

PESQUISA DO GENE CYP2D6*10 ATRAVÉS DE PCR-RFLP NA TP3 DO MICF 2025

Castro C.⁽¹⁾; Carmo M.⁽¹⁾; Martins T.⁽¹⁾; Ribeiro A.C.⁽²⁾

(1) MSc in Pharmaceutical Sciences, Instituto Universitário Egas Moniz, Egas Moniz School of Health & Science, Campus Universitário, Quinta da Granja, 2829-511 Caparica, Almada, Portugal

(2) Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CiEM); Egas Moniz School of Health & Science, Campus Universitário, Quinta da Granja, 2829-511 Caparica, Almada, Portugal

INTRODUÇÃO

- O alelo **CYP2D6*10** é uma variante do gene CYP2D6, caracterizada por uma substituição de uma citosina por uma timina (100C>T) correspondente ao polimorfismo **rs1065852**.
- Esta mutação, altera a estrutura da proteína pela substituição de uma prolina por uma serina (P34S) reduzindo significativamente a sua **atividade enzimática**. É particularmente prevalente em populações asiáticas estando associada a um **metabolismo lento** de vários fármacos, tais como antidepressivos e antipsicóticos, entre outros.
- A presença do CYP2D6*10 contribui para a **variabilidade interindividual** na atividade da enzima, influenciando a eficácia e segurança dos tratamentos. A genotipagem deste alelo permite prever o fenótipo metabólico e ajustar a terapêutica de forma personalizada.
- Objetivo** → Identificar a presença de polimorfismos no gene CYP2D6 em amostras de DNA de estudantes do MICF da Egas Moniz School of Health and Science.

METODOLOGIA

1. Extração de DNA da mucosa oral de 23 estudantes (Omniswab – Nucleospin Tissue Kit)

2. Quantificação e Pureza do DNA (NanoVue + Gel de Agarose)

3. Amplificação do DNA por PCR

1. Em cada eppendorf, adicionar a **Mix da reação** (20µl):

- 12,5 µl – Kit Taq
- 1 µl – Primer F (10 µM)
- 1 µl – Primer R (10 µM)
- 5,5 µl – Água

2. Para o controlo negativo: + 5 µl de Água

3. Para as amostras: + 5 µl de DNA

4. Colocar os eppendorfs no **termociclador**

- 5 min a 95°C – 1x
- 30 seg. a 95°C
- 40 seg a 63°C
- 30 seg a 72°C
- 5 min a 72°C – 1x

4. Restrição enzimática

1. Em cada eppendorf, adicionar a **Mix da Restrição** (Vf=30µl):

- 1 µl – Enzima de Restrição HphI
- 3 µl – Buffer (10% do volume final)
- 1 µl – Água

5. Análise electroforética em gel de agarose a 3%

- Colocar 3 µl de azul III em cada eppendorf.
- Aplicar 7 µl de marcador NZYDNA Ladder VI, 12 µl do controlo negativo e 12 µl das amostras no gel de agarose a 3%, respetivamente.
- Visualizar à luz UV.

RESULTADOS

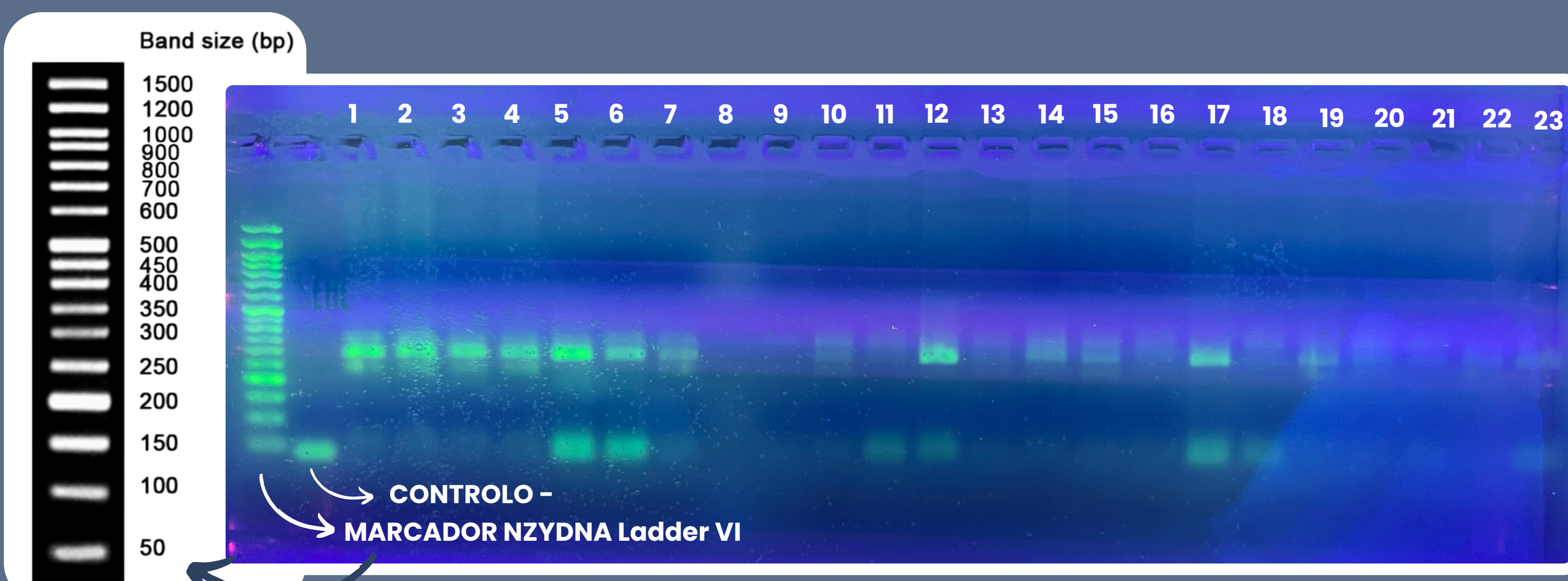


Fig 1. Fotografia do Gel de Agarose a 3%

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

- Através da análise eletroforética do gene **CYP2D6*10** observámos que **todas** as amostras são **homozigóticas** (frequência genotípica CC), uma vez que apresentam 2 bandas de **282 pb** e **62 pb**.
- Os homozigóticos para o alelo T apresentam 3 bandas a 182 pb, 100 pb e 62 pb, o que não ocorreu nos nossos resultados.
- No 2.º poço, correspondente ao **controlo negativo**, observa-se uma banda semelhante à de 62 pb, provavelmente resultante de primers não ligados com tamanho aproximado.
- As **amostras 8 e 9**, não foram contabilizadas por ausência de banda. O mesmo poderá ter ocorrido devido a uma baixa concentração de DNA.

Frequências Genóticas:

$$\begin{aligned}f(CC) &= 21/21 = 1 \\f(CT) &= 0/21 = 0 \\f(TT) &= 0/21 = 0\end{aligned}$$

Frequências Alélicas:

$$\begin{aligned}f(C) &= f(CC) + \frac{1}{2}f(CT) = 1 \\f(T) &= 0\end{aligned}$$

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

$$\begin{aligned}f(CC) &= p^2 = 1 \\f(CT) &= 2pq = 0 \\f(TT) &= q^2 = 0\end{aligned}$$

POPULATION	CYP2D6*10 OBSERVED	ALLELES TOTAL	FREQUENCY
African American/Afro-Caribbean	1026	26878	3.82%
American	152	10486	1.45%
Central/South Asian	1092	14442	7.56%
East Asian	18784	43842	42.84%
European	4658	296422	1.57%
Latino	491	18694	2.63%
Near Eastern	441	6508	6.77%
Oceanian	114	1998	5.71%
Sub-Saharan African	847	17424	4.86%

	Observado	Esperado
C	21	1 x 21 = 21
C	0	0 x 21 = 0
T	0	0 x 21 = 0
T	0	0 x 21 = 0

Fig 2. Dados Mundiais PHARMGKB

CONCLUSÃO

- Todas as amostras detetáveis revelaram genótipo **homozigótico CC**, associada a um perfil de metabolização normal.
- A população em análise está em **Equilíbrio de Hardy-Weinberg**, visto que os resultados **observados = esperados**.
- A frequência genotípica TT (0%) observada é consistente com as baixas prevalências reportadas nas **populações Europeia e Americana**, de 1,57% e 1,45%, respetivamente.
- A **ausência da mutação CYP2D6*10** nesta amostra sugere que, nesta população, é expectável uma metabolização eficaz dos fármacos habitualmente afetados por esta variante.

Referências bibliográficas

- CYP2D6*10 [Internet]. [cited 2025 May 25]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/haplotype/PA165816582>
- Li JY, Wang XF, Zhang ZQ, Chen YG, Zou JL, Wang X, et al. Correlation between CYP2D6*10 Gene Mutation, and Structure and Function of its Encoding Protein. Tropical Journal of Pharmaceutical Research [Internet]. 2014 [cited 2025 May 25];13(3):347–51. Available from: <http://www.tjpr.org>
- rs1065852 – SNPedia [Internet]. [cited 2025 May 25]. Available from: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs1065852>
- Kane M. CYP2D6 Overview: Allele and Phenotype Frequencies. 2025 Jan 17 [cited 2025 May 25]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574601/>