



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS
*CYP2C19*2* E *CYP2C19*17* NA RESPOSTA AO TRATAMENTO À
CLOZAPINA NA ESQUIZOFRENIA**

AGOSTINHO TAVARES SEMEDO

GOIÂNIA-GO

2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

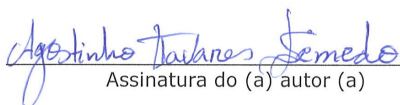
Nome completo do autor: Agostinho Tavares Semedo

Título do trabalho: Avaliação da influência dos polimorfismos *CYP2C19*2* e *CYP2C19*17* na resposta ao tratamento à clozapina na esquizofrenia

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 22 / 02 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

AGOSTINHO TAVARES SEMEDO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS
CYP2C19*2 E CYP2C19*17 NA RESPOSTA AO TRATAMENTO À
CLOZAPINA NA ESQUIZOFRENIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini
Coorientador: Dr. Rodrigo Bernini De Brito

**GOIÂNIA-GO
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Tavares Semedo, Agostinho
Avaliação da influência dos polimorfismos CYP2C19*2 e CYP2C19*17 na resposta ao tratamento à clozapina na esquizofrenia [manuscrito] / Agostinho Tavares Semedo. - 2017.
xi, 55 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini; co-orientador Dr. Rodrigo Bernini de Brito.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2017.

Bibliografia.
Inclui siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. esquizofrenia. 2. clozapina. 3. polimorfismos. 4. CYP2C19. 5. refratariedade. I. Ghedini, Paulo César, orient. II. Título.

CDU 57



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 455**

2 Aos vinte e dois dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezessete, às
3 catorze horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II da
4 Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca
5 examinadora: Prof. Dr. Paulo César Ghedini, Profa. Dra. Raphaela de Castro
6 Georg, Profa. Dra. Nádia Aparecida Bérghamo e Dr. Rodrigo Bernini de Brito
7 para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado,
8 procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada "Avaliação da
9 Influência dos Polimorfismos CYP2C19*2 e CYP2C19*17 na Resposta ao
10 Tratamento à Clozapina na Esquizofrenia", em nível de mestrado, área de
11 concentração em Farmacologia e Fisiologia, de autoria de **Agostinho Tavares**
12 **Semedo**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
13 Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a
14 apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida
15 ao autor da dissertação que em cerca de 30 minutos procedeu à
16 apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da
17 banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial.
18 Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-
19 se em vista o que consta na Resolução nº1340 de 2015 do Conselho de
20 Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa
21 de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi APROVADA,
22 considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção
23 do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás.
24 A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da
25 dissertação na Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas
26 pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa.
27 Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 05 minutos,
28 encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Renato César Rodrigues,



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

29 Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de
30 Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata
31 que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca
32 examinadora em três vias de igual teor.

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

Prof. Dr. Paulo César Ghedini
Presidente da Banca
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Nádia Aparecida Bérghamo
Universidade Federal de Goiás

Dr. Rodrigo Bernini de Brito
Universidade Federal de Goiás

Toda a boa dádiva e todo o dom perfeito vêm do alto, descendo do Pai das luzes, no Qual não há mudança nem sombra de variação.

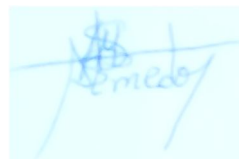
Tiago 1:17 (Bíblia Sagrada)

Dedicatória

À **JEOVÁ DEUS**, pois é dele, por ele e para ele toda a honra, glória e sabedoria.

À minha amada **SOFIA** e nosso filho **JADSON AUGUSTO**, por todo sacrifício e sonos perdidos, todavia, unidos por um único amor. Vós sois a razão da minha luta, dádiva de Deus para mim. I love you.

À toda família e amigos



Agradecimentos

«Toda a boa dádiva e todo o dom perfeito vêm de Deus (...) (Tiago 1:17)» Então, Deus deve estar no centro de todos os nossos agradecimentos. Obrigado santificado pai, Jeová Deus, por toda a benignidade imerecida que venho recebendo da sua parte, pela proteção, benção, companheirismo e infinito amor demonstrado. Que o seu santo nome seja sempre glorificado e reconhecido em todas as nações da terra, amén.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo César Ghedini**, por ter me sugerido este desafio de abraçar e desenvolver este projeto, pela paciência, disponibilidade e imprescindível colaboração em toda esta caminhada. Tem sido para além do professor, orientador, um grande conselheiro em todo este processo, Deus lhe abençoe.

Ao meu Coorientador, **Dr. Rodrigo Bernini De Brito**, pela importante colaboração técnica, clínico e psiquiátrico, pontos fundamentais no desenvolvimento deste projecto.

Ao grande colega e amigo, **Thiago Sardinha** que humildemente com a sua esposa **Lanussy Sardinha** e toda a família, me acolheram nos seus lares e me apoiaram neste processo de integração, Deus vos abençoe.

À toda minha família, amigos que tanto perto como distantes souberam me transmitir energia positiva e excelentes incentivos ao longo deste percurso.

Aos colegas do Laboratório que calorosamente me receberam e me ajudaram na minha integração, de destacar a **Ayda Malaver** pelas valiosas instruções na realização dos experimentos laboratoriais, **Luanna Fernandes, Thiago Sardinha, Amanda Bastos, Bruna Souza, Frederico, Lis Raquel, Guilherme Luis, Hericles Mesquita, Hiasmin Nery e Christielle Rodrigues**.

Aos irmãos africanos, provenientes de Cabo Verde, Moçambique, Guiné-Bissau, Benin, Nigéria, Angola, República Democrática do Congo, entre outros, por este ambiente de africanidade, “irmandade” e convivência que tivemos ao longo deste percurso. “**Mama Africa nos bersu i nos bilida d’odju**”.

Aos pacientes com esquizofrenia e seus familiares, pois, constituem o pilar e principal motivo deste trabalho. Bem haja a saúde e uma vida digna para eles.

À CAPES, CNPq e FAPEG pelo incentivo através da bolsa e auxílios à pesquisa

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. Introdução.....	1
1.1- Esquizofrenia	1
1.2- Antipsicóticos	2
1.2.1- Clozapina	3
1.3. <i>CYP2C19</i>	6
1.3.1- Generalidades.....	6
1.3.2 – Distribuição das frequências alélicas.....	8
1.3.3- Polimorfismos genéticos da <i>CYP2C19</i>	10
2. Objectivos.....	16
2.1. Geral.....	16
2.2. Específicos.....	16
3- Material e Métodos.....	17
3.1- Sujeito de estudo.....	17
3.2- Genotipagem.....	18
3.2.1- Pacientes.....	18
3.2.2- Controle.....	21
3.3- Análise estatística.....	23
4- Resultados.....	24
4.1- Dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes em estudo.....	24
4.2- Frequências do grupo dos pacientes esquizofrênicos e o controle.....	25
4.3- Relação de frequências entre o grupo dos pacientes com ER e ESR.....	26
4.4- Relação de frequências dos pacientes com ER e o grupo Controle	27
4.5- Relação de frequências dos pacientes com ESR e o grupo Controle.....	28

4.6- Relação dos genótipos e fenótipos com a refratariedade.....	29
4.7-Média da dose diária de clozapina entre os fenótipos.....	30
4.8- Dados clínicos e sociodemográficos com a refratariedade.....	31
5- Discussão.....	32
6-Conclusão.....	36
Referências.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SQZ	Esquizofrenia
CLZ	Clozapina
5HT2A	Receptor de serotonina 5-hidroxytriptamina
APGs	Antipsicóticos de primeira geração
ASGs	Antipsicóticos de segunda geração
ER	Esquizofrenia refratária
ESR	Esquizofrenia super-refratária
EPS	Efeitos extrapiramidais
ME	Metabolizador extensivo
MI	Metabolizador intermediário
MU	Metabolizador ultra-rápido
ML	Metabolizador lento
DSM V – TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
FDA	Food and Drug Administration
BPRS	Brief Psychiatric Rating Scale
IMC	Índice de Massa corporal
M \pm EP	Média \pm erro padrão
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction Fragment Length polymorphism
EDTA	Ethylene diamine-tetra-acetic acid
HS	Homozigoto selvagem
HM	Homozigoto mutado
HT	Heterozigoto
DNA	Desoxyribonucleic acid
SPSS	Statistical Package for Social Sciences

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da Clozapina (C ₁₉ H ₁₈ N ₄ Cl)	3
Figura 2. Grau de afinidade e interação de clozapina com diferentes receptores.....	4
Figura 3. Localização do gene <i>CYP2C19</i> no braço longo do cromossomo 10.....	7
Figura 4. Estrutura do gene <i>CYP2C19</i> constituído por 9 exons.....	7
Figura 5. Ilustração da ação de enzima <i>CYP2C19</i> na reação da N-desmetilação da CLZ.....	8
Figura 6. Tamanho do fragmento de DNA referente ao polimorfismo <i>CYP2C19*2</i>	18
Figura 7. Tamanho do fragmento de DNA referente ao polimorfismo <i>CYP2C19*17</i> ..	19
Figura 8. Eletroesferograma ilustrando o polimorfismo <i>CYP2C19*2</i>	21
Figura 9. Eletroesferograma ilustrando o polimorfismo <i>CYP2C19*17</i>	21
Figura 10. Fragmentos de DNA observados após a digestão enzimática referentes ao polimorfismo <i>CYP2C19*2</i>	23
Figura 11. Fragmentos de DNA observados após a digestão enzimática referentes ao polimorfismo <i>CYP2C19*17</i>	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alelos identificados da <i>CYP2C19</i>	12
Tabela 2. Condições de PCR para o polimorfismo <i>CYP2C19</i> *2.....	19
Tabela 3. Condições de PCR para o polimorfismo <i>CYP2C19</i> *17.....	19
Tabela 4. Condições da reação de sequenciamento.....	20
Tabela 5. Características dos produtos de PCR após digestão.....	22
Tabela 6. Dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes em estudo.....	24
Tabela 7. Frequências do grupo dos Pacientes esquizofrênicos e o Controle.....	25
Tabela 8. Relação de frequências entre o grupo dos pacientes com ER e ESR.....	26
Tabela 9. Relação de frequências dos pacientes com ER e o grupo Controle.....	27
Tabela 10. Relação de frequências dos pacientes com ESR e o grupo Controle.....	28
Tabela 11. Relação dos genótipos e fenótipos com a refratariedade.....	29
Tabela 12. Média da dose diária de clozapina entre os fenótipos.....	30
Tabela 13. Dados clínicos e sociodemográficos com a refratariedade.....	31

RESUMO

A clozapina (CLZ) é um antipsicótico de escolha no tratamento de esquizofrenia refratária (ER). No entanto, cerca de 30% dos pacientes não respondem adequadamente à este antipsicótico, sendo considerados super-refratários ao tratamento (ESR). Sabe-se que polimorfismos genéticos nas enzimas do citocromo *P450* podem influenciar o metabolismo das drogas, interferindo na variabilidade individual de resposta terapêutica. Sendo a *CYP2C19* uma enzima altamente polimórfica e com a segunda maior participação no metabolismo da CLZ, o presente estudo visou analisar as influências dos polimorfismos *CYP2C19*2* e **17* na resposta ao tratamento à este antipsicótico. O estudo incluiu 69 pacientes diagnosticados com esquizofrenia e 137 indivíduos saudáveis como controle. Utilizou-se a técnica de sequenciamento na genotipagem dos pacientes e a restrição enzimática (RFLP-Restrição Fragment Length Polymorphism) para o controle. Os resultados mostraram uma maior distribuição do polimorfismo *CYP2C19*17* no grupo dos pacientes em comparação ao grupo controle. O polimorfismo *CYP2C19*2* teve uma maior distribuição no grupo dos pacientes com ER em comparação aos pacientes com ESR. O polimorfismo *CYP2C19*17* em heterozigose (*CYP2C19*1/*17*) estava associado à maior dose de CLZ em politerapia e resposta terapêutica menos eficiente no grupo dos pacientes com ESR, enquanto que a *CYP2C19*2* em heterozigose estava associado à menor dose de CLZ em monoterapia e à boa resposta terapêutica nos pacientes com ER. Notou-se também uma associação da média da dose diária de CLZ, da gravidade sintomatológica (BPRS) e dos indivíduos do sexo feminino à super-refratariedade de resposta ao tratamento à clozapina tendo esses parâmetros uma maior distribuição no grupo dos pacientes com esquizofrenia super-refratária. Esses achados sugerem que outras estratégias de tratamento sejam avaliadas para os pacientes portadores do polimorfismo *CYP2C19*17* diagnosticados com ESR, sobretudo os do sexo feminino. Futuros estudos com amostras mais alargadas seriam relevantes para dar uma maior consistência a esses achados.

Palavras-chave: Esquizofrenia, Clozapina, Polimorfismos, *CYP2C19* e refratariedade

ABSTRACT

Clozapine (CLZ) has been an antipsychotic of choice in treatment refractory schizophrenia (TRS). However, around 30% of the patients do not respond appropriately to this antipsychotic, being in this way, super-refractory schizophrenia (SRS). Genetic polymorphisms from cytochrome *P450 enzymes* can influence the metabolism of drugs and individual variability therapeutic response. Considering *CYP2C19* a polymorphic enzyme with second major participation in the metabolism of CLZ, the aim of the present study was to analyse the influence of *CYP2C19*2* and **17* polymorphisms in the response to the treatment to CLZ. The present study included 69 schizophrenic patients and 137 healthy individuals as a control group. Genotyping test and analysis of polymorphisms was done using sequencing technique and enzymatic restriction (RFLP) for patients and control's group respectively. The results showed a major distribution of *CYP2C19*17* polymorphism in patients's group in comparison to control's group. The *CYP2C19*2* polymorphism was significantly higher in patients with TRS than to patients with SRS. The *CYP2C19*17* polymorphism in heterozygous (*CYP2C19*1/*17*) was associated to higher clozapine's doses in polytherapy and less efficient therapeutic response in SRS patients's group, while the *CYP2C19*2* was associated to lower clozapine's doses in monotherapy and good therapeutic response in TRS patients's group. In addition, parameters like daily mean clozapine dose, symptoms severity according to Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) and female individuals were also associated to super-refractoriness response to CLZ having a major distribution in SRS patients's group. These findings suggest that new treatment strategies must be evaluated for the patients carriers of *CYP2C19*17* polymorphism with SRS, above all the female individuals. Future studies with larger sample should be relevant to give more consistence to these findings.

Key words: Schizophrenia, Clozapine, Polymorphisms, *CYP2C19* and Refractoriness

1. Introdução

1.1- Esquizofrenia

A esquizofrenia (SQZ) é um transtorno mental grave com uma prevalência mundial aproximada de 1%, atingindo cerca de 27 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América. Não parece distinguir raça, sexo ou idade, mas manifesta-se geralmente no final da fase da adolescência, caracterizada classicamente por um conjunto de sintomas, subdivididas em dois grandes grupos: os positivos como alucinações (sobretudo auditivas e cenestésicas) e delírios (persecutórios e de grandeza); e negativos, como diminuição de concentração e atenção, embotamento afetivo com perda de contato com a realidade, causando disfunção social crônica [1].

No Brasil a prevalência da esquizofrenia está na ordem dos 0,8% correspondendo cerca de 1,6 milhão de indivíduos. A maioria dos pacientes com este transtorno (81,5%) é assistida em serviços públicos de saúde, porém cerca de 71% não recebem um tratamento regular [2, 3].

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM V – TR considera como sendo esquizofrenia, quando no mínimo dois ou mais sintomas positivos estão presentes e persistentes, com duração de pelo menos um mês, e também a presença de pelo menos um sintoma negativo com uma persistência de seis meses [4].

No que diz respeito à etiologia deste transtorno, ainda não completamente esclarecida, sabe-se que indivíduos com SQZ apresentam uma taxa de 80% de probabilidade de transmiti-la aos seus filhos, evidenciando, deste modo, a participação da herança genética [5]. A exposição a fatores exógenos, como infecções virais, hipóxia e má nutrição durante o desenvolvimento fetal, parece também influenciar o surgimento da doença [6].

Todavia, a sua fisiopatologia é caracterizada por um conjunto de desequilíbrios de neurotransmissores presentes em diferentes regiões do sistema nervoso central, envolvendo a dopamina, a serotonina e seus respectivos receptores que parecem estar implicados na complexidade da doença quando presentes em níveis alterados. Neste sentido, surgiram algumas hipóteses na tentativa de explicar a etiologia da esquizofrenia, entre as quais, a dopaminérgica, uma das mais antigas, proposta por Carlson em 1970 e fundamentada na ideia de que o aumento do nível de dopamina e

da sua atividade na região mesolímbica, estimulados pelos agonistas dos seus receptores (substâncias psicoativas como cocaína e anfetaminas) produzem sintomas parecidos aos sintomas positivos da esquizofrenia [7].

Uma hiperfunção dopaminérgica na via mesolímbica e a interação com os receptores D2 seriam os responsáveis pelos sintomas positivos; os sintomas negativos estão associados a uma hipofunção dopaminérgica na via mesocortical com uma ativação ineficiente dos receptores D1 da dopamina [8].

Os antipsicóticos constituem a primeira linha de tratamento deste transtorno. Todavia, estes não constituem o único suporte de tratamento, mas são o seu foco principal, devido à eficácia na melhoria dos sintomas psicóticos. Outros tratamentos como a psicoterapia e a terapia ocupacional são aconselhados, uma vez que a farmacoterapia antipsicótica não cobre todo o espectro sintomatológico da SQZ. Profissionais de saúde e familiares devem trabalhar em conjunto para aumentar a qualidade de vida dos pacientes, desenvolvendo estratégias individualizadas e baseadas na prática clínica [9, 10].

1.2- Antipsicóticos

Os antipsicóticos constituem a opção principal no tratamento da esquizofrenia. Eles são classificados de acordo com as suas características químicas, melhoria de sintomas psicóticos e efeitos adversos em dois grupos principais: 1-antipsicóticos típicos ou de primeira geração (APGs) tais como a clorpromazina, o haloperidol; 2-antipsicóticos atípicos ou de segunda geração (ASGs) tais como a clozapina, a olanzapina, risperidona, quetiapina entre outros [11].

O uso de antipsicóticos no tratamento da esquizofrenia iniciou-se em 1952 com a introdução de clorpromazina descoberta em 1950 [12]. No final da década de 50, foi descoberto o haloperidol, um outro antipsicótico típico capaz de promover melhorias dos sintomas positivos da esquizofrenia, à semelhança de clorpromazina [13].

Embora os APGs apresentem melhorias dos sintomas positivos da SQZ, por terem em sua grande parte alta afinidade com os receptores D2 de dopamina, acabam ocupando um número para além do necessário desses receptores resultando em efeitos adversos. Estudos reportaram a associação desses antipsicóticos aos efeitos extrapiramidais (EPS em inglês), tais como o parkinsonismo (rigidez articular,

salivação, tremores), a discinesia tardia (movimento orofacial persistente, distonia, acatisia, tics) e acinesia (diminuição motora), entre outros [14].

Cerca de 20 - 30% dos pacientes diagnosticados corretamente com esquizofrenia e tratados rigorosamente com APGs ou mesmo com ASGs, exceto clozapina, em monoterapia por pelo menos duas etapas de tratamento no mínimo de seis semanas não apresentam melhorias satisfatórias de sintomas, constituindo assim grupo de pacientes com esquizofrenia refratária (ER), suscitando novas estratégias de tratamento para este grupo de indivíduos [15].

Neste sentido, no início da década de 70, foi descoberta a clozapina (CLZ) que, diferentemente dos APGs, não promovia catalepsia, sintomas EPS e nem a elevação de prolactina, apresentando efeitos benéficos sobre os sintomas positivos e negativos da esquizofrenia, sendo considerado um antipsicótico atípico ou de segunda geração indicado no tratamento da esquizofrenia refratária [16, 17].

1.2.1- Clozapina

A clozapina (Figura 1) é uma benzodiazepina tricíclica de baixo peso molecular (326,13g), indicado no tratamento de pacientes com esquizofrenia refratária, ou que esteja em risco de cometer suicídio ou que apresentam comportamentos agressivos. Em termos farmacocinético ela constitui um antipsicótico com uma taxa de absorção entre 90-95%, alcança o pico máximo no plasma cerca de duas horas após a sua administração, com um tempo médio de 12 horas de duração no organismo, cujos metabólitos resultantes da biotransformação N-desmetil clozapina (norclozapina) e o N-óxido podem ser excretados tanto através da urina como nas fezes [18].

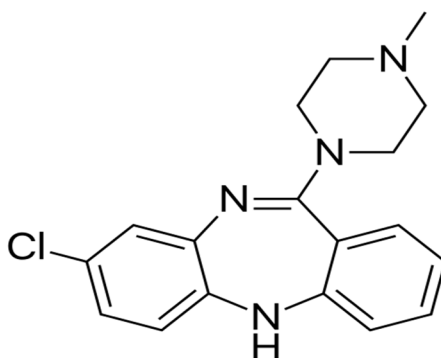


Figura 1. Estrutura molecular da Clozapina (C₁₉H₁₈N₄Cl).

Fonte: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2239220>

Em termos farmacodinâmico a clozapina é capaz de se ligar tanto a receptores inibitórios como excitatórios de vários neurotransmissores, podendo a sua ação ser de forma agonista ou antagonista, conforme o nível de afinidade e de eficácia demonstrada em cada ligação, tendo como principais alvos os receptores de dopamina e de serotonina. A CLZ é antagonista parcial do receptor D2 da dopamina, agonista parcial do receptor dopaminérgico D1 e do receptor 5HT_{1A} de serotonina, antagonista dos receptores de serotonina 5HT_{2A/C}, agonista dos receptores colinérgicos muscarínicos M1 e M3 (excitatórios), agonista parcial dos receptores M2 e M4 (inibitórios), antagonista dos receptores adrenérgicos α – 1(excitatório) e α -2 (inibitório) e é antagonista do receptor de histamina H1 (excitatório), [19] Figura 2.

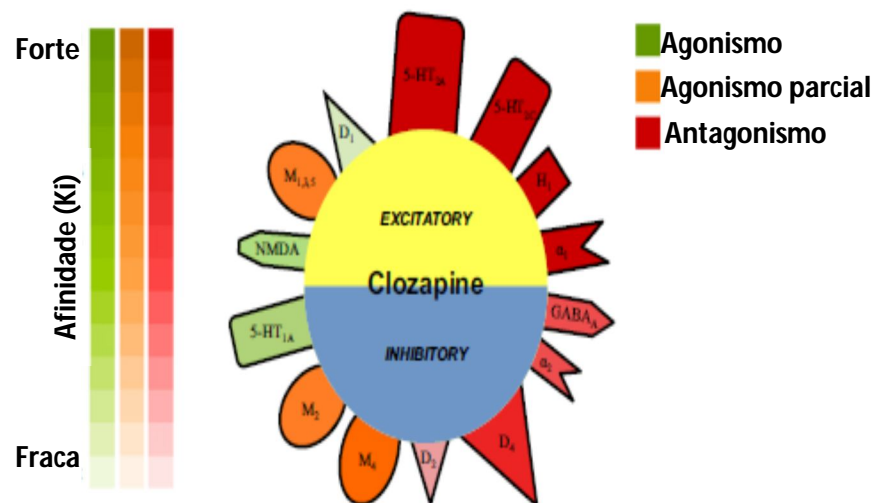


Figura 2. Grau de afinidade e interação de clozapina com diferentes receptores, mecanismo de ação (agonismo/antagonismo/agonismo parcial). Observa-se uma interação agonista de CLZ com os receptores D1 da dopamina e 5-HT_{1A} da serotonina o que resulta na ligação e ativação total desses receptores. Nota –se uma interação de agonismo parcial entre a CLZ e os receptores colinérgicos muscarínicos M2, M4 o que resulta numa ligação e ativação parcial desses receptores. Todavia, verifica-se uma interação antagonista entre a CLZ e os receptores da família D2 de dopamina, serotoninérgicos 5-HT_{2A/C}, histamínico H1 e alfa adrenérgicos α_1 e α_2 o que resulta na ligação e bloqueio desses receptores.

Fonte: O’Connor WT. O’Shea SD.(2015), adaptado [19]

O uso da CLZ na metade da década de 70 foi associado à agranulocitose, tendo-se relatado a morte por agranulocitose de 8 pacientes na Finlândia, motivo pelo qual a sua utilização foi interrompida [20]. No entanto, em 1988, Kane e seus

colaboradores demonstraram a superioridade da CLZ em relação à clorpromazina no tratamento dos pacientes com esquizofrenia refratária [21]. Esta superioridade foi associada à capacidade da CLZ de bloquear os receptores D2 na região mesolímbica, reduzindo a hiperatividade dopaminérgica resultando na melhoria dos sintomas positivos e pela capacidade de estimular a ativação dos receptores D1 da dopamina na região mesocortical, aumentando a atividade dopaminérgica nesta região o que resulta na melhoria dos sintomas negativos da esquizofrenia.

Por esta razão, em 1990 ela foi aprovada nos Estados Unidos como o protótipo da nova classe de antipsicóticos atípicos e, em 2002, a *Food and Drug Administration (FDA)* aprovou seu reingresso no mercado para o uso exclusivo em casos de esquizofrenia refratária e em pacientes com altos riscos de cometerem suicídio, persistência de hostilidade e agressividade [20]. Entretanto, verificou-se que cerca de 30% dos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento à CLZ em monoterapia após um período de seis meses de tratamento, constituindo o grupo de pacientes com esquizofrenia super-refratária (ESR) [22, 23] levando ao questionamento sobre os possíveis fatores envolvidos nesta ausência de resposta ou resposta ineficiente à clozapina.

Múltiplos fatores, incluindo estado de saúde, influências ambientais e características genéticas podem influenciar a resposta à drogas. A farmacogenética é uma área da farmacologia que visa avaliar como as diferenças genéticas entre indivíduos podem afetar a resposta à drogas [24], visando auxiliar o profissional de saúde na seleção e melhor ajuste de doses de diferentes drogas no tratamento com base no perfil genético do indivíduo. A pesquisa nesta área tem focado principalmente em efeito dos genes isolados, buscando identificar genes que predisponham à doenças; modulem respostas aos medicamentos; afetem a farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos ou que estejam associados a reações adversas a medicamentos [25].

As diferenças quanto às respostas terapêuticas entre os indivíduos geralmente estão associadas com polimorfismos genéticos presentes em genes que afetam a farmacocinética ou a farmacodinâmica [26]. Polimorfismo genético é conhecido como um conjunto de alterações que ocorrem na sequência nucleotídica de DNA seja por substituição de uma base única (SNPs- Single Nucleotide Polymorphism), por repetições de determinada sequência específica de nucleotídeos, seja por deleção ou

inserção de uma base na sequência. No genoma humano ocorre cerca de 3.1 milhões de SNPs [27].

Tais polimorfismos podem alterar a expressão e/ou a atividade de sítios de ligação de medicamentos [28], por afetarem a estabilidade do RNA mensageiro correspondente, ou modificarem a estrutura conformacional da proteína correspondente. Como consequência, essas alterações podem levar à redução ou aumento da atividade da proteína codificada [29]. Um número considerável de evidências sugere que SNPs em genes que codificam transportadores de medicamentos, enzimas metabolizadoras de medicamentos ou envolvidas na biossíntese e reparo do DNA, poderiam determinar a eficácia dos medicamentos e sua toxicidade [30].

Muitos medicamentos clinicamente utilizados, são metabolizados essencialmente pelas enzimas da família do citocromo P450, cujos genes exibem polimorfismos genéticos [31, 32]. As enzimas *CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* participam no metabolismo da CLZ [33].

Entre os estudos que visam avaliar a associação entre polimorfismos de isoenzimas do *CYP 450* e a resposta ao tratamento à clozapina, foi demonstrado recentemente pelo grupo ao qual este estudo está vinculado, a associação do polimorfismo *CYP1A2*1F* com a esquizofrenia super-refratária [34]. Sabendo-se que posteriormente à *CYP1A2*, a isoenzima *CYP2C19* apresenta a segunda maior participação no metabolismo deste antipsicótico [33], torna-se evidente a necessidade de avaliar a influência de variantes polimórficas da *CYP2C19* na resposta ao tratamento à clozapina.

1.3. *CYP2C19*

1.3.1- Generalidades

A *CYP2C19* foi originalmente descrita como gene hidroxilase de mefenitoina por Kupfer [35] em 1979. Este nome foi escolhido, pois, a enzima produzida por este gene, mostrava um papel importante e necessário na hidroxilação de mefenitoina. Como esta enzima pertence também à família das enzimas do citocromo *P450*, sofreu uma alteração no nome, passando a ser referida como citocromo *2C19* (*CYP2C19*), ou simplesmente enzima *2C19* [36]. A *2C19* constitui um gene da subfamília *CYP2C*, localizada no braço longo do cromossomo 10 (10q24.1-q24.3), composto por 90.209 nucleotídeos ou 90.2 kilobases, contendo também na sua estrutura nove exons com

1.473 nucleotídeos e codifica uma proteína composta por 490 aminoácidos (Figuras 3 e 4, respectivamente) [36].

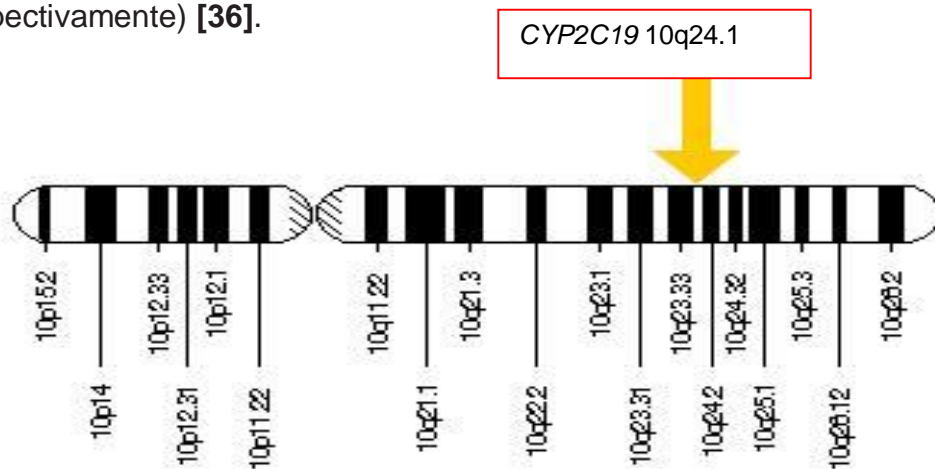


Figura 3. Localização do gene *CYP2C19* no braço longo do cromossomo 10, especificamente na região 2 banda 4 sub-banda 1 (10q24.1).

Fonte: Mrazek DA. (2010) [36].

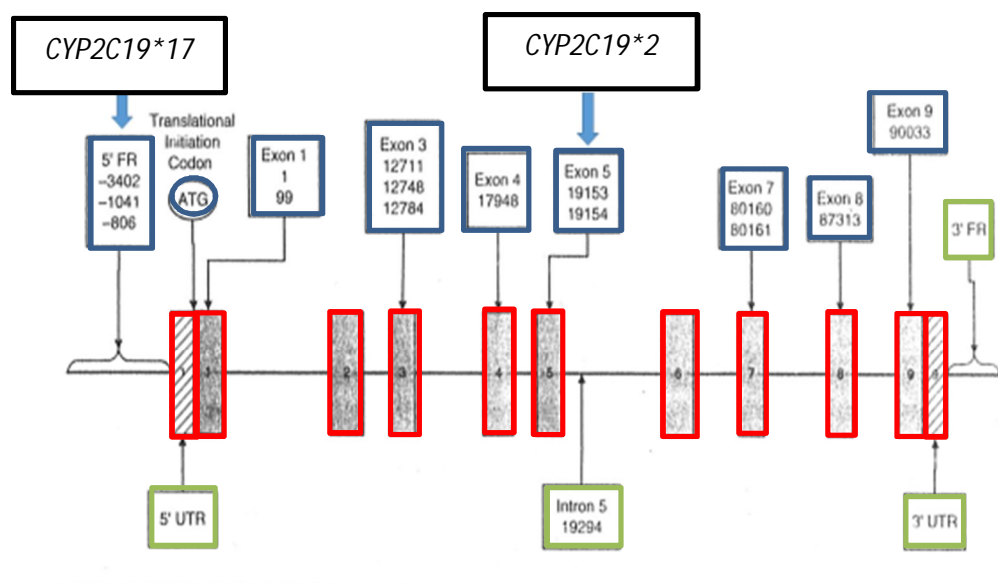


Figura 4. Estrutura do gene *CYP2C19* constituído por 9 exons. Pode –se observar a localização do polimorfismo *CYP2C19*2* (fragmento de 223 pares de bases (pb)), resultante da substituição de uma guanina (g) por uma adenina (a) na posição nucleotídica 19154 do exon 5. Observa-se também o polimorfismo *CYP2C19*17* (fragmento de 470pb), resultante da substituição de uma citosina (c) por uma timina (t) na posição nucleotídica -806 da região flanqueadora ou promotora do gene.

Fonte: Mrazek DA.(2010), adaptado [36].

Em termos metabólicos, esta enzima tem um papel primário no metabolismo de mais de 50 medicamentos disponíveis, incluindo antiplaquetários (clopidogrel), inibidores de bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol), ansiolíticos (diazepam) e antidepressivos tricíclicos (amitriptalina, clomipramina) [36]. A *CYP2C19* tem a segunda maior participação no metabolismo de CLZ, juntamente com a *CYP1A2* e *CYP2D6*, sobretudo, na N-desmetilação da qual resulta a norclozapina, um metabólito terapeuticamente ativo que irá desencadear a sua ação farmacológica no sistema nervoso central (Figura 5) [33].

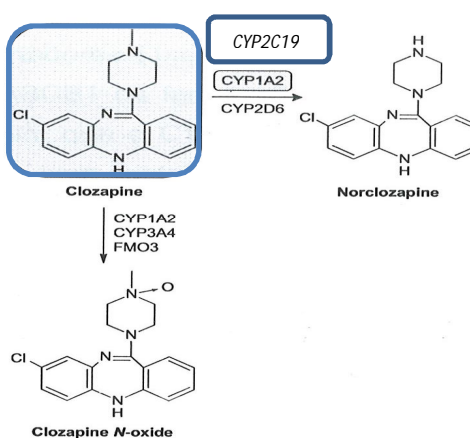


Figura 5. Ilustração da ação da enzima *CYP2C19* na reação da N-desmetilação da CLZ. Nesta reação a clozapina perde um grupo metílico (CH_3) resultando assim a norclozapina que é um metabólito terapeuticamente ativo. Desta reação participam enzimas como *CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP2C9* e *CYP2D6* sendo a estimativa de contribuição distribuída em 30%, 24%, 22%, 12% e 6%, respectivamente, em relação a N-desmetilação de clozapina em microssomas de fígado humano. Outra reação por que passa a CLZ é a N-oxidação que é catalisada pela *CYP3A4*, *CYP1A2* e flavina contendo mono-oxigenase do tipo 3 (FMO3).

Fonte: Olesen Ole V. Linnet K. (2001), adaptado [33].

1.3.2 – Distribuição das frequências alélicas

A frequência alélica populacional da *CYP2C19* apresenta variação étnica bastante diversificada. Alguns estudos demonstram a presença mais comum do alelo mutado *CYP2C19*2* em caucasianos e chineses na ordem de 9 a 37% [37,38,39,40]. O alelo mutado *CYP2C19*3* tem a frequência de 10 % entre os chineses, porém, é extremamente raro na população não- asiática e entre os africanos [41,42].

Estudo desenvolvido por Xie e colaboradores reportou substancial variação da *CYP2C19* em quatro grupos populacionais extensivamente estudados: 1- Norte

Europeia; 2- Etiópia; 3- África Sub-Sahariana e 4- China. Tal análise evidenciou uma menor frequência dos alelos inativos *CYP2C19*2* e *CYP2C19*3* na população Norte Europeia do que na Chinesa. Apenas 2% dos pacientes Norte Europeus eram metabolizadores lentos ou pobres e 26% eram metabolizadores intermediários para esta enzima sendo evidenciado que nesta população, o tratamento psiquiátrico deve reduzir a dose de medicamentos metabolizados por esta enzima para cerca de um quarto dos seus pacientes [43].

Neste mesmo estudo, verificou-se também uma distribuição substancial e similar do alelo *CYP2C19*17* para cerca de 18% das populações Norte Europeia e da Etiópia o que demonstra a necessidade de aumento de dose para esses grupos de pacientes, a fim de alcançar a eficácia terapêutica. No entanto, uma frequência baixa do alelo *CYP2C19*17* (4%) foi observada na população Chinesa, quando comparada ao alelo *CYP2C19*2* (31%). Cerca de 25% dos pacientes Chineses são metabolizadores lentos e, precisam de uma dose menor que a convencional para que acumulação sérica e efeitos adversos sejam evitados. Um ligeiro aumento dos alelos inativos *CYP2C19*2* e *CYP2C19*3* foram também observados na população da África Sub-Sahariana quando comparados à Norte Europeia [43].

Um estudo na população brasileira sobre a intervariação étnica da *CYP2C19* desenvolvida por Santos e colaboradores entre os Ameríndios, descendentes Caucásios, Mulatos e descendentes Africanos relatou uma frequência de 10,4%, 16,9%, 16,5% e 20,2%, respectivamente para o alelo *CYP2C19*2* e 15,8%; 18,0%; 21,3% e 26,3%, respectivamente para o alelo *CYP2C19*17* sem no entanto, detectar um único alelo para *CYP2C19*3*. Esses resultados demonstraram uma presença substancial de ambos polimorfismos na população brasileira, sendo o alelo *CYP2C19*17* ligeiramente maior, sobretudo nos mulatos e descendentes africanos [44].

A variação na distribuição de frequências alélicas desta enzima entre as populações tem influência direta na capacidade metabólica dos pacientes no que diz respeito às drogas metabolizadas por esta enzima, sendo a presença do alelo inativo *CYP2C19*2* em homozigose associado ao metabolismo lento e em heterozigose ao metabolismo intermediário e o alelo *CYP2C19*17* ao metabolismo ultra-rápido. Sendo assim, polimorfismos genéticos desta enzima devem ser considerados em tratamentos psiquiátricos de forma a minimizar os efeitos adversos e alcançar a eficácia terapêutica.

1.3.3- Polimorfismos genéticos da *CYP2C19*

O gene *CYP2C19* é altamente polimórfico, sendo que atualmente já se encontram descritos 35 alleles (disponível em <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>, acessado em 14.01.2017), Tabela 1 [45]. Polimorfismos genéticos deste gene permitem uma classificação fenotípica dos indivíduos em quatro grupos de metabolizadores: (1) Metabolizadores normais ou extensivos (ME) - aqueles portadores dos dois alelos ativos normais (*CYP2C19**1/*1); (2) Metabolizadores intermediários (MI) - os que carregam um alelo ativo normal e um alelo inativo mutado (*CYP2C19**1/*2); (3) Metabolizadores lentos ou pobres (ML) - aqueles que tem dois alelos inativos mutados (*CYP2C19**2/*2) e, (4) Metabolizadores ultra-rápidos (MU) - os que possuem alelo ativo mutado *CYP2C19**17 seja em homozigose (*CYP2C19**17/*17) ou em heterozigose com alelo ativo normal (*CYP2C19**1/*17) [36]. Todavia, os indivíduos portadores do genótipo combinado (*CYP2C19**2/*17) por terem uma capacidade metabólica superior ao do metabolizador lento e inferior ao do extensivo foram incluídos no grupo dos metabolizadores intermediários MI, em conformidade com estudos de Sychev e colaboradores e de Payan e colaboradores [46,47].

Indivíduos considerados ME demonstram boa reação a dose padrão ou convencional de droga e alcançam eficácia terapêutica sem uma observância significativa de efeitos adversos. Os ML demonstram uma capacidade metabólica reduzida, e em tais indivíduos uma dose menor que a convencional é aconselhada de forma a evitar efeitos adversos por acumulação sérica. Para os MI aconselha-se uma dose menor que a convencionalmente aplicada, porém maior que a dos ML para alcançar a eficácia terapêutica. No entanto, os MU precisam de um aumento controlado da dose, superior ao convencional a fim de evitar falha terapêutica [36].

Os alelos *CYP2C19**2 e *CYP2C19**3 estão associados à redução da atividade enzimática e ao metabolismo lento o que resulta na acumulação sérica e efeitos colaterais [48,49]. O alelo *CYP2C19**17 está associado ao aumento da atividade enzimática e ao metabolismo ultra-rápido, pelo que a avaliação da falha terapêutica deve ser considerada [50].

O polimorfismo *CYP2C19**2 (G>A, rs4244285) resulta da substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição nucleotídica 19154 no exon 5 e está associado à redução da atividade enzimática da *CYP2C19*. Os indivíduos portadores

deste polimorfismo seja em homozigose ($*2/*2$) como em heterozigose ($*1/*2$ ou $*2/*17$) apresentam uma reduzida atividade metabólica, sendo neste caso recomendado uma dose menor de medicamentos do que a convencionalmente aplicada para evitar acumulação sérica e efeitos adversos [48,49].

O polimorfismo *CYP2C19**17 (-806 C>T, rs12248560) ocorre em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo -3402 C>T e resulta da substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição nucleotídica -806 da região promotora do gene, diretamente associado ao aumento da atividade enzimática da *CYP2C19*, o que pode levar à falha terapêutica. Os indivíduos portadores deste polimorfismo, em heterozigose ($*1/*17$) ou homozigose ($*17/*17$) são indicados a terem um aumento de dose dos medicamentos objetivando o alcance da eficácia terapêutica [50].

Como já referido a atividade enzimática pode ser alterada devido aos polimorfismos genéticos que ocorrem nas suas variantes alélicas, podendo assim interferir na resposta terapêutica à determinados medicamentos. Todavia, alguns estudos tem também demonstrado a participação de outros fatores, tais como o consumo de café e de cigarro na alteração da atividade de algumas enzimas da família do citocromo *P450*, podendo desta forma influenciar a resposta ao tratamento à determinados fármacos cujos metabolismos dependem dessas enzimas. Hagg e colaboradores reportaram que a ingestão diária de cafeína em doses de 400 a 1000mg interferem na atividade da enzima *CYP1A2* inibindo o metabolismo e a eliminação da clozapina [51]. Outros estudos desenvolvidos por Spina e colaboradores tem reportado também esta relação da cafeína com o metabolismo da clozapina [52].

Meyer relatou no seu estudo o aumento da concentração de clozapina em pacientes fumantes que haviam deixados de fumar, com ocorrência de efeitos colaterais, aconselhando deste modo um ajuste de dosagem tendo em conta o perfil do paciente (fumante crônico, fumante esporádico ou se é um paciente que está deixando de fumar) [53]. Outros estudos reportaram a nicotina como um indutor da *CYP1A2* tendo observado presença de maiores concentrações plasmática de clozapina em pacientes não fumantes em comparação aos pacientes fumantes [54].

Estudos tem reportado uma associação do polimorfismo *CYP2C19**2 em homozigose à alta taxa de mortalidade por infarte miocárdico entre os pacientes não fumantes tratados com clopidogrel, em comparação aos pacientes fumantes, demonstrando que o consumo de cigarro estaria debilitando a ação deste

polimorfismo e contribuiu para o aumento da capacidade metabólica da enzima nos fumantes, diminuindo assim a mortalidade neste grupo [55].

Alguns estudos tem reportado uma maior associação dos indivíduos do sexo feminino à menor resposta à clozapina, aumentando assim a sua proporção no grupo dos pacientes com esquizofrenia super-refratária [56].

Tendo em conta uma presença substancial dos polimorfismos *CYP2C19*2* e *CYP2C19*17* na população brasileira e a segunda maior participação da *CYP2C19* no metabolismo da clozapina, o presente estudo visou analisar as influências desses polimorfismos na resposta ao tratamento à este antipsicótico nos pacientes com esquizofrenia refratária e super-refratária. Para além disso, avaliou - se também as possíveis associações dos parâmetros: gravidade sintomatológica conforme a escala BPRS, o tempo de uso de CLZ, o índice de massa corporal (IMCs) a idade e o sexo com a refratariedade de resposta ao tratamento à este antipsicótico.

Tabela 1. Alelos identificados da *CYP2C19*

Alelos	Mudança de nucleotídeo		Atividade enzimática		Referências
	cDNA	Gene	In Vivo	In Vitro	
<i>CYP2C19*1A</i>	Nenhuma	Nenhuma	Normal	Normal	Romkes et al, 1991
<i>CYP2C19*1B</i>	<u>99C>T; 991A>G</u>	<u>99C>T; 80161A>G</u>	Normal		Richardson et al, 1997
<i>CYP2C19*1C</i>	<u>991A>G</u>	<u>80161A>G</u>	Normal		Blaisdell et al, 2002
<i>CYP2C19*2A</i>	<u>99C>T; 681G>A</u> <u>;990C>T; 991A>G</u>	<u>99C>T; 19154G>A; 80160C>T;80161A>G (12662A>G</u>	Nenhuma		de Morais et al, 1994a
<i>CYP2C19*2B</i>	<u>99C>T; 276G>C</u> <u>681G>A; 990C>T;991A>G</u>	<u>99C>T; 12460G>C; 19154G>A;80160C>T; 80161A>G (12662A>G</u>	Nenhuma		Ibeanu et al, 1998b
<i>CYP2C19*2C</i>	<u>99C>T; 481G>C</u> <u>681G>A; 990C>T;991A>G</u>	<u>98T>C; 99C>T; 12122G>A;12662A>G; 12834G>C; 19154G>A;19520A>G; 57740C>G; 79936T>A; 80160C>T; 80161A>G</u>			Fukushima-Uesaka et al., 2005
<i>CYP2C19*2D</i>	<u>99C>T; 681G>A</u> <u>;990C>T; 991A>G; 1213G>A</u>	<u>98T>C; 99C>T; 12662A>G;19154G>A; 57740C>G; 80160C>T;80161A>G; 87275G>A</u>			Lee et al., 2009
<i>CYP2C19*2E</i>	<u>99C>T; 681G>A</u> <u>; 813G>A; 990C>T;991A>G</u>	<u>99C>T; 19154G>A; 19286G>A;80160C>T; 80161A>G (12662A>G</u>			Hu et al., 2012

CYP2C19*2F	<u>99C>T; 681G>A</u> ;990C>T; 991A> <u>G;1021G>A</u>	<u>99C>T; 19154G>A; 80</u> <u>160C>T;80161A>G;</u> 80191G>A (12662A>G)			<u>Hu et al., 2012</u>
CYP2C19*2G	<u>99C>T; 681G>A</u> ;990C>T; 991A> <u>G;1079A>T</u>	<u>99C>T; 19154G>A; 80</u> <u>160C>T;80161A>G;</u> 80249A>T (12662A>G)			<u>Hu et al., 2012</u>
CYP2C19*2H	<u>99C>T; 681G>A</u> ;990C>T; 991A> <u>G;1186C>G</u>	<u>99C>T; 19154G>A; 80</u> <u>160C>T;80161A>G;</u> 87248C>G (12662A>G)			<u>Hu et al., 2012</u>
CYP2C19*2J	<u>9C>T; 681G>A;</u> <u>990C>T; 991A></u> <u>G;1261A>C</u>	<u>99C>T; 19154G>A; 80</u> <u>160C>T;80161A>G;</u> 87323A>C (12662A>G)			<u>Hu et al., 2012</u>
CYP2C19*3A	<u>636G>A; 991A></u> <u>G; 1251A>C</u>	<u>17948G>A; 80161A>G;</u> <u>87313A>C</u>	Nenhuma		<u>de Moraes et al,</u> <u>1994b</u>
CYP2C19*3B	<u>636G>A; 991A</u> <u>>G;1078G>A; 1</u> <u>251A>C</u>	<u>889T>G; 12013T>G; 1</u> <u>2122G>A;12306G>A; 1</u> <u>3166T>C; 17948G>A;1</u> <u>8911A>G; 80161A>G</u> <u>80248G>A;87313A>C</u>	Nenhuma		<u>Fukushima-Uesaka et</u> <u>al., 2005</u>
CYP2C19*3C	<u>407T>A; 636G></u> <u>A;991A>G;</u> <u>1251A>C</u>	<u>12760T>A; 17948G>A;</u> <u>80161A>G;87313A>C</u>			<u>Hu et al., 2012</u>
CYP2C19*4A	<u>1A>G; 99C>T, 9</u> <u>91A>G</u>	<u>1A>G; 99C>T; 80161A</u> <u>>G</u>	Nenhuma		<u>Ferguson et al, 1998</u>
CYP2C19*4B	<u>1A>G; 99C>T, 9</u> <u>91A>G</u>	<u>-3402C>T; -</u> <u>806C>T; 1A>G; 99C>T</u> <u>;80161A>G</u>	Nenhuma		<u>Scott et al., 2011</u> <u>Zackrisson et al.,</u> <u>2010</u>
CYP2C19*5A	<u>1297C>T</u>	<u>90033C>T</u>	Nenhuma	Nenhuma	<u>Xiao et al, 1997</u> <u>Ibeanu et al, 1998a</u>
CYP2C19*5B	<u>99C>T; 991A>G</u> ; <u>1297C>T</u>	<u>99C>T; 80161A>G; 90</u> <u>033C>T</u>	Nenhuma		<u>Ibeanu et al, 1998a</u>
CYP2C19*6	<u>99C>T; 395G>A</u> ;991A>G	<u>99C>T; 12748G>A; 80</u> <u>161A>G</u>	Nenhuma	Nenhuma	<u>Ibeanu et al, 1998b</u>
CYP2C19*7		<u>19294T>A</u>	Nenhuma		<u>Ibeanu et al, 1999</u>
CYP2C19*8	<u>358T>C</u>	<u>12711T>C</u>	Nenhuma	Diminui	<u>Ibeanu et al, 1999</u>
CYP2C19*9	<u>99C>T; 431G>A</u> ;991A>G	<u>99C>T; 12784G>A; 80</u> <u>161A>G</u>		Diminui	<u>Blaisdell et al, 2002</u>
CYP2C19*10	<u>99C>T; 680C>T;</u> <u>991A>G</u>	<u>99C>T; 19153C>T; 80</u> <u>161A>G</u>		Diminui	<u>Blaisdell et al, 2002</u>
CYP2C19*11	<u>99C>T; 449G>A</u> ;991A>G	<u>99C>T; 12802G>A; 80</u> <u>161A>G</u> R150H (12802G>A) pode			<u>Blaisdell et al, 2002</u> <u>Skierka and Black,</u> <u>2014</u>

		existir em ligação com CYP2C19*'2s' -98T>C e 12662A>G			
CYP2C19*12	<u>99C>T</u> ; <u>991A>G</u> ; <u>1473A>C</u>	<u>99C>T</u> ; <u>80161A>G</u> ; <u>90209A>C</u>		Instável	<u>Blaisdell et al, 2002</u>
CYP2C19*13	<u>991A>G</u> ; <u>1228C>T</u>	<u>80161A>G</u> ; <u>87290C>T</u>			<u>Blaisdell et al, 2002</u>
CYP2C19*14	<u>50T>C</u> ; <u>99C>T</u> ; <u>91A>G</u>	<u>50T>C</u> ; <u>99C>T</u> ; <u>80161A>G</u>			<u>Blaisdell et al, 2002</u>
CYP2C19*15	<u>55A>C</u> ; <u>991A>G</u>	<u>55A>C</u> ; <u>80161A>G</u>			<u>Blaisdell et al, 2002</u>
CYP2C19*16	<u>1324C>T</u> Existência de polimorfismo CYP2C19*2 681 G>A no mesmo alelo não pode ser excluído	<u>90060C>T</u>			<u>Morita et al, 2004</u>
CYP2C19*17	<u>99C>T</u> ; <u>991A>G</u>	<u>-3402C>T</u> ; <u>806C>T</u> ; <u>99C>T</u> ; <u>80161A>G</u>	Aumenta	Aumento na transcrição	<u>Sim et al., 2006</u> <u>Rudberg et al., 2007</u> <u>Sibbing et al., 2010</u>
CYP2C19*18	<u>99C>T</u> ; <u>986G>A</u> ; <u>991A>G</u>	<u>99C>T</u> ; <u>80156G>A</u> ; <u>80161A>G</u> ; <u>87106T>C</u>			<u>Fukushima-Uesaka et al., 2005</u>
CYP2C19*19	<u>99C>T</u> ; <u>151A>G</u> ; <u>991A>G</u>	<u>99C>T</u> ; <u>151A>G</u> ; <u>80161A>G</u> ; <u>87106T>C</u>			<u>Fukushima-Uesaka et al., 2005</u>
CYP2C19*20					
CYP2C19*21					
CYP2C19*22	<u>557G>C</u> ; <u>991A>G</u>	<u>17869G>C</u> ; <u>80161A>G</u>			<u>Matimba et al., 2009</u>
CYP2C19*23	<u>99C>T</u> ; <u>271G>C</u> ; <u>991A>G</u>	<u>99C>T</u> ; <u>12455G>C</u> ; <u>80161A>G</u>			<u>Zhou et al., 2009</u>
CYP2C19*24	<u>99C>T</u> ; <u>991A>G</u> ; <u>1004G>A</u> ; <u>1197A>G</u>	<u>99C>T</u> ; <u>80161A>G</u> ; <u>80174G>A</u> ; <u>87259A>G</u>			<u>Zhou et al., 2009</u>
CYP2C19*25	<u>99C>T</u> ; <u>991A>G</u> ; <u>1344C>G</u>	<u>99C>T</u> ; <u>80161A>G</u> ; <u>90080C>G</u>			<u>Zhou et al., 2009</u>
CYP2C19*26	<u>99C>T</u> ; <u>766G>A</u> ; <u>991A>G</u>	<u>99C>T</u> ; <u>19239G>A</u> ; <u>80161A>G</u>			<u>Lee et al., 2009</u>
CYP2C19*27	<u>991A>G</u>	<u>-1041G>A</u> ; <u>80161A>G</u>		Diminui expressão	<u>Drögemöller et al., 2010</u>
CYP2C19*28 (Preliminar)	<u>55A>C</u> ; <u>991A>G</u> ; <u>1120G>A</u>	<u>-2030C>T</u> ; <u>-2020C>A</u> ; <u>-1439T>C</u> ; <u>55A>C</u> ; <u>80161A>G</u> ; <u>80290G>A</u>			<u>Drögemöller et al., 2010</u>
CYP2C19*29	<u>83A>T</u> ; <u>99C>T</u> ; <u>91A>G</u>	<u>83A>T</u> ; <u>99C>T</u> ; <u>80161A>G</u>			<u>Hu et al., 2012</u>

CYP2C19*30	217C>T	12401C>T			<u>Hu et al., 2012</u>
CYP2C19*31	99C>T; 232C>T;991A> G	99C>T; 12416C>T; 80161A>G			<u>Hu et al., 2012</u>
CYP2C19*32	99C>T; 296A>G;991A> G	99C>T; 12480A>G; 80161A>G			<u>Hu et al., 2012</u>
CYP2C19*33	99C>T; 562G>A;991A> G	99C>T; 17874G>A; 80161A>G			<u>Hu et al., 2012</u>
CYP2C19*34	-13G>A; 7C>T; 10T>C	-13G>A; 7C>T; 10T>C			<u>Chua et al., 2013</u>
CYP2C19*35	99C>T; 562G>A; 991A>G	99C>T; 12662A>G;80161A>G		Nenhuma	Chaudhry et al., 2015

De entre os 35 alelos descritos apenas a CYP2C19*1 constitui o alelo normal. Alguns alelos polimórficos como a CYP2C19*2, *3, *4, *8, *9, *10, *27 estão associados à diminuição da expressão enzimática. O alelo CYP2C19*12 está associado à instabilidade da atividade enzimática, sem no entanto, especificar se aumenta ou diminui a sua atividade. Apenas o alelo polimórfico CYP2C19*17 está associado ao aumento da atividade enzimática.

Fonte: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>

2. Objetivos

2.1. Geral

- Analisar a influência dos polimorfismos *CYP2C19*2* e *CYP2C19*17* na resposta ao tratamento à clozapina em pacientes esquizofrênicos refratários e super-refratários.

2.2. Específicos

- Determinar as frequências genótípicas, alélicas e fenotípicas do grupo de pacientes esquizofrênicos comparando-as com o grupo controle
- Verificar a relação dos dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes com a refratariedade de resposta ao tratamento à clozapina.

3- Material e Métodos

3.1- Sujeito de estudo

O presente estudo incluiu 69 pacientes diagnosticados com esquizofrenia de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – quarta edição (DSM IV – TR em inglês), na Clínica Psiquiátrica Brain Institute e Pax Clínica Psiquiátrica – Instituto de Neurociências, na cidade de Goiânia, GO – Brasil, obedecendo os seguintes critérios:

a) Critérios de inclusão

- Maiores de 18 anos;
- Em tratamento com clozapina há pelo menos um ano com dosagem estável;
- Remissão da fase aguda da doença;
- Redução mínima de 20% na pontuação inicial na escala psiquiátrica de medição de sintomas (BPRS- Brief Psychiatric Rating Scale em inglês).

b) Critérios de exclusão

- Presença de uma doença clínica grave;
- Medicação concomitante com outros medicamentos que interferem no metabolismo da CLZ;
- Incapacidade mental;
- Abuso ou dependência de bebidas alcoólicas ou substâncias psicoativas;
- Gravidez e lactação.

Como grupo controle foram utilizadas amostras sanguíneas de 137 indivíduos saudáveis naturais do estado de Goiás e residentes na cidade de Goiânia.

Os dados clínicos e sociodemográficos (dose, pontuações sintomáticas na escala BPRS, idade, índice de massa corporal e sexo) dos pacientes foram obtidos a partir dos respectivos prontuários disponibilizados pelos centros clínicos donde foram recrutados.

Todos os procedimentos experimentais assim como o termo de consentimento livre e esclarecido dos indivíduos participantes do estudo, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás sob parecer nº 1.483.734.

3.2- Genotipagem

3.2.1- Pacientes

A genotipagem do grupo dos pacientes foi feita através da técnica de sequenciamento. Após a coleta da amostra de sangue, procedeu-se a extração do DNA genômico, usando Kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Um fragmento de 223 pares de base (pb) para o polimorfismo *CYP2C19*2* (G>A, rs4244285) foi amplificado através da reação de cadeia polimerase (PCR em inglês) com primers especificamente desenhado para o presente estudo sendo Forward: CAACCAGAGCTTGGCATATTGTATC e Reverse: TAAAGTCCCGAGGGTTGTTG, (Figura 6).

```

caa cca gag ctt ggc ata ttg tat cta tac ctt tat taa atg ctt tta att taa taa
att att gtt ttc tct tag ata tgc aat aat ttt ccc act atc att gat tat ttc ccg
gga acc cat aac aaa tta ctt aaa aac ctt gct ttt atg gaa agt gat att ttg gag
aaa gta aaa gaa cac caa gaa tcg atg gac atc aac aac cct egg gac tta

Forward: caa cca gag ctt ggc ata ttg tat
Reverse: caa caa ccc tcg gga ctt ta
Polimorfismo: g

```

Figura 6: Tamanho do fragmento de DNA utilizado no presente estudo referente ao polimorfismo *CYP2C19*2* (G>A, 223pb; rs4244285). O polimorfismo resulta da substituição de guanina (g) por adenina (a) na posição nucleotídica 19154 no exon 5. Esta mutação resulta de um *splicing* deficiente que conduz ao término precoce da síntese enzimática. O alelo polimórfico resultante (*CYP2C19*2*) é inativo e está associado à perda da atividade enzimática (Loss-Of-function) [36].

Um fragmento de 470 pb para o polimorfismo *CYP2C19*17* (C>T, rs12248560) foi amplificado de acordo com a metodologia descrita por Anichavezhi e colaboradores (2012) [57], tendo como Forward: GCCCTTAGCACCAAATTC e Reverse: ATTTAACCCCCTAAAAAAAACG, (Figura 7).

ttc tca agc cct tag cac caa att ctc	tga gat cag ctc ttc ctt cag tta cac tga
gcg ttt ccc ctc tgc agt gat gga gaa ggg aga act ctt att ttt tct cat gag cat	
ctc tgg ggc tgt ttt cct tag ata aat aag tgg ttc tat tta atg tga agc ctg ttt	
tat gaa cag gat gaa tgt ggt ata tat tca gaa taa cta atg ttt gga agt tgt ttt	
ggt ttg cta aaa caa agt ttt agc aaa cga ttt ttt ttt tca aat ttg tgt ctt ctg	
ttc tca aag cat ctc tga tgt aag aga taa tgc gcc acg atg ggc atc aga aga cct	
cag ctc aaa tcc cag ttc tgc cag cta tga gct gtg tgg cac caa cag gtg tcc tgt	
tct ccc agg gtc tcc ctt ttc cca ttt gaa ata taa aaa ata aca att cct gcc ttc	
acg tgt ttt ttt agg ggg tta aat	ggt aaa ggt gtt tat atc tgc taa ggt aat tta
ctt gat ata tgt ttg gtt att gaa gat	
Forward: gcc ctt agc acc aaa ttc tc	
Reverse: cgt gtt ttt tta ggg ggt taa at	
Polimorfismo: c	

Figura 7: Tamanho do fragmento de DNA utilizado no presente estudo referente ao polimorfismo *CYP2C19*17* (C>T, 470pb; rs12248560). O polimorfismo resulta da substituição de citosina (c) por timina (t) na posição nucleotídica -806 na região promotora do gene. O alelo polimórfico resultante (*CYP2C19*17*) é ativo e está associado ao ganho da função enzimática (Gain-Of-Function) [36].

As condições PCR para os dois polimorfismos estão descritas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Condições de PCR para o polimorfismo *CYP2C19*2*

Reagentes	[Final]	Volume	Ciclagem
Buffer (10X)	1X	5.0µl	95°C – 2min
DNTPs (10mM)	0.4mM	2.0µl	95°C – 1min
Primer (20µM)	0.6µM	1.3µl	56°C – 1min
MgCL ₂ (50mM)	2.0mM	2.0µl	72°C – 1.5min
Água (H ₂ O)	****	37.4µl	72°C – 3min
Taq polimerase 5U/ul	0.03u	0.3µl	4°C - ∞
DNA (amostra)	5 ng/µl	2.0µl	

Tabela 3. Condições de PCR para o polimorfismo *CYP2C19*17*

Reagentes	[Final]	Volume	Ciclagem
Buffer (10X)	1X	5.0µl	94°C – 1min
DNTPs (10mM)	0.12mM	0.6µl	94°C – 30sec
Primer (20µM)	0.6µM	1.1µl	52°C – 30sec
MgCL ₂ (50mM)	2.5mM	2.5µl	72°C – 30sec
Água (H ₂ O)	****	37.4µl	72°C – 7min
Taq polimerase 5U/ul	0.04u	0.4µl	4°C - ∞
DNA (amostra)	5 ng/µl	3.0µl	

Os produtos de PCR de ambos os polimorfismos foram purificados, usando o kit ilustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE healthcare). Em seguida, foi feita a reação de sequenciamento através do Kit Big Dye terminator 3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, USA), conforme as condições descritas na Tabela 4. As amostras foram analisadas pelo sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Califórnia, USA).

Tabela 4. Condições da reação de sequenciamento

Reagentes	Volume	Ciclagem
BigDye terminator v3.1	1.5µl	96°C – 1min
Buffer BigDye v.3.1 (5X)	1.25µl	96°C – 10sec
Iniciador/Primer (5µM)	1.0µl	56°C – 5sec
DNA purificado (50ng/µl)	1.5µl	60°C – 4min
Água ultrapura	4.75µl	4°C - ∞
TOTAL	10µl	

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado segundo a metodologia de etanol gelado e Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético (EDTA- ethylene diamine tetra-acetic acid em inglês) 125mM. As sequências resultantes foram analisadas através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2.5.0). Alguns exemplos de eletroesferogramas representados nas figuras 8 e 9.

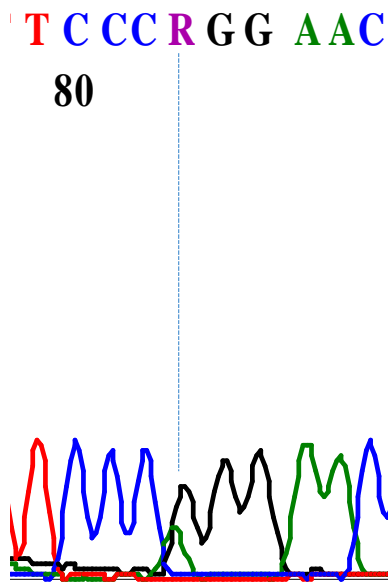


Figura 8. Eletroesferograma ilustrando o polimorfismo *CYP2C19*2* em heterozigose representado pela letra R indicando neste caso as bases guanina (g) e adenina (a) sendo esta a base mutada.

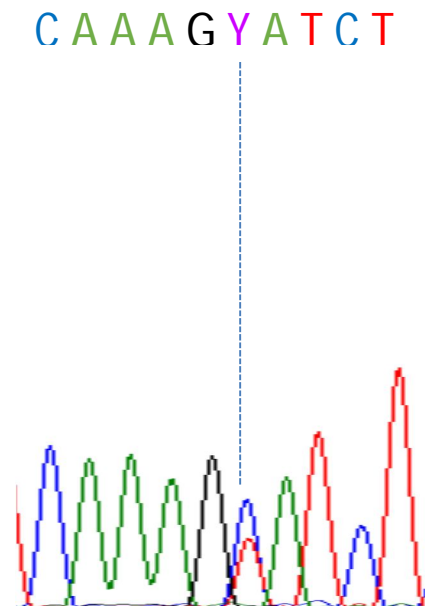


Figura 9. Eletroesferograma ilustrando o polimorfismo *CYP2C19*17* em heterozigose representado pela letra Y indicando as bases citosina (c) e timina (t) sendo esta a base mutada.

3.2.2- Controle

A genotipagem dos indivíduos do grupo controle foi feita mediante a técnica de restrição enzimática – RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*). O produto de DNA obtido da reação de cadeia de polimerase (PCR) do polimorfismo *CYP2C19*2* (fragmento de 223 pb), conforme as condições descritas na Tabela 2 foi digerido com a enzima *SmaI* à 30°C (1-16 horas) em um mix de 20µl contendo: 1µl de produto de PCR, 2µl de tampão 10X Buffer Tango, 1µl da enzima *SmaI*) e 16µl de H₂O (mili-Q), seguindo as instruções do fabricante (ThermoScientific[®]). A seguir, 10µl dos produtos da reação foram corridos no gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e posteriormente visualizado no fotodocumentador, ChemiDoc MP imaging system (BIO-RAD Laboratories), conforme ilustrada na Figura 10.

Para o polimorfismo *CYP2C19*17*, além da primeira PCR de um fragmento de 470pb, conforme as condições descritas na Tabela 3, foi feita uma segunda reação de PCR, *nested* (fragmento de 143 pb) a fim de adicionar o sítio específico de restrição (ATG-CA↓T) para a enzima Nsil (New England Biolabs) em condições não polimórficas, tendo como sequências específicas de primers: Forward- AAATTTGTGTCTTCTGTTCTCAATG e Reverse- AGACCCTGGGAGAACAGGAC e posteriormente digerida, seguindo as instruções do fabricante (ThermoScientific^R).

As condições de amplificação do fragmento da segunda PCR para a *CYP2C19*17* foram: 1 µl de produto da PCR I; 10mM de DNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; 0,6 µM de *primers*; tampão Buffer 1X e 0,1 U da enzima taq DNA polymerase (New England Biolabs). A ciclagem usada foi: 1min – 95°C; 25 ciclos de 30 s – 95°C, 30 s – 53°C e 30 s – 72°C; 7 min – 72°C.

Os produtos resultantes da segunda PCR foram submetidos à restrição enzimática com a enzima Nsil à 37°C por 8 horas em um mix de 20µl contendo: 8µl de produto de PCR, 2µl de tampão de reação NEB 10X e 1,5µl (1U) da enzima Nsil. Para este caso, 10µl dos produtos da reação foram aplicados em Gel de Poliacrilamida a 12% e submetidos à eletroforese (100 mV; 2 horas) utilizando o sistema de eletroforese em vertical Vert-10 (LOCCUS). A seguir, o géll foi visualizado em fotodocumentador, ChemiDoc MP imaging system (BIO-RAD Laboratories), conforme ilustrado na Figura 11.

A caracterização genotípica foi feita mediante os fragmentos de DNA observados no gel de agarose e de poliacrilamida, (Tabela 5) e Figuras 10 e 11 respectivamente. As classificações fenotípicas de ambos os grupos foram feitas a partir dos genótipos observados, conforme estudos anteriores [46, 47].

Tabela 5. Características dos produtos de PCR após a digestão

Alelos	Fragmento PCR (pb)	Enzimas	HS	HM	HT
<i>CYP2C19*2</i>	223	SmaI	113-110	223	223-113-110
<i>CYP2C19*17</i>	143	Nsil	116-27	143	143-116-27

HS – Homozigoto selvagem; HM – Homozigoto mutado; HT – Heterozigoto. Indivíduos HS apresentam dois fragmentos de 113-110pb e/ou 116-27pb, HM apresentam um fragmento de 223pb e/ou 143pb e HT apresentam três fragmentos de 113-110-223pb e/ou 116-27-143pb para os polimorfismos *CYP2C19*2* e *CYP2C19*17*, respectivamente.

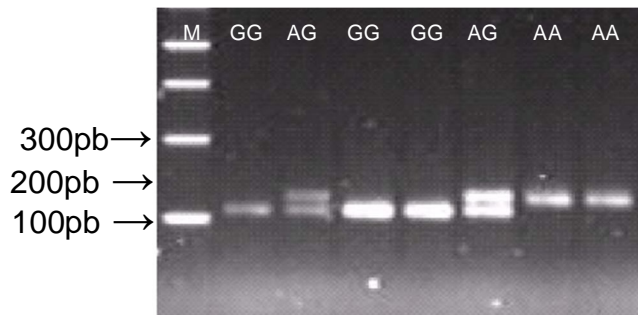


Figura 10. Fragmentos de DNA observados no gel de agarose após a digestão para o polimorfismo *CYP2C19*2*. A letra M indica o marcador molecular utilizado. Homozigotos selvagens (GG) detetados no tamanho 110 – 113pb; Heterozigotos (AG) observados nos tamanhos 110-113 e 223pb e Homozigotos mutados (AA) detetados no tamanho 223 pb.

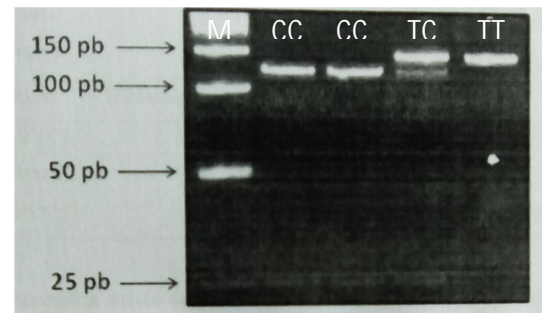


Figura 11. Fragmentos de DNA observados no gel de poliácridamida após a digestão para o polimorfismo *CYP2C19*17*. A letra M representa o marcador molecular utilizado. Homozigoto selvagem (CC) detetado no tamanho 116-27pb. Heterozigotos (TC) observado nos tamanhos 116-27 e 143pb. Homozigoto mutado (TT) detetado no tamanho 143pb.

3.3- Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através dos programas SPSS, versão 21.0 (Statistical Package for Social Sciences) e GraphPad Prism versão 5.0 (San Diego, CA, USA). Um intervalo de confiança (IC) de 95% foi estabelecido na determinação das frequências genóticas, alélicas e fenóticas. Foi usado o teste exato de Fisher na comparação da distribuição das frequências entre os grupos e na distribuição do sexo com a refratariedade. Análise de variância (ANOVA em inglês) de duas vias foi utilizada para analisar a relação dos genótipos e fenótipos com a refratariedade, a média da dose diária de CLZ entre os fenótipos, a média da dose diária de CLZ, gravidade sintomatológica (BPRS), tempo médio de uso de CLZ, índice de massa corporal (IMCs) e a idade com a refratariedade de resposta ao tratamento. A significância estatística foi fixada em valor de $P \leq 0,05$.

4- Resultados

4.1- Dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes em estudo

Dos 69 pacientes esquizofrênicos classificados de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – quarta edição (DSM IV – TR em inglês) incluídos no presente estudo, 34 eram portadores de esquizofrenia refratária (ER), ou seja, não respondiam a outros antipsicóticos, porém respondem ao tratamento à clozapina em monoterapia e 35 portadores de esquizofrenia super-refratária (ESR), ou seja, não respondem à clozapina em politerapia. Demais dados sobre esses pacientes estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6. Dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes em estudo

Dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes	
ER/ESR	34/35
IMC inicial (Kg/m ²) M±EP	26±0,5
IMC final (Kg/m ²) M±EP	27±0,6
Idade (M ±EP)	39±1,0
Sexo (M/F)	47/22

Os dados estão apresentados em número absoluto para os parâmetros esquizofrenia refratária (ER), esquizofrenia super-refratária (ESR) e Sexo e em média±erro padrão da média (M±EP) para os parâmetros Índice de Massa Corporal (IMCs) e a idade.

4.2- Frequências do grupo dos pacientes esquizofrênicos e o Controle

Uma distribuição significativamente diferente foi observada na distribuição dos genótipos *CYP2C19*1/*1* e *CYP2C19*1/*17* ($P=0,0053$ e $P=0,0005$, respectivamente) sendo o homozigoto selvagem *CYP2C19*1/*1* significativamente maior no grupo controle enquanto o heterozigoto *CYP2C19*1/*17* maior no grupo dos pacientes esquizofrênicos. Nenhum homozigoto mutado (*CYP2C19*2/*2* e *CYP2C19*17/*17*) foi observado no grupo dos pacientes esquizofrênicos. O alelo polimórfico *CYP2C19*17* foi maior no grupo dos pacientes esquizofrênicos ($P=0,0193$). Verificou-se uma maior distribuição do fenótipo ME no grupo controle ($P=0,0053$) enquanto MU foi maior no grupo dos pacientes esquizofrênicos sendo $P=0,0038$. Nenhum indivíduo portador do ML foi detectado no grupo dos pacientes esquizofrênicos, porém no grupo controle 2,9% dos indivíduos eram portadores deste fenótipo.

Tabela 7. Frequências do grupo dos Pacientes esquizofrênicos e o Controle

Genótipos	Pacientes (69)		Controle (137)		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
<i>CYP2C19*1/*1</i>	24 (34,8)	25,8 – 46,4	76 (55,5)	47,1 – 63,5	0,0053
<i>CYP2C19*1/*2</i>	8 (11,6)	5,8 – 21,7	16 (11,7)	5,8 – 17,5	1,0000
<i>CYP2C19*1/*17</i>	31 (44,9)	33,3 – 54,2	28 (20,4)	13,5 – 27,0	0,0005
<i>CYP2C19*2/*17</i>	6 (8,7)	1,2 – 15,9	8 (5,8)	1,8 – 10,9	0,5584
<i>CYP2C19*2/*2</i>	----	-- --	4 (2,9)	0,7 – 5,8	----
<i>CYP2C19*17/*17</i>	----	-- --	5 (3,6)	0,7 – 6,9	----
Alelos	Pacientes		Controle		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
<i>CYP2C19*1</i>	87 (63,0)	54,3 – 72,8	196 (71,5)	66,1 – 77,7	0,0914
<i>CYP2C19*2</i>	14 (10,1)	5,1 – 15,2	32 (11,7)	8,4 – 15,3	0,7412
<i>CYP2C19*17</i>	37 (26,8)	18,8 – 34,1	46 (16,8)	12,4 – 21,5	0,0193
Fenótipos	Pacientes		Controle		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
ME	24 (34,8)	20,3 – 48,4	76 (55,5)	48,1 – 62,0	0,0053
MI	14 (20,3)	8,7 – 31,0	24 (17,5)	11,7 – 24,1	0,7041
MU	31(44,9)	30,1 – 62,6	33 (24,1)	17,1 – 31,4	0,0038
ML	----	-- --	4 (2,9)	0,7 – 6,6	----

IC – Intervalo de Confiança; ME- metabolismo extensivo (portadores do genótipo *CYP2C19*1/*1*); MI- metabolismo intermediário (portadores dos genótipos *CYP2C19*1/*2* e *CYP2C19*2/*17*); MU- metabolismo ultra-rápido (portadores dos genótipos *CYP2C19*1/*17* e *CYP2C19*17/*17*) e ML- metabolismo lento (portadores do genótipo *CYP2C19*2/*2*). Foi utilizado o teste exacto de Fisher para a comparação entre os grupos. Diferenças estatisticamente significativas observadas para valores de $P<0,05$.

4.3- Relação de frequências entre o grupo dos pacientes com ER e ESR

A distribuição das frequências entre os pacientes com ER e ESR está descrita na Tabela 8. Foi observada uma distribuição significativamente maior do genótipo heterozigoto *CYP2C19*1/*2* no grupo dos pacientes com ER ($P=0,0275$). No entanto, os genótipos homozigoto selvagem *CYP2C19*1/*1*; heterozigotos *CYP2C19*1/*17* e *CYP2C19*2/*17* não foram diferentemente distribuídos entre os grupos ($P=0,6183$; $P=0,0534$ e $P=1,000$, respectivamente). Os alelos selvagem *CYP2C19*1* e os polimórficos *CYP2C19*2* e *CYP2C19*17* não foram diferentemente distribuídos entre os grupos sendo $P=0,7267$; $P=0,0961$ e $P=0,1256$, respectivamente. Também os fenótipos ME, MI e MU não foram diferentemente distribuídos entre os grupos sendo $P=0,6183$, $P=0,0784$ e $P=0,0534$, respectivamente.

Tabela 8. Frequências entre os pacientes com ER e ESR

Genótipos	ER (34)		ESR (35)		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
<i>CYP2C19*1/*1</i>	13 (38,2)	23,5 – 56,5	11 (31,4)	14,3 – 54,9	0,6183
<i>CYP2C19*1/*2</i>	7 (20,6)	5,3 – 35,3	1 (2,9)	0,0 – 12,0	0,0275
<i>CYP2C19*1/*17</i>	11 (32,4)	20,0 – 47,7	20 (57,1)	33,1 – 76,0	0,0534
<i>CYP2C19*2/*17</i>	3 (8,8)	0,0– 20,6	3 (8,6)	0,0 – 20,0	1,000
Alelos	ER		ESR		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
<i>CYP2C19*1</i>	44 (64,7)	54,4 – 76,5	43 (61,4)	48,6 – 74,3	0,7267
<i>CYP2C19*2</i>	10 (14,7)	6,6 – 23,5	4 (5,7)	1,4 – 12,1	0,0961
<i>CYP2C19*17</i>	14 (20,6)	10,3 – 29,4	23 (32,9)	18,6 – 45,0	0,1256
Fenótipos	ER		ESR		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
ME	13 (38,2)	22,9 – 60,0	11 (31,4)	17,1 – 45,7	0,6183
MI	10 (29,4)	14,1 – 44,1	4 (11,4)	2,9 – 23,4	0,0784
MU	11(32,4)	17,1 – 47,1	20 (57,1)	38,3 – 72,0	0,0534
ML	----	-- --	----	---	----

IC – Intervalo de Confiança; ME- metabolismo extensivo; MI- metabolismo intermediário; MU- metabolismo ultra-rápido e ML- metabolismo lento. Foi utilizado o teste exacto de Fisher para a comparação entre os grupos. Diferenças estatisticamente significativas observadas para valores de $P<0,05$.

4.4- Relação de frequências dos pacientes com ER e o grupo Controle

Na tabela 9, estão descritos os resultados referentes à distribuição comparativa das frequências dos dois polimorfismos entre os pacientes com a esquizofrenia refratária e o grupo controle. Nenhum homocigoto mutado foi observado no grupo dos pacientes com ER enquanto no grupo controle 2,9% e 3,6% dos indivíduos eram homocigotos mutados para *CYP2C19*2/*2* e *CYP2C19*17/*17*, respectivamente. No entanto, pode se observar que os dois polimorfismos não se distribuem de forma diferentes entre os grupos.

Tabela 9. Frequências dos pacientes com ER e o grupo Controle

Genótipos	ER (34)		Controle (137)		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
<i>CYP2C19*1/*1</i>	13 (38,2)	23,5 – 56,5	76 (55,5)	47,1 – 63,5	0,0855
<i>CYP2C19*1/*2</i>	7 (20,6)	5,3 – 35,3	16 (11,7)	5,8 – 17,5	0,1720
<i>CYP2C19*1/*17</i>	11 (32,4)	20,0 – 47,7	28 (20,4)	13,5 – 27,0	0,1704
<i>CYP2C19*2/*17</i>	3 (8,8)	0,0– 20,6	8 (5,8)	1,8 – 10,9	0,4588
<i>CYP2C19*2/*2</i>	--	--	4 (2,9)	0,7 – 5,8	--
<i>CYP2C19*17/*17</i>	--	--	5 (3,6)	0,7 – 6,9	--

Alelos	ER		Controle		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
<i>CYP2C19*1</i>	44 (64,7)	54,4 – 76,5	196 (71,5)	66,1 – 77,7	0,3006
<i>CYP2C19*2</i>	10 (14,7)	6,6 – 23,5	32 (11,7)	8,4 – 15,3	0,5359
<i>CYP2C19*17</i>	14 (20,6)	10,3 – 29,4	46 (16,8)	12,4 – 21,5	0,4777

Fenótipos	ER		Controle		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
ME	13 (38,2)	22,9 – 60,0	76 (55,5)	48,1 – 62,0	0,0855
MI	10 (29,4)	14,1 – 44,1	24 (17,5)	11,7 – 24,1	0,1491
MU	11(32,4)	17,1 – 47,1	33 (24,1)	17,1 – 31,4	0,3811
ML	----	-- --	4 (2,9)	0,7 – 6,6	----

IC – Intervalo de Confiança; ME- metabolismo extensivo; MI- metabolismo intermediário; MU- metabolismo ultra-rápido e ML- metabolismo lento. Foi utilizado o teste exacto de Fisher para a comparação entre os grupos. Nenhuma Diferença estatisticamente significativa foi observada ($P>0,05$).

4.5- Relação de frequências dos pacientes com ESR e o grupo Controle

Os resultados relativos à distribuição comparativa das frequências entre os pacientes com esquizofrenia super-refratária e o grupo controle estão indicados na Tabela 10. Pode se notar que o genótipo homocigoto selvagem *CYP2C19*1/*1* foi maior no grupo controle ($P=0,0137$) e o heterocigoto *CYP2C19*1/*17* foi significativamente maior nos pacientes com ESR sendo $P<0,0001$. Os alelos *CYP2C19*1* e *CYP2C19*2* foram similarmente distribuídos, porém o alelo *CYP2C19*17* foi maior no grupo dos pacientes com ESR ($P=0,0043$). Os fenótipos ME e MU foram diferentemente distribuídos, sendo ME maior no grupo controle e MU maior no grupo dos pacientes com ESR ($P=0,0137$ e $P=0,0004$, respectivamente).

Tabela 10. Frequências dos pacientes com ESR e o grupo Controle

Genótipos	ESR (34)		Controle (137)		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
<i>CYP2C19*1/*1</i>	11 (31,4)	14,3 – 54,9	76 (55,5)	47,1 – 63,5	0,0137
<i>CYP2C19*1/*2</i>	1 (2,9)	0,0 – 12,0	16 (11,7)	5,8 – 17,5	0,2011
<i>CYP2C19*1/*17</i>	20 (57,1)	33,1 – 76,0	28 (20,4)	13,5 – 27,0	<0,0001
<i>CYP2C19*2/*17</i>	3 (8,6)	0,0 – 20,0	8 (5,8)	1,8 – 10,9	0,6974
<i>CYP2C19*2/*2</i>	--	--	4 (2,9)	0,7 – 5,8	--
<i>CYP2C19*17/*17</i>	--	--	5 (3,6)	0,7 – 6,9	--

Alelos	ESR		Controle		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
<i>CYP2C19*1</i>	43 (61,4)	48,6 – 74,3	196 (71,5)	66,1 – 77,7	0,1108
<i>CYP2C19*2</i>	4 (5,7)	1,4 – 12,1	32 (11,7)	8,4 – 15,3	0,1899
<i>CYP2C19*17</i>	23 (32,9)	18,6 – 45,0	46 (16,8)	12,4 – 21,5	0,0043

Fenótipos	ESR		Controle		P - valor
	n (%)	IC: 95%	n (%)	IC: 95%	
ME	11 (31,4)	17,1 – 45,7	76 (55,5)	48,1 – 62,0	0,0137
MI	4 (11,4)	2,9 – 23,4	24 (17,5)	11,7 – 24,1	0,4535
MU	20 (57,1)	38,3 – 72,0	33 (24,1)	17,1 – 31,4	0,0004
ML	----	-- --	4 (2,9)	0,7 – 6,6	----

IC – Intervalo de Confiança; ME- metabolismo extensivo; MI- metabolismo intermediário; MU- metabolismo ultra-rápido e ML- metabolismo lento. Foi utilizado o teste exacto de Fisher para a comparação entre os grupos. Diferenças estatisticamente significativas observadas para valores de $P<0,05$.

4.6- Relação dos genótipos e fenótipos com a refratariedade

A relação dos genótipos e fenótipos observados incluindo a média da dose diária de clozapina com a refratariedade está indicada na Tabela 11. Verificou-se que os genótipos heterozigotos *CYP2C19*1/*17* e *CYP2C19*2/*17* estão associados à super-refratariedade de resposta. Os pacientes portadores destes genótipos do grupo com ESR obtiveram uma resposta terapêutica menos eficientes mesmo tendo recebidos médias de dose de CLZ significativamente maiores em combinação com outros fármacos quando comparados aos pacientes do grupo com ER que em doses significativamente menores de CLZ em monoterapia conseguiram desencadear boa resposta terapêutica ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente). O fenótipo MU também está associado à super-refratariedade tendo os pacientes portadores deste fenótipo no grupo com ESR desencadeados uma resposta terapêutica menos eficiente mesmo recebendo uma média da dose diária de CLZ significativamente maior combinado com outros fármacos em comparação aos pacientes do grupo com ER ($P < 0,001$). Nenhum indivíduo portador do fenótipo ML foi observado entre os grupos.

Tabela 11. Relação dos genótipos e fenótipos com a refratariedade

	ER	ESR	
Genótipos	M \pm (EP; N)	M \pm (EP; N)	P-Valor
<i>CYP2C19*1/*1</i>	569,2 (28,9; 13)	600 (21,9; 11)	> 0,05
<i>CYP2C19*1/*2</i>	457,1 (35,5; 7)	500 (0,0; 1)	> 0,05
<i>CYP2C19*1/*17</i>	477,3 (29,4; 11)	610 (19,0; 20)	< 0,001
<i>CYP2C19*2/*17</i>	333,3 (25,7; 3)	533,3 (51,3; 3)	< 0,05
Fenótipos	Dose (EP)	Dose (EP)	P-valor
ME	569,2 (28,9; 13)	600 (21,9; 11)	> 0,05
MI	420 (27,8; 10)	525 (37,5; 4)	> 0,05
MU	477,3 (29,4; 11)	610 (19,0; 20)	< 0,001
ML

Os dados estão apresentados em média da dose diária de clozapina \pm (erro padrão da média; número de pacientes) M \pm (EP; N). Foi utilizado o teste estatístico ANOVA de duas Vias na comparação entre os grupos. Diferenças estatisticamente significativas observadas ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente). ME – metabolismo extensivo; MI- metabolismo intermediário; MU- metabolismo ultra-rápido; ML – metabolismo lento. ER- esquizofrenia refratária; ESR- esquizofrenia super-refratária

4.7- Média da dose diária de clozapina entre os fenótipos

Na Tabela 12 estão descritos os resultados referentes a média diária de clozapina entre os fenótipos. Verificou-se que a média da dose diária de clozapina entre os indivíduos com ME foi significativamente maior que os com MI e MU no grupo dos pacientes com ER sendo $P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente. No entanto, a média da dose diária de clozapina entre os indivíduos portadores dos fenótipos MI e MU não foram significativamente diferentes nos pacientes com ER ($P > 0,05$). Não se observou nenhuma diferença na distribuição da média da dose diária de clozapina entre os fenótipos nos pacientes com ESR ($P > 0,05$).

Tabela 12. Média da dose diária de clozapina entre os fenótipos

	ME	MI	P-valor
	M \pm (EP; N)	M \pm (EP; N)	
ER	569,2 (28,9; 13)	420 (27,8; 10)	< 0,001
ESR	600 (21,9; 11)	525 (37,5; 4)	> 0,05
	ME	MU	P-valor
ER	569,2 (28,9; 13)	477,3 (29,4; 11)	< 0,05
ESR	600 (21,9; 11)	610 (19,0; 20)	> 0,05
	MI	MU	P-valor
ER	420 (27,8; 10)	477,3 (29,4; 11)	> 0,05
ESR	525 (37,5; 4)	610 (19,0; 20)	> 0,05

Os dados estão apresentados em média da dose diária de clozapina \pm (erro padrão da média; número de pacientes) (M \pm EP; N). Foi utilizado o teste estatístico ANOVA de duas Vias na comparação entre os grupos. Diferenças estatisticamente significativas observadas ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente). ME – metabolismo extensivo; MI- metabolismo intermediário; MU- metabolismo ultra-rápido. ER- esquizofrenia refratária; ESR- esquizofrenia super-refratária

4.8- Dados clínicos e sociodemográficos com a refratariedade

Uma associação à super-refratariedade de resposta foi observada na distribuição da média da dose diária de clozapina sendo neste caso significativamente maior no grupo dos pacientes com ESR em comparação aos pacientes do grupo com ER ($P < 0,001$). A gravidade sintomatológica mediante escala BPRS está também associada à super-refratariedade de resposta sendo significativamente maior no grupo dos pacientes com ESR tanto antes como após a medicação à clozapina ($P < 0,001$). Verificou-se também uma associação dos indivíduos do sexo feminino à super-refratariedade de resposta tendo uma maior distribuição no grupo dos pacientes com ESR ($P = 0,0194$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos para os parâmetros tempo de uso de clozapina, IMCs e a idade ($P > 0,05$).

Tabela 13. Dados clínicos e sociodemográficos com a refratariedade

	ER	ESR	P-valor
Dose CLZ, mg/dia (EP)	495,6 (20,0)	597,1 (13,2)	< 0,001
BPRS (inicial) (EP)	42,6 (2,2)	63,6 (2,1)	< 0,001
BPRS (final) (EP)	30,4 (1,9)	48,6 (1,6)	< 0,001
Tempo de uso clz, anos (EP)	2,8 (0,3)	3,0 (0,3)	> 0,05
IMC _{inicial} (kg/m ²) (EP)	26 (0,7)	26 (0,9)	> 0,05
IMC _{final} (kg/m ²) (EP)	27 (0,7)	28 (0,9)	> 0,05
Idade (anos) (EP)	40 (1,4)	39 (1,3)	> 0,05
Sexo Masc. N	28	19	0,0194
Fem. N	6	16	0,0194

Os dados estão apresentados em média±erro padrão da média ($M \pm EP$) para os parâmetros Dose, BPRS, Tempo de uso de clozapina, Índice de Massa Corporal (IMC) e a idade; e em número absoluto para o Sexo. Foi utilizado ANOVA de duas vias na comparação entre os grupos. Porém, para o parâmetro sexo foi utilizado o teste exacto de Fisher. Significância estatísticas observadas para valores de $P < 0,001$ e $P = 0,0194$, respectivamente.

5- Discussão

No presente trabalho, procurou-se analisar possíveis influências dos polimorfismos *CYP2C19*2* e *CYP2C19*17* na resposta ao tratamento à clozapina nos pacientes diagnosticados com ER e ESR, bem como, avaliar as possíveis associações dos parâmetros como a gravidade sintomatológica (BPRS), o tempo de uso de CLZ, IMCs, a idade e o sexo com a refratariedade de resposta à clozapina. Para isso, o estudo incluiu 69 pacientes esquizofrênicos, sendo 34 com ER e 35 com ESR, 47 do sexo masculino e 22 do sexo feminino, cuja média da idade \pm erro padrão ($M \pm EP$) foi de $39 \pm 1,0$ anos. Incluiu-se também 137 indivíduos saudáveis nascidos e residentes na cidade de Goiânia utilizados como grupo controle.

Os resultados relativos às frequências demonstraram uma distribuição significativamente maior do polimorfismo *CYP2C19*17* no grupo dos pacientes esquizofrênicos (ER+ESR) em comparação ao grupo controle, abrindo a possibilidade de uma possível associação desse polimorfismo ao estado do indivíduo, ou seja, à doença. Embora, o foco principal do presente estudo esteja voltado a influência dos polimorfismos à resposta ao tratamento, não se descarta também a possibilidade da existência de genes contendo polimorfismos que predisponham à doença, pois isto constitui mais uma linha de investigação no campo da farmacogenética como referido por Mukherjee e colaboradores [25].

Verificou-se que tanto no grupo dos pacientes esquizofrênicos, como no grupo controle havia uma presença substancial do polimorfismo *CYP2C19*17*. Esses resultados mostram evidências que corroboram à outros estudos feitos na população geral brasileira por Santos e colaboradores [44]. Estudos em diferentes populações mundiais reportam também a presença notável deste polimorfismo, sendo de 21,1% e 25,5% em mulheres alemãs diagnosticadas com câncer de mama e mulheres saudáveis, respectivamente [58] e 22% no grupo dos pacientes noruegueses com desordem psiquiátrica tratados com escitalopram [59].

Embora em menor escala e não diferentemente distribuídos entre os pacientes esquizofrênicos e controle, detectou se também a presença do polimorfismo *CYP2C19*2* indo ao encontro de estudos anteriores das regiões do Norte-Nordeste e Sul-Sudeste Brasileira, conforme dados da Rede Nacional de Farmacogenética (REFARGEN) (www.refargen.org.br) [60], bem como, na população geral [44].

A distribuição das frequências dos dois polimorfismos entre o grupo dos pacientes com ER e o grupo controle demonstrou não haver nenhuma diferença estatisticamente significativas entre os grupos, minimizando a hipótese da possível associação desses polimorfismos à doença. No entanto, quando comparado esta distribuição entre o grupo dos pacientes com ESR e o grupo controle, observou-se que o polimorfismo *CYP2C19*17* foi significativamente maior no grupo dos pacientes com ESR, sinalizando a possibilidade da predisposição de genes contendo este polimorfismo ao estado dos pacientes diagnosticados com esquizofrenia super-refratária.

Na comparação das frequências dos dois polimorfismos entre os pacientes com ER e ESR, observou-se uma distribuição significativamente maior do polimorfismo *CYP2C19*2* em heterozigose (*CYP2C19*1/*2*) no grupo dos pacientes com ER, sinalizando deste modo a associação deste polimorfismo à boa resposta à clozapina neste grupo de pacientes. Tendo em conta que os indivíduos portadores deste genótipo (*CYP2C19*1/*2*) e do genótipo *CYP2C19*2/*17* foram classificados como metabolizadores intermediários MI, procedeu-se então a comparação da média da dose diária de clozapina recebida por esses indivíduos com a administrada aos indivíduos metabolizadores extensivos ME dentro do grupo dos pacientes com ER e ESR. Os resultados mostraram que os indivíduos MI receberam uma média da dose diária de clozapina (420mg/dia) significativamente menor que a dos ME (569,2mg/dia), o que justifica a boa resposta à clozapina neste grupo de indivíduos. Estudos anteriores têm dado indicações para administração de dose menores de medicamentos para indivíduos MI em comparação a aplicada nos ME para que a eficácia terapêutica seja alcançada [36].

A relação dos genótipos dos pacientes com a refratariedade, demonstrou uma associação dos genótipos *CYP2C19*1/*17* e *CYP2C19*2/*17* à uma maior dose de clozapina nos pacientes com ESR, sinalizando deste modo, a associação do polimorfismo *CYP2C19*17* em heterozigose à super-refratariedade de resposta, uma vez que esses grupos de pacientes tiveram respostas menos eficientes mesmo tendo recebidos doses significativamente maiores de clozapina em combinação com outros fármacos quando comparados ao grupo dos pacientes com ER que em doses significativamente menores de clozapina em monoterapia conseguiram desencadear boa resposta terapêutica. Também o fenótipo MU está associado à uma maior dose de clozapina no grupo dos pacientes com ESR, tendo este grupo desencadeado

resposta terapêutica menos eficiente mesmo com doses significativamente maiores de CLZ em politerapia. Este achado sinaliza a associação do polimorfismo *CYP2C19*17* em heterozigose (*CYP2C19*1/*17*) à super-refratariedade de resposta à CLZ, corroborando estudos anteriores que têm reportados implicações clínicas deste polimorfismo à falhas terapêuticas à vários medicamentos.

Hunfeld e colaboradores reportaram a associação deste polimorfismo à falha terapêutica à doses aprovadas de inibidores de bomba de protons entre os caucasianos [61]. Outro estudo reportou a associação deste polimorfismo à falha terapêutica à voriconazol num caucasiano de 48 anos de idade diagnosticado com uma infecção pulmonar grave causada por *Aspergillus fumigatus* [62]. Pedersen e colaboradores reportaram a associação deste polimorfismo ao aumento da inibição de segregação de plaquetas sanguíneas mediada por clopidogrel entre sujeitos dinamarqueses [63].

O presente estudo observou também uma associação da média da dose diária de CLZ com a super-refratariedade de resposta tendo os indivíduos diagnosticados com ESR recebidos doses significativamente maiores do que os com ER, o que sinaliza ser o grupo com resposta terapêutica menos eficiente. Estudo sobre a farmacoterapia de tratamento de esquizofrenia refratária, sob uma perspectiva clínica reportou a necessidade de uma maior dose de clozapina aos super-refratários por serem pacientes mais resistentes ao tratamento [64].

A relação entre a gravidade sintomatológica mediante a escala BPRS com a refratariedade, demonstrou também uma associação da gravidade sintomatológica com a super-refratariedade onde os indivíduos com ESR apresentaram uma maior gravidade sintomatológica tanto antes como após a medicação à CLZ. Este achado mostra evidências similares à estudos anteriores que reportaram os indivíduos com ESR como sendo mais graves e resistentes ao tratamento, precisando de outras estratégias de tratamentos que inclui a combinação de CLZ com fármacos de outras classes, como o lítio, ácido valpróico, benzodiazepínicos, inibidores de recaptção de serotonina (IRS), ou com anticonvulsivantes como a lamotrigina e o topiramato. A terapia eletroconvulsiva (ECT) e a estimulação magnética transcraniana repetitiva são terapias do tipo físico que também são indicadas no tratamento deste grupo de pacientes [65, 66].

Uma maior distribuição de indivíduos do sexo feminino foi observada no grupo dos pacientes com ESR. Contrariamente, observou-se maior número de indivíduos do

sexo masculino no grupo dos pacientes com ER. Resultados similares foram reportados em estudos anteriores, nos quais uma maior resistência foi observada em pacientes do sexo feminino em comparação aos do sexo masculino [52, 67]. Estudo conduzido por Nielsen e colaboradores reportaram associação dos pacientes do sexo feminino à uma menor resposta à CLZ e distribuídos na sua maioria no grupo dos pacientes com ESR [56].

Nenhuma associação foi observada em relação aos parâmetros IMCs, a idade e o tempo médio de uso da CLZ com a super-refratariedade de resposta ao tratamento. Os pacientes com ER estiveram em tratamento monoterapêutico à CLZ e os pacientes com ESR receberam um tratamento politerapêutico, resultante da combinação de CLZ com risperidona na sua maioria.

A combinação farmacológica é uma estratégia muito utilizada, sobretudo, em casos de ESR, porém os resultados não têm sido muito promissores em termos de eficácia terapêutica [68]. Uma meta-análise de 14 estudos randomizados, duplo-cegos, placebo-controlados de combinação de clozapina com ASGs demonstraram uma superioridade do tratamento combinado apenas em comparação ao placebo [69]. Outra meta-análise incluindo vários compostos combinados com CLZ, encontrou um efeito positivo apenas para a sulpirida, mas não para amisulprida, aripiprazol, risperidona e haloperidol [66].

A combinação de CLZ com risperidona continua sendo a mais pesquisada apesar dos resultados negativos já reportados uma vez que esses antipsicóticos apresentam afinidades diferentes para alguns receptores presentes no sistema nervoso central. A CLZ apresenta uma propriedade antidopaminérgica mais baixa do que a risperidona, sobretudo para receptores da família D2 da dopamina que constituem principais alvos dos mesmos. Os efeitos colaterais e metabólicos e de muitas causas que poderiam estar na base da interrupção de tratamento aumentam significativamente com a administração combinada de antipsicóticos [68], embora alguns estudos têm mostrado a superioridade de terapia de combinação farmacológica em relação à monoterapia [70].

6- Conclusão

De um modo geral, o presente estudo observou a presença dos dois polimorfismos nos grupos estudados tendo o polimorfismo *CYP2C19*17* uma maior distribuição no grupo dos pacientes em comparação ao grupo controle. A maioria dos pacientes com ER eram portadores do polimorfismo *CYP2C19*2* em heterozigose e portadores do fenótipo MI o que sinaliza a associação deste polimorfismo à boa resposta neste grupo. Os indivíduos portadores do polimorfismo *CYP2C19*17* em heterozigose e através do seu fenótipo correspondente MU estão associados à maiores doses de CLZ e resposta terapêutica menos eficientes no grupo dos pacientes com ESR. Os parâmetros como a média da dose diária de CLZ, a gravidade sintomatológica mediante escala BPRS e indivíduos do sexo feminino estão também associados à super-refratariedade de resposta ao tratamento tendo maiores distribuições no grupo dos pacientes com esquizofrenia super-refratária. Todavia, parâmetros como o tempo médio do uso de CLZ, IMCs e a idade não estão associados à super-refratariedade de resposta ao tratamento no presente estudo. Outras estratégias de tratamento devem ser consideradas para os pacientes super-refratários, sobretudo os portadores do polimorfismo *CYP2C19*17*, porém o polimorfismo *CYP2C19*2* em heterozigose pode ser benéfico na resposta ao tratamento à CLZ em doses significativamente menores que a convencionalmente aplicadas. Futuros estudos com amostras mais alargadas seriam relevantes para dar uma maior consistência a esses resultados.

Referências

1. Millier ASU. Humanistic burden in schizophrenia: a literature review. *Journal of psychiatric research* 2014; 54: 85-93.
2. Leitão RJ. Ferraz MB. Chaves AC. Mari JJ. Cost of schizophrenia: direct costs and use of resources in the State of São Paulo. *Rev Saude Publica* 2006; 40:304-9.
3. Kiusiang TT. Pezzullo L. Violin BB. Sardi P. Delatorre RM. Pititto L. et al. The potential benefits of long-acting atypical antipsychotic injections in preventing relapse in Brazil: 17th Annual European Congress; 8-12 November 2014; Amsterdam RAI.
4. GARCIA R. PONDÉ M. LIMA MG. Atualização em psicoses. São Paulo: *PhoENIX*, 2004.
5. Van JKG. The environment and schizophrenia. *The nature* 2010; 468 (7321):203-212.
6. Hultman CM. Prenatal and perinatal risk factors for schizophrenia, affective psychosis and reactive psychosis of early onset: case-control study. *BMj* 1999; 318: 421-426.
7. Murray RMLJ. Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation. *European College of Neuropsychopharmacology journal* 2008; 18 (3):129-134.
8. Laruelle M. Kegeles LS. Glutamate, dopamine and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 1003:138-158.
9. Stafford MR. Mayo-Wilson E. Loucas CE. James A. Hollis C. Birchwood M. et al. Efficacy and safety of pharmacological and psychological interventions for the treatment of psychosis and schizophrenia in children, adolescents and young adults: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015; 10: e0117166. doi: 10.1371/journal.pone.0117166 PMID: 25671707.
10. Lieberman JA. Stroup TS. McEvoy JP. Swartz MS. Rosenheck RA. Perkins DO. et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med*. 2005; 353: 1209–1223. PMID: 16172203.
11. Tandon R. Belmaker RH. Gattaz WF. Lopez-Ibor JJ. Okasha A. Singh B. et al. World Psychiatric Association Pharmacopsychiatry Section statement on comparative effectiveness of antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res*. 2008; 100: 20–38. doi: 10.1016/j.schres.2007.11.033 PMID: 18243663.

12. Delay JD. Utilisation thérapeutique psychiatrique d'une phénothiazine d'action centrale elective. *Ann. Médico-Psychol.* 1952; 110, 112–117 (1952) (in French).
13. Sigwald JB. Quatre cas de dyskinésie, facio-bucco-linguomasticatrice treatment par les neuroleptiques. *Rev. Neurol. (Paris)* 1959; 100, 751–755 (in French).
14. Farde L. Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch. Gen. Psychiatry* 1992; 49, 538–544.
15. Meltzer H. Kostacoglu A. Treatment-resistant schizophrenia. In: Lieberman J. Murray R. editors. *Comprehensive care of schizophrenia: a textbook of clinical management*. London: *Martin Dunitz*, 2001. p. 181-203.
16. Kinon BJ. Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs: a critical analysis. *Psychopharmacology (Berl.)* 1996; 124, 2–34.
17. Remington G. Atypical antipsychotics are some more atypical than others? *Psychopharmacology* 2000; 148, 3–15.
18. Wenthur CJLC. Classics in chemical neuroscience:clozapine. *ACS chemical neuroscience* 2013; 4(7):1018-1025.
19. O'Connor WT. O'Shea SD. Clozapine and GABA transmission in schizophrenia disease models: establishing principles to guide treatments. *Pharmacology & therapeutics* 2015; 150:47-80.
20. Bersani FSCE. Factors affecting interindividual differences in clozapine response: a review and case report. *Human psychopharmacology* 2011; 26 (3):177-187.
21. Kane J. Honigfeld G. Singer J. Meltzer H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch. Gen. Psychiatry* 1988; 45 (9): 789–796.
22. Buckley PFDM. Schizophrenia today: What do we know and how sure are we? *J Psychiatric Pract* 2001; 7 (4):244-6.
23. Henna Neto JEH. Clinical aspects of super-refractory schizophrenia: a 6 month cohort observational study. *Rev. Bras.Psichiatr* 2007; 29(3):228-232.
24. Chowbay B. Zhou S. Lee EJ. An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore. *Drug Metab Rev* 2005; 37 (2):327-78.
25. Mukherjee D. Topol EJ. Pharmacogenomics in cardiovascular diseases. *Curr Probl Cardiol* 2003; 28 (5):317-47.

26. Chowbay B, Zhou S, Lee EJ. An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore. *Drug Metab Rev* 2005;37(2):327-78.
27. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, et al. International HapMap Consortium. A second-generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007; 449:851-61.
28. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 2003; 348 (6):529-37.
29. Thorisson GA, Stein LD. The SNP Consortium website: past, present and future. *Nucleic Acids Res* 2003;31(1):124-7.
30. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* 2001;250(3):186-200.
31. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286 (5439):487-91.
32. Kirchheiner J, Heesch C, Bauer S, Meisel C, Seringer A, Goldammer M, et al. Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome *P450 2D6* on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 2004 76 (4):302-12.
33. Olesen Ole V, Linnet K. Contributions of five Human Cytochrome *P450* isoforms to the N-demethylation of Clozapine In Vitro at Low and High concentrations. *J Clin Pharmacol* 2001; 41:823-832.
34. De Brito R, Araújo LC, Diniz MJA, Georg RC, Vianelo RP, Ghedini PC, et al. The *CYP1A2 -163CNA* polymorphism is associated with super-refractory schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2015; 169: 502–503.
35. Kupfer A, Desmond P, Schenker S, Branch R. Family study of a genetically determined deficiency of mephenytoin hydroxylation in man. [Letter]. *Pharmacologist* 1979; 21 (173).
36. Mrazek DA. Psychiatric Pharmacogenomics. *Oxford University Press*: New York 2010, pp 55-62.
37. Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP3A5* in the Greek population. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21, 419–426.
38. De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S) mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 1994, 46, 594–598.
39. Farjadian S, Ghaderi A. HLA class II similarities in Iranian Kurds and Azeris. *Int J Immunogenet* 2007; 34, 457–463.

40. Pang YS. Wong LP. Lee TC. Mustafa AM. Mohamed Z. Lang CC. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in healthy Malaysian subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58, 332–335.
41. Isaza C. Henao J. Martínez JH. Arias JC. Beltrán L. Phenotype-genotype analysis of *CYP2C19* in Colombian mestizo individuals. *BMC Clin Pharmacol* 2007; 7, 6.
42. Moridani M. Fu L. Selby R. Yun F. Sukovic T. Wong B. Cole DE. Frequency of *CYP2C9* polymorphisms affecting warfarin metabolism in a large anticoagulant clinic cohort. *Clin Biochem* 2006; 39, 606–612.
43. Xie HG. Stein CM. Kim RB. Wilkinson GR. Flockhart DA. Wood AJ. Allelic, genotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (*CYP2C19*) in healthy Caucasian populations of European descent throughout the world. *Pharmacogenetics* 1999; 9 (5), 539-549.
44. Santos PCJL. Soares RAG. Santos DBG. Nascimento RM. Coelho GLLM. Nicolau JC. Mill JG. Et al. *CYP2C19* and *ABCB1* gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Medical Genetics* 2011; 12: 13.
45. Chaudhry AS. Prasad B. Shirasaka Y. Fohner A. Finkelstein D. Fan Y. et al. The *CYP2C19* Intron 2 Branch Point SNP is the Ancestral Polymorphism Contributing to the Poor Metabolizer Phenotype in Livers with *CYP2C19*35* and *CYP2C19*2* Alleles. *Drug Metab Dispos* 2015; 43:1226 1235.
46. Sychev DA. Denisenko NP. Sizova ZM. Grachev AV. Velikolug KA. The frequency of *CYP2C19* genetic polymorphisms in Russian patients with peptic ulcers treated with proton pump inhibitors. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 2015;8; 111-114.
47. Payan M. Tajik N. Rouini MR. Ghahremani MH. Genotype and allele frequency of *CYP2C19*17* in a healthy Iranian population. *Med. J Islam Repub Iran* 2015 (3 October). Vol. 29:269.
48. Aynacioglu AS. Brockmüller J. Bauer S. Frequency of cytochrome P450 *CYP2C19* variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1999; 48: 409-415.
49. Tanigawara Y. Aoyama N. Kita T. Shirakawa K. Komada F. Kasuga M. et al. *CYP2C19* genotype-related efficacy of omeprazole or the treatment of infection caused by *Helicobacter pylori*. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1999; 66:528-534.
50. Sim SC. Rissinger C. Dahl ML. Aklillu E. Christensen M. Bertilsson L. et al. A common novel *CYP2C19* gene variant causes ultra-rapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and anti-depressants. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2006; 79:103-113.
51. Hagg S. Spigset O. Mjorndal T. Dahlqvist R. Effect of caffeine on clozapine pharmacokinetics in healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology* 2000 Jan;49(1):59-63.

52. Spina E. De Leon J. Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2007;100(1):4-22.
53. Meyer JM. Individual changes in clozapine levels after smoking cessation: results and a predictive model. *Journal of clinical psychopharmacology* 2001 Dec;21(6):569-574.
54. Hasegawa M. Gutierrez-Esteinou R. Way L. Meltzer HY. Relationship between clinical efficacy and clozapine concentrations in plasma in schizophrenia: effect of smoking. *Journal of clinical psychopharmacology* 1993 Dec;13 (6):383-390.
55. Zhang M. Liu X. Wang L. Wang Y. Ju L. Li J. Cigarette Smoking might weaken the prognostic significance of cytochrome *P450 2C19*2* polymorphism in acute myocardial infarction patients. *J. Cell. Mol. Med.* 2016; Vol 20, No 7, pp. 1247-1254.
56. Nielsen J. Nielsen RE. Correll CU. Predictors of clozapine response in patients with treatment-refractory schizophrenia: results from a Danish Register Study. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2012; 32 (5): 678-683.
57. Anichavezhi D. Chakradhara Rao US. Shewade DG. Krishnamoorthy R. Adithan C. Distribution of *CYP2C19*17* allele and genotypes in an Indian population. *J Clin Pharm Ther.* 2012; 37 (3): 313-8.
58. Justenhoven C. Hamann U. Pierl CB. *CYP2C19*17* is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008; DOI 10.1007/s 10549-008-0076-4.
59. Rudberg I. Mohebi B. Hermann M. Refsum H. Molden E. Impact of the ultrarapid *CYP2C19*17* allele on serum concentration of escitalopram in psychiatric patients. *Clin. Pharmacol. Ther* 2008; 83:322-327.
60. Kurtz GS. Pharmacogenomics in admixed populations: the Brazilian pharmacogenetics/pharmacogenomics network—REFARGEN. *The Pharmacogenomics Journal* 2004; 4, 347–348. doi:10.1038/sj.tpj.6500287.
61. Hunfeld NG. Mathot RA. Touw DJ. Effect of *CYP2C19*2* and **17* mutations on pharmacodynamics and kinetics of proton pump inhibitors in Caucasians. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2008;5:752–760.
62. Abidi MZ. D'Souza A. Kuppalli K. Ledebouer N. Hari P. *CYP2C19*17* genetic polymorphism – an uncommon cause of voriconazole treatment failure. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2015; 83:46-48.
63. Pedersen RS. Nielsen F. Stage TB. Vinholt PJ. Achwah AB. Damkier P. Broesen K. *CYP2C19*17* increases clopidogrel-mediated platelet inhibition but does not alter the pharmacokinetics of the active metabolite of clopidogrel. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2014; 41:870-878.
64. Dold M. Leucht S. Pharmacotherapy of treatment-resistant Schizophrenia: a clinical perspective. *Evidence – based mental health* 2014; 17 (2): 33 – 37.

65. Miyamoto S. Jarskog LF. Fleischhacker WW. Schizophrenia: when clozapine fails. *Current opinion in psychiatry* 2015 May; 28 (3):243-248.
66. Sommer IE. Begemann MJ. Temmerman A. Leucht S. Pharmacological augmentation strategies for schizophrenia patients with insufficient response to clozapine: a quantitative literature review. *Schizophrenia bulletin* 2012 Sep; 38 (5):1003-1011.
67. Tang YL. Mao P. Li FM. Li W. Chen Q. Jiang F. Cai ZJ. Mitchell PB. Gender, age, smoking behaviour and plasma clozapine concentrations in 193 Chinese inpatients with schizophrenia. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2007; 64 (1): 49-56.
68. Gallego JA. Bonnetti J. Zhang J. Kane JM. Correll CU. Prevalence and correlates of antipsychotic polypharmacy: a systematic review and meta-regression of global and regional trends from the 1970s to 2009. *Schizophr Res* 2012 Jun;138 (1):18-28.
69. Taylor D. Paton C. Kapur S. Prescribing guidelines in psychiatry. 11th edn Chichester: Wiley-Blackwell 2012. The South London and Maudsley NHS Foundation Trust and Oxleas NHS Foundation Trust.
70. Katona L. Czobor P. Bitter I. Real-world effectiveness of antipsychotic monotherapy vs.polypharmacy in schizophrenia: to switch or to combine? A nation wide study in Hungary. *Schizophr Res* 2014 Jan; 152 (1): 246-54.