

Filipa Alexandra Ponte Fonseca

Farmacogenómica

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014

Filipa Alexandra Ponte Fonseca

Farmacogenómica

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014

© 2014
Filipa Alexandra Ponte Fonseca
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS

Filipa Alexandra Ponte Fonseca

Farmacogenómica

Nome do Aluno

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação do Prof. Doutor José Manuel Cabeda.

Resumo

Diferenças inter-individuais na eficácia e toxicidade da medicação são comuns entre os pacientes. Estima-se que a genética possa explicar entre 20 a 95 por cento da variabilidade na resposta aos fármacos. Porém associados à genética, existem fatores tais como, a idade, sexo, doenças secundárias e outros fatores ambientais que afetam a absorção, distribuição, metabolização e excreção dos fármacos podendo levar, habitualmente, à ocorrência de reações adversas. Estas reações são responsáveis por milhões de hospitalizações e milhares de mortes por ano apenas nos Estados Unidos.

Identificação e caracterização de um grande número de polimorfismos genéticos (biomarcadores) nas enzimas metabolizadoras e transportadoras dos fármacos pode fornecer um conhecimento aprofundado sobre os mecanismos de diferenças inter-individuais na resposta à droga. O uso de novas tecnologias moleculares, nomeadamente de sequenciação do genoma, e de diagnóstico para avaliar o perfil genético e os biomarcadores das doenças abrem novos caminhos para permitir a cada doente o esquema de tratamento que lhe pode trazer os melhores resultados. Este esquema de tratamento, além de diminuir o número de reações adversas evita a exposição do paciente a um longo período de terapia baseado na tentativa e erro.

Para os doentes, a medicina personalizada detém a promessa de terapêuticas mais eficazes e com menos efeitos secundários, podendo assim, ser poupados à perspetiva de um tratamento com efeitos adversos significativos e pouco ou nenhum efeito terapêutico

Farmacogenética e farmacogenómica são duas áreas que emergiram para investigar a variabilidade individual na resposta aos fármacos. A indústria farmacêutica utiliza, cada vez mais, técnicas relacionadas com a farmacogenómica e com a farmacogenética e a informação que delas resulta para o processo de desenvolvimento de novos fármacos, promovendo a prescrição de um medicamento apropriado na dose certa para cada paciente.

Palavras-chave: Farmacogenómica, Farmacogenética, Variabilidade Individual, sequenciação do DNA, medicina personalizada

Abstract

Inter-individual differences in the efficacy and toxicity of medication are common among patients. It is estimated that genetic factors can account for 20 to 95 percent of variability in drug responses. However associated with genetic, there are factors such as age, sex, secondary diseases and other environmental factors that affect the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs and may lead to adverse reactions. These reactions are responsible for millions of hospitalizations and thousands of deaths each year in the United States.

Identification and characterization of a large number of genetic polymorphisms (biomarkers) in metabolizing enzymes and transporters of drugs can provide a thorough understanding of the mechanisms of inter-individual differences in drug response. The use of new molecular technologies, in particular genome sequencing, diagnosis for assessing the genetic profile and assessing biomarkers of disease open new paths to individualize each patient's treatment plan, optimizing it's results. This treatment schedule, while decreasing the number of adverse reactions avoids exposing the patient to a long-term therapy based on trial and error. For patients, personalized medicine holds the promise of more effective therapies with fewer side effects, and may thus spare the prospect of a treatment with significant adverse effects and little or no therapeutic effect

Pharmacogenetics and pharmacogenomics are two areas that have emerged to investigate the individual variability in response to drugs. The pharmaceutical industry uses increasingly techniques related to pharmacogenetics and pharmacogenomics and the information that follows them to the process of drug development, promoting the prescription of appropriate medication in the right dose for each patient

Keywords: Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Individual variability, DNA sequencing, personalized medicine

Dedicatória

À Deus,

“Tudo posso Naquele que me
fortalcece” Fp 4:13

Agradecimentos

Ao concluir esta etapa tão importante na minha vida não posso deixar de agradecer às pessoas que contribuíram para o meu percurso ao longo destes 5 anos de curso culminado com a realização desta dissertação de mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas.

À Universidade Fernando Pessoa agradeço a qualidade de ensino que me concedeu, contribuindo de forma excelente para a minha formação.

Ao Professor Doutor José Manuel Cabeda por toda a ajuda prestada ao longo da realização deste projeto, dispensado sempre os melhores e mais cuidados conhecimentos. Além disso a sua orientação, opinião, críticas construtivas foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

À minha amiga Daniela Almeida por me ter acompanhado nas maiores aventuras e desaventuras no decorrer destes longos 5 anos. Por estar sempre ao meu lado, por juntas conseguirmos vencer cada etapa sem nunca desistir. Obrigada pelo companheirismo e amizade que me deste. Também a amigas como a Fernanda Lavandeira e Joana Marques que desde o primeiro dia fizeram parte deste percurso marcando-o de forma única.

Ao meu namorado, por todo o apoio ao longo desta fase, as palavras de incentivo constantes foram sem dúvida um fator essencial para me ajudar a terminar esta etapa. Obrigada por estares ao meu lado e por toda a compreensão ao longo desta fase.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais e à minha avó, por acreditarem sempre em mim e por todos os ensinamentos de vida. Espero que ao longo do tempo possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que constantemente, me oferecem.

Por fim, agradeço a Deus por me ter dado força inesgotável para conseguir terminar esta etapa tão importante.

ÍNDICE GERAL

SUMÁRIO

ABSTRACT

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

I- INTRODUÇÃO	1
II- VARIABILIDADE GENÉTICA	3
1- Mutações e Polimorfismos	3
2- Lições do programa de sequenciação do genoma humano	8
3- Tecnologias de sequenciação de genomas	10
<i>i- Primeira Geração.....</i>	<i>10</i>
<i>ii- Segunda Geração</i>	<i>13</i>
<i>iii- Terceira Geração</i>	<i>20</i>
III- RESPOSTA AOS FÁRMACOS.....	26
1- Variabilidade humana na resposta aos fármacos.....	26
<i>i- Problemas de segurança e eficácia.....</i>	<i>26</i>
<i>ii- Variações na metabolização.....</i>	<i>27</i>
2- A genómica e a medicina personalizada: janela de oportunidades	33
<i>i- Vantagens para a indústria</i>	<i>33</i>
<i>ii- Vantagens para o doente</i>	<i>37</i>
<i>iii- Desafios a resolver.....</i>	<i>39</i>
<i>iv- Problemas éticos</i>	<i>40</i>
IV- FARMACOGENÓMICA: EXEMPLOS.....	42
1- Casos de sucesso	42
<i>i- Terapia oncológica.....</i>	<i>42</i>
<i>ii- Doenças Infeciosas.....</i>	<i>47</i>
<i>iii- Vírus da Imunodeficiência Humana.....</i>	<i>48</i>
<i>iv- Farmacologia e as enzimas do metabolismo.....</i>	<i>49</i>
2- Casos em desenvolvimento	50
V- CONCLUSÃO	52
VI- BIBLIOGRAFIA	54

Índice de Figuras

Figura 1 – Efeito do gene sobre o fenótipo	4
Figura 2 – Papel do ncRNA.....	5
Figura 3 – Conceito de Epigénética.....	6
Figura 4 – Estrutura do DNA	9
Figura 5 – Esquema da técnica de Roche 454/FLX Pirosequenciação	14
Figura 6 – Esquema da técnica de sequenciação do Illumina	16
Figura 7 – Esquema da técnica da Life Technologies ion proton	19
Figura 8 – Esquema da técnica Tsms	22
Figura 9 – Esquema da técnica da Pacific biosciences SMRT.....	24
Figura 10 – Classificação do perfil metabólico.....	30
Figura 11 – Princípio do cálculo da do ajustamento da dose	31
Figura 12 – Papel da Farmacogenómica	34
Figura 13 – Número de antibióticos aprovados pela FDA	35
Figura 14 – Biomarcadores e o processo de diagnóstico	38
Figura 15 – Cromossoma de Philadelphia	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 – 21

Tabela 2 – 28

Lista de Abreviaturas

A- Adenina

ABI- “Applied biosystemns”

BRCA1 – “Breast Cancer 1”

C- Citosina

CYP450 – Citocromo P450

ddNTP – di-desoxirribonucleótido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleotidos

ERCC1- “Excision repair cross complementing rodent repair deficiency, complementation group”

EGFR- recetor do fator de crescimento epidermal

FDA- “Food and Drug Administration”

FET – Transístores de efeito de campo

G- Guanina

GA- “Genome analyzer”

HER2 – Recetores tipo 2 do crescimento epidérmico humano

mRNA- RNA mensageiro

ncRNA- RNA não codificante

NHGRI – “National Human Genome Research Institute”

NIH – “National Institutes of Health”

PCR – “Polymerase chain reaction”

PGM – “Personal Genome Machine”

PPi - pirofosfato

RAM- Reações Adversas Medicamentosas

RNA- Ácido ribonucleico

RRM1- “Ribonucleotide reductase M1 polypeptide”

SNP – “Single nucleotide polymorphisms”

Solid- “Sequencing by Oligo Ligation and Detection”

T- Timina

TPMT- tiopurina-metiltransferase

tSMS – “true single molecule sequencing”

SMRT – “Single molecule real time”

VHI- Vírus da Imunodeficiência Humana

VKOR - Vitamina K Epóxido Redutase

VKORC1 - Sub-unidade 1 do Complexo Vitamina K Epóxido Redutase

ZMW – “Zero Mode Waveguide”

I. INTRODUÇÃO

É bem conhecido que pacientes diferentes apresentam diferentes respostas para a mesma medicação. Estas diferenças individuais podem fazer com que as doses padronizadas, ou seja, as doses terapêuticamente recomendadas, possam levar a concentrações sanguíneas inesperadamente elevadas ou baixas (conforme o perfil genético). Por sua vez, as diferentes concentrações podem conduzir à alteração do efeito terapêutico, podendo causar reações adversas ou diminuir a efetividade terapêutica (Evans, *et al.*, 2003). A variabilidade individual em termos de eficácia e segurança dos fármacos tem sido estudada desde o início da medicina humana, embora essa variação receba mais atenção agora do que nunca (Qiang & Lu, 2011).

Após a apresentação do modelo do DNA em 1953 por Watson-Crick, foi possível o esclarecimento de como o DNA é transcrito e traduzido em proteínas e, deste modo, a criação de protocolos de clonagem, sequenciação e hibridação do DNA (Alberts *et al.*, 2002). Com o rápido avanço tecnológico surgiram métodos de sequenciação do DNA o que levou ao aparecimento do Projeto de Genoma Humano, tendo sido concluída a primeira versão do genoma humano no ano de 2000. Foi possível então alcançar um marco fundamental na medicina. Era um marco importante para o desenvolvimento de terapêuticas bem mais eficazes e com menos efeitos secundários, uma vez que, muitas doenças têm a sua origem no genótipo humano. O genótipo pode controlar processos do metabolismo, no transporte ou no mecanismo de ação dos fármacos inerentes à sua administração alterando a sua eficácia, segurança e toxicidade. É então necessário que os genes humanos envolvidos nesta variabilidade sejam identificados, que os seus mecanismos de ação sejam elucidados e a sua importância clínica definida (Evans & Johnson, 2001).

Assim, para além dos aspetos pessoais de cada indivíduo (a idade, o género, a história individual da doença ou fatores ambientais) que são cuidadosamente considerados antes da escolha da terapêutica, o perfil genético dos doentes pode proporcionar informação útil para o planeamento do tratamento (Evans & Johnson, 2001). O uso de novas tecnologias moleculares e de diagnóstico para avaliar o perfil genético e os biomarcadores das doenças abrem novos caminhos para permitir a cada doente o esquema de tratamento que lhe pode trazer os melhores resultados.

Este enfoque no perfil genético das doenças é um fator chave para uma nova abordagem em ciência e cuidados médicos que se chama medicina personalizada, uma vez que, se estima que a genética possa explicar entre 20 a 95 por cento das diferentes respostas aos fármacos (Metzger *et al.*, 2006).

II- Variabilidade Genética

2- Mutações e Polimorfismos

O gene é considerado a unidade fundamental da informação genética, responsável por uma certa característica do fenótipo, como por exemplo a cor dos olhos e da pele de um indivíduo (Portin, 2002). Contudo, com o evoluir da ciência, foi necessário uma definição de gene mais específica, a fim de explicar de forma mais precisa a maneira de um gene afetar o fenótipo. Fenótipo pode então ser definido como sendo o conjunto das ações individuais de cada gene influenciadas por certos fatores, como as hormonas, efeitos ambientais e as interações celulares (Figura 1).

A variabilidade genética é um dos fatores responsável pela seleção natural e continuidade da espécie humana e, na sua base estão os processos envolvidos na geração de mutações e de polimorfismos que podem permanecer no genoma durante um tempo indeterminado e passar de geração em geração. Caso seja uma alteração vantajosa, eventualmente irá persistir por muito mais tempo beneficiando assim a espécie. Este processo ocorre a diferentes níveis e partes do genoma. Existem cerca de 6×10^9 nucleótidos no genoma humano diplóide o que leva a um índice de 200 novas mutações/polimorfismos por geração. Por este motivo existe uma variabilidade genética maior em populações também maiores (Wright, 2001).

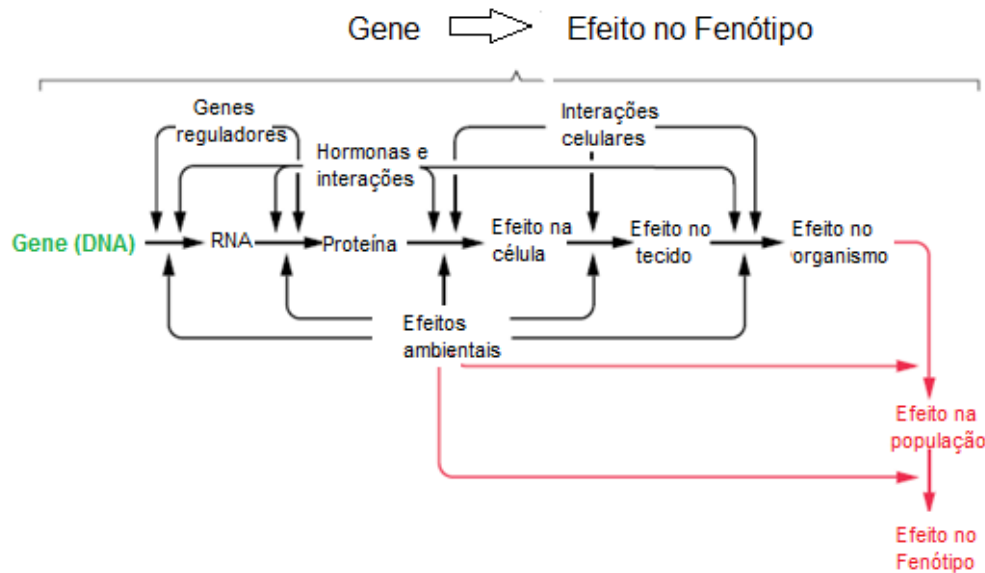


Figura 1: O mecanismo pelo qual um gene exerce um certo efeito sobre o fenótipo é frequentemente bastante complexo incluindo diversos fatores tais como os genes reguladores, hormonas, interações entre as células. Estes fatores influenciam a transcrição de DNA para RNA, a tradução de RNA para proteínas e os seus efeitos nas células, tecidos e organismo (Adaptado de Snustad *et al.*,1997)

No entanto, os genes representam apenas uma fração do genoma humano, assim, antigamente era considerado que a maioria das mutações teria um efeito nulo na seleção natural por 3 razões. Em primeiro lugar como 97% do genoma humano não codifica nenhum produto funcional, não era considerado possível que afetasse a função genética (ex:intrões). Segundo, se uma mutação ocorrer em 1,5% do genoma que codifica um produto funcional é provável que resulte na troca de um nucleótido “sinónimo” que não mudará o aminoácido formado, uma vez que vários codões codificam o mesmo aminoácido. Por fim variações que afetam regiões codificantes e resultam na alteração do aminoácido, podem não ter efeitos significativos na genética do indivíduo (Wright,2001). No entanto nos dias que correm esta explicação não é aceitável, uma vez que, já se sabe que parte do genoma pode dar origem a espécies de RNA não codificantes (ncRNA) mas que demonstram ser essenciais para a regulação da expressão dos genes. Deste modo diversos fatores são afetados, como por exemplo, as modificações das histonas, tais como a acetilação, metilação ou modificação estrutura

da cromatina, podendo alterar de eucromatina para heterocromatina ou vice-versa. Estas alterações podem alterar o processo de transcrição do DNA (Figura 2). A estas sequências não codificantes são associadas diversas doenças de um genótipo considerado normal, provando mais uma vez, que não são apenas as regiões codificantes responsáveis por um determinado fenótipo. Exemplos destes mecanismos são os diversos cancros que estão associados às modificações das histonas (Niu & Jiang, 2012; Costa, 2007).

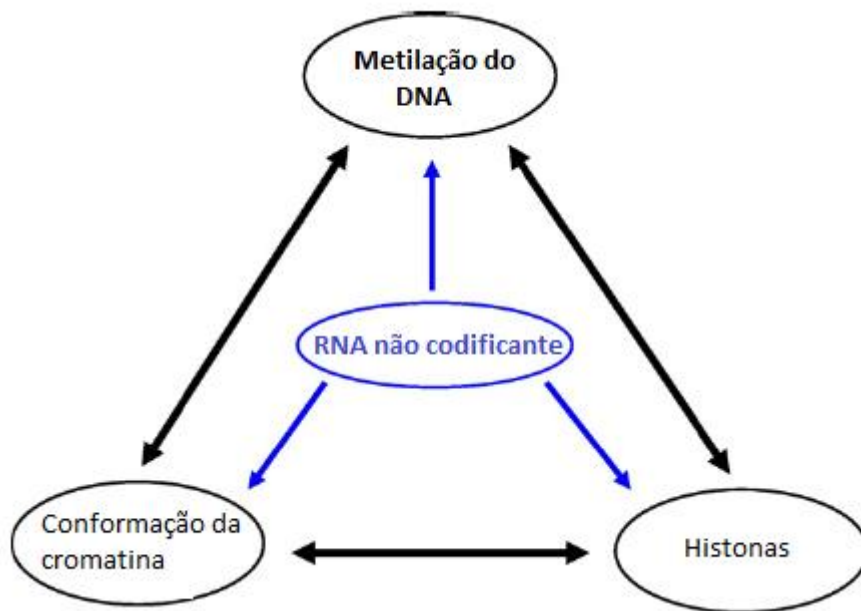


Figura 2: O ncRNA é essencial para alguns mecanismos como é o caso da metilação do DNA, a conformação da cromatina (eucromatina e heterocromatina) e para as modificações das histonas (metiltransferases e acetiltransferases) (Adaptado de Costa, 2007).

Surgiu assim o termo Epigenética que se define como sendo as modificações que ocorrem no material genético que não alteram a sequência de nucleótido, mas que no entanto causam modificações na estrutura da molécula de DNA (Figura 3).

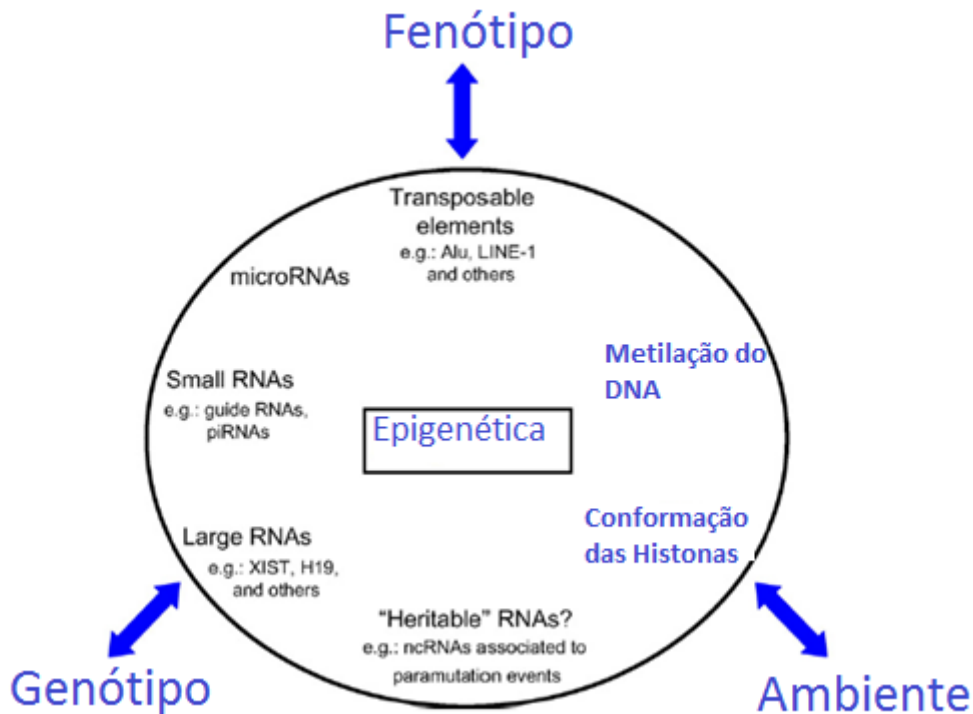


Figura 3: A Epigenética tem um papel central nos mecanismos que afetam o Fenótipo devido a certas modificações como é o caso da conformação das histonas e da metilação do DNA. A epigenética juntamente com as mudanças no ambiente geram diferentes fenótipos mesmo que o genótipo seja o mesmo (Adaptado de Costa, 2007).

Mutações e polimorfismos são ambos termos que designam alterações na sequência de DNA, no entanto ambos se referem a alterações diferentes. Uma mutação é definida como sendo uma alteração da sequência do DNA que não surge frequentemente na população. Estas situações levam a uma prevalência de um alelo, considerado normal, e a um alelo raro e anormal provocado pela mutação. Por outro lado, um polimorfismo é uma variação na sequência do DNA mais comum entre a população, uma vez que, para ser considerado polimorfismo, o alelo tem que se expressar em 1% ou mais na população. (Wright, 2001; Snustad *et al.*, 1997).

Esta diferença quantitativa entre mutações e polimorfismos justifica-se pelas suas consequências funcionais. Assim variações que, direta ou indiretamente, possam causar patologias são geralmente raras na população, classificadas assim, como mutações. No entanto, nem todas as mutações causam doenças, podendo ter um efeito neutro ou mesmo benéfico. Como já dito, anteriormente, caso seja uma alteração vantajosa ou que

não apresente consequências patológicas, esta irá persistir ao longo do tempo aumentando a sua ocorrência. Posto isto, todos os polimorfismos começam por ser uma mutação. Exemplos destes polimorfismos são aqueles que apenas irão influenciar características como a altura e a cor do cabelo, em vez de características de importância médica (Twyman, 2003).

Polimorfismos podem ser encontrados fora dos genes e dentro dos genes influenciando assim algumas características, como por exemplo, a resposta aos fármacos, pois tanto as regiões codificantes como não-codificantes, como já afirmado acima, afetam o fenótipo do indivíduo (Snustad *et al.*, 1997; Costa, 2007).

Existem vários tipos de mutações e polimorfismos, porém o tipo mais comum (90%) é a troca de um único nucleótido, conhecido por “single nucleotide polymorphism” ou SNP. Neste tipo de variação pode existir a troca de uma purina por outra purina (ex: adenina por guanina), troca esta denominada de transição, ou então pode existir uma transversão que é a troca de uma base purina por uma pirimidina (ex: adenina por citosina) ou vice-versa. As transições são mais comuns que as transversões pois as enzimas de reparação do DNA reconhecem mais facilmente um erro de replicação devido a transversões. Este tipo de mutações pode ainda ser chamado de mutações pontuais. Existem cerca de 3 a 10 milhões de SNPs no genoma humano com frequência superior a 1%, sendo assim consideradas de polimorfismos (Wright, 2001; Schleif, 1993).

Os SNPs, de forma mais usual, podem ocorrer em regiões não-codificantes, porém cerca de 10 000-50 000 SNPs ocorrem em regiões codificantes. Este tipo de polimorfismo pode conduzir à alteração da proteína formada levando ao aparecimento de diversas doenças. Exemplo disto é a troca de um codão por um codão stop que leva à terminação prematura do processo de tradução, podendo dar origem, por exemplo, a uma talassemia beta, ou seja, a uma anemia hemolítica grave. Podemos ainda ter alterações sinónimas, sendo que estas apresentam uma frequência maior, levando a uma alteração neutra, pois há troca de um codão que codifica o mesmo aminoácido, não havendo alteração da proteína formada (Wright, 2001).

Inserções e deleções são outros tipos de mutações em que um nucleotídeo, habitualmente durante a replicação do DNA, é inserido ou eliminado na sequência de bases. Quando isto ocorre induz uma alteração da leitura da sequência de DNA, modificando o processo de síntese proteica, pois uma vez alterados os codões (conjunto de 3 nucleotídeos) o aminoácido resultante não será o mesmo. Caso seja inserido ou eliminado um codão inteiro, a sequência de aminoácidos não será toda alterada, apenas irá existir um aminoácido a menos ou a mais na proteína resultante.

Por fim existem as inversões que são pouco comuns e embora antigamente se afirmasse que tinham pouco efeito, hoje em dia, e retomando a noção de regiões não codificantes, sabe-se que ao alterar a ordem dos nucleotídeos e a formação da cromatina altera o processo de transcrição podendo levar ao aparecimento de diversas doenças, nomeadamente doenças oncológicas (Schleif, 1993; Zuckerkandl & Cavalli, 2006).

2- Lições do programa de sequenciação do genoma humano

Cada molécula de DNA é constituída por 2 cadeias anti-paralelas em dupla hélice formadas por unidades fundamentais designadas de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é composto por um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma das 4 bases (A, T, G, C). Esta estrutura em dupla hélice forma-se pela ligação fosfodiéster entre o açúcar de um nucleotídeo e o fosfato de outro. As duas cadeias mantêm-se unidas por pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. (Figura 4). Em cada célula, mais precisamente no interior do núcleo, encontramos DNA de um modo condensado em forma de cromossomas. É de salientar que existe também DNA em organelos especializados como as mitocôndrias e, no caso das plantas, nos cloroplastos. Tanto as mitocôndrias como os cloroplastos possuem DNA bastante diferente do que existe no núcleo celular com um código genético diferente do da célula hospedeira eucariótica e semelhantes ao das bactérias (Demick, 2006)

Associadas ao DNA existem proteínas, como as histonas, que compactam e organizam o DNA e regulam a sua ação influenciando diversos processos como é o caso da transcrição (Alberts *et al.*,2002).

Cerca de 15 anos depois da descoberta da molécula de DNA de dupla hélice por Watson e Crick em 1953 surgiram as primeiras tentativas de sequenciação do DNA (Hutchison, 2007). Sequenciar o genoma significa saber a ordem exata em que se encontram os nucleotídeos num determinado segmento de DNA (Alberts *et al.*,2002; NHGRI (1)).

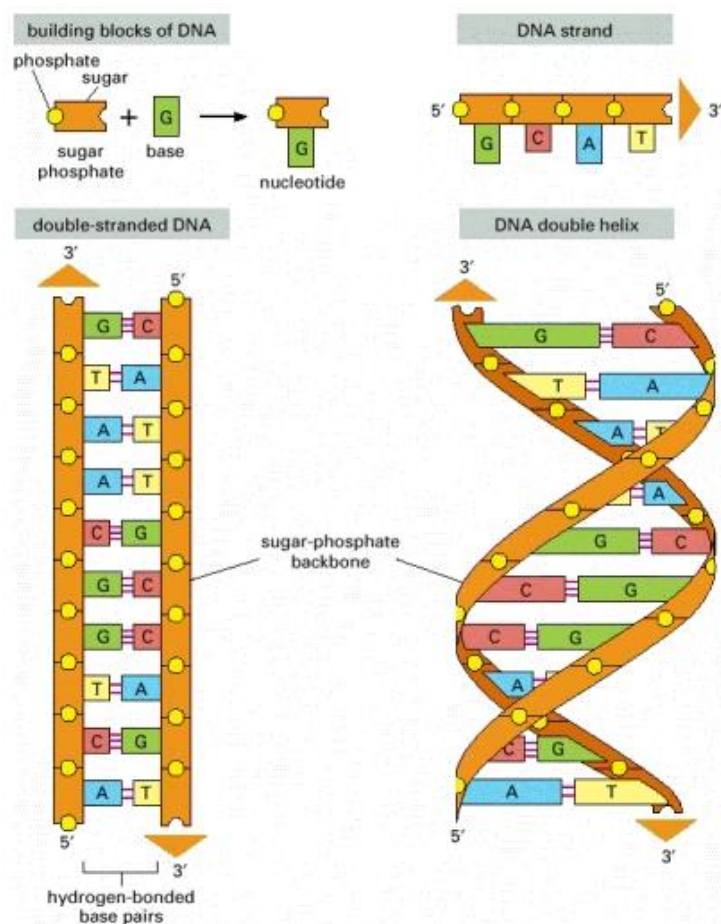


Figura 4: A molécula de DNA é constituída por diferentes nucleotídeos constituídos por uma das quatro tipos de bases ligados à cadeia por um açúcar e um fosfato. Cada molécula é composta por 2 cadeias antiparalelas em forma de hélice que se mantêm unidas por pontes de hidrogénio entre os pares de bases (A-T; G-C) (Alberts *et al.*,2002).

A sequenciação do genoma humano é importante, uma vez que permite conhecer a informação presente num segmento de DNA. Assim, essa informação dá-nos, por exemplo, a possibilidade de saber se esse segmento possui ou não determinados genes responsáveis por certas doenças, mutações ou características. Este conhecimento é uma das primeiras vantagens da sequenciação do genoma (Griffiths, 2013; NHGRI (2)). Assim, a sequenciação promove novas descobertas em diferentes áreas como a genética, a biologia, ciência forense entre outras. Porém surgem também contratempos nomeadamente em questões éticas de segurança e saúde pública (França *et al.*, 2002).

Os primeiros métodos de sequenciação de ácidos nucleicos surgiram na década de 70 por Frederick Sanger, que deu o seu nome ao primeiro método de sequenciação do genoma de grande impacto. Para atingir um objetivo mais ambicioso, os cientistas desenvolveram uma série de tecnologias para aumentar a quantidade de amostras a ser sequenciadas simultaneamente de forma mais rápida, técnicas de separação mais sofisticadas e alternativas de visualização. As máquinas usadas hoje em dia conseguem sequenciar até 96 amostras ao mesmo tempo sequenciando 750 a 1000 pares de bases por reação, em comparação com as 250 a 500 pares de base do método Sanger original. Em 14 de Abril de 2003 o *National Human Genome Research Institute (NHGRI)* anunciou a conclusão do Projeto Genoma Humano, com a sequenciação de todo o genoma humano (Griffiths, 2013; NHGRI).

3- Tecnologias de sequenciação de genomas

i- Primeira Geração

- **Sequenciação de Sanger**

As técnicas de sequenciação do DNA são a chave para certos avanços nas mais diversas áreas. O primeiro método de sequenciação, como dito anteriormente, foi descrito por Sanger e Coulson e utilizava DNA polimerase de *Escherichia coli* (Sanger & Coulson, 1975). Os produtos destas polimerases eram interpretados por eletroforese em gel de

acrilamida. Porém, para tornar o método mais eficaz, 2 anos depois Sanger e os seus colaboradores sujeitaram o método anterior a melhorias consecutivas (Sanger *et al.*, 1977). Esta evolução do método é designada por sequenciação dideoxy enzimática e viria a revolucionar a história da genômica nos anos seguintes. Consistia numa reação enzimática que polimeriza os fragmentos de DNA complementares ao DNA a ser analisado (França *et al.*, 2002). Resumidamente, um iniciador, uma sequência complementar ao DNA a sequenciar é fundido com uma região específica conhecida no DNA a sequenciar, sendo isto um ponto de partida para a sequenciação do DNA. A chave deste processo de sequenciação é a incorporação de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) A polimerização é feita até a enzima incorporar um di-desoxirribonucleótido (ddNTP) na cadeia em crescimento. Neste momento a reação é interrompida, uma vez que um ddNTP não tem extremidade 3'OH que é necessária para a formação da ligação fosfodiéster com o nucleotídeo seguinte (Adams, 2008). Este método é realizado em quatro tubos diferentes, cada uma contendo a adequada quantidade de um dos quatro terminadores (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e a DNA polimerase. Todos os fragmentos gerados possuem a mesma extremidade 5', enquanto a extremidade 3' é determinada pelo didesoxirribonucleótido utilizado na reação. Depois de todas as quatro reações terminarem, os fragmentos de DNA são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os investigadores podem ver os fragmentos alinhados por tamanho e saber qual a base que se encontra no fim de cada segmento. Isso torna a sequência de DNA simples de ler (França *et al.*, 2002; Adams, 2008).

- **Sequenciação por Maxam & Gilbert**

Outro método surgiu para a sequenciação do DNA por Maxam & Gilbert com base numa degradação química. (Maxam & Gilbert, 1977). Neste método, os fragmentos de DNA marcados na extremidade são submetidos a clivagem aleatória em cada base azotada (A, T, C, G) usando agentes químicos específicos. Este ataque químico é baseado em três passos, sendo eles a modificação da base, a remoção da base modificada a partir da cadeia de açúcar dando-se por fim a clivagem do DNA na posição da base (Maxam & Gilbert, 1977). Os produtos destas quatro reações são então

separados usando eletroforese em gel de poliacrilamida (França *el al.*, 2002). Este método tem diversas vantagens em relação ao método de Sanger, uma vez que, o fragmento pode ser sequenciado diretamente pelo DNA e não pelas suas cópias, este método é menos suscetível a erros no que diz respeito à sequenciação é também considerado um método simples e fácil de controlar.

Apesar de todas as vantagens, este método tem alguns inconvenientes. Em primeiro lugar, este método caracteriza-se pela lentidão dos seus processos. Além disso exige a utilização de produtos químicos perigosos que requerem cuidados especiais no manuseamento. Ainda, a falta de homogeneidade química e física entre as cadeias de DNA leva à polidispersão na eletroforese dificultando a sua leitura. Por estas razões este método é pouco aplicado hoje em dia, mas ainda é utilizado quando o fragmento que queremos sequenciar forma uma estrutura secundária após a desnaturação e não permite o avanço da DNA polimerase (França *el al.*, 2002).

- **Pirosequenciação**

A pirosequenciação é uma técnica de sequenciação de DNA baseada na deteção de pirofosfato libertado (PPi) durante a síntese de DNA. Nesta técnica decorre numa serie de reações, onde se gera uma luz visível que é proporcional ao número de nucleótidos incorporados (Ronaghi, 2001). Esta serie iniciam-se com uma reação de polimerização em que o PPi inorgânico é libertado devido à incorporação dos nucleótidos. O PPi é convertido em ATP pela ATP sulfúrilase e produz luz. Como o nucleótido adicionado é conhecido, a sequencia de DNA pode ser determinada (Ronaghi, 2001).

A pirosequenciação surge, então, como uma vertente inovadora da sequenciação que permite uma caraterização detalhada dos ácidos nucleicos, possuindo uma elevada precisão, flexibilidade, processamento paralelo, e facilidade em ser automatizada. Esta técnica dispensa ainda a necessidade do uso de primers e nucleóticos marcados e eletroforese em gel (Ronaghi,2001).

ii- Segunda Geração

As plataformas de segunda geração podem gerar de 500 milhões de bases (Roche) a bilhões de bases (Illumina, SOLiD). Estes novos métodos assentam em processos paralelos e cíclicos e amplificação de clones. Este processo pode ser feito usando polimerização ou ligação de DNA, sendo o resultado visualizado por quimioluminescência (pirosequenciação), fluorescência (Illumina Genome Analyser), ou sequenciação por oligo-ligações e fluorescência (SOLiD) (Mcginn & Gut, 2012). *Human Genome Research Institute (NHGRI)* inicialmente financiou uma série de projetos que fizeram parte da revolução das tecnologias de sequenciação do genoma. Recentemente, em dezembro de 2010, o NHGRI publicou um mapa mais detalhado da variação genética humana usando tecnologias de sequenciação de DNA de última geração para caracterizar as diferenças genéticas entre vários indivíduos de populações em estudo.

- **Roche 454/ FLX Pirosequenciação**

Esta técnica de segunda geração foi a primeira a ser introduzida no mercado em 2004 e usa uma tecnologia de sequenciação alternativa conhecida como pirosequenciação (Mardis, 2008). Em pirosequenciação cada incorporação de nucleótidos de DNA polimerase resulta na libertação de pirofosfato que inicia um série de reações que culminam com a produção de luz pela enzima luciferase. A quantidade de luz produzida é proporcional ao número de nucleótidos incorporados. Nesta técnica as moléculas de DNA são sequenciadas em paralelo após a sua amplificação por PCR, ocorrendo assim várias reações em milhares de esferas de agarose (Mardis, 2008). Uma vez que cada esfera possui oligonucleotídeos complementares às sequências específicas elas ficam associadas a apenas um único fragmento. Estes complexos são isolados em micelas de óleo/água onde, na fase aquosa, estão presentes reagentes de PCR. Cada micela produz em pouco tempo cerca de um milhão de moléculas prontas para a sequenciação, ou seja, cada esfera de agarose possui até um milhão de cópias do fragmento do DNA original à sua superfície. (Figura 5). Estas moléculas amplificadas são depois sequenciadas em paralelo pela técnica de pirosequenciação (Mardis, 2008).

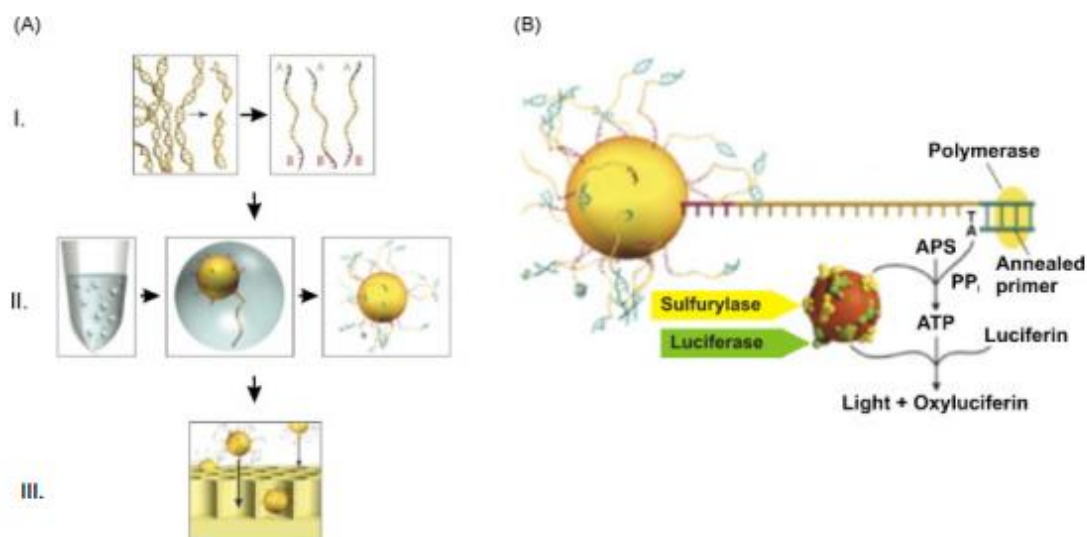


Figura 5: (A) Esquema representativo do funcionamento do sistema de sequenciação começando com a construção da “biblioteca” e ligação aos adaptadores. Após a formação das gotículas segue-se uma reação de PCR em emulsão. As esferas formadas encaixam nos poços. (B) Esquema ilustrativo da reação de pirosequenciação (Ansonge, 2009)

- **Illumina genome analyzer**

Tal como no 454 da Roche, a técnica de sequenciação do Illumina necessita que as sequências a serem determinadas sejam convertidas numa biblioteca de sequenciação especial, sendo necessária a desnaturação da cadeia dupla para se obter uma cadeia única, que permita a amplificação das sequências para assim serem submetidas à sequenciação. Assim, dois adaptadores diferentes são acrescentados às terminações 5' e 3' de todas as moléculas. As cadeias simples de DNA encontram-se em concentrações muito baixas ao longo de canais de uma célula de fluxo. Esta célula de fluxo têm na sua superfície dois oligonucleotídeos complementares aos adaptadores que se encontram nos terminais 5' e 3' das moléculas. A nova molécula que está a ser criada encontra-se ligada covalentemente à célula de fluxo. Esta molécula dobra-se e vai ligar-se ao oligonucleotídeo complementar ao segundo adaptador que não está ligado à placa, podendo ser usado para sintetizar uma segunda cadeia ligada também covalentemente à placa (Figura 6). Este processo, designado de amplificação de ponte, é repetido várias vezes criando milhares de cópias da sequência original. Assim as cópias estão prontas para serem sequenciadas (Kircher & Kelso, 2010). As moléculas de DNA são

sequenciadas base a base em paralelo usando quatro nucleótidos marcados com fluorescência, que no final serão excitados por um laser. Cada fluorocromo dá origem a uma cor diferente sendo assim possível identificar a base que foi adicionada. Este fluorocromo é depois retirado para que a próxima base se possa ligar ao template, é lida então cada base adicionada em cada ciclo (Kircher & Kelso, 2010).

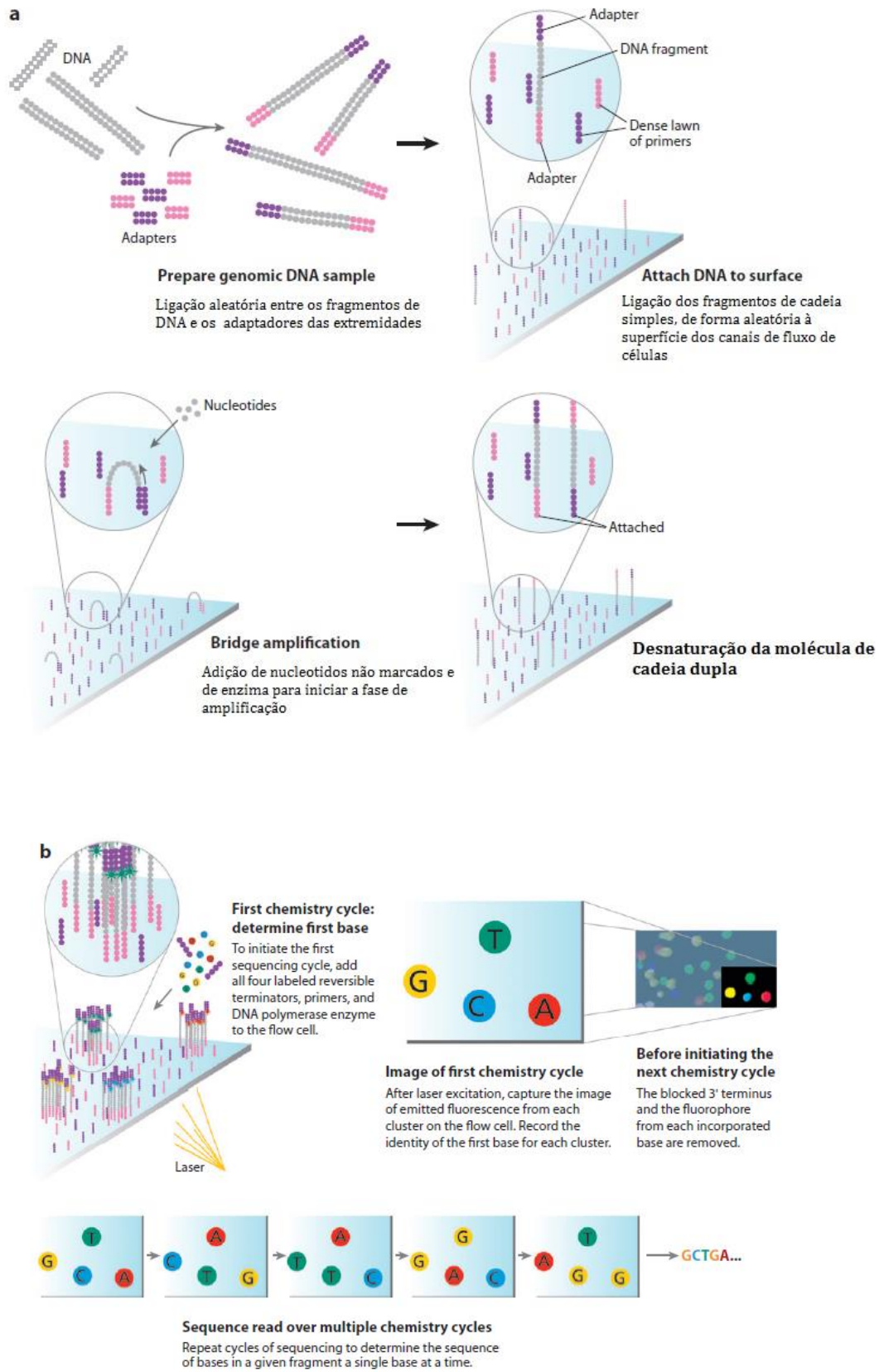


Figura 6: Esquema da técnica de sequenciação do Illumina (Adaptado de Mardis, 2008).

- **Applied biosystems solid**

A plataforma Solid (Sequencing by Oligo Ligation and Detection) usa um adaptador-ligando semelhante aos usados nos métodos descritos anteriormente. Este método usa também uma emulsão PCR com pequenas esferas magnéticas para amplificar os fragmentos que vão ser sujeitos à sequenciação. No entanto esta técnica distingue-se das anteriores devido à enzima utilizada. Neste caso é utilizada uma DNA ligase em vez da DNA polimerase (Mardis, 2008). Nesta técnica uma mistura de sondas fluorescentes compete para a ligação ao primer. Este primer de sequenciação é posteriormente hibridizado com as cópias da cadeia. Após a medição da fluorescência, parte da molécula é clivada da extremidade 5' deixando 2 nucleótidos e um grupo fosfato livre, disponível para se dar próxima reação de ligação (Kircher & Kelso, 2010). Os fragmentos sintetizados são futuramente removidos por desnaturação iniciando-se, então, uma segunda ronda de sequenciação com a hibridização de um novo primer. O sistema SOLiD permite a sequenciação de mais de 300 milhões de esferas. Assim os sistemas, ABI SOLiD e Illumina GA, são comparáveis em termos de rendimento e preço. As duas diferenças mais importantes entre estas técnicas de segunda geração e as de primeira geração referem-se ao comprimento da leitura das sequências e à capacidade de correção dos erros, ou seja, a leitura é muito mais pequena e a capacidade de correção de erros é muito mais alta (Mardis, 2008).

- **Life technologies ion proton**

Esta técnica usa a incorporação enzimática de bases semelhante à tecnologia da Roche, usufruindo de uma tecnologia semicondutora, detetando os prótons libertados aquando da incorporação dos nucleótidos durante o processo de síntese. Os fragmentos de DNA com sequências que possuem um adaptador específico são ligados e posteriormente amplificados por clonagem em emulsão de PCR, na superfície de esferas. Estas esferas, conhecidas por *Ion Sphere Particles*, são transferidas para os poços sensíveis a prótons e a sequenciação é iniciada a partir de um local específico na sequência (Quail *et al.*, 2012). Assim que se inicia a sequenciação, cada uma das quatro bases (C, G, A e T) é

introduzida sequencialmente e cada incorporação bem sucedida é determinada pela variação de pH devido à libertação de H⁺ durante a incorporação de bases. Um sistema com numerosos sensores de pH é usado em paralelo para detetar de que base se trata (Mcginn & Gut, 2012). O PGM™ *IonTorrent Personal Genome Machine* tornou-se em pouco tempo o aparelho de sequenciação mais vendido em todo o mundo, uma vez que, também foi primeiro instrumento do género, comercializado pela *Life Technologies*.

Depois do sucesso do PGM™ a Life Technologies lançou o IonProton™ Sequencer que funciona por meio de chips facilitando assim o processo. Neste caso, existem transístores de efeito de campo (FET's) que são responsáveis pela deteção das variações de pH numa estrutura de micro poços, onde cada poço atua como um local individual de polimerização de DNA contendo uma DNA polimerase e um fragmento para sequenciação. Sob esta camada de micropoços está um estrato sensível a iões, e uma subcamada, composta por uma matriz de detetores FETs (Figura 7). Os FET detetam as variações de pH durante a incorporação de bases e convertem este sinal em voltagem, gravando os dados no *software* que permite a sua leitura (Niedringhaus *et al.*, 2011).

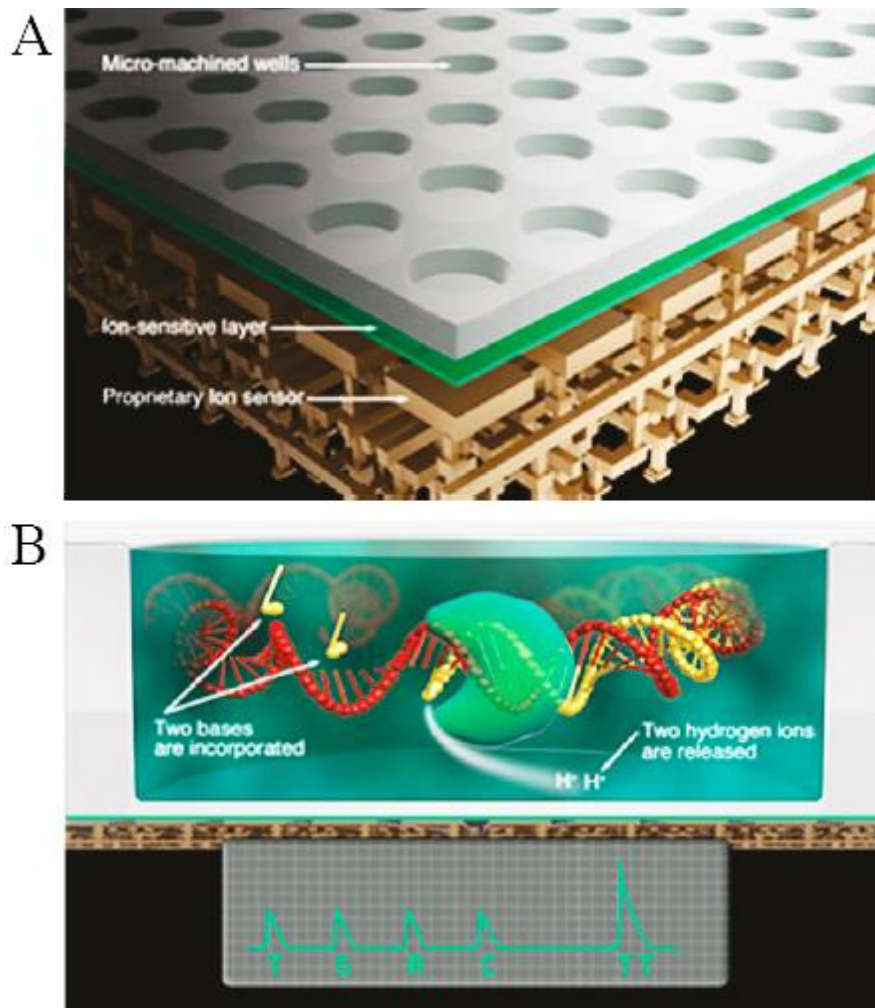


Figura 7: Esboço do chip do IonProton™. (A) uma vista da camada do chip, revelando a estrutura. Na camada superior é possível observar poços individuais de reação de polimerização e também as duas camadas inferiores que são compostas pelos sensores FET. Cada poço possui um FET correspondente que deteta a mudança no pH; (B) Verificação da ocorrência da reação em cada poço: incorporação, pela DNA polimerase, de uma repetição de dois nucleótidos com a libertação de 2 iões de hidrogénio; Na figura á ainda possível visualizar um gráfico de leitura que permite a identificação das bases (Niedringhaus *et al.*, 2011).

iii- Terceira Geração

Como vimos anteriormente as plataformas de segunda geração necessitam da amplificação dos fragmentos do DNA através do PCR, a fim de aumentar a intensidade do sinal para assim permitir a sua detecção. Embora a técnica de amplificação através do PCR seja uma evolução para a análise do DNA, em alguns momentos pode levar a erros na sequenciação de bases dos fragmentos que não existiam antes da amplificação (Pareek *et al.*, 2011).

Com o objetivo de ultrapassar essas limitações, surgiram então as técnicas de sequenciação de terceira geração que são definidas pela leitura direta em moléculas únicas, não sendo necessário, portanto um sistema enzimático para amplificar as sequências. Desta forma é possível diminuir a possibilidade de ocorrência de erros que advinha da utilização do sistema de amplificação (Mcginn & Gut, 2012).

Deste modo a terceira geração conseguiu superar as duas gerações anteriores em termos de comprimento de leitura da sequência, uma vez que se passou a sequenciar dezenas de milhares de bases em vez das dezenas de bases por cada leitura. Esta nova geração permite também uma maior rapidez do processo (10 000 a 20 000 vezes mais rápido) e um maior rendimento (de dias para horas ou minutos). Por fim, além de exigir quantidades inferiores de amostra, o seu custo por base sequenciada é também inferior (Pareek *et al.*,2011). Comparações entre os vários sistemas de segunda e terceira geração, que serão explicados posteriormente, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Comparação de plataformas de segunda e terceira geração. (Adaptado de (Pareek *et al.*, 2011))

Empresa	Roche GS GLX	Illumina-Sollexa	Life Technologies	Helicos Biosciences	Pacific Biosciences
Site	www.454.com/index.asp	www.solexa.com	www3.appliedbiosystems.com/AB_Home	www.helicosbio.com	www.pacificbiosciences.com
Plataforma	GS FLX Titanium	HiSeq 2000, Genome Analyzer IIE	ABI SOLiD, SOLid 4	HeliScope	SMRT
Preparação	ePCR clonal na superfície de esferas	Amplificação clonal enzimática em vidro	ePCR clonal na superfície de esferas	Deteção de moléculas únicas	Deteção de moléculas únicas
Característica	Luz emitida de reações secundárias pela libertação do pirofosfato	Emissão fluorescente de nucleotídeos marcados com fluorocromos	Emissão fluorescente de nucleotídeos marcados com fluorocromos	Deteção em tempo real da fluorescência	Deteção em tempo real da fluorescência
Método	Emulsão de PCR/esferas	Amplificação isotermal na “flow cell”	Emulsão de PCR/esferas	Sequenciação de moléculas únicas	Sequenciação de moléculas únicas
Química	Pirosequenciação	Terminadores fluorescentes reversíveis	Ligação de sondas a oligonucleotídeos	Terminadores fluorescentes reversíveis	Nucleotídeos fluorescente fosfo-ligados
Método de sequenciação	Pirosequenciação	Terminadores fluorescentes reversíveis	Por ligases	Uma base de cada vez	Por síntese
Comprimentos de leitura (bases)	400	36	35	>1000	>1000
Tempo por leitura	10h	2-3 dias	6 dias	12	<1
Rendimento bases/leitura (Gb)	0,035	3-6	10-20	28	100/hora

- **Helicos heliscope**

Uma das primeiras técnicas de sequenciação capaz de sequenciar moléculas individuais sem necessidade de amplificação foi introduzida por Braslavky em 2003, através da empresa Helicos. Este tipo de sequenciação tem a vantagem de não ser afetada por erros na preparação de biblioteca ou na amplificação e facilita a sequenciação de quantidades mínimas de material genético (Braslavky *et al.*, 2003).

Esta técnica baseia-se na tecnologia “true single molecule sequencing” – tSMS. O processo inicia-se com a adição de poly-A-tail (cauda de várias bases Adenina) à

molécula de DNA para gerar fragmentos (Pareek *et al.*, 2011). No último passo da poliadenilação é adicionada uma adenina marcada com fluorescência (Kircher & Kelso, 2010). Após esta etapa a molécula vai hibridizar com nucleotídeos poly-T universais que estão presentes na superfície da “flow cell” do HeliScope. Esta hibridização vai desencadear as reações de sequenciação. Um laser ilumina a superfície da “flow cell” revelando a localização de cada template fluorescente (Pareek *et al.*, 2011). Com estas coordenadas identificadas, a adenina marcada com fluorescência, na terminação 3’, é retirada e a sequenciação começa. Passam então pela “flow cell” polimerases com cada nucleótido (A, C, G e T) marcado com fluorescência. É então lida a fluorescência das bases que se ligaram às sequências antes de ser removido o fluoróforo (Figura 8). Este processo repete-se até se atingir o comprimento de leitura desejado (Kircher & Kelso, 2010).

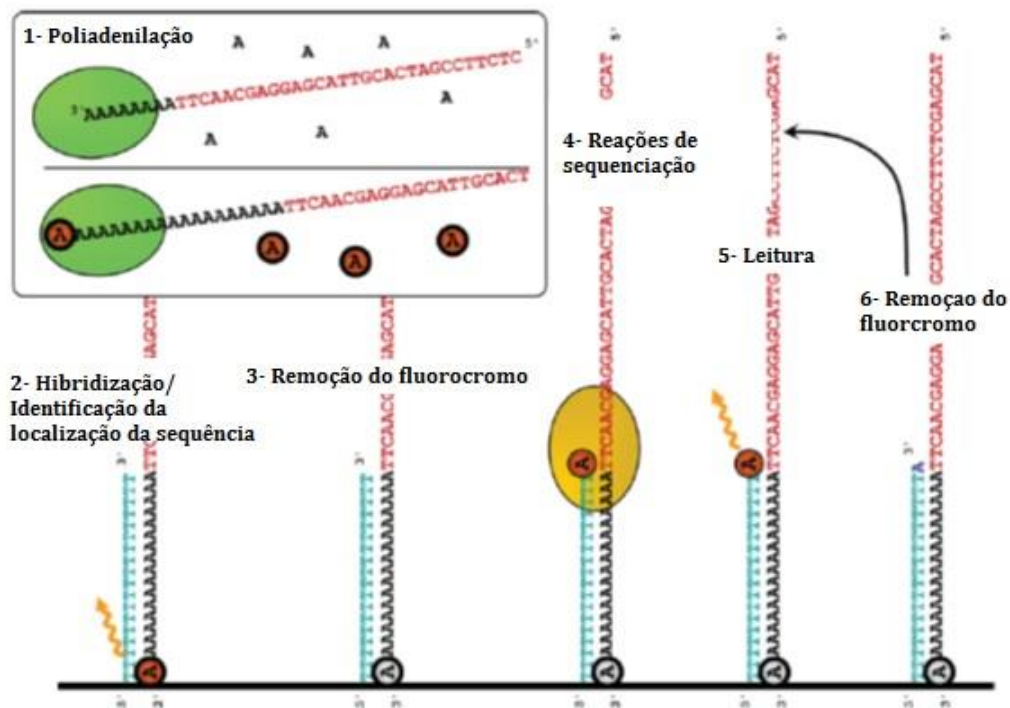


Figura 8: Tecnologia “true single molecule sequencing” – Tsm. Os fragmentos do ácido nucleico a analisar são hibridizados em posições conhecidas na célula de fluxo. O primer, a polimerase e os nucleotídeos marcados são também adicionados. A próxima base incorporada na cadeia sintetizada é determinada pela emissão da fluorescência. (Pareek *et al.*, 2011).

- **Pacific biosciences SMRT**

A tecnologia de sequenciação SMRT (*Single Molecule Real Time*) possibilita, pela primeira vez, a observação de uma síntese natural de DNA pela DNA polimerase. A reação de sequenciação de um fragmento de DNA é feita por uma única DNA polimerase ligada a uma zona de detecção ZMW (*Zero Mode Waveguide*). A ZMW é uma câmara cilíndrica de metal, com aproximadamente 9 nm de diâmetro que possui uma base de vidro por onde passa a luz, para que seja possível a leitura (Figura 9). Assim, a tecnologia da Pacific Biosciences fornece fundamentalmente um novo tipo de leitura, com o potencial de ultrapassar algumas limitações das tecnologias de última geração disponíveis atualmente. Esta tecnologia fornece uma maior quantidade de informação disponível em menor tempo, menos custos e menor quantidade de erros (Pareek *et al.*, 2011).

Durante a sequenciação, o DNA da amostra é alongado pela polimerase usando nucleótidos marcados na terminação fosfato com 4 tipos de fluorescência (uma cor para cada base) presentes na solução (Figura 9). A marcação no grupo fosfato, ao contrário da marcação feita na base permite que a enzima clive a fluorescência como parte do processo de incorporação do nucleótido na cadeia nova de DNA, deixando assim uma cadeia sintetizada natural. Esta inovação demonstra a utilidade da técnica pela exploração das propriedades da DNA polimerase. À medida que a polimerase alonga a sequência vai adicionar um nucleótido de cada vez, durante este período de incorporação é possível ler a fluorescência emitida pelo nucleótido individualmente. Subsequentemente, a leitura simultânea e contínua da fluorescência permite a determinação da sequência de DNA em cada uma das milhares de câmaras ZMW (Pareek *et al.*, 2011).

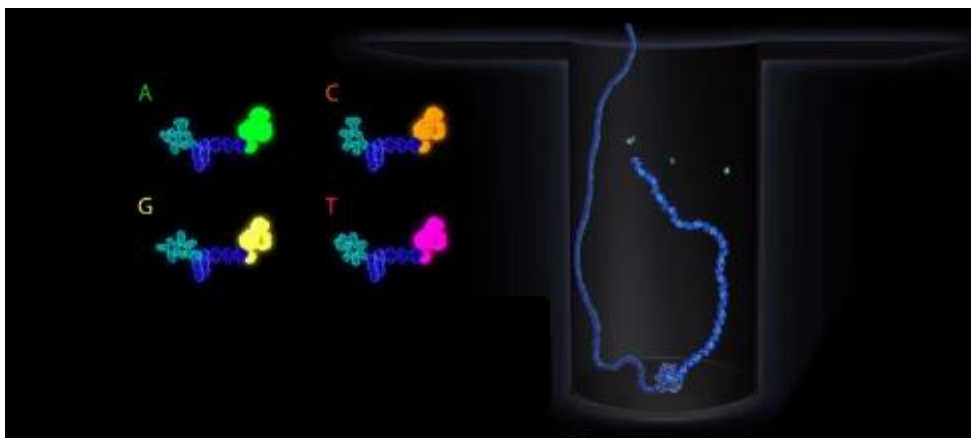


Figura 9: Durante a sequenciação uma DNA polimerase é imobilizada no fundo da camera ZMT. É adicionado um nucleótido de cada vez, cada um dos 4 nucleótidos está marcado com uma fluorescência de cor diferente. Cada vez que uma base é detetada é emitida a fluorescência específica de cada uma. Este processo ocorre em paralelo nas milhas de camaraz ZMT que compõem a célula SMRT (Pacific Biosciences, 2014).

- **Nanopore sequencing**

As nanotecnologias têm sido consideradas como as tecnologias de auge para a sequenciação de uma única molécula de DNA. Atualmente estão a ser desenvolvidos vários conceitos e tecnologias baseados na sequenciação utilizando diversos nanoporos (Zhang *et al.*, 2011).

A sequenciação de uma molécula de DNA, utilizando um sequenciador de DNA Nanopore, não exige a marcação de nucleótidos para a sua deteção. Esta técnica foi desenvolvida a partir de estudos de translocação do DNA através de vários nanoporos artificiais ou proteicos. A sequenciação de DNA com o instrumento Nanopore baseia-se na conversão do sinal elétrico que percorre um nanoporo, quando este é atravessado por um nucleótido. No sistema desenvolvido pela Oxford Nanopore, o nanoporo consiste num poro proteico de α -hemolisina, o qual se liga covalentemente a uma molécula de ciclodextrina (local de ligação para os nucleótidos) (Pareek *et al.*, 2011)

O princípio da técnica assenta na modulação da corrente iónica que atravessa o poro, revelando parâmetros da molécula de DNA, como por exemplo a sua conformação, comprimento e diâmetro. Durante o processo da sequenciação, a corrente iónica que

atravessa o nanoporo é bloqueada por um nucleótido. Este tempo de bloqueio é característico de cada base permitindo assim determinar a sequência de DNA (Pareek *et al.*, 2011).

As vantagens do uso de nanoporos biológicos incluem a possibilidade de serem facilmente modificados, o seu tamanho estar bem definido e poderem ser produzidos em massa, sem alterar o tamanho e estrutura (McGinn & Gut, 2012).

III- Resposta aos Fármacos

1. Variabilidade humana na resposta aos fármacos

i- Problemas de segurança e eficácia

As diferentes reações aos fármacos entre os pacientes é um facto conhecido e é um grave problema na medicina. Estas diferentes reações advêm de diversos fatores tais como doenças secundárias e meio ambiente. No entanto a variação no genoma humano é a maior causa para a variabilidade na resposta aos fármacos. Estes fatores afetam a absorção, distribuição, metabolização e excreção dos fármacos podendo levar, habitualmente, à ocorrência de reações adversas. Estas reações são responsáveis por milhões de hospitalizações e milhares de mortes por ano apenas nos Estados Unidos (Brockmöller & Tzvetkov, 2007).

Assim, saúde pública abrange várias preocupações atuais, entre elas, o uso racional do medicamento com a consequente otimização das terapêuticas. Esta otimização assenta em dois grandes focos: a segurança e a eficácia, sendo prioritários para anulação de problemas relacionados com a segurança (reações adversas) e a maximização de questões relacionadas com a eficácia. Estes dois pontos são, portanto, os objetivos principais no desenvolvimento dos medicamentos. No entanto, a segurança é relativa dado que todo o fármaco pode ser prejudicial tendo em conta diversos fatores como a janela terapêutica, isto é, a diferença entre uma dose habitualmente eficaz e uma dose que possa produzir efeitos secundários. A fim de melhorar a eficácia e a segurança dos fármacos e para um melhor entendimento das consequências da sua administração surgiram rapidamente áreas científicas como farmacogenética e a farmacogenómica com o objetivo de explicar a associação das reações adversas com a genética do paciente (Shastry, 2005). Embora semelhantes estes termos têm significados diferentes. Farmacogenética foca-se nas alterações genéticas apenas de um único gene relacionado com a diferença das respostas aos fármacos, enquanto que a farmacogenómica se foca em muitos genes, ou seja utiliza uma abordagem ampla do genoma para estudar todo o espectro de genes envolvidos nas diferentes respostas. A relação entre o genótipo e a

resposta aos fármacos deve assumir, então, um importante papel no diagnóstico e tratamento, podendo desta forma fornecer as bases para uma abordagem racional para prescrição de medicamentos, através da identificação e definição de vários polimorfismos nas enzimas metabolizadoras e transportadoras dos fármacos (Shastri, 2005). Neste contexto, a Farmacogenómica é hoje uma área em expansão e poderá deter as ferramentas necessárias que possibilitam a construção de respostas terapêuticas dirigidas ao perfil genético dos indivíduos, permitindo respeitar a variabilidade intra e inter-individual. Atualmente, os novos medicamentos são desenvolvidos através de vários ensaios controlados que permitem avaliar a sua segurança e eficácia, aplicando os mais altos padrões científicos que orientam a sua atividade.

É de realçar que a importância do genótipo é maior em terapias onde a resposta individual é difícil de prever. Por exemplo, nas terapias antidepressivas, onde 30% dos pacientes não respondem de forma eficaz ao tratamento. Nestes casos é importante conhecer todos os fatores individuais, tais como, a taxa metabólica, tratamentos anteriores, fatores genéticos envolvidos nos alvos do fármaco e nas enzimas metabolizadoras, a fim de melhorar o tratamento, por exemplo, através do ajustamento da dose de acordo com o genótipo, mudar a estratégia terapêutica ou até mesmo de fármaco (Kirchheiner & Seeringer, 2006).

ii- Variações na metabolização

Para muitos fármacos os polimorfismos nos genes que codificam enzimas transportadoras e metabolizadoras dos fármacos determinam a sua eficácia e a segurança. A primeira descoberta no âmbito da farmacogenética foi feita há mais de 50 anos em doentes com uma deficiência na enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase. Estes doentes desenvolveram hemólise quando tratados com primaquina (um antimalárico muito usado na altura) e foi desenvolvida uma correlação entre a deficiência enzimática e a reação adversa observada. (Shin, *et al.*, 2009).

Um dos principais sistemas enzimáticos do organismo que atua sobre os fármacos é o sistema citocromo P450, também chamado de sistema CYP450 ou sistema P450. São encontradas principalmente no fígado, localizando-se a nível do retículo endoplasmático

liso, nas mitocôndrias e em outras membranas. Entre as enzimas metabolizadoras são as do CYP 450 que detêm um papel mais importante afetando, assim, a farmacocinética do fármaco alterando todo o processo desde a administração até à excreção, o que leva à alteração da farmacodinâmica, ou seja, alteram os efeitos fisiológicos dos fármacos e os seus mecanismos de ação, levando a diferentes respostas de paciente para paciente, uma vez que a concentração do fármaco no sangue é alterada (Kirchheiner & Seeringer, 2006; Suarez-Kurtz, 2004).

Em geral, os medicamentos são convertidos em metabolitos mais solúveis em água, ou seja, são sujeitos a um processo de biotransformação (reações de fase I e II), que facilita a sua excreção. Estes polimorfismos das enzimas que participam no metabolismo podem afetar as reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise) e as reações de fase II (reações de conjugação, acetilação, glucoronidação, metilação e sulfatação). Estes polimorfismos nas enzimas de fase I e de fase II causam uma importante variação na resposta aos fármacos (Tabela 2)

Tabela 2 : Exemplo do impacto do alelo das enzimas metabolizadoras nos vários fármacos (Sim *et al.*, 2011).

Drug	Clinical use	Impacting DME alleles	Literature support of DME biomarker	Impact of DME biomarker on PK	Impact of DME biomarker on clinical parameter	Type of clinical parameter affected
Warfarin	Cardiovascular disorders	CYP2C9*2 and *3	Extensive	High	Modest	Bleeding
Clopidogrel	Cardiovascular disorders	CYP2C19*2, *3, *17	Extensive	High	Modest	Stent thrombosis and bleeding
Tamoxifen	Breast cancer	CYP2D6 (various)	Relatively good	High	Modest	Breast cancer recurrence
Tacrolimus	Organ transplantation	CYP3A5*3	Relatively good	Relatively strong	Small	Graft rejection
Antidepressants	Depression	CYP2D6 (various)	Insufficient number of studies	High	Unknown	Non-response
Escitalopram	Depression	CYP2C19*17	Insufficient number of studies	High	Unknown	Non-response
NSAIDs	Pain relief	CYP2C9*2 and *3	Insufficient number of studies	Modest	Unknown	GI bleeding
Irinotecan	Colorectal cancer	UGT1A1*28	Good	High	Modest	Myelotoxicity
6-MP and AZA	Leukemia and chronic inflammation	TPMT*2, TPMT*3A and TPMT*3C	Good	High	Modest	Myelotoxicity
Codeine	Pain relief	CYP2D6 (various)	Relatively good	High	Limited	Response or CNS depression

Abbreviations: AZA, azathioprine; CNS, central nervous system; DME, drug-metabolizing enzyme; GI, gastrointestinal; 6-MP, 6-mercaptopurine; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; PK, pharmacokinetic.

Devido a esta variabilidade genética, as populações podem ser classificadas de acordo com o seu perfil metabólico como metabolizadores pobres ou lentos, intermédios, rápidos e ultra-rápidos (figura 10). Os metabolizadores lentos, em geral, são indivíduos com diminuição ou ausência da enzima metabolizadora, o que leva ao aumento da concentração de fármaco, podendo levar ao aparecimento de reações adversas por sobredosagem. Os metabolizadores intermédios, são os que apresentam o metabolismo

mais comum na população, neste caso a concentração de fármaco será de acordo com a esperada. Já o fenótipo de metabolizadores rápidos e ultra-rápidos podem derivar de um aumento na produção da enzima metabolizadora associado a uma ou múltiplas duplicações do gene que codifica a enzima. Nestas situações a concentração de fármaco será abaixo da janela terapêutica, não havendo assim, efeito clínico desejado.

Este perfil metabólico além de influenciar a resposta aos fármacos influencia também, de forma oposta, a resposta aos pró-fármacos. Os pró-fármacos precisam ser metabolizados pelas CYPs para, só então, se tornarem efetivos, como é o caso de muitos analgésicos opióides que devem ser ativados pelo CYP2D6. No entanto, 2% a 10% da população são metabolizadores lentos que possuem um alelo da enzima CYP2D6 não funcional, havendo assim, uma resistência aos efeitos analgésicos destes medicamentos (Evans & Johnson, 2001). No caso de metabolizadores rápidos os pró-fármacos são rapidamente tornados ativos devido à elevada metabolização, podendo levar ao aumento da concentração.

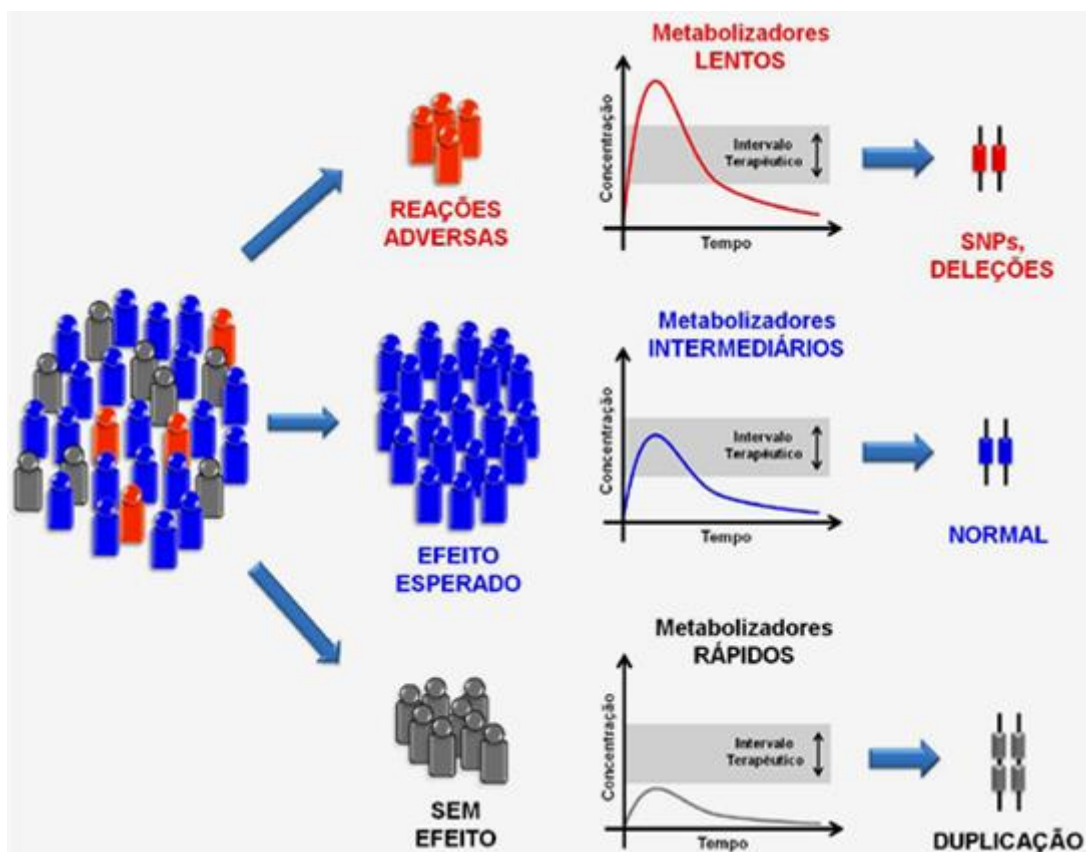


Figura 10: Classificação de acordo com o perfil metabólico: metabolizadores pobres ou lentos, intermédios, rápidos e ultra-rápidos (Metzger *et al.*, 2006).

Ou seja, a genética ao causar variação no metabolismo do fármaco vai levar a uma alteração da *clearance*, no tempo de semi-vida e na concentração máxima. Estas diferenças na farmacocinética devem assumir uma importância e devem levar à consideração do ajustamento da dose em função do genótipo em diversas ocasiões. Estes ajustamentos da dose podem ser calculados de acordo com os princípios da bioequivalência, da atividade dos metabolitos, e da janela terapêutica (figura 11).

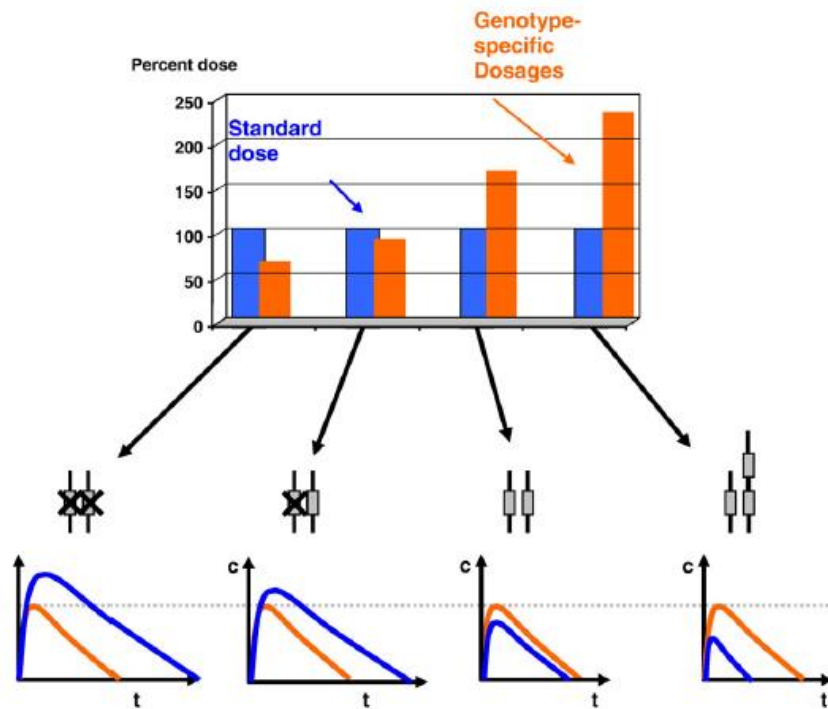


Figura 11: Princípio do cálculo do ajustamento da dose em função do genótipo com base nas diferenças nos parâmetros farmacocinéticos, como a clearance e AUC. As doses teóricas para os subgrupos: metabolizadores pobres, intermédios, extensos e ultra-rápidos são retratados como dosagens específicas de genótipo esquemáticos, a fim de obter valores iguais de concentração plasmática (Kirchheiner & Seeringer, 2006).

No entanto, nem todos os fármacos são adequados para a realização deste ajuste e otimização da dose. As terapias medicamentosas que exigem uma administração rápida não permitem a realização dos testes para o cálculo da dose baseada no genótipo. Além disso, os fármacos que possuem uma grande janela terapêutica não justificam o esforço e os custos associados ao ajustamento da dose segundo o genótipo. Por outro lado existem tratamentos onde a dosagem deve ser cuidadosamente administrada e calculada de forma individualizada. Para dar um exemplo, o tratamento de insuficiência cardíaca com β -Bloqueadores exige, mesmo em concentrações baixas, um ajustamento da dose, uma vez que, a genética leva a diferenças no metabolismo do fármaco, podendo levar a que a concentração ultrapasse a janela terapêutica (Kirchheiner & Seeringer, 2006).

Um dos fármacos mais afetados pelos polimorfismos das enzimas metabolizadoras é a varfarina. Embora amplamente utilizada para o tratamento e prevenção de doenças tromboembólicas, a varfarina é conhecida por ter uma janela terapêutica estreita, e por apresentar uma grande variabilidade individual na resposta clínica, elevada percentagem de reações adversas, algumas até, letais. A varfarina exige, assim, um ajuste cuidadoso da dose terapêutica de paciente para paciente (Tomalik-Sharte *et al.*, 2006). Além disso, os polimorfismos genéticos de um número grande de enzimas envolvidas na ação farmacológica e farmacocinética da varfarina demonstraram ser importantes na determinação da variabilidade individual no tratamento com varfarina. A partir dessas perspectivas, a terapia anticoagulante com varfarina é considerada um modelo bem adaptado à medicina individualizada (Rettie & Tai, 2006).

A dose padrão de varfarina é de 4 a 6 mg / dia. No entanto, a dose diária eficaz varia de 0,5 a mais do que 30 mg de paciente para paciente. Os doentes que receberam uma dose de varfarina insuficiente correm o risco de não conseguir controlar a coagulação do sangue, enquanto que nos pacientes que recebam uma dose elevada existe um risco grande de hemorragia. A monitorização frequente dos pacientes durante a terapia com varfarina é considerada prática comum (Qiang & Lu, 2011).

Existem vários polimorfismos genéticos associados à variabilidade individual de tratamento com varfarina, estes incluem polimorfismos do gene VKORC1 e da enzima CYP2C9 responsáveis pelo seu metabolismo. Por exemplo, as pessoas portadoras do alelo 1173T/T do gene VKORC1 requerem cerca de metade da dose diária de varfarina em comparação com pacientes com o alelo 1173C/C. Por outro lado, pacientes portadores do alelo CYP2C9*2 e CYP2C9*3 têm capacidade reduzida para metabolizar a varfarina resultando num aumento da concentração plasmática, podendo ainda, levar a uma sobredosagem. Estes pacientes têm um maior risco de desenvolvimento de efeitos colaterais do que os portadores do alelo CYP2C9*1. Portanto, a genotipagem dos pacientes antes da terapia com varfarina pode reduzir a percentagem de efeitos adversos e facilitar a obtenção do equilíbrio entre o efeito terapêutico e risco de hemorragia (Gage & Lesko, 2008; Kim *et al.*, 2009.).

2- A genómica e a medicina personalizada: janela de oportunidades

i- Vantagens para a indústria

- **Novos desenhos de ensaios clínicos**

Além de otimizar o uso de medicamentos prescritos atualmente, a farmacogenómica também pode oferecer novas estratégias no processo de desenvolvimento de medicamentos (Evans & Johnson, 2001).

Nos estudos pré-clínicos ou na fase I dos ensaios clínicos, a genotipagem pode ser útil para excluir ou incluir grupos genómicos particulares e definidos, com o objetivo de aumentar as possibilidades de um fármaco se mostrar seguro. Isto leva a indústria farmacêutica a usar a farmacogenómica ou a farmacogenética, conforme o caso, na fase inicial dos ensaios clínicos para se assegurar que as populações dos estudos são representativas da população em geral, nomeadamente ao nível das variações genéticas associadas ao metabolismo (Grant & Hakonarson, 2007).

Esta situação pode ajudar favoravelmente a minimizar o risco do ensaio ou a diminuir o risco de um fármaco falhar num estado muito avançado do seu desenvolvimento, aumentando a segurança do produto final.

Numa fase do ensaio mais avançada, fase II ou fase III, a farmacogenómica e a farmacogenética podem ser usadas para identificar geneticamente grupos definidos que têm um elevado risco de desenvolver reações adversas graves, ou de forma prospetiva, em que se podem testar novos fármacos em sub-populações de doentes que se acredita responderem melhor (Shin *et al.*, 2009). Esta situação poderá ser particularmente importante na identificação de uma terapêutica que seja altamente efetiva mas que esteja associada a poucas, mas graves, reações adversas com base genética. Estes grupos podem ser identificados e excluídos em posteriores ensaios (Ingelman-Sunberg, 2008). Isto é, pode ser possível reduzir o número de indivíduos necessários nos ensaios clínicos na fase II e III, eliminando aqueles que não respondem devido a polimorfismos enzimas metabolizadoras de fármacos ou nos alvos dos fármacos. Uma vez o fármaco

aprovado e lançado, ele seria administrado à população com maior probabilidade de beneficiar (Figura 12).

POTENCIAL DA FARMACOGENÓMICA

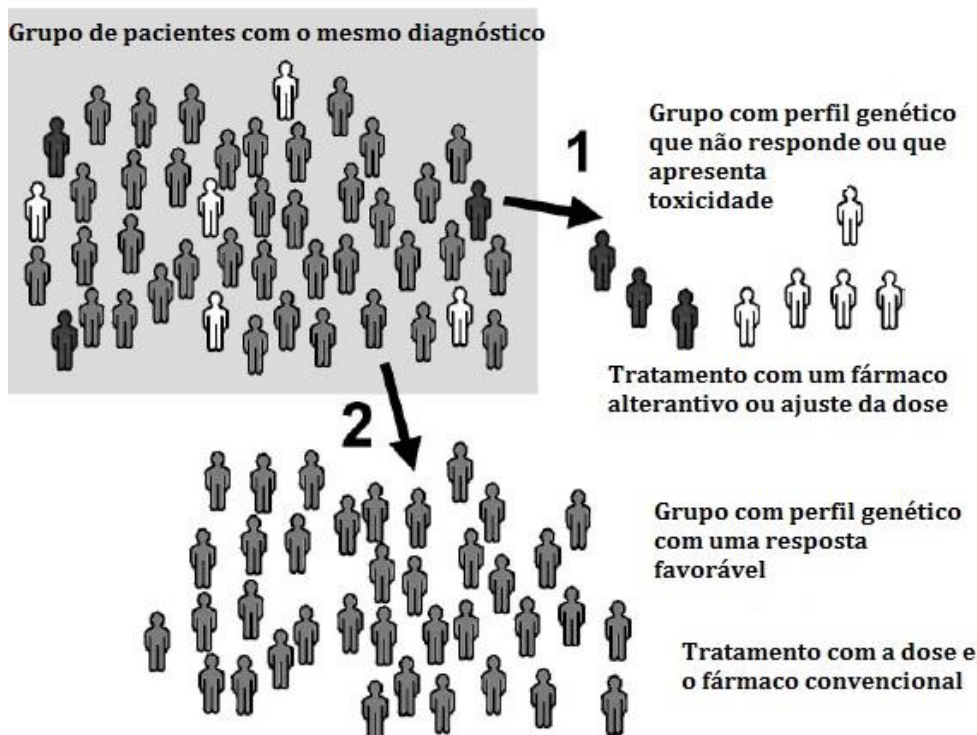


Figura 12: O potencial da farmacogenética e da farmacogenómica é identificar os pacientes dentro de uma população com o mesmo diagnóstico (por exemplo, hipertensão, leucemia, asma, etc), que estão geneticamente predispostas a responder, ou não, ao tratamento ou para desenvolver uma toxicidade. Assim é possível alterar o tratamento do grupo com o perfil genético que não responde ao convencional. A restante população pode então ser tratado com a terapia convencional (Adaptado de: Evans & Johnson, 2001).

A farmacogenética/farmacogenómica é, então, uma ferramenta útil no desenvolvimento de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas. O processo de aprovação de um medicamento poderá ser facilitado e encurtado ao realizar testes com populações caracterizadas geneticamente. Isso traria um maior sucesso nos testes de novos medicamentos e reduziria os custos e riscos associados. Além disso permite ainda a reavaliação de fármacos já ensaiados e rejeitados, permitindo a sua utilização a uma parcela da população que responda positivamente ao tratamento (Kalow, 2002).

Exemplo de fármacos que possam estar sujeitos a esta reavaliação são os antibióticos. Estes fármacos são utilizados para combater infeções bacterianas, matando ou inibindo o crescimento dos microrganismos, sendo capazes de inibir em baixas doses, processos vitais das bactérias (Kester *et al.*, 2008). A necessidade de novos antibióticos é maior agora do que antes, devido às multi-resistências dos patogénicos mais comuns que se desenvolveram pelo uso irracional e abusivo destes fármacos ao longo dos últimos anos.

No entanto o número de antibióticos novos tem vindo a ser reduzido pela FDA (Figura 13) Esta medida tem por base questões económicas, uma vez que o maior interesse está no lançamento de medicamentos de uso crónico, e não de curta duração. Os antibióticos possuem também um alto custo por produto aprovado (Spellberg *et al.*, 2004)

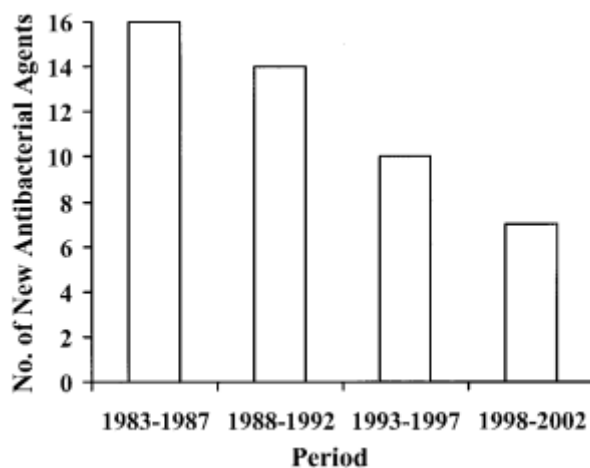


Figura 13: Redução de quase 56% do número de novos antibióticos aprovados pela FDA ao longo dos anos de 1983 a 2002 (Spellberg *et al.*, 2004).

Uma vez que não são lançados novos antibióticos e os existentes atualmente começam a tornar-se ineficazes devido às resistências, uma das possibilidades é o retorno a antibióticos antigos com pouco uso atualmente. Esta recuperação pode levar a um aumento da eficácia clínica, uma vez que, pode levar a uma ação sinérgica ou ação combinada com um antibiótico atual, que por si só já não é tao eficaz (Spellberg *et al.*, 2004).

- **Novas oportunidades de desenho de novos fármacos**

O campo da farmacogenómica começou com um foco no metabolismo dos fármacos, porém tem-se estendido atualmente também para a sua distribuição, incluindo assim, recetores e uma crescente lista de transportadores que influenciam a absorção, distribuição e excreção das drogas, assim como de alvos terapêuticos que podem modular a resposta das drogas. Entende-se por alvos terapêuticos como: uma proteína onde o fármaco vai atuar (recetor ou enzima), proteína envolvida na resposta farmacológica, ou proteína associada ao risco de uma patologia que vai ser alterada pelo fármaco. O grande objetivo da farmacogenómica no estudo dos alvos das drogas identificar a base hereditária para a variabilidade inter-individual na resposta à droga e toxicidade, particularmente quando esta variabilidade não é explicada por diferenças na concentração do fármaco (Evans & Johnson, 2001). Este espectro mais alargado permite uma evolução dos ensaios clínicos, permitindo assim uma maior área de ação e investigação. Além da identificação e da validação de novos alvos terapêuticos, uma das várias aplicações da genómica ao nível da indústria farmacêutica tem sido a ajuda na seleção dos melhores fármacos para um alvo em particular (Schmedders *et al.*, 2003). Isto acontece porque, um dos mais importantes contributos da genómica é contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos numa determinada doença (Thorn *et al.*, 2007).

A indústria farmacêutica utiliza, cada vez mais, técnicas relacionadas com a farmacogenómica e com a farmacogenética e a informação que delas resulta para o processo de desenvolvimento de novos fármacos (Shin *et al.*, 2009). Assim, na descoberta de novos fármacos que abrangem toda a população, só as moléculas candidatas que não mostram variações significativas na eficácia, perante os alelos mais comuns do alvo identificado, seguem para desenvolvimento, reduzindo assim, a probabilidade de serem rejeitados num estado mais avançado do desenvolvimento (Schmedders *et al.*, 2003).

Na descoberta de novos fármacos dirigidos a determinadas sub-populações, na maioria dos casos, os grupos-alvo destes fármacos são indivíduos com uma determinada

variação genética, que poderão beneficiar bastante da terapêutica, respondendo bem a esta. Estes fármacos provavelmente terão que ser aprovados e considerados seguros em todos os grupos de indivíduos, mas poderão ser licenciados e comercializados especificamente para o grupo de indivíduos que responde bem, ou seja, terá um “mercado” restrito mas extremamente efetivo (Kollek *et al.*, 2006)

ii- Vantagens para o doente

Como já foi dito, farmacogenética/farmacogenómica é um campo em que a genética do paciente é levado em consideração durante o tratamento com diversos fármacos. Estas terapias individualizadas além de melhorarem a resposta ao tratamento, diminuem o numero de pacientes que sofrem reações adversas aos medicamentos (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007). Além de diminuir o número de reações adversas existe ainda a vantagem de evitar a exposição do paciente a um longo período de terapia baseado na tentativa e erro. Cabe recordar que, nesse processo, muitos pacientes após prescrições ineficazes acabam por abandonar o tratamento não aguardando, assim, por uma terapia eficaz (Lima *et al.*, 2004).

À medida que esta visão da medicina personalizada se vai tornando gradualmente uma realidade na prática clínica corrente, o tratamento prescrito pelos médicos e as vidas dos doentes estão a mudar. O geneticista americano Francis S. Collins afirma que “Estamos na linha da frente de uma verdadeira revolução em medicina.”. Este cientista ajudou a descodificar a sequência genética do ser humano como responsável pelo Projeto de Genoma Humano e foi nomeado diretor do Instituto Nacional de Saúde dos EUA em 2009. Collins acredita que a medicina personalizada pode ser muito mais eficaz que a abordagem tradicional de “tratamento igual” para todos – isto é, o mesmo medicamento para todas as pessoas (National Institutes of Health- NHI, 2014). Segundo este ponto de vista, esta perspectiva anuncia uma alteração dramática de paradigma em medicina. Esta mudança de paradigma, juntamente com outros avanços em medicina personalizada, pode alterar a forma como os médicos diagnosticam e tratam muitas doenças. Uma análise inicial ao sangue ou a um tecido pode determinar a eficácia de um dado medicamento para um doente específico, ajudando a prever a forma como um doente irá

tolerar o tratamento e se poderá ter sucesso. Estes testes e perfil molecular fazem principalmente o rastreio de substâncias orgânicas denominadas biomarcadores (figura 14). A maioria dos biomarcadores são proteínas, mas podem também ser moléculas como ácidos gordos ou moléculas com características génicas, incluindo o DNA e os RNAs. Os biomarcadores genéticos podem ter um importante destaque na identificação de doentes que previsivelmente respondem e de doentes que não respondem a determinada terapêutica, evitando efeitos tóxicos e permitindo um ajuste na dose dos fármacos de forma a otimizar a sua eficácia e segurança (Ingelman-Sunberg, 2008). Estes biomarcadores podem ser classificados segundo a sua utilização específica: resposta clínica e diferenciação dessa mesma resposta, identificação do risco, cálculo da dose, suscetibilidade e resistência (Ingelman-Sunberg, 2008).

A FDA reconheceu na farmacogenómica/farmacogenética uma forma de identificação de novos biomarcadores que poderão ser muito úteis no desenvolvimento de novos fármacos (FDA, 2009), tais como os biomarcadores preditivos de Reações Adversas Medicamentosas (RAMs).



Figura 14: A medicina personalizada fundamenta-se na análise e identificação de Biomarcadores através de amostras de tecidos, sangue ou fluidos corporais do doente, a fim de se escolher um medicamento personalizado de acordo com os resultados. Assim, aumentamos a eficácia do tratamento com a vantagem de se diminuir a probabilidade de efeitos adversos (Pfizer, 2014).

Para os doentes, a medicina personalizada detém a promessa de terapêuticas mais eficazes e com menos efeitos secundários, podendo assim, ser poupados à perspetiva de um tratamento com efeitos adversos significativos e pouco ou nenhum efeito terapêutico. Aumenta igualmente a eficiência global da prestação de cuidados de saúde

uma vez que traçar o perfil molecular pode descartar certos tratamentos em doentes que não irão responder aos mesmos. Esta nova perspectiva proporciona aos doentes opções terapêuticas sem precedentes. Se um fármaco ainda tem que ser aprovado para uma dada indicação, o tratamento no âmbito de um ensaio clínico pode bem ser uma alternativa. As técnicas de rastreio que identificam biomarcadores específicos permitem que alguns doentes sejam incluídos em ensaios clínicos e possam beneficiar de novos fármacos (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007).

iii- Desafios a resolver

Mais de 50 anos de pesquisa dos efeitos da farmacogenética/farmacogenómica onde é demonstrado o impacto da variabilidade genética no metabolismo dos diversos fármacos, ainda não levaram ao advento da medicina personalizada (Kirchheiner & Seeringer, 2006). A complexidade de algumas doenças e das variações dos genes e os custos associados, podem-se tornar potenciais barreiras à incorporação da farmacogenética e da farmacogenómica como prática habitual no diagnóstico e tratamento. Este processo obriga a um aumento da educação na comunidade clínica e ao entendimento do termos farmacogenética/farmacogenómica pela lei pública. Como disse Gurwitz e Rehavi em 2005 a “A educação dos profissionais de saúde em farmacogenética como parte de seu currículo em farmacologia, e a exposição de seu potencial para a população em geral, serão indispensáveis para o sucesso da medicina personalizada” (Gurwitz & Rehavi, 2005). Um dos desafios a resolver passa pela diminuição do custo da sequenciação de DNA. Enquanto que a sequenciação do genoma custava cerca de \$ 500.000 dólares norte-americanos em 2000, esse custo já foi reduzido para \$ 50.000 dólares norte-americanos em 2010 e os peritos calculam que o preço possa descer em breve para valores inferiores a \$1.000 dólares norte-americanos, existindo uma empresa (recentemente adquirida pela Roche) com o objetivo de reduzir este valor para cerca de \$100 por genoma. O oncologista britânico Ultan McDermott afirma que em poucos anos poderão estar disponíveis plataformas para a sequência completa do genoma humana por poucas centenas de dólares americanos. Embora o

custo da sequenciação do DNA esteja a diminuir drasticamente, os valores de custo-efetividade da medicina genómica continuam limitados (McDermott *et al.*, 2011).

Embora o tratamento individualizado seja ainda um desafio começa no entanto a ser uma realidade no desenvolvimento nos novos fármacos, uma vez que apresenta diversas vantagens em termos de saúde pública permitindo ao mesmo tempo reduzir a percentagem de efeitos adversos, como já mencionada anteriormente (Brockmøller & Tzvetkov, 2007). É fundamental notar que muitos genes podem influenciar as respostas aos medicamentos, o que torna bastante complexa a tarefa de identificar quais as variações genéticas que são mais relevantes. Validar clinicamente os marcadores genéticos de maior relevância clínica talvez seja o mais importante fator limitante do uso da informação genética na tomada de decisões terapêuticas. Com o tempo, vão estar disponíveis cada vez mais tratamentos dirigidos. Novos medicamentos para tratar diversas patologias estão em desenvolvimento, e vários ensaios clínicos já estão a ser realizados (Metzger *et al.*, 2006).

iv- Problemas éticos

Há várias razões para que a farmacogenómica na medicina não avance tão rapidamente como esperado. Além das dificuldades científicas e das questões económicas já discutidas, as questões éticas e sociais constituem também um desafio. É de salientar também as consequências psicológicas, a violação da privacidade ou a discriminação. Talvez o futuro passe pela criação de uma base de dados confidencial contendo o genótipo de cada paciente. Contudo, se a privacidade dessa base de dados fosse violada, pessoas ou grupos que carregam variações genéticas associadas às mais diversas fisiopatologias podem estar em desvantagem. Esta desvantagem caracteriza-se pela perda da igualdade do acesso aos cuidados de saúde e, até mesmo à dificuldade em obter um seguro de saúde, uma vez que, não é do interesse económico uma companhia de seguros proteger pessoas ou grupos que detêm uma probabilidade elevada de desenvolver uma doença (Moran *et al.*, 2011).

Ainda, a estratificação de uma população em sub-populações, provocada pela aplicação da farmacogenómica, poderá causar repressões, no caso do não investimento no desenvolvimento de fármacos para populações específicas pouco numerosas, dado que não constitui um investimento atrativo para as empresas, o que releva questões de imparcialidade. Deste modo, algumas populações podem deixar de ter acesso a terapêuticas novas e mais efetivas, nomeadamente porque a terapêutica para estes indivíduos, quando desenvolvida, poderá vir a ser bastante mais cara. Aqui poderão estar em causa problemas éticos sérios que terão que ser considerados pelas entidades reguladoras nacionais e sobretudo, pelas internacionais (Moran *et al.*, 2011)

IV- Farmacogenómica: exemplos

1- Casos de sucesso

Atualmente, nos Estados Unidos da América, cerca de 120 fármacos têm incluídas na sua descrição descobertas no âmbito da farmacogenética/farmacogenómica (Frueh, *et al.*, 2008) reconhecidas pela FDA. Estes fármacos incluem-se em diversas áreas terapêuticas como as doenças infecciosas (o voriconazole), a cardiologia e a hematologia (a varfarina), a neurologia (a carbamazepina), a psiquiatria (a atomoxetina) e a oncologia (a azatioprina, o irinotecano, o trastuzumab e o cetuximab) (Shin, *et al.*, 2009). São ainda exemplos o imatinib, um antineoplásico, inibidor enzimático específico (da enzima tirosinacina), usado no tratamento de alguns tipos de cancro, nomeadamente na leucemia mielóide crónica; e o erlotinib e o gefitinib, também um antineoplásico, usado no tratamento do cancro do pulmão de pequenas células e no cancro pancreático, e cujo mecanismo de ação é bloquear o recetor do fator de crescimento das células cancerosas (Evans *et al.*, 2003).

i- Terapia oncológica

- **Cancro da mama**

Um dos exemplos é o tratamento com trastuzumab para o cancro da mama. O seu uso é limitado a situações onde há um aumento do tumor, formação de metástases e resistência aos agentes quimioterápicos. A utilização deste fármaco está dependente da expressão de genes de recetores HER2, (*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*), isto é, recetores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano. A sua sobre-expressão tem o potencial para causar o aparecimento de cancro e irá determinar a utilização deste fármaco, uma vez que o trastuzumab é um anticorpo monoclonal que bloqueia o recetor em causa, inibindo portanto, a sua expressão. A utilização deste

fármaco tem tido grandes resultados terapêuticos quando associado à quimioterapia convencional (Plosker *et al.*, 2006).

Neste caso específico, a FDA considera importante a pesquisa da sobre-expressão do recetor HER2 em mulheres com cancro da mama, antes de iniciarem a terapêutica com este anticorpo monoclonal (FDA, 2009). O objetivo é, antes de iniciar a terapêutica com este fármaco, predeterminar a expressão dos recetores HER2, pois sabe-se que este só será eficaz em tumores que sobre-expressam este recetor. Esta predeterminação permite uma otimização da terapêutica com um uso racional do fármaco (Evans *et al.*, 2003).

Sabe-se que a quimioterapia reduz a possibilidade de recorrência do cancro daí ser uma terapia geralmente prescrita. No entanto, metade dos pacientes com cancro de mama recebem quimioterapia e sofrem os efeitos adversos, sem que seja necessário, uma vez que apenas uma ou no máximo duas mulheres em cada cinco sofre uma recorrência. Somente estas mulheres necessitam de quimioterapia complementar. Surgiram então dois testes que avaliam a possibilidade de recorrência do cancro.

O Oncotype Test®, da Genomics Health, é um teste diagnóstico que quantifica a possibilidade de recorrência do cancro da mama em doentes com um diagnóstico recente, num estágio 1 ou 2, que poderão ser tratadas com tamoxifeno. Este teste avalia a variação de um painel de biomarcadores de 21 genes associados com a recorrência, ou não-recorrência, em sub-tipos particulares de cancro da mama. Assim haverá uma melhoria do prognóstico tendo por base a estratificação das doentes de acordo com a possibilidade de recorrência da doença (Thorn *et al.*, 2007).

Recentemente foi desenvolvido outro teste para o cancro da mama que permite, também uma reavaliação adequada de doentes que já tiveram cancro e que poderão vir a desenvolvê-lo novamente. Este teste genético da empresa holandesa *Agendia*, chamado *MammaPrint*®, cujo kit é comercializado e reconhecido pela FDA desde 2007, avalia o grau de agressividade do cancro da mama. O teste permite avaliar como o cancro irá responder aos tratamentos prescritos para evitar a recorrência das células cancerosas (Thorn *et al.*, 2007).

MammaPrint® é realizado num tecido tumoral que é enviado para o laboratório clínico da *Agendia*, onde um teste histológico é feito. Este teste é realizado utilizando

tecnologia de chip de micromatriz. Esta é uma pequena superfície sólida que é dividida em milhares de pequenas redes. Cada rede contém DNA com um código diferente correspondendo a cada gene. Isto permite estudar a atividade de centenas ou mesmo milhares de genes simultaneamente, medindo o nível de mRNA de 1900 genes diferentes, dando especial importância a 70 genes com um papel fundamental na formação de metástases. O resultado de uma *MammaPrint*® é muito claro e fácil de interpretar podendo ser nulo/baixo risco de metástases ou alto risco de metástases. (MammaPrint, 2007)

- **Leucemia mielóide crónica**

A leucemia mielóide crónica corresponde a 15 a 20% dos casos de leucemia e em quase todos os doentes se encontra uma anomalia cromossómica conhecida como “cromossoma de Filadélfia” (Figura 15). Este defeito cromossómico é uma translocação cromossómica recíproca que envolve os braços longos dos cromossomas 9 e 22, caracterizada pelo cromossoma 22 ser mais curto do que o normal. Esta alteração dá origem a uma proteína mutante e hiper-reactiva responsável pela proliferação celular excessiva característica do cancro, a BCR-ABL (Husain *et al.*, 2007).

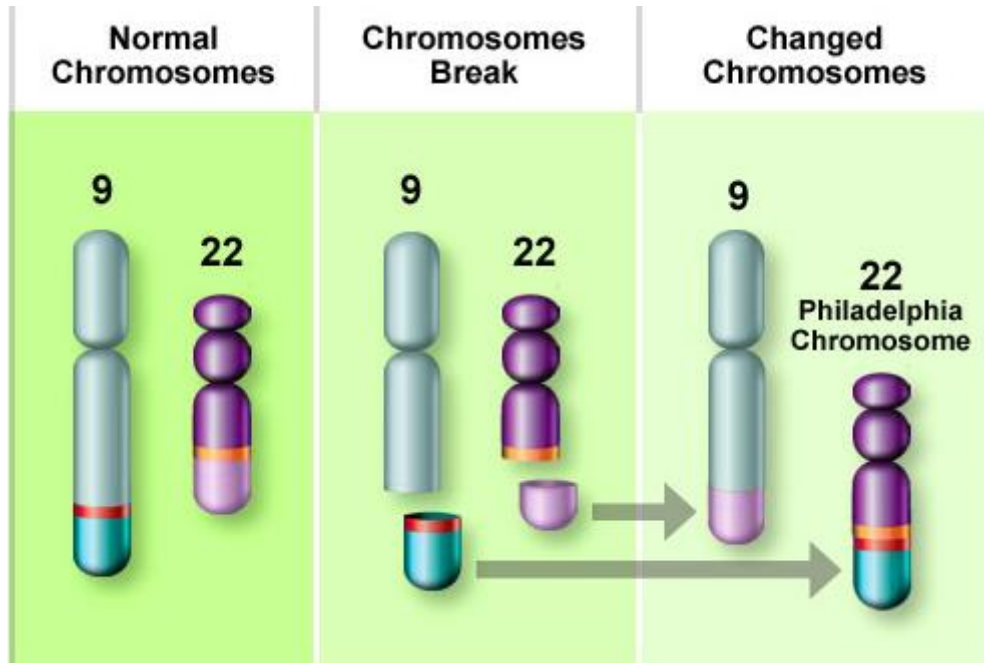


Figura 15: «Cromossoma de Philadelfia», translocação cromossómica recíproca que envolve os braços longos dos cromossomas 9 e 22 (WebMD, 2011)

Na leucemia mielóide crónica as células afetadas vão alterar a produção das células estaminais hematopoiéticas e os glóbulos brancos que elas produzem. O imatinib atua bloqueando e inibindo a atividade desta proteína mutante (BCR-ABL), assim como os seus efeitos negativos. É um inibidor altamente específico desta enzima e tem tido um sucesso clínico considerável em doentes que são tratados na fase inicial da doença, podendo mesmo conseguir-se uma eventual remissão completa (Thorn *et al.*, 2007)

A leucemia mielóide crónica pode ser diagnosticada mesmo antes dos sintomas aparecerem, nomeadamente através de um teste genético que identifica o já referido “cromossoma de Philadelfia”. Esta deteção precoce da doença é importante porque nos estadios mais avançados da leucemia os doentes muitas vezes desenvolvem resistência ao imatinib, não respondendo ao tratamento (Ingelman-Sunberg, 2008).

Os doentes que estão medicados com imatinib podem ao fim de algum tempo registar uma diminuição da resposta à terapêutica. Esta situação acontece, nomeadamente em doentes com instabilidade genética e mais suscetíveis ao aparecimento de mutações genéticas. Quando se verifica a diminuição da resposta ao tratamento é necessária a

pesquisa de mutações para se fazer um ajuste de doses. Havendo uma relação direta entre o aparecimento das mutações e a diminuição da resposta terapêutica poder-se-á considerar benéfica a identificação imediata das mutações para haver um ajuste da dose, ou eventualmente uma alteração do fármaco (Shin *et al.*, 2009).

- **Leucemia linfoblástica aguda**

As tiopurinas são fármacos usados no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, sendo metabolizadas pela tiopurina-metiltransferase (TPMT), cuja atividade determina a eficácia e a toxicidade destes fármacos (Shin *et al.*, 2009).

Doentes com uma deficiência hereditária na TPMT correm o risco de toxicidade hematopoiética grave quando expostos a doses padrão de tiopurinas. Assim, foi desenvolvido num hospital pediátrico dos Estados Unidos da América, no St. Jude Children's Research Hospital, um teste genético capaz de determinar os níveis de atividade da TPMT com base na variação alélica deste gene. O ajuste de doses é feito de acordo com o resultado do teste genético, podendo as doses ser diminuídas em 10 a 15 vezes em relação à dose padrão, permitindo assim que a tiopurina se torne tolerável e efetiva em indivíduos deficientes nesta enzima (McLeod & Silva, 2002).

- **Cancro do pulmão**

O cancro do pulmão é atualmente a primeira causa de morte com origem oncológica, o estado avançado em que a doença muitas vezes é diagnosticada permite uma taxa de sucesso de apenas 20 a 25%. Além disso, é um tipo de cancro que metastiza com facilidade para órgãos vitais como o cérebro, fígado e medula óssea (Dick, 2009).

Muitos doentes com cancro do pulmão das células pequenas não respondem por exemplo ao gefitinib, inibidor da tirosinacina, cujo alvo é o recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR). Além disso, muitas mutações têm sido descobertas no

gene que codifica o EGFR e que levam ao aumento da sinalização do fator de crescimento e conferem susceptibilidade ao inibidor. Estes resultados sugerem que as mutações no EGFR podem prever a sensibilidade ao gefitinib nos doentes com cancro do pulmão (Thorn *et al.*, 2007).

O cancro do pulmão tem por estas razões proporcionado uma extensa área de investigação no campo das alterações genéticas, tendo permitido a descoberta de marcadores moleculares preditivos de sensibilidade a regimes de quimioterapia, o que tem contribuído para um ligeiro aumento do tempo de vida destes doentes. Além das evidências referidas sobre as mutações no EGFR associadas a mutações no recetor da tirosina cinase, os níveis de expressão de marcadores genéticos como o ERCC1 (*Excision repair crosscomplementing rodent repair deficiency, complementation group 1*), RRM1 (*Ribonucleotide reductase M1 polypeptide*) e BRCA1 (*Breast Cancer 1*, pertencente à classe de genes supressores do tumor) podem ser também determinantes na resposta com outras terapêuticas como a cisplatina/gemcitabine (Danesi *et al.*, 2009).

Há por isso uma procura contínua neste campo clínico de forma a conseguir identificar biomarcadores genéticos que contribuam para uma melhor terapêutica e monitorização desta doença, tendo como objetivo o aumento da duração da vida dos doentes (Danesi *et al.*, 2009).

- **Doenças infecciosas**

O objetivo dos testes farmacogenómicos nas doenças infecciosas inclui a identificação de fatores genéticos envolvidos na disponibilidade do fármaco no organismo nas situações da ausência de resposta à terapêutica ou no caso em que ocorrem efeitos adversos.

A farmacogenómica tem também utilidade através de testes que permitem o estudo de agentes infecciosos, como o vírus da hepatite C e o papiloma vírus. No entanto, estes testes não são usados para avaliar características genéticas humanas, mas sim para detetar estirpes virais que são resistentes a um fármaco em particular.

A genotipagem do vírus da Hepatite C pode ter utilidade para determinar a duração do tratamento, enquanto outros testes como - o Digene's Hybrid Capture II - classificam o papiloma vírus de modo a estratificar as infeções em baixo e alto risco para desenvolver cancro do colo do útero (Evans *et al.*, 2003).

Nos doentes com patologias reumáticas, candidatos à terapêutica com tiopurinas é medido o nível de atividade da enzima TMPT. O pro-predictRx TMPT genetics® ajuda a determinar os doentes que poderão beneficiar da terapêutica com Imuran® (azatioprina, um imunodepressor) e a respetiva dose, uma vez que uma deficiência na produção da enzima TMPT poderá causar uma toxicidade potencialmente fatal (Evans, 2004)

- **Vírus da Imunodeficiência Humana- VIH**

A infeção por Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) é uma infeção grave para a qual estão disponíveis vários fármacos para o controlo da doença. No entanto, o tratamento é limitado pelos graves efeitos adversos e pelas resistências desenvolvidas ao longo do tempo numa grande parte dos doentes.

Na terapêutica antirretroviral já foram identificados alguns genes implicados no metabolismo, transporte e efeitos adversos. A identificação dos diferentes alelos destes genes pode colaborar na seleção da terapêutica e no ajuste da dose, resultando em tratamentos mais personalizados nestes doentes (Mallal *et al.*, 2008).

A questão da hipersensibilidade ao abacavir é um dos exemplos em que a farmacogenómica poderá ser efetiva. Este fármaco é um importante anti-retroviral (inibidor da guanósina transcriptase reversa), no entanto, na população caucasiana, 5 a 8% dos doentes com esta terapêutica poderão ter uma reação de hipersensibilidade caracterizada por febre, rash cutâneo, diarreias, náuseas, sintomas respiratórios, entre outros. Nestes casos, a administração do fármaco deve ser suspensa de imediato e não poderá ser recomeçada porque estes efeitos são potencialmente fatais (Ma *et al.*, 2007).

Em 2002 foi possível relacionar-se o gene HLA-B*5701 com as reações de hipersensibilidade ao abacavir. A identificação deste polimorfismo foi o resultado de

estudos de microtoxicidade e de análises sequenciais dos genes HLA-A, HLA-B e HLA-C. Este progresso levou à prévia genotipagem dos doentes antes destes serem submetidos à terapêutica, com o objetivo de reduzir o número de reações de hipersensibilidade associadas ao abacavir. Caso os indivíduos não possuam este polimorfismo, não se irão desenvolver sinais de reações de hipersensibilidade quando submetidos à terapêutica com este fármaco (Mallal *et al.*, 2008).

Este teste farmacogenético permite aos clínicos minimizar a probabilidade de surgir um efeito tóxico grave e específico de um determinado fármaco, contribuindo para uma terapêutica individualizada mais efetiva, confirmando utilidade em usar o alelo HLA-B*5701 como um biomarcador de rotina na prática clínica aquando da prescrição de abacavir (Mallal *et al.*, 2008).

- **Farmacogenómica e as enzimas do metabolismo**

Como citado no subcapítulo 3.1.2, as enzimas do Citocromo P450 são essenciais para o metabolismo de muitos fármacos e embora esta classe possua mais de cinquenta enzimas, apenas sete delas metabolizam 90% das drogas, sendo duas as mais significantes: CYP3A4 e CYP2D6. A variabilidade genética nessas enzimas pode influenciar a resposta dos pacientes à prescrição comum de certas classes de fármacos, incluindo betabloqueadores e antidepressivos.

A genotipagem prévia ao tratamento permitirá, ainda, que os pacientes considerados como metabolizadores intermédios, pobres, rápidos e ultrarrápidos sejam beneficiados por esse processo, reduzindo ou impedindo os efeitos adversos e/ou promovendo respostas clínicas positivas. Nos Estados Unidos testes genéticos já se encontram disponíveis, por exemplo, para definir os diferentes genótipos do gene VKORC1, responsável pelo metabolismo da varfarina, e do Citocromo P450: CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP1A2). O conhecimento da variação ao nível dos genes que codificam estas proteínas pode ajudar o médico a escolher a dose certa de determinado fármaco para o indivíduo em causa, evitando a exposição do doente a efeitos secundários marcados (Ingelman-Sundberg, 2004).

O teste da *Roche Diagnostic's*, o *AmpliChip P450®*, é uma opção já disponível e baseia-se na tecnologia microarrays. Analisa variações ao nível dos genes que codificam as famílias CYP2D6 e CYP2C19, responsáveis pelo metabolismo de fármacos muito utilizados como as benzodiazepinas, anti-epilépticos, antidepressivos, antipsicóticos, bloqueadores adrenérgicos de tipo β , entre outros. Analisa 27 variações alélicas no gene que codifica a família CYP2D6 e 3 variações alélicas para o gene que codifica a família CYP2C19 (Roche, 2008). Este teste permite dividir os indivíduos em metabolizadores lentos e metabolizadores extensos em relação ao CYP2C19, e em metabolizadores lentos, intermédios, extensos ou ultra-rápidos em relação ao CYP2D6 (Ingelman-Sundberg, 2004).

2- Casos em desenvolvimento

São vários os testes farmacogenómicos que estão atualmente em desenvolvimento tendo o objetivo de proporcionar melhores escolhas terapêuticas e mais efetivas em várias áreas clínicas.

O Ovanome®, da DNAPrint Genomics, é um teste genómico que deteta alelos SNPs que são associados à não resposta ao tratamento quimioterápico usado frequentemente em doentes com cancro do ovário (Taxol (paclitaxel)+Carboxiplatina) (Martin & Morrison, 2006).

A resposta à terapêutica com estatinas é também alvo do desenvolvimento de, pelo menos, dois testes farmacogenómicos. Estes testes têm como objetivo classificar os doentes, mediante a sua resposta terapêutica., avaliando as correlações com as variações genéticas (Chasman *et al.*, 2004).

Na área da psiquiatria, um outro estudo está a ser desenvolvido sobre as variações genéticas e a resposta à clozapina, em doentes com esquizofrenia, procurando-se identificar os indivíduos que têm maior suscetibilidade de desenvolver agranulocitose -

um dos efeitos secundários mais graves provocados pela utilização deste fármaco (Martin & Morrison., 2006).

Os doentes com hipertensão arterial são também um grupo que poderá vir a usufruir das potencialidades da farmacogenómica através da pré-prescrição de um teste que poderá permitir prever qual a terapêutica anti-hipertensiva que poderá ser mais efetiva (Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina, bloqueadores dos canais de cálcio, bloqueadores adrenérgicos de tipo β , diuréticos, entre outros). São vários os estudos que estão a ser desenvolvidos nesta área (Grant & Hakonarson., 2007).

V- Conclusão

A promessa da farmacogenómica em desvendar a base genética da variabilidade individual na resposta aos fármacos é construída sobre o sucesso da farmacogenética no estabelecimento das relações entre as mutações/polimorfismos e a variabilidade individual. Para além da farmacogenética, o rápido aglomerar de conhecimento sobre o sequenciamento do genoma aliado ao desenvolvimento de análises genéticas contribui para o progresso da farmacogenómica. A utilidade da farmacogenómica manifesta-se sobretudo na área da terapia medicamentosa traduzindo-se numa medicina individualizada e no desenvolvimento de novos medicamentos lidando com a variabilidade individual. Esta medicina personalizada caracteriza-se pela prescrição de um medicamento apropriado na dose certa para cada paciente a fim de se conseguir um benefício terapêutico máximo com os mínimos efeitos adversos. No entanto, ainda nos encontramos numa fase muito primitiva, uma vez que, dados clínicos para apoiar o uso de testes genéticos para o tratamento da maioria das doenças ainda não estão disponíveis. Descobrir uma alteração genética relevante, responsável por uma modificação na resposta terapêutica e desenvolver um teste que possa permitir a identificação desta situação, é um processo complexo que requer tempo e recursos. Em muitos casos, as reações adversas medicamentosas a uma terapia surgem num número muito reduzido de doentes tornado, assim, ainda mais complexo estabelecer uma relação entre um marcador genético e a resposta terapêutica. Assim que o “código” de genes que influenciam as respostas de drogas em seres humanos seja definido, será possível uma maior precisão em otimizar a terapia medicamentosa com base na capacidade de cada paciente para metabolizar, transportar e responder aos medicamentos. Em última análise, um banco de dados on-line seguro deve ser desenvolvido onde o perfil genético de cada indivíduo será armazenado e disponíveis para os médicos autorizados auxiliando as decisões de tratamento.

Os exemplos bem-sucedidos podem orientar futuras pesquisas na área da farmacogenómica aumentando assim, a sua aplicação na terapia. O aumento dos ensaios clínicos que avaliam a utilidade e custo-efetividade da genotipagem e da medicina

individualizada são fundamentais para orientar a prática clínica dos testes genéticos e tratamento individualizado

A farmacogenómica poderá assim oferecer o potencial de tornar a medicina mais efetiva, contribuindo para o aumento dos resultados terapêuticos e para a redução dos efeitos adversos, podendo trazer muitos ganhos para o sistema de saúde por diminuir, nomeadamente: o número de reações adversas e o número de ensaios clínicos com insucesso, o tempo que leva um fármaco a ser aprovado, o tempo de duração das terapêuticas e também de descoberta da terapêutica ideal para um doente. Ou seja, o desenvolvimento de drogas guiado pela farmacogenómica pode abrir as portas para o desenvolvimento de uma nova era com o objetivo de promover a eficácia, segurança e terapia individualizada de medicamentos de baixo custo.

VI- Bibliografía

- Adams, J. (2008) DNA sequencing technologies. *Nature Education* 1(1):193.
- Alberts, B. et al. (2002). The Structure and Function of DNA. In: Alberts, B. et al. (Ed.). *Molecular Biology of the Cell*.4. Nova Iorque, Garland Science.
- Ansorge W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. 25(4).
- Braslavsky, I., Hebert, B., Kartalov, E., and Quake, S.R. (2003) Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(7), 3960–3964.
- Brockmüller J., Tzvetkov MV.(2007). Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol*, 64(2),pp. 133-157.
- Chasman, D., et al. (2004) Pharmacogenetic Study of statin therapy and cholesterol reduction. *Journal American Medical Association*, Vol. 291, pp. 2821-27.
- Costa, F. F. (2007). Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*, 410, 9–17.
- Danesi, R., et al. (2009). Pharmacogenomics in non-small-cell lung cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 61, pp. 408-417.
- Dick, JE. (2009). Looking ahead in cancer stem cells. *Nat. Biotechnol.*, Vol. 27, pp. 44-46.
- Demick, D. (2006). Mitochondria – created to energize us. *Journal of Creation*, 20,pp. 10–12.
- Evans, W. E., Johnson, J. A.(2001). Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2, pp. 9-39.
- Evans, W. E., Howard, L., McLeod, D. (2003). Pharmacogenomics: Drug disposition, Drug Targets, and Side Effects. *New England Journal of Medicine*. 348, p. 6.

Evans, WE. (2004). Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. *Ther Drug Monit*, Vol. 26, pp. 186-91.

FDA, Administration Food and Drug. (2009). Innovation or stagnation: challenge and opportunity of the critical path to new medical product. [Em Linha]. Disponível em <www.fda.gov/oc/initiatives/critical_path/whitepaper.html>. [Consultado em 30/08/2014].

França, T. C., Carrilho, E. and Kist, B. L. (2002). A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics* 35, 2, pp. 169–200.

Frueh, FW, *et al.*(2008). Pharmacogenomic Biomarker Information in Drug Labels Approved by the United States Food and Drug Administration: Prevalence of Related Drug Use. *Pharmacotherapy*,28, pp. 9-92.

Gage, B. F., Lesko, L.J. (2008). Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *J Thromb Thrombolysis*, 25, pp. 45–51.

Grant, S., Hakonarson, H. (2007). Recent Development in Pharmacogenomics from Candidate Genes to Genome Wide Association Studies. *Future Drugs*. 2007, 7, pp. 371-393.

Griffiths, A.J.F. (2013). DNA sequencing 2013. *Encyclopædia Britannica Online*. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/422006/DNA-sequencing>>. [Consultado em 30/11/2013].

Gurwitz, D. Rehavi, M. (2005). Pharmacogenetics: towards personalized medicine. *Harefuah*, 144(10), 711--6.

Husain, A., *et al.* (2007). Clinical Pharmacogenetics in Pediatric Patients. *Future Medicine*, 8, 1403-11.

Hutchison, C. A., 3rd (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res*, 35, 6227-37.

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

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

Ingelman-Sunberg, M. (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 116, 496–526

Ingelman-Sunberg, M. (2008) Pharmacogenomic Biomarkers for Prediction of Severe Adverse Drug Reactions. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 358, pp. 637-39.337

Kalow, W. (2002). Pharmacogenetics and personalised medicine. *Fundam Clin Pharmacol*. 16, p.337.

Kester, M. *et al.* (2008) Farmacologia- Série de formação básica integrada. Rio de Janeiro, Mosby Elsevier.

Kim, M.J., Huang, S.M., Meyer, U.A., Rahman, A., Lesko, L.J. (2009). A regulatory science perspective on warfarin therapy: a pharmacogenetic opportunity. *J Clin Pharmacol*, 49, pp. 138–146

Kircher, M. e Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays*, 32, pp. 524-536.

Kirchheiner, J. and Seeringer, A. (2006). Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 489–494

Kollek R., *et al.* (2006). Pharmacogenetics, adverse drug reactions and public health. *Community Genetics*, 9, pp. 50-54.

Lima, I. *et al.* (2004). Farmacogenética do tratamento da depressão: busca de marcadores moleculares de boa resposta aos antidepressivos. *Rev. psiquiatr. clín.*; 31(1).

Ma, Q., *et al.* (2007) Advances in Pharmacogenomics of Antiretrovirals: an Update. *Future Medicine*, Vol. 8, pp. 1169-78.

Mallal, S., *et al.* (2008). HLA-B*55701 - Screening for Hypersensitivity to Abacavir. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 358, pp. 568-79.

MammaPrint. (2007). Breast Cancer [Em Linha]. Disponível em <<http://www.mammaprintco.uk/index.html>>. [Consultado em 21/09/2014].

Mardis, E. R. (2008b). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, pp. 387-402.

Martin, P. e Morrison, M. (2006). Realising the Potencial of Genomic Medicine. Institute for the Study of Genetics, Biorisks and Society, University of Nottingham. London :Royal Pharmaceutical Society of Great Britain.

Maxam, A. M., Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 560-4.

McDermott, U. *et al.*, (2011). Genomics and the Continuum of Cancer Care. *New England Journal of Medicine*. 364, pp. 340-350.

Mcginn, S., Gut, I. G. (2012). DNA sequencing - spanning the generations. *N Biotechnol*.

McLeod, HL, Silva, C. (2002) The thiopurine S-methyltransferase gene locus - implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*, Vol. 3, pp. 89-98.

Metzger, I. F., Souza-Costa, D. C., Tanus-Santos, J. E. (2006) Pharmacogenetic: Principles, applications and perspectives. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 39 (4), pp. 515-521.

Moran, C., Thornburg, C., Barfield, R. (2011) Ethical considerations for pharmacogenomic testing in pediatric clinical care and research. *National Institute of Health*. 12(6), pp. 889–895.

NHGRI (1). Deoxyribonucleic Acid (DNA) [Em Linha]. Disponível em <<http://www.genome.gov/25520880>>. [Consultado em 30/11/2013].

NHGRI (2). The Human Genome Project Completion [Em Linha]. Disponível em <<http://www.genome.gov/11006943>>. [Consultado em 30/11/2013].

Niedringhaus, T. P., Milanova, D., Kerby, M. B., Snyder, M. P. e Barron, A. E. (2011). Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anal Chem*, 83. 4327-41.

NIH. Biographical Sketch of Francis S. Collins, M.D., [Em Linha]. Disponível em <<http://www.nih.gov/about/director/directorbio.htm>>. Consultado em 05/09/2014]

Niu, D. and Jiang, L. (2012) Can ENCODE tell us how much junk DNA we carry in our genome? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430, 1340–1343

Pacif Biosciences (2014). SMRT Technology. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.pacificbiosciences.com/products/smrt-technology/>>. Consultado em 05/09/2014

Pareek, C. S., Smoczynski, R. e Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*, 52, pp. 413-435.

Pfizer. (2014). Medicina Personalizada [Em Linha]. Disponível em <<https://www.pfizer.pt/Medicina-personalizada-V%C3%ADdeo-224.aspx>>. [Consultado em 05/09/2014].

Plosker, GL. e Keam, SJ. (2006). Trastuzumab: a review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer. *Drugs*, 66, pp. 449-475.

Portin, P. (2002). Historical Development of the Concept of the Gene. *Journal of Medicine and Philosophy*, 27, pp. 257-286.

Qiang, M. & Lu, A. (2011). Pharmacogenetics, Pharmacogenomics, and Individualized Medicine. *Pharmacol Rev* 63, pp. 437– 459.

Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P. e Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13, p. 341.

Rettie, AE., Tai, G. (2006). The pharmacogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine. *Mol Interv*, 6, pp. 23 – 227.

Roche, (2008) AmpliChip Package Insert. [Em Linha]. Disponível em <http://amplichip.us/documents/Amplichip_CYP450_Test_Package_Insert.pdf> [Consultado em 01/09/2014].

Ronaghi M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing, *Genome Res.* 11, pp. 3-11.

Sanger, F., Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNAbly primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94, 441-8.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Sciences U S A*, 74, 5463-7.

Schmedders M., *et al.* (2003). Individualized pharmacogenetic therapy: a critical analysis. *Community Genetics*, 6, pp. 114-119.

Schleif, R. (1993). *Genetics and Molecular Biology*. United States of America, The Johns Hopkins University Press Baltimore and London.

Shastry, BS. (2005). Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J.*, 6, pp. 16-21.

Shin, J., *et al.* (2009). Pharmacogenetics: from discovery to patient care. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 66, pp. 625-637.

Sim, S.C., Kacevska, M. e Ingelman-Sundberg, M. (2013). Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *The Pharmacogenomics Journal*, 13, pp. 1-11.

Snustad, P., Simmons, M.J. e Jenkins, J.B.(1997). Definitions of the Gene. In: Snustad, P., Simmons, M.J. e Jenkins, J.B. (Ed.). *Principles Of Genetics*. Nova Iorque, John Wiley & Sons, pp.1-29.

Spellberg, B., Powers, J., Brass, E., Miller, L. e Edwards, J. (2004). Trends in Antimicrobial Drug Development:Implications for the Future. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 1279–86.

Suarez-Kurtz, G. (2004) Farmacogenómica: a genética dos medicamentos. *Instituto Ciência Hoje*. vol. 35, nº 208.

Thorn, C.F., *et al.* (2007). Pathway-Based Approaches to Pharmacogenomics. *Current Pharmacogenomics*, 5, pp. 76-86.

Tomalik-Sharte, D., Lazar, A., Fuhr, U. e Kirchheiner, J. (2006). The Clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *The Pharmacogenomics Journal*.8, pp. 4-15.

Twyman R. (2003). Mutation or polymorphism?. [Em Linha]. Disponível em < http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020780.html>.[Consultado em 21/09/2014].

WebMD, (2011). Living with Chronic Myelogenous Leukemia. [Em Linha]. Disponível em < <http://www.webmd.com/cancer/cml-treatment-14/slideshow-what-to-expect>>.[Consultado em 05/09/2014].

Wright, A.F. (2001). Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. *Encyclopedia of life sciences*.Edinburgh, John Wiley & Sons.

Zhang J., Chiodini R., Badr A., Zhang G. (2001). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics*. 38, pp. 95-109.

Zuckerandl, E., Cavalli, G. (2006) Combinatorial epigenetics, “junk DNA”, and the evolution of complex organisms. *Gene - section functional genomics*, 390, 232–242