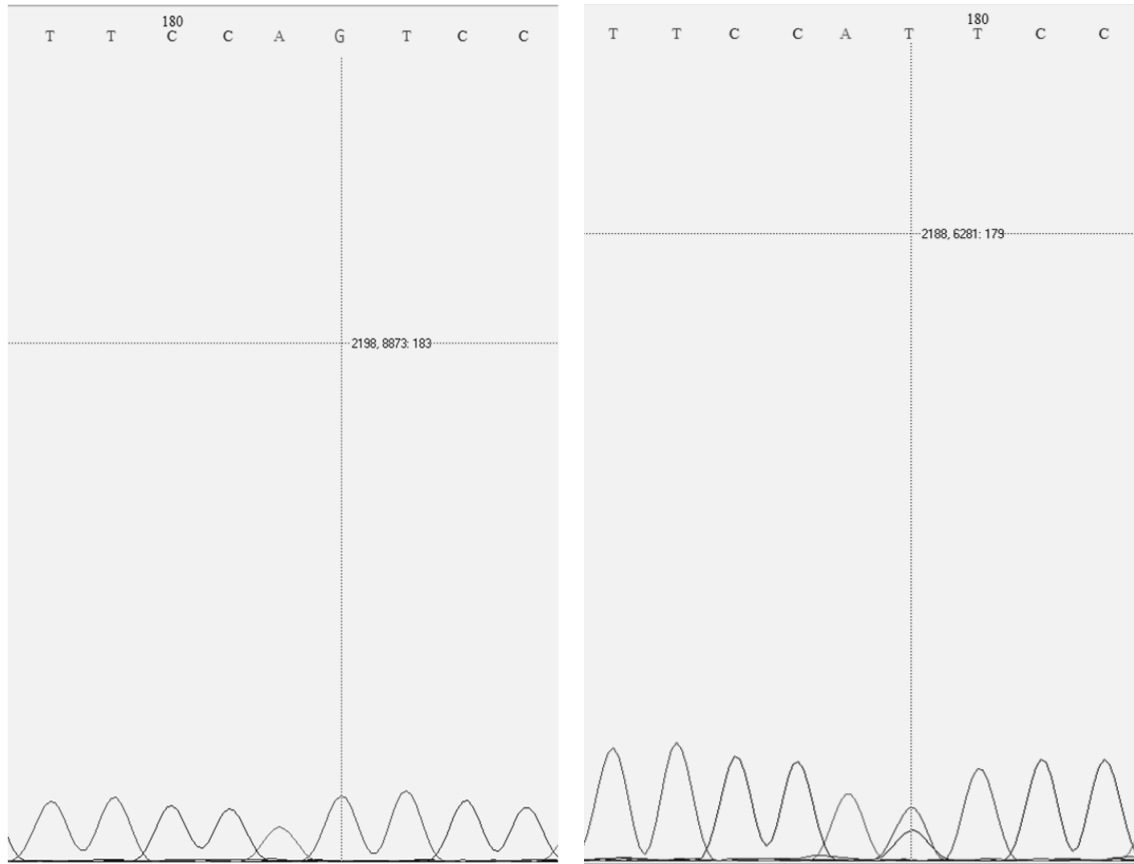


Figura 14 – *Electrophoretogram* de uma amostra com o genótipo homocigótico 516 GG e heterocigótico 516GT.

Em seguida, será apresentada na Tabela 8 com as frequências de cada genótipo encontradas na amostra analisada. Duas amostras não foram passíveis de análise devido à escassa qualidade do ADN.

Tabela 8 – Frequência genotípicas e alélicas na amostra de 48 indivíduos.

		n	Freq.(%)
Genótipo	GG	21	43.75
	GT	27	56.25
Alelos	G	69	71.88
	T	27	28.12

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 48 amostras, 21 amostras (43,75%) apresentaram o genótipo GG e 27 (56,25%) o genótipo GT. O genótipo TT não foi observado em nenhuma das amostras analisadas. As frequências alélicas para os genótipos G e T foram 71,88% e 28,12%, respectivamente.

Em seguida, será apresentada a Tabela 9 com dados relativos às frequências dos três genótipos, provenientes de diferentes estudos.

Tabela 9 – Frequências dos polimorfismos CYP2B6 516G>T em diferentes estudos (adaptado de Anwar Mulugeta, 2012).

Artigos	Tamanho da amostra	Frequência dos polimorfismos CYP2B6 516G>T		
		GG (%)	GT (%)	TT (%)
Uttayamakul et al.	101	67 (66.3)	28 (27.7)	6 (6)
Haas et al.	157	83 (52.9)	60 (38.2)	14 (8.9)
Powers et al.	206	105 (51.0)	82 (39.8)	19 (9.2)
Saitoh et al.	367	187 (51.0)	148 (40.3)	32 (8.7)

Como é possível verificar pelos dados recolhidos de diferentes estudos, a frequência dos diferentes polimorfismos não é constante de ensaio para ensaio. De salientar, que a frequência do genótipo GG é, na grande maioria dos estudos aqui apresentados, predominante relativamente aos outros genótipos. O genótipo TT é o que conquista, consistentemente, a menor frequência em todos os estudos.

A análise dos genótipos da amostra deste trabalho, não revelou a presença do genótipo TT, podendo este evento dever-se ao reduzido tamanho de amostragem. Como se pode constatar pela Tabela 9, as amostras nos outros estudos encontram-se na ordem das centenas, enquanto a descrita neste trabalho possuía apenas 48 indivíduos.

Relativamente ao estudo da distribuição das frequências genotípicas e alélicas no sexo masculino e feminino, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 10 e Tabela 11, respectivamente.

Tabela 10 – Distribuição das frequências genotípicas no sexo masculino e feminino.

Genotipo	Homens	(%)	Mulheres	(%)	P-value
GG	17	(35.4)	4	(8.3)	1
GT	22	(45.8)	5	(10.4)	

Tabela 11 – Distribuição das frequências alélicas no sexo masculino e feminino.

Alelo	Homens (%)	Mulheres (%)	P-value
G	56 (58.3)	13 (13.5)	1
T	22 (22.9)	5 (5.2)	

A análise estatística demonstrou a distribuição das frequências genotípicas e alélicas é a mesma para homens e mulheres ($p > 0,05$).

Apesar de existirem alguns estudos que descrevem a existência de maior atividade da CYP2B6, bem como, maiores concentrações de proteína e mRNA nos fígados de indivíduos do sexo feminino, não foram encontradas diferenças, ao nível da frequência dos diferentes genótipos, estaticamente significativas entre os dois sexos (Ilic et al., 2013).

De igual forma, a distribuição das frequências genotípicas e alélicas foram estudadas entre caucasianos e negros, como resumido na Tabela 12 e Tabela 13.

Tabela 12 – Distribuição das frequências genotípicas em caucasianos e negros.

Genotipo	Caucasianos	(%)	Negros	(%)	P-value
GG	12	(29.3)	4	(9.8)	1
GT	19	(46.3)	5	(14.6)	

Tabela 13 – Distribuição das frequências alélicas em caucasianos e negros.

Alelo	Caucasianos	(%)	Negros	(%)	P-value
-------	-------------	-----	--------	-----	---------

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

G	43	(52.44)	14	(17.07)	1
T	19	(23.17)	6	(7.32)	

Em semelhança, ao descrito para o sexo, também a distribuição das frequências genóticas e alélicas demonstraram ser as mesmas entre as duas raças ($p > 0,05$).

Tendo em consideração as informações fornecidas pela base de dados dbSNP Short Genetic Variations do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs3745274) foi possível realizar a comparação das frequências alélicas entre raças deste estudo com outros estudos. Num estudo com 54 indivíduos, a frequência alélica do alelo G para os caucasianos foi de 69,9% e para o alelo T foi de 30,1%. Como se pode constatar as frequências anteriormente descritas parecem ser muito semelhantes às obtidas neste trabalho para a mesma raça. Num outro estudo com 120 participantes, a frequência alélica do alelo G para os indivíduos de raça negra foi de 60,1% e para o alelo T foi de, aproximadamente 38,9%. Contrariamente aos dados da raça caucasiana, as frequências deste estudo afastam-se bastante dos resultados obtidos neste trabalho podendo, mais uma vez, esta discrepância dever-se ao tamanho da amostras ou, ainda, a critérios de inclusão e exclusão diferentes dos utilizados nesta análise.

De seguida, será apresentada uma tabela com os dados de diferentes estudos relativos à frequência dos polimorfismos CYP2B6 516G>T em caucasianos e negros.

Tabela 14 – Frequência dos polimorfismos CYP2B6 516G>T em caucasianos e negros (adaptado de (Anwar Mulugeta, 2012)

Artigos	Caucasianos			Negros		
	GG (%)	GT	TT	GG	GT	TT
Haas et al.	53 (59.6)	33 (37.1)	3 (3.4)	22 (44)	18 (36)	10 (20)
Wyen et al.	58 (51.3)	44 (38.9)	11 (9.7)	27 (47.4)	23 (40.4)	7 (12.3)
Powers et al.	80 (55.9)	54 (37.8)	9 (6.3)	25 (39.7)	28 (44.4)	10 (15.9)
Haas et al.	185 (75.6)	60 (24.4)	-	107 (68.7)	48 (31.3)	-

Como se pode constatar pelo exposto na Tabela 14, e resumindo os resultados de alguns dos principais estudos realizados nesta área, a raça caucasiana apresenta uma

maior frequência do genótipo 516GG quando comparada com a frequência dos outros dois genótipos. Por outro lado, na raça negra, as frequências dos genótipos 516GG e 516GT estão muito mais equilibradas. O genótipo GG continua a existir com uma maior frequência porém, a diferença para a frequência do 516GT já não é tão evidente como na raça caucasiana. O genótipo 516TT possui, para as duas raças, a menor frequência.

As frequências genótípicas obtidas neste estudo não estão totalmente de acordo com as descritas em outros estudos. Para as duas raças analisadas a frequência mais elevada foi para o genótipo 516GT. O fato da amostra ter uma pequena dimensão, juntamente com o diminuto número de indivíduos de raça negra, não nos possibilita afirmar com certeza que não existem diferenças nas frequências genótípicas e alélicas entre as diferentes raças.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 15 – Valores de p obtidos no equilíbrio de Hardy-Weinberg baseados no teste χ^2 .

N	Genotipo	n	Freq.(%)	95% CI	P-value
48	GG	21	43.75	(29.8,58.7)	0.007
	GT	27	56.25	(41.3,70.2)	
	G	69	71.88	(61.6,80.4)	
	T	27	28.12	(19.7,38.4)	

Foi possível constatar que os resultados obtidos com as nossas amostras não seguem o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$). Este desequilíbrio pode ser justificado pelo fato de este gene, provavelmente, estar em evolução. Esta situação poderá dever-se tanto a uma situação de seleção natural, em que há a seleção dos genes mais favoráveis, ou de deriva genética, processo através do qual as frequências alélicas são modificadas, sem ter em conta as vantagens de cada genótipo, dando origem a desvios ao equilíbrio.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2 - SNP 785A>G

Amplificação por PCR *Multiplex*

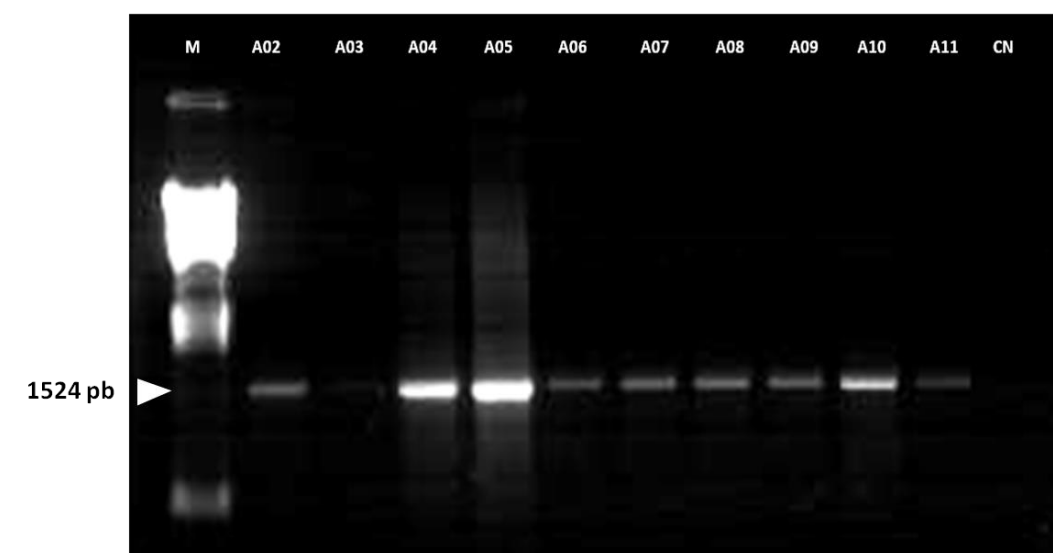


Figura 15 – Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do gene CYP2B6, utilizando o marcador *Lambda ADN- Hind III*.

Pela análise eletroforética dos produtos de amplificação foi possível concluir que a técnica foi executada com sucesso uma vez que todas as amostras apresentaram bandas de amplificação com 1524pb, como era esperado. A fraca intensidade apresentada por algumas bandas pode dever-se a uma baixa concentração de ADN extraído nessas amostras.

Genotipagem por *Allele-Specific PCR*



Figura 16 – Perfil eletroforético dos produtos da genotipagem por *Allele-Specific PCR* onde se observou a presença do alelo A

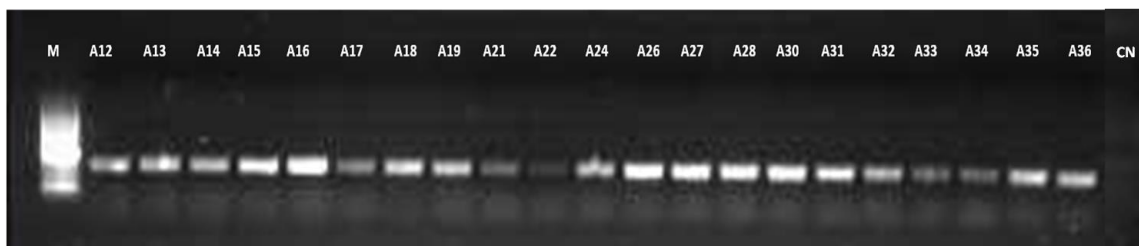


Figura 17 – Perfil eletroforético dos produtos da genotipagem por *Allele-Specific PCR* onde se observou a presença do alelo G

Os resultados da genotipagem por *Allele-Specific PCR* permitiu verificar que todas as amostras apresentaram bandas tanto para o alelo A como para o alelo G, como se pode observar pela Figura 17 e Figura 18 (representativas da amostra total). De notar que algumas das bandas apresentam uma intensidade bastante fraca quando comparadas com outras, veja-se o exemplo da amostra A22 e A26 na Figura 18. Para despistar possíveis erros na identificação dos genótipos das amostras, recorreu-se à técnica de RT-PCR.

Confirmação dos resultados por TaqMan[®] RT-PCR

Como já referido anteriormente, os resultados obtidos por genotipagem por *Allele-Specific PCR* descritos anteriormente foram confirmados utilizando a técnica TaqMan[®] RT-PCR. Nesta técnica utilizaram-se sondas específicas para os alelos A e G, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 16 – Freqüência dos diferentes genótipos na amostra de 50 indivíduos.

Genótipo	785AA	785AG (%)	785GG	Total
Freqüência	0	50 (100%)	0	50

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Não foi possível calcular o equilíbrio de Hardy-Weinberg uma vez que todas as amostras apresentaram o mesmo genótipo (heterozigótico 516AG).

Tabela 17 – Número de indivíduos associados a cada um dos diferentes genótipos estudados

	Genótipo 785AG	Genótipo 785AA	Genótipo 785GG
Genótipo 516GT	21	-	-
Genótipo 516GG	27	-	-
Genótipo 516TT	-	-	-

O genótipo dos dois SNPs do CYP2B6 estudados foram determinados para 48 dos 50 indivíduos da amostra inicial e as frequências de cada um estão sumarizadas na Tabela 17.

Dos 48 indivíduos da amostra estudada nesta monografia, existiam 21 indivíduos heterozigóticos quer para a mutação 516G>T quer para a mutação 785A>G (43,75%) e 27 indivíduos homozigóticos *wild-type* para a mutação 516G>T e heterozigóticos para a mutação 785A>G (56,25%) .

Tabela 18 – CYP2B6 haplótipos (adaptado de (Gatanaga et al., 2007)

CYP2B6 (Haplótipo)	SNP 516G>T	SNP 785A>G
*1/*4	GG	AG
*1/*6	GT	AG
*6/*6	GT	AG

No estudo de Gatanaga e seus colaboradores, 2007, existia o objetivo de determinar se a dose de EFV poderia ser reduzida em doentes que apresentavam concentrações plasmáticas elevadas do fármaco após a administração de uma dose *standart*. O seu estudo mostrou que os portadores dos haplótipos CYP2B6 *6/*6 apresentavam concentrações plasmáticas de EFV extremamente altas, e que a redução da dose era possível nestes pacientes com manutenção da ação anti-VIH-1 eficaz (Gatanaga et al., 2007).

Tabela 19 – Relação entre o haplótipo CYP2B6 e as concentrações plasmáticas de EFV (adaptado de (Sukasem et al., 2013)

CYP2B6 Haplótipos	Concentrações plasmáticas de EFV (mg/L)	Metabolizador
*1/*1	1.570	Rápido
*1/*4	2.550	Intermédio
*1/*6	2.655	Intermédio
*6/*6	7.210	Lento

Sukasem e seus colaboradores, 2013, estudaram a relação existente entre os haplótipos CYP2B6 e as concentrações plasmáticas do EFV. Parte dos seus resultados está resumida na Tabela 19. A concentração plasmática média entre os vários participantes do estudo foi de 2.260 mg/L. A partir da análise realizada, foi encontrada uma elevação significativa dos níveis de EFV para os haplótipos *1/*6 e *6/*6. Não existindo uma diferença significativa nos restantes haplótipos (Sukasem et al., 2013).

Na amostra deste trabalho de investigação, existiam 27 indivíduos com o genótipo 516GG e 785AG. Cruzando os dados com o primeiro estudo referido, significa que estas amostras podem ter o haplótipo CYP2B6*1/*4. Relativamente aos outros 21 indivíduos, que apresentavam o genótipo 516GT e 785AG, poderiam pertencer aos haplótipos CYP2B6 *1/*6 ou *6/*6. Como se pode observar, pelos dados fornecidos pela Tabela 19, todos os outros haplótipos apresentam concentrações plasmáticas de EFV mais elevadas do que o haplótipo *1/*1. De salientar, que o haplótipo *6/*6 apresenta concentrações plasmáticas de EFV associadas ao aparecimento de efeitos adversos ao nível do sistema nervoso central (>4 mg/L).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O nosso estudo não contém dados relativos às concentrações plasmáticas de EFV dos doentes participantes, porém, com base nos dados apresentados, todos os participantes do estudo podem ser classificados como metabolizadores intermédios. Assim, sugere-se a hipótese de, muito provavelmente, os indivíduos com o haplótipo *1/*4 e *1/*6 apresentarem concentrações superiores ao expectável, após a administração de uma dose de efavirenz *standart*, mas que se encontram dentro do intervalo de segurança e eficácia terapêutica (entre 1 e 4 mg/L). Em oposição, os indivíduos com haplótipo*6/*6, apresentam concentrações cima dos 4 mg/L pelo que seria importante realizar um seguimento destes doentes na tentativa de verificar a existência de efeitos adversos ao nível do sistema nervoso central. Se esta suposição se verificar verdadeira, seria necessário propor uma alteração da terapêutica, ou com a diminuição da dose de efavirenz para 400 mg ou 200 mg diários ou com a alteração completa do esquema terapêutico.

IV - Conclusões

A isoenzima CYP2B6 é codificada por um gene polimórfico pertencente ao complexo enzimático do citocromo P450. Esta isoenzima está envolvida no metabolismo de uma vasta variedade de fármacos, incluindo os antirretrovirais. Presentemente, sabe-se que as variações genéticas em genes humanos que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos podem contribuir para diferenças interindividuais na resposta terapêutica. É, pois, fundamental a análise dos perfis genéticos para identificar subgrupos que poderão estar sujeitos ao aparecimento de efeitos adversos e, até mesmo, falha terapêutica.

O estudo da diversidade do gene CYP2B6 é fulcral no fornecimento de informações capazes de dar continuidade à avaliação do impacto destes polimorfismos na eficácia da terapêutica antirretroviral. Nesse sentido, este trabalho pretendeu identificar os principais polimorfismos do gene CYP2B6 em indivíduos sujeitos à terapêutica antirretroviral com efavirenz.

A frequência genotípica para o genótipo GT foi de 56,25%, enquanto para o genótipo homozigótico GG foi de 43,75%. As frequências alélicas para os alelos G e T foram de 71,88% e 28,13%, respetivamente. Não foram observadas diferenças na distribuição das frequências genotípicas e alélicas entre sexos e raças.

Dos 48 indivíduos estudados, colocou-se a hipótese de 27 apresentarem o haplótipo CYP2B6 *1/*4, que codifica fenótipo de metabolizadores intermédios, indicando que apesar de as suas concentrações plasmáticas poderão estar mais elevadas do que o que seria de esperar com uma dose *standard*, mas ainda se encontram dentro do intervalo de concentrações terapêuticas. Ainda assim, a hipótese mais relevante deste estudo, traduz-se na possibilidade de 21 dos participantes pertencerem ao haplótipo CYP2B6 *6/*6 e, poderem vir a experienciar ou já terem experienciado efeitos adversos ao nível do sistema nervoso central.

Tendo em vista os aspetos observados, entende-se a necessidade de realizar um novo estudo que inclua dados relativos às concentrações plasmáticas de EFV que

possam ser cruzados com os resultados deste estudo, para uma melhor compreensão da relevância dos polimorfismos no tratamento antirretroviral.

V - Referências Bibliográficas

- Anwar Mulugeta, A. H. E. and Y. B. (2012). Genetic variability of CYP2B6 G516T and their impact in efavirenz based HAART: a meta-analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(03), 763–772.
- Aquaro, S., Svicher, V., Schols, D., Pollicita, M., Antinori, A., Balzarini, J., & Perno, C. F. (2006). Mechanisms underlying activity of antiretroviral drugs in HIV-1-infected macrophages: new therapeutic strategies. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(5), 1103–1110. <http://doi.org/10.1189/jlb.0606376>
- Arendt, C. W., & Littman, D. R. (2001). HIV: master of the host cell. *Genome Biology*, 2(11), REVIEWS1030. Retrieved from <http://genomebiology.com/2001/2/11/reviews/1030.1>
- Ariyoshi, N., Miyazaki, M., Toide, K., Sawamura Yi, & Kamataki, T. (2001). A single nucleotide polymorphism of CYP2b6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281, 1256–1260. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4524>
- Arts, E. J., Hazuda, D. J., Bushman, E. F. D., Nabel, G. J., & Swanstrom, R. (2012). HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, 1–23. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., & Arya, N. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Future Drugs*, 5, 1473–7159. Retrieved from www.future-drugs.com
- Avery, L. B., VanAusdal, J. L., Hendrix, C. W., & Bumpus, N. N. (2013). Compartmentalization and antiviral effect of efavirenz metabolites in blood plasma, seminal plasma, and cerebrospinal fluid. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(2), 422–429. <http://doi.org/10.1124/dmd.112.049601>
- Bhaskaran, K., Johnson, A. M., Lambert, P. C., & Porter, K. (2008). Changes in the Risk of Death, 300(1), 51–59.
- Biennu, E., Swart, M., Dandara, C., & Ashton, M. (2014). The role of genetic polymorphisms in cytochrome P450 and effects of tuberculosis co-treatment on the

- predictive value of CYP2B6 SNPs and on efavirenz plasma levels in adult HIV patients. *Antiviral Research*, 102, 44–53. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.11.011>
- Braitstein, P., Brinkhof, M. W. G., Dabis, F., Schechter, M., Boulle, A., Miotti, P., ... Egger, M. (2006). Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet*, 367, 817–824. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68337-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68337-2)
- Bumpus, N., Kent, U. M., & Hollenberg, P. F. (2006). Metabolism of Efavirenz and 8-Hydroxyefavirenz by P450 2B6 Leads to Inactivation by Two Distinct Mechanisms, 318(1), 345–351. <http://doi.org/10.1124/jpet.106.102525.itor>
- Burger, D., Van Der Heiden, I., La Porte, C., Van Der Ende, M., Groeneveld, P., Richter, C., ... Van Schaik, R. (2006). Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: The effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 61(November), 148–154. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2005.02536.x>
- Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA. (2015). Recomendações portuguesas para o tratamento da infecção VIH, 1–102. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Recomendações+Portuguesas+para+o+Tratamento+da+Infecção+VIH+/+sida#0>
- Cressey, T. R., & Lallemand, M. (2007). Pharmacogenetics of antiretroviral drugs for the treatment of HIV-infected patients: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, 7, 333–342. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.08.004>
- Creveling, C. R. (2001). *Methyltransferases. Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics* (Vol. 4). <http://doi.org/10.1002/0470846305>
- Croom, E. L., Stevens, J. C., Hines, R. N., Wallace, A. D., & Hodgson, E. (2009). Human hepatic CYP2B6 developmental expression: The impact of age and genotype. *Biochemical Pharmacology*, 78, 184–190. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.03.029>
- Daraki, A., Zachaki, S., Koromila, T., Diamantopoulou, P., Pantelias, G. E., Sambani, C., ... Manola, K. N. (2014). The G⁵¹⁶T CYP2B6 germline polymorphism affects

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- the risk of acute myeloid leukemia and is associated with specific chromosomal abnormalities. *PloS One*, 9(2), e88879. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0088879>
- de Oliveira Santos, N. S., Villela Romanos, M. T., & Dutra Wigg, M. (2008). *Introdução à Virologia Humana*. (Guanabara, Ed.) (2ª Edição).
- Dinis, A., Duarte, R., Caldeira, C., Bettencourt, J., Gomes, M., Oliveira, O., & Melo, T. (2014). *Infeção VIH, SIDA e Tuberculose em números – 2014*.
- Drocourt, L., Ourlin, J. C., Pascussi, J. M., Maurel, P., & Vilarem, M. J. (2002). Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25125–25132. <http://doi.org/10.1074/jbc.M201323200>
- Du, L., Hoffman, S. M. G., & Keeney, D. S. (2004). Epidermal CYP2 family cytochromes P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195, 278–287. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2003.09.020>
- Faucette, S. R., Sueyoshi, T., Smith, C. M., Negishi, M., Lecluyse, E. L., & Wang, H. (2006). Differential Regulation of Hepatic CYP2B6 and CYP3A4 Genes by Constitutive Androstane Receptor but Not Pregnane X Receptor. *Health (San Francisco)*, 317(3), 1200–1209. <http://doi.org/10.1124/jpet.105.098160.metabolism>
- Faucette, S. R., Wang, H., Hamilton, G. A., Jolley, S. L., Gilbert, D., Lindley, C., ... Lecluyse, E. L. (2004). REGULATION OF CYP2B6 IN PRIMARY HUMAN HEPATOCYTES BY prototypical inducers, 32(3), 1–11. Retrieved from papers3://publication/uuid/462F4737-EEA0-4B63-89AE-D43654585F96
- Gatanaga, H., Hayashida, T., Tsuchiya, K., Yoshino, M., Kuwahara, T., Tsukada, H., ... Oka, S. (2007a). Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 *6 and *26. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(9), 1230–1237. <http://doi.org/10.1086/522175>
- Gatanaga, H., Hayashida, T., Tsuchiya, K., Yoshino, M., Kuwahara, T., Tsukada, H., ... Oka, S. (2007b). Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 *6 and *26. *Clinical Infectious Diseases :*

An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 45(9), 1230–7. <http://doi.org/10.1086/522175>

- Gomez, C., & Hope, T. J. (2005). The ins and outs of HIV replication. *Cellular Microbiology*, 7(5), 621–626. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00516.x>
- Goodwin, B., Moore, L. B., Stoltz, C. M., McKee, D. D., & Kliewer, S. a. (2001). Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. *Molecular Pharmacology*, 60(3), 427–431.
- Guan, S., Huang, M., Chan, E., Chen, X., Duan, W., & Zhou, S. F. (2006). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2B6 gene in Han Chinese. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 14–21. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.004>
- Guerra, E., de Lara, J., Malizia, A., & Díaz, P. (2009). Supporting user-oriented analysis for multi-view domain-specific visual languages. *Information and Software Technology*. <http://doi.org/10.1016/j.infsof.2008.09.005>
- Hodgson, E., & Rose, R. L. (2007). The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacology and Therapeutics*, 113, 420–428. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.10.002>
- Hofmann, M. H., Blievernicht, J. K., Klein, K., Saussele, T., Schaeffeler, E., Schwab, M., & Zanger, U. M. (2008). Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c. 516G> T, a marker of CYP2B6* 6, is responsible for decreased expression and activity of. ... *of Pharmacology and ...*, 325(1), 284–292. <http://doi.org/10.1124/jpet.107.133306>.
- Honda, M., Muroi, Y., Tamaki, Y., Saigusa, D., Suzuki, N., Tomioka, Y., ... Hiratsuka, M. (2011). Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of antimalarial artemether. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(10), 1860–1865. <http://doi.org/10.1124/dmd.111.040352>
- Ilic, K., Hawke, R. L., Thirumaran, R. K., Schuetz, E. G., Hull, J. H., Kashuba, A. D. M., ... Chen, M.-L. (2013). The influence of sex, ethnicity, and CYP2B6 genotype on bupropion metabolism as an index of hepatic CYP2B6 activity in humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 41(3), 575–81. <http://doi.org/10.1124/dmd.112.048108>
- Ingelman-Sundberg, M. (2002). Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- toxicity. *Toxicology*, 181-182, 447–452. [http://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00492-4](http://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00492-4)
- Ingelman-Sundberg, M. (2005). The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, 52–56. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.030>
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., & Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacology and Therapeutics*, 116, 496–526. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>
- Jacob, R. M., Johnstone, E. C., Neville, M. J., & Walton, R. T. (2004). Identification of CYP2B6 sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping. *Clinical Chemistry*, 50(8), 1372–1377. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2004.031708>
- Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2009). *Basic and Clinical Pharmacology, Eleven Edition. Basic And Clinical Pharmacology*. Retrieved from <http://www.amazon.ca/exec/obidos/redirect?tag=citeulike09-20&path=ASIN/0071451536>
- Kwara, A., Lartey, M., Sagoe, K. W., Rzek, N. L., & Court, M. H. (2009). CYP2B6 (c.516G>>>T) and CYP2A6 (*9B and/or *17) polymorphisms are independent predictors of efavirenz plasma concentrations in HIV-infected patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 67(4), 427–436. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03368.x>
- Lamba, V., Lamba, J., Yasuda, K., Strom, S., Davila, J., Hancock, M. L., ... Schuetz, E. G. (2003). Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(3), 906–922. <http://doi.org/10.1124/jpet.103.054866>
- Maggiolo, F. (2009). Efavirenz: a decade of clinical experience in the treatment of HIV. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(5), 910–28. <http://doi.org/10.1093/jac/dkp334>
- Mukonzo, J. K., Röshammar, D., Waako, P., Andersson, M., Fukasawa, T., Milani, L.,

- ... Aklillu, E. (2009). A novel polymorphism in ABCB1 gene, CYP2B6*6 and sex predict single-dose efavirenz population pharmacokinetics in Ugandans. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 68(5), 690–699. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03516.x>
- Natella Y. Rakhmanina, b, C. (2011). Efavirenz in the Therapy of HIV Infection, 6(1), 95–103. <http://doi.org/10.1517/17425250903483207.Efavirenz>
- Nebert, D. W., & Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360, 1155–1162. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7)
- Nelson, D. R., Goldstone, J. V, Stegeman, J. J., & B, P. T. R. S. (2013). The cytochrome P450 genesis locus : the origin and evolution of animal cytochrome P450s The cytochrome P450 genesis locus : the origin and evolution of animal cytochrome P450s. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, (January).
- Petroll, A., Hare, C., & Pinkerton, S. (2008). The Essentials of HIV: A Review for Nurses. *J Infus Nurs*, 31(4), 228–235. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>
- Powers, V., Ward, J., & Gompels, M. (2009). CYP2B6 G516T genotyping in a UK cohort of HIV-positive patients: Polymorphism frequency and influence on efavirenz discontinuation. *HIV Medicine*, 10(8), 520–523. <http://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2009.00718.x>
- Ribaudo, H. J., Liu, H., Schwab, M., Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Moutsier-Reif, A. a, ... Haas, D. W. (2010). Effect of CYP2B6, ABCB1, and CYP3A5 polymorphisms on efavirenz pharmacokinetics and treatment response: an AIDS Clinical Trials Group study. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(5), 717–722. <http://doi.org/10.1086/655470>
- Rodríguez-Nóvoa, S., Barreiro, P., Jiménez-Nácher, I., & Soriano, V. (2006). Overview of the pharmacogenetics of HIV therapy. *The Pharmacogenomics Journal*, 6(4), 234–45. <http://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500374>
- Rogers, J. F., Nafziger, A. N., & Bertino, J. S. (2002). Toxicity of Cytochrome P450 – Metabolized Drugs. *The American Journal of Medicine*, 113(Table 1), 746–750.
- Rotger, M., Saumoy, M., Zhang, K., Flepp, M., Sahli, R., Decosterd, L., & Telenti, A.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (2007). Partial deletion of CYP2B6 owing to unequal crossover with CYP2B7. *Pharmacogenetics and Genomics*, 17(10), 885–890. <http://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3282ef5cd1>
- Rotger, M., Tegude, H., Colombo, S., Cavassini, M., Furrer, H., Décosterd, L., ... Zanger, U. M. (2007). Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81(4), 557–566. <http://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100072>
- Schnell, G., Joseph, S., Spudich, S., Price, R. W., & Swanstrom, R. (2011). HIV-1 replication in the central nervous system occurs in two distinct cell types. *PLoS Pathogens*, 7(10). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002286>
- Simon, V., Ho, D. D., & Karim, Q. A. (2010). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment, 368(9534), 489–504. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69157-5.HIV/AIDS](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69157-5.HIV/AIDS)
- Singh, D., Kashyap, A., Pandey, R. V., & Saini, K. S. (2011). Novel advances in cytochrome P450 research. *Drug Discovery Today*, 16(17-18), 793–799. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.08.003>
- Smith, R. L., de Boer, R., Brul, S., Budovskaya, Y., & van Spek, H. (2012). Premature and accelerated aging: HIV or HAART? *Frontiers in Genetics*, 3(January 2013), 328. <http://doi.org/10.3389/fgene.2012.00328>
- Stevenson, M., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., & Lamonica, C. a. (1990). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *The EMBO Journal*, 9(5), 1551–1560.
- Sukasem, C., Chamnanphon, M., Koomdee, N., Puangpetch, A., Santon, S., Jantararoungtong, T., ... Manosuthi, W. (2013). High Plasma Efavirenz Concentration and CYP2B6 Polymorphisms in Thai HIV-1 Infections. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 28(5), 391–7. <http://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-120>
- Sukasem, C., Cressey, T. R., Prapaithong, P., Tawon, Y., Pasomsub, E., Srichunrusami, C., ... Chantratita, W. (2012). Pharmacogenetic markers of CYP2B6 associated with efavirenz plasma concentrations in HIV-1 infected Thai adults. *British*

- Journal of Clinical Pharmacology*, 74(6), 1005–1012.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04288.x>
- Sukasem, C., & Sungkanuparph, S. (2013). Would a CYP2B6 test help HIV patients being treated with efavirenz? *Pharmacogenomics*, 14(9), 999–1001.
<http://doi.org/10.2217/pgs.13.69>
- Thorn, C., Lamba, J., Lamba, V., Klein, T., & Altman, R. (2011). PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP2B6, 20(8), 520–523.
- Wang, H., Faucette, S. R., Gilbert, D., Jolley, S. L., Sueyoshi, T., Negishi, M., & Lecluyse, E. L. (2003). Glucocorticoid Receptor Enhancement of Pregnane X Receptor- Mediated Cyp2B6 Regulation in Primary Human Hepatocytes Abstract : *Regulation*, 31(5), 620–630.
- Wang, H., & Tompkins, L. M. (2009). CYP2B6: New Insights into a Historically Overlooked Cytochrome P450 Isozyme, 9(7), 598–610.
- Ward, B. A., Gorski, J. C., Jones, D. R., Hall, S. D., & Flockhart, D. A. (2003). The Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) Is the Main Catalyst of Efavirenz Primary and Secondary Metabolism : Implication for HIV / AIDS Therapy and Utility of Efavirenz as a Substrate Marker of CYP2B6 Catalytic Activity, 306(1), 287–300.
<http://doi.org/10.1124/jpet.103.049601.treatment>
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–562. <http://doi.org/10.1038/nature01262>
- Weber, A., Szalai, R., Sipeky, C., Magyar, L., Melegh, M., Jaromi, L., ... Melegh, B. (2015). Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples. *Pharmacological Reports*, 67(3), 460–464.
<http://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.11.006>
- Williams, I., Churchill, D., Anderson, J., Boffito, M., Bower, M., Cairns, G., ... Youle, M. (2014). British HIV Association guidelines for the treatment of HIV-1-positive adults with antiretroviral therapy 2012 (Updated November 2013. All changed text is cast in yellow highlight.). *HIV Medicine*, 15 Suppl 1(July 2012), 1–85.
<http://doi.org/10.1111/hiv.12119>

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Xexemeku, F., Kenu, E., Oliver-commey, J., Boima, V., Sagoe, A., Boamah, I., ... Court, M. H. (2009). Pharmacokinetics of Efavirenz when Co-administered with Rifampin in TB/HIV Co-infected Patients: Pharmacogenetic Effect of CYP2B6 Variation. *J. Clin. Pharmacol.*, 48(9), 1032–1040. <http://doi.org/10.1177/0091270008321790>.Pharmacokinetics
- Xu, C., Ogburn, E. T., Guo, Y., & Desta, Z. (2012). Effects of the CYP2B6 * 6 Allele on Catalytic Properties and Inhibition of CYP2B6 In Vitro : Implication for the Mechanism of Reduced Efavirenz Metabolism and Other CYP2B6 Substrates In Vivo □ ABSTRACT :, 40(4), 717–725.
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 103–141. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>