

**FERNANDA MARCONI ROVERSI**

**CORRELAÇÃO ENTRE A GENOTIPAGEM DOS  
ALELOS MAIS COMUNS DO GENE *MDR1*  
E A FARMACOCINÉTICA DA DROGA  
*DEXTROMETHORPHAN* EM VOLUNTÁRIOS SADIOS**

**CAMPINAS**

**2007**

**FERNANDA MARCONI ROVERSI**

**CORRELAÇÃO ENTRE A GENOTIPAGEM DOS  
ALELOS MAIS COMUNS DO GENE *MDR1*  
E A FARMACOCINÉTICA DA DROGA  
*DEXTROMETHORPHAN* EM VOLUNTÁRIOS SADIOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para a obtenção do título de  
Mestre em Farmacologia.

**ORIENTADOR: DR. JOSÉ LUIZ DONATO**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R769c Roversi, Fernanda Marconi  
Correlação entre genotipagem dos alelos mais comuns do gene MDR1 e a farmacocinética da droga dextromethorphan em voluntários sadios / Fernanda Marconi Roversi. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : José Luiz Donato  
Dissertação( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Farmacogenômica. 2. Genotipagem. 3. Polimorfismo de um único nucleotídeo. 4. Dextrometorfano. 5. Farmacocinética. I. Donato, José Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : "Influence of MDR1 polymorphisms on dextromethorphan pharmacokinetics in healthy Brazilian subjects"**

**Keywords:** • Pharmacogenetics  
• Genotyping  
• Single-Nucleotide Polymorphisms  
• Dextromethorphan  
• Pharmacokinetics

**Titulação: Mestre em Farmacologia**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. José Luiz Donato  
Prof. Dr. José André Yunes  
Profa. Dra. Marcela de Araújo**

**Data da defesa: 29- 10 - 2007**



---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador:**

**Prof. Dr. José Luiz Donato**

---

---

**Membros:**

---

**Prof. Dr. José Luiz Donato**

**Prof. Dr. José Andrés Yunes**

**Profa. Dra. Marcela de Araújo**

---

Three handwritten signatures in blue ink are written over the names of the examiners. The first signature is for Prof. Dr. José Luiz Donato, the second for Prof. Dr. José Andrés Yunes, and the third for Profa. Dra. Marcela de Araújo.

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 29/10/2007**

---

*Dedico esta Tese*  
*À minha querida Avó Jeni,*  
*Que infelizmente partiu,*  
*Pelo amor e carinho*  
*Pela lição de vida*  
*Pela alegria de viver*  
*Pelo apoio e incentivo*  
*Por tudo que me ensinou*  
*Sei que sempre estará presente*

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a muitos que me ajudaram sob muitos pontos de vista. A meu ver, nunca realizamos algo solitariamente, pois sempre somos auxiliados seja com idéias, com compreensão, com conselhos sinceros ou com um silêncio profundo.

Ao meu orientador Dr. José Luiz Donato pela receptividade, pela proposta de trabalho, pela orientação e pela confiança depositada em mim. Por ter dado condições possíveis para pensar e executar o projeto.

Ao Dr Gilberto de Nucci que me acolheu em seu Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio e oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores da Universidade Estadual de Campinas durante esse período de pós-graduação, pelos ensinamentos, principalmente na área de Farmacologia, e pelo incentivo ao pensamento crítico e questionador.

Aos professores da Universidade Federal de São Paulo durante o período de graduação, pela importante contribuição para a minha formação e pelo conhecimento que me transmitiram.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico), pelo auxílio financeiro.

À Banca do Exame de Qualificação e à Banca Examinadora desta Tese por dedicarem seu tempo na avaliação crítica do trabalho.

Ao amigo Geórgio, pela amizade, bondade, dedicação e pelas valiosas discussões; sempre disposto a auxiliar; sua contribuição foi fundamental na realização deste trabalho.

Ao Rogério, pelas discussões e colaboração, pela contribuição na realização da análise estatística, auxiliando em muito no desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas Aline, Denise e Eluana, pela amizade e atenção, pelo convívio.

A todos os colegas e amigos do Laboratório – em especial, Aline e Juan – que me acolheram e dividiram as lutas do dia a dia.

Ao Marcelo, ao Borges e ao Gustavo, da Empresa Galeno Research Unit, pela colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Dr José Andrés Yunes pelos seus ensinamentos e aprendizado na área de Biologia Molecular; pelo estímulo, apoio e incentivo; pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para a realização desta tese.

Ao Dr. Márcio José Silva pela valiosa colaboração, pela compreensão, pela atenção e por ter possibilitado o desenvolvimento dos experimentos de seqüenciamento para esta tese.

Aos meus pais pelo amor, apoio, carinho e cumplicidade, contribuindo para o desenvolvimento de uma consciência crítica e do desejo de conhecimento. À minha mãe, em especial, pelo companheirismo nos momentos mais críticos.

À amiga Patrícia, minha irmã de coração, pela amizade sincera, apoio incondicional e carinho; por sua generosidade e incansável colaboração, nunca medindo esforços para me ajudar.

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxxvii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xli</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	45
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	49
<b>2.1- Objetivos Gerais</b> .....	51
<b>2.2- Objetivos Específicos</b> .....	51
<b>3- REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	53
<b>3.1- Farmacogenética / Farmacogenômica</b> .....	55
<b>3.2- Absorção de Drogas</b> .....	56
3.2.1- Transportador Glicoproteína P.....	57
3.2.1.1- Caracterização da Glicoproteína P.....	57
3.2.1.2- Polimorfismos do Gene <i>MDR1</i> .....	63
<b>3.3- Metabolização de Drogas</b> .....	70
<b>3.4- Fármaco <i>Dextromethorphan</i></b> .....	70
3.4.1- Descrição.....	70
3.4.2- Farmacocinética.....	71
3.4.3- Farmacodinâmica.....	72
<b>3.5- Bioequivalência</b> .....	72
<b>4- CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	75
<b>4.1- Casuística</b> .....	77
4.1.1- Seleção dos Voluntários.....	77

4.1.2- Comitê de Ética.....	77
4.1.3- Critérios de Inclusão.....	77
4.1.4- Critérios de Exclusão.....	78
<b>4.2- Fármaco.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3- Etapa Clínica.....</b>	<b>80</b>
<b>4.4- Fenotipagem.....</b>	<b>81</b>
4.4.1- Análise através de HPLC / LC-MS-MS.....	81
4.4.1.1- Quantificação das Amostras.....	81
4.4.1.1.1- Preparação das Curvas de Calibração.....	81
4.4.1.1.2- Preparação dos Controles de Qualidade.....	82
4.4.1.1.3- Validação da Corrida Analítica.....	83
4.4.1.1.4- Preparação das Amostras.....	83
4.4.1.2- HPLC / LC-MS-MS.....	84
4.4.1.3- Taxa de Biotransformação.....	84
4.4.2- Genotipagem CYP2D6.....	84
4.4.2.1- Extração de DNA Genômico.....	84
4.4.2.2- Amplificação.....	85
4.4.2.2.1- Primers.....	85
4.4.2.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase.....	85
<b>4.5- Etapa Clínica.....</b>	<b>86</b>
<b>4.6- Genotipagem <i>MDRI</i>.....</b>	<b>87</b>
4.6.1- Extração de DNA Genômico.....	87
4.6.2- Amplificações.....	88

4.6.2.1- Primers.....	88
4.6.2.1.1- Preparação de Primers.....	89
4.6.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase.....	89
4.6.3- Sequenciamento.....	90
4.6.3.1- Reação de PCR.....	90
4.6.3.2- Purificação do Produto de PCR.....	90
4.6.3.3- Denaturação.....	91
4.6.3.4- Leitura.....	91
<b>4.7- Farmacocinética.....</b>	<b>91</b>
4.7.1- Quantificação das Amostras.....	92
4.7.1.1- Preparação das Curvas de Calibração.....	92
4.7.1.2- Preparação dos Controles de Qualidade.....	93
4.7.1.3- Validação da Corrida Analítica.....	93
4.7.1.4- Preparação das Amostras.....	93
4.7.2- HPLC / LC-MS-MS.....	94
4.7.3- Análise Estatística.....	94
<b>4.8- Análise Estatística: Genotipagem x Farmacocinética.....</b>	<b>95</b>
<b>4.9- Soluções.....</b>	<b>95</b>
4.9.1- Solução Acetato de Amônio 10 Mm.....	95
4.9.2- Solução Ácido Fórmico 12 Mm.....	95
4.9.3- Solução Aquosa de Acetonitrila.....	95
4.9.4- Solução Aquosa de Acetonitrila e Metanol.....	96
4.9.5- Solução Diclorometano / Éter Etílico.....	96

4.9.6- Solução Éter Dietílico / Hexano.....	96
4.9.7- Solução Fase Móvel.....	96
4.9.8- Solução Save Money.....	96
4.9.9- Solução Tris-HCl 10 mM.....	97
4.9.10- Solução Tris-HCl 1M.....	97
<b>5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>5.1- Casuística.....</b>	<b>101</b>
<b>5.2- Classificação dos Voluntários (Fenotipagem e Genotipagem).....</b>	<b>103</b>
<b>5.3- Genotipagem.....</b>	<b>111</b>
5.3.1- Amplificação através de PCR.....	111
5.3.2- Seqüenciamento.....	115
<b>5.4- Farmacocinética.....</b>	<b>119</b>
<b>5.5- Correlação Genotipagem e Farmacocinética.....</b>	<b>121</b>
<b>5.6- Análise das Frequências Alélica e Genotípica.....</b>	<b>131</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>133</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>137</b>
<b>8- ANEXOS .....</b>	<b>145</b>
<b>Anexo 1- Termo de Consentimento.....</b>	<b>147</b>
<b>Anexo 2- Aprovação Comitê de Ética - Estudo GDN 98/04.....</b>	<b>150</b>
<b>Anexo 3- Aprovação Comitê de Ética - Estudo GDN 131/04.....</b>	<b>152</b>
<b>Anexo 4- Trabalho Apresentado em Congresso.....</b>	<b>155</b>
<b>Anexo 5- Trabalho Submetido para Publicação.....</b>	<b>156</b>
<b>Anexo 6- Cálculo do Tamanho Amostral.....</b>	<b>175</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a Curva de Concentração do Fármaco versus Tempo
AUC <sub>0-4 hs</sub>	Área sob a Curva de Concentração do Fármaco versus Tempo 0 (zero) ao Tempo de Coleta de 4 hs, calculado pelo método linear
AUC <sub>0-24 hs</sub>	Área sob a Curva de Concentração do Fármaco versus Tempo 0 (zero) ao Tempo de Coleta de 24 hs, calculado pelo método linear
AUC <sub>0-48 hs</sub>	Área sob a Curva de Concentração do Fármaco versus Tempo 0 (zero) ao Tempo de Coleta de 48 hs, calculado pelo método linear
BHE	Barreira Hematoencefálica
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
C <sub>máx</sub>	Concentração Plasmática Máxima
CYP2D6	Isoforma 2D6 do Citocromo P450
ddNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfatado marcados com Fluorescência
DM	<i>Dextromethorphan</i> – droga mãe
DNA	Ácido Deoxiribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfatado livres em solução
DP	Desvio Padrão
DX	<i>Dextrorphan</i> – principal metabólito de DM
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
HCl	Ácido Clorídrico

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
hs	Horas
IMC	Índice de Massa Corpórea
kDa	Quilodaltons
kg	Quilogramas
L	Litros
LC-MS-MS	Espectrometria de Massa
LOQ	Limite de Quantificação
m	Metros
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mmol	Milimols
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
µm	Micrômetros
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar

ng	Nanogramas
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGP	Glicoproteína P
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Padrão Interno
QC	Controles de Qualidade
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
SNP	Polimorfismos de um Único Nucleotídeo
TGI	Trato Gastrointestinal
$T_{máx}$	Tempo em que a $C_{máx}$ foi atingida
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Volts
Vol	Voluntário

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b> Alguns dos substratos da proteína PGP.....	62
<b>Tabela 2-</b> Descrição dos 28 SNPs do gene <i>MDR1</i> quanto a localização, posição, mutação e efeito causado.....	64
<b>Tabela 3-</b> Análise das frequências alélica e genotípica em diferentes etnias.....	67
<b>Tabela 4-</b> Preparação das curvas de calibração para a análise das amostras de urina através de experimentos de fenotipagem.....	82
<b>Tabela 5-</b> Preparação das amostras dos controles de qualidade usadas na quantificação de DM ou de DX.....	83
<b>Tabela 6-</b> Relação entre os nomes dos primer sintetizados e suas respectivas seqüências de bases nitrogenadas.....	85
<b>Tabela 7-</b> Relação entre os 3 polimorfismos (SNPs) estudados, os correspondentes nomes dos primer sintetizados e suas respectivas seqüências de bases nitrogenadas.....	89
<b>Tabela 8-</b> Preparação das curvas de calibração para a análise farmacocinética.....	92
<b>Tabela 9-</b> Preparação das amostras dos controles de qualidade usadas na quantificação da droga mãe DM e de seu principal metabólito DX.....	93
<b>Tabela 10-</b> Descrição dos 32 voluntários participantes selecionados para o estudo de fenotipagem.....	102

<b>Tabela 11-</b>	Características dos 32 voluntários participantes do estudo aos quais foi ministrado o xarope <i>Dextromethorphan</i> .....	103
<b>Tabela 12-</b>	Taxas de Biotransformação referentes aos 32 voluntários participantes do estudo de fenotipagem.....	105
<b>Tabela 13-</b>	Genótipo CYP2D6 referente aos 32 voluntários participantes do estudo.....	109
<b>Tabela 14-</b>	Genótipo <i>MDR1</i> (exons 12, 21 e 26) referente aos 27 voluntários participantes do estudo.....	118
<b>Tabela 15-</b>	Correlação entre os Genótipos <i>MDR1</i> (Exon 26), as Características dos voluntários e os Parâmetros Farmacocinéticos dos voluntários participantes do estudo, classificados como metabolizadores rápidos.....	121
<b>Tabela 16-</b>	Intervalos dos valores de p obtidos através de análise estatística relacionando os diferentes genótipos com os parâmetros farmacocinéticos.....	122
<b>Tabela 17-</b>	Correlação entre os Genótipos <i>MDR1</i> (Exon 21), as Características dos voluntários e os Parâmetros Farmacocinéticos pós-administração oral da droga <i>dextromethorphan</i> dos voluntários participantes do estudo, classificados como metabolizadores rápidos.....	129
<b>Tabela 18-</b>	Correlação entre os Genótipos <i>MDR1</i> (Exon 12), as Características dos voluntários e os Parâmetros Farmacocinéticos pós-administração oral da droga <i>dextromethorphan</i> dos voluntários participantes do estudo, classificados como metabolizadores rápidos.....	130

<b>Tabela 19-</b>	Frequências alélica e genotípica do polimorfismo do Exon 26 do gene <i>MDR1</i> e correlação dessas frequências com diferentes populações.....	131
<b>Tabela 20-</b>	Frequências alélica e genotípica do polimorfismo do Exon 21 do gene <i>MDR1</i> .....	132
<b>Tabela 21-</b>	Frequências alélica e genotípica do polimorfismo do Exon 12 do gene <i>MDR1</i> .....	132

## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b> Estrutura Bidimensional da PGP.....	58
<b>Figura 2-</b> Estrutura Tridimensional da PGP humana.....	59
<b>Figura 3-</b> Localização celular da PGP humana.....	60
<b>Figura 4-</b> Localização anatômica da PGP humana.....	61
<b>Figura 5-</b> Polimorfismos mais frequentes do gene <i>MDR1</i> .....	63
<b>Figura 6-</b> <i>Dextromethorphan</i> . Estrutura química.....	71
<b>Figura 7-</b> Metabolização do <i>Dextromethorphan</i> por enzimas hepáticas.....	72
<b>Figura 8-</b> Curva tempo versus Concentração Plasmática da droga DM.....	74
<b>Figura 9-</b> Eletroforese. <i>PCR tetra primers</i> da genotipagem CYP2D6*3.....	107
<b>Figura 10-</b> Eletroforese. <i>PCR tetra primers</i> da genotipagem CYP2D6*4.....	108
<b>Figura 11-</b> Eletroforese. Análise, em gel de agarose, da amplificação da região referente ao exon 12 do gene <i>MDR1</i> .....	112
<b>Figura 12-</b> Eletroforese. Análise, em gel de agarose, da amplificação da região referente ao exon 21 do gene <i>MDR1</i> .....	113
<b>Figura 13-</b> Eletroforese. Análise, em gel de agarose, da amplificação da região referente ao exon 26 do gene <i>MDR1</i> .....	114
<b>Figura 14-</b> Eletroferogramas. Resultados do Sequenciamento Automático...	117
<b>Figura 15-</b> Dispersão dos valores de $AUC_{0-4hs}$ de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.....	124
<b>Figura 16-</b> Dispersão dos valores de $AUC_{0-24hs}$ de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.....	124

<b>Figura 17-</b>	Dispersão dos valores de $AUC_{0-48hs}$ de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.....	125
<b>Figura 18-</b>	Dispersão dos valores de $C_{1h}$ de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.....	125
<b>Figura 19-</b>	Dispersão dos valores de $C_{4h}$ de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.....	126
<b>Figura 20-</b>	Dispersão dos valores de $C_{máx}$ de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.....	126

# RESUMO

A farmacogenômica utiliza informações genéticas para orientar a escolha da terapia farmacológica em uma base individual, pressupondo que se podem prever diferenças na resposta a agentes terapêuticos entre indivíduos, a partir de sua constituição genética. Os estudos atuais de farmacogenômica objetivam otimizar a eficácia de uma droga e diminuir os efeitos colaterais e a toxicidade. Os estudos de polimorfismos genéticos podem ter um impacto nos ajustes individuais da dose de um determinado fármaco. Os polimorfismos de genes que codificam transportadores de drogas, como o gene *MDR1*; das enzimas metabolizadoras de fármacos, como a isoforma 2D6 do citocromo P450 (CYP2D6), e de receptores para drogas, relacionam-se às alterações funcionais no fenótipo, contribuindo na resposta a uma droga.

O *dextromethorphan* é um agente antitússico que atua no centro da tosse. Este fármaco é metabolizado, principalmente pela CYP2D6, no metabólito ativo *Dextrorphan* e sua absorção sofre interferência da proteína codificada pelo gene *MDR1*.

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação do genótipo de uma população de voluntários sadios através da análise dos polimorfismos dos exons mais frequentes (12, 21, e 26) do gene *MDR1*, correlacionando-se esses polimorfismos com a farmacocinética do fármaco *dextromethorphan* e do seu principal metabólito *dextrorphan*.

Após uma seleção dos participantes do estudo, feita através de anamnese, exames físico, neurológico, psiquiátrico e laboratorial, e histórico médico, foram realizados experimentos de fenotipagem através da análise quantitativa da droga *dextromethorphan* e do seu metabólito *dextrorphan* na urina, em dois períodos distintos (imediatamente após e 12 horas após a administração da droga), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massa (LC-MS-MS) e de genotipagem CYP2D6, classificando os voluntários em metabolizadores rápidos ou lentos.

Os 27 indivíduos, identificados como metabolizadores rápidos, foram incluídos num protocolo de avaliação farmacocinética dos compostos, ao longo de um período de 48 horas após a administração do xarope *dextromethorphan*, por meio do método HPLC / LC-MS-MS.

A análise da genotipagem *MDRI* foi realizada em três etapas sucessivas: extração de DNA, amplificação do gene *MDRI* e seqüenciamento automático. Uma vez determinado o genótipo de cada voluntário, uma correlação entre esses dados genotípicos, a farmacocinética do *dextromethorphan* e algumas características (idade, altura, peso e índice de massa corpórea) foi estabelecida por meio de análise estatística, usando-se o teste *Wilcoxon Rank Sum*.

Os valores obtidos para as Áreas Sob a Curva (AUCs) 0-4 h, 0-24 h, 0-48 h ( $\pm$  DP) foram significativamente mais baixos para os indivíduos 3435TT ( $1,18 \pm 0,05$ ,  $2,11 \pm 0,83$ ,  $2,12 \pm 0,83$  ngh/ml) em relação aos indivíduos 3435CC ( $4,49 \pm 3,91$ ,  $11,07 \pm 9,98$ ,  $11,33 \pm 10,53$  ngh/ml) e 3435CT ( $3,91 \pm 3,22$ ,  $8,07 \pm 7,41$ ,  $8,20 \pm 7,57$  ngh/ml). Os valores referentes a Concentração Máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) ( $\pm$  DP) também foram significativamente mais baixos nos indivíduos 3435TT ( $0,45 \pm 0,05$  ng/ml) em relação aos indivíduos 3435CC ( $1,74 \pm 1,52$  ng/ml) e 3435CT ( $1,52 \pm 1,22$  ng/ml). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos analisados e os fatores idade, peso, altura e IMC.

A distribuição genotípica para o exon 26 do gene *MDRI* foi 41 % CC, 44 % CT e 15 % TT. Para os exons 21 e 12 desse mesmo gene, essas distribuições genotípicas foram, respectivamente, 56 % GG, 40 % GT, e 4 % TT e 12 % CC, 38 % CT, e 50 % TT.

Desse modo, observou-se uma correlação entre o polimorfismo C3435T – exon 26 do gene *MDRI* – e alguns parâmetros farmacocinéticos: a  $C_{m\acute{a}x}$  e as AUCs do fármaco *dextromethorphan*, após uma única administração oral, apresentaram valores mais baixos nos indivíduos 3435TT.

A existência de uma correlação entre a genotipagem e a farmacocinética demonstra que a implementação de técnicas de biologia molecular pode auxiliar alguns testes clínicos, cujo alvo de interesse é a investigação da absorção e da metabolização de drogas.

**ABSTRACT**

Pharmacogenomics is used to study the effects of genetic basis for interindividual differences in drug response. This genetic information can predict and optimize the drug efficacy and/or safety and can minimize the adverse drug reactions and toxicity.

*Dextromethorphan* shares part of the adverse event profile of opioids and is widely used as a probe drug for CYP2D6 phenotyping and for the assessment of its activity. *Dextromethorphan* is an antitussigen agent that acts in the center of the cough. This drug is mainly metabolized by the CYP2D6 in the active metabolite *dextrorphan* and its absorption suffers interference from the protein codified for *MDR1* gene.

In this present study, we investigated the relationship between the *MDR1* genotype and the *dextromethorphan* (DM) pharmacokinetics in 27 healthy Brazilian subjects and determined the *MDR1* genotype frequency in this population. The *MDR1* genotype was determined by PCR-DNA sequencing. After single oral administration of 30 mg DM, plasma concentrations of DM and DX were measured and its pharmacokinetic characteristics were compared according to *MDR1* genotype. The area under the plasma concentration-time curve 0-4h, 0-24h and 0-48h was significantly lower in subjects with 3435TT ( $1.18 \pm 0.05$ ,  $2.11 \pm 0.83$ ,  $2.12 \pm 0.83$  ngh/ml) than in those with 3435CC ( $4.49 \pm 3.91$ ,  $11.07 \pm 9.98$ ,  $11.33 \pm 10.53$  ngh/ml) and 3435CT ( $3.91 \pm 3.22$ ,  $8.07 \pm 7.41$ ,  $8.20 \pm 7.57$  ngh/ml). The maximum plasma concentrations were lower in subjects with 3435TT ( $0.45 \pm 0.05$  ng/ml) than in those with 3435CC ( $1.74 \pm 1.52$  ng/ml) and 3435CT ( $1.52 \pm 1.22$  ng/ml). There wasn't effect of gender or age on the distribution. The distribution of the *MDR1* genotype at exon 26, 21 and 12 was, respectively, 41 % CC, 44 % CT, and 15 % TT, 56 % GG, 40 % GT, and 4 % TT and 12 % CC, 38 % CT, and 50 % TT. In conclusion, DM pharmacokinetics was affected by the genetic polymorphisms of the *MDR1* gene in healthy Brazilian subjects. These findings may provide a plausible explanation for interindividual variation in the disposition of DM, although our data couldn't explain the exact mechanisms by which the polymorphic *MDR1* gene paradoxically reduces the plasma levels of DM. Further evaluation is thus warranted.

# **1- INTRODUÇÃO**

A farmacogenômica descreve o uso da informação genética para orientar a escolha da terapia farmacológica numa base individual: indivíduos distintos podem apresentar respostas fisiológicas completamente diferentes a um mesmo fármaco, podendo um deles ficar curado enquanto o outro não. Assim, pressupõe-se que é possível prever diferenças nas respostas a agentes terapêuticos entre indivíduos a partir de sua constituição genética (Pirazzoli e Recchia, 2004). Com base neste princípio, a descoberta das variações genéticas específicas associadas a uma resposta terapêutica boa ou inadequada a um determinado fármaco deverá permitir a individualização das escolhas terapêuticas baseadas no genótipo que regula a farmacocinética e a farmacodinâmica dos medicamentos. Estudos atuais de farmacogenômica têm como objetivo otimizar a eficácia de uma droga e diminuir os efeitos colaterais e a toxicidade (Eichelbaum *et al.*, 2005). A existência de um banco de dados disponível das características genéticas de cada indivíduo poderia contribuir para uma seleção mais adequada de drogas do que a seleção baseada na tentativa e erro, minimizando o aparecimento de efeitos adversos e contribuindo inclusive em termos econômicos. Nesta área, os estudos de polimorfismos genéticos podem ter um impacto nos ajustes individuais da dose de um determinado fármaco, para portadores dessas mutações (Marzolini *et al.*, 2004). Os polimorfismos de genes que codificam transportadores protéicos, enzimas metabolizadoras de fármacos ou receptores para drogas relacionam-se às alterações funcionais no fenótipo (níveis alterados de expressão e / ou de atividade de determinadas proteínas), contribuindo na resposta a uma droga (Woojin Lee *et al.*, 2005). Assim, a correlação entre polimorfismos de genes relacionados ao transporte de drogas, como os polimorfismos do gene *MDR1*, e a sua repercussão farmacocinética (fase I do desenvolvimento clínico), em indivíduos voluntários sadios, podem auxiliar no tratamento (escolha do medicamento e de sua posologia) tanto da população em geral quanto de pacientes com uso prolongado de um medicamento, pela possibilidade de uma pré-seleção mais adequada do fármaco a ser prescrito. Este procedimento poderia trazer benefícios para o sistema de saúde pela diminuição substancial de internações para o tratamento de efeitos colaterais.

## **2- OBJETIVOS**

## 2.1- Objetivos Gerais

- Genotipagem dos exons 12, 21 e 26 do gene *MDR1*, em indivíduos sadios da região de Campinas - SP, que participaram como voluntários em estudo de bioequivalência, aos quais foi ministrada a droga *dextromethorphan*.
- Análise da correlação entre os polimorfismos do exon 26 do gene *MDR1* e a farmacocinética da droga *dextromethorphan*, com a finalidade de identificar, através de genotipagem, populações que apresentam diferenças significativas no nível de absorção do referido fármaco.

## 2.2- Objetivos Específicos

- Classificação dos participantes do estudo em metabolizadores rápidos / ultra-rápidos ou lentos / intermediários.
- Avaliação das frequências alélica e genotípica dos exons 12, 21 e 26 do gene *MDR1* em indivíduos sadios da região de Campinas - SP.

### **3- REVISÃO DA LITERATURA**

### 3.1- Farmacogenética / Farmacogenômica

O termo *farmacogenética* foi utilizado pela primeira vez pelo geneticista alemão Friedrich Vogel, na década de 50, após a constatação da existência de respostas diferenciais a uma mesma droga ministrada em doses equivalentes e do fato que algumas dessas respostas apresentavam padrão de herança mendeliana simples (Shields *et al.*, 1994). A farmacogenética ou farmacogenômica, termos atualmente utilizados como sinônimos, refere-se ao estudo das variações individuais, advindas de fatores genéticos, nas respostas à ação de medicamentos ou de poluentes ambientais. Ou seja, estudo da expressão de genes individuais relevantes na susceptibilidade a doenças e na resposta a fármacos nos níveis celular, tecidual, individual ou populacional (Pirazzoli e Recchia, 2004), relacionando a absorção ou o metabolismo de drogas e os estudos moleculares de DNA ou RNA.

Na farmacocinética, estudo do que o organismo faz com as drogas, algumas investigações possibilitaram o conhecimento sobre variabilidade genotípica e fenotípica, entre indivíduos, na regulação dos processos de metabolização xenobiótica. Foram assim definidos os termos *polimorfismo genético*, que corresponde a um traço mendeliano existente numa população em que, no mínimo, dois fenótipos ocorrem em frequência maior do que ou igual a 1 % (Nebert *et al.*, 1996), e *mutação*, que corresponde a alteração da seqüência de bases do DNA a qual pode levar a alteração no códon do mRNA (Passarge, 2001).

Durante cerca de 20 anos, a caracterização desses polimorfismos esteve restrita à detecção de variantes enzimáticas através de eletroforese sem, no entanto, analisar as características moleculares. Todavia, a caracterização de diversos genes do metabolismo, por meio de técnicas de clonagem e de seqüenciamento, e a disponibilidade de metodologias acuradas para a identificação de variantes alélicas no DNA possibilitaram identificar inúmeros polimorfismos em diversas populações.

O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) é capaz de produzir alterações em resposta a fármacos, transformando-se em alvo de pesquisa da farmacogenômica. Em alguns casos, a diferença em um único nucleotídeo resulta no aumento das concentrações máximas de determinadas drogas no sangue e na incidência freqüente de efeitos adversos

inesperados. Vários polimorfismos em genes que codificam enzimas, transportadores e receptores para diversos medicamentos já foram descritos, indicando, em alguns deles, uma associação entre a farmacocinética e a eficácia das drogas (Hiratsuka *et al.*, 2006).

Diversos fatores como a dieta alimentar, a idade, o sexo, o ritmo circadiano e as interações com outras drogas podem levar a modificações na resposta de um indivíduo a um determinado medicamento. Além disso, alterações genéticas podem determinar várias diferenças individuais na absorção, na distribuição, no metabolismo e na excreção de fármacos, assim como na interação droga-receptor. Essas alterações genéticas podem estar relacionadas aos transportadores protéicos, como o transportador PGP que altera a absorção de drogas; aos receptores de fármacos, como os 2-adrenérgicos, que influenciam a resposta da droga; e à função enzimática do sistema citocromo P450 ou à fase II da metabolização da droga (Rogers *et al.*, 2002).

### **3.2- Absorção de Drogas**

A absorção é um processo farmacocinético cujo objetivo é transferir o fármaco do seu local de administração para o plasma ou para a linfa, através do fluxo sanguíneo.

Por muito tempo, a absorção de drogas através do trato gastrointestinal (TGI) foi considerada um processo passivo dependente do tamanho do cristal, da solubilidade, da lipofilicidade, do pKa da droga e do pH do líquido intestinal. Uma vez absorvido o fármaco, a transferência do sangue para os tecidos estaria relacionada às propriedades físico-químicas da droga e à capacidade de ligação das proteínas. Alguns estudos demonstraram que muitas drogas são substratos de transportadores protéicos ativos (proteínas de membrana) que mantêm a homeostase celular importando e exportando compostos, sendo esses transportadores os principais determinantes da farmacocinética da droga. Pela localização no intestino, no fígado e no epitélio renal, tais transportadores são importantes na absorção, na biodisponibilidade e na eliminação de muitas drogas, assim como no direcionamento e / ou impedimento do acesso desses fármacos a determinados órgãos (Eichelbaum *et al.*, 2004).

Diversos transportadores de membrana estão envolvidos na absorção das drogas no TGI, na captação pelo cérebro ou no transporte em locais específicos de ação, como na fenda sináptica.

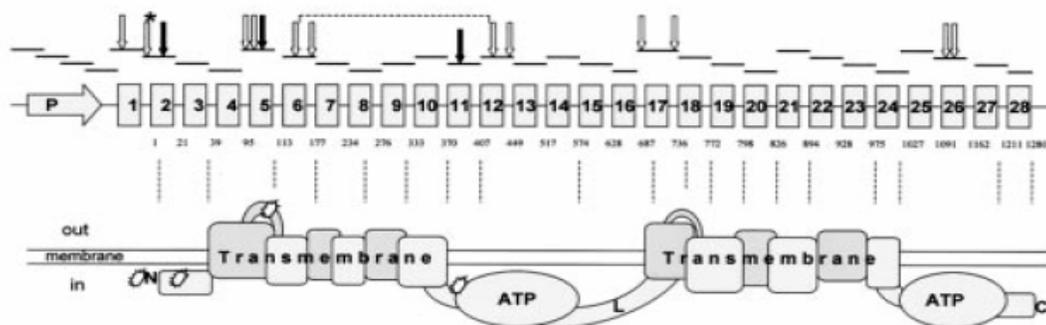
### 3.2.1- Transportador Glicoproteína P

#### 3.2.1.1- Caracterização da Glicoproteína P

A Glicoproteína P (PGP), membro da família dos transportadores ABC, é uma bomba de efluxo transmembrânica ATP-dependente. A PGP, presente em diferentes organismos, de bactérias a seres humanos, foi isolada primeiramente de células de ovário de hamster chinês (CHO) resistentes a colchicina (Juliano & Ling, 1976). Posteriormente, sua expressão foi observada em diversos tecidos humanos sem alterações fisiopatológicas, sugerindo alguma função fisiológica importante (Thiebaut *et al.*, 1987).

Essa Glicoproteína P é codificada por uma pequena família gênica que, nos seres humanos, corresponde a dois genes, denominados *MDR1* e *MDR2* (*Multiple Drug Resistance* - resistência a múltiplas drogas). O gene *MDR1* apresenta 28 exons e está localizado no braço longo do cromossomo 7, na região 21.1 (Callen *et al.*, 1987); teve sua identificação baseada na superexpressão em células tumorais associadas a uma resistência cruzada a diversos medicamentos anticancerígenos (Ueda *et al.*, 1987).

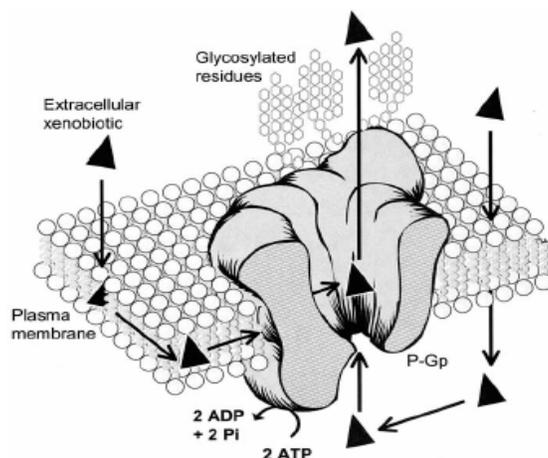
A análise da seqüência de aminoácidos e dos domínios funcionais da glicoproteína P possibilitou a determinação de um modelo hipotético bidimensional dessa proteína (figura 1).



**Figura 1- Estrutura Bidimensional PGP.** Modelo hipotético bidimensional da PGP humana, baseado na análise da seqüência de aminoácidos e seus domínios funcionais.

**Fonte:** Hoffemeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. **PNAS** 2000; 97(7): 3473–8.

A PGP possui 1280 aminoácidos, uma massa molecular de aproximadamente 170 kDa (Schwab *et al*, 2003) e é composta por 2 seqüências simétricas e homólogas, cada uma contendo 6 domínios transmembrânicos e um sítio de ligação para a molécula de ATP (figura 2).



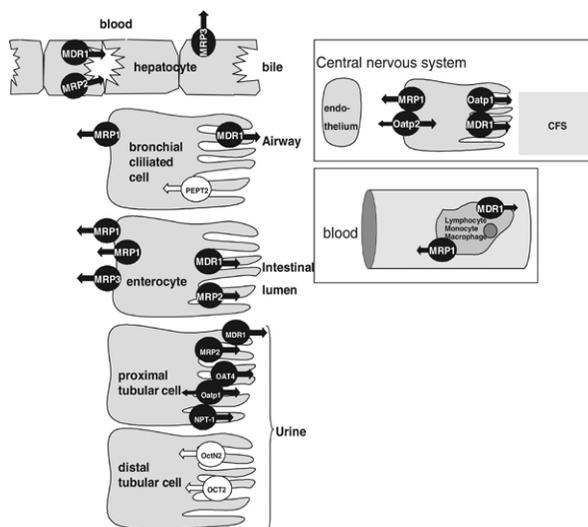
**Figura 2- Estrutura Tridimensional da PGP.** Modelo tridimensional da PGP humana.

**Fonte:** Marzolini C, Paus E, Buclin T e Kim RB. Polymorphisms in human *MDR1* (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. **Clinic Pharmacol Therap** 2004; 75(1):13-33.

A função da PGP é a exportação de numerosas substâncias, incluindo variadas drogas, do meio intracelular para o extracelular, isto é, o transporte de substratos contra o gradiente de concentração (Kwan & Brodie MJ, 2005; Sakaeda *et al.*, 2001), com o objetivo de proteger as células do acúmulo de substâncias xenobióticas ou de metabólitos tóxicos (Meyer, 2000).

A PGP está localizada na superfície canalicular dos hepatócitos, na superfície apical das células do túbulo proximal nos rins e na superfície da bordadura em escova dos enterócitos. Ela também é expressa no epitélio do plexo coróide do cérebro (barreira sangue-fluido cerebrospinal) e na superfície luminal dos capilares do cérebro (barreira hematoencefálica - BHE) (Figura 3). Foi constatada a presença da PGP em outros tecidos

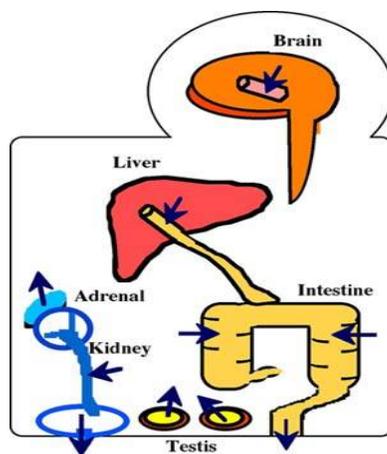
nos quais existem barreiras hemato-teciduals, como a placenta, os ovários e os testículos, assim como em células tronco hematopoéticas, células mononucleares do sangue periférico, macrófagos maduros, células natural *killers*, células dendríticas apresentadoras de antígeno e linfócitos T e B (Marzolini *et al.*, 2004).



**Figura 3-** Localização celular da PGP humana.

**Fonte:** Rodriguez-Novoa S, Barreiro P, Jimenez-Nacher I, Soriano V. Overview of the pharmacogenetics of HIV therapy. *Pharmacogenomics J* 2006; 6(4):234-45.

A função e a localização anatômica das PGP (figura 4) sugerem que este transportador age como uma barreira protetora para manter toxinas fora do corpo, excretando estes compostos na bile, na urina e no lúmen intestinal, além de limitar a absorção dos mesmos no TGI, impedindo, assim, o acúmulo em órgãos críticos como o cérebro, as gônadas, a medula óssea e o feto (Marzolini *et al.*, 2004; Tanigawara, 2000). No cérebro normal, a PGP regula o intercâmbio de xenobióticos entre o plasma e o cérebro (Marchi *et al.*, 2004), por sua atuação na BHE.



**Figura 4-** Localização anatômica da PGP humana.

**Fonte:** Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, *et al.* Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. **J Biol Chem** 1992; 267(34):24248-52.

Do ponto de vista farmacológico, devido a sua distribuição estratégica em diversos órgãos responsáveis pela absorção, distribuição, metabolização e eliminação de várias substâncias, conclui-se que a PGP pode desempenhar um papel importante na farmacocinética e na disposição de seus substratos (Fromm, 2000). O grau de expressão e de funcionalidade da PGP pode afetar diretamente a eficácia da terapêutica de alguns de seus substratos, através de alterações na farmacocinética. Isto é de suma importância na terapia do câncer, na qual a expressão e a atividade elevadas do gene *MDR1* fazem com que as células cancerosas se tornem refratárias ao tratamento com muitos fármacos, em sua maioria, substratos da PGP (Ambudkar *et al.*, 1999).

Os substratos transportados pela PGP apresentam um amplo espectro, incluindo uma variedade de agentes farmacologicamente distintos, usados no tratamento do câncer, da hipertensão, da alergia, das infecções, das doenças neurodegenerativas e das inflamações (Ambudkar *et al.*, 1999). Não obstante, entre os substratos da PGP também se encontram fármacos com estreitos espectros terapêuticos, como alguns agentes quimioterápicos,

ciclosporina A, verapamil, terfenadina, fexofenadina e inibidores de protease para o vírus da AIDS (HIV-1).

Na tabela 1 estão apresentados alguns fármacos que constituem substratos da PGP, descritos de acordo com o seu mecanismo de ação (classe farmacológica).

**Tabela 1-** Alguns dos substratos da proteína PGP.

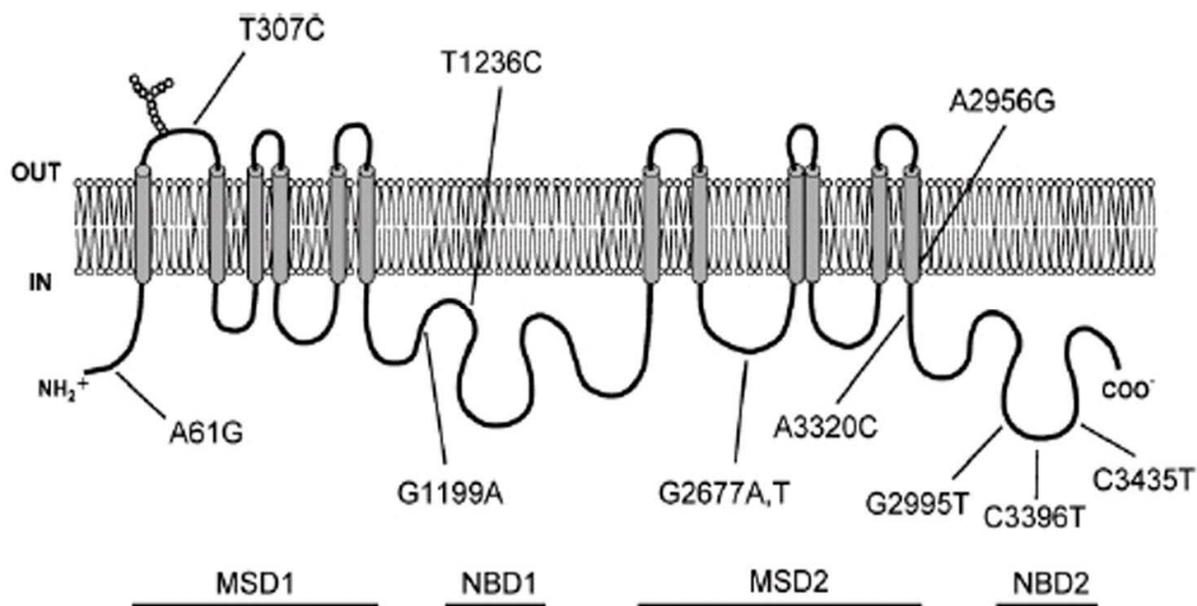
<b>Classe Farmacológica</b>	<b>Fármacos</b>
Antiácidos	Cimetidina, Ranitidina
Antiarrítmicos	Digoxina, Quinidina, Verapamil
Antibióticos	Eritromicina, Rifampina, Tetraciclina
Anticancerígenos	Actinomicina D, Mitomicina C, Vinblastina
Antidepressivos	Amitriptilina
Antieméticos	Ondansetrom, Tropisetrom
Antiepiléticos	Fenobarbital, Fenitoína
Anti-hipertensivos	Celiprolol, Diltiazem, Talinolol
Antimicóticos	Itraconazol
Antivirais	Amprenavir, Indinavir, Ritonavir
Glicocorticóides	Aldosterona, Cortisol, Dexametasona
Imunossupressores	Ciclosporina A, Sirolimus, Valspodar
Opióides	Morfina

A relação estrutura-atividade dos substratos da PGP ainda não está totalmente elucidada, embora a lipofilicidade e o número de ligações de hidrogênio vem sendo considerados parâmetros relevantes, uma vez que ambos foram correlacionados à afinidade de compostos para PGP (Marzolini *et al*, 2004).

### 3.2.1.2- Polimorfismos do gene *MDR1*

O gene *MDR1* humano é altamente polimórfico ocorrendo em várias combinações alélicas, sendo que a maioria dessas alterações genéticas ou estão localizados nas regiões dos íntrons ou são silenciosas (Cascorbi *et al.*, 2001).

Inicialmente, um estudo realizado através de uma avaliação sistemática revelou 15 diferentes polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) do gene *MDR1* humano, sendo 11 desses SNPs não codificantes, localizados em íntrons e / ou em posições não fixas, e 1 SNP precedendo diretamente o códon iniciador de transcrição ATG (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Atualmente, já foram identificados 28 SNPs, sendo que 19 estão localizados em exons e 11 não são codificados. A tabela 2 descreve a localização, a posição, a mutação e o efeito causado por esses 29 polimorfismos do gene *MDR1* (Figura 5).



**Figura 5-** Polimorfismos mais frequentes do gene *MDR1*. Localização dos polimorfismos mais frequentes do gene *MDR1*.

**Fonte:** Sakaeda T. *MDR1* genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20(6):391-414.

**Tabela 2-** Descrição dos 28 SNPs do gene *MDR1* quanto a localização, posição, mutação e efeito causado.

Localização	Posição	Mutação	Efeito
Promotor	5' flanking/-41	A/G	Não codificante
Exon1a	Exon1a/-145	C/G	Não codificante
Exon1b	Exon1b/-129	T/C	Não codificante
Íntron 1	Exon2/-4	C/T	Não codificante
Íntron 1	Exon2/-1	G/A	Translação inicial
Exon2	Exon2/61	A/G	Asn21Asp
Íntron 4	Exon5/-35	G/C	
Íntron 4	Exon5/-25	G/T	
Exon5	Exon5/307	T/C	Phe103Leu
Íntron 6	Exon6/+139	C/T	
Íntron 6	Exon6/+145	C/T	
Exon7	Exon7/548	A/G	Asn183Ser
Exon11	Exon11/1199	G/A	Ser400Asn
Exon12	Exon12/1236	C/T	Silenciosa
Íntron 12	Exon12/+44	C/T	
Exon13	Exon13/1474	C/T	Arg492Cys
Íntron 16	Exon17/-76	T/A	
Íntron 17	Exon17/+137	A/G	
Exon21	Exon21/2650	C/T	Silenciosa
		G/T	Ala893Ser
Exon21	Exon21/2677	G/A	Ala893Thr
Exon24	Exon24/2956	A/G	Met986Val
Exon24	Exon24/2995	G/A	Ala999Thr
Exon26	Exon26/3320	A/C	Gln1107Pro
Exon26	Exon26/3396	C/T	Silenciosa
Exon26	Exon26/3421	T/A	Ser1141Thr
Exon26	Exon26/3435	C/T	Silenciosa
Exon28	Exon28/4030	G/C	
Exon28	Exon28/4036	A/G	

### Legenda:

A posição do polimorfismo foi definida a partir da primeira base nitrogenada do códon iniciador ATG, sendo a base A definida como número 1.

Para as mutações localizadas nos íntrons, as posições foram definidas como posição *downstream* (-) ou posição *upstream* (+) de seu respectivo exon.

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

A mutação do exon 21 (G2677T/A), que substitui na posição 893 o aminoácido Alanina pelo aminoácido Serina (G2677T) ou o aminoácido Alanina pelo aminoácido Treonina (G2677A) e a mutação silenciosa do exon 26 (C3435T, Ile1145Ile) são os polimorfismos mais comuns do gene *MDR1* humano. Os polimorfismos C3435T e G2677T/A influenciam a expressão duodenal da PGP e alteram a absorção e / ou eliminação de muitas drogas.

#### ***Polimorfismo C3435T – exon 26***

O polimorfismo C3435T no exon 26 do gene *MDR1* foi a primeira alteração genética a ser associada à expressão alterada da proteína PGP, influenciando a administração oral de certos substratos da PGP, como a digoxina. Apesar desse polimorfismo não causar alteração no aminoácido codificado Isoleucina, embora haja modificação no códon (ATC para ATT), ele está correlacionado aos níveis de expressão e à função dessa glicoproteína no intestino: foi observada uma diferença na expressão da PGP no duodeno de indivíduos homocigotos para o alelo mutante e de indivíduos homocigotos para o alelo selvagem.

A relação entre o polimorfismo C3435T e a função e / ou expressão da PGP tem sido investigada. Algumas hipóteses propostas, ainda não conclusivas, são: uma ligação entre esse polimorfismo e outros sítios no mesmo gene, como no exon 21, no exon 12, os quais são parte de um haplótipo comum (Kim *et al.*, 2001); uma redução na eficiência de tradução (Schwab *et al.*, 2003); uma alteração no processamento e no controle e regulação de tradução do mRNA (Wang *et al.*, 2005); uma ligação com uma seqüência importante para o processamento do mRNA (Jamroziak *et al.*, 2002); ou a troca do códon ATC, que é freqüente, para um códon raro, ATT, retardando o início da tradução protéica (Anthony & Slach, 2002) e podendo alterar a função da PGP (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007).

O polimorfismo C3435T foi associado à variação nos níveis intestinais da PGP, influenciando a captação de substratos da PGP administrados por via oral, como digoxina, fexofenadina e ciclosporina A. Hoffemeyer e colaboradores demonstraram que as concentrações de digoxina no plasma eram até quatro vezes mais elevadas em indivíduos homozigotos (TT) para essa mutação C3435T, após uma única dose oral desse fármaco, e que a concentração máxima no plasma de digoxina também se encontrava aumentada depois da administração crônica (Hoffemeyer *et al.*, 2000).

Alguns estudos indicam que as alterações genéticas variam substancialmente de acordo com os grupos étnicos. As respostas às drogas e à farmacocinética de diversas terapias, como a quimioterapia, também apresentam variações conforme as diferentes raças. Além disso, a avaliação dos haplótipos, combinação de polimorfismos conjuntamente herdados, pode resultar em uma melhor correlação com o fenótipo do que com polimorfismos individuais (Woojin Lee *et al.*, 2005).

O SNP C3435T foi analisado entre as populações africanas, caucasianas e asiáticas (Li *et al.*, 2005) (Tabela 3).

**Tabela 3-** Análise das frequências alélica e genotípica em diferentes etnias.

Population samples (n)	Allele freq		Genotype freq			p Value	OR	95% CI
	C	T	CC	CT	TT			
Chinese (265)	0.56	0.44	0.32	0.48	0.2	/	/	/
Ghanaian (206)	0.83	0.17	0.67	0.34	0	0.00	0.26	0.19–0.36*
Kenyan (80)	0.83	0.17	0.7	0.26	0.04	0.00	0.26	0.17–0.40*
Sudanese (51)	0.73	0.27	0.52	0.43	0.06	0.00	0.45	0.28–0.72*
Ashkenazi (100)	0.65	0.35	0.42	0.46	0.12	0.03	0.69	0.49–0.96*
Polish (122)	0.62	0.38	0.42	0.41	0.17	0.13	0.79	0.58–1.07
Japanese (114)	0.61	0.39	0.35	0.53	0.12	0.21	0.82	0.59–1.12
French (81)	0.57	0.43	0.36	0.42	0.22	0.87	0.97	0.68–1.38
Filipino (60)	0.56	0.41	0.38	0.42	0.2	0.74	0.93	0.62–1.40
Saudi (96)	0.55	0.45	0.37	0.38	0.26	0.84	1.03	0.74–1.44
Spanish (408)	0.52	0.48	0.26	0.52	0.22	0.14	1.18	0.95–1.47
German (188)	0.52	0.48	0.27	0.48	0.24	0.24	1.17	0.89–1.53
Caucasian (UK) (190)	0.48	0.42	0.24	0.48	0.28	0.41	1.12	0.85–1.47
Malay (99)	0.48	0.52	0.25	0.46	0.28	0.05	1.38	1.0–1.92
New Zealander (160)	0.47	0.53	0.21	0.52	0.27	0.01	1.44	1.09–1.91*
Indian (264)	0.38	0.62	0.25	0.46	0.28	0.00	2.07	1.62–2.65*

\* Data showing significant significances are in bold print. The C allelic frequency of the Chinese serves as control.

**Fonte:** Li Y, Wang Y, Sun J, Li Y, Yang L. Distribution of the functional *MDR1* C3435T polymorphism in the Han population of China. **Wiss Med Wkly** 2006; 136:377–82.

Um aspecto interessante relacionado ao polimorfismo C3435T do exon 26 é a associação entre o aumento do risco para determinadas doenças e o papel protetor do alelo C (tipo selvagem) do exon 26. Esse alelo é mais frequentemente expresso na população africana quando comparada com a caucasiana e a asiática. A descoberta de que o alelo C está associado a uma expressão mais elevada da PGP (Hoffemeyer *et al*, 2000), levou à hipótese de que a frequência mais elevada do genótipo CC na população africana, pode representar uma vantagem seletiva desse genótipo em relação a infecções do TGI, muito comuns nessa população (Schaeffeler *et al.*, 2001).

Do mesmo modo, nas doenças inflamatórias do intestino, tais como a colite ulcerativa e a Doença de Crohn, estudos epidemiológicos apontaram uma menor incidência de colite ulcerativa na população africana, em comparação com a caucasiana, o que está de

acordo com a frequência alélica do polimorfismo no exon 26 do gene *MDR1* para as diferentes etnias (Schaeffeler *et al.*, 2001).

Siegsmund e colaboradores observaram que a frequência do alelo variante 3435T do exon 26 do gene *MDR1*, em pacientes com carcinoma renal, é significativamente mais elevada em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo que a menor frequência do alelo 3435T na população africana pode ser um fator determinante da incidência reduzida do carcinoma renal em diferentes regiões (Siegsmund *et al.*, 2002).

Recentemente foi identificada uma associação entre os polimorfismos no exon 26 do gene *MDR1* e a epilepsia, onde a frequência do alelo 3435C é significativamente maior nos indivíduos acometidos desta doença. No cérebro epilético, o gene *MDR1*, associado à resistência a múltiplas drogas, está superexpresso em algumas células específicas, como as células endoteliais dos vasos sanguíneos que constituem a BHE e as células do parênquima constituídas por neurônios e astrócitos. Nas células endoteliais, a PGP pode ter influência na eliminação de drogas antiepilépticas do cérebro para o sangue, fenômeno que estaria relacionado ao tratamento antiepiléptico não responsivo. Por sua vez, a PGP não é normalmente medida nas células do parênquima. Essas células específicas estão localizadas nas lesões associadas aos focos epileptogênicos ativos no cérebro, possivelmente levando a alterações na distribuição e / ou penetração de drogas no cérebro. (Marchi *et al.*, 2004).

Em relação às doenças neurodegenerativas, o polimorfismo C3435T do exon 26 do gene *MDR1* foi analisado em pacientes com Doença de Parkinson, tanto expostos a pesticidas quanto não expostos, comparando-se com indivíduos controles. Embora nenhuma correlação significante entre o polimorfismo do gene *MDR1* e a Doença de Parkinson tenha sido observada, verificou-se uma significante associação entre pacientes com Doença de Parkinson expostos a pesticida e o polimorfismo do exon 26: nesses pacientes uma frequência estatisticamente alta de heterozigotos CT e de homozigotos TT foi observada. Isto sugere que o alelo 3435C do exon 26 desempenha um papel protetor para pacientes com Doença de Parkinson, em especial entre aqueles com um histórico de exposição a pesticidas (Drozdik *et al.*, 2003).

A relação entre os polimorfismos do gene *MDR1* e a terapia para o HIV foi estudada, uma vez que todos os inibidores de protease do HIV atualmente disponíveis são transportados pela PGP e que a absorção intestinal e a penetração no Sistema Nervoso Central desses inibidores são altamente dependentes da PGP. Em seus estudos, Fellay e colaboradores (Fellay *et al.*, 2002) observaram um aumento significativo na contagem de células CD4 em pacientes HIV+ portadores do genótipo TT do exon 26, seis meses após o início da terapia retroviral, hipotetizando-se que esse benefício estaria associado ao alelo T e que resultaria de um aumento na penetração do inibidor de protease do HIV nas células CD4. Além de alterar a concentração intracelular da droga, verificou-se que a superexpressão da PGP *in vitro* reduzia a suscetibilidade das células CD4 humanas à infecção com o HIV por afetar a fusão viral e a liberação das partículas virais (Speck *et al.*, 2002).

#### ***Polimorfismo G2677T/A – exon 21***

O polimorfismo G2677T/A foi associado às variações na atividade da PGP. Experimentos *in vitro* demonstraram que as células que expressam a variante 2677T têm um efluxo maior de digoxina quando comparadas àquelas que expressam o alelo 2677G. Além disso, os indivíduos que carregam o alelo 2677T tiveram uma atividade mais elevada da PGP *in vivo*, verificada através dos níveis plasmáticos de fexofenadina, do que aqueles com o alelo 2677G.

A frequência do alelo 2677T é mais elevada nos asiáticos e nos caucasianos (38 a 62 %) do que nos afro-americanos (15 %). A frequência do alelo 2677A é mais elevada em japoneses (15 a 22 %) do que nos caucasianos (2 a 4 %).

#### ***Polimorfismo C1236T – exon 12***

Existem diferenças nas frequências do alelo do exon 12 (C1236T) entre indivíduos caucasianos e asiáticos. O alelo da variante 1236T é mais encontrado em indivíduos asiáticos do que em caucasianos.

### 3.3- Metabolização de Drogas

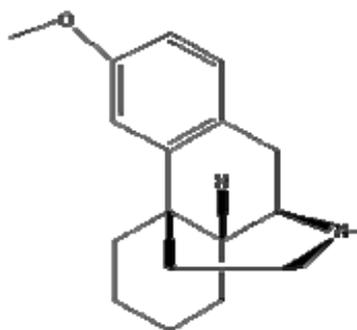
A metabolização de fármacos envolve dois tipos de reações bioquímicas, conhecidas como reações de fase I e de fase II. Essas ocorrem principalmente no fígado, podendo também ocorrer no plasma, no pulmão ou no intestino. As reações de fase I são catabólicas e visam introduzir um grupo reativo polar, como o –OH, num processo conhecido como “funcionalização”. Alguns componentes do sistema CYP450 estão envolvidos nesse tipo de metabolização. As reações de fase II são anabólicas e envolvem a conjugação, resultando geralmente em um produto menos lipossolúvel e com carga iônica, que facilita a sua excreção na urina ou na bile.

Os indivíduos podem ser classificados de acordo com os diferentes tipos de metabolizadores - ultra-rápidos, rápidos, intermediários ou lentos - de acordo com o alelo que possuem. Os metabolizadores ultra-rápidos, 1 a 10 % da população, possuem genes duplicados ou multiduplicados ativos. Os metabolizadores rápidos, 75 a 85 % da população, são definidos como indivíduos homocigotos para o alelo selvagem ou para atividades enzimáticas normais. Os metabolizadores intermediários, 10 a 15 % da população, ou os metabolizadores lentos, 5 a 10 % da população, correspondem aos portadores de dois alelos mutantes que levam a uma diminuição de atividade enzimática ou perda de função enzimática. Embora o número e a complexidade das mutações podem ser grandes, apenas alguns genes mutantes, geralmente três a cinco alelos, são comuns e respondem à maioria (mais do que 95 %) dos alelos mutantes (Meyer, 2000).

### 3.4- Fármaco *Dextromethorphan*

#### 3.4.1- Descrição

O fármaco *D-(+)-3-methoxy-17-methyl-(9 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,14 $\alpha$ )-morphinan*, conhecido como *dextromethorphan* (DM) (Figura 6), é um agente antitússico de ação central, que possui baixa afinidade por receptores opióides, não causa dependência e atenua a tolerância analgésica produzida pela substância morfina (Elliot *et al.*, 1994; Mao *et al.*, 1996).



**Figura 6- Dextromethorphan.** Estrutura química.

**Fonte:** [www.chemfinder.com](http://www.chemfinder.com)

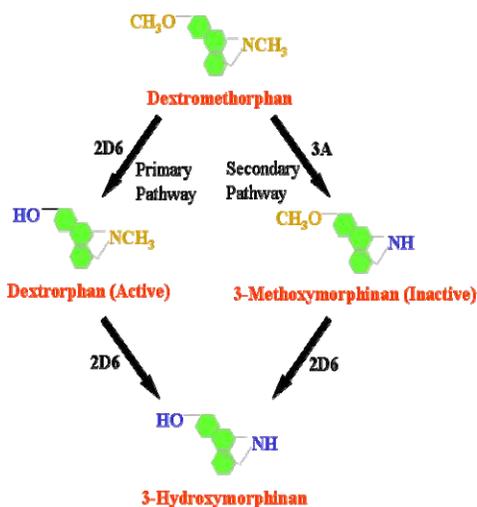
O DM está estruturalmente relacionado ao opióide morfínico *levorphanol* e possui sítios de ligação no Sistema Nervoso Central, tais como os receptores N-metil-D-aspartato e os receptores sigma (Chow *et al.*, 2004).

O fármaco DM é metabolizado no metabólito ativo *Dextrorphan* (DX), através de uma enzima do sistema citocromo P450, a isoforma 2D6, e, em menor quantidade, no metabólito *3-metoximorfina*, através de outras enzimas do sistema citocromo P450, as isoformas 3A4 e 3A5 (Yu and Haining, 2001; Yu *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004).

#### 3.4.2- Farmacocinética

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

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



**Figura 7- Metabolização do *Dextromethorphan* pelas enzimas hepáticas.**

**Fonte:** [www.uchsc.edu/sm/psych/ppfr/cyp\\_metabolism.htm](http://www.uchsc.edu/sm/psych/ppfr/cyp_metabolism.htm)

### 3.4.3- Farmacodinâmica

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

### 3.5- Bioequivalência

O termo bioequivalência corresponde à comparação da biodisponibilidade de dois fármacos diferentes, ou seja, como estes se comportam no organismo em termos de disponibilidade para exercer sua ação terapêutica. São considerados bioequivalentes quando

são semelhantes para ambos os parâmetros  $C_{\text{máx}}$  e  $T_{\text{máx}}$  e as respectivas áreas sob a curva de concentração plasmática versus tempo (AUC) são equiparáveis.

Algumas questões de bioinequivalência têm sido observadas entre fármacos, justificando a importância dos estudos comparativos de diferentes preparações quanto à biodisponibilidade, a fim de garantir ao paciente equivalência terapêutica entre os diferentes medicamentos comercializados, principalmente quando se trata de terapias de risco, onde as substituições entre formulações podem resultar em graves problemas.

Alguns parâmetros são analisados para a determinação da bioequivalência entre fármacos:

A. Concentração plasmática máxima ( $C_{\text{máx}}$ )

Esse parâmetro representa a maior concentração plasmática alcançada pelo fármaco após administração oral, sendo diretamente proporcional à absorção. Desta forma, depende diretamente da extensão, da velocidade de absorção e da velocidade de eliminação. Para um efeito terapêutico ótimo e seguro, esse parâmetro deve estar posicionado, sobre a curva de concentração sanguínea versus tempo, entre a concentração mínima efetiva e a concentração máxima tolerada.

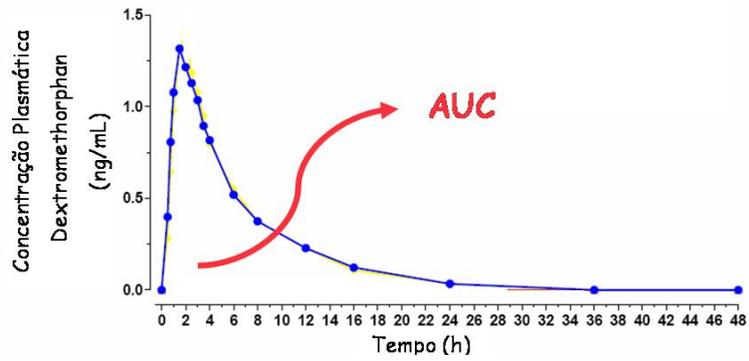
B. Tempo para alcançar a concentração máxima no plasma ( $T_{\text{máx}}$ )

Esse parâmetro tem uma relação estreita com a velocidade de absorção do fármaco e pode ser usado como simples medida da absorção. É atingido quando a velocidade de entrada do fármaco na circulação é excedida pelas velocidades de eliminação e distribuição.

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

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

### Concentração Média



**Figura 8-** Curva tempo (h) versus Concentração Plasmática de droga *Dextromethorphan* (ng/mL).

## **4- CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## 4.1- Casuística

### 4.1.1- Seleção de Voluntários

Um total de 32 voluntários sadios (16 homens e 16 mulheres, 19 a 47 anos), habitantes do município de Campinas - SP, participou do estudo de genotipagem *MDR1*, assim como do estudo de farmacocinética referente ao fármaco *dextromethorphan*.

As condições de saúde dos voluntários foram verificadas através de anamnese; histórico médico; exames físico, neurológico, psiquiátrico e laboratoriais [hemograma completo; glicemia em jejum; colesterol total; triglicerídeos; ácido úrico; uréia; creatinina; bilirrubina total; proteína total; albumina; fosfatase alcalina; transaminase glutâmico oxalacética (TGO/AST); transaminase pirúvica (TGP/ALT); gama GT; velocidade de hemossedimentação; urina tipo I; protoparasitológico para fezes; sorologia negativa para hepatite B, hepatite C e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS); e teste de gravidez para voluntários do sexo feminino (beta HCG)].

### 4.1.2- Comitê de Ética

Os objetivos do estudo foram explicados a cada voluntário, com um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para ser lido e assinado (Anexo 1). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas. Esse estudo foi feito de acordo com as regras da Boa Prática Clínica e a revisão da Declaração de Helsinki para pesquisas biomédicas envolvendo voluntários.

### 4.1.3- Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão de um voluntário para participação no estudo foram:

- A. Assinatura, pelo voluntário, de uma cópia do Termo de Consentimento antes do início dos procedimentos;
- B. Possuir idade entre 18 e 50 anos de idade (inclusive);
- C. Gozar de boa saúde, conforme avaliação dos exames hematológicos, bioquímicos, físicos e de urina;

- D. Possuir registro do uso de medicamentos e histórico médico;
- E. Apresentar sinais vitais clínicos previamente definidos: frequência cardíaca em repouso na faixa de 50 a 90 batimentos por min;
- F. Apresentar pressão sangüínea em repouso (sentado) entre 100 / 60 mmHg e 140 / 90 mmHg;
- G. Ter sido caracterizado como Metabolizador Rápido, com base nos experimentos de fenotipagem;
- H. Não ser fumante ou usuário de produtos à base de fumo;
- I. Suspender a alimentação e bebida (exceto água) após a meia-noite da noite anterior à consulta para triagem (exames laboratoriais);
- J. Estar ciente de que não se pode comer ou beber (exceto água) após a meia-noite anterior à coleta de sangue para os exames laboratoriais de pré-internação (linha base);
- K. Não consumir cafeína durante as 24 hs anteriores à coleta de sangue para análise da linha de base e até 48 hs após as coletas de sangue pós-administração da droga;
- L. Não consumir pomelo ou seu respectivo suco durante as 48 hs anteriores à cada coleta de sangue para análise da linha de base e até 48 hs após as coletas de sangue pós-administração do fármaco;
- M. Para voluntários do sexo feminino, concordar em praticar métodos anticoncepcionais eficazes durante o período de estudo.

#### 4.1.4- Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão de um voluntário para participação no estudo foram:

- A. Apresentar histórico de alergia ou hipersensibilidade ao *dextromethorphan*, à doxilamina, agentes colorantes, flavorizantes e adoçantes artificiais (sacarina);
- B. Apresentar ocorrência ou presença de asma, excesso de catarro, tosse persistente / crônica, dificuldade em urinar devido a um aumento da próstata, úlcera péptica estenosante, obstrução piloroduodenal, obstrução do colo da bexiga, enfisema, glaucoma, problemas de respiração ou bronquite crônica;
- C. Apresentar IMC igual a ou maior do que 28,75;
- D. Apresentar histórico de problemas de coagulação ou doenças hemorrágicas, ou realização atual de terapia anticoagulante;
- E. Apresentar histórico de agranulocitose, anemia aplástica, trombocitopenia ou qualquer distúrbio sangüíneo;
- F. Apresentar histórico de abuso de drogas ou alcoolismo (se homem, caso consuma mais de 35 unidades de álcool por semana ou 12 unidades por dia; se mulher, caso consuma mais do que 24 unidades por semana ou 8 unidades por dia);
- G. Apresentar histórico de consumo maior do que 300 mg de cafeína por dia;
- H. Apresentar exposição a qualquer droga sob investigação dentro dos 3 meses anteriores ao início do estudo ou pretensão em participar de qualquer outro experimento de investigação durante este estudo;
- I. Fazer o uso de remédio que exija prescrição médica nos 14 dias anteriores ao início do estudo ou uso de produto que não exige prescrição nos 7 dias antes do início do estudo, com exceção de produtos contendo *dextromethorphan* ou doxilamina, os quais não podem ter sido tomados nos 21 dias anteriores ao início do estudo (excluindo-se os produtos sob teste ou produtos para fenotipagem administrados neste estudo);

- J. Fazer o uso de anticoncepcional oral de alta dose (contendo mais do que 50 µg de etinilestradiol);
- K. Encontrar-se nos primeiros 3 meses de período pós-parto ou amamentando;
- L. Apresentar teste de urina ou sérico positivo para gravidez;
- M. Apresentar doação ou perda de sangue (maior do que ou igual a 450 mL) nas 12 semanas anteriores ao início do estudo;
- N. Apresentar presença de condição ou uso de medicação que leve o investigador a acreditar que irá interferir na avaliação da medicação em estudo ou confundir a interpretação dos resultados do estudo.
- O. Ter sido caracterizado como Metabolizador Lento, com base nos experimentos de fenotipagem.

#### **4.2- Fármaco**

O fármaco utilizado nesse estudo foi o xarope Walltussin *Dextromethorphan*, no qual 5 mL contem 10 mg de *dextromethorphan* e 100 mg guafenesina USP (Lot 4JK0029, Validade 07/06) da Wallgreen Co., Deerfield, IL, 60015-4616, USA.

#### **4.3- Etapa Clínica**

Os voluntários participantes do estudo foram “internados” no dia anterior à administração da droga, entre 17:00 e 21:00 hs. Uma vez confinados, todos os voluntários ficaram em jejum alimentar por um período de, no mínimo, 8 hs antes da administração da medicação. A ingestão de líquidos foi permitida até 6 hs antes e 2 hs após a administração do fármaco. A dieta, tanto de alimentos quanto de líquidos, obedeceu ao mesmo padrão para todos os voluntários e foi isenta de substâncias xantínicas, tais como café, chá-preto e bebidas contendo coca.

A administração consistiu em uma única dose de 15 mL do xarope Walltussin *Dextromethorphan* (30 mg de DM) ingerido com 200 mL de água sem gás.

Para os experimentos de fenotipagem, duas amostras de urina foram coletadas: uma imediatamente após e outra até 12 horas após a administração do xarope contendo DM.

No decorrer do confinamento, os voluntários receberam duas refeições: uma após 4 hs e outra entre 7 e 8 hs após a administração do fármaco.

#### **4.4- Fenotipagem**

##### 4.4.1- Análise através de HPLC/LC-MS-MS

Os ensaios de quantificação da droga DM e de seu metabólito DX na urina foram realizados para possibilitar a caracterização fenotípica de cada voluntário. As amostras de urina foram coletadas em dois momentos distintos: imediatamente após e 12 horas após a administração do xarope DM.

##### 4.4.1.1- Quantificação das Amostras

As concentrações de DM e de DX no plasma foram quantificadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS-MS) usando como Padrão Interno (PI) as seguintes moléculas *Dextromethorphan-D3* (DM-D3) e *Dextrorphan-D4* (DX-D4).

##### 4.4.1.1.1- Preparação das Curvas de Calibração

A curva de calibração consistiu de um branco (matriz processada sem o PI); de uma amostra de urina denominada zero (matriz processada com o PI); e das amostras de urina padrões a serem quantificadas.

As amostras de urina padrões foram preparadas adicionando as soluções padrões de trabalho contendo o analito a ser quantificado (droga mãe DM ou seu metabólito DX) às amostras controles de urina humana (Tabela 4).

**Tabela 4-** Preparação das curvas de calibração para a análise das amostras de urina através de experimentos de fenotipagem.

<b>Analito</b>	<b>Curva de Calibração (concentração na urina) (ng / mL)</b>	<b>Volume (mL) e Concentração (ng / mL) da Solução Trabalho</b>		<b>Volume (mL) de Urina Adicionado</b>	<b>Volume Total (mL)</b>	<b>Fator de Diluição</b>
DM ou DX	5	1,0	50	9,0	10,0	10
DM ou DX	10	1,0	100	9,0	10,0	10
DM ou DX	20	1,0	200	9,0	10,0	10
DM ou DX	50	1,0	500	9,0	10,0	10
DM ou DX	100	1,0	1000	9,0	10,0	10
DM ou DX	200	1,0	2000	9,0	10,0	10
DM ou DX	500	1,0	5000	9,0	10,0	10
DM ou DX	1000	1,0	10000	9,0	10,0	10
Zero	0	1,0	----	----	----	----
Branco	0	1,0	----	----	----	----

#### 4.4.1.1.2- Preparação dos Controles de Qualidade (QC)

As amostras dos controles de qualidade (QC) foram preparadas adicionando-se as soluções padrões contendo o analito a ser quantificado (DM ou DX) às amostras controles de urina humana (Tabela 5).

Foram utilizados 3 controles de qualidade diferentes.

**Tabela 5-** Preparação das amostras dos controles de qualidade usadas na quantificação de DM ou de DX.

QC	Controle de Qualidade (concentração no plasma) (ng / mL)	VOLUME (mL) e Concentração (ng / mL) da Solução Trabalho	VOLUME de Plasma Controle Adicionado (mL)	VOLUME Total (mL)	Fator de Diluição
QCA	15	1,0      150	9,0	10,0	10
QCB	150	1,0      1500	9,0	10,0	10
QCC	750	1,0      7500	9,0	10,0	10

#### 4.4.1.1.3- Validação da Corrida Analítica

A corrida analítica consiste na curva de calibração, QCs e quantificação do analito (DM ou DX) nas amostras coletadas. O coeficiente de variação máximo permitido para os QCs foi de 15 %, podendo haver 2 rejeições por corrida analítica, desde que não fosse na mesma concentração.

Para o Limite de Quantificação (LOQ), o coeficiente de variação máximo permitido foi de 5 ng / mL. Para a curva de calibração, pelo menos 5 das 8 concentrações deveriam apresentar coeficiente de variação de, no máximo, 15 %, desde que não correspondessem a menor e / ou maior concentração. Para a menor concentração da curva de calibração, o coeficiente de variação não pôde exceder 20 %. O coeficiente de linearidade da curva foi de, no mínimo, 95 %.

#### 4.4.1.1.4- Preparação das Amostras

Inicialmente, um volume de 200  $\mu$ L de amostra de urina foi preparada adicionando-se 50  $\mu$ L de uma solução contendo PI, a fim de obter uma concentração final de 1  $\mu$ g/mL de PI. Então, 200  $\mu$ L de tampão carbonato / bicarbonato (pH 8,5) foram adicionados. As amostras foram misturadas, adicionando-se 4 mL da solução éter

etílico / diclorometano. Após homogeneização, seguida de agitação vigorosa, a fase orgânica (superior) foi transferida para um novo tubo e seca, usando-se um fluxo de nitrogênio. Um volume de 200 µL de solução aquosa de acetonitrila e 12 mM de ácido fórmico foi adicionado à amostra seca para a reconstituição da mesma.

Essa solução preparada foi homogeneizada e transferida para *vials* a fim de possibilitar a sua leitura.

#### 4.4.1.2- HPLC / LC-MS-MS

Um volume de 10 µL de cada amostra preparada foi injetada no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplado a Espectrometria de Massa (LC-MS-MS) (quatro LC, Micromass - UK) ajustado com uma bomba de 4 pólos (G1311A, Agilent-USA) e com um eletrospray positivo (ES+), usando um sistema de monitoramento de reações múltiplas (MRM) e uma solução de fase móvel fluindo no sistema a 1 mL por min. Utilizou-se uma coluna cromatográfica C8 3 µm (100 x 4,6 mm, Prevail, Alltech, USA).

#### 4.4.1.3- Taxas de Biotransformação

As Taxas de Biotransformação  $\frac{C_{DM}}{(C_{DM} + C_{DX})}$  foram calculadas para todos os

voluntários. Os voluntários cujas taxas apresentaram um valor igual ou inferior a 0,3 foram classificados como metabolizadores rápidos, enquanto que aqueles com taxas superiores a 0,3 foram considerados metabolizadores lentos.

#### 4.4.2- Genotipagem CYP2D6

##### 4.4.2.1- *Extração de DNA Genômico*

A extração do DNA genômico foi feita a partir de 4 mL de sangue venoso total coletado em tubos *PAXgene Blood DNA Tubes* (Qiagen AG), utilizando-se o kit de extração *Easy DNA extraction Kit* (Invitrogen).

#### 4.4.2.2 - Amplificação

##### 4.4.2.2.1- Primers

Os primers foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies - IDT (Coralville, IA, USA), sendo as seqüências de bases nitrogenadas descritas por Hersberger (Hersberger *et al.*, 2000) (Tabela 6).

**Tabela 6-** Relação entre os nomes dos primer sintetizados e suas respectivas seqüências de bases nitrogenadas.

N o m e d o P r i m e r	Seqüência do Primer	
3	GCGGAGCGAGAGACCGAG GA	
4	GGTCCGGCCCTGACTCC TTCT	CYP2 D6*3
6	GCTAACTGAGCACG TCCCAGGTCATCCT	
1	TCCCAGCTGGAATCCGGTG TCG	CYP2 D6*4
2	GGAGCTCGCCCTGCAGAG ACTCCT	
B	TCTCCCACCCCAA	

#### 4.4.2.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para cada PCR do alelo 3 da isoforma 2D6 do citocromo P450 (CYP2D6\*3) foram utilizados 2,5 µL de tampão comercial da enzima *Platinum*<sup>®</sup> *Taq* polimerase contendo 1,5 mmol / L MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>); 0,5 µL de dNTP 10 mM (Fermentas<sup>®</sup>); 75 nM de primer 3, 75 nM de primer 4new, 0,75 nM de primer 6 e 0,75 nM de primer Awt; 1U de enzima *Platinum*<sup>®</sup> *Taq* polimerase 5 U / µL (Invitrogen<sup>®</sup>); 200 ng do DNA genômico; e água milliQ completando um volume de 25,0 µL.

A PCR foi feita no termociclador TC-412 FlexiGene (Techene<sup>®</sup>, Cambridge, UK) de acordo com a seguinte programação: denaturação inicial de 10 min a 94°C, seguida de amplificação através de 20 ciclos de 94°C por 30 s, 63°C por 30 s e 72°C por 60 s e 27 ciclos de 94°C por 30s, 53°C por 30s e 72°C por 60s, finalizando com uma extensão final por 7 min a 72°C.

A análise da qualidade do produto de PCR foi realizada em gel de agarose 2 %, corado com Brometo de Etídio e visualizado em transiluminador ultravioleta (UV).

Para cada PCR do alelo 4 da isoforma 2D6 do citocromo P450 (CYP2D6\*4) foram utilizados 2,5 µL de tampão comercial da enzima *Platinum*<sup>®</sup> *Taq* polimerase contendo 1,5 mmol / L de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>); 0,5 µL de dNTP 10 mM (Fermentas<sup>®</sup>); 1,25 nM de primer 1new, 1,25 nM de primer 2new, 75 nM de primer Bmut e 50 nM de primer 7; 1U de enzima *Platinum*<sup>®</sup> *Taq* polimerase 5 U / µL (Invitrogen<sup>®</sup>); 200 ng do DNA genômico; e água milliQ completando um volume de 25,0 µL.

A PCR foi feita no termociclador TC-412 FlexiGene (Techene<sup>®</sup>, Cambridge, UK) de acordo com a seguinte programação: denaturação inicial de 10 min a 94°C, seguida de amplificação através de 15 ciclos de 94°C por 30 s, 63°C por 30 s e 72°C por 60 s e 27

ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 60 s, finalizando com uma extensão final por 7 min a 72°C.

A análise da qualidade do produto de PCR e a determinação do genótipo CYP2D6\*3 e \*4, de cada voluntário, foram realizadas em gel de agarose 2,0 %, corado com Brometo de Etídio e visualizado em transiluminador ultravioleta (UV).

#### **4.5- Etapa Clínica**

Os voluntários novamente selecionados através dos experimentos de fenotipagem, foram “internados” no dia anterior à administração do fármaco, entre 17:00 e 21:00 hs. Uma vez confinados, todos os voluntários ficaram em jejum alimentar por um período de, no mínimo, 8 hs antes da administração da droga. A ingestão de líquidos foi permitida até 6 hs antes e 2 hs após essa administração. A dieta, tanto de alimentos quanto de líquidos, obedeceu ao mesmo padrão para todos os voluntários e foi isenta de substâncias xantínicas, como café, chá-preto e bebidas contendo coca.

A administração consistiu em uma dose de 15 mL do xarope Walltussin *Dextromethorphan* (30 mg de DM) ingerido com 200 mL de água sem gás.

Para possibilitar a realização dos experimentos de farmacocinética, amostras de sangue foram colhidas imediatamente após a administração e nos seguintes tempos: 30 min; 1,0 h; 1h30 min; 2,0 h; 2h30 min; 3,0 h; 3h30 min; 4,0 h; 6,0 h; 8,0 h; 12,0 h; 16,0 h; 24,0 h; 36,0 h; 48,0 h; 72,0 h; 120,0 h; e 168,0 h após a administração da droga.

No decorrer do confinamento, os voluntários receberam 2 refeições: uma após 4 hs e outra entre 7 e 8 hs após a administração do fármaco.

Após 24 hs de “internação”, foi permitido aos voluntários um regime aberto, retornando para coletas de amostras de sangue nos seguintes tempos pós-administração da droga: 36,0; 48,0; 72,0; 120,0; e 168,0 hs.

Após a última coleta da amostra de sangue, os voluntários realizaram exames clínicos (incluindo registro de eletrocardiograma) para a verificação de suas condições físicas.

#### **4.6- Genotipagem *MDR1***

A determinação do genótipo *MDR1* de cada voluntário participante do estudo foi realizada através de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), amplificando-se os exons 12, 21 e 26 do gene *MDR1*. Em seguida, foi feito um seqüenciamento automático (capilar) desse produto de PCR a fim de verificar o alelo presente em cada voluntário.

##### 4.6.1- Extração de DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi feita a partir de 1 mL de sangue venoso total coletado em tubos contendo o anticoagulante EDTA (3 mg), utilizando-se o *Kit GFX Genomic Blood Purification* (Amersham Biosciences).

Inicialmente foi realizada a Lise de Células Vermelhas, adicionando-se 1 mL de sangue total a 3 mL de solução de lise, misturando vigorosamente e incubando à temperatura ambiente por 5 min. O material foi centrifugado por 5 min a 500 g e temperatura ambiente na *Centrífuga 5810R Refrigerated Centrifuge* (Eppendorf). O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente por inversão do tubo, deixando um volume de 50 µL para possibilitar a ressuspensão do *pellet*. Então, um volume de 500 µL de Solução de Extração do *Kit GFX Colum* foi adicionado à amostra ressuspendida, vortexando-se vigorosamente. O material foi incubado à temperatura ambiente por 5 min. Toda a amostra diluída foi transferida para a coluna *GFX*, localizada sobre um *eppendorf*. O material foi centrifugado a 5.000 g (8.000 rpm) por 1 min e temperatura ambiente. A coluna *GFX* foi transferida para um outro *eppendorf* e uma nova centrifugação a 5.000 g (8.000 rpm) por 1 min e temperatura ambiente foi realizada. Em seguida, a coluna *GFX* foi novamente transferida para num novo *eppendorf* e 500 µL de Tampão de Lavagem do *Kit GFX Colum* foram adicionados nessa coluna. O material foi centrifugado a 5.000 g (8.000 rpm) por 1

min e temperatura ambiente. Então, a coluna **GFX** foi transferida para um novo *ependorf* e uma adição de 500 µL de Tampão de Lavagem do *Kit GFX Colum*, seguida de uma centrifugação a 12.128 g (12.000 rpm) por 3 min e temperatura ambiente, foram realizadas. A coluna **GFX** foi transferida novamente e adicionaram-se 50 µL de solução Tris-HCl 10 mM sobre essa coluna a fim de eluir o DNA. O material foi incubado à temperatura ambiente por 1 min e centrifugado a 12.128 g (12.000 rpm) por 1 min e temperatura ambiente. Uma nova adição de 50 µL de solução Tris-HCl 10 mM foi feita sobre a coluna **GFX**, centrifugando-se a 12.128 g (12.000 rpm) por 1 min e temperatura ambiente. A coluna **GFX** foi então descartada e todo o eluato, correspondente ao DNA, foi transferido para um novo *ependorf*.

Após a extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro UV Mini 1240 (Shimadzu) e armazenado a 4°C.

#### 4.6.2- Amplificações

##### 4.6.2.1- Primers

Os primers foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA), sendo as seqüências de bases nitrogenadas descritas por Cascorbi (Cascorbi *et al.*, 2001) (Tabela 7).

**Tabela 7-** Relação entre os 3 polimorfismos (SNPs) estudados, os nomes dos primer sintetizados e suas respectivas seqüências de bases nitrogenadas.

SNP	Nome Primer	Seqüência do Primer
<b>Exon 12</b>	MDR-15	5'-TAT CCT GTG TCT GTG AAT TGC C – 3'
C1236T	MDR-16	5'-CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG – 3'
<b>Exon 21</b>	MDR-9	5'-TGC AGG CTA TAGGTT CCA GG – 3'
G2677A	MDR-10	5'-GTT TGA CTC ACC TTC CCA G – 3'
<b>Exon 26</b>	MDR-11	5'-TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG – 3'
C3435T	MDR-12	5'-AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC – 3'

#### 4.6.2.1.1- Preparação de Primers

A solubilização do primer sintetizado consistiu na sua ressuspensão em água milliQ autoclavada de modo a obter uma concentração final de 100  $\mu\text{M}$  de primer em cada 1  $\mu\text{L}$  de solução. Em seguida, o primer ressuspendido foi incubado a uma temperatura de 37°C por 10 min para uma dissolução completa.

O primer ressuspendido foi diluído 10 vezes, em água milliQ, para obter uma concentração de 10  $\mu\text{M}$  de primer em cada 1  $\mu\text{L}$  de solução.

#### 4.6.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para cada reação de PCR foram utilizados 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão comercial da enzima *Taq* DNA polimerase (Sigma<sup>®</sup>); 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM (Fermentas<sup>®</sup>); 1,0  $\mu\text{L}$  de primer forward 10  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{L}$  de primer reverse 10  $\mu\text{M}$ ; 1 U de enzima *Taq* DNA polimerase 5 U /  $\mu\text{L}$  (Sigma<sup>®</sup>); 200-300 ng do DNA genômico; e água milliQ completando um volume de 25,0  $\mu\text{L}$ .

A PCR foi feita no termociclador TC-412 FlexiGene (Techene<sup>®</sup>, Cambridge, UK) de acordo com a seguinte programação: denaturação inicial de 2 min a 94°C, seguida de amplificação através de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s, finalizando com uma extensão final por 7 min a 72°C.

A análise da qualidade produto de PCR foi realizada em gel de agarose 2,0 % a 120V, corado com Brometo de Etídio e visualizado em transiluminador de ultravioleta (UV).

#### 4.6.3- Seqüenciamento

O Seqüenciamento foi realizado através do método de dideoxynucleotídeos, através das seguintes etapas:

#### 4.6.3.1- Reação de PCR

Uma nova reação de PCR foi realizada usando, sem purificação, o produto de PCR amplificado anteriormente. Para a realização dessa reação, o kit de reação de seqüenciamento “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer, USA) foi utilizado. Em cada um dos poços de uma placa de 96 poços (Sorenson, USA) foi adicionado: 6,0 µL de tampão “Save Money” (para a manutenção do pH da solução e ajuste da concentração de cloreto de magnésio); 0,5 µL de BigDye, [kit contendo nucleotídeos livres (dNTPs), nucleotídeos marcados com fluorescência (ddNTPs) e a enzima *Taq* DNA polimerase]; 1,0 µL de primer numa concentração de 5 µM / mL [primer forward (sentido 5' – 3') ou primer reverse (sentido 3' – 5')]; 1,0 µL do Produto de PCR previamente amplificado; e água milliQ completando um volume de 20,0 µL.

O seqüenciamento foi feito num termociclador PCR PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) de acordo com a seguinte programação: amplificação através de 25 ciclos de 95°C por 10 s, 50°C por 30 s e 60°C por 4 min.

#### 4.6.3.2- Purificação do produto de PCR

Antes do início da leitura no sequenciador, uma purificação do produto de PCR foi realizada objetivando a preservação dos capilares do Seqüenciador Automático de DNA e a eliminação de excessos de resíduos, tais como ddNTPs, primers e sais, melhorando, assim, a qualidade das seqüências produzidas.

Em cada poço da placa já preparada, foram adicionados 80 µL de solução de etanol 80 % gelado, com vigorosa homogeneização por inversão do tubo, para a precipitação do DNA. Após uma incubação à temperatura ambiente por 15 min, no escuro, o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 45 min e temperatura de 20°C (Multispeed Refrigerated Centrifuge PK121R, ALC). O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em solução de etanol 70 % (150 µL). O material foi novamente centrifugado a 4.000 rpm por 10 min e temperatura de 20°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento armazenado por 40 min à temperatura ambiente, no escuro, para a precipitação total.

#### 4.6.3.3- Denaturação

O produto de PCR purificado com etanol e precipitado foi ressuscitado em 10 µL de solução de Hi-Di Formamida e denaturado a 96°C por 5 min no termociclador. Posteriormente, foi incubado a uma temperatura de – 20°C por 2 min.

#### 4.6.3.4- Leitura

As amostras foram lidas por eletroforese capilar no Seqüenciador Automático de DNA (modelo 3700 Genetic Analyser ABI Prism, Perkin Elmer), sendo os resultados obtidos na forma de eletroferogramas.

### **4.7- Farmacocinética**

Para os ensaios de quantificação da droga DM através da farmacocinética, amostras de sangue venoso foram coletadas em vários momentos distintos: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 16,0; 24,0; 36,0; 48,0; 72,0; 120,0; e 168,0 hs após a administração da medicação.

Primeiramente, o sangue venoso de cada voluntário, em cada coleta, foi centrifugado, separando-se o plasma para a realização desses experimentos.

Esse plasma foi armazenado a uma temperatura de – 80°C até a realização da etapa analítica referente aos experimentos de farmacocinética.

#### 4.7.1- Quantificação das Amostras

As concentrações de DM e DX no plasma foram quantificadas através HPLC / LC-MS-MS usando como PIs as moléculas DM-D3 e DX-D4.

##### 4.7.1.1- Preparação das Curvas de Calibração

A curva de calibração consistiu de 2 amostras denominadas brancas (amostra matriz processada sem o padrão interno), 2 amostras denominadas zero (amostra matriz processada com o padrão interno) e das amostras de plasma padrões a serem quantificadas, em duplicata.

As amostras de plasma padrões foram preparadas adicionando as soluções padrões de trabalho com o analito (DM ou DX), a ser quantificado, aos plasmas humanos controles (Tabela 8).

**Tabela 8-** Preparação das curvas de calibração para a análise farmacocinética.

Curva de Calibração (concentração no plasma) (ng / mL)	Volume (mL) Adicionado da Solução Trabalho	Concentração (ng / mL) da Solução Trabalho	Volume (mL) de Plasma Adicionado	Volume Total (mL)	Fator de Diluição
20	1,0	200	9,0	10,0	10
50	1,0	500	9,0	10,0	10
100	0,5	2000	9,5	10,0	20
200	1,0	2000	9,0	10,0	10
500	1,0	5000	9,0	10,0	10
2000	1,0	20000	9,0	10,0	10
5000	2,5	5000	7,5	10,0	4
20000	0,2	1000000	9,8	10,0	50

#### 4.7.1.2- Preparação dos Controles de Qualidade (QC) e dos Limites de Quantificação (LOQ)

**Tabela 9-** Preparação dos controles de qualidade e dos limites de quantificação usados na quantificação da droga mãe DM e de seu principal metabólito DX.

Controle de Qualidade (concentração no	Volume Adicionado (mL) da Solução	Concentração (ng / mL) da Solução	Volume de Plasma Adicionado	Volume Total (mL)	Fator de Diluição
--	-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------	-------------------	-------------------

plasma) (ng / mL)	Trabalho	Trabalho	(mL)		
20	0,16	1000000	13,84	14,0	90,0
60	0,40	18000	11,60	12,0	30,0
1800	1,00	18000	9,00	10,0	10,0
3600	2,00	1800	8,00	10,0	5,0
18000	0,18	1800	9,82	10,0	55,60

#### 4.7.1.3- Validação da Corrida Analítica

A corrida analítica consistiu na curva de calibração, QCs e quantificação do analito nas amostras coletadas. O coeficiente de variação máximo permitido para os QCs foi de 15 %, podendo haver 2 rejeições por corrida analítica, não sendo da mesma concentração. Para o Limite de Quantificação (LOQ), o coeficiente de variação máximo permitido foi de 0,20 ng / mL. Para a curva de calibração, pelo menos 5 das 8 concentrações deveriam apresentar coeficiente de variação de, no máximo, 15 %, desde que não correspondessem a menor e / ou maior concentração. Para a menor concentração da curva de calibração, o coeficiente de variação não pode exceder 20 %. O coeficiente de linearidade da curva foi de, no mínimo, 95 %.

#### 4.7.1.4- Preparação das Amostras

Inicialmente, um volume de 500 µL de plasma foi preparado adicionando-se 50 µL de uma solução contendo PI, a fim de obter uma solução cuja concentração final de PI correspondia a 100 ng / mL. Então, 100 µL de um tampão bicarbonato foram adicionados. As amostras foram misturadas novamente, adicionando-se 4 mL de solução éter dietílico / hexano para possibilitar a extração. Após mistura e agitação vigorosa, a fase orgânica superior foi transferida para um novo tubo e seca, usando-se um fluxo de nitrogênio. Um volume de 150 µL de solução aquosa de acetonitrila com ácido fórmico 12 mM foi adicionado à amostra seca para a reconstituição. Essa solução preparada foi homogeneizada e transferida para *vials*.

#### 4.7.2- HPLC / LC-MS-MS

Um volume de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra preparada foi injetada no sistema HPLC / LC-MS-MS (quatro LC, Micromass - UK) ajustado com uma bomba de 4 pólos, eletrospray positivo, usando um sistema de MRM e um fluxo de 1,5 mL da solução de fase móvel por min. Utilizou-se uma coluna cromatográfica C8 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4,6 mm, Prevail, Alltech, USA).

#### 4.7.3- Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados através de uma análise não comportamental dos dados referentes a AUC. Os parâmetros  $C_{\text{máx}}$  e  $T_{\text{máx}}$  foram determinados através dos perfis plasmáticos individuais tempo-concentração para a droga DM. O  $T_{\text{máx}}$  foi estatisticamente avaliado usando a diferença individual, constituindo um intervalo de confiança de 90 %. A AUC foi calculada através de um método linear-logarítmico entre 0 e 4 hs ou entre 0 e 24 hs ou entre 0 e 48 hs.

As análises estatísticas dos dados do estudo analítico foram conduzidas após a transformação logarítmica baseada em modelo aditivo para todos os valores de  $AUC_{0-t}$  e  $C_{\text{máx}}$ . Essa análise foi realizada usando os seguintes programas: *WinNonLin Professional Network Edition 3.2*; *Microsoft Excel 7.0*; e *Graph Pad Prism Version*. A entrada dos dados e seu processamento foram realizados através de arquivos *Microsoft Excel*, baseado nos dados derivados do equipamento de análise.

### **4.8- Análise Estatística: Genotipagem x Farmacocinética**

O teste não-paramétrico de *Wilcoxon Rank Sum* foi usado para as análises estatísticas, comparando os dados e os parâmetros farmacocinéticos entre os indivíduos homocigotos para o alelo selvagem (CC) e os indivíduos homocigotos para o alelo variante

(TT) e entre os indivíduos heterozigotos (CT) e os indivíduos homozigotos para o alelo variante (TT).

As frequências dos alelos e dos genótipos para os exons 12, 21 e 26 do gene *MDR1* foram calculadas através do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para a análise do equilíbrio *Hardy-Weinberg*.

#### 4.9- Soluções

##### 4.9.1- Solução Acetato de Amônio 10 mM

Acetato de Amônio	77,01 mg
H <sub>2</sub> O q. s. p. 100 mL	

##### 4.9.2- Solução Ácido Fórmico 12 mM

Ácido Fórmico	55,24 mg
H <sub>2</sub> O q. s. p. 100 mL	

##### 4.9.3- Solução Aquosa de Acetonitrila (50/50; v/v)

Acetonitrila	50 mL
H <sub>2</sub> O milliQ	50 mL

##### 4.9.4- Solução Aquosa de Acetonitrila e Metanol (45/35/20; v/v/v)

Acetonitrila	45 mL
Metanol	35 mL

---

H <sub>2</sub> O milliQ	20 mL
-------------------------	-------

---

#### 4.9.5- Solução Diclorometano / Éter Etílico (20/80; v/v)

---

Diclorometano	20 mL
Éter Etílico	80 mL

---

#### 4.9.6- Solução Éter Dietílico / Hexano (80/20; v/v)

---

Éter Dietílico	80 mL
Hexano	20 mL

---

#### 4.9.7- Solução Fase Móvel

---

Acetonitrila	90 mL
H <sub>2</sub> O milliQ	9 mL
Ácido Fórmico 12 mM	1 mL

---

#### 4.9.8- Solução Save Money

---

MgCl <sub>2</sub> 1M	7,5 µL
Tris-HCl 1M pH 9,0	300 µL
H <sub>2</sub> O milliQ	1200 µL

---

#### 4.9.9- Solução Tris-HCl 10 mM

---

Trizma HCl	15,76 mg
H <sub>2</sub> O q. s. p. 10mL	

---

A solução foi esterilizada por autoclavagem a 121°C / 250°F por 40 min na autoclave EagleTen (AMSCO).

#### 4.9.10- Solução Tris-HCl 1 M pH 9,0

Trizma HCl	15,76 g
Ajuste do pH para 9,0	
H <sub>2</sub> O q. s. p. 100 mL	

A solução foi esterilizada por autoclavagem a 121°C / 250°F por 40 min na autoclave EagleTen (AMSCO).

## **5- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5.1- Casuística

Inicialmente, um total de 78 voluntários sadios, que participaram como voluntários em estudos de bioequivalência, foram recrutados para a realização de exames físicos, neurológicos, psiquiátricos e laboratoriais, além de anamnese e da verificação de seu histórico médico.

Para cada voluntário foi preenchido um Formulário de Relato de Casos, no qual constam o histórico clínico e os resultados dos exames realizados e do eletroencefalograma antes do início e após o término do estudo, e também durante a internação para a administração do xarope Walltussin *Dextromethorphan*. Também foram estabelecidos, nesse Formulário, os critérios de inclusão e de exclusão desse estudo.

Todos os voluntários admitidos para participar do estudo não apresentaram indícios de doença cardíaca, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica ou psiquiátrica. Além disso, verificou-se a ausência do uso de medicamentos 7 dias antes do estudo, assim como, do abuso de drogas, tais como álcool, tabaco e drogas ilícitas.

Desses 78 voluntários previamente selecionados, 32 foram recrutados para participar dos estudos de fenotipagem. Esse número de voluntários segue as recomendações da legislação atualmente vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece entre 26 e 32 voluntários.

A descrição das características nome (constam apenas as iniciais devido a preservação do anonimato dos voluntários), sexo, data de nascimento, idade no dia em que foi realizado o estudo, altura, peso e IMC [calculado através da seguinte fórmula:

$$IMC = \frac{Peso (kg)}{(Altura (m))^2}$$

] referentes a todos os 32 voluntários sadios selecionados para participar dos experimentos de fenotipagem estão descritos na tabela abaixo (Tabela 10).

**Tabela 10-** Descrição dos 32 voluntários participantes selecionados para o estudo de fenotipagem.

<b>Identificação</b>	<b>Nome</b>	<b>Sexo</b>	<b>Data Nascimento</b>	<b>Idade no dia do estudo</b>	<b>Altura</b>	<b>Peso</b>	<b>IMC</b>
<b>Vol 1</b>	AS	M	21/10/78	26	1,75	78,50	25,6
<b>Vol 2</b>	CJ	M	30/04/80	24	1,71	66,50	22,7
<b>Vol 3</b>	IG	M	15/09/70	34	1,78	82,50	26,1
<b>Vol 4</b>	JV	M	28/11/77	27	1,78	84,50	26,7
<b>Vol 5</b>	LB	M	15/11/57	47	1,67	68,50	24,6
<b>Vol 6</b>	RS	M	05/12/65	39	1,74	76,50	25,3
<b>Vol 7</b>	RO	M	28/12/85	19	1,82	88,50	26,7
<b>Vol 8</b>	OS	M	02/08/75	29	1,74	77,50	25,6
<b>Vol 9</b>	AS	M	22/04/67	37	1,74	69,50	23,0
<b>Vol 10</b>	JB	M	29/04/61	43	1,72	72,50	24,5
<b>Vol 11</b>	LC	M	17/10/78	26	1,72	76,90	26,0
<b>Vol 12</b>	MG	M	09/03/67	37	1,65	57,50	21,1
<b>Vol 13</b>	CA	F	10/05/81	23	1,69	61,00	21,4
<b>Vol 14</b>	RA	F	21/04/63	41	1,57	56,80	23,0
<b>Vol 15</b>	ES	F	18/11/77	27	1,64	60,00	22,3
<b>Vol 16</b>	AS	F	25/05/85	19	1,66	60,50	22,0
<b>Vol 17</b>	AA	F	12/09/77	27	1,61	57,50	22,2
<b>Vol 18</b>	IM	F	20/12/84	20	1,54	51,50	21,7
<b>Vol 19</b>	RV	F	13/08/63	41	1,64	67,00	25,0
<b>Vol 20</b>	BA	F	04/03/78	26	1,68	57,40	20,3
<b>Vol 21</b>	TV	F	01/11/85	19	1,64	63,00	23,4
<b>Vol 22</b>	VM	F	05/08/74	30	1,56	54,00	27,2
<b>Vol 23</b>	VC	F	11/08/82	22	1,63	63,50	23,9
<b>Vol 24</b>	WR	F	18/01/86	19	1,54	56,60	23,8
<b>Vol 25</b>	CS	F	04/08/71	33	1,51	54,50	24,2
<b>Vol 26</b>	SS	M	26/04/67	37	1,69	73,00	25,6
<b>Vol 501</b>	CO	M	10/05/58	46	1,68	59,00	20,90
<b>Vol 502</b>	LV	M	08/12/64	40	1,68	59,40	21,00
<b>Vol 503</b>	RS	M	26/02/85	20	1,78	73,50	23,20
<b>Vol 504</b>	EV	F	8/10/66	38	1,63	58,50	22,00
<b>Vol 505</b>	AA	F	30/07/70	34	1,69	68,50	24,00
<b>Vol 506</b>	TL	F	16/06/79	25	1,57	54,00	21,90

A tabela abaixo (Tabela 11) apresenta os valores médios ( $\pm$  DP), valores mínimos e valores máximos referentes às características idade, altura, peso e IMC dos 32 voluntários participantes do estudo.

**Tabela 11-** Características dos 32 voluntários participantes do estudo aos quais foi ministrado o xarope Walltussin *Dextromethorphan*.

Característica	Valor Médio	Valor Mínimo	Valor Máximo
Idade (anos)	30,47 $\pm$ 8,64	19,00	47,00
Altura (cm)	1,67 $\pm$ 0,08	1,51	1,82
Peso (kg)	65,90 $\pm$ 9,98	51,50	88,50
IMC (kg / m <sup>2</sup> )	23,65 $\pm$ 1,94	20,30	27,20

## 5.2- Classificação dos Voluntários (Fenotipagem e Genotipagem)

Como um dos critérios de exclusão era a não classificação do voluntário como um Metabolizador Lento, foram realizados experimentos de fenotipagem para possibilitar a classificação em metabolizadores rápidos ou lentos.

Com essa finalidade, amostras de urina dos voluntários foram colhidas em dois momentos distintos - imediatamente após e cerca de 12 hs após a administração do xarope Walltussin *Dextromethorphan*. Para os experimentos de fenotipagem, inicialmente foi adicionado PI (DM-3 ou DX-4), de concentração conhecida, às amostras de urina permitindo monitorar perdas durante o processo. A seguir, foi realizada uma extração líquido / líquido. Para isso, adicionou-se o tampão bicarbonato para a manutenção do pH, possibilitando que o analito e o PI permanecessem na forma não-ionizada e pudessem ser facilmente extraídos através da mistura de solvente orgânico (solução éter etílico / diclorometano) usada. A fase orgânica, na qual o analito e PI encontravam-se, foi transferida para um novo tubo e levada para dessecação através de fluxo de nitrogênio a 40°C, concentrando o analito e o PI e possibilitando a evaporação dos solventes orgânicos que poderiam danificar a coluna cromatográfica. Então, o precipitado foi reconstituído

numa solução semelhante à fase móvel do HPLC e injetado para análise quantitativa através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa.

O método foi testado e validado para uma linearidade de 5 a 1000 ng / mL para DM e DX, a fim de se confirmar a precisão e a acurácia do método em análise.

As curvas de calibração testadas para a validação do método usaram as seguintes calibrações: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng / mL para DM e DX. O LOQ foi de 5 ng / mL para DM e DX, consideradas suficientes para a caracterização do perfil farmacocinético de cada voluntário.

As variabilidades interensaio e intra-ensaio foram asseguradas por meio das concentrações de amostragem de QCs, as quais foram validadas pelo método nas seguintes concentrações: 15 ng / mL para QCA, 150 ng / mL para QCB e 750 ng / mL para QCC, tanto para a droga mãe DM quanto para o seu metabólito DX.

Nesses ensaios de fenotipagem, os tempos de retenção dos analitos e dos PIs foram: 1,5 s para DX e DX-D4 e 1,8 s para DM e DM-3. Nenhuma interferência significativa foi observada nos tempos de retenção do fármaco DM, de seu metabólito DX e dos PIs (DM-3 e DX-4). O tempo de corrida cromatográfica foi de 5 min.

Para a definição dos íons a serem monitorados, do analito e dos PIs, fez-se o espectro total das moléculas de DM, DM-3, DX e DX-4 protonadas. Através da análise de espectro total, os íons mais abundantes foram selecionados e fragmentados. Simultaneamente, todos os parâmetros do equipamento foram escolhidos e ajustados. Dessa forma, os íons com maior e melhor definições para as finalidades analíticas foram: 272,2 > 147,3 para DM; 275,3 > 150,2 para DM-3; 258,0 > 157,1 para DX; e 262,0 > 157,2 para DX-D4.

A análise fenotípica foi realizada nas amostras de urina de cada um dos voluntários, usando-se as Taxas de Biotransformação (Tabela 12), que correspondem à razão entre a concentração da droga mãe DM ( $C_{DM}$ ) e a somatória da concentração da droga

mãe DM ( $C_{DM}$ ) com a concentração de seu metabólito DX ( $C_{DX}$ ):  $\frac{C_{DM}}{(C_{DM} + C_{DX})}$ . Esse

cálculo possibilitou a classificação dos voluntários em dois grupos distintos: metabólicos rápidos, cuja Taxa de Biotransformação possui um valor igual ou inferior a 0,30, e metabólicos lentos, quando tal Taxa apresentava um valor superior a 0,30 (Schmid *et al.*, 1985).

**Tabela 12-** Taxas de Biotransformação referentes aos 32 voluntários participantes do estudo de fenotipagem.

Identificação	Taxa de Biotransformação	Identificação	Taxa de Biotransformação
Vol 1	0,08	Vol 17	0,21
Vol 2	0,03	Vol 18	0,03
Vol 3	0,04	Vol 19	0,06
Vol 4	0,03	Vol 20	-----
Vol 5	0,04	Vol 21	0,04
Vol 6	0,07	Vol 22	0,04
Vol 7	0,02	Vol 23	-----
Vol 8	0,13	Vol 24	0,20
Vol 9	0,17	Vol 25	0,12
Vol 10	0,02	Vol 26	0,10
Vol 11	0,10	Vol 501	0,29
Vol 12	0,07	Vol 502	0,96
Vol 13	0,06	Vol 503	0,93
Vol 14	-----	Vol 504	0,65
Vol 15	0,03	Vol 505	0,98
Vol 16	0,02	Vol 506	0,95

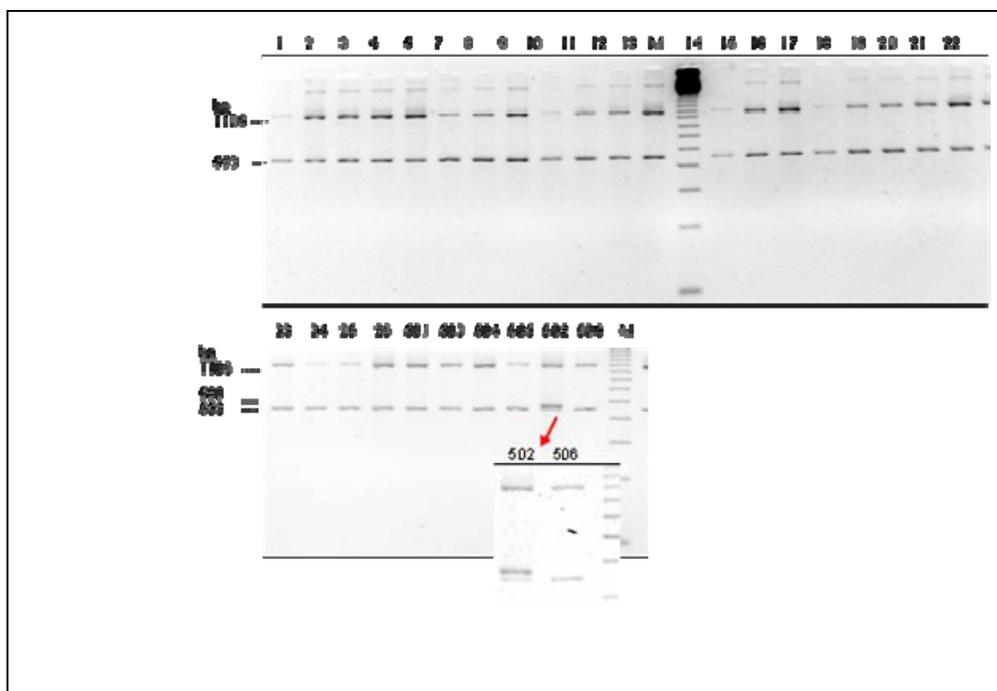
Como pode ser observado na tabela acima, dos 32 voluntários participantes desse estudo de fenotipagem, 24 foram classificados como metabólicos rápidos (com Taxas de Biotransformação no intervalo entre 0,02 e 0,29) enquanto 5 voluntários foram considerados metabólicos lentos (com Taxas de Biotransformação no intervalo entre 0,65 e 0,98). Por problemas na quantificação da droga mãe DM nas amostras de urina coletadas, através do sistema HPLC / LC-MS-MS, não foi possível realizar a classificação dos voluntários 14, 20 e 23.

Considerando a precisão da genotipagem na determinação de polimorfismos, foi realizada uma amplificação das regiões do DNA referentes tanto ao alelo 3 quanto ao alelo 4 da isoforma 2D6 do citocromo P450, uma vez que a CYP2D6 é a principal enzima envolvida na metabolização do fármaco DM no seu principal metabólito DX (Huang *et al.*, 2004).

Para a amplificação dessas regiões do DNA, primeiramente fez-se a extração de DNA total do sangue venoso de cada voluntário, utilizando o Kit de extração *Easy DNA*. Esse DNA foi quantificado através de espectrofotometria.

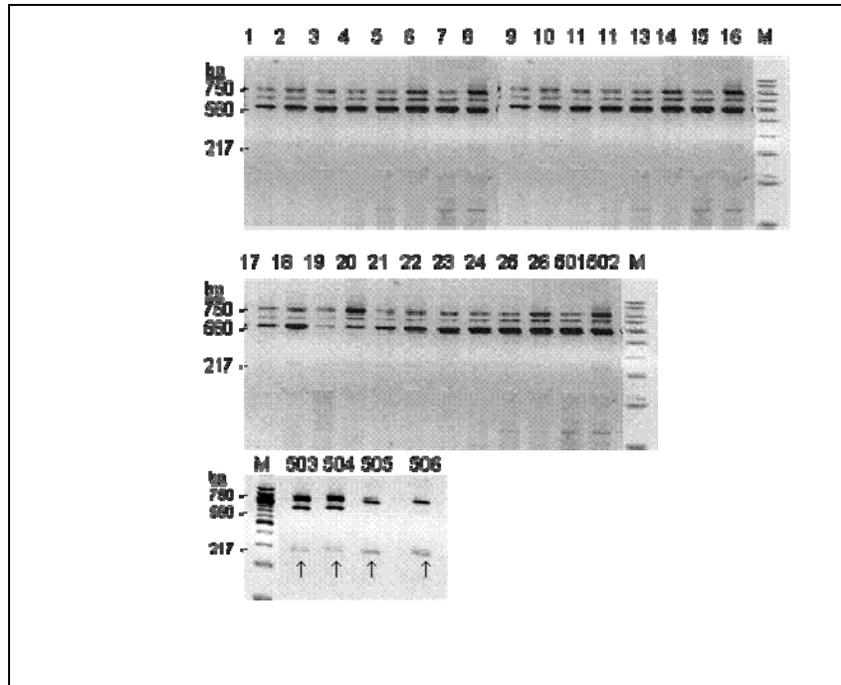
A PCR foi realizada DNA genômico extraído; a enzima *Platinum Taq* DNA polimerase; e tetra primers. A qualidade do produto de PCR, assim como a determinação do genótipo CYP2D6, isoformas 3 e 4, de cada voluntário, foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose.

Em relação a isoforma 3 da enzima CYP2D6, observa-se um fragmento controle, de maior peso (1106 pb), que corresponde a uma amplificação geral da região alélica, em todas as amostras. Os indivíduos 1 a 26, 501, 503 a 506 são caracterizados como homozigotos selvagens, pois apresentam o fragmento controle e uma outra banda alelo-específico de 553 pb. O indivíduo 502 é caracterizado como homozigoto mutante (\*3/\*3), uma vez que apresenta o fragmento controle de 1106 pb e uma outra banda alelo-específico de 580 pb (figura 9).



**Figura 9- Eletroforese.** *PCR tetra primers* da genotipagem CYP2D6\*3. Marcador (M) de 123bp.

Em relação a isoforma 4 da enzima CYP2D6, observa-se um fragmento controle, de maior peso (750 pb), que corresponde a uma amplificação geral da região alélica, em todas as amostras. Os indivíduos 1 a 26, 501 e 502 são caracterizados como homocigotos selvagens, pois apresentam o fragmento controle e uma outra banda alelo-específico de 560 pb. Os indivíduos 503 e 504 são caracterizados como heterocigotos (\*1/\*4), visto que apresentam o fragmento controle e duas bandas alelo-específico, 560 pb e 217 pb. Os indivíduos 505 e 506 são caracterizados como homocigoto mutante (\*4/\*4), uma vez que apresentam o fragmento controle e uma outra banda alelo-específico de 217 pb (figura 10).



**Figura 10- Eletroforese.** *PCR tetra primers* da genotipagem CYP2D6\*4. Marcador (M) de 100bp.

Os metabolizadores rápidos correspondem aos indivíduos homocigotos para os alelos selvagens da CYP2D6 (\*1/\*1), enquanto os metabolizadores lentos correspondem àqueles que apresentam variações em um dos alelos da CYP2D6 (\*1/\*3, heterocigotos para o alelo 3; ou \*1/\*4, heterocigotos para o alelo 4; ou \*3/\*3, homocigotos para o alelo 3; ou \*4/\*4, homocigotos para o alelo 4) ou simultaneamente em 2 alelos da CYP2D6 (McElroy *et al.*, 2000).

Na tabela abaixo (Tabela 13) encontram-se a análise da genotipagem CYP2D6, para os alelos 3 e 4, referente a cada um dos 32 voluntários participantes do estudo.

**Tabela 13-** Genótipo CYP2D6 referente aos 32 voluntários participantes do estudo.

Identificação	Genótipo CYP2D6	
	CYP2D6*3	CYP2D6*4
Vol 1	*1/*1	*1/*1
Vol 2	*1/*1	*1/*1
Vol 3	*1/*1	*1/*1
Vol 4	*1/*1	*1/*1
Vol 5	*1/*1	*1/*1
Vol 6	*1/*1	*1/*1
Vol 7	*1/*1	*1/*1
Vol 8	*1/*1	*1/*1
Vol 9	*1/*1	*1/*1
Vol 10	*1/*1	*1/*1
Vol 11	*1/*1	*1/*1
Vol 12	*1/*1	*1/*1
Vol 13	*1/*1	*1/*1
Vol 14	*1/*1	*1/*1
Vol 15	*1/*1	*1/*1
Vol 16	*1/*1	*1/*1
Vol 17	*1/*1	*1/*1
Vol 18	*1/*1	*1/*1
Vol 19	*1/*1	*1/*1
Vol 20	*1/*1	*1/*1
Vol 21	*1/*1	*1/*1
Vol 22	*1/*1	*1/*1
Vol 23	*1/*1	*1/*1
Vol 24	*1/*1	*1/*1
Vol 25	*1/*1	*1/*1
Vol 26	*1/*1	*1/*1
Vol 501	*1/*1	*1/*1
Vol 502	<b>*3/*3</b>	*1/*1
Vol 503	*1/*1	<b>*1/*4</b>
Vol 504	*1/*1	<b>*1/*4</b>
Vol 505	*1/*1	<b>*4/*4</b>
Vol 506	*1/*1	<b>*4/*4</b>

Como pode ser observado na tabela acima (Tabela 13), os 24 voluntários classificados como metabolizadores rápidos, através de HPLC / LC-MS-MS, realmente correspondem aos indivíduos homocigotos para os alelos selvagens da CYP2D6 (\*1/\*1). Os 3 voluntários, anteriormente não classificados, apresentam alelos selvagens (\*1/\*1), o que também os caracteriza como metabolizadores rápidos. Em relação aos 5 metabolizadores lentos, classificados através de HPLC / LC-MS-MS, 2 são heterocigotos em relação ao alelo 4 (\*1/\*4) e 3 são homocigotos, sendo 2 em relação ao alelo 4 (\*4/\*4) e 1 em relação ao alelo 3 (\*3/\*3) da CYP2D6.

Assim, dos 32 voluntários previamente selecionados, 27 foram classificados como metabolizadores rápidos enquanto 5 foram considerados lentos.

Recentemente, um outro método tem sido utilizado para a classificação em metabolizadores rápidos ou lentos. Esse método é baseado na razão entre as AUCs dos compostos (AUC da droga mãe / AUC do principal metabólito). Assim, após a quantificação do *dextromethorphan* e do *dextrorphan* e a avaliação do parâmetro farmacocinético Área Sob a Curva (AUC), verificou-se que os 27 voluntários identificados como metabolizadores rápidos, correspondentes a indivíduos homocigotos para os alelos selvagens da CYP2D6, apresentavam razão entre as AUCs dos compostos (AUC do *dextromethorphan* / AUC do *dextrorphan*) variando entre 0,05 e 0,68. Em relação aos 5 voluntários classificados como metabolizadores lentos, os quais apresentaram polimorfismos variados em relação a CYP2D6, foi observado que os heterocigotos apresentavam uma razão entre as AUCs variando entre 2,94 e 58,22 e os homocigotos variantes entre 106,50 e 252,22. Dessa forma, a farmacocinética possibilita a classificação em metabolizadores rápidos e lentos dependendo da razão entre as AUCs da droga mãe e do seu metabólito: os metabolizadores lentos apresentam razões intermediárias ou elevadas (heterocigotos e homocigotos variantes, respectivamente), enquanto que nos metabolizadores rápidos (homocigotos selvagens) a razão é baixa.

Esses dados demonstram uma alta correlação entre a fenotipagem, a genotipagem CYP2D6 e a farmacocinética. A fenotipagem não é totalmente específica, visto que podem existir eventuais problemas na manipulação das amostras e na análise dos dados, bem como falhas na experimentação. A vantagem do uso da técnica de

farmacocinética é a avaliação no decorrer de um intervalo de tempo e não apenas em tempos específicos, como ocorre na fenotipagem, permitindo o monitoramento de toda a farmacocinética da droga. A genotipagem da CYP2D6 é uma técnica de fácil implantação em laboratórios de biologia molecular, apresenta grande especificidade e precisão e necessita de uma pequena amostra de sangue.

Os metabolizadores lentos possuem diminuição ou perda de função e / ou de atividade enzimática, decorrente da mutação nos alelos 3 e / ou 4 da CYP2D6 (Kroemer & Eichelbaum, 1995). Essas alterações podem ocasionar um acúmulo do fármaco DM no plasma. Como alguns parâmetros farmacocinéticos a serem analisados encontram-se relacionados às concentrações plasmáticas de DM, essas elevações, não decorrentes de polimorfismos no gene *MDR1*, poderiam tendenciar os resultados. Por essa razão, esses 5 metabolizadores lentos, voluntários 502 a 506, foram excluídos dos experimentos de genotipagem *MDR1* e de farmacocinética da droga DM.

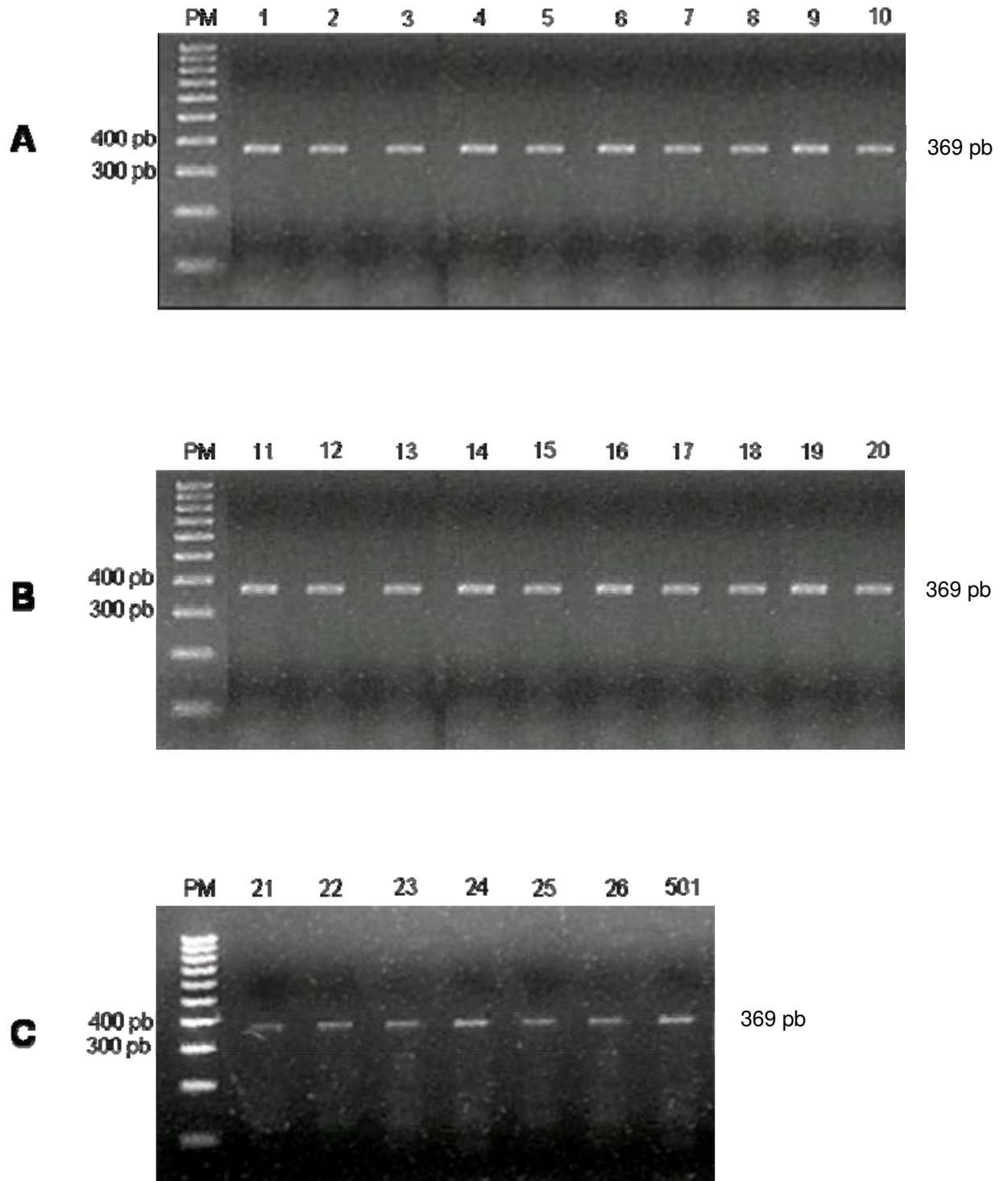
### 5.3- Genotipagem *MDR1*

#### 5.3.1- Amplificações através da PCR

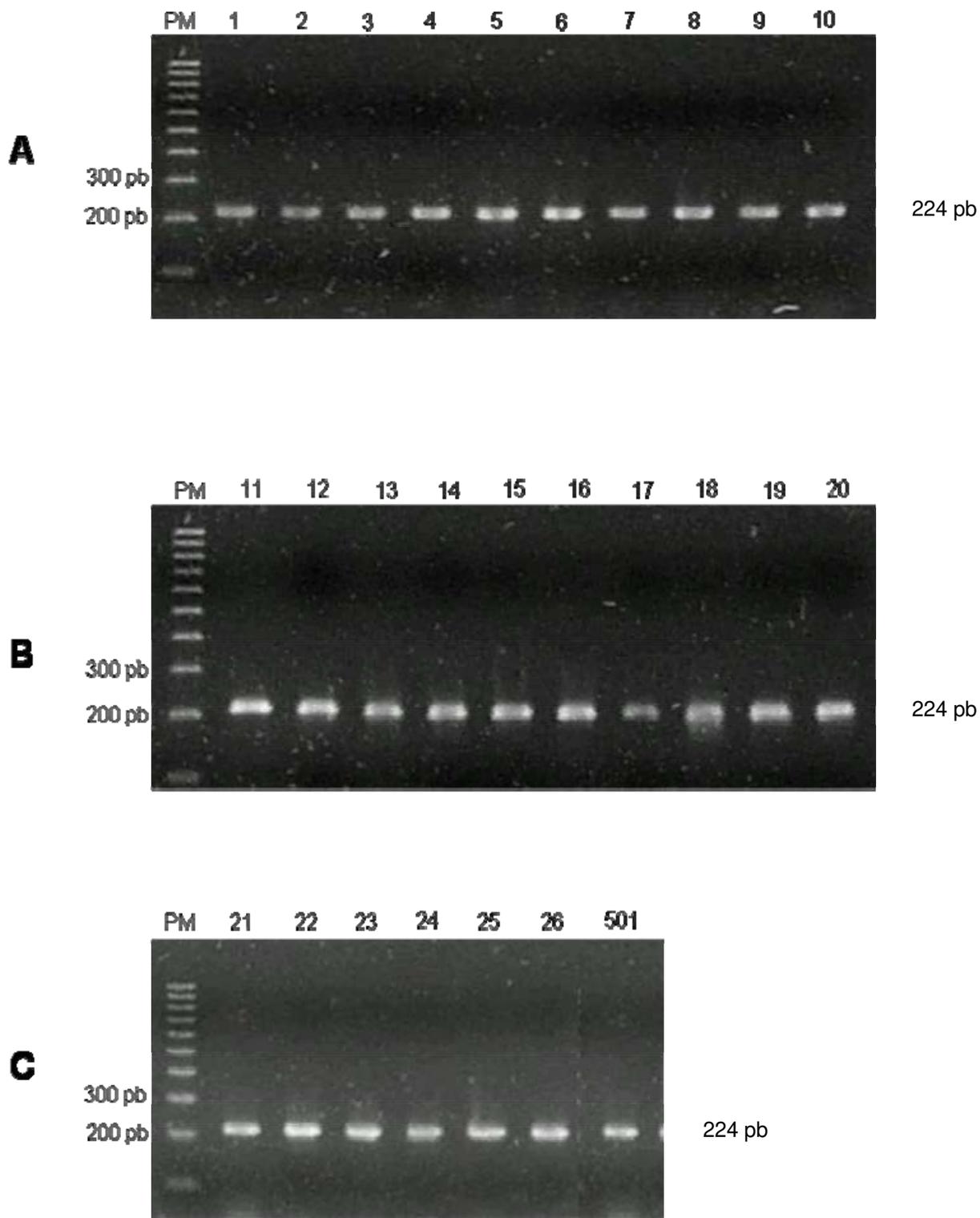
Para a amplificação de regiões do DNA referentes aos exons 12, 21 e 26 do gene *MDR1*, inicialmente extraiu-se, a partir do sangue venoso, o DNA de cada um dos 27 voluntários caracterizados como metabolizadores rápidos, utilizando o Kit *GFX*.

Em seguida, a PCR foi realizada, usando DNA genômico; enzima *Taq* DNA polimerase; e primers forward e reverse para cada um dos exons em estudo (Tabela 7).

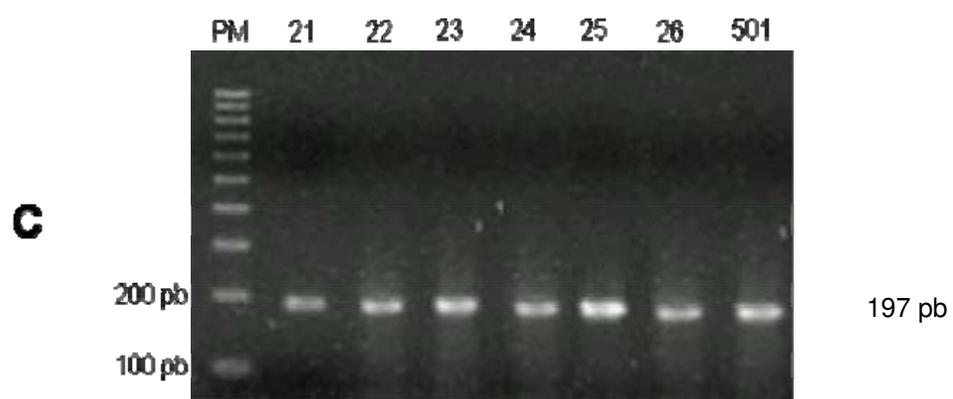
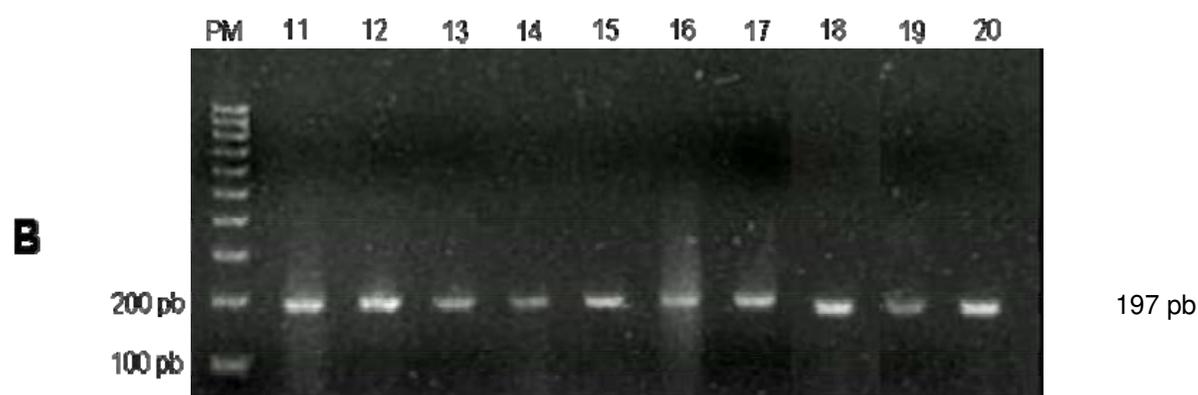
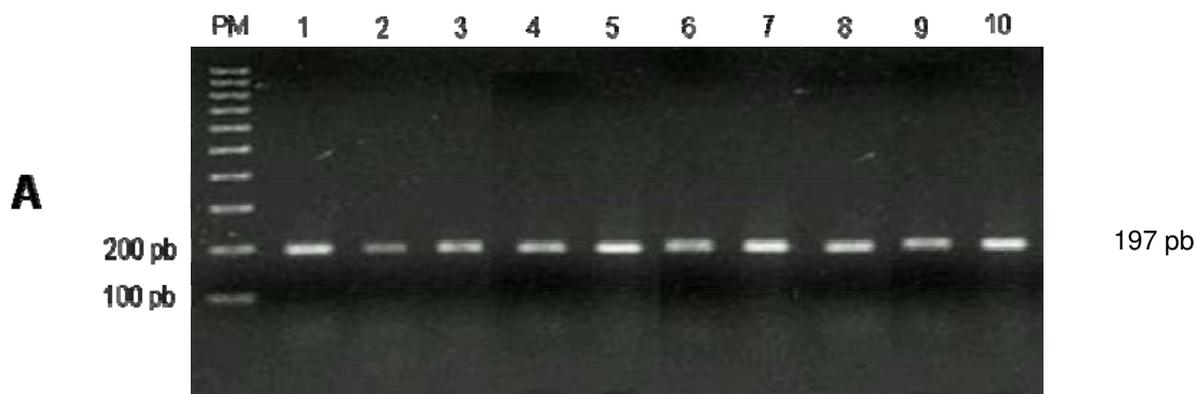
Como pode ser visualizado em todos os géis de agarose (Figuras 11, 12 e 13), não há a presença de bandas inespecíficas. As bandas amplificadas são únicas, nítidas, bem definidas e de tamanho esperado. Em relação ao exon 12, a banda amplificada apresenta tamanho de 369 pb. Em relação ao exon 21, a amplificação resulta num fragmento de 224 pb. Em relação ao exon 26, para o qual a amplificação determina um fragmento de 197pb.



**Figura 11- Eletroforese.** Análise, em gel de agarose 2 %, da amplificação da região referente ao exon 12 do gene *MDR1*: (A) vol 1 a 10; (B) vol 11 a 20; e (C) vol 21 a 26 e 501; (PM) peso molecular 100 bp Low PCR Ladder (Sigma®).



**Figura 12- Eletroforese.** Análise, em gel de agarose 2 %, da amplificação da região referente ao exon 21 do gene *MDRI*: (A) vol 1 a 10; (B) vol 11 a 20; e (C) vol 21 a 26 e 501; (PM) peso molecular 100 bp Low PCR Ladder (Sigma®).



**Figura 13- Eletroforese.** Análise, em gel de agarose 2 %, da amplificação da região referente ao exon 26 do gene *MDR1*: (A) vol 1 a 10; (B) vol 11 a 20; e (C) vol 21 a 26 e 501; (PM) peso molecular 100 bp Low PCR Ladder (Sigma®).

### 5.3.2- Seqüenciamento

O Seqüenciamento foi feito usando-se o “ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystem) e tendo como base o Método de dideoxinucleotídeos.

Durante a reação para seqüenciamento, o primer anela-se a uma seqüência complementar e os nucleotídeos, tanto os marcados com fluorescência quanto os não marcados, são incorporados de acordo com a fita molde com a enzima DNA polimerase. Os nucleotídeos fluorescentes são dideoxinucleotídeos (ddNTP), ou seja, não possuem a hidroxila 3' terminal, a qual é fundamental para que a enzima DNA polimerase possa dar continuidade à adição de novos nucleotídeos durante a síntese de novas fitas de DNA. Assim, quando ocorre a incorporação desse nucleotídeo marcado com fluorescência, a síntese da fita é interrompida, impossibilitando a ligação do nucleotídeo seguinte, uma vez que não há como estabelecer uma ligação fosfodiéster. Desse modo, gera-se um fragmento cujo tamanho é determinado conforme o local no qual o nucleotídeo de terminação foi incorporado. No final dessa reação de amplificação, fragmentos de variados tamanhos são gerados, purificados através de precipitação com etanol e, então, submetidos à eletroforese. Os sinais fluorescentes são amplificados e detectados por câmara CCD (fotomultiplicador) no aparelho de seqüenciamento. Através de uma análise computacional, cada nucleotídeo é identificado através do seu comprimento de onda de emissão específica de cada fluorocromo e o resultado é mostrado na forma de eletroferograma.

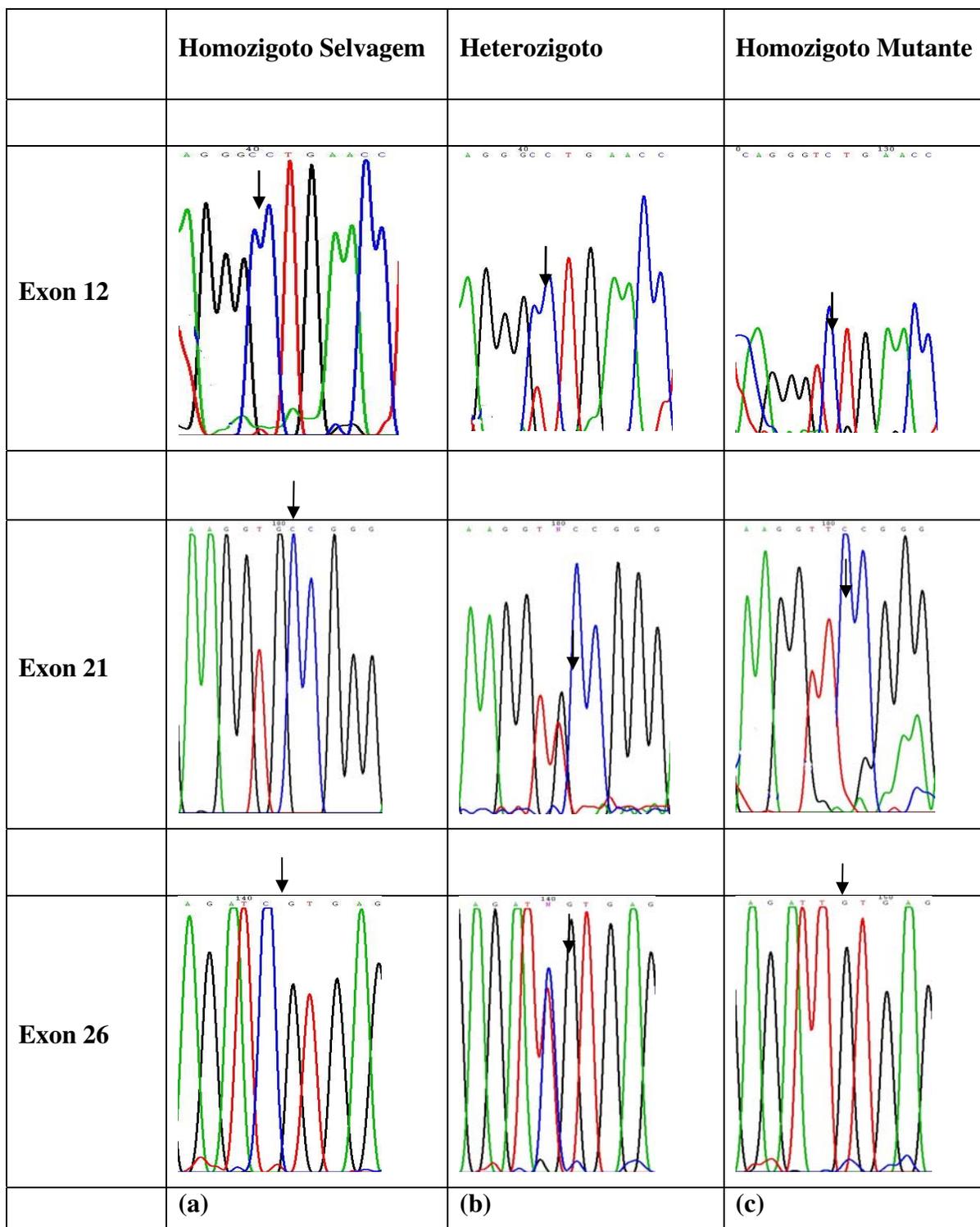
Uma vez realizada a Reação de Seqüenciamento, as seqüências, tanto no sentido 5' – 3' quanto no sentido 3' – 5' (em duplicatas), obtidas nos eletroferogramas de todos os voluntários, foram comparadas com as seqüências de pares de base da região correspondente a cada exon 12, 21 ou 26 do gene *MDRI*, através do programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). A homologia observada após essa comparação variou entre 90 e 98 % em todos os exons analisados para cada um dos voluntários.

A figura 14 corresponde a uma amostragem de todos os eletroferogramas obtidos através dos experimentos de seqüenciamento. A determinação do genótipo de cada voluntário foi realizada da seguinte forma: observação no eletroferograma obtido através de

sequenciamento, de um pico único na posição referente a uma possível mutação, para cada um dos 3 exons, caracteriza o indivíduo como homozigoto. Em relação ao indivíduo homozigoto selvagem (Figura 14a), para os exons 12 e 26 do gene *MDR1* há um pico único de citosina (C) e para o exon 21 há um pico único de guanina (G). Em relação aos homozigotos variantes, nos quais ocorre a mutação de ponto para os 3 exons, o pico observado é referente a uma timina (T) (Figura 14c). A observação, no eletroferograma obtido através de sequenciamento, de 2 picos simultâneos na posição referente a uma possível mutação caracteriza o indivíduo como heterozigoto (Figura 14b). Para os exons 12 e 26 há pico simultâneo de citosina (C) e timina (T) e para o exon 21 de guanina (G) e timina (T). Em nenhum dos eletroferogramas analisados em relação ao exon 21 foi observado um pico simultâneo de guanina (G) e adenina (A) ou um pico único de adenina (A).

A análise dos eletroferogramas, tanto no sentido 5' – 3' quanto no sentido 3' – 5', referentes ao exon 12 do gene *MDR1* do voluntário 24 não permitiu a determinação do genótipo uma vez que a região da possível mutação apresentava picos sobrepostos e ruídos altos. Um novo seqüenciamento foi realizado com o mesmo produto de PCR e, novamente, não foi possível determinar o genótipo. Uma nova amplificação desse exon 12 para esse voluntário foi feita e o produto de PCR purificado foi usado para uma nova reação de sequenciamento. A análise do eletroferograma obtido e a comparação com seqüências descritas no programa *BLAST* não permitiu a determinação do genótipo do voluntário 24, pelas mesmas razões anteriores.

A análise dos eletroferogramas referentes ao exon 21 do gene *MDR1* do voluntário 18 não possibilitou a determinação de seu genótipo. O eletroferograma no sentido 5' – 3' apresentou um pico único de guanina enquanto que no sentido 3' – 5' foram observados dois picos, um de guanina e um de timina. Uma nova amplificação desse exon para o voluntário 18 foi realizada e o produto de PCR foi purificado e utilizado para uma nova reação de sequenciamento. A mesma observação descrita anteriormente foi vista nos novos eletroferogramas, impossibilitando a determinação do genótipo.



**Figure 14- Eletroferogramas.** Resultados do Seqüenciamento Automático referentes aos exons 12, 21 e 26 do gene *MDR1* para os genótipos (a) homozigoto selvagem, (b) heterozigoto e (c) homozigoto variante. A seta indica o sítio da possível mutação.

A tabela abaixo (Tabela 14) apresenta o genótipo de cada um dos 27 voluntários em relação aos exons 12, 21 e 26 do gene *MDR1*. Como pode ser observado, há várias combinações alélicas em relação a esses exons.

**Tabela 14-** Genótipo *MDR1* (exons 12, 21 e 26) referente aos 27 voluntários.

I d e n t i f i c a ç ã o	Genótipo <i>MDR1</i>		
	Exon 12	Exon 21	Exon 26
V o l 1	Homozigot o Variante	Homozigoto Variante	Homozigot o Selvagem
V o l 2	Homozigot o Variante	Heterozigoto	Heterozigo to
V o l 3	Homozigot o Variante	Heterozigoto	Heterozigo to
V o l 3	Heterozigot o	Homozigoto Selvagem	Homozigot o

1			Selvagem
4			
V			
o			
1	Homozigot o Variante	Heterozigoto	Homozigot o Variante
5			
V			
o			
1	Heterozigot o	Homozigoto Selvagem	Homozigot o Selvagem
6			
V			
o			
1	Homozigot o Variante	Heterozigoto	Heterozigo to
7			
V			
o			
1	Homozigot o Selvagem	Homozigoto Selvagem	Heterozigo to
8			
V			
o			
1	Homozigot o Variante	Heterozigoto	Heterozigo to
9			
V			
o			
1	Heterozigot o	Homozigoto Selvagem	Homozigot o Selvagem
1			
0			
V			
o			
1	Homozigot o Variante	Heterozigoto	Heterozigo to

1  
1  
V  
o  
1  
1  
2  
V  
o  
1  
1  
3  
V  
o  
1  
1  
4  
V  
o  
1  
1  
5  
V  
o  
1  
1  
6  
V  
o  
1

Homozigot  
o Selvagem

Homozigoto  
Selvagem

Homozigot  
o  
Selvagem

Homozigot  
o Variante

Heterozigoto

Homozigot  
o Variante

Homozigot  
o Variante

Heterozigoto

Homozigot  
o Variante

Heterozigot  
o

Homozigoto  
Selvagem

Heterozigo  
to

Homozigot  
o Selvagem

Homozigoto  
Selvagem

Heterozigo  
to

Heterozigot  
o

Homozigoto  
Selvagem

Homozigot  
o  
Selvagem

1  
7  
V  
o  
1  
1  
8  
V  
o  
1  
1  
9  
V  
o  
1  
2  
0  
V  
o  
1  
2  
1  
V  
o  
1  
2  
2  
V  
o  
1  
2

Heterozigot  
o

Indefinido

Heterozigo  
to

Homozigot  
o Variante

Heterozigoto

Heterozigo  
to

Heterozigot  
o

Homozigoto  
Selvagem

Heterozigo  
to

Heterozigot  
o

Homozigoto  
Selvagem

Homozigot  
o  
Selvagem

Heterozigot  
o

Homozigoto  
Selvagem

Homozigot  
o  
Selvagem

Heterozigot  
o

Homozigoto  
Selvagem

Homozigot  
o  
Selvagem

3			
V			
o			
1	Indefinido	Homozigoto Selvagem	Homozigot o Selvagem
2			
4			
V			
o			
1	Homozigot o Variante	Homozigoto Selvagem	Homozigot o Selvagem
2			
5			
V			
o			
1	Homozigot o Variante	Homozigoto Variante	Homozigot o Variante
2			
6			
V			
o			
1	Homozigot o Variante	Heterozigoto	Heterozigo to
5			
0			
1			

#### 5.4- Farmacocinética

Para os ensaios de quantificação da droga, através da farmacocinética, amostras de sangue foram coletadas em momentos distintos: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 16,0; 24,0; 36,0 e 48,0 hs após a administração da droga.

O sangue venoso coletado foi centrifugado, separando-se o plasma para a realização dos experimentos de farmacocinética. Inicialmente, foi adicionado PI, DM-3 ou DX-4, de concentração conhecida, às amostras de plasma. A seguir, foi realizada uma

extração líquido / líquido com adição de tampão bicarbonato para a manutenção do pH, permitindo que o analito e os PIs permanecessem na forma não-ionizada e pudessem ser facilmente extraídos, através da mistura de solvente orgânico (solução de éter dietílico / hexano) usada. A fase orgânica, na qual o analito e o PI encontravam-se, foi transferida para um novo tubo e levada para dessecação através de fluxo de nitrogênio, concentrando o analito e o PI e possibilitando a evaporação dos solventes orgânicos que poderiam danificar a coluna cromatográfica. Então, o precipitado foi reconstituído numa solução semelhante à fase móvel do HPLC e injetado para análise quantitativa através de HPLC / LC-MS-MS. Esse método de análise com monitoramento de reações múltiplas é uma técnica altamente seletiva e sensível para mensurar quantidades ínfimas de substâncias presentes na matriz.

Assim como nos ensaios de fenotipagem, o método para a análise farmacocinética foi testado e validado para uma linearidade de 5 a 1000 ng / mL para DM e DX, a fim de confirmar a precisão e a acurácia. As curvas de calibração testadas usaram as seguintes concentrações: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng / mL para DM e DX. Essa faixa de linearidade validada abrangeu todas as concentrações obtidas nas amostras em estudo. O coeficiente de correlação linear foi superior a 0,95.

O LOQ verificado foi de 0,20 ng / mL para DM e DX, sendo suficiente para a caracterização do perfil farmacocinético de todos os voluntários, atendendo ao critério da  $AUC_{0-t}$  ser de, no mínimo, 80 % da  $AUC_{inf}$ .

Para a verificação das variabilidades interensaio e intra-ensaio, foram asseguradas concentrações de amostragem de QCs, nas seguintes concentrações: 15 ng / mL para QCA, 150 ng / mL para QCB e 750 ng / mL para QCC, tanto para DM quanto para DX. O método mostrou-se preciso e exato tanto nas intra quanto nas intercorridas analíticas, sendo os coeficientes de variação inferiores a 15 % para todos os valores. Com base nesses coeficientes, a estabilidade da droga mãe DM, de seu metabólito DX e dos PIs foi comprovada em todas as condições experimentais do estudo de farmacocinética, nos recipientes e nas condições de armazenamento empregados.

O tempo de retenção das moléculas foi de 2 s tanto para DX e DX-D4 quanto para DM e DM-3. Nenhuma interferência significativa foi observada nos tempos de retenção do fármaco DM, de seu metabólito DX e dos PIs. O tempo de corrida cromatográfica foi relativamente curto (5 min), quando comparado a outras técnicas disponíveis.

Para a definição dos íons a serem monitorados, do analito e do PIs, fez-se o espectro total das moléculas de DM, DM-3, DX e DX-4 protonadas. Através da análise de espectro total, os íons mais abundantes foram selecionados e fragmentados. Simultaneamente, todos os parâmetros do equipamento foram escolhidos e ajustados. Dessa forma, os íons com maior e melhor definições para as finalidades analíticas foram:  $272,2 > 215,2$  para DM; e  $275,2 > 218,3$  para DM-3;  $258,1 > 133,1$  para DX; e  $262,0 > 137,1$  para DX-D4.

Os parâmetros farmacocinéticos avaliados estatisticamente foram aqueles relacionados ao processo de absorção do fármaco: quantidade de fármaco absorvida, calculada através dos valores de AUCs, e a velocidade de absorção, avaliada pela medida pontual da maior concentração plasmática do medicamento atingida experimentalmente ( $C_{máx}$ ) após a administração do fármaco. A quantidade de fármaco absorvida foi calculada através do valor de AUC entre 0 e 4 hs pós-administração da droga ( $AUC_{0-4h}$ ), do valor de AUC entre 0 e 24 hs pós-administração da droga ( $AUC_{0-24h}$ ) e do valor de AUC entre 0 e 48 hs pós-administração da droga ( $AUC_{0-48h}$ ).

## **5.5- Correlação Genotipagem e Farmacocinética**

O teste usado para análises estatísticas foi o *Wilcoxon Rank Sum Test*, pois a distribuição dos dados farmacocinéticos não é normal, isto é, havia a necessidade de um teste não-paramétrico que levasse em conta o número de amostras de cada grupo.

Os dados e os parâmetros farmacocinéticos foram comparados entre os indivíduos homozigotos para o alelo selvagem (CC) e os indivíduos homozigotos para o alelo mutante (TT); entre os indivíduos homozigotos para o alelo selvagem (CC) e os

indivíduos heterozigotos (CT) e entre os indivíduos heterozigotos (CT) e os indivíduos homozigotos para o alelo mutante (TT) para o exon 26 do gene *MDRI*.

A tabela 15 mostra a correlação dos dados da genotipagem do exon 26 do gene *MDRI*, da farmacocinética da droga *dextromethorphan* e das características idade, altura, peso e IMC dos 27 indivíduos participantes do estudo.

**Tabela 15-** Correlação entre os Genótipos Exon 26 do gene *MDRI*, as Características dos voluntários e os Parâmetros Farmacocinéticos dos voluntários participantes do estudo classificados como metabolizadores rápidos.

	Genótipo <i>MDRI</i> – Exon 26		
	C / C ( n = 1 1 )	C / T ( n = 1 2 )	T / T ( n = 4 )
<b>Idade (anos)</b>	3 0, 3 0 ± 7, 6 5	2 8, 2 3 ± 8, 8 6	3 7, 0 0 ± 1 0, 2 0
<b>Altura (cm)</b>	1, 6 6 ± 0, 0	1, 7 0 ± 0, 0	1, 6 6 ± 0, 0

	9	7	6
<b>Peso</b>	6	6	6
<b>(kg)</b>	6,	7,	7,
	2	2	2
	0	6	4
	±	±	±
	1	1	8,
	0,	1,	3
	9	4	1
	9	3	
<b>IMC (kg</b>	2	2	2
<b>/ m<sup>2</sup>)</b>	4,	3,	4,
	4	3	1
	1	0	2
	±	±	±
	1,	2,	1,
	9	1	9
	0	9	1
<b>C<sub>1h</sub></b>	1,	1,	0,
<b>(ng/ml)</b>	3	0	3
	0	7	3
	±	±	±
	1,	0,	0,
	3	8	1
	6	6	5
<b>C<sub>4h</sub></b>	1,	0,	0,
<b>(ng/ml)</b>	0	7	2
	9	7	9
	±	±	±
	0,	0,	0,
	7	6	0
	1	0	2
<b>C<sub>máx</sub></b>	1,	1,	1,
<b>(ng/ml)</b>	9	6	6
	0	7	7
	±	±	±
	0,	0,	0,

	8	4	5
	8	9	8
<b>T<sub>máx</sub> (h)</b>	4,	3,	1,
	3	9	1
	8	1	8
	±	±	±
	4,	3,	0,
	1	2	0
	1	2	5
<b>AUC<sub>0-4h</sub></b>	1		
<b>(ng</b>	0,	8,	2,
<b>h/ml)</b>	5	0	1
	0	7	1
	±	±	±
	1	7,	0,
	0,	4	8
	3	1	3
	3		
<b>AUC<sub>0-</sub></b>	1		
<b><sup>24h</sup> (ng</b>	0,	8,	2,
<b>h/ml)</b>	8	2	1
	0	0	2
	±	±	±
	1	7,	0,
	0,	5	8
	9	7	3
	4		
<b>AUC<sub>0-</sub></b>			3
<b><sup>48h</sup> (ng</b>	3	2	7,
<b>h/ml)</b>	0,	8,	0
	3	2	0
	0	3	±
	±	±	1
	7,	8,	0,
	6	8	2
	5	6	0

**Tabela 16-** Intervalos dos valores de p obtidos através de análise estatística relacionando os diferentes genótipos com os parâmetros farmacocinéticos.

---

● $0,05 < p < 0,10$ comparado com CC	● $0,04 < p < 0,10$ comparado com CT
◆ $0,10 < p < 0,20$ comparado com CC	◆ $0,10 < p < 0,20$ comparado com CT
	■ $0,20 < p < 0,40$ comparado com CT

---

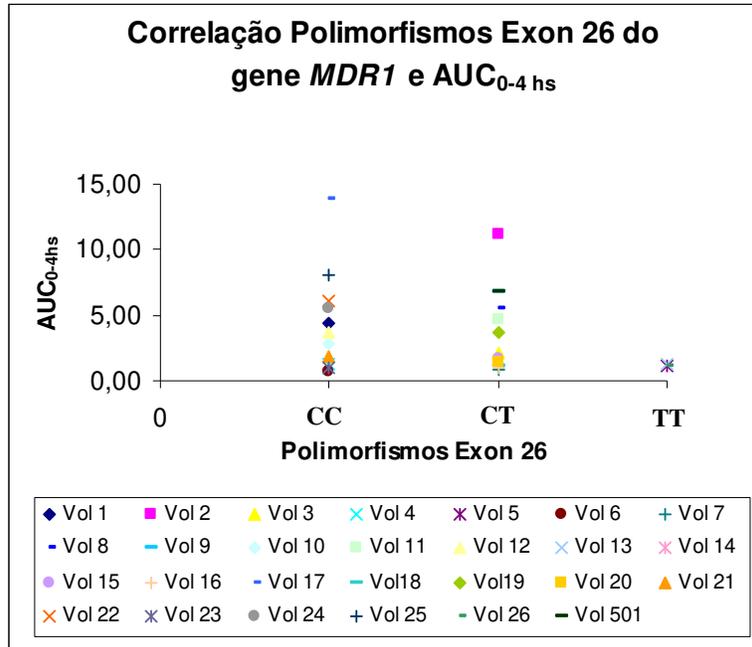
Em relação ao exon 26 do gene *MDR1*, nenhuma diferença estatística nas características idade, peso, altura e IMC entre os indivíduos CC e TT ou CT e TT ou CC e CT foi encontrada, indicando que os três grupos (CC, CT ou TT) eram homogêneos com relação a essas características.

Os parâmetros AUCs apresentaram valores menores nos indivíduos portadores do alelo variante T em relação aos indivíduos homozigotos selvagens (CC) e heterozigotos (CT). Esse parâmetro não representa apenas a absorção de uma determinada droga, principalmente na parede intestinal, mas também a distribuição em muitos tecidos e a excreção renal ou biliar (Sakaeda *et al.*, 2005). Os valores de p calculados para  $AUC_{0-4hs}$ ,  $AUC_{0-24hs}$  e  $AUC_{0-48hs}$  comparando TT com CC foram, respectivamente, 0,14, 0,12 e 0,12. Comparando TT com CT, em relação aos mesmos parâmetros, os valores de p foram: 0,22, 0,40 e 0,40.

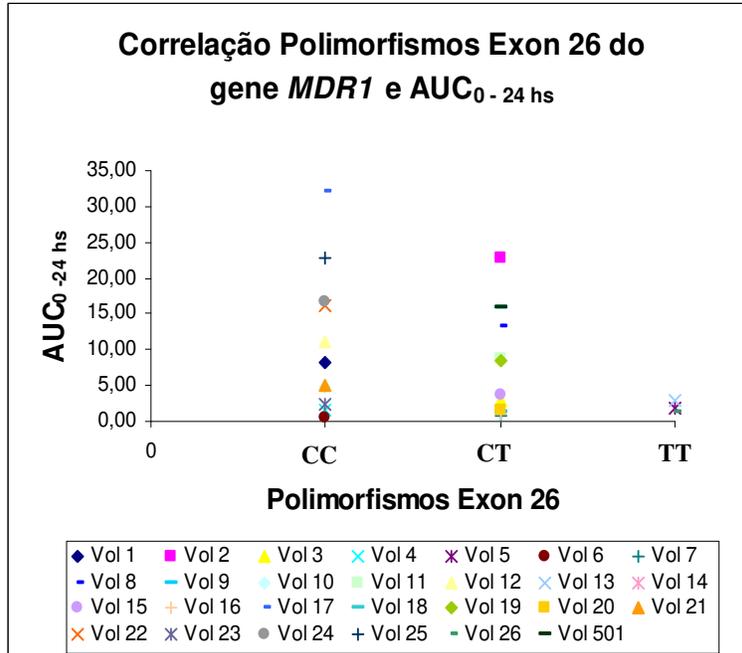
Em relação ao parâmetro  $C_{1h}$ , que corresponde à concentração plasmática da droga após 1 h da sua administração, observamos uma variação significativa ( $p = 0,04$ ) entre os indivíduos heterozigotos e os homozigotos variantes. O valor de p calculado entre CC e TT foi de 0,10, tanto para o parâmetro  $C_{1h}$  quanto para o  $C_{4h}$ . Comparando TT com CT em relação ao parâmetro  $C_{4h}$ , o valor de p obtido foi 0,35. O valor de  $C_{máx}$  obtido apresentou um valor mais baixo em indivíduos homozigotos variantes (TT) em relação aos homozigotos selvagens e heterozigotos, sendo os valores de p iguais a 0,10 e 0,19, respectivamente. Os parâmetros de concentrações plasmáticas, principalmente o  $C_{máx}$ , também são funções complicadas de absorção, de distribuição e de excreção (Sakaeda *et al.*, 2005).

Nenhuma diferença significativa foi observada no parâmetro  $T_{\text{máx}}$  entre os grupos homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos variantes. Isto era esperado, visto que as diferenças no genótipo modificam a quantidade da droga que é absorvida; todavia, não alteram as taxas de absorção (cinética de absorção).

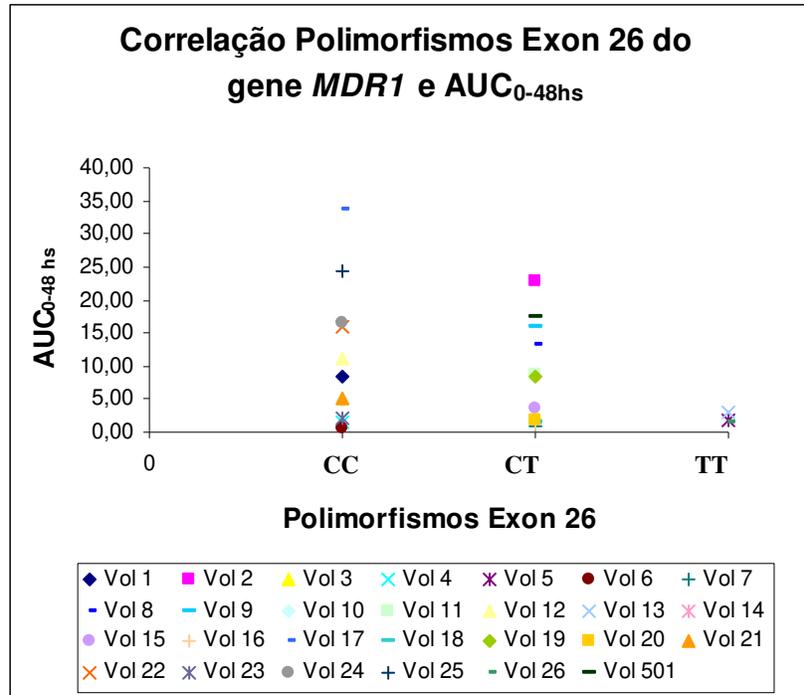
Os gráficos abaixo (figuras 15 a 20) referem-se à dispersão dos valores de  $AUC_{0-4\text{hs}}$ ,  $AUC_{0-24\text{hs}}$ ,  $AUC_{0-48\text{hs}}$ ,  $C_{1\text{h}}$ ,  $C_{4\text{h}}$  e  $C_{\text{máx}}$ , respectivamente, referentes aos 27 voluntários, conforme o genótipo *MDR1* do exon 26. Como pode ser observado nesses gráficos, há uma grande variação interindividual nos parâmetros farmacocinéticos avaliados, contribuindo para os valores elevados obtidos nos desvios padrão. O voluntário 17 (homozigoto selvagem) e o voluntário 2 (heterozigoto) apresentam valores muito elevados em todos os parâmetros.



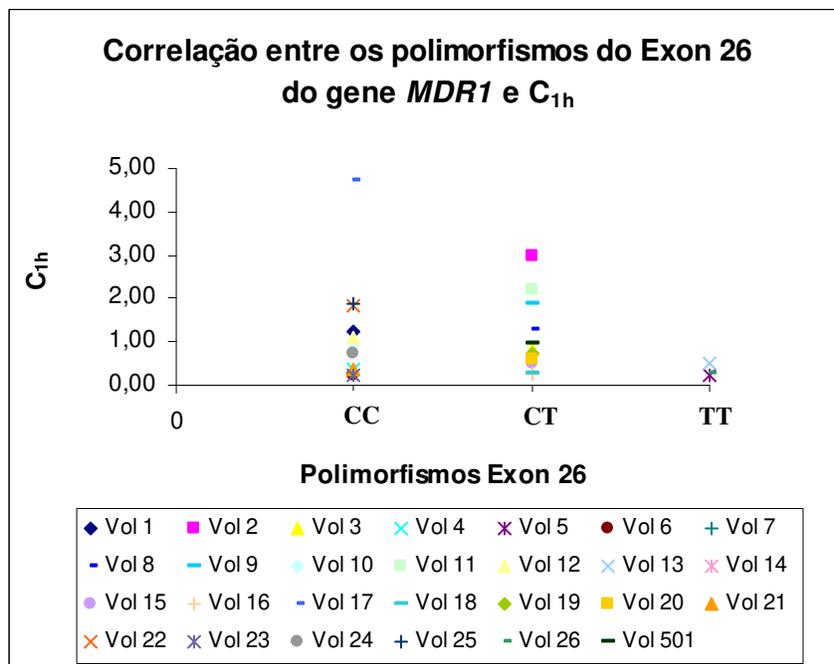
**Figura 15-** Dispersão dos valores de  $AUC_{0-4hs}$  de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.



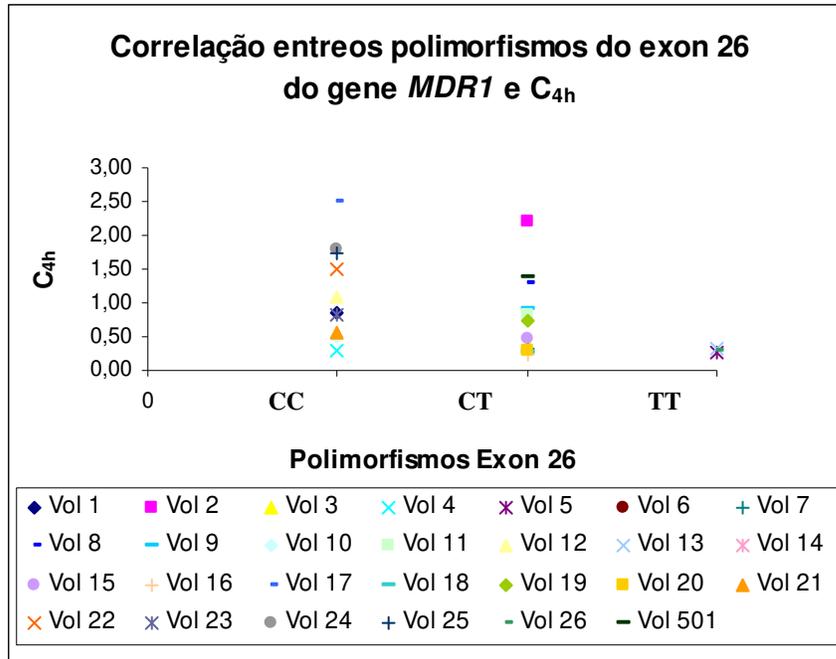
**Figura 16-** Dispersão dos valores de  $AUC_{0-24hs}$  de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.



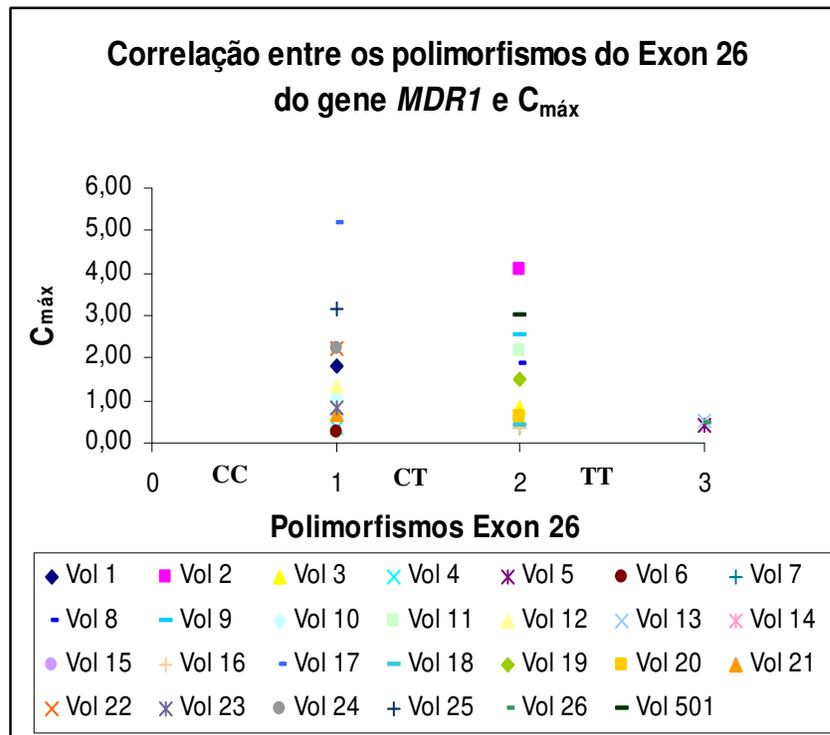
**Figura 17-** Dispersão dos valores de  $AUC_{0-48hs}$  de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.



**Figura 18-** Dispersão dos valores de  $C_{1h}$  de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.



**Figura 19-** Dispersão dos valores de  $C_{4h}$  de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.



**Figura 20-** Dispersão dos valores de  $C_{máx}$  de todos os voluntários em relação aos seus respectivos genótipos.

Sabe-se que os indivíduos polimórficos 3435TT (exon 26, gene *MDR1*) expulsam pouca quantidade de droga das células internas para o meio externo, embora não se conheça ainda o mecanismo de ação. Entretanto, este excesso da droga dentro das células pode ser rapidamente distribuído nos tecidos ou excretado pelo rim, diminuindo a concentração plasmática da droga (Sakaeda *et al.*, 2005). A distribuição e a excreção podem explicar a concentração plasmática e os valores de AUCs menores da droga *dextromethorphan* nos indivíduos portadores do alelo mutante (TT) do que nos indivíduos heterozigotos (CT) ou homozigotos selvagem (CC) no exon 26 do gene *MDR1*, como observado em nosso estudo.

Uma outra possibilidade seria a retenção do fármaco *dextromethorphan* no interior do enterócito, devido à diferença estrutural entre as camadas apical, local de concentração da PGP (Marzolini *et al.*, 2004), e basal. Desse modo, uma quantidade menor da droga atingiria a circulação sistêmica, ocasionando uma menor concentração plasmática de DM.

Acredita-se que o gene *MDR1* expresso na parede intestinal afeta a absorção de uma variedade de drogas. Por essa razão, a correlação entre os efeitos do polimorfismo C3435T (exon 26) e a farmacocinética, após uma única administração oral, tem sido intensamente estudada (Sakaeda *et al.*, 2005).

Uma redução na expressão duodenal da PGP foi observada por Hoffmeyer e colaboradores (Hoffmeyer *et al.*, 2000) em indivíduos portadores do genótipo TT para o alelo C3435T quando o fármaco digoxina foi administrado oralmente. Neste estudo, níveis mais elevados de digoxina no plasma, após indução com rifampina, foram observados nos indivíduos com genótipo TT em comparação aos indivíduos com genótipos CC ou CT. Essa observação pode indicar que as taxas de biodisponibilidade e de extensão dos substratos da PGP devem ser diferentes entre o alelo mutante (TT) e o alelo selvagem (CC): em indivíduos portadores do alelo variante, a secreção biliar ou renal de digoxina seria mais lenta, com uma diminuição na taxa de eliminação e uma elevação na concentração dessa droga no plasma. Todavia, a análise das concentrações de digoxina sem a indução de rifampina em relação aos diferentes genótipos não foi realizada. Por esse motivo, ainda não está elucidado se a elevação da concentração plasmática nos indivíduos TT é devida aos

baixos níveis de expressão de *MDR1* antes da indução com rifampina ou à supressão da indução de *MDR1* através de rifampina.

Uma outra pesquisa realizada por Sakaeda e colaboradores observou que, após uma única administração oral de digoxina, o valor da AUC nos indivíduos TT era mais baixo do que em indivíduos CT ou CC. Segundo os pesquisadores, esse fato poderia ser explicado pela alteração de distribuição, isto é, os aumentos na taxa de distribuição eram mais predominantes para uma única administração de digoxina quando comparada a um aumento na taxa de absorção ou diminuição da secreção biliar ou renal (Sakaeda *et al.*, 2001).

Da mesma forma, Kim e colaboradores (Kim *et al.*, 2001) estudaram a associação entre o polimorfismo no exon 26 do gene *MDR1* e os parâmetros farmacocinéticos da droga fexofenadina, concluindo que a concentração plasmática de fexofenadina, após uma única dose oral, era mais baixa nos indivíduos portadores do alelo variante do que nos heterozigotos ou nos homozigotos selvagens.

O genótipo *MDR1* 3435TT foi associado a uma baixa expressão de transcrição desse gene *MDR1* e de seu produto PGP em células mononucleares do sangue periférico e a baixas concentrações plasmáticas dos fármacos nelfinavir e efavirenz, correspondendo a uma base molecular potencial para as diferenças interindividuais no ritmo da recuperação imune de células CD4, vista após o início do tratamento (Fellay *et al.*, 2002). Os pesquisadores consideram que o fato das concentrações plasmáticas de nelfinavir e de efavirenz serem baixas, quando a expressão da PGP também é baixa, pode sugerir um efeito indireto do genótipo *MDR1* 3435T. Duas hipóteses são exploradas para esse paradoxo: as concentrações baixas da PGP poderiam ser compensadas pela superexpressão de outros transportadores com afinidade para as drogas antiretrovirais, potencializando uma redução nas concentrações plasmáticas dessas drogas; e uma ação intestinal conjunta entre a enzima CYP3A e a PGP, limitando a absorção das drogas, como demonstrado por Schuetz e colaboradores (Schuetz *et al.*, 1996).

Desses estudos pode-se constatar a seguinte correlação entre a genotipagem *MDR1* (exon 26) e a farmacocinética de drogas como digoxina, fenoxifenadine e antiretrovirais: os indivíduos homozigotos variantes 3435TT apresentam valores mais

baixos dos parâmetros  $C_{m\acute{a}x}$  e / ou AUC em relação aos homozigotos selvagens e / ou heterozigotos. Essa correlação é a mesma que a estabelecida nesse presente trabalho.

A tabela 17 corresponde à correlação dos dados da genotipagem do exon 21 do gene *MDRI*, da farmacocinética da droga *dextromethorphan* e das características idade, altura, peso e IMC dos participantes desse estudo. O indivíduo 18 foi excluído dessa análise devido a não definição do seu genótipo em relação a esse exon.

**Tabela 17-** Correlação entre os Genótipos *MDRI* (Exon 21), as Características dos voluntários e os Parâmetros Farmacocinéticos pós-administração oral da droga *dextromethorphan* dos voluntários participantes do estudo, classificados como metabolizadores rápidos.

Parâmetros Farmacocinéticos	Genótipo <i>MDRI</i> – Exon 21		
	G/G (n = 14)	G/T (n = 10)	T/T (n = 2)
<b>Idade (anos)</b>	28,36 ± 7,55	33,80 ± 10,16	31,50 ± 7,78
<b>Altura (cm)</b>	1,65 ± 0,08	1,70 ± 0,07	1,72 ± 0,04
<b>Peso (kg)</b>	63,96 ± 9,74	69,62 ± 10,25	75,75 ± 3,89
<b>IMC (kg / m<sup>2</sup>)</b>	23,61 ± 2,04	24,09 ± 1,99	25,60 ± 0,00
<b>C<sub>1h</sub> (ng/ml)</b>	1,08 ± 1,19	1,18 ± 0,95	0,75 ± 0,69
<b>C<sub>4h</sub> (ng/ml)</b>	1,00 ± 0,72	0,81 ± 0,63	0,57 ± 0,39
<b>C<sub>máx</sub> (ng/ml)</b>	1,48 ± 1,38	1,71 ± 1,32	1,14 ± 0,98
<b>T<sub>máx</sub> (h)</b>	1,96 ± 0,84	1,56 ± 0,46	1,75 ± 0,35
<b>AUC<sub>0-4h</sub> (ng h/ml)</b>	3,90 ± 3,71	4,28 ± 3,48	2,77 ± 2,3
<b>AUC<sub>0-24h</sub> (ng h/ml)</b>	9,51 ± 9,61	8,96 ± 7,76	4,87 ± 4,86
<b>AUC<sub>0-48h</sub> (ng h/ml)</b>	9,72 ± 10,08	9,12 ± 7,94	4,83 ± 4,80

Alguns experimentos *in vitro* mostraram que as células que expressam a variação 2677T apresentam um efluxo maior de digoxina quando comparadas àquelas que expressam o alelo 2677G. Além disso, os indivíduos portadores do alelo variante 2677T tiveram uma atividade mais elevada da PGP *in vivo*, a qual foi determinada através dos níveis de fexofenadina no plasma, do que aqueles com o alelo 2677G (Kim *et al.*, 2001).

Nenhuma diferença significativa na análise estatística foi observada em relação ao exon 21 do gene *MDRI*.

Johne e colaboradores mostraram que o haplótipo 2677T-3435T está significativamente associado a valores mais elevados de AUC e o haplótipo 2677G-3435C a valores mais baixos de AUC, após uma única administração oral de digoxina. A análise do haplótipo mostrou-se mais adequada do que a análise de SNP em prever o fenótipo *MDRI* (Johne *et al.*, 2002).

No nosso caso, a pequena casuística do genótipo 2677TT (n = 2) não permitiu uma análise dos referidos haplótipos.

A tabela 18 corresponde à correlação dos dados de genotipagem do exon 12 do gene *MDRI*, da farmacocinética da droga *dextromethorphan* e das características idade, altura, peso e IMC dos participantes do estudo. O indivíduo 24 foi excluído dessa análise devido a não definição do seu genótipo em relação a esse exon.

**Tabela 18-** Correlação entre os Genótipos *MDRI* (Exon 12), as Características dos voluntários e os Parâmetros Farmacocinéticos pós-administração oral da droga *dextromethorphan* dos voluntários participantes do estudo, classificados como metabolizadores rápidos.

Parâmetros Farmacocinéticos	Genótipo <i>MDRI</i> – Exon 12		
	C/C (n = 3)	C/T (n = 10)	T/T (n = 13)
<b>Idade (anos)</b>	31,00 ± 9,09	26,78 ± 7,10	33,38 ± 9,12
<b>Altura (cm)</b>	1,70 ± 0,05	1,64 ± 0,07	1,69 ± 0,08
<b>Peso (kg)</b>	68,00 ± 10,47	62,66 ± 10,22	69,40 ± 8,02
<b>IMC (kg / m<sup>2</sup>)</b>	23,50 ± 2,28	23,58 ± 2,28	24,22 ± 10,26
<b>C<sub>4h</sub> (ng/ml)</b>	0,91 ± 0,47	0,72 ± 0,88	0,85 ± 0,63
<b>C<sub>máx</sub> (ng/ml)</b>	1,01 ± 0,72	1,53 ± 2,07	1,73 ± 1,26
<b>T<sub>máx</sub> (h)</b>	2,06 ± 0,94	1,70 ± 0,57	1,58 ± 0,42
<b>AUC<sub>0-4h</sub> (ng h/ml)</b>	2,65 ± 2,18	4,18 ± 5,49	4,34 ± 3,32
<b>AUC<sub>0-24h</sub> (ng h/ml)</b>	6,44 ± 6,17	8,68 ± 13,12	9,44 ± 8,15
<b>AUC<sub>0-48h</sub> (ng h/ml)</b>	6,40 ± 6,16	9,03 ± 13,87	9,69 ± 8,50

Nenhuma diferença significativa na análise estatística foi observada em relação ao exon 12 do gene *MDRI*.

## 5.6- Análise das Freqüências Alélica e Genotípica

Os valores das freqüências, calculados através do teste do qui-quadrado, para o genótipo referente ao exon 26 do gene *MDR1* nos indivíduos saudáveis participantes desse estudo, habitantes da região metropolitana de Campinas, foram: 41 % CC, 44 % CT e 15 % TT (a freqüência do alelo C calculada foi 0,63). Neste estudo, o alelo e o genótipo estavam em equilíbrio *Hardy-Weinberg* para o exon 26 do gene *MDR1*. Os valores obtidos para a freqüência do alelo C são significativamente mais elevados do que nas populações caucasianas da Europa ocidental (0,48) e na população espanhola (0,48). Não obstante, essa freqüência é mais baixa do que em algumas populações africanas (0,83), como na ganense e na queniana. As pequenas diferenças observadas na distribuição do alelo C, entre a população analisada nesse estudo e outras populações, podem resultar de diferenças nos fatores étnicos (Li *et al.*, 2006).

A freqüência do alelo C observada em indivíduos brasileiros saudáveis corresponde a uma freqüência intermediária entre a população africana (mais elevada) e europeia (mais baixa). Isto pode ser explicado devido a uma grande parte da população brasileira corresponder a uma miscigenação destas duas populações (africanas e europeias).

**Tabela 19-** Freqüências alélica e genotípica do polimorfismo do Exon 26 do gene *MDR1* e a correlação dessas freqüências em diferentes populações.

	N	Freqüência Alélica		Freqüência Genotípica			Ref	
		C	T	CC	CT	TT		
<b>Brasileiros</b>	27	0,63	0,37	0,41	0,44	0,15		
Africanos	Ganenses	206	0,83	0,17	0,67	0,34	0,00	Ameyaw <i>et al.</i> , 2001
	Quenianos	80	0,83	0,17	0,70	0,26	0,04	Ameyaw <i>et al.</i> , 2001
Europeus	Caucasianos	190	0,48	0,42	0,24	0,48	0,28	Hoffmeyer <i>et al.</i> , 2000
	Espanhóis	408	0,48	0,42	0,26	0,52	0,22	Bernal <i>et. al.</i> , 2003

Uma descoberta recente mostrou que o alelo C está associado a uma expressão mais elevada da PGP, levando à conjectura de que o genótipo CC estaria relacionado a uma proteção a infecções do TGI, muito comuns em populações africanas (Schaeffeler *et al.*, 2001).

Em relação ao exon 21, as frequências observadas para os alelos e para os genótipos foram: 56 % homozigotos selvagens (GG), 40 % heterozigotos (GT) e 4 % homozigotos polimórficos (TT). A frequência obtida para o alelo G foi 76 % (Tabela 20). Esses dados não foram comparados com outros grupos étnicos, pois não encontramos dados significativos na literatura.

**Tabela 20-** Frequências alélica e genotípica do polimorfismo do Exon 21 do gene *MDRI*.

	N	Frequência Alélica		Frequência Genotípica		
		<b>G</b>	<b>T</b>	<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>
<b>Exon 21</b>	25	0,76	0,24	0,56	0,40	0,04

Em relação ao exon 12, as frequências observadas para os genótipos foram: 12 % homozigotos selvagens (CC), 38 % heterozigotos (CT) e 50 % homozigotos polimórficos (TT). A frequência obtida para o alelo para o alelo T foi 69 % (Tabela 21). Esses dados não foram comparados com outros grupos étnicos, pois não encontramos dados significativos na literatura.

**Tabela 21-** Frequências alélica e genotípica do polimorfismo do Exon 12 do gene *MDRI*.

	N	Frequência Alélica		Frequência Genotípica		
		<b>C</b>	<b>T</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
<b>Exon 12</b>	26	0,31	0,69	0,12	0,38	0,50

## **6- CONCLUSÃO**

- ❖ Existe uma correlação entre o polimorfismo C3435T – exon 26 do gene *MDR1* – e alguns parâmetros farmacocinéticos: a Concentração Máxima ( $C_{máx}$ ) e as Áreas Sob a Curva (AUCs) do fármaco *dextromethorphan*, após uma única administração oral, apresentaram valores mais baixos nos indivíduos portadores do alelo mutante T. Esses resultados podem fornecer explicações para as variações interindividuais do fármaco *dextromethorphan*, embora não possam explicar o mecanismo exato pelo qual esse polimorfismo do gene *MDR1* altera os níveis plasmáticos desse fármaco.
  
- ❖ Em relação ao exon 26, as frequências genóticas observadas para homocigotos selvagens (CC), heterocigotos (CT) e homocigotos polimórficos (TT) foram, respectivamente, 41 %, 44 % e 15 %. A frequência obtida para o alelo C do exon 26 (63 %) é significativamente mais elevada do que nas populações europeias e significativamente mais baixa do que em populações africanas.
  
- ❖ Em relação ao exon 21, as frequências genóticas observadas para homocigotos selvagens (GG), heterocigotos (GT) e homocigotos polimórficos (TT) foram, respectivamente, 56 %, 40 % e 4 %. A frequência obtida para o alelo T foi 24 %.
  
- ❖ Em relação ao exon 12, as frequências genóticas observadas para homocigotos selvagens (CC), heterocigotos (CT) e homocigotos polimórficos (TT) foram, respectivamente, 12 %, 38 % e 50 %. A frequência obtida para o alelo T foi 69 %.

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1999; 39: 361–98.

Antonhy V, Skach WR. Molecular mechanism of P-glycoprotein assembly into cellular membranes. **Curr Protein Pept Sci** 2002; 3(5):485-501.

Callen DF, Baker E, Simmers RN, Seshadri R, Roninson IB. Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. **Hum Genet** 1987; 77(2):142-4.

Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, *et al.* Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter *MDR-1* gene in white subjects. **Clin Pharmacol Ther** 2001; 69(3): 169-174.

Chow LH, Huang EY, Ho ST, Lee TY, Tao PL. Dextromethorphan potentiates morphine antinociception at the spinal level in rats. **Can J Anaesth** 2004; 51(9):905-10.

Drozdik M, Bialecka M, Mysliwiec K, Honczarenko K, Stankiewicz J, Sych Z. Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. **Pharmacogenetics** 2003; 13(5):259-63.

Eichelbaum M, Fromm MF, Schwab M. Clinical Aspects of the *MDR-1 (ABCB1)* Gene Polymorphism. **Ther Drug Monitor** 2004; 26(2):180–5.

Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. **Ann Rev Med** 2005; 57:11.1–11.19.

Elliot K, Hynansk A, Inturrisi CE. Dextromethorphan attenuates and reverses analgesic tolerance to morphine. **Pain** 1994; 59(3):361-68.

Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, *et al.* Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. **Lancet** 2002; 359(9300):30-6.

Fromm MF. P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. **Int J Clin Pharmacol Ther** 2000; 38(2):69-74.

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

Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M. Genetic testing for pharmacogenetics and its clinical application in drug therapy. **Clin Chim Acta** 2006; 363(1-2):177-86.

Hoffemeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, *et al*. Functional polymorphisms of the human multidrugresistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. **Proc Nat Acad Sci USA** 2000; 97(7): 3473–8.

Huang W, Lin YS, McConn DJ 2<sup>nd</sup>, Calamia JC, Totah RA, Isoherranen N, *et al*. Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. **Drug Metab Dispos** 2004; 32(12):1434-45.

Jamroziak K, Balcerczak E, Mlynarski W, Mirowski M, Robak T. Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of Polish population. **Pol J Pharmacol** 2002; 54(5):495–500.

John A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, *et al*. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. **Clin Pharmacol Ther** 2002; 72(5):584–94.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim Biophys Acta** 1976; 455(1):152-62.

Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, *et al*. Identification of functionally variant *MDR1* alleles among European Americans and African Americans. **Clin Pharmacol Ther** 2001; 70(2):189–99.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. **Science** 2007; 315(5811):525-8.

Kroemer HK, Eichelbaum M. Molecular basis and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. **Life Sci** 1995; 56:2285-98.

Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. **Epilepsia** 2005; 46(2):224-35.

Li Y, Wang Y, Sun J, Li Y, Yang L. Distribution of the functional MDR1 C3435T polymorphism in the Han population of China. **Swiss Med Wkly** 2006; 136(23-24):377-82.

Mao J, Price DD, Lu J, Caruso FS, Mayer DJ. Oral administration of dextromethorphan prevents the development of morphine tolerance and dependence in rats. **Pain** 1996; 67(2-3): 212-18.

Marchi N, Hallene KL, Kight KM, Cucullo L, Moddel G, Bingaman W, et al. Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain. **BMC** 2004; 2:37.

Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. **Lancet** 2000; 356(9242): 1667–71.

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

McElroy S, Sachse C, Brockmoller J, Richmond J, Lira M, Friedman D, et al. CYP2D6 genotyping as an alternative to phenotyping for determination of metabolic status in a clinical trial setting. **AAPS PharmSci.** 2000; 2(4):E33

Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. **DNA Cell Biol** 1996; 15(4): 273-80.

Passarge E. In: **Color Atlas of Genetic.** Edited by Georg Thieme Verlag Stuttgart, Germany. Published by Thieme New York, New York, USA 2001.

Pirazzoli A, Recchia G. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: are they still promising? **Pharmacol Res** 2004; 49(4): 357-61.

Rodriguez-Novoa S, Barreiro P, Jimenez-Nacher I, Soriano V. Overview of the pharmacogenetics of HIV therapy. **Pharmacogenomics J** 2006; 6(4):234-45.

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

Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T, *et al.* MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. **Pharm Res** 2001; 18(10):1400-4.

Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? **Drug Metab Pharmacokinet** 2005; 20(6):391-414.

Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, *et al.* Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. **Lancet** 2001; 358(9279):383-4.

Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV, Schuetz JD. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans. **Proc Nat Acad Sci USA** 1996; 93(9):4001-5.

Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**. 2003; 43:285-307.

Schmid B, Bircher J, Preisig R, K pfer A. Polymorphic dextromethorphan metabolism: cosegregation of oxidative O-methylation with debrisoquine hydroxylation. **Pharmacol Ther** 1985; 38:618-624.

Shields PG. Pharmacogenetics: detecting sensitive populations. **Environ Health Perspect**. 1994; 102 (Suppl 11):81-7.

Siegmund M, Brinkmann U, Schaeffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, *et al.* Association of the P-glycoprotein transporter MDR1 (C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. **J Am Soc Nephrol** 2002; 13(7):1847-54.

Speck RR, Yu XF, Hildreth J, Flexner C. Differential effects of P-glycoprotein and multidrug resistance protein-1 on productive human immunodeficiency virus infection. **J Infect Dis** 2002; 186(3):332-40.

Tanigawara Y. Role of P-glycoprotein in drug disposition. **Ther Drug Monit** 2000; 22(1): 137-40.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. **Proc Nat Acad Sci USA** 1987; 84(21):7735-8.

Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene. **J Biol Chem** 1987; 262(36):17432-6.

Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, *et al.* Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. **J Biol Chem** 1992; 267(34):24248-52.

Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. **Pharmacogenet Genomics** 2005; 15(10):693–704.

Woojin Lee A, Lockhart AC, Kim RB, Rothenberg ML. Cancer Pharmacogenomics: Powerful Tools in Cancer Chemotherapy and Drug Development. **Oncologist** 2005; 10(2): 104-11.

Yu A, Haining RL. Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities? **Drug Metab Dispos** 2001; 29(11):1514-20.

Yu A, Dong H, Lang D, Haining RL. Characterization of dextromethorphan O- and N-demethylation catalyzed by highly purified recombinant human CYP2D6. **Drug Metab Dispos** 2001; 29(11):1362-5.

## **8- ANEXOS**

## ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO

**Cartesius Desenvolvimento de Pesquisas Clínicas Ltda**  
**Galeno Research Unit**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CORRELAÇÃO ENTRE A GENOTIPAGEM DOS ALELOS MAIS COMUNS DO GENE *MDR1*  
E A FARMACOCINÉTICA DA DROGA *DEXTROMETHORPHAN* EM VOLUNTÁRIOS  
SADIOS.

#### I – DESENHO DO ESTUDO E OBJETIVOS

A farmacogenética descreve o uso da informação genética para orientar a escolha da terapia farmacológica numa base individual. Assim, pressupõe-se que é possível prever diferenças nas respostas a agentes terapêuticos entre indivíduos a partir de sua constituição genética. Com base neste princípio, a descoberta das variações genéticas específicas associadas a uma resposta terapêutica boa ou inadequada a um determinado fármaco, deverá permitir a individualização das escolhas terapêuticas baseadas no genótipo do indivíduo que regulam a farmacocinética e a farmacodinâmica dos medicamentos. Estudos atuais de farmacogenética têm como objetivo otimizar a eficácia de uma droga e diminuir os efeitos colaterais e a toxicidade. O objetivo deste estudo é investigar uma possível correlação entre os polimorfismos do gene *MDR1* e a farmacocinética da droga *Dextromethorphan* com a finalidade de identificar, através de genotipagem, populações que apresentam diferenças significativas nos níveis de absorção de fármacos.

#### II - PROCEDIMENTOS

Os participantes desse estudo serão submetidos ao preenchimento de um formulário de identificação e dados clínicos. Será realizada coleta de sangue periférico para Análise Hematológica (exames de hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de plaquetas); Análise Bioquímica (exames de uréia, creatinina, bilirrubina total, proteínas totais, albumina, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, colesterol total, triglicerídeos, ácido úrico e  $\gamma$ GT); Análise de Urina (exame de urina I e experimentos de fenotipagem); Análise Sorológica [exames de hepatite B e C, HIV(1+2) e b-HCG nas mulheres]; Genotipagem *MDR1* e *CYP2D6*; e experimentos de farmacocinética.

#### III - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS

O desconforto será pequeno, visto que o procedimento mais doloroso é a coleta de uma amostra de sangue como é feito nos exames de sangue normais. Será colhida apenas uma amostra de sangue de cerca de 5 ml, em uma seringa; portanto, sempre que possível, uma única punção será realizada.

#### IV – BENEFÍCIOS

A correlação entre polimorfismos de genes relacionados ao transporte de drogas, como os polimorfismos do gene *MDR1*, e a sua repercussão farmacocinética (fase I do desenvolvimento clínico), em indivíduos voluntários sadios, podem auxiliar no tratamento (escolha do medicamento e de sua posologia) tanto da população em geral quanto de pacientes que fazem o uso prolongado de um determinado tipo de medicamento, pela possibilidade de uma pré-seleção mais adequada do fármaco a ser prescrito. A existência de um banco de dados disponível das características genéticas de cada indivíduo poderia contribuir para uma seleção de drogas mais adequada do que a seleção baseada na tentativa e erro, minimizando o aparecimento de efeitos adversos, contribuindo inclusive em termos econômicos. Este procedimento poderia trazer benefícios para o sistema de saúde pela diminuição substancial de internações para o tratamento de efeitos colaterais.

## **V - GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS**

Todas as informações a respeito do andamento do trabalho (exames de sangue, consultas, resultados, riscos) serão comunicados aos participantes assim como, quaisquer outras dúvidas serão esclarecidas. O principal investigador é o Dr. Gilberto de Nucci, professor do Depto de Farmacologia da USP e da UNICAMP, responsável pela Cartesius Desenvolvimento de Pesquisas Clínicas Ltda (Av. Prof. Lineu Prestes, 1524 -São Paulo / SP, fone: (11) 30917493) e Galeno Research Unit (Rua Latino Coelho, 1301 - Parque Taquaral- Campinas / SP, fone: (19) 32427133). Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, deve-se entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Campinas (Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária - Campinas - SP, fone: (19) 37888936, e-mail cep@fcm.unicamp.br).

## **VI - LIBERDADE DE RETIRAR O CONSENTIMENTO**

A autorização para realização do estudo pode ser retirada no momento em que o participante desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem que deixe de receber orientação, tratamentos ou resultados já obtidos.

## **VII - SEGURANÇA DO SIGILO**

Toda a informação a respeito do participante e seus exames será mantida em sigilo com o intuito de manter a privacidade do mesmo. O Centro de Bioequivalência não identificará o voluntário por ocasião da exposição e / ou publicação dos resultados.

## **VIII - COMPROMISSO DE ATUALIZAR A INFORMAÇÃO**

As informações serão fornecidas de maneira atualizada visando um maior esclarecimento dos familiares e até uma eventual mudança de opinião em continuar ou não participando do projeto.

## **IX - DISPONIBILIDADE DE TRATAMENTO MÉDICO**

Todos os participantes receberão acompanhamento médico necessário, assim como o direito de se manterem atualizados sobre os resultados parciais da pesquisa ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores. Em caso de dano pessoal, diretamente causados pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

## **X - GASTOS**

Todos os procedimentos médicos e de diagnóstico laboratorial pertinentes à pesquisa serão pagos sem, portanto, qualquer gasto por parte do participante.

## **XI – COMPROMISSO DO PESQUISADOR**

O pesquisador responsável se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

## TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, declaro ter lido a carta de informação a respeito do PROJETO DE PESQUISA: **CORRELAÇÃO ENTRE A GENOTIPAGEM DOS ALELOS MAIS COMUNS DO GENE *MDRI* E A FARMACOCINÉTICA DA DROGA *DEXTROMETHORPHAN* EM VOLUNTÁRIOS SADIOS.**

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que me foram lidas descrevendo o estudo. Ficaram claros quais são os propósitos desta pesquisa, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu entendimento neste serviço.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou representante legal

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pessoa responsável pelo atendimento

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO 2- APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA - ESTUDO GDN 98/04



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP  
☎ (0\_19) 3788-8936  
FAX (0\_19) 3788-8925  
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/cep/index.html  
cep@fcm.unicamp.br

CEP. 19/10/04.  
(Grupo II)

**PARECER PROJETO: Nº 550/2004**

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: "UM ESTUDO RANDOMIZADO, CRUZADO COM TRÊS PERÍODOS, PARA AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA DE UMA DOSE ÚNICA DE UMA COMBINAÇÃO DE DOXILAMINA A DEXTROMETORFANO, SOMENTE DE DOXILAMINA E SOMENTE DE DEXTROMETORFANO EM INDIVÍDUOS ADULTOS E SAUDÁVEIS"**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Gilberto de Nucci

**INSTITUIÇÃO:** Clínica de Repouso de Itapira

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 15/10/2004

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 19/04/2005 e 19/10/2005

### II - OBJETIVOS

Avaliar a biodisponibilidade comparativa do succinato de doxilamina e do bromidrato de dextrometorfano quando administrados sob a forma de um produto combinado e quando administrados como produtos isolados.

### III - SUMÁRIO

Será um estudo randomizado, de dose única, cruzado com três períodos. Os voluntários serão submetidos a fenotipagem a fim de se determinar se são metabolizadores extensivos ou lentos do dextrometorfano. Os indivíduos identificados como extensivos serão inscritos no estudo. Após fenotipagem, os participantes passarão por um período de interrupção de pelo menos 7 dias. Os participantes serão designados aleatoriamente a uma sequência de tratamento. Aproximadamente 12 participantes de ambos os sexos serão recrutados.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequado e contém todas as informações para que o voluntário decida se quer ou não participar do estudo. Os critérios de inclusão e exclusão são adequados, bem como a forma de recrutamento dos voluntários.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### **VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de outubro de 2004.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## ANEXO 3- APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA - ESTUDO GDN 131/04



CEP, 19/10/04.  
(Grupo II)

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

(0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-8925

[www.fan.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fan.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

[cep@fem.unicamp.br](mailto:cep@fem.unicamp.br)

**PARECER PROJETO: N° 551/2004**

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: "UM ESTUDO RANDOMIZADO PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE UMA DOSE ÚNICA DE UMA COMBINAÇÃO DE DOXILAMINA A DEXTROMETORFANO, SÓMENTE DE DOXILAMINA E SÓMENTE DE DEXTROMETORFANO EM INDIVÍDUOS ADULTOS E SAUDÁVEIS"**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci

INSTITUIÇÃO: Clínica de Repouso de Itapira

APRESENTAÇÃO AO CEP: 15/10/2004

**APRESENTAR RELATÓRIO EM: 19/04/2005 e 19/10/2005**

### II - OBJETIVOS

Avaliar o perfil farmacocinético do succinato de doxilamina e do bromidrato de dextrometorfano quando administrados sob a forma de um produto combinado e quando administrados como produtos isolados.

### III - SUMÁRIO

Será um estudo randomizado, de dose única, cruzado com três períodos. Os voluntários serão submetidos a fenotipagem a fim de se determinar se são metabolizadores extensivos ou lentos do dextrometorfano. Os indivíduos identificados como lentos serão inscritos no estudo. Após fenotipagem, os participantes passarão por um período de interrupção de pelo menos 7 dias. Os participantes serão designados aleatoriamente a uma sequência de tratamento. Aproximadamente 8 participantes de ambos os sexos serão recrutados.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequado e contém todas as informações para que o voluntário decida se quer ou não participar do estudo. Os critérios de inclusão e exclusão são adequados, bem como a forma de recrutamento dos voluntários.

### V - PARECER DO CEP

- 1 -

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## **VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de outubro de 2004.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP  
☎ (0\_19) 3788-8936  
FAX (0\_19) 3788-8925  
🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)  
✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

CEP. 27/09/05  
(PARECER PROJETO 551/2003)

## PARECER

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “UM ESTUDO RANDOMIZADO, PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE UMA DOSE ÚNICA DE UMA COMBINAÇÃO DE DOXILAMINA A DEXTROMETORFANO, SÓMENTE DE DOXILAMINA E SÓMENTE DE DEXTROMETORFANO EM METABOLIZADORES LENTOS DE DEXTROMETORFANO”**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci

### II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o Relatório Final, apresentado em setembro de 2005, do protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Recomendação: quando da publicação enviar cópia ao CEP/FCM.

  
Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP



## Correlação entre os Polimorfismos da CYP2D6 e do gene *MDR1* com a biodisponibilidade do dextrometorfano e do dextrorfano em voluntários sadios

A farmacogenômica utiliza informação genética para orientar a escolha da terapia farmacológica em uma base individual, pressupondo que se pode prever diferenças na resposta a agentes terapêuticos entre indivíduos, a partir de sua constituição genética. Os estudos atuais de farmacogenética objetivam otimizar a eficácia de uma droga e diminuir os efeitos colaterais e a toxicidade. Os estudos de polimorfismos genéticos (SNPs) podem ter um impacto nos ajustes individuais da dose de um determinado fármaco. Os polimorfismos de genes que codificam transportadores de drogas, como o gene *MDR1*; das enzimas metabolizadoras de fármacos, como a isoforma 2D6 do citocromo P450 (CYP2D6), e de receptores para drogas, relacionam-se às alterações funcionais no fenótipo, contribuindo na resposta a uma droga. O Dextrometorfano é um agente antitússico que atua no centro da tosse, isômero da Codeína e metabolizado principalmente pela CYP2D6 no metabólito ativo dextrorfano. Sua absorção sofre interferência da proteína do gene *MDR1*.

O presente projeto tem como objetivos a avaliação do genótipo de uma população de voluntários sadios pela análise dos polimorfismos dos alelos mais frequentes da CYP2D6 e do gene *MDR1*, correlacionando-se com a biodisponibilidade do dextrometorfano e do seu metabólito dextrorfano.

Uma fenotipagem foi inicialmente realizada através da quantificação na urina do dextrometorfano e do dextrorfano até 12 horas após a administração, utilizando-se método validado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. A seguir, 26 indivíduos identificados como metabolizadores rápidos e 5 como metabolizadores lentos foram incluídos em um protocolo de avaliação farmacocinética dos compostos ao longo de um período de 48 horas após a administração de 10 mg de dextrometorfano. A genotipagem da CYP2D6 foi realizada pela técnica de PCR Tetra-Primer.

Após a quantificação do dextrometorfano e do dextrorfano e avaliação da farmacocinética, verificou-se que os 26 voluntários identificados como metabolizadores rápidos (homozigotos para os alelos selvagem da CYP2D6) apresentaram razão entre as áreas sob a curva (AUC) dos compostos (AUC do dextrometorfano / AUC do dextrorfano) variando entre 0,05 e 0,68. Os 5 voluntários classificados como metabolizadores lentos apresentaram polimorfismos variados, sendo 2 heterozigotos (em relação ao alelo 4) e 3 homozigotos (2 em relação ao alelo 4 e outro em relação ao alelo 3). Nos heterozigotos, a razão entre as AUCs variou entre 2,94 e 58,22 e nos homozigotos entre 106,50 e 252,22, demonstrando alta correlação entre a fenotipagem, genotipagem e farmacocinética. A análise dos polimorfismos no gene *MDR1* permitirá avaliar o papel deste gene na absorção do dextrometorfano e conseqüente interferência nos parâmetros farmacocinéticos neste estudo.

A existência de uma correlação entre genotipagem e farmacocinética demonstra que a implementação de técnicas de biologia molecular pode auxiliar testes clínicos que possuem como alvo de interesse a metabolização e absorção de drogas. ■

Apoio financeiro: CNPq.

## ANEXO 5- TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

**(1) The title of the article**

**Influence of *MDR1* polymorphisms on dextromethorphan pharmacokinetics in healthy Brazilian subjects.**

**Short Title**

**MDR1 genotyping in healthy Brazilian subjects**

**(2) The authors' full name**

Fernanda M Roversi<sup>1\*</sup>

Rogério A Oliveira<sup>2</sup>

Georgio F Valadares<sup>2</sup>

José L Donato<sup>1</sup>

Gilberto de Nucci<sup>1,2</sup>

**(3) Affiliations**

1 –Department of Pharmacology– State University of Campinas (UNICAMP) – Campinas, São Paulo, Brazil.

2 – Galeno Research Unit – Campinas, São Paulo, Brazil.

**(4) Acknowledgement of grant support and of individuals**

This study was supported by a scholarship grant of the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

**(5) Correspondence author.**

José Luiz Donato

Zip code: 13087-010

Adress: Rua Latino Coelho, 1301.

Phone: 55-19-3242-7022

Parque Taquaral - Campinas – São Paulo – Fax : 55-19-3242-7827

Brazil

e-mail: josedonato@uol.com.br

## SUMMARY

In this present study, we investigated the relationship between the *MDR1* genotype and the dextromethorphan (DM) pharmacokinetics in 27 healthy Brazilian subjects. The *MDR1* genotype in this population was determined by PCR-DNA sequencing. After single oral administration of 10 mg DX, plasma concentrations of dextromethorphan were measured and its pharmacokinetic characteristics were compared according to *MDR1* genotype. The area under the plasma concentration-time curve 0-4h, 0-24h and 0-48h was significantly lower in subjects with 3435TT ( $1.18 \pm 0.05$ ,  $2.11 \pm 0.83$ ,  $2.12 \pm 0.83$  ngh/ml) than in those with 3435CC ( $4.49 \pm 3.91$ ,  $11.07 \pm 9.98$ ,  $11.33 \pm 10.53$  ngh/ml) and 3435CT ( $3.91 \pm 3.22$ ,  $8.07 \pm 7.41$ ,  $8.20 \pm 7.57$  ngh/ml). The maximum plasma concentrations were lower in subjects with 3435TT ( $0.45 \pm 0.05$  ng/ml) than in those with 3435CC ( $1.74 \pm 1.52$  ng/ml) and 3435CT ( $1.52 \pm 1.22$  ng/ml). There wasn't effect of gender or age on the distribution. The distribution of the *MDR1* genotype at exon 26, 21 and 12 was, respectively, 41% CC, 44% CT, and 15% TT, 56% GG, 40% GT, and 4% TT and 12% CC, 38% CT, and 50% TT. DM pharmacokinetics was affected by the genetic polymorphisms of the *MDR1* gene in healthy Brazilian subjects. These findings may provide a plausible explanation for interindividual variation in the disposition of DM, although our data couldn't explain the exact mechanisms by which the polymorphic *MDR1* gene paradoxically reduces the plasma levels of DM.

**Key words:** *MDR1* genotype, Single-Nucleotide Polymorphisms, dextromethorphan pharmacokinetics

## INTRODUCTION

The P-glycoprotein (PGP) is encoded by a small gene family, comprising two genes in humans, designated *MDR1* (Multiple Drug Resistance) and *MDR2*, located near each other on chromosomal region 7q21.1 [1] and consists of 28 exons. PGP is an integral membrane protein with 1280 amino acids and has a molecular mass of approximately 170 kDa [2] that acts as an efflux pump at the cell membrane through hydrolysis of ATP to drive the efflux of its substrates against the concentration gradient [3, 4].

PGP is found in the canalicular surface of hepatocytes, the apical surface of proximal tubular cells in kidneys, and the brush border surface of enterocytes, as well as in the epithelium of the brain choroids plexus, on the luminal surface of blood capillaries of the brain and other tissues known to have blood-tissue barriers. The function and the anatomic localization of PGP suggest that this transporter acts as a protective barrier to keep toxins out of the body by excreting these compounds into bile, urine, and the intestinal lumen and thereby prevents accumulation of such compounds in

critical organs such as the brain, gonads, and bone marrow, as well as in the fetus [5]. Therefore, the PGP function is a physiologic defense by extruding a wide variety of hydrophobic xenobiotics from the inside cells to outside, protecting cells from accumulation of toxic substances or metabolites, and affording protection of sensitive organs [6].

From a pharmacologic point of view, judging from its strategic distribution in organs of drug absorption, distribution, metabolism and elimination, PGP can be expected to play a pivotal role in the pharmacokinetics and disposition of its substrate [7]. Studies using MDR1 knockout mice show that active excretion by intestinal PGP limits the oral absorption of certain substrates, such as human immunodeficiency virus (HIV)-protease inhibitors [8] and paclitaxel [9].

The range of substrates transported by PGP is extensive and includes a variety of pharmacologically distinct agents used in cancer chemotherapy, hypertension, allergy, infection, immunosuppression, neurology and inflammation [10]. One example of PGP substrate is dextromethorphan, which shares part of the adverse event profile of opioids and is widely used as a probe drug for CYP2D6 phenotyping and for the assessment of its activity [11].

These observations suggest that both MDR and cytochrome P-450 gene families are evolutionarily selected by the capacity of various xenobiotics to induce their own detoxification either through metabolism to hydrophilic derivatives by the cytochrome P-450 system or direct excretion from the cell by the MDR gene family. Furthermore, the data indicate that induction of selective members of the MDR and the cytochrome P-450 gene families may depend on overlapping regulatory elements that may lead to complementary roles in drug resistance [12, 13].

The *MDR1* gene is highly polymorphic occurring in various allelic combination, most of the detected polymorphisms are intronic or silent [14]. Genetic polymorphisms affecting their expression or changing their affinity for substrates can alter the absorption and elimination of drugs that are their substrates and can alter drug concentrations at the site of action despite similar blood concentrations and, therefore, influence disease risk [15].

To date, 28 SNPs (Single-Nucleotide Polymorphisms) have been reported in the *MDR1* gene, where 19 SNPs are located in the exonic regions and 11 are nonsynonymous. Allelic variations in the exons 12, 21 and 26 of the MDR1 gene were associated with altered PGP function [16]. The G2677T/A (exon 21) and the silent C3435T (exon 26) are the most common *MDR1* polymorphisms.

Interestingly, SNPs at exon 21 in position 2677 can result in 2 distinct amino acid changes, namely Ala893Ser (G2677T) and Ala893Thr (G2677A), and these two polymorphisms may be associated with altered transporter function or expression. [17, 18].

A synonymous SNP in exon 26 (C3435T) was the first variant to be associated with altered protein expression, influencing the uptake of orally administered PGP substrates such as digoxin. Although the SNP does not change the encoded amino acid (Ile1145Ile), PGP expression in the duodenum of individuals with the homozygous variant allele was noted to be different that in individuals with the wild type allele. Some hypothesis has been proposed to explain the relation between the polymorphism in the exon 26 of the MDR1 gene: the link between polymorphism in the exon 26 and others polymorphic sites in the same gene, as in the exon 21, exon 12 and exon 1b, that change the activity and function of PGP [17]; the reduction in translation efficiency that influence the function of PGP [2]; the alteration or regulation in mRNA processing and translation [19]; the impact on posttranscriptional modifications; and the linked to an important sequence for mRNA processing [20].

SNPs in the exons 26 (C3435T), 21 (G2677T/A), and 12 (C1236T) have been characterized in a number of ethnic populations. Interestingly, the allele frequencies of the 3 variant sites differ in the various populations, marked differences in the allele frequency of the exon 26. SNP were observed between the African and the Caucasian-Asian populations: the C allele is indeed more frequently expressed in African populations compared with Caucasian-Asian populations. With regard to exon 21, the 2677A genotype appeared to be significantly more common in Japanese subjects. In addition, major differences in allele frequencies of exon 12 are observed between Caucasian and Asian subjects and the variant 1236T allele is more frequently observed in Asian subjects as compared with Caucasian subjects [16, 18, 21].

An increasing number of studies have also implicated certain commonly occurring SNPs in *MDR1* in problems including altered drug levels and host susceptibility to diseases such as Parkinson's disease, inflammatory bowel disease, refractory seizures, and CD4 cell recovery during human immunodeficiency virus therapy [5].

The level of protein expression and the functional integrity of PGP affect its pharmacokinetic interaction with therapeutically administered drugs and play an important role in efficacy and toxicity of drug treatment. Therefore, the objective of this study was to evaluate the *MDR1* genotype frequency in Brazilian healthy subjects and to study the relationship between the *MDR1* genotype and the pharmacokinetics of the drug dextromethorphan after single oral administration in these subjects.

## **METHODS**

### **Subjects**

A total of 27 unrelated healthy subjects (14 males and 13 females, 19 – 43 years old) were included in the pharmacokinetic study of dextromethorphan and *MDR1* genotyping.

Before been accepted in the study, all volunteers were fully informed about the aims of the study, and a written informed consent was obtained. The protocol was approved by the **Ethical Committee** of UNICAMP (Estate University of Campinas, Campinas, Brazil) and was performed according to the revised Declaration of Helsinki for biomedical research involving human subjects and the rules of Good Clinical Practice.

All approved subjects were evaluated to be in good health during the study based on the physical examination, medical history, and laboratory tests.

The subjects were prohibited from taking any drugs for 1 week before the drug administration until the end of the study.

The exclusion criteria were:

- Be a poor metabolizer – determined by a phenotype assay and confirmed by CYP3A4 genotype, preventing high serum concentration and high AUC of dextromethorphan.
- Any of the clinical examination showed to be out of the normal range.

### **Drug**

The drug used in the study was Walltussin DM syrup, each 5 mL containing 10 mg of dextromethorphan and 100 mg USP guaifenesin (Lot 4JK0029, Expiration Date 07-06) from Wallgreen Co., Deerfield, IL, 60015-4616, USA.

### **Phenotyping**

After fasting overnight, each subject received a 15 mL oral dose of WALTUSSIN DM (30 mg of dextromethorphan) ingested with 200 mL of water. No meal other than a standard meal provided during the whole confinement period was permitted as well as any other liquid but water. The first mealtime was 4 h after the administration. Another meal was taken seven to eight hours after the drug administration.

Urine samples were collected immediately before the drug administration and up to twelve hours afterwards for drug quantification assay and phenotype characterization. Urine samples were acidified with ascorbic acid and kept at a temperature of -80°C waiting for the analytical phase. The DM and its metabolite Dextrorphan (DX) concentrations were quantified.

## **Pharmacokinetics**

Between 5:00 and 9:00 pm of the day before the drug administration, all volunteers were confined. After fasting overnight, each subject received a 15 mL oral dose of WALLTUSSIN DM (30 mg of dextromethorphan) ingested with 200 mL of water.

As in the phenotyping study, no meal other than a standard meal provided during the whole confinement period was permitted as well as any other liquid but water. The time of the meals was also the same, 4 and 8 h after the administration. The consumption of alcohol or xanthine-containing foods and beverages was restricted during the study.

Venous blood samples were collected in EDTA tubes right before the drug administration and at the following times: 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 16.0, 24.0, 36.0, 48.0, 72.0, 120.0 and 168.0 hours after the drug administration.

After 24 hours of the confinement, patients have been allowed to stay in their homes and requested to return to the Clinical Center at 36.0, 48.0, 72.0, 120.0 and 168.0 hours after the drug administration for blood sampling. At the time of the last blood withdrawal, all volunteers were also clinically evaluated.

After collection, blood samples were immediately centrifuged at  $3000\times g$  for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Plasma samples were transferred to polyethylene tubes and immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analytical phase. Care was taken to avoid excessive light exposure.

## **DX and DM Quantification**

The plasma and urine concentrations of DM and DX were measured by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS/MS system) using Dextromethorphan-D3 (DM-D3) and Dextrophan-D4 (DX-D4) as Internal Standards (IS). The quantification method was fully validated to confirm the precision and accuracy.

A 500  $\mu\text{L}$  sample of the plasma was prepared adding 50  $\mu\text{L}$  of a mix solution having a final concentration of 100 ng/mL of IS. Samples were mixed with a vortex mixer for 10 seconds and added 100  $\mu\text{L}$  of bicarbonate buffer solution. Samples were mixed again with vortex mixer and added 4 mL of diethyl ether/hexane (80/20; v/v) for extraction. The upper organic layer was collected into another tube and dried using a dry bath under nitrogen flow. A 150  $\mu\text{L}$  of aqueous acetonitrile solution (50/50 v/v) was added into the dried tube for sample reconstitution. Solution was mixed for 10 seconds and transferred into the vials. A volume of 10  $\mu\text{L}$  was injected into an HPLC-MS-MS (quatro LC, Micromass – UK) system setup with quadrupole pump (G1311A, Agilent-USA), positive electrospray (ES+) using multiple reaction monitoring system (MRM) and in a flow of 1.5 mL/min acetonitrile/water/formic acid (90/9/1; v/v/v) mobile phase solution. The

column used was a chromatographic column C8 5 $\mu$  (150 x 4.6 mm i.d, Prevail, Alltech – USA). Retention times were: 2.0 sec for DX and DX-D4 and 2.0 sec for DM and DM-D3. Monitored ions were: 258.1>133.1 (DX), 262.1>137.1 (DX-D4), 272.2>215.2 (DM) and 275.2>218.3 (DM-D3). Calibration curves tested used the following concentrations: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 and 1000 ng/mL for DM and DX. For those samples with a concentration below the LOQ, a value of zero was recorded. Three serum samples were prepared for a blood sample and the average value was adopted as the data. Inter-assay and intra-assay variability were assured using quality control sampling concentrations (QCs), which were validated for the method in the following concentrations: 15 ng/mL for QCA, 150 ng/mL for QCB and 750 ng/mL for QCC for both DM and DX.

Pharmacokinetic parameters were calculated by noncompartmental analysis of serum concentration-time curve data using WinNonlin Professional Network Edition 3.2 software (acquired from Scientific Consulting - Pharsight Corporation, Palo Alto CA, USA - registered to Clinical Pharmacology ICB-USP). The peak serum concentration ( $C_{max}$ ) and the time to reach  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ) were determined from individual serum concentration-time profiles for dextromethorphan. The area under the serum concentration-time curve of dextromethorphan was calculated by the linear-log trapezoidal method from 0 to 4 hs or to 24 hs or to 48 hs ( $AUC_{0-4h}$  or  $AUC_{0-24h}$  or  $AUC_{0-48h}$ ).

### **Sample Collection for DNA Extraction**

During the phenotyping confinement, a 4 ml sample of peripheral venous blood was collected in PAXgene Blood DNA Tubes (Qiagen AG). Genomic high-molecular-weight DNA was extracted from 1.0 mL of whole blood using the GFX Genomic Blood Purification Kit (Amersham Biosciences). Total genomic DNA was suspended in 100  $\mu$ l of Tris-HCl 10mM pH 8.0 solution and stored at - 20°C.

### **MDR1 Genotype Determination by PCR – DNA sequencing.**

The genotypes of each individual at the MDR1 locus were determined with the use of PCR assays, according to Cascorbi [14]. After amplification of specific DNA fragments using specific primers for each region (Table 1), all mutations could be discriminated following DNA sequence assays.

DNA amplification was performed under similar conditions for all reactions using the specific PCR buffer (Sigma, Brazil), 10 pmol of specified primers (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA), 0.2 mmol/L of deoxyribonucleoside triphosphate (Fermentas), 0.5 units of Platinum Taq DNA Polymerase (Sigma) and 200-300 ng of genomic DNA in a total volume of 25  $\mu$ L. The PCR

conditions consisted of an initial denaturing step for 2 minutes at 94°C followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 30 seconds. The final elongation was performed at 72°C for 7 minutes. The PCR reactions were carried out in an Endurance TC 412 Thermocycler (Duxford, Cambridge, England).

### **Table 1**

DNA fragments were then separated on a 2.0 % agarose gel at 120V to confirm the amplification and DNA integrity. Fragments were visualized after ethidium bromide staining in an ultraviolet transilluminator. As weight markers were used *100 bp Low Ladder* (Sigma).

High quality DNA amplification fragments were sent to the sequencing facility where BigDye Terminator cycle sequencing occurred in a fully automated, bar-coded process on ABI 3700 capillary sequencers (Perkin – Elmer/Applied Biosystems). At polymorphic positions, genotypes were assigned after manual review.

### **Statistical Analysis**

The nonparametric *Wilcoxon Rank Sum Test* was used for statistical analyses, comparing the demographic data and pharmacokinetics parameters between the subjects harboring the wild-type allele (CC) and the subjects harboring the mutant allele (TT) and between the heterozygous subjects (CT) and the mutant homozygous subjects (TT).

The data were also tested for their fit to Hardy-Weinberg equilibrium by calculating expected alleles and genotypes frequencies and comparing them to the observed values using a  $\chi^2$  test for the exon 26 of *MDR1* gene.

## **RESULTS**

In this study, a total of 27 healthy subjects of Brazilian population were genotyped using PCR-DNA sequencing for the major known *MDR1* polymorphism C3435T (exon 26) and were correlated with the dextromethorphan pharmacokinetics.

### **DNA sequencing**

Figure1 shows the identification of the *MDR1* genotype according to PCR-DNA sequencing. In the electropherogram of the subjects harboring the wild-type homozygous, we observed only a cytosine signal in the C3435T site (Figure 1a). In the same way, in the electropherogram of the subjects

harboring the mutant homozygous, we observed only a thymine signal in the C3435T site (Figure 1c). When the subjects were heterozygous, in the same C3435T site, we saw the signal of a cytosine and a signal of a thymine (Figure 1b).

## **Figure 1**

### **Correlation between C3435T *MDR1* genotype and demographic data and pharmacokinetics parameters**

Table 2 lists the demographic data and pharmacokinetics parameters in relation of exon 26. There was no statistical difference of demographic data among the subjects harboring CC, CT or TT. The maximum serum concentration ( $C_{\text{máx}}$ ) and the serum concentration at 1 hour ( $C_{1\text{h}}$ ) and 4 hours ( $C_{4\text{h}}$ ) of dextromethorphan after single oral administration were higher in the subjects with CC than TT. No difference was observed in the  $T_{\text{máx}}$  values among the subjects.  $AUC_{0-4\text{hs}}$  values ( $\pm$  SD) were  $4.38 \pm 4.11$ ,  $3.91 \pm 3.22$  and  $1.18 \pm 0.05$ , respectively, with a significant differences between CC and CT or TT.  $AUC_{0-24\text{hs}}$  values ( $\pm$  SD) were  $10.50 \pm 10.33$ ,  $8.07 \pm 7.41$  and  $2.11 \pm 0.83$ ; and  $AUC_{0-48\text{hs}}$  values ( $\pm$  SD) were  $10.80 \pm 10.94$ ,  $8.20 \pm 7.57$  and  $2.12 \pm 0.83$  respectively for the genotypes CC, CT and TT.

## **Table 2**

This genotyping study also analyzed the allele and genotype frequencies of the SNPs C3435T (exon 26), G2677T/A (exon 21) and C1236T (exon 12) in a Brazilian healthy population. In this study, the allele and genotype were in Hardy-Weinberg equilibrium for the 3 exon of *MDR1* gene.

### ***MDR1* Allelic and Genotyping Distribution in Healthy Subjects for exon 26**

Table 3 shows the *MDR1* genotypes for exon 26: 41 % (11 / 27) were homozygous for wild type (CC), 44 % (12 / 27) were heterozygous (CT) and 15 % (4 / 27) were homozygous for the mutant allele (TT). The C-allele frequency was 63 %.

## **Table 3**

### **Comparisons of C3435T *MDR1* genotype (exon 26) analysis in this study with previous reports**

The comparisons of C3435T *MDR1* genotype (exon 26) analysis in this study with previous reports are presented in table 4, including some populations: African (Ghanaian and Kenyan), Asian (Japanese) and European (Ashkenazi, Caucasians from Western Europe, German, Polish and Spanish).

#### **Table 4**

##### ***MDR1* Allelic and Genotyping Distribution in Healthy Subjects for exon 21**

Table 5 shows the *MDR1* genotypes for exon 21: 56 % (14 / 25) were homozygous for wild type (GG), 40 % (10 / 25) were heterozygous (GT) and 4 % (1 / 25) were homozygous for the mutant allele (TT). The G-allele frequency was 76 %.

#### **Table 5**

##### ***MDR1* Allelic and Genotyping Distribution in Healthy Subjects for exon 12**

Table 6 shows the *MDR1* genotypes for exon 12: 12 % (3 / 26) were homozygous for wild type (CC), 38 % (10 / 26) were heterozygous (CT) and 50 % (13 / 26) were homozygous for the mutant allele (TT). The C-allele frequency was 31 %.

#### **Table 6**

## **DISCUSSION**

Pharmacogenomics is used to study the effects of genetic basis for interindividual differences in drug response. This genetic information can predict and optimized the drug efficacy and / or safety and can minimize the adverse drug reactions and toxicity [27, 28].

Many genotype-phenotype-pharmacokinetics studies are being developed to elucidate the correlation between polymorphisms and clinical outcome. One of the studied genes is the *MDR1* gene. This gene is highly polymorphic and encodes a P-glycoprotein (PGP) that transports a variety of structurally divergent drugs. The polymorphisms localized in the exon 21 (G2677T/A) and in the exon 26 (C3435T) have been indicate as potential determinants of a variability in drug disposition and efficacy [29].

*MDR1* expressed in the intestinal wall is believed to affect absorption of variety drugs, so the correlation between C3435T polymorphism effects and pharmacokinetics after single oral administration has been intensely studied [30].

A reduction in PGP duodenal expression was observed by Hoffmeyer and colleagues [25] in subjects harboring the polymorphism TT for the C3435T allele at exon 26 when digoxin were orally administrate. In this study, a higher plasma digoxin levels was observed in subjects with TT genotype in comparison to subjects with CC or CT genotypes. This finds would predict that the bioavailability rate and extent of a PGP substrate should have difference between the mutant allele (TT) and the wild-type allele (CC): in the subjects with the mutant allele, the biliary or renal secretion of digoxin would be slower, decreasing the elimination rate and raising the concentration

of this drug. Similarly, Sakaeda and colleagues [3] observed that after a single oral administration of digoxin, the plasma concentration of this drug in exon 26 polymorphic subjects (TT) was lower than in heterozygous or wild-type homozygous subjects.

Kim and colleagues [17] studied the association between the polymorphism at exon 26 of *MDR1* gene and the pharmacokinetics of the drug fexofenadine. They conclude that the fexofenadine serum concentration after single oral administration was lower in subjects harboring the mutant allele than heterozygous subjects or the wild-type homozygous subjects.

The *MDR1* 3435TT genotype was associated with low expression of the *MDR1* transcript and PGP in peripheral blood mononuclear cells and with low concentrations in plasma of the drugs nelfinavir and efavirenz, a potential molecular basis for interindividual differences in pace of CD4-cell immune recovery that is seen after initiation of treatment [31]. The authors considered that concentrations of nelfinavir and efavirenz in plasma are low when PGP expression is also low suggesting an indirect effect of the *MDR1* 3435 genotype. They explored two hypotheses to address this paradox: low concentrations of PGP might be compensated for by overexpression of other transporters with affinity for antiretroviral drugs potentially leading to a reduction of plasma drug concentrations; and intestinal CYP3A and PGP act together to limit drug absorption, as demonstrated by Schuetz and colleagues [32].

This finds shows that there are considerable discrepancies in the relation between polymorphism in *MDR1* gene and the plasma concentration after single oral administration of a variability drugs. Part of the reason for the discrepancies in the results could be due to the fact that the C3435T SNP is not the only polymorphism influencing PGP expression levels and hence, the pharmacokinetics and pharmacodynamics of PGP substrates [33].

The correlation between exons 21 and 26 of *MDR1* gene was also analyzed by some research. Johne and colleagues showed that haplotype 2677G–3435T was associated with significantly higher and haplotype 2677G–3435C with lower AUC values after single oral digoxin administration, and haplotype analysis was superior to SNP analysis in predicting *MDR1* phenotype [34]. Kim and colleagues observed that subjects with mutant alleles (2677TT / 3435TT) of *MDR1* gene showed an increase in the oral clearance of amlodipine and lower plasma concentrations compared with those with heterozygote (2677GT / 3435CT) or wild type (2677GG / 3435CC) subjects [35].

*In vitro* experiments have shown that cells expressing the 2677T variant have an enhanced efflux of digoxin when compared to those expressing the 2677G allele. Moreover, individuals carrying the 2677T allele had higher PGP activity *in vivo*, measured by plasma fexofenadine levels, than those with the 2677G allele [17].

In the present study, demographic Data and pharmacokinetics parameters, including maximum serum concentration ( $C_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$ ), serum concentration-time profile and time for maximum serum concentration ( $T_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$ ) were determined following single oral administration of dextromethorphan, a CYP2D6/3A4 substrate.

After exon 26 genotyping, no statistical difference of demographic data among the subjects harboring CC, CT or TT was observed, indicating that the 3 groups (CC, CT or TT) were homogeneous in relation to age, height, weight and body mass index (BMI). However, the value of serum concentration-time profile parameter was lower in subjects harboring the mutant T-allele than in wild-type homozygous (CC) and heterozygous subjects (CT). The serum concentration-time profiles after a single oral administration are affected not only by absorption, mainly in the intestinal wall, but also by distribution across many tissues and renal or biliary excretion. In addition, we found that the  $C_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$  was lower in mutant homozygous subjects.  $C_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$  parameter is also a complicated function of absorption, distribution, metabolism and excretion [30].

It is known that polymorphic subjects extrude a lower amount of drug from the inner compartment to outside the cells although the details about the molecular mechanism of its action were not fully elucidated. However, drug excess inside the cells can quickly be distributed in tissues or excreted through the kidney, decreasing the serum concentration of the drug [30]. This distribution and excretion can explain the lower dextromethorphan serum concentration and the lower serum concentration-time profiles after single oral administration in subjects harboring the variant T-allele (TT) than heterozygous subjects (CT) or the wild-type homozygous subjects (CC) at exon 26 of the *MDR1* gene.

No significant difference was observed in  $T_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$  parameter between the distinct groups wild-type homozygous, heterozygous and polymorphic subjects. This was expected because the differences in the genotype modify the quantity of drug that is absorbed but not change the absorption rates (kinetics of absorption).

In our subjects, the C-allele frequency of 0.63 for the exon 26 was in Hardy-Weinberg equilibrium. The frequency of the C-allele is similar to some population: Japanese (0.61), Polish (0.62) and Ashkenazi (0.65). This C-allele frequency is significantly higher than in Caucasians from Western Europe (0.48), Spanish (0.52) and Indian population (0.38). On the other hand, the C-allele frequency found in our subjects is lower than in some African populations as in the Ghanaian and Kenyan population (0.83). The differences observed in the C-allele distribution can be a result of differences in ethnic origin, environmental and dietary factors [36]. The C-allele frequency observed in our study is an intermediary frequency between African and European population. This

can be explained by the fact that the major part of Brazilian population corresponds to miscegenation between the African and European groups.

In conclusion, the maximum serum concentration and serum concentration-time profile of dextromethorphan after single oral administration were lower in the subjects harboring a mutant T-allele at exon 26 of the *MDR1* gene. There was no effect of gender or age on the dextromethorphan distribution. These findings may provide further explanation for interindividual variation in dextromethorphan disposition although our findings could not explain the exact mechanism(s) by which the highly polymorphic *MDR1* gene paradoxically reduces the dextromethorphan serum levels. This requires further studies.

## REFERENCES

- [1] Callen DF, Baker E, Simmers RN, Seshadri R, Roninson IB. Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Hum Genet* 1987; 77(2): 142-144.
- [2] Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 285-307.
- [3] Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T *et al* MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001; 18(10): 1400-1404.
- [4] Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46(2): 224-235.
- [5] Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human *MDR-1* (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(1): 13-33.
- [6] Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000; 356(9242): 1667-1671.
- [7] Fromm MF. P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38(2): 69-74.
- [8] Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM *et al*. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 101(2): 289-294.
- [9] Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK *et al*. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(5): 2031-2035.

- [10] Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 361–398.
- [11] Funck-Brentano C, Boelle PY, Verstuyft C, Bornert C, Becquemont L, Poirier JM. Measurement of CYP2D6 and CYP3A4 activity in vivo with dextromethorphan: sources of variability and predictors of adverse effects in 419 healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61(11):821-9.
- [12] Burt RK, Thorgeirsson SS. Coinduction of MDR-1 multidrug-resistance and cytochrome P-450 genes in rat liver by xenobiotics. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80(17): 1383-1386.
- [13] Wachter VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 1995; 13(3): 129-134.
- [14] Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M *et al*. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter *MDR-1* gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(3): 169-174.
- [15] Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Ann Rev Med* 2006; 57: 11.1–11.19.
- [16] Chowbay B, Cumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003; 13(2): 89-95.
- [17] Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI *et al*. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70(2): 189-199.
- [18] Tanabe M, Leiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y *et al*. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297(3):1137-1143.
- [19] Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(10): 693–704.
- [20] Jamroziak K, Balcerczak E, Mlynarski W, Mirowski M, Robak T. Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of Polish population. *Pol J Pharmacol* 2002; 54(5): 495–500.

- [21] Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS *et al.* Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics* 2000; 12(6): 437-450.
- [22] Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A *et al.* *MDR1* Pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001;11(3): 217–221.
- [23] Balram C, Sharma A, Sivathasan C, Lee EJ. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56(1): 78–83.
- [24] Ostrovsky O, Nagler A, Korostishevsky M, Gazit E, Galski H. Genotype and allele frequencies of C3435T polymorphism of the MDR1 gene in various Jewish populations of Israel. *Ther Drug Monit* 2004; 26(6): 679–684.
- [25] Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrugresistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(7): 3473–3478.
- [26] Bernal ML, Sinues B, Fanlo A, Mayayo E. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population. *Ther Drug Monit* 2003; 25(1): 107–111.
- [27] Woojin Lee A, Lockhart AC, Kim RB e Rothenberg ML. Cancer Pharmacogenomics: Powerful Tools in Cancer Chemotherapy and Drug Development. *Oncologist* 2005; 10(2): 104-111.
- [28] Rogers JF, Nafziger NA, Bertino Jr JS. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med* 2002; 113(9): 746-750.
- [29] Rodrigues AC, Rebecchi IM, Bertolami MC, Faludi AA, Hirata MH e Hirata RD. High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with *MDR-1* haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(9): 1389-1397.
- [30] Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20(6): 391-414.
- [31] Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP *et al.* Swiss HIV Cohort Study. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002; 359(9300): 30-36.
- [32] Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV, Schuetz JD. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(9): 4001–4005.

[33] Chowbay B, Li H, David M, Cheung YB, Lee EJ. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 60(2):159-171.

[34] Johne A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C *et al.* Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72(5):584–594.

[35] Kim KA, Park PW, Park JY. Effect of ABCB1 (MDR1) haplotypes derived from G2677T/C3435T on the pharmacokinetics of amlodipine in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 63(1):53-58.

[36] Li Y, Wang Y, Sun J, Li Y, Yang L. Distribution of the functional MDR1 C3435T polymorphism in the Han population of China. *Swiss Med Wkly* 2006; 136(23-24): 377-82.

## TABLES

**Table 1:** Primer sequences user for amplification of PCR fragments.

SNP	Primer name	Primer sequence
Exon 12 (C1236T)	MDR-15	5'-TAT CCT GTG TCT GTG AAT TGC C
	MDR-16	5'-CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG
Exon 21 (G2677A)	MDR-9	5'-TGC AGG CTA TAGGTT CCA GG
	MDR-10	5'-GTT TGA CTC ACC TTC CCA G
Exon 21 (G2677T)	MDR-9	5'-TGC AGG CTA TAGGTT CCA GG
	MDR-10a	5'-TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G
Exon 26 (C3435T)	MDR-11	5'-TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG
	MDR-12	5'-AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC

\*bp – base pair

**Table 2:** Demographic Data and Pharmacokinetic Parameters after Single Oral Administration of Dextromethorphan in Healthy Subjects

	Genotype <i>MDR1</i> – Exon 26			
	CC (N = 11)	CT (N = 12)	TT (N = 4)	
<b>Age (years)</b>	29.27 ± 8.01	29.00 ± 8.79	37.00 ± 10.20	(a)
	27.00	26.50	39.00	(b)
<b>Height (m)</b>	1.65 ± 0.09	1.70 ± 0.07	1.66 ± 0.06	(a)
	1.64	1.70	1.68	(b)
<b>Weight (kg)</b>	65.33 ± 10.82	67.26 ± 11.43	67.24 ± 8.31	(a)
	63.00	66.50	68.50	(b)
<b>BMI (kg / m<sup>2</sup>)</b>	24.35 ± 1.81	23.30 ± 2.19	24.12 ± 1.91	(a)
	24.20	22.70	24.60	(b)
<b>C<sub>1h</sub> (ng/ml)</b>	1.24 ± 1.30	1.07 ± 0.86	0.33 ± 0.15 ◆ ○	(a)
	0.95	0.80	0.26	(b)
<b>C<sub>4h</sub> (ng/ml)</b>	1.16 ± 0.70	0.77 ± 0.60	0.29 ± 0.02 ● ▲	(a)
	0.97	0.60	0.29	(b)
<b>C<sub>máx</sub> (ng/ml)</b>	1.74 ± 1.52	1.52 ± 1.22	0.45 ± 0.05 ● ◇	(a)
	1.3 6	1.18	0.45	(b)
<b>T<sub>máx</sub> (h)</b>	2.00 ± 0.89	1.67 ± 0.49	1.67 ± 0.58	(a)
	1.50	1.75	2.00	(b)
<b>AUC<sub>0-4h</sub> (ng h/ml)</b>	4.49 ± 3.91	3.91 ± 3.22	1.18 ± 0.05 ◆ ◇	(a)
	3.74	2.86	1.17	(b)
<b>AUC<sub>0-24h</sub> (ng h/ml)</b>	11.07 ± 9.98	8.07 ± 7.41	2.11 ± 0.83 ● ▲	(a)
	8.31	6.01	1.86	(b)
<b>AUC<sub>0-48h</sub> (ng h/ml)</b>	11.33 ± 10.53	8.20 ± 7.57	2.12 ± 0.83 ● ▲	(a)
	8.31	6.02	1.86	(b)

The values are (a) the mean ± standard deviation and (b) the median.

BMI means body mass index.

C<sub>1h</sub> and C<sub>4h</sub> mean the serum concentration of dextromethorphan at 1 hour and 4 hours.

C<sub>máx</sub> means the maximum serum concentration of dextromethorphan.

T<sub>máx</sub> means the time to maximum serum concentration.

AUC<sub>0-4h</sub>, AUC<sub>0-24h</sub> and AUC<sub>0-48h</sub> mean the area under the serum concentration-time curve of dextromethorphan 0 to 4 hs, to 24 hs or to 48 hs.

Statistics:

- 0.05 < p < 0.10 compared with CC
- ◆ 0.10 < p < 0.20 compared with CC
- ▲ 0.20 < p < 0.50 compared with CC
- p < 0.05 compared with CT
- ◇ 0.10 < p < 0.20 compared with CT
- △ 0.20 < p < 0.50 compared with CT

**Table 3:** Allele and genotype frequencies of a polymorphism of C3435T *MDR1* gene.

	N	Allele Frequency		Genotype Frequency		
		C	T	CC	CT	TT
<b>Exon 26</b>	27	0.63	0.37	0.41	0.44	0.15

**Table 4:** Allele (C and T) and genotype (CC, CT and TT) frequencies of a polymorphism of C3435T *MDR1* between the data in this study and the other published data

	N	Allele Frequency		Genotype Frequency			Ref	
		C	T	CC	CT	TT		
		<b>Brazilian</b>	27	0.63	0.37	0.41		0.44
<b>African</b>	Ghanaian	206	0.83	0.17	0.67	0.34	0.00	[22]
	Kenyan	80	0.83	0.17	0.70	0.26	0.04	[22]
<b>Asian</b>	Indian	264	0.38	0.62	0.25	0.46	0.28	[23]
	Japanese	114	0.61	0.39	0.35	0.53	0.12	[3]
<b>European</b>	Ashkenazi	100	0.65	0.35	0.42	0.46	0.12	[24]
	Caucasians (UK)	190	0.48	0.42	0.24	0.48	0.28	[25]
	German	188	0.52	0.48	0.27	0.48	0.24	[22]
	Polish	122	0.62	0.38	0.42	0.41	0.17	[20]
	Spanish	408	0.48	0.26	0.26	0.52	0.22	[26]

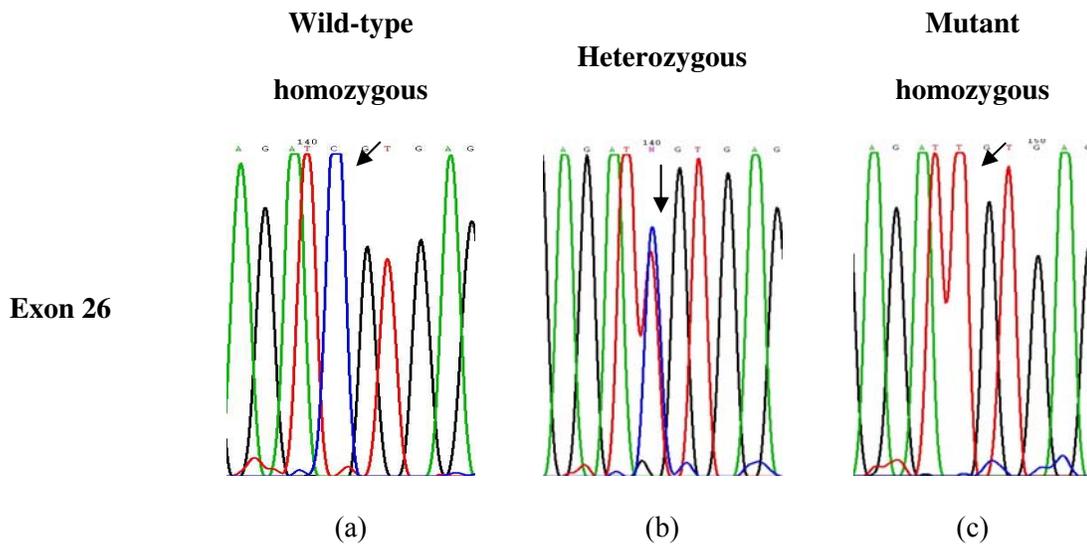
**Table 5:** Allele and genotype frequencies of a polymorphism G267T/A of *MDR1* gene.

	N	Allele Frequency		Genotype Frequency		
		G	T	GG	GT	TT
<b>Exon 21</b>	25	0.76	0.24	0.56	0.40	0.04

**Table 6:** Allele and genotype frequencies of a polymorphism C1236T of *MDR1* gene.

	N	Allele Frequency		Genotype Frequency		
		C	T	CC	CT	TT
<b>Exon 12</b>	26	0.31	0.69	0.12	0.38	0.50

**FIGURES**



**Figure 1:** Direct sequencing results for the genotypes (a) wild-type homozygous (CC), (b) heterozygous (CT) and (c) mutant homozygous (TT). The arrow indicates the C3435T site.

## ANEXO 6 – CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho amostral ( $n$ ) é calculado através da seguinte fórmula:  $n = \frac{(Z)^2 \times p \times q}{E^2}$ , sendo

$Z$  a variável reduzida, cujo valor adotado foi de 1,96 para um grau de liberdade 1 e um nível de significância de 0,05;  $p$  a probabilidade de encontrar o fenômeno estudado;  $q$  a probabilidade de não encontrar o fenômeno estudado ( $q = 1 - p$ ); e  $E$  o erro tolerado, com probabilidade de 95 % ( $E = q \times 0,30$ , onde 0,30 corresponde a precisão da estimativa). O valor  $n$  determina a quantidade mínima de elementos necessários para compor uma amostragem de modo a obter resultados expressivos em estudos com enfoque genético.

Nesse estudo, a probabilidade  $p$  correspondeu à frequência observada para o alelo selvagem C ( $f(C)$ ), enquanto que a probabilidade  $q$  correspondeu à frequência observada para o alelo variante T ( $f(T)$ ). Para o cálculo dessas duas variáveis, utilizou-se a seguinte tabela:

Genótipos	Número Observado	Frequência
CC	11	0,41
CT	12	0,44
TT	4	0,15
Total	27	1

sendo  $p = f(C) = 0,41 + \frac{1}{2}(0,44) = 0,63$  e  $q = f(T) = 1 - f(C) = 1 - 0,63 = 0,37$ .

O valor obtido para o tamanho amostral ( $n$ ) da população em estudo foi de 73 voluntários. Como o objetivo deste trabalho foi correlacionar os polimorfismos do exon 26 do gene *MDR1* e a farmacocinética da droga *dextromethorphan*, selecionamos 32 voluntários, seguindo as recomendações da legislação atualmente vigente da ANVISA para estudos de farmacocinética e de bioequivalência que estabelece entre 26 e 32 voluntários.