

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAURÍCIO DAHER ANDRADE GOMES

**AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIAS GENÉTICAS EM DESFECHOS CLÍNICOS
RELEVANTES PARA A PRÁTICA DA ANESTESIOLOGIA**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

BRASÍLIA, 2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
por qualquer meio convencional ou eletrônico,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

MAURÍCIO DAHER ANDRADE GOMES

**AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIAS GENÉTICAS EM DESFECHOS CLÍNICOS
RELEVANTES PARA A PRÁTICA DA ANESTESIOLOGIA**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovada em: 06 / 02 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves (presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira
Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Wolnei Caumo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Michella Soares Coelho (suplente)
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho à Flávia, minha esposa e companheira de vida, por todo amor, paciência e apoio que você sempre me ofereceu. As minhas conquistas também são suas.

Dedico também aos meus filhos Sérgio e Elis, por toda alegria, inocência e renovação que vocês me dão a cada dia, mesmo que ainda não saibam disso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos. É indescritível a importância do carinho, amor e amizade que vocês me deram. Os meus sucessos mostram simplesmente o germinar do que vocês semearam. Sem isso, nada valeria a pena.

Aos Professores Francisco de Assis Rocha Neves e Edno Magalhães. Sem dúvida alguma, vocês foram os professores mais importantes da minha vida. Suas trajetórias de conquista, superação e honra constituem a maior fonte de inspiração para o meu crescimento profissional, e uma dentre as maiores para meu crescimento pessoal. Sou verdadeiramente afortunado por tê-los conhecido e sido vosso aprendiz.

Aos excelentes parceiros Gustavo Barcelos Barra, Renato Borges Saito e Felipe Machado de Moura Costa. Suas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento dos projetos cujos resultados aqui apresento.

Aos professores e amigos Guilherme Santos, Carlos Pantoja, Angélica Amato, Adriana Lofrano, Andrei Sposito, Marie Togashi, Marília Barros, Enrique Arganaraz, Fátima Borin, Luiz Simeoni, Rilva Soares, Isabella Leão, Cristina Simeoni, Lara Velasco, Cátia Gôveia, Luis Cláudio Ladeira, Edísio Pereira e José Henrique Leal. O convívio e o aprendizado com pessoas tão nobres em muito me engrandeceram.

Às minhas avós, tias e primos. Vocês são um porto seguro em tempos de incerteza, me lembrando de onde vim e para onde devo ir.

Aos amigos e “amigões”, pela cerveja, o rock e a alegria.

Every time we witness an injustice and do not act, we train our character to be passive in its presence and thereby eventually lose all ability to defend ourselves and those we love.

(Julian Assange)

PREFÁCIO

A influência de fatores genéticos na prática da medicina tem se tornado cada vez mais reconhecida, especialmente após a conclusão do Projeto Genoma Humano. Novos marcadores genéticos, associados às diferentes etapas da fisiopatologia de doenças como o câncer e os distúrbios cardiovasculares, estão sendo identificados a cada dia. Paralelamente, diferenças interindividuais na resposta farmacológica de diversas medicações também estão sendo explicadas por fatores genéticos. Em certas situações, como no tratamento da fibrilação atrial, um tipo frequente de arritmia cardíaca, o perfil genético dos pacientes já está sendo considerado durante o planejamento da terapêutica.

No futuro, é possível que tanto os critérios diagnósticos quanto a terapia medicamentosa assumam um caráter individualizado, e a sequência genômica de cada paciente será determinante para a tomada de decisões clínicas. A partir desta idéia, surge o conceito de “medicina personalizada” onde o tratamento certo é dado na hora certa para o paciente certo. Entretanto, para que a medicina personalizada se torne uma realidade, as associações entre as mais diversas variações genéticas e os desfechos de relevância clínica deverão ser definidas nas próximas décadas.

Neste sentido, nosso grupo vêm trabalhando na pesquisa do efeito de variações genéticas sobre desfechos clínicos relevantes para a prática da Anestesiologia. No presente documento apresentamos os resultados obtidos a partir de dois projetos desenvolvidos em nossa instituição.

No primeiro, investigamos a influência de variações genéticas frequentes do receptor beta-2 adrenérgico (polimorfismos nos códons 16 e 27) na resposta hemodinâmica de pacientes submetidas ao bloqueio subaracnóideo para realização da operação cesariana. Os resultados que obtivemos sugerem que a presença de certas variantes pode estar associada a uma maior estabilidade hemodinâmica, menor necessidade de vasopressores e menor incidência de hipotensão arterial após a indução do bloqueio anestésico.

No segundo projeto, descrevemos a frequência da mais importante variação genética do receptor opióide-mu (polimorfismo A118G), que é o principal alvo farmacológico de analgésicos opióides. A frequência deste polimorfismo ainda não

havia sido descrita em indivíduos brasileiros. Também desenvolvemos um método de genotipagem rápido e custo-efetivo para este polimorfismo, e avaliamos possíveis repercussões funcionais desta variação em relação ao vício ao tabaco.

O presente documento foi dividido em quatro capítulos. Inicialmente, é apresentado um contexto histórico refletindo as influências da genética no campo da medicina. Em seguida, é apresentada uma revisão de conceitos genéticos básicos que poderão ser importantes para a compreensão dos projetos de pesquisa. Por fim, cada um dos projetos de pesquisa é explicitado individualmente, sendo que os artigos produzidos em cada projeto podem ser encontrados como anexos.

RESUMO

Introdução: Em um futuro próximo, espera-se que o uso de dados genéticos individuais seja determinante para aspectos práticos da medicina como o diagnóstico e a terapêutica. Um dos maiores desafios para o surgimento desta “medicina personalizada” será a integração das informações genéticas aos determinantes clássicos do desenvolvimento de doenças e da resposta aos medicamentos. Atualmente, a realização de estudos de associação genética nas mais diversas situações clínicas é altamente pertinente e necessária.

Objetivos: Comparar o risco de hipotensão arterial e as variações na resposta hemodinâmica subsequente à indução da anestesia subaracnóidea para realização de operação cesariana entre grupos de pacientes formados de acordo com a presença de variações genéticas do gene do receptor beta-2 adrenérgico; definir a frequência do polimorfismo A118G do receptor opióide-mu em uma população da região Centro-Oeste do Brasil, avaliando possíveis consequências funcionais deste polimorfismo na prevalência de tabagismo e na exposição ao tabaco.

Métodos: Para avaliação de variações do gene do receptor beta-2 adrenérgico, 150 parturientes híidas que seriam submetidas a operação cesariana eletiva foram selecionadas. Durante 30 minutos após a indução da anestesia, os seguintes desfechos foram avaliados: incidência de hipotensão arterial; dose administrada de vasopressor; variações na pressão arterial e na frequência cardíaca. As pacientes foram agrupadas de acordo com a presença do haplótipo ArgGln (composto pelos alelos Arg16 e Gln27) em homozigose, e os grupos foram comparados entre si. A frequência do polimorfismo A118G do receptor opióide-mu foi avaliada em 200 pacientes cirúrgicos do Hospital Universitário de Brasília. Estes pacientes responderam um questionário sobre dados demográficos e dados relevantes ao vício de tabaco.

Resultados: No estudo do receptor beta-2 adrenérgico, as análises foram conduzidas com dados provenientes de 143 parturientes. Os grupos não apresentavam diferenças significativas em suas características basais. As pacientes que possuíam o haplótipo ArgGln em homozigose apresentaram um menor risco de hipotensão arterial após a indução da anestesia subaracnóide. Os valores

pressóricos destas pacientes foram significativamente maiores ao longo do período avaliado em comparação com as pacientes que possuíam uma ou nenhuma cópia do haplótipo ArgGln ($P < 0,001$). Em relação a avaliação do receptor opióide-mu, uma frequência de 16% (IC 95% 12,7 - 19,9%) foi encontrada na amostra de pacientes. A prevalência de tabagismo foi semelhante quando os pacientes homozigotos para o alelo 118A foram comparados com os pacientes com uma ou duas cópias do alelo 118G. Entretanto, a exposição ao tabaco medida em maços-ano foi maior em pacientes que possuíam o alelo 118G em relação aos homozigotos 118A ($28,9 \pm 12,5$ versus $21,5 \pm 10,8$ respectivamente, $P = 0,02$).

Conclusões: O perfil genético em relação a haplótipos do receptor beta-2 adrenérgico parece influenciar a resposta hemodinâmica de parturientes submetidas a anestesia subaracnóidea para realização de operação cesariana. Este é o primeiro estudo a descrever a frequência do polimorfismo A118G do receptor opióide-mu em brasileiros. O polimorfismo A118G pode influenciar o comportamento de brasileiros em relação ao tabagismo.

Palavras-chave: Anestesiologia; genômica; polimorfismo genético; receptor beta-2 adrenérgico; anestesia regional; hemodinâmica; receptor opióide-mu; dor; abuso de substâncias.

ABSTRACT

Introduction: In the nearby future, it is expected that individual genetic data will be determinant in fundamental aspects of medical practice like diagnosis and therapy. One of the greatest challenges for the development of this “personalized medicine” will be the integration of genetic information to the classical determinants of disease development and drug response. Presently, the development of genetic association studies in diverse clinical contexts is highly relevant and necessary.

Objectives: Compare the risk of arterial hypotension and the hemodynamic fluctuations after subarachnoid anesthesia induction for cesarian delivery between patients grouped according to the presence of specific genetic variations of the beta-2 adrenergic receptor; define the frequency of the A118G polymorphism of the mu-opioid receptor in a population of the Center-West region of Brazil, also evaluating possible functional consequences of this polymorphism in relation to tobacco smoking prevalence and exposure.

Methods: To evaluate the effects of beta-2 adrenergic receptor variations, 150 healthy parturients scheduled to undergo elective cesarian delivery were recruited. In the 30 minutes after anesthesia induction, the following outcomes were evaluated: arterial hypotension incidence; vasopressor administered dose; arterial blood pressure and heart rate variations. Parturients were grouped according to the presence of the ArgGln haplotype (composed by the alleles Arg16 and Gln27) in homozygosity, and the groups were compared. The mu-opioid receptor A118G polymorphism was evaluated in 200 surgical patients of the Hospital Universitário de Brasília. These patients answered a survey about their demographic characteristics and factors associated to tobacco addiction.

Results: In the beta-2 adrenergic receptor study, the analyses were conducted with data from 143 parturients. The baseline characteristics did not differ significantly between the groups. Patients with two copies of the ArgGln haplotype presented a lower risk of arterial hypotension after spinal anesthesia induction. The arterial pressure levels of these patients were significantly higher than the group of patients with one or no copies of the ArgGln haplotype ($P < 0,001$). Regarding the mu-opioid receptor evaluation, a frequency of 16% (CI 95% 12.7 - 19.9%) was observed in our

patient sample. The tobacco smoking prevalence did not differ significantly when patients homozygous for the 118A allele were compared to those with one or two copies of the 118G allele. However, the tobacco exposure of smokers, measured in packs-year, was higher in patients that had the 118G allele compared to patients 118A homozygous (28.9 ± 12.5 vs 21.5 ± 10.8 respectively, $P = 0.02$).

Conclusions: The genetic profile in regard to haplotypes of the beta-2 adrenergic receptor appear to influence the hemodynamic response of parturients subjected to subarachnoid anesthesia for cesarian delivery. This was the first study to describe the frequency of the mu-opioid receptor A118G polymorphism among Brazilians. The A118G polymorphism may influence the behavior of Brazilians towards the tobacco addiction.

Keywords: Anesthesiology; genomics; genetic polymorphism, beta-2 adrenergic receptor; regional anesthesia; hemodynamics; mu-opioid receptor; pain; substance abuse.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - Gregor Mendel e os princípios da hereditariedade
- Figura 1.2 - Artigo de Archibald Garrod sobre a hereditariedade da alcaptonúria
- Figura 1.3 - Francis Crick e James Watson e a estrutura do *DNA*
- Figura 1.4 - Descrição do genoma humano
- Figura 1.5 - Crescimento das publicações de estudos *GWAS*
- Figura 1.6 - Queda dos custos de sequenciamento
- Figura 1.7 - Influências genéticas na resposta a medicamentos
- Figura 2.1 - Estrutura em dupla-hélice do *DNA*
- Figura 2.2 - Código genético
- Figura 2.3 - Estrutura da cromatina
- Figura 2.4 - Elementos que constituem um gene
- Figura 2.5 - Tipos de polimorfismo de nucleotídeo único
- Figura 2.6 - Recombinação homóloga e formação de haplótipos
- Figura 2.7 - Associações entre variações genéticas e características clínicas identificadas por estudos *GWAS*
- Figura 2.8 - Desenho dos estudos do tipo *GWAS*
- Figura 3.1 - Polimorfismos Arg16Gly e Gln27Glu do receptor beta-2 adrenérgico
- Figura 3.2 - Haplótipos do receptor beta-2 adrenérgico
- Figura 3.3 - Sítios de anelamento e produtos de amplificação da reação de genotipagem dos haplótipos do receptor beta-2 adrenérgico por *qPCR*
- Figura 3.4 - Padrões de amplificação das reações de genotipagem do receptor beta-2 adrenérgico
- Figura 3.5 - Incidência de hipotensão arterial após a indução da anestesia
- Figura 3.6 - Variação da pressão arterial sistólica após a indução da anestesia
- Figura 4.1 - Mecanismo de sinalização celular pelo receptor opióide-mu
- Figura 4.2 - Localização do polimorfismo A118G do receptor opióide-mu
- Figura 4.3 - Correlação entre os achados do sequenciamento e da genotipagem do polimorfismo A118G por *qPCR*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de *PCR* convencional e *PCR* quantitativo do Projeto 1
- Tabela 3.2 - Configuração das reações de *PCR* quantitativo do Projeto 1
- Tabela 3.3 - Variações genéticas do receptor beta-2 adrenérgico encontradas na nossa população
- Tabela 3.4 - Descrição do risco de hipotensão materna em associação aos haplótipos do gene do receptor beta-2 adrenérgico
- Tabela 3.5 - Características basais das pacientes, comparadas em relação à presença do haplótipo ArgGln em homozigose
- Tabela 3.6 - Desfechos observados após a indução da anestesia subaracnóidea no Projeto 1
- Tabela 4.1 - Frequência alélica do polimorfismo A118G em diversos povos
- Tabela 4.2 - Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no Projeto 2
- Tabela 4.3 - Distribuição de alelos e genótipos do receptor opióide-mu entre as raças da população estudada, quando divididos de acordo com a presença do alelo G do receptor opióide-mu
- Tabela 4.4 - Comparação das características gerais dos pacientes
- Tabela 4.5 - Características dos pacientes fumantes quando comparados em relação à presença do alelo G do receptor opióide-mu

LISTA DE ABREVIATURAS

ADRB2	Receptor Beta-2 Adrenérgico
ANOVA	Análise De Variância (Analysis Of Variance)
ASA	Sociedade Americana De Anestesiologia (American Society Of Anesthesiologists)
CNV	Variação Do Número De Cópias (Copy Number Variations)
Ct	Ciclo Do Limiar De Detecção
ddNTP	Didesoxirribonucleotídeo Trifosfatado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Desoxyribonucleic Acid)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (Ethylenediamine Tetraacetic Acid)
EHW	Equilíbrio De Hardy-Weinberg
GWAS	Estudo De Associação Genômica Ampla (Genome Wide Association Studies)
IMC	Índice De Massa Corpórea
MOR	Receptor Opióide-mu
OPRM1	Gene Do Receptor Opióide-mu
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Reação Em Cadeia De Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
SNP	Modificação De Nucleotídeo Único (Single Nucleotide Polymorphism)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA DA GENÉTICA NA MEDICINA	18
1.2 MEDICINA GENÔMICA.....	22
1.3 INFLUÊNCIAS GENÉTICAS NO DIAGNÓSTICO.....	25
1.4 INFLUÊNCIAS GENÉTICAS NA TERAPÊUTICA	25
1.5 FARMACOGENÉTICA.....	26
2 PRINCÍPIOS BÁSICOS	29
2.1 ESTRUTURA DO DNA.....	29
2.2 DEFINIÇÃO DE GENE.....	32
2.3 VARIAÇÃO GENÔMICA.....	34
2.4 TIPOS DE VARIAÇÕES	34
2.5 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA	36
3 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIAS GENÉTICAS SOBRE A RESPOSTA HEMODINÂMICA DE PACIENTES SUBMETIDOS À ANESTESIA.....	43
3.1 JUSTIFICATIVA	43
3.2 OBJETIVOS.....	46
3.2.1 Objetivos gerais	46
3.2.2 Objetivos específicos	46
3.3 MÉTODOS.....	47
3.3.1 População de Pacientes	47
3.3.2 Procedimento Anestésico	47
3.3.3 Análise Laboratorial	48
3.3.4 Análise Estatística	51
3.3.5 Comitê de Ética	53
3.4 RESULTADOS	54
3.5 DISCUSSÃO.....	59
3.6 CONCLUSÃO	63
4 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIAS GENÉTICAS SOBRE AS AÇÕES DO RECEPTOR OPIÓIDE-MU.....	65
4.1 JUSTIFICATIVA	65

4.2 OBJETIVOS.....	68
4.2.1 Objetivos Gerais	68
4.2.2 Objetivos Específicos	68
4.3 MÉTODOS.....	69
4.3.1 População de Pacientes	69
4.3.2 Questionário e Coleta de Amostra Sanguínea.....	69
4.3.3 Análise Laboratorial	69
4.3.4 Análise Estatística	71
4.3.5 Comitê de Ética	72
4.4 RESULTADOS.....	73
4.5 DISCUSSÃO.....	76
4.6 CONCLUSÃO.....	79
5 REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO A - MANUSCRITO DO ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO ANAESTHESIA.....	89
ANEXO B - MANUSCRITO DO ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO PAIN PRACTICE.....	110
ANEXO C - PARECERES DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	128
ANEXO D - MODELO DO QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PACIENTES DO PROJETO 2.....	130
ANEXO E - CLASSIFICAÇÃO DE ESTADO FÍSICO SEGUNDO A SOCIEDADE AMERICANA DE ANESTESIOLOGISTAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA DA GENÉTICA NA MEDICINA

Desde épocas imemoriais já era percebido que diferenças na “natureza” dos indivíduos influenciavam a susceptibilidade a doenças. Uma citação do século 5 atribuída a Hipócrates diz: “Alguns homens têm constituições como montanhas de florestas onde nascentes se originam, enquanto outros são como um solo pobre e com pouca água, há ainda aqueles que são como a terra rica de campos e pântanos e outros como o terreno infértil e seco da planície”[§] (1).

A partir da descrição dos padrões de herança hereditária pelo monge Gregor Mendel na segunda metade do século 19 (2), hoje sabemos que todos os seres vivos são o produto da interação entre seus materiais genéticos e o ambiente que os cerca. As conclusões de Mendel surgiram em decorrência de seus experimentos com o cruzamento de plantas, mais especificamente de ervilheiras (figura 1.1). Um hiato de quase 40 anos transcorreu até que conceitos mendelianos alcançassem o campo da medicina, um fato que ocorreu na Inglaterra no início do século 20.

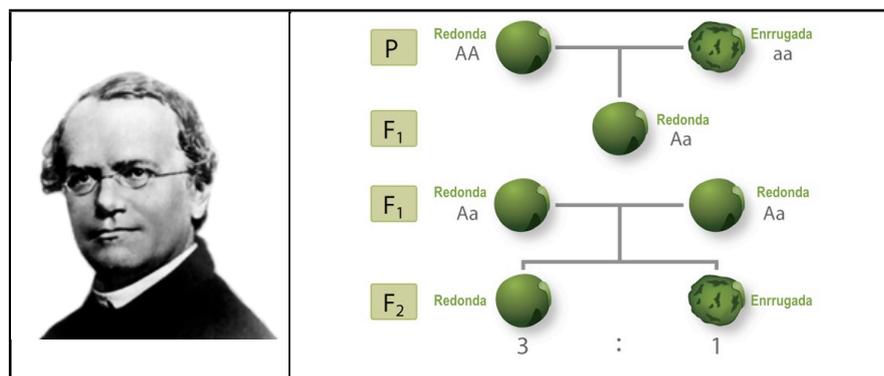


Figura 1.1 - O monge Gregor Mendel estabeleceu os princípios de hereditariedade estudando ervilheiras da espécie *Pisum sativum*, avaliando, entre outras características, a forma arredondada ou enrugada das sementes de ervilhas entre as gerações (Fonte das imagens: *Wikipedia* e *Life Science Web Textbook* (3) - Direitos Autorais: *The University of Tokyo*).

[§] Traduzido do inglês: “Some men have constitutions that are like wooded mountains running with springs, others like those with poor soil and little water, still others like land rich in pastures and marshes, and yet others like the bare, dry earth of the plain.”

Por volta do ano 1898, o médico e pesquisador Archibald Garrod estava interessado em condições clínicas associadas ao aparecimento de pigmentos na urina. Seus interesses o levaram a investigar pacientes portadores de alcaptonúria, uma rara doença relacionada ao surgimento de artrites, que também é caracterizada pelo escurecimento da urina quando deixada em contato com o ar. Garrod percebeu uma alta frequência de consanguinidade entre os pais de crianças acometidas por alcaptonúria, uma observação que foi explicada posteriormente pelo padrão de herança autossômica recessiva dessa doença (4). Garrod cunhou o termo “erro inato do metabolismo” ao descrever doenças metabólicas que eram desencadeadas por fatores hereditários (5). Suas publicações são consideradas o marco inicial da especialidade Genética Médica, cujo foco reside no diagnóstico e tratamento de doenças de origem genética e na realização de aconselhamento genético (figura 1.2).

Nos últimos 100 anos, a influência da genética na prática da medicina se concentrou no estudo de doenças raras, monogênicas e caracterizadas pela herança que segue padrões mendelianos de hereditariedade. A talassemia beta, a anemia falciforme e a fibrose cística são importantes exemplos deste grupo de doenças. Hoje, milhares de doenças de origem genética já foram descritas e estão compiladas no sítio da internet: *Online Mendelian Inheritance in Man* (6). Apesar da raridade das doenças monogênicas, a descrição de seus mecanismos fisiopatológicos pôde fornecer informações para o melhor entendimento de doenças multifatoriais semelhantes, cuja a frequência é muito maior. Podemos citar como exemplo deste fato, as informações cruciais a respeito do desenvolvimento da doença aterosclerótica que puderam ser extraídas a partir de estudos sobre a hipercolesterolemia familiar (7).

Ao longo do século 20, descobertas científicas revolucionárias proporcionaram uma nova visão sobre a genética do ser humano. Em 1953, o biólogo americano James Watson e o físico inglês Francis Crick descreveram a complexa estrutura em dupla-hélice da molécula de *DNA* (figura 1.3) (8). Até então, o mecanismo de armazenamento das informações hereditárias e o processo de cópia do material genético durante as divisões celulares, permaneciam mistérios da biologia (9).

current in this manner but I have seen steady improvement take place under its continued use.

In many cases no special diet is necessary. When there is any emaciation a liberal diet is required which may be supplemented by two extra pints of milk in the day. If there is great emaciation forced feeding may be necessary.

In a large number of cases, and especially in those which are seen in hospital out-patient practice, we can unfortunately carry out little more than medicinal treatment and often in circumstances which are not at all favourable to recovery. Belladonna was frequently prescribed and was useful in some cases but I have often been disappointed in the results of its use. To be of service in exophthalmic goitre any line of treatment should be steadily maintained for some weeks or even months and patients often dislike to continue taking belladonna in sufficient doses to produce physiological effects. Convallaria has proved useful in cases in which the frequency of the pulse has been very high and is more effectual in lowering the pulse-rate than other cardiac tonics. Bromides are useful in cases in which there are marked nervousness and tremors. Arsenic is useful in nearly all cases and may be combined with other drugs with advantage. The best results are obtained by giving small doses of three or four minims of Fowler's solution three times a day for a month or two or for the first three weeks of each month for five or six months. Of the animal extracts thymus and suprarenal tablets have both been of service. Thyroid extract is harmful, as it often exaggerates the symptoms, and should not be given in exophthalmic goitre. Special measures are frequently required for the treatment of urgent symptoms. The sudden attacks of diarrhoea were readily controlled by laudanum and dilute sulphuric acid. Severe attacks of palpitation with very rapid pulse yielded to the application of an ice-bag to the præcordial area. Persistent vomiting in acute cases is difficult to treat. On the whole rectal feeding and the administration of morphia, either subcutaneously or by the rectum, gave better results than other lines of treatment.

Newcastle-on-Tyne.

THE INCIDENCE OF ALKAPTONURIA: A STUDY IN CHEMICAL INDIVIDUALITY.

BY ARCHIBALD E. GARROD, M.A., M.D. OXON.,
F.R.C.P. LOND.

PHYSICIAN TO THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN, GREAT ORMOND-STREET; DEMONSTRATOR OF CHEMICAL PATHOLOGY AT ST. BARTHOLOMEW'S HOSPITAL.

ALL the more recent work on alkaptonuria has tended to show that the constant feature of that condition is the excretion of homogentisic acid, to the presence of which substance the special properties of alkapton urine, the darkening with alkalis and on exposure to air, the power of staining fabrics deeply, and that of reducing metallic salts, are alike due. In every case which has been fully investigated since Wolkow and Baumann¹ first isolated and described this acid its presence has been demonstrated and re-examination of the material from some of the earlier cases also has led to its detection. The second allied alkapton acid, uroleucic, has hitherto only been found in the cases investigated by Kirk and in them in association with larger amounts of homogentisic acid.² By the kindness of Dr. R. Kirk I have recently been enabled to examine fresh specimens of the urines of his patients who have now reached manhood and was able to satisfy myself that at the present time even they are no longer excreting uroleucic acid. After as much of the homogentisic acid as possible had been allowed to separate out as the lead salt the small residue of alkapton acid was converted into the ethyl ester by a method recently described by Erich Meyer³ and the crystalline product

¹ Wolkow and Baumann: Zeitschrift für physiologische Chemie, 1891, Band xv., p. 228.

² R. Kirk: Journal of Anatomy and Physiology, 1889, vol. xxiii., p. 69. Huppert: Zeitschrift für Physiologische Chemie, 1897, Band xxiii., p. 412.

³ E. Meyer: Deutsches Archiv für Klinische Medizin, 1901, Band lxx., p. 443.

obtained had the melting-point of ethyl homogentisate (120° C.). Further observations, and especially those of Mittelbach,⁴ have also strengthened the belief that the homogentisic acid excreted is derived from tyrosin, but why alkaptonuric individuals pass the benzene ring of their tyrosin unbroken and how and where the peculiar chemical change from tyrosin to homogentisic acid is brought about, remain unsolved problems.

There are good reasons for thinking that alkaptonuria is not the manifestation of a disease but is rather of the nature of an alternative course of metabolism, harmless and usually congenital and lifelong. Witness is borne to its harmlessness by those who have manifested the peculiarity without any apparent detriment to health from infancy on into adult and even advanced life, as also by the observations of Erich Meyer who has shown that in the quantities ordinarily excreted by such persons homogentisic acid neither acts as an aromatic poison nor causes acid intoxication, for it is not excreted as an aromatic sulphate as aromatic poisons are, nor is its presence in the urine attended by any excessive output of ammonia. However, regarded as an alternative course of metabolism the alkaptonuric must be looked upon as somewhat inferior to the ordinary plan, inasmuch as the excretion of homogentisic acid in place of the ordinary end products involves a certain slight waste of potential energy. In this connexion it is also interesting to note that, as far as our knowledge goes, an individual is either frankly alkaptonuric or conforms to the normal type, that is to say, excretes several grammes of homogentisic acid per diem or none at all. Its appearance in traces, or in gradually increasing or diminishing quantities, has never yet been observed, even in the few recorded temporary or intermittent cases. In cases in which estimations have been carried out the daily output has been found to lie within limits which, considering the great influence of proteid food upon the excretion of homogentisic acid and allowing for differences of sex and age, may be described as narrow. This is well illustrated by Table I., in which the cases are arranged in order of age:—

TABLE I.—Showing the Average Excretion of Homogentisic Acid.

No.	Sex.	Age.	Average excretion of homogentisic acid per 24 hours on ordinary mixed diet.	Names of observers.
1	M.	2½ years.	3.2 grammes.	Erich Meyer.
2	M.	3½ "	2.6 "	A. E. Garrod.
3	M.	8 "	2.7 "	Ewald Stier.
4	M.	18 "	5.9 "	P. Stange.
5	M.	44 "	4.6 "	Mittelbach.
6	M.	45 "	4.7 "	H. Ogden.
7	M.	60 "	5.3 "	Hammarsten.
8	F.	60 "	3.2 "	H. Embden.
9	M.	68 "	4.8 "	Wolkow and Baumann.

The information available as to the incidence of alkaptonuria is of great interest in connexion with the above view of its nature. That the peculiarity is in the great majority of instances congenital cannot be doubted. The staining property of the urine allows of its being readily traced back to early infancy. This has been repeatedly done and in one of my cases⁵ the staining of the napkins was conspicuous 57 hours after the birth of the child. The abnormality is apt to make its appearance in two or more brothers and sisters whose parents are normal and among whose forefathers there is no record of its having occurred, a peculiar mode of incidence which is well known in connexion with some other conditions. Thus of 32 known examples, which were presumably congenital, no less than 19 have occurred in seven families. One family contained four alkaptonurics, three others contained three, and the remaining three two each. The proportion of alkaptonuric to normal members is of some interest and Table II. embodies such definite knowledge upon this point as is at present available regarding congenital cases.

⁴ Mittelbach: Ibid., 1901, Band lxxi., p. 50.

⁵ A. E. Garrod: THE LANCET, Nov. 30th, 1901, p. 1484; Transactions of the Royal Medical and Chirurgical Society, 1902, vol. lxxxv., p. 69.

Em meados da década de 70, o bioquímico inglês Frederick Sanger desenvolveu a técnica de sequenciamento do *DNA* usando nucleotídeos modificados “terminadores” (10), o que resultou em um aumento considerável da eficiência do processo de sequenciamento. Ainda hoje, o método descrito por Sanger é utilizado, apesar de ter sido modificado para que se tornasse ainda mais rápido e automatizado.

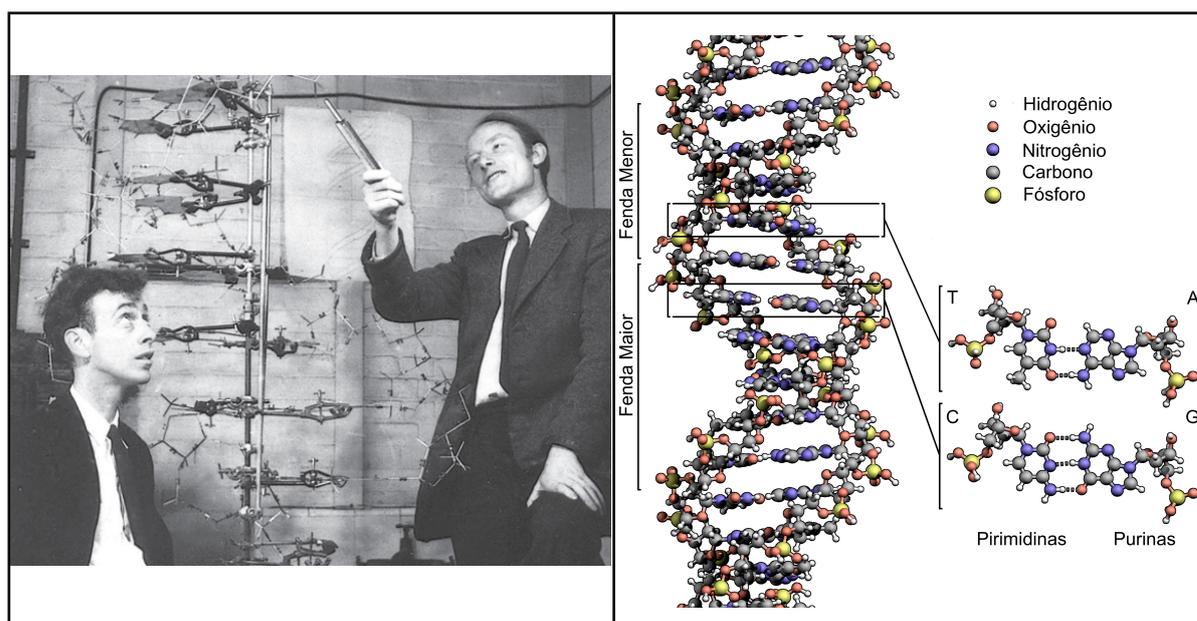


Figura 1.3 - Francis Crick (à direita) e James Watson mostrando um modelo da estrutura da molécula de *DNA* (Fonte da imagem: *Bioinformatics and Information Science Center*). O painel a direita mostra os elementos que constituem o *DNA* (Fonte da imagem: *Wikipedia*).

Um novo espectro de possibilidades em relação à manipulação do *DNA* surgiu após o desenvolvimento da reação em cadeia de polimerase (*PCR - polymerase chain reaction*) pelo bioquímico americano Kary Mullis em 1983. Esta técnica utiliza repetidos ciclos de duplicação de uma sequência específica da cadeia de *DNA*, resultando em um produto de amplificação facilmente detectável e manuseável (11). Existem diversas aplicações para este método, como a clonagem e o sequenciamento do *DNA*, e a versatilidade da reação de *PCR* fez com que se tornasse uma técnica indispensável em qualquer laboratório de biologia molecular moderno.

Ao final do século 20, as condições estavam criadas para que a incrível tarefa de sequenciar o genoma humano fosse realizada. O Projeto Genoma Humano teve

início em 1990, realizado num esforço conjunto de vários países. No ano 2001 uma versão preliminar do genoma humano foi publicada (12), e no ano de 2004 uma versão praticamente completa estava pronta (13). Uma nova era do conhecimento médico se iniciava (figura 1.4).



Figura 1.4 - Duas versões do genoma humano foram descritas por dois grupos independentes (Consórcio Internacional do Projeto Genoma (12) e a empresa *Celera Genomics* (15)) e foram simultaneamente publicadas nos periódicos *NATURE* e *SCIENCE* no ano de 2001 (Fonte das imagens: *Nature* - Direitos Autorais: *Nature Publishing Group* e *Science* - Direitos Autorais: *American Association for the Advancement of Science*).

1.2 MEDICINA GENÔMICA

Antes da publicação do genoma humano, pouco se conhecia sobre as bases genéticas das doenças que mais comumente afligem o ser humano (14). Sabia-se que doenças como o diabetes mellitus e a hipertensão arterial sistêmica possuíam elementos hereditários, entretanto, não existiam métodos sistemáticos para identificação das variações genéticas associadas ao desenvolvimento dessas condições.

Atualmente, a associação de mais de 1000 variantes genéticas já foi estabelecida para pelo menos 160 doenças e características comuns dos seres humanos, e este número não para de crescer (14). O primeiro método a obter considerável sucesso em demonstrar as influências genéticas em condições comuns foi aquele estabelecido para os estudos de associação genômica ampla (*GWAS - genome wide association studies*). Estes estudos são geralmente realizados sob a forma de um desenho do tipo caso-controle, onde são procuradas diferenças genéticas entre indivíduos doentes (casos) e indivíduos normais (controles) ao longo de grandes extensões do genoma. A premissa básica para a realização deste tipo de estudo é que uma combinação de variantes genéticas comuns influenciaria tanto o desenvolvimento das características individuais (p. ex. peso, altura, inteligência), quanto a predisposição a diferentes doenças. Contrariamente ao que é observado em doenças mendelianas, em que a mutação geralmente tem um efeito intensamente negativo sobre a capacidade de reprodução do indivíduo (o que torna a mutação rara), as variantes que influenciariam condições comuns teriam efeitos evolutivos levemente deletérios, neutros ou mesmo vantajosos, o que conferiria a capacidade de transmissão da variação aos descendentes dos indivíduos que as possuísem (14). A hipótese “doença comum / variante comum” foi testada inicialmente em 2002(16), sendo repetidamente confirmada pela descoberta de diversas associações desde então (17) (figura 1.5).



Figura 1.5 - Gráfico apresentando o número crescente de estudos do tipo GWAS que foram publicados desde o ano de 2005 até a metade do ano de 2012 (Fonte da imagem: *National Human Genome Research Institute*).

A rápida queda dos custos relacionados ao processo de sequenciamento (figura 1.6) está sendo fundamental para que novos projetos sejam conduzidos com o objetivo de interpretar as informações funcionais contidas na sequência do genoma. O projeto *ENCODE* (*ENCyclopedia Of DNA Elements*) tem os objetivos de: identificar todas as regiões do genoma humano que são transcritas, localizar todas as sequências nas quais fatores transcricionais se ligam, descrever a dinâmica estrutural da cromatina e interpretar o código de modificações das histonas (18). Os projetos *HapMap* (19) e *1000 Genomes* (20) estão catalogando as variações que têm uma frequência de pelo menos 1%, quando localizadas em qualquer parte do genoma, e de pelo menos 0,1%, quando ocorrem em regiões que codificam proteínas, comparando a frequência destas modificações nas mais diversas populações ao redor do mundo. Os projetos *Roadmap Epigenomics* (21) e *International Human Epigenome Consortium* (22) buscam identificar: os pontos de metilação do *DNA*, decifrar o código de modificações de histonas, e entender a regulação da acessibilidade ao *DNA* por modificações da estrutura da cromatina. A medida que o código das informações genômicas sobre os estados normal e doente do ser humano é decifrado novas e importantes contribuições ocorrerão nos mais diversos campos da medicina.

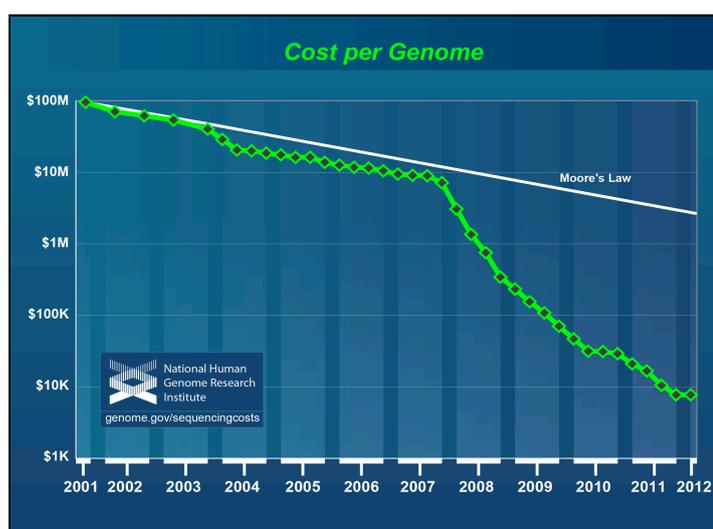


Figura 1.6 - Gráfico mostrando a queda dos custos associados ao sequenciamento do genoma de uma pessoa ao longo do tempo. Os custos são apresentados em dólares, e caem de 100 milhões (\$100M) em 2001 para menos de 10 mil (\$10K) em 2012. A linha hipotética identificada como *Moore's Law* representa a tendência de desenvolvimento da indústria de informática, que neste caso é usada como um parâmetro de comparação para o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento genético (Fonte da imagem: *National Human Genome Research Institute*).

1.3 INFLUÊNCIAS GENÉTICAS NO DIAGNÓSTICO

Na próxima década, espera-se que as mutações responsáveis pela maioria das doenças monogênicas mendelianas sejam identificadas. Completado este estágio, o processo de diagnóstico de doenças de origem genética será em muito facilitado, evitando-se a instituição de tratamentos ineficazes e melhorando o aconselhamento dos pacientes e de seus familiares (23).

No caso das doenças poligênicas, um dos maiores benefícios da medicina genômica será o de ajudar na estratificação de casos, identificando subtipos genéticos específicos, que apesar de clinicamente semelhantes, respondem de forma diferente aos tratamentos dispensados. Atualmente, pacientes diagnosticados com câncer de mama já têm sido estratificados desta forma (24).

Todas as doenças são influenciadas em diferentes graus por variações genéticas, fatores ambientais e hábitos de vida. A integração de informações genéticas aos determinantes clássicos do desenvolvimento das doenças, a ser feita por estudos observacionais dos tipos coorte e caso-controle, aumentará o conhecimento a respeito da fisiopatologia das doenças, assim como melhorará as estratégias de diagnóstico, tratamento e prevenção atuais (23). Um dos mais importantes estudos de coorte, o *Framingham Heart Study*, já incorporou análises genéticas em seu repertório de avaliações clínicas (25).

1.4 INFLUÊNCIAS GENÉTICAS NA TERAPÊUTICA

A medicina genômica influenciará a farmacoterapia de diversas formas, dentre elas: identificando novos alvos farmacológicos, orientando o desenho de drogas, proporcionando melhores desenhos de ensaios clínicos e, obtendo maior eficácia e menor incidência de efeitos colaterais pela prescrição personalizada de medicamentos. Adicionalmente, abordagens terapêuticas não baseadas em fármacos, como mudanças dietéticas, intervenções comportamentais e de hábitos

de vida, modificações da exposição a agentes externos, e ações populacionais de saúde pública, também sofrerão influências significativas de informações genéticas.

1.5 FARMACOGENÉTICA

Estima-se que fatores genéticos contribuam em 20 a 95% na variação interindividual no metabolismo e na resposta farmacológica de medicamentos (26). O termo farmacogenética tem sido utilizado para designar os estudos que avaliam a influência de fatores genéticos nas diferenças entre as propriedades farmacológicas de medicamentos observadas entre os indivíduos.

Os primeiros estudos a documentar a presença de influências hereditárias na resposta a medicamentos datam da metade do século 20, e identificaram a predisposição hereditária para o desenvolvimento de reações adversas às drogas isoniazida, primaquina e succinilcolina (5). Atualmente, o campo da farmacogenética está evoluindo para a farmacogenômica, onde ao invés da influência de genes candidatos individuais, as variações genéticas estão sendo pesquisadas numa escala que abrange todo o genoma (ou pelo menos grandes regiões do genoma).

Uma variação genética pode influenciar a resposta a um medicamento por interferência direta ou indireta nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de uma droga (figura 1.7). As variações genéticas associadas à alteração da função de proteínas transportadoras e de enzimas metabolizadoras causarão mudanças na disponibilidade da droga no sítio de ação. Podemos citar, como um exemplo, uma modificação no gene que codifica a enzima *CYP2C9* da família do citocromo p450 que diminui o metabolismo da droga warfarina, que foi associada a aumento do risco de sangramento em pacientes portadores desta variação. Por outro lado, a presença de mutações em genes que codificam receptores farmacológicos ou enzimas alvo, também já foram implicadas em alterações da resposta farmacológica de certos medicamentos. Um exemplo é a mutação no gene da enzima vitamina K epóxi-redutase, o alvo de ação da warfarina, que foi associada a redução dos efeitos desta droga e necessidade de ajuste da dose (27).

A farmacogenética tem o potencial de melhorar a eficácia dos tratamentos, prevenir eventos adversos e evitar tratamentos caros e ineficazes (28). Entretanto, o uso de informações genéticas para orientar o planejamento terapêutico ainda é muito pouco realizado. Um dos principais motivos para este fato é escassez de estudos que demonstraram melhores desfechos clínicos quando uma conduta foi tomada com base em informações genéticas.

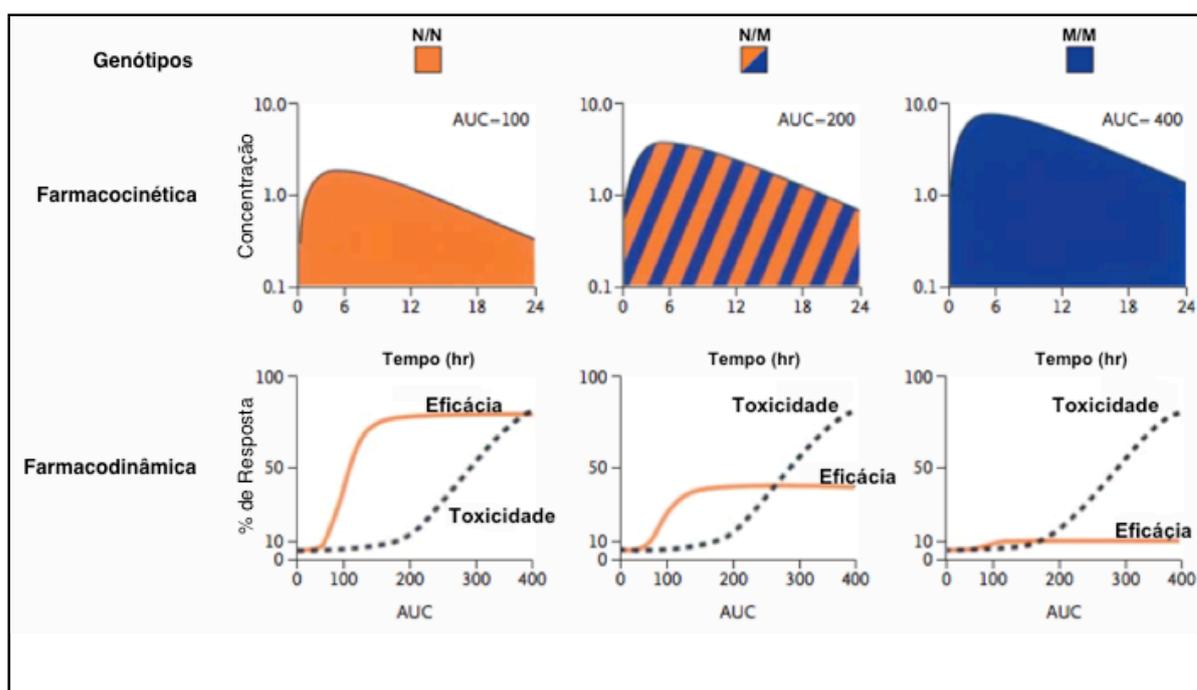


Figura 1.7 - A figura mostra os efeitos que dois polimorfismos genéticos podem ter sobre as características farmacológicas de uma droga. Os genótipos apresentados são: alelo normal em homozigose (N/N); alelo mutante em homozigose (M/M); e heterozigoto (N/M). O grupo de gráficos superior mostra a concentração plasmática de uma droga após sua administração. A medida que a ação de uma enzima que metaboliza essa droga é prejudicada pela presença de uma ou duas mutações, ocorre um acúmulo plasmático crescente dessa droga, resultando em aumento de sua meia-vida de metabolização, com maior risco de superdosagem. O grupo de gráficos inferior mostra a curva de dose e resposta para os efeitos de uma droga, uma relação que é dependente da ligação da droga ao seu alvo farmacológico (em geral um receptor). A presença de mutações na proteína alvo resulta em prejuízo da ação da droga e falha terapêutica. É importante notar que neste caso o efeito tóxico é independente da ligação da droga ao seu alvo farmacológico e, uma tentativa de compensar o efeito da mutação com aumento de dose, pode resultar em efeitos tóxicos. (Fonte da imagem: *The New England Journal of Medicine* (26) - Direitos Autorais: *Massachusetts Medical Society*).

Para que a medicina genômica atinja todo o seu potencial, será necessária a realização de um grande número de estudos da associação genética nas mais

diversas situações encontradas na prática clínica. Paralelamente, também será fundamental a divulgação dos modernos conhecimentos sobre a genética humana entre os profissionais de saúde, para que assim possam incorporar esses novos conceitos nos protocolos clínicos que serão usados no futuro.

2 PRINCÍPIOS BÁSICOS

2.1 ESTRUTURA DO *DNA*

Todas as informações genéticas responsáveis pelo desenvolvimento e funcionamento do corpo humano estão codificadas em moléculas de ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid - DNA*). A estrutura do *DNA* se baseia em duas cadeias de nucleotídeos interligadas, que assumem uma conformação tridimensional em dupla-hélice (figura 2.1) (8). Os nucleotídeos são as unidades básicas do polímero de *DNA*, e são constituídos por um anel sacarídeo (desoxirribose), um grupamento fosfato e uma base nitrogenada, que é específica para cada tipo de nucleotídeo. Existem dois grupos de nucleotídeos, as purinas (adenina [A] e guanina [G]) e as pirimidinas (citosina [C] e timina [T]). O esqueleto central da cadeia de *DNA* é composto pelos anéis de desoxirribose unidos pelos grupamentos fosfato em ligações covalentes do tipo fosfodiéster. Por sua vez, a junção entre as duas cadeias de *DNA* se dá por pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas de cada uma das cadeias, sendo que uma adenina forma par com uma timina, enquanto que uma guanina forma par com uma citosina (9). Este comportamento é denominado complementariedade das bases. A sequência do *DNA* humano possui 3,2 bilhões de pares de bases, e o termo genoma é usado em referência a esta totalidade.

As informações genéticas estão contidas na sequência dos nucleotídeos da molécula de *DNA*. Cada uma das bases (A, T, C e G) pode ser considerada como uma letra de um alfabeto de quatro letras (9). A sequência é “lida” durante o processo de expressão gênica, que também é chamado de transcrição, pois as informações contidas na “linguagem” de um ácido nucleico (*DNA*) são copiadas usando a mesma linguagem, ou seja, um outro tipo de ácido nucléico, mais especificamente o ácido ribonucleico (*ribonucleic acid - RNA*). Este processo cria uma cadeia de *RNA* complementar a uma sequência específica contida no genoma.

Uma fração dos produtos de transcrição passa pelo processo de tradução, onde as informações contidas na sequência do *RNA* são interpretadas para a

síntese de todas as proteínas do corpo. A tradução é feita no citoplasma por uma organela chamada ribossomo, que é composta pela junção de subunidades proteicas e de *RNA*. A forma encontrada pela natureza para que um “alfabeto de quatro letras” (bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos) seja traduzido para um “alfabeto de 23 letras” (23 aminoácidos usados para a síntese de proteínas) é pela leitura simultânea de três bases, que se combinam em diferentes sequências chamadas códons (figura 2.2) (9).

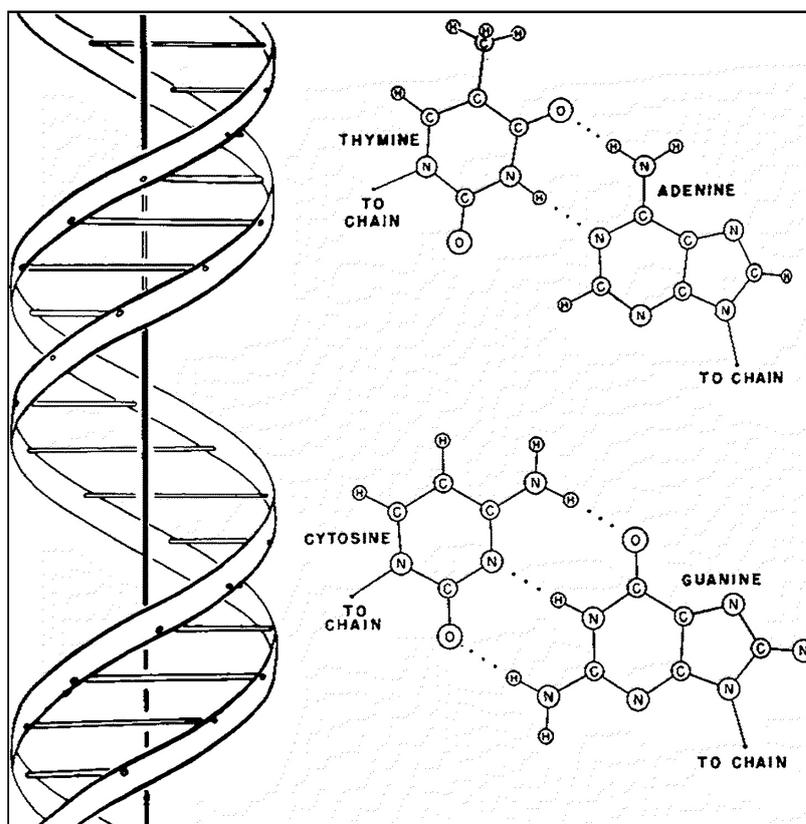


Figura 2.1 - Representação da estrutura do *DNA* como descrita por Watson e Crick (Fonte da imagem: *Nature* (8) - Direitos Autorais: *Nature Publishing Group*).

A estrutura do *DNA* também é fundamental para a propagação das informações hereditárias durante os processos celulares de mitose e meiose. Inicialmente, as cadeias são separadas pela dissociação das pontes de hidrogênio. A seguir, uma nova fita de *DNA* é criada a partir de uma antiga pela incorporação de nucleotídeos complementares à sequência que está sendo usada como molde. A característica de complementariedade entre as bases nitrogenadas do *DNA* permite que as informações genéticas permaneçam praticamente intactas nas fitas recém formadas (9).

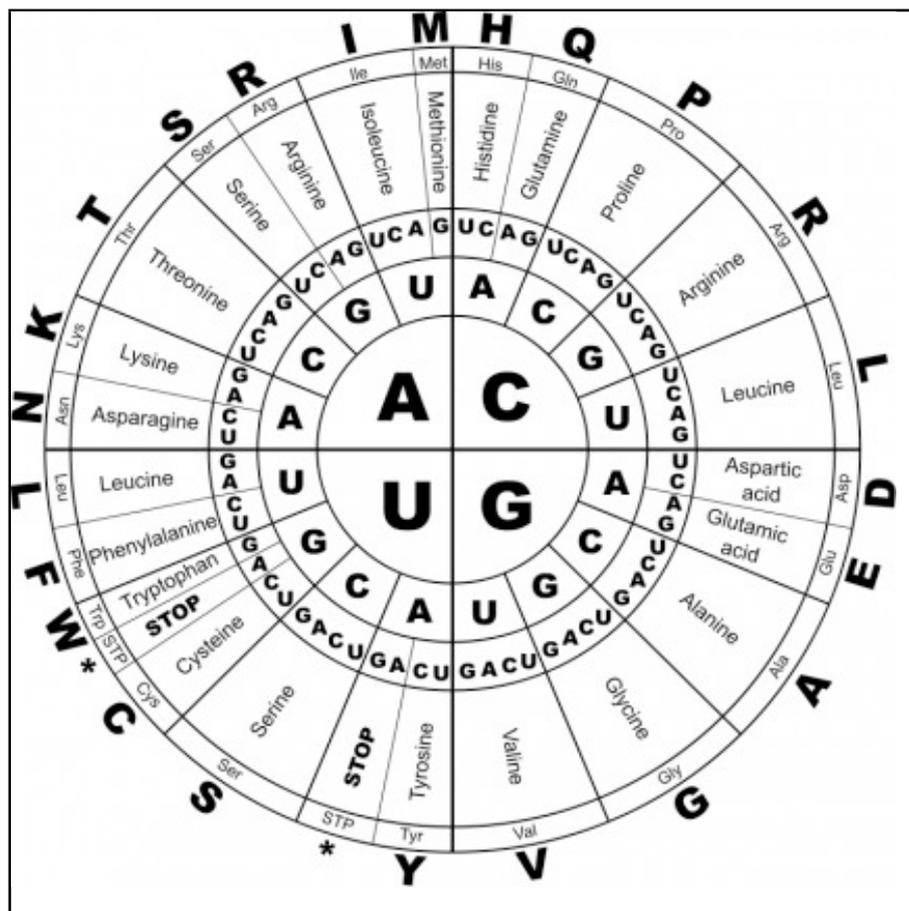


Figura 2.2 - Diagrama apresentando o código genético que orienta a síntese proteica a partir dos códons compostos por tríplexes de bases nitrogenadas (Fonte da imagem: *Open Clip Art Library*).

A maior parte do material genético humano está contida nos 22 pares de cromossomos somáticos e nos 2 cromossomos sexuais (X e Y), perfazendo um total de 46 cromossomos em cada célula do corpo. O material genético restante consiste em *DNA* mitocondrial localizado exclusivamente em mitocôndrias e herdado a partir do óvulo materno. Os cromossomos são formados pela dupla-fita de *DNA* altamente compactada em uma estrutura chamada cromatina (figura 2.3) (29). A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, um complexo formado pela fita de *DNA* enovelada a um conjunto de oito proteínas chamadas histonas. Apesar do *DNA* permanecer num estado altamente compactado dentro do núcleo celular, a estrutura da cromatina é dinâmica, uma característica essencial para que as regiões do *DNA* programadas para expressão tornem-se acessíveis à maquinaria celular responsável pela transcrição.

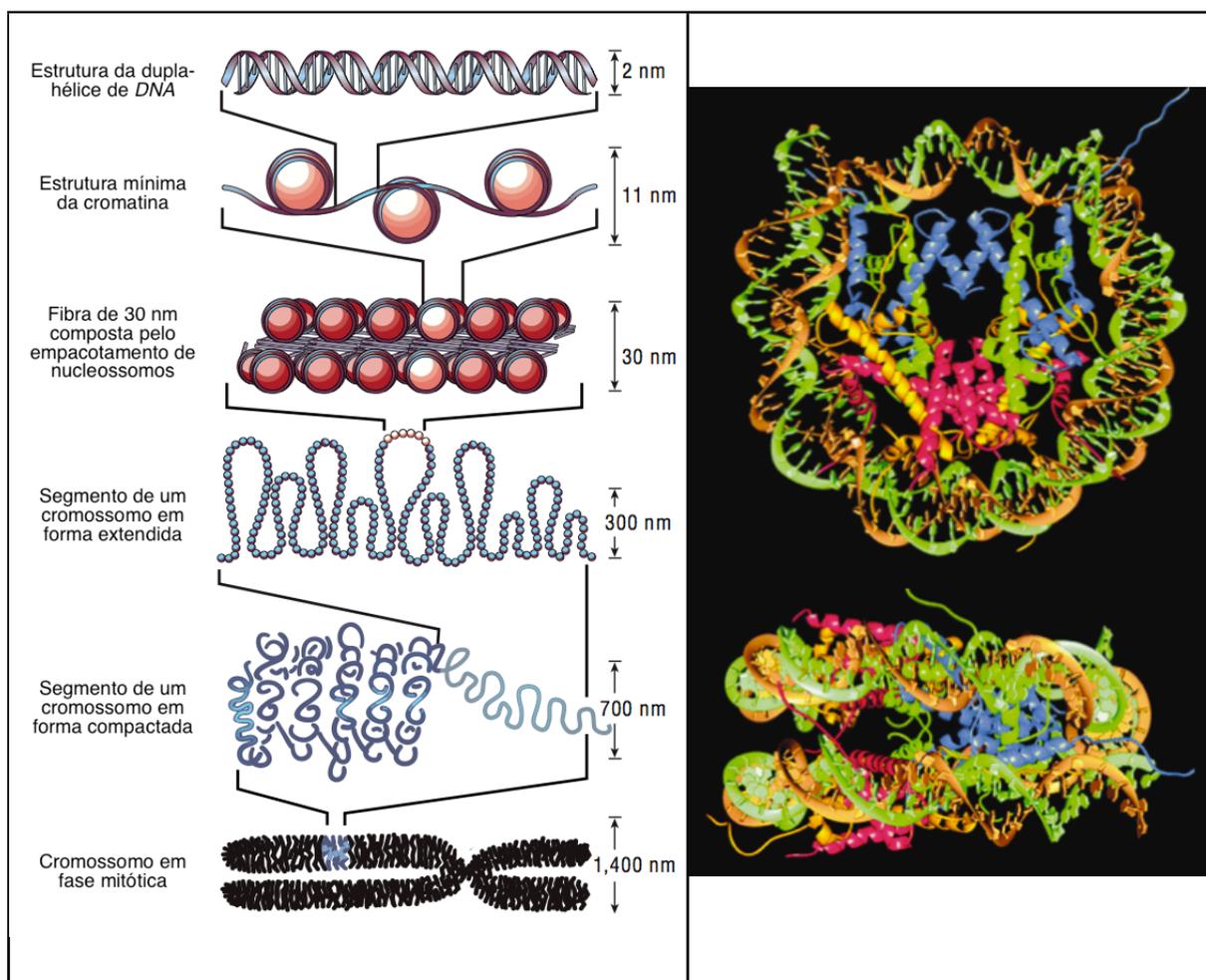


Figura 2.3 - Empacotamento do *DNA* nos vários níveis da estrutura da cromatina (Painel A). No painel B esta demonstrado a estrutura cristalográfica de um nucleossomo, mostrando como o *DNA* se enovela ao redor do octâmero de proteínas histonas (Fonte das imagens: *Nature* (29) - Direitos Autorais: *Nature Publishing Group*)

2.2 DEFINIÇÃO DE GENE

O termo gene tem sido tradicionalmente usado em referência a um segmento do *DNA* que, quando expresso, resulta na codificação de uma proteína. Este conceito, entretanto, está sofrendo modificações após a descoberta de que a maioria dos segmentos transcritos do genoma produzem moléculas de *RNA* que não codificam proteínas, apesar de ainda possuírem funções essenciais, como a regulação do processo de transcrição gênica. Atualmente, qualquer região do genoma que é transcrita e se traduz em um traço identificável, é chamada de gene (30).

A sequência de um gene possui diversos elementos funcionais constitutivos (figura 2.4). A região transcrita é composta por éxons e íntrons, sendo que as regiões intrônicas são retiradas da cadeia de *RNA* pelo processo de *splicing*, um dos mecanismos que prepara o *RNA* para a tradução. A sequência que dá origem a uma proteína durante a tradução (composta pela junção dos éxons do *RNA*) encontra-se intercalada por duas regiões não traduzidas (*untranslated regions* - *UTR*'s) que têm funções de regulação da expressão gênica e do processamento do *RNA*. Os promotores são regiões localizadas “acima” (em relação à direção que o *RNA* é sintetizado) da sequência que é transcrita em *RNA*, e estão relacionados à ligação de proteínas reguladoras do processo de transcrição. Existem também regiões que participam da regulação da expressão gênica mas que estão localizadas em pontos distantes da sequência transcrita. Estas regiões são chamadas de reforçadores (*enhancers*) ou silenciadores, dependendo do efeito que impõe sobre o processo de transcrição (9).

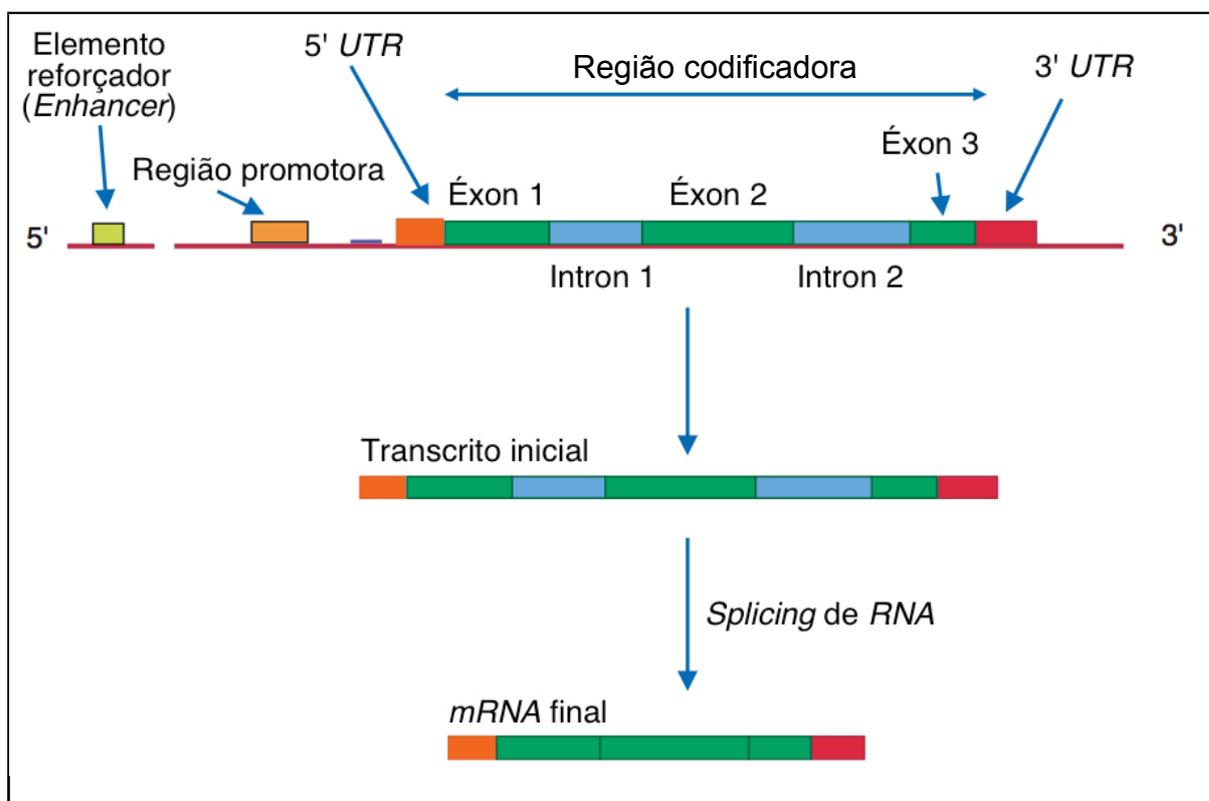


Figura 2.4 - Representação de alguns dos elementos que constituem um gene típico. Após a transcrição inicial da sequência do *DNA* o processo de *splicing* retira as regiões intrônicas, sendo este um dos processos necessários para formação do *RNA* mensageiro maduro (Fonte da imagem: *British Journal of Anaesthesia* (31) - Direitos Autorais: *Oxford University Press*).

2.3 VARIAÇÃO GENÔMICA

Ao se comparar os genomas completos de diferentes pessoas, descobriu-se que os seres humanos possuem um elevado grau de similaridade em suas sequências, sendo que 99,6% dos pares de bases são iguais (32). Devido ao tamanho do genoma, entretanto, uma diferença de 0,4% ainda corresponde a um volume substancial de variações, que podem chegar a 24 milhões de pares de bases entre dois indivíduos não relacionados. Sendo assim, o conceito de normalidade do ponto de vista genético tem se tornado cada vez mais complexo. Quando mais de uma sequência é identificada para um mesmo gene, as variantes são chamadas de alelos e aquele mais frequente é, por vezes, chamado de alelo normal. Quando a frequência do alelo mais raro ultrapassa o valor de 1% em uma determinada população, esta variação é chamada de polimorfismo. Já o termo mutação tem sido reservado para variações genéticas associadas ao desenvolvimento de doenças (33).

As diversas características individuais observáveis, em conjunto chamadas de fenótipo, são um produto da interação entre o potencial genético individual, também chamado de genótipo, e todas as influências ambientais externas às quais uma pessoa é exposta ao longo de sua vida. É importante notar que o potencial genotípico nem sempre se manifestará em um fenótipo reconhecível, assim como o inverso também é verdade, e um mesmo fenótipo poderá, ou não, ser determinado por efeitos genéticos.

2.4 TIPOS DE VARIAÇÕES

As variações genéticas podem ser classificadas em três grandes categorias: modificações de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* - *SNPs*), também chamados de mutações pontuais; inserções ou deleções de nucleotídeos, observadas em diferentes tamanhos e; rearranjos da estrutura do *DNA*, que alteram a ordem da sequência de nucleotídeos do genoma.

Quando as modificações de nucleotídeo único ocorrem na sequência que é transcrita de um gene, estas podem ainda ser classificadas pelos efeitos que impõe sobre a transcrição (figura 2.5). Uma modificação do *DNA* que resulta na troca de um aminoácido da sequência de uma proteína é chamada de mutação *missense*. Por outro lado, mutações do tipo *nonsense* criam um sinal de terminação do processo de transcrição (um códon de terminação) e o *RNA* transcrito tem a sua sequência truncada, o que normalmente resulta em sua degradação (7). Existem mutações que apesar de modificarem o códon, não modificam o aminoácido que é codificado, um fato explicado pela redundância de códons em relação aos aminoácidos usados para tradução de proteínas. Este tipo de mutação é comumente chamada de silenciosa, entretanto, já foi descrito que este tipo de variação pode modificar o processo de *splicing* de *RNA* (34), assim como interferir no processo de dobramento de proteínas (35), alterando suas funções.

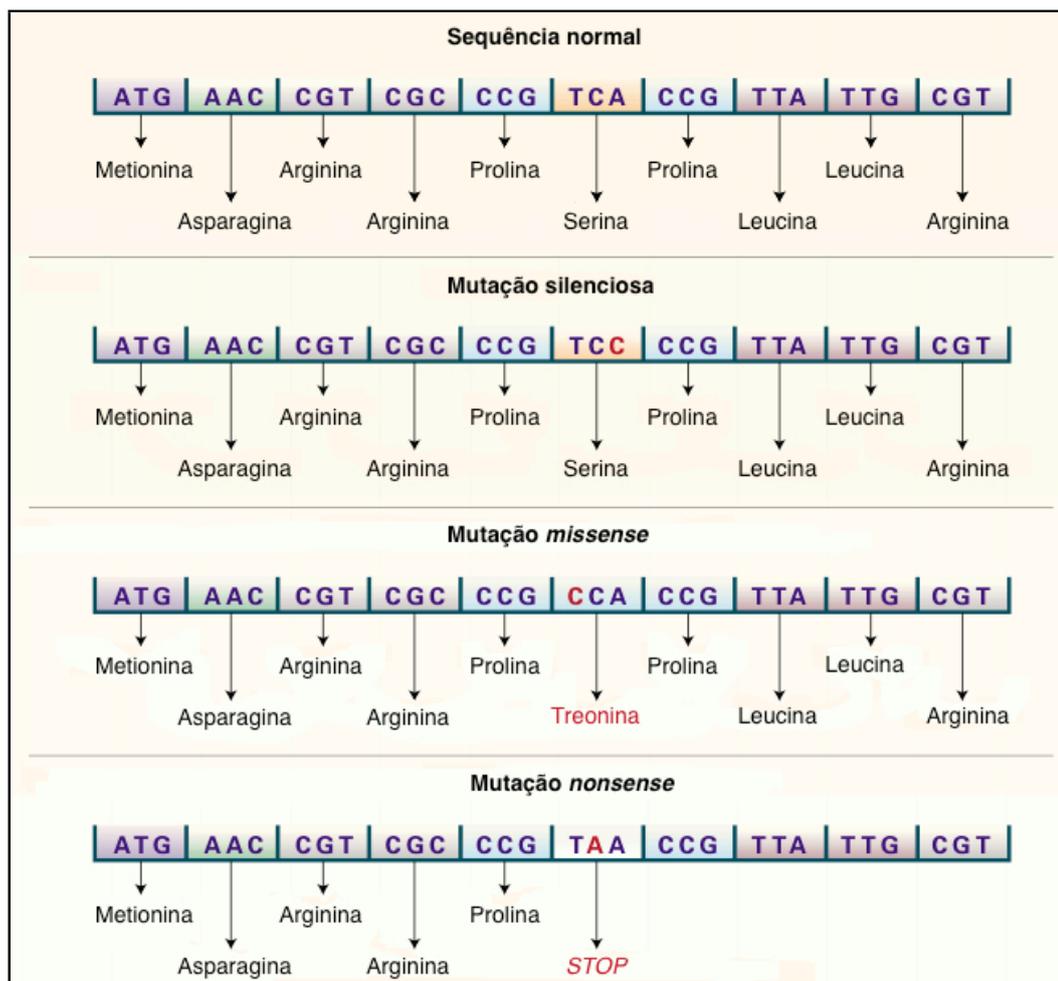


Figura 2.5 - Exemplos de polimorfismos de nucleotídeo único e suas repercussões (Fonte da imagem: *The New England Journal of Medicine* (7) - Direitos Autorais: *Massachusetts Medical Society*).

As inserções e deleções de nucleotídeos são tipos de modificações comuns e podem variar de tamanho desde um par de base até grandes sequências de milhares de pares de bases (33). Assim como os *SNPs*, as modificações do tipo inserção e deleção podem ter efeitos neutros (sem influências sobre o fenótipo) ou efeitos deletérios que se associam ao desenvolvimento de doenças. Existem segmentos do genoma várias vezes duplicados, e estas estruturas são chamadas de variações do número de cópias (*copy-number variations - CNVs*) (36). Apesar deste tipo de modificação já ter sido associado a diferentes doenças psiquiátricas (37, 38), uma pessoa normal possui em média 100 *CNVs* em seu genoma (14).

A avaliação das variações genéticas de um indivíduo é chamada de genotipagem e pode ser feita por diferentes métodos (39). No passado, os testes de genotipagem se concentravam em uma ou apenas algumas poucas mutações na sequência de um único gene. Em geral, estes testes se baseavam na reação de *PCR*, onde uma região de interesse do genoma era amplificada e uma busca por mutações era feita no produto de amplificação. Desenvolvimentos tecnológicos recentes agora nos permitem avaliar milhões de variações simultaneamente. Estes novos métodos se baseiam primariamente em microarranjos de *DNA* e em sequenciamentos de alta eficiência (*next-gen sequencing*) (33).

2.5 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA

A capacidade de avaliação das variações genéticas de forma rápida e barata tem possibilitado a realização de um grande número de estudos clínicos que estão definindo a influência de fatores genéticos no diagnóstico e tratamento de doenças (23). O objetivo destes estudos de associação genética é estabelecer uma associação estatisticamente significativa entre uma ou mais variantes genéticas e certos fenótipos ou estados patológicos. Idealmente, o estabelecimento de uma associação entre uma variante e um desfecho também geraria uma nova compreensão sobre mecanismo biológico relacionado a essa associação, aumentando o entendimento sobre a fisiologia do estado normal e doente do organismo.

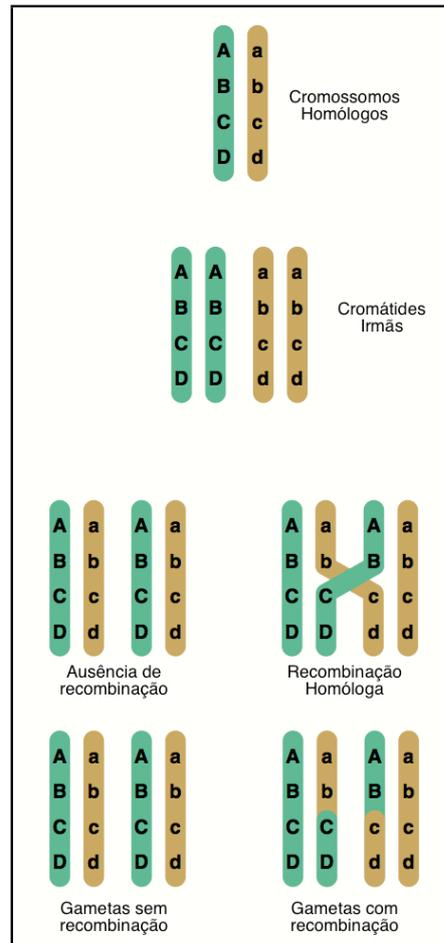


Figura 2.6 - Recombinação homóloga durante o processo de meiose. Inicialmente, as células germinativas duplicam o material genético de cada de seus cromossomos. O emparelhamento das cromátides permite a troca de material genético entre cromossomos homólogos, produzindo gametas com ou sem recombinação da sequência genética. Os haplótipos correspondem a segmentos conservados que são trocados durante este processo, e estão demonstradas nos gametas com recombinação (alelo C é herdado juntamente ao alelo D, constituindo o haplótipo CD, assim como os alelos c e d que constituem o haplótipo cd).

Existem duas situações em que podemos identificar uma associação entre uma variação genética e um fenótipo ou doença. Na primeira, a variante detectada possui um efeito funcional direto sobre a característica observada. A outra possibilidade é que a variante identificada se encontra em desequilíbrio de ligação com a mutação responsável pelo efeito. O desequilíbrio de ligação ocorre quando dois ou mais alelos (localizados no mesmo ou em genes diferentes) se encontram fisicamente próximos em um cromossomo, sendo geralmente herdados em conjunto. Além da proximidade física entre as variantes genéticas, podemos citar como determinantes da intensidade do desequilíbrio de ligação a taxa de recombinação homóloga (figura 2.6) daquela região do cromossomo e o tempo desde o surgimento

das variantes na população que está sendo avaliada (40). Um grupo de alelos em desequilíbrio de ligação entre si é denominado haplótipo. A identificação de um alelo que pertence a um haplótipo específico permite que se façam inferências sobre presença de outros alelos associados ao mesmo haplótipo, mesmo que estes não sejam avaliados diretamente. Sendo assim, a herança de um haplótipo se comporta como aquela de um alelo único.

O desenho de estudos de associação genética segue aproximadamente os mesmos princípios gerais usados no planejamento de estudos clínicos epidemiológicos. Apesar de estudos do tipo coorte e ensaio clínico serem realizados, o desenho mais típico é o caso-controle, onde padrões genéticos são pesquisados em indivíduos afetados (casos) e comparados ao perfil de indivíduos não afetados (controles). Os estudos podem também ser classificados pela estratégia adotada para identificar os fatores genéticos relacionados a uma determinada característica ou doença (40). Os estudos do tipo “polimorfismo candidato” avaliam a influência de um polimorfismo específico sobre o desfecho de interesse, sendo que esta estratégia geralmente se baseia em mecanismos fisiológicos que explicariam esta associação. Estudos de “gene candidato” geralmente pesquisam um número variável de polimorfismos (5 a 50 *SNPs*) na sequência de um gene, selecionado com base em suas funções, ou por estar próximo a uma região ampla do genoma que foi associada ao fenótipo de interesse. Estudos mais amplos do tipo *fine mapping* (avaliação de 1 a 10 milhões de pares de bases) e estudos de associação genômica ampla (*GWAS*) buscam associações em regiões amplas, que podem chegar até à extensão de todo o genoma (figura 2.7). Em consequência dos métodos que são adotados para sua realização, os estudos do tipo *GWAS* permitem uma busca não-enviesada de variações genéticas associadas a características individuais e doenças, mesmo que o mecanismo responsável por esta associação seja desconhecido. Interessantemente, a grande maioria dos *SNPs* identificados por estudos *GWAS* se localizam em regiões que não codificam proteínas (17).

A especificação de qual é o modelo de herança genética que rege a associação entre uma variação genética e o aparecimento de um efeito ou característica, definirá como esta associação deve ser testada nos estudos de associação genética. Quatro diferentes modelos podem ser descritos pela avaliação do efeito que a variação causa em indivíduos heterozigotos (41). No caso de um

modelo genético dominante, a presença de uma ou duas cópias da variação genética resulta no aparecimento do efeito. Por outro lado, em um modelo recessivo, o efeito só surgirá quando duas cópias da variação estiverem presentes (em homozigose). Nestes dois casos, os indivíduos heterozigotos poderão ser agrupados junto a um dos grupos com genótipos homozigotos, selecionados de acordo com o modelo. A escolha de um modelo genético aditivo atribui um efeito dose para a variação genética, onde os heterozigotos apresentam um efeito x , enquanto os homozigotos para a variação apresentam um efeito $2x$. Nos casos em que não é possível prever qual o efeito que uma variação genética causará aos heterozigotos, um modelo genérico de associação deverá ser adotado, onde cada genótipo é considerado de forma independente, o que resultará na análise de três categorias diferentes: homozigoto A, heterozigoto AB e homozigoto B.

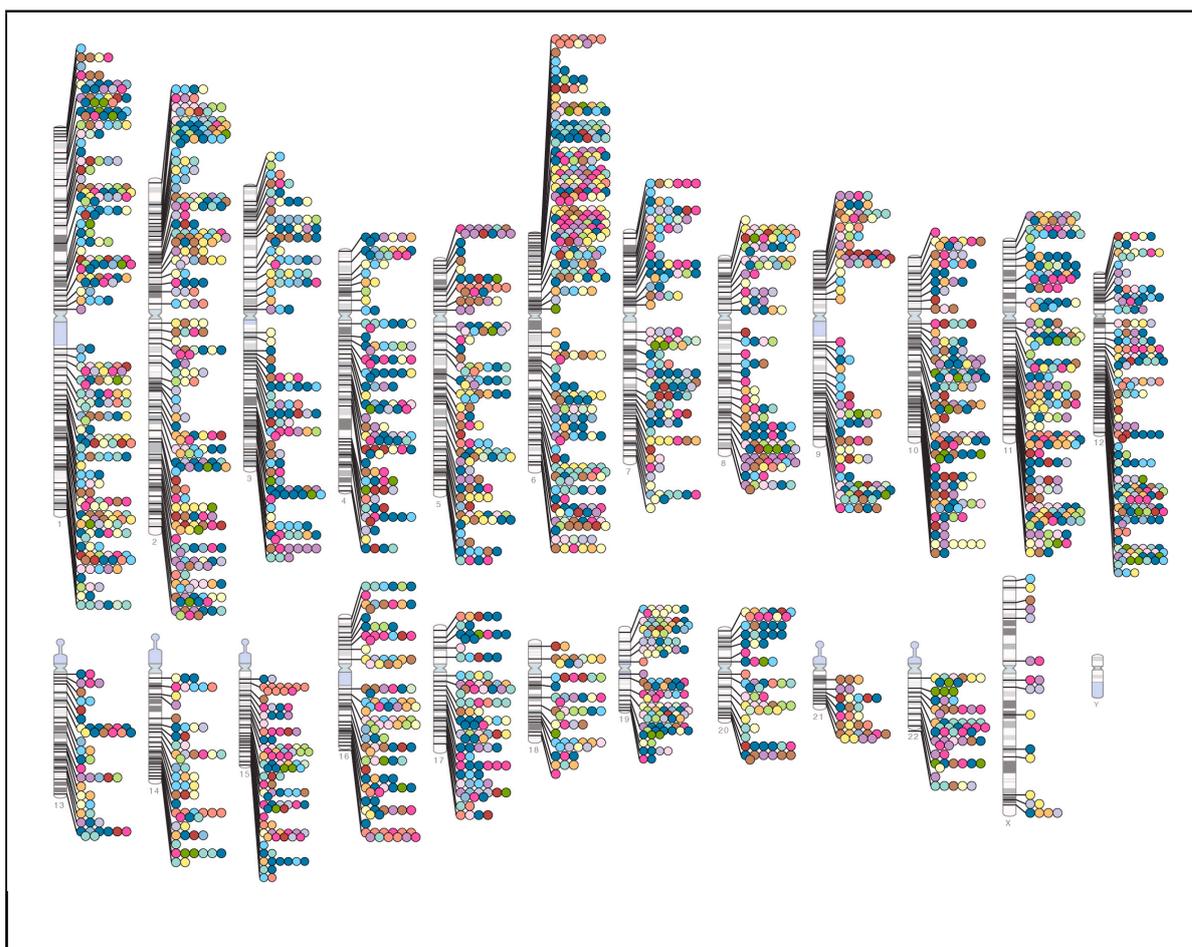


Figura 2.7 - Estudos GWAS publicados até julho de 2012. Estão representadas as associações entre diversos polimorfismos do genoma humano e diferentes características clinicamente relevantes (Fonte da imagem: *National Human Genome Research Institute*).

Além dos efeitos de fatores de confusão e viés tradicionais, as conclusões dos estudos de associação genética também podem ser prejudicadas pela presença de subgrupos populacionais e pela realização de múltiplos testes de associação, quando feitos de forma não ajustada (41). Sendo assim, estes problemas devem ser levados em consideração durante as análises desse tipo de estudo. A presença de subgrupos populacionais pode ser testada pela comparação da distribuição alélica observada àquela prevista pelo postulado de Hardy-Weinberg (equilíbrio de Hardy-Weinberg - EHW), pelo qual se afirma que a distribuição de alelos somáticos em uma população é constante entre as gerações, desde que não ocorram migrações, mutações ou efeitos de seleção natural nesta população. Desta forma, a distribuição dos alelos A e B seguirão a proporção $p^2 + 2pq + q^2$, onde p é a frequência do alelo A e q é a do alelo B. Uma diferença significativa entre as distribuições esperada e observada sugere a existência de populações com perfis genéticos heterogêneos dentro da amostra de indivíduos selecionados para o estudo, gerando confusão sobre qual é a variante associada ao efeito.

Estudos recentes têm avaliado uma quantidade crescente de variações genéticas, um número que pode chegar a mais de 1 milhão de *SNPs* avaliados simultaneamente (17). Consequentemente, é esperado que uma grande quantidade de falsas associações sejam criadas pela realização de múltiplos testes de associação. Existem duas estratégias metodológicas para lidar com este problema: diminuir o número de testes realizados, pela seleção precisa dos desfechos de interesse, por exemplo, ou pelo ajuste dos critérios que definem uma associação, como pela utilização do método de Bonferroni, que divide a probabilidade da presença de uma associação pelo número de testes realizados (figura 2.8).

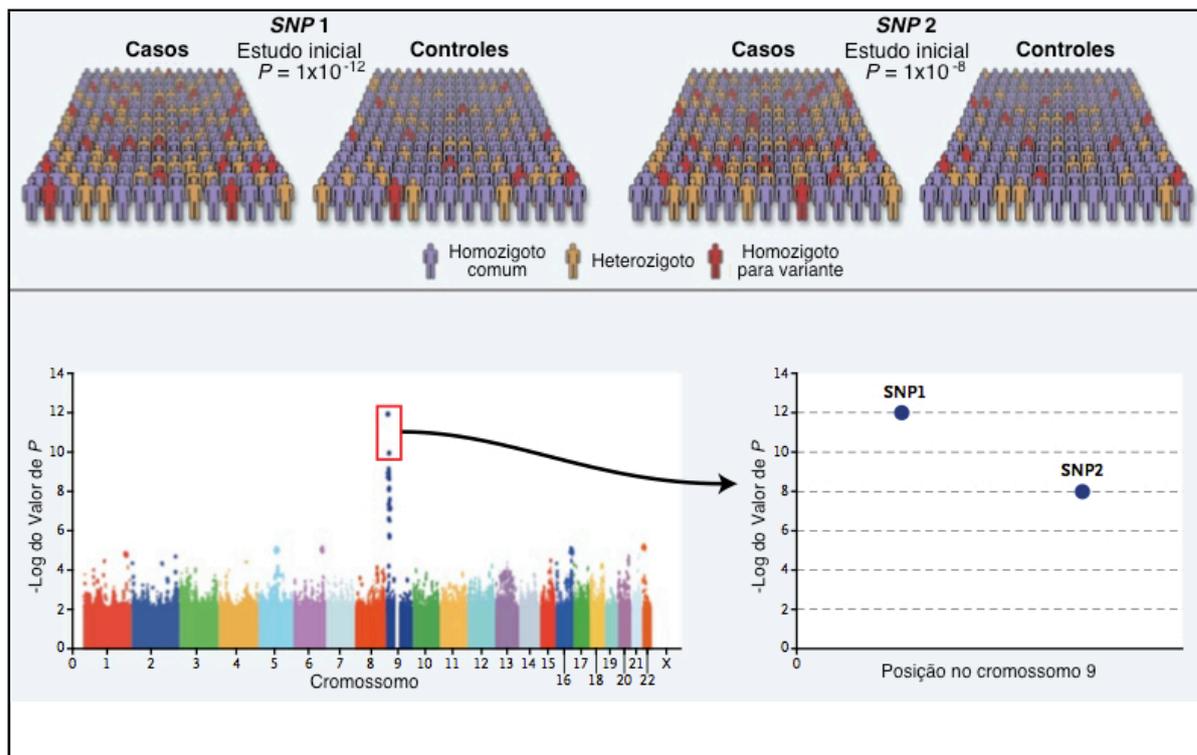


Figura 2.8 - Modelo para os estudos de associação genômica ampla. O desenho típico deste tipo de estudo é o de caso-controle, onde a frequência de variantes genéticas são comparadas entre pacientes que possuem uma determinada característica ou doença versus indivíduos não acometidos. A figura mostra um estudo que detectou uma associação forte (valor de $P \leq 1 \times 10^{-8}$) entre dois polimorfismos (SNP 1 e 2) e uma característica individual. O gráfico inferior esquerdo mostra a probabilidade (em valor de P) de cada um dos milhares de polimorfismos avaliados (ao longo de todo o genoma) estarem associados à característica de interesse do estudo. Este tipo de gráfico é bastante encontrado nas publicações de estudos GWAS e é comumente chamado de “Manhattan plot” (Fonte da imagem: *The New England Journal of Medicine* (17) - Direitos Autorais: *Massachusetts Medical Society*).

PROJETO 1

**AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIAS GENÉTICAS SOBRE A RESPOSTA
HEMODINÂMICA DE PACIENTES SUBMETIDOS À ANESTESIA**

3 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIAS GENÉTICAS SOBRE A RESPOSTA HEMODINÂMICA DE PACIENTES SUBMETIDOS À ANESTESIA

3.1 JUSTIFICATIVA

A hipotensão arterial em gestantes submetidas a cirurgia cesariana é uma complicação frequente da anestesia subaracnóide (42). A hipovolemia relativa resultante da compressão aorto-cava pelo útero gravídico, associada à vasodilatação causada pelo bloqueio de fibras simpáticas pela droga anestésica, explicam essa intercorrência. Para que se evitem os efeitos deletérios da queda da pressão arterial materna sobre a perfusão uteroplacentária e o bem-estar fetal, estratégias como o deslocamento uterino (43), a infusão de quantidades variáveis de cristalóides ou colóides (44) e o uso de diferentes vasopressores (45), têm sido empregadas.

A descrição de fatores genéticos que pudessem identificar as gestantes sob maior risco de hipotensão arterial seria interessante do ponto de vista terapêutico. O uso de doses anestésicas menores e medidas preventivas mais agressivas poderiam ser implementadas em pacientes de alto risco. Além disso, as informações obtidas aumentariam o conhecimento a respeito dos mecanismos de regulação hemodinâmica e poderiam servir de base para estudos em outras situações clínicas, como o choque séptico, por exemplo.

O controle da pressão arterial e do débito cardíaco depende em grande parte da atividade dos receptores beta-2 adrenérgicos (*ADRB2*) (46). Quando ativado, o receptor *ADRB2* inicia uma cascata de sinalização celular através da proteína G resultando, entre outros efeitos, em broncodilatação, vasodilatação e estimulação do inotropismo e cronotropismo cardíacos. O gene do receptor *ADRB2* já foi identificado como sendo polimórfico, possuindo pelo menos 19 variações em sua sequência genética, e já foi demonstrado que alguns destes polimorfismos podem estar associados ao desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica, obesidade, asma brônquica e doença arterial coronariana (47).

Os polimorfismos Arg16Gly (NCBI, RefSNP ID: rs1042713 - substituição do resíduo glicina por arginina no códon 16) e Gln27Glu (NCBI, RefSNP ID: rs1042714 - substituição de uma glutamina por ácido glutâmico no códon 27) são variações frequentes do receptor *ADRB2* (figura 3.1). Estudos seminais em cultura de células mostraram que estas variações interferem no processo de dessensibilização do receptor *ADRB2* induzida por agonistas (também chamado de *downregulation*) (48). Desde então, estas variações genéticas foram estudadas em diferentes contextos clínicos, como na resposta de pacientes asmáticos à terapia broncodilatadora crônica (49) e como potenciais marcadores de risco do desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica (50).

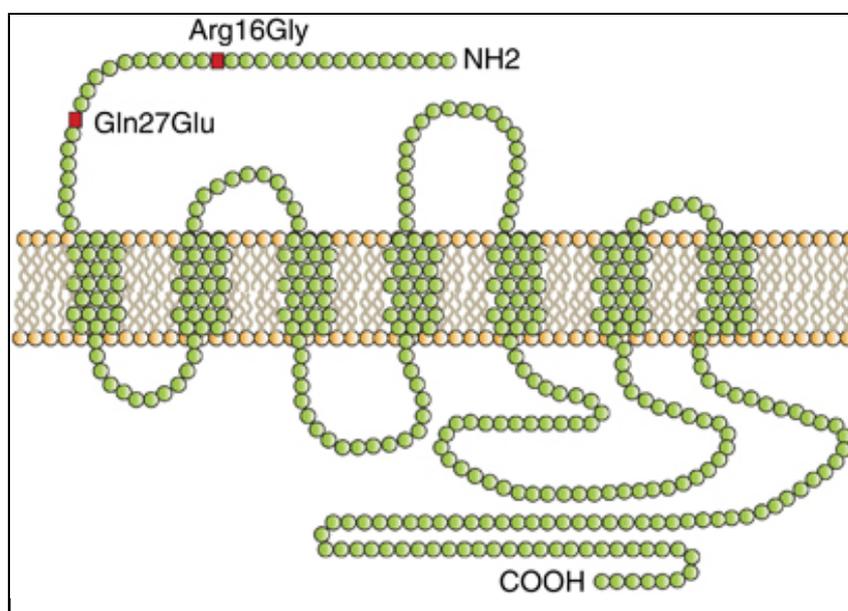


Figura 3.1 - Os polimorfismos Arg16Gly e Gln27Glu do receptor beta-2 adrenérgico estão demonstrados, estando localizados nas posições 47 e 79 no domínio extracelular do receptor (Fonte da imagem: *The Pharmacogenomics Journal* (51) - Direitos Autorais: *Macmillan Publishers Limited*).

Alguns estudos já avaliaram a associação entre estes polimorfismos do receptor *ADRB2* e diferenças na resposta hemodinâmica após anestesia subaracnóide para realização da operação cesariana. Um primeiro estudo, que comparou parturientes portando diferentes isoformas do receptor beta-2 adrenérgico, não demonstrou diferenças significativas na incidência de hipotensão entre os grupos. No entanto, as pacientes homozigotas para a isoforma Gly16 precisaram de uma menor quantidade de drogas vasopressoras para controle da hipotensão após a indução da anestesia (52). Recentemente, nosso grupo realizou

um estudo com formato semelhante (53). Nossos resultados, entretanto, foram divergentes daqueles descritos previamente. Observamos que a presença do genótipo Arg16 em homozigose conferiu estabilidade hemodinâmica às gestantes submetidas ao bloqueio subaracnóide para realização de operação cesariana. Além de diminuir o risco de hipotensão arterial (razão de risco), menos vasopressores foram utilizados para normalização da pressão arterial nas pacientes com isoforma Arg16. Nosso estudo, no entanto, contava com um pequeno número de pacientes (50 parturientes) e os efeitos do polimorfismo Gln27Glu não foram avaliados.

Um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos Arg16Gly e Gln27Glu já foi descrito, indicando a presença de haplótipos no gene *ADRB2* (figura 3.2) (54, 55). Haplótipos são segmentos de um mesmo cromossomo contendo um grupo de polimorfismos que são herdados como uma unidade. Sendo assim, um efeito atribuído a um polimorfismo específico pode, na verdade, ser a manifestação de uma outra mutação próxima mas não avaliada. O efeito de haplótipos do gene *ADRB2* sobre a regulação hemodinâmica de parturientes submetidas a anestesia subaracnóidea ainda não foi estudado.

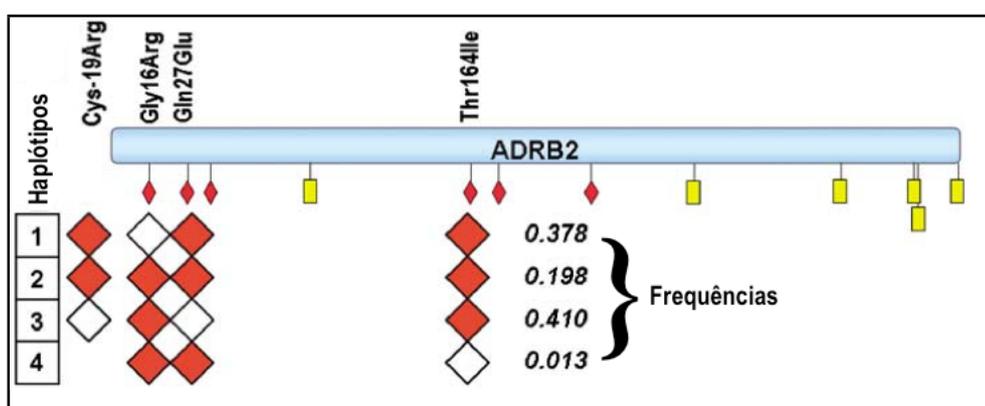


Figura 3.2 - Representação das mutações *missense* (losango vermelho) e silenciosas (retângulos amarelos) encontradas no gene *ADRB2*. Abaixo dos pontos de polimorfismo estão apresentados os alelos comuns (em vermelho) e os alelos variantes (em branco). Os haplótipos e suas frequências (segundo Zee et al. 2005 (56)) estão identificados (Fonte da imagem: *The Pharmacogenomics Journal* (55) - Direitos Autorais: *Macmillan Publishers Limited*).

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivos gerais

- Aumentar os conhecimentos a respeito de variações genéticas que podem influenciar a prática da Anestesiologia.
- Gerar novos métodos de diagnóstico molecular de variações genéticas.

3.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a associação entre diferentes haplótipos compostos pelos polimorfismos dos códons 16 e 27 do gene do receptor beta-2 adrenérgico e o risco de hipotensão arterial (medido pela razão de risco) em parturientes submetidas a anestesia subaracnóidea para realização de operação cesariana.
- Avaliar quais os modelos de herança genética dos haplótipos do *ADRB2* que estão mais fortemente relacionados com o risco de hipotensão arterial materna.
- Comparar a resposta hemodinâmica subsequente à indução da anestesia subaracnóidea entre grupos de pacientes formados de acordo com a presença de haplótipos específicos do gene do receptor *ADRB2*.
- Estabelecer uma metodologia rápida e custo-efetiva de genotipagem dos polimorfismos Arg16Gly e Gln27Glu do receptor beta-2 adrenérgico através da técnica de *PCR* quantitativo alelo-específico.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 População de Pacientes

Cento e cinquenta parturientes foram recrutadas no Hospital Universitário de Brasília e no Hospital Regional da Asa Sul durante o período de agosto de 2007 a julho de 2010. As pacientes eram convidadas para participar da pesquisa se tinham 16 anos ou mais, se seriam submetidas à operação cesariana por indicação obstétrica e se eram classificadas como estado físico I ou II pela classificação de estado físico da Sociedade Americana de Anestesiologia (*American Society of Anesthesiologists - ASA*) (Anexo E).

Os critérios de exclusão foram: presença de contraindicações para a técnica de anestesia subaracnóidea; descrição de alergias a anestésicos locais ou opióides; falha parcial ou total do bloqueio anestésico; idade gestacional abaixo de 37 semanas; gestação múltipla; peso acima de 100 kg; diagnóstico de doenças cardiovasculares, eclâmpsia ou pré-eclâmpsia; tratamento com corticoesteróides, magnésio, agonistas ou antagonistas adrenérgicos. Além disso, foram também excluídas as pacientes incapazes e as consideradas analfabetas funcionais.

3.3.2 Procedimento Anestésico

A pressão arterial foi determinada de forma não-invasiva por um monitor oscilométrico automático com a bolsa pressurizadora posicionada no braço oposto ao da punção venosa. A medida basal da pressão arterial foi determinada por três medidas consecutivas, executadas antes da indução da anestesia subaracnóidea, com a paciente posicionada em decúbito lateral esquerdo. Todas as pacientes receberam a injeção anestésica na posição sentada, através dos espaços intervertebrais L3-L4 ou L4-L5, usando uma agulha do tipo Quincke (tamanho 25 ou 27G). Uma dose anestésica única contendo 10 mg de bupivacaína hiperbárica

juntamente com 3 microgramas de sufentanil foi administrada. Após a indução da anestesia, as pacientes permaneceram em posição supina em uma mesa operatória plana. A hidratação venosa foi feita com 2000 ml de solução cristalóide (solução de Ringer lactato ou solução salina a 0,9%) infundida rapidamente através de um cateter 18G posicionado em um dos membros superiores.

A hipotensão arterial materna foi definida por uma queda de 20 mmHg na pressão arterial sistólica ou uma queda de 20% da pressão arterial média em relação aos valores basais. O tratamento da hipotensão era iniciado quando qualquer dos limites pré-estabelecidos era ultrapassado. A terapia foi feita com uma dose de 10 mg do vasopressor efedrina, inicialmente, e 5 mg em doses subsequentes até o restabelecimento dos valores da pressão arterial acima dos limites que definiam a hipotensão arterial.

O nível sensitivo do bloqueio anestésico foi definido por um estímulo com agulha, feito 15 minutos após a indução da anestesia. O tempo desde a indução da anestesia até o parto, os parâmetros hemodinâmicos e a doses de efedrina administradas foram registradas até que 30 minutos se passassem após a indução da anestesia, sendo utilizados intervalos de 3 minutos entre as anotações.

Ao final do procedimento uma amostra de 3 ml sangue venoso periférico foi colhida em frascos contendo o anticoagulante *EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)*. Esta amostra foi mantida congelada (-20°C) até o momento da extração de *DNA*.

3.3.3 Análise Laboratorial

O *DNA* genômico foi isolado de leucócitos circulantes provenientes do sangue total das pacientes. Foi usado o método da resina Chelex-100® (57) (BioRad, Hercules, CA, EUA). Este procedimento se inicia com a mistura de 50 µl de sangue com 1 ml de água. A mistura é incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, e o resultado é a hemólise do sangue. Em seguida, as células nucleadas são recuperadas por centrifugação da mistura por 3 minutos a 8000G. Após descarte do sobrenadante, é adicionado mais 1 ml de água ao precipitado e os passos de

incubação, centrifugação e descarte do sobrenadante são repetidos nas mesmas condições descritas acima. A seguir, 200 µl de uma suspensão da resina Chelex-100® a 5% é adicionada às amostras que são misturadas em um vórtice por 10 segundos. O lisado celular resultante é então incubado a 56°C por 30 minutos e a seguir a 95°C por 8 minutos. As amostras de *DNA* extraído são então armazenadas a -20°C para até sejam utilizadas.

A genotipagem dos polimorfismos Arg16Gly e Gln27Glu foi feita através do sistema de amplificação refratária à mutação usando a reação de amplificação em cadeia do *DNA* feita de modo quantitativo (58) (*PCR* quantitativo ou *qPCR*). Foram utilizados quatro oligonucleotídeos iniciadores (tabela 3.1) que quando combinados em pares formavam 4 diferentes reações, cada uma gerando um produto de amplificação com 82 pares de base (tabela 3.2 e figura 3.3). Os genótipos foram determinados pela comparação da eficiência das amplificações observadas nas reações A, B, C ou D. Cada um dos tubos de reação era composto por: 10 µl da solução SYBR® Green (Maxima SYBR® Green *qPCR* Master Mix 2X, Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA), 100 ng de cada oligonucleotídeo iniciador e 5 µl da solução de *DNA* extraído em um volume final de 20 µl. Os controles negativos foram compostos por tubos de reação onde não era adicionado o *DNA*. O programa da reação no termociclador foi: ativação da polimerase de *DNA* a 95°C por 10 minutos, seguida por 31 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 10 segundos e extensão a 72°C por 10 segundos. A especificidade da reação foi confirmada pela análise da curva de desnaturação, feita pelo aquecimento dos produtos de amplificação de 60 a 90°C em incrementos de 0,3°C enquanto o decaimento da emissão de fluorescência era detectado. Tanto a amplificação quanto a análise da curva de desnaturação foram feitas no aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O protocolo de genotipagem foi validado pelo envio de produtos de reações de amplificação em cadeia de polimerase convencional (*PCR*) para sequenciamento da região que contém os polimorfismos. Este procedimento foi feito com as amostras das primeiras 50 pacientes recrutadas para nosso estudo. As reações de *PCR* foram feitas usando um kit comercial contendo a *Taq DNA* polimerase (Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA). Os oligonucleotídeos iniciadores usados (tabela 3.1) geravam um produto de amplificação de 367 pares de bases (figura 3.3). As condições das

reações foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos seguida por 35 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação a 94°C por 40 segundos, e anelamento/ extensão por 68°C por 1 minuto. A extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos. A amplificação foi feita em um termociclador TC-312 (Techne Inc. Burlington, NJ, EUA). A especificidade da reação de *PCR* foi testada por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 3.1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de *PCR* convencional e *PCR* quantitativo

Identificação	Seqüência	Variante identificada
ADRB2-1	5' - AGCGCCTTCTTGCTGGCACCCACTA - 3'	Arg16
ADRB2-2	5' - AGCGCCTTCTTGCTGGCACCCACTG - 3'	Gly16
ADRB2-3	5' - CCACCACCCACACCTCGTCCCTCTC - 3'	Gln27
ADRB2-4	5' - CCACCACCCACACCTCGTCCCTCTG - 3'	Glu27
ADRB2-5	5' - CACCACACCACAGCCGCTGAATGA - 3'	Sequenciamento
ADRB2-6	5' - ATGACCAGATCAGCACAGGCCAGTGAAGT - 3'	Sequenciamento

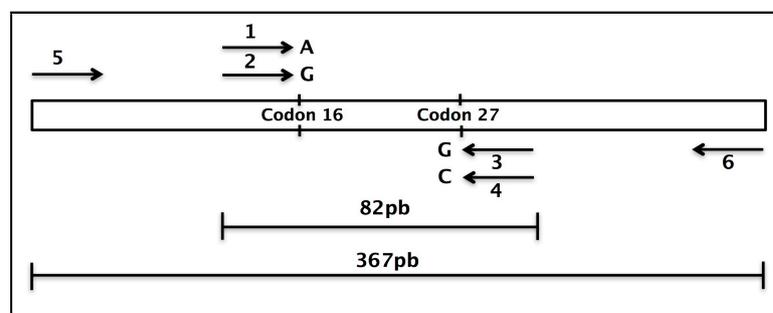


Figura 3.3 - Os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos estão indicados assim como os produtos de amplificação gerados pelas reação de *PCR*.

Tabela 3.2 - Configuração das reações de *PCR* quantitativo

Reação de <i>PCR</i>	Combinação de oligonucleotídeos
A	ADRB2-1 + ADRB-3
B	ADRB2-1 + ADRB-4
C	ADRB2-2 + ADRB-3
D	ADRB2-2 + ADRB-4

Os produtos da reação de amplificação foram purificados enzimaticamente usando o kit EXO-SAP em que 1 unidade de fosfatase alcalina (Promega, Madison, WI, EUA) e 1 unidade de exonuclease I (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) foram adicionadas à 10 µl do produto da amplificação. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e a seguir a 80°C por 20 minutos. Os produtos de amplificação purificados foram enviados para a empresa de sequenciamento Macrogen (Macrogen Inc, Coréia).

O sequenciamento de *DNA* foi realizado pela técnica descrita por Sanger (10) (terminação controlada da replicação), utilizando-se o produto *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* e a plataforma de sequenciamento *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer*. Inicialmente, a sequência alvo é submetida a repetidos ciclos de duplicação de forma semelhante a uma reação de *PCR*. Entretanto, além dos componentes normalmente utilizados em reações de *PCR*, também compõe as reações didesoxirribonucleotídeos trifosfatados (*ddNTP*) com marcação fluorescente. A incorporação de nucleotídeos do tipo *ddNTP* inibe o prolongamento da cadeia de *DNA*, uma vez que possuem um grupamento hidroxila no carbono 3' da cadeia de pentose o que impede a fusão de um novo nucleotídeo à cadeia. Como a incorporação de nucleotídeos *ddNTP* ocorre de forma aleatória, após vários ciclos de duplicação são produzidas cópias de diferentes tamanhos da sequência alvo. Estes fragmentos de *DNA* são separados pelo processo de eletroforese em capilares, e o sequenciamento é feito pela detecção dos nucleotídeos fluorescentes incorporados aos fragmentos de diferentes tamanhos.

3.3.4 Análise Estatística

A frequência dos alelos foi avaliada para os polimorfismos Arg16Gly e Gln27Glu do gene *ADRB2*, e a distribuição genotípica foi testada em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste de qui-quadrado de Pearson.

A associação entre a presença de diferentes haplótipos do receptor *ADRB2* e o risco de hipertensão materna foi testada em relação ao número de cópias (nenhuma, uma ou duas cópias) de cada um dos haplótipos encontrados,

inicialmente assumindo um modelo genérico de herança (cada grupo é avaliado de forma independente). Caso uma associação fosse sugerida pelo teste de qui-quadrado (valor de $P \leq 0,1$), ela seria melhor definida pela avaliação dos modos dominante (pacientes com uma ou duas cópias do haplótipo versus aqueles sem cópias), recessivo (pacientes com duas cópias versus aqueles com uma ou nenhuma cópia) e aditivo (é considerado um efeito aditivo para cada cópia do haplótipo). O modelo genético que melhor se ajustava aos dados foi usado para agrupar as pacientes nas demais análises. Os grupos foram comparados em relação às características de base, os níveis sensitivos do bloqueio, os tempos desde a indução da anestesia até o parto, os riscos de hipotensão, as doses administradas de efedrina e as variações na pressão arterial e na frequência cardíaca após a indução da anestesia.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a distribuição normal de variáveis contínuas. As variáveis categóricas foram comparadas usando o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fischer, a depender da situação. O teste de tendência de Armitage foi usado na análise do modelo aditivo de herança genética. Dados paramétricos foram comparados pelo teste t de Student e, em caso de distribuição não-paramétrica, pelo teste U de Mann-Whitney foi feito. Os parâmetros hemodinâmicos foram comparados usando o teste de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. O método de Kaplan-Meier foi aplicado para avaliar a propensão ao desenvolvimento de hipotensão ao longo do tempo após a indução da anestesia. As curvas de sobrevivência geradas foram comparadas usando o teste *log-rank*. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo e a correção para múltiplas medidas foi feita pelo método de Bonferroni, resultando em um valor corrigido de $P \leq 0,002$. As análises foram feitas pelo *software SPSS* (versão 17, IBM, Chicago, IL, USA).

3.3.5 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (Anexo C) e todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado.

3.4 RESULTADOS

A anestesia subaracnóidea foi administrada com sucesso em todos os casos e nenhuma complicação grave ocorreu. A incidência geral de hipotensão arterial foi de 71,3%. Durante análise dos dados coletados de 150 pacientes, verificamos que sete pacientes não preenchiam as especificações do protocolo, sendo que uma paciente tinha a idade inferior à especificada, a idade gestacional de cinco pacientes era inferior a 37 semanas e em um caso a idade gestacional não era conhecida. A análise foi realizada a partir dos dados de 143 parturientes.

Os padrões de amplificação obtidos podem ser visualizados na figura 3.4. Houve uma correlação perfeita entre os dados da genotipagem por *PCR* quantitativo e os resultados das 50 amostras enviadas para sequenciamento. A frequência dos alelos, genótipos e haplótipos pode ser verificada na tabela 3.3. A distribuição genotípica dos polimorfismos do códon 16 e 27 estava em equilíbrio com as proporções estimadas pelo modelo de Hardy-Weinberg (valor de *P* de 0,3 e 0,25, respectivamente). Apenas três haplótipos, dentre os quatro tipos possíveis, foram identificados. Nenhuma das pacientes apresentava o haplótipo ArgGlu, que seria identificado caso a reação de *qPCR* com a maior eficiência fosse a do tipo A.

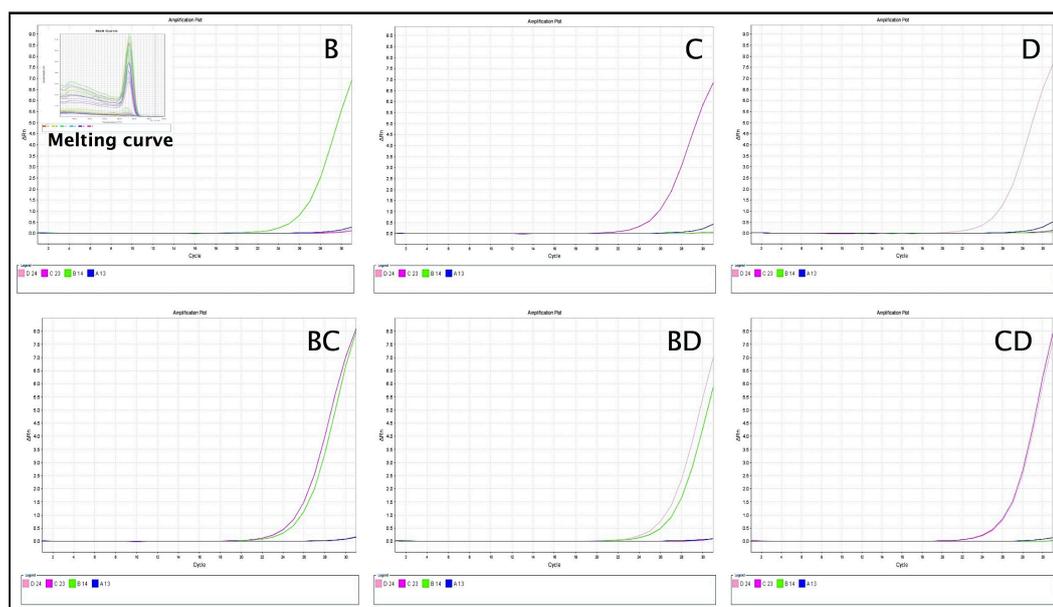


Figura 3.4 - Os diferentes padrões de amplificação encontrados na população estudada. Cada um dos quadros apresenta quatro reações feitas paralelamente para cada uma das amostras, que eram então comparadas em relação às suas eficiências de amplificação.

Tabela 3.3 - Variações genéticas encontradas na nossa população

Polimorfismo do códon 16		Polimorfismo do códon 27		
Alelos		Alelos		
Arg	122 (42,7)	Gln	216 (75,5)	
Gly	164 (57,3)	Glu	70 (24,5)	
Genótipos		Genótipos		
Arg16Arg	23 (16,1)	Gln27Gln	79 (55,2)	
Arg16Gly	76 (53,1)	Gln27Glu	58 (40,6)	
Gly16Gly	44 (30,8)	Glu27Glu	6 (4,2)	
Valor P do EHW	0.30	Valor P do EHW	0.25	
No. de cópias dos haplótipos				
Haplótipos	Sem cópias	1 cópia	2 cópias	Total de cópias
ArgGln	44 (30,8)	76 (53,1)	23 (16,1)	122 (42,7)
GlyGln	68 (47,5)	55 (38,5)	20 (14)	95 (33,2)
GlyGlu	80 (55,9)	57 (39,9)	6 (4,2)	69 (24,1)

Os valores são apresentados como número (porcentagem)

EHW - equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 3.4 - Descrição da razão de chance de hipotensão materna em associação aos haplótipos do gene do receptor beta-2 adrenérgico

No. de cópias dos haplótipos					
Haplótipos	Sem cópias	1 cópia	2 cópias	X ²	Valor de P
ArgGln	1	1,21	0,41	5,09	0,078
GlyGln	1	1,4	1,43	0,86	0,65
GlyGlu	1	1,1	2,14	0,48	0,49
No. de cópias ArgGln					
Modelo	Sem cópias	1 cópia	2 cópias	X ²	Valor de P
Aditivo	1	0,71	0,5	1,93	0,16
Dominante	1	0,9	0,9	0,06	0,8
Recessivo	1	1	0,36	4,92	0,027

Os valores de risco correspondem às razões de chance

A associação entre o número de cópias dos haplótipos e o risco de hipotensão materna está demonstrado na tabela 3.4. Apenas o haplótipo ArgGln parecia estar relacionado com o risco de hipotensão ($\chi^2 = 5,09$; $P = 0,078$) quando o efeito dos haplótipos foi pesquisado de maneira não específica. Quando as diferentes formas de herança genética foram testadas para o haplótipo ArgGln, o modelo recessivo (onde a presença de duas cópias é comparada à presença de uma ou nenhuma cópia) refletia com mais precisão o efeito genético sobre o risco de hipotensão ($P = 0,027$).

Baseado nestas informações, as pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com a número de cópias do haplótipo ArgGln: aquelas com uma ou nenhuma cópia ($N=120$) e aquelas com duas cópias ($N=23$). Não foram observadas diferenças nas características basais entre os grupos, como pode ser observado na tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Características basais das pacientes, comparadas em relação à presença do haplótipo ArgGln em homozigose

	No. de cópias ArgGln		Valor de <i>P</i>
	≤1 (<i>N</i> =120)	2 (<i>N</i> =23)	
Idade; anos	26,0 (6,3)	23,3 (4,9)	0,061
Idade gestacional; semanas	40 [39-40]	39 [38-40]	0,59
Altura; cm	159,6 (6,8)	160,4 (6,6)	0,60
Peso; kg	72,4 (10,2)	70,7 (7,7)	0,44
Índice de massa corpórea; kg.m⁻²	28,5 (4,2)	27,6 (3,4)	0,31
Estado físico	I (89%) II (11%)	I (91%) II (9%)	0,76
Pressão arterial sistólica; mmHg	117,8 (14,3)	114,5 (12,7)	0,31
Pressão arterial média; mmHg	82,9 (11,6)	81,9 (10,8)	0,72

Valores são médias (desvio padrão), medianas [intervalo interquartil] ou número (porcentagem %)

A comparação dos desfechos após a indução da anestesia está apresentada na tabela 3.6. Os níveis do bloqueio sensitivo ficaram localizados nos mesmos dermatômos em ambos os grupos, e não foram detectadas diferenças nos intervalos desde a indução da anestesia até o parto.

A presença de duas cópias do haplótipo ArgGln parecia estar associada à redução tanto o risco de hipotensão arterial materna (52,2% versus 75%; razão de risco de 0,36; IC 95% 0,15-0,91; $P = 0,042$) quanto nas doses administradas de efedrina para elevação dos níveis pressóricos acima dos limites de hipotensão ($P =$

0,038). Entretanto, estas diferenças não atingiram significância estatística após correção por múltiplas análises. Um efeito protetor similar do haplótipo ArgGln foi observado quando a incidência de hipotensão materna ao longo do tempo foi comparada entre os grupos pelo teste *log rank* ($P = 0,042$), mas novamente sem significância estatística após a correção de Bonferroni (figura 3.5).

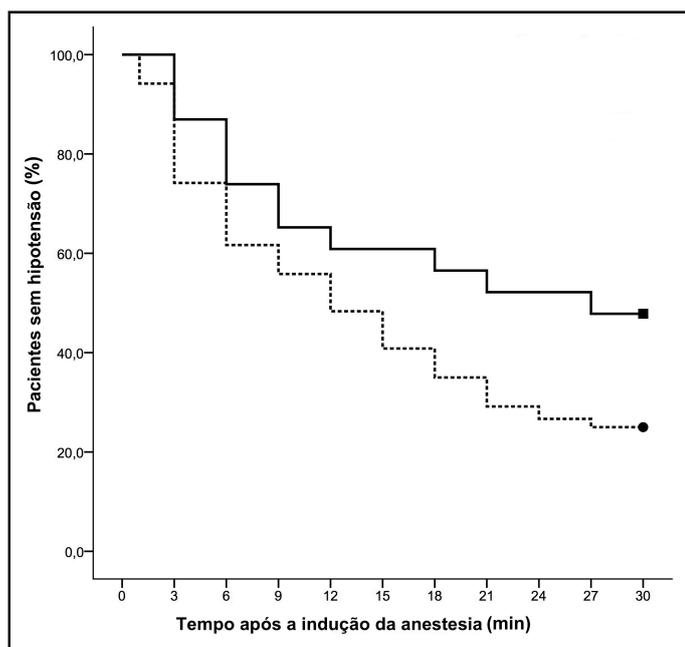


Figura 3.5 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier mostrando a incidência de hipotensão materna ao longo do tempo. As pacientes foram agrupadas em relação à homozigose para o haplótipo ArgGln: pacientes com uma ou nenhuma cópia (linha pontilhada com círculo fechado para dados censurados) e pacientes com duas cópias (linha sólida com quadrado fechado para dados censurados).

Após a indução da anestesia, as pacientes com duas cópias do haplótipo ArgGln apresentaram um menor decréscimo da pressão arterial em relação aos valores basais, além de valores consistentemente maiores da pressão arterial durante o período avaliado (tabela 3.6 e figura 3.6). Estas diferenças entre os grupos se mantiveram significativas mesmo após correção para múltiplas medidas em relação à diminuição máxima da pressão arterial média em relação aos valores basais ($P < 0,001$) e a variação acumulada da pressão arterial sistólica em relação aos valores basais ($P < 0,001$). Quando os parâmetros hemodinâmicos consecutivos foram comparados entre os grupos, através da análise de variância de medidas repetidas, observamos diferenças significativas em relação à variação da pressão arterial sistólica em relação aos valores basais ($P = 0,001$), mas não para a variação

da pressão arterial média em relação aos valores basais ($P = 0,012$) e para os valores da frequência cardíaca ($P = 0,85$).

Tabela 3.6 - Desfechos observados após a indução da anestesia subaracnóidea

	No. de cópias ArgGln		Valor de P
	≤ 1 ($N=120$)	2 ($N=23$)	
Nível do bloqueio sensitivo; dermatomo	T5 [T4-T5]	T5 [T4-T6]	0,30
Tempo até o parto; minutos	9 [9-12,75]	12 [9-12]	0,76
Incidência de hipotensão materna; N	90 (75%)	12 (52,2%)	0,042
Dose de efedrina; mg	10 [0-20]	10 [0-15]	0,038
Diminuição máxima da PAS*; %	-20,0 (13,6)	-12,0 (13,4)	0,011
Diminuição máxima da PAM†; %	-26,0 (11,6)	-16,0 (12,2)	< 0,001
Varição acumulada da PAS*; %	-2,7 (8,2)	4,2 (9,3)	< 0,001
Varição acumulada de PAM†; %	-5,1 (10,1)	1,6 (10)	0,004

Valores são médias (desvio padrão), medianas [intervalo interquartil] ou número (porcentagem %)

*PAS - pressão arterial sistólica

†PAM - pressão arterial média

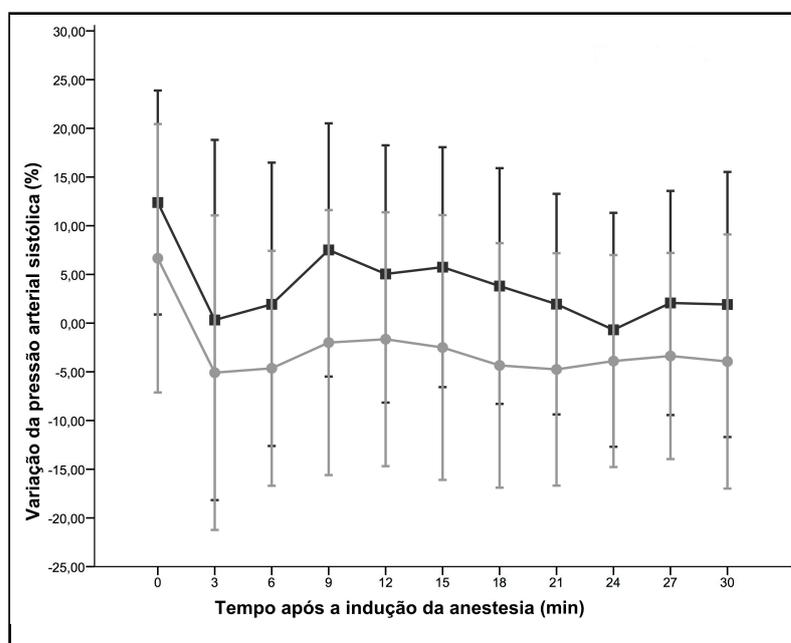


Figura 3.6 - Variação da pressão arterial sistólica em relação aos valores basais entre os grupos. As pacientes foram agrupadas em relação à homozigose para o haplótipo ArgGln: pacientes com uma ou nenhuma cópia (linha e círculo fechado cinzas) e pacientes com duas cópias (linha e quadrado fechado pretos). As barras de erro representam o desvio padrão da média.

3.5 DISCUSSÃO

Realizamos um estudo buscando associações entre diferentes haplótipos do gene do receptor beta-2 adrenérgico e diferenças na resposta hemodinâmica de pacientes submetidas a anestesia subaracnóidea para operação cesariana. O desenho que utilizamos foi o de um estudo do tipo caso-controle, feito a partir de dados prospectivos. Adotamos uma estratégia de análise dividida em duas etapas, inicialmente agrupando as pacientes de acordo com a presença de haplótipos que pareciam influenciar a incidência de hipotensão materna e, posteriormente, comparando estes grupos em relação às características gerais e os desfechos hemodinâmicos após a indução da anestesia.

Durante a etapa inicial, procuramos associações entre o número de cópias dos diferentes haplótipos do gene do receptor *ADRB2* e o risco de hipotensão arterial após a indução da anestesia. Observamos que a presença do haplótipo ArgGln estava relacionada a uma menor incidência de hipotensão. Pela avaliação de diferentes modelos de herança genética, percebemos que o modelo recessivo era o que refletia com mais precisão os possíveis efeitos do haplótipo ArgGln. Desta forma, as pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou ausência do haplótipo ArgGln em homozigose. Apesar destes dois grupos apresentarem características de base semelhantes e ambos terem apresentado uma queda inicial da pressão arterial após a instalação do bloqueio anestésico, as pacientes que possuíam duas cópias do haplótipo ArgGln apresentaram um decréscimo significativamente menor assim como maiores valores pressóricos ao longo do procedimento. Estas diferenças foram estatisticamente significativas mesmo após correção por múltiplas análises.

Nosso estudo fornece novas informações em relação a associação entre variações do gene *ADRB2* e os mecanismos de regulação hemodinâmica. Em um estudo prévio, nós observamos que as parturientes portadoras do genótipo Arg16 em homozigose apresentaram menor risco de hipotensão arterial após instalação do bloqueio anestésico para realização da operação cesariana (53). Agora, avaliando a interrelação entre os polimorfismos do códon 16 e do códon 27, verificamos que os efeitos atribuídos ao genótipo Arg16 não podem ser dissociados dos efeitos do

haplótipo ArgGln, já que todas as cópias do alelo Arg16 estavam acompanhadas no mesmo cromossomo por uma cópia do alelo Gln27 em uma organização haplotípica. Este resultado sugere que outras mutações não avaliadas, dentro deste mesmo haplótipo, poderiam ser responsáveis pelos efeitos protetores observados em relação à hipotensão materna.

Estudos prévios já trataram deste assunto e descreveram efeitos algo contraditórios em relação aos nossos resultados no mesmo contexto clínico. No primeiro, feito em uma coorte de pacientes norte americanos, mostrou que as parturientes com genótipos Gly16 e Glu27 receberam menos vasopressores para manutenção da pressão arterial acima do limiar de hipotensão nos 15 minutos após a indução da anestesia subaracnóidea (52). Em um estudo mais recente, conduzido em uma coorte chinesa, não foram detectadas influências dos genótipos do códon 16 e 27 do *ADRB2* sobre a dose necessária de vasopressores para manter a pressão arterial materna próxima dos valores medidos antes da indução da anestesia subaracnóide. Interessantemente, a menor concentração plasmática de efedrina necessária para manter a pressão arterial próxima aos valores basais, foi observada em parturientes com o genótipo Arg16 em homozigose (59). É importante ressaltar que para entender a discrepância entre os resultados dos diferentes estudos, deve-se considerar que a avaliação do risco de hipotensão arterial materna não é igual a avaliar a dose de vasopressor utilizada, apesar destas duas variáveis serem obviamente relacionadas. Além disso, as análises do presente estudo focaram em haplótipos do gene *ADRB2*, ao invés dos outros estudos que focaram em genótipos dos polimorfismos do códon 16 e 27.

Os polimorfismos Arg16Gly e Gln27Glu são modificações frequentes do gene do receptor beta-2 adrenérgico e têm sido associados à modificações de aspectos farmacológicos e clínicos da função do receptor (47, 60). Estudos seminais *in vitro* mostraram que a variante Gly16 aumenta a dessensibilização induzida pelo agonista, enquanto que a variante Glu27 confere resistência à dessensibilização (48, 61). A tradução clínica destas mutações foi descrita para o tratamento crônico de asma (49), a susceptibilidade à hipertensão arterial sistêmica (50) e o aumento da mortalidade relacionada ao choque séptico (62) e a insuficiência cardíaca (63). Entretanto, resultados conflitantes são frequentemente observados entre os estudos, sendo que em alguns casos uma associação previamente descrita não é observada

(64) e, em outros, é demonstrado uma associação inversa àquela que havia sido previamente descrita (65). Além do mais, já foram descritas associações para uma raça específica, e esta ocorrência é geralmente explicada pela influência de outras variações genéticas não avaliadas (66).

Uma associação entre o tônus autonômico e o risco de hipotensão materna após indução de anestesia subaracnóidea já foi descrita (67). A partir da avaliação espectral da variação da frequência cardíaca, foi demonstrado que parturientes com aumento da atividade simpática basal apresentam maior risco de desenvolver hipotensão arterial. Uma possível explicação seria que o bloqueio da inervação simpática pelo anestésico local não seria adequadamente compensado pelos outros sistemas responsáveis pela elevação da pressão arterial, uma vez que estes sistemas já estariam adaptados à uma situação basal de elevado tônus autonômico simpático. Paralelamente, já foi descrito que os polimorfismos do gene *ADRB2* se associam a diferenças na atividade do sistema nervoso autonômico. Indivíduos homocigotos para o genótipo Arg16 apresentaram menor atividade simpática e um maior tônus parassimpático em relação à pacientes portadores do alelo Gly16 (68, 69).

Com base nos resultados de estudos anteriores e nas observações de nosso grupo, nossa atual hipótese é que os pacientes com 2 cópias do haplótipo ArgGln apresentam menor risco de desenvolver hipotensão arterial após indução da anestesia subaracnóidea para operação cesariana, possivelmente em consequência de um decréscimo da atividade simpática basal, apesar de que esta associação ainda precisa ser confirmada. Estas observações podem não ser reproduzidas em populações com um perfil genético diferente em relação ao da população brasileira.

Nosso estudo apresenta diversas limitações. O pequeno tamanho amostral não confere o poder estatístico adequado para realização de uma análise multivariada, que eventualmente será necessária para confirmar a associação independente de variações genéticas do gene *ADRB2* e risco de desenvolvimento de hipotensão materna após a anestesia subaracnóidea. Além disso, devido à escassez de pacientes com o haplótipo GlyGlu, e a ausência de pacientes portadores do haplótipo ArgGlu, não foi possível avaliar adequadamente a associação entre estas variantes aos desfechos hemodinâmicos de nossa amostra.

Um outro ponto passível de críticas é o fato de não termos agrupado as

pacientes de acordo com suas raças ou perfis étnicos (além de todas serem brasileiras) e, desta forma, que nossa população pudesse estar composta por diferentes subpopulações genéticas. Entretanto, observamos que a distribuição alélica seguiu o equilíbrio de Hardy-Weinberg, e que as proporções dos genótipos foram semelhantes a um outro estudo realizado em uma coorte brasileira, ambos fatos argumentando contra a hipótese da presença de subpopulações. Além do mais, a população brasileira é altamente heterogênea do ponto de vista genético (70), e a identificação individual como pertencendo à raça branca, parda ou negra, guarda pouca correspondência com o padrão genético de raça de indivíduos brasileiros (71). Acreditamos que quando os efeitos genéticos são avaliados na “população em geral” os resultados obtidos se aproximam da prática clínica, por outro lado, esta estratégia também torna o estabelecimento de associações mais árduo.

3.6 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que variações em haplótipos do gene do receptor beta-2 adrenérgico podem influenciar a resposta hemodinâmica de pacientes que são submetidas a anestesia subaracnóidea para realização da operação cesariana. Nossa sugestão é que mais trabalhos sejam realizados para esclarecer os efeitos genéticos de variações do gene *ADRB2*, utilizando análises multivariadas e concomitantemente avaliando a atividade autonômica perioperatória.

PROJETO 2

**AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIAS GENÉTICAS SOBRE AS AÇÕES DO RECEPTOR
OPIÓIDE-MU**

4 AVALIAÇÃO DE INFLUÊNCIAS GENÉTICAS SOBRE AS AÇÕES DO RECEPTOR OPIÓIDE-MU

4.1 JUSTIFICATIVA

O receptor opióide-mu (*mu-opioid receptor - MOR*) tem um papel fundamental em importantes vias de sinalização celular da fisiologia humana, participando de mecanismos relacionados à dor, ao estresse e a adição (72). Os fármacos que agem pela ativação do *MOR* têm sido usados por séculos para o tratamento de síndromes dolorosas agudas e crônicas, e ainda figuram entre os medicamentos mais prescritos da atualidade (73). Apesar de muito utilizados, a resposta farmacológica aos opióides é caracterizada por uma elevada heterogeneidade interindividual, um fato que pode ser parcialmente atribuído a variações genéticas que influenciam as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas destes medicamentos (74, 75).

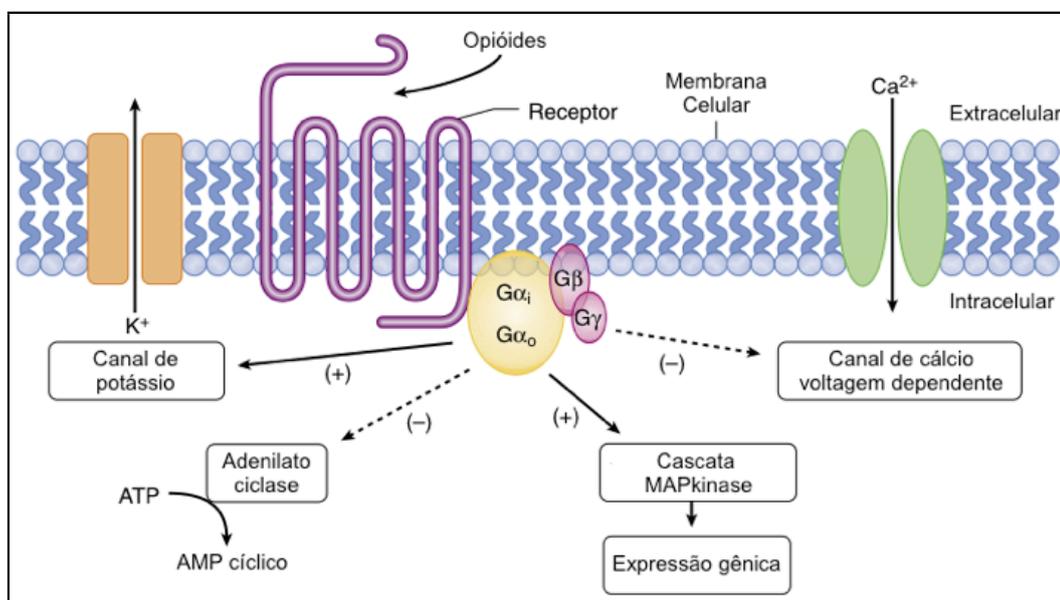


Figura 4.1 - Mecanismo de sinalização celular pelo receptor opióide-mu. A ligação de agonistas ao receptor causa a ativação da proteína G_i com consequente inativação da adenilato ciclase, fechamento de canais de cálcio e abertura de canais de potássio. Estes eventos resultam em diminuição da disponibilidade de cálcio intracelular e hiperpolarização da membrana celular. Além disso, os opióides são capazes de regular a expressão gênica, principalmente através da ativação da cascata de fosforilação de enzima MAP quinase. ATP: trifosfato de adenosina. AMP: monofosfato de adenosina (Fonte da imagem: *Miller's Anesthesia, 7th Edition* (76)- Direitos Autorais: *Elsevier Inc*).

A partir de estudos que analisaram os efeitos de modificações no gene do receptor opióide-mu (*OPRM1*), identificou-se que o polimorfismo A118G (NCBI, RefSNP ID: rs1799971) está associado a modificações de propriedades do receptor. Esta mutação do tipo *missense* está localizada no primeiro éxon do gene *OPRM1*, e resulta na substituição de um resíduo de asparagina por ácido aspártico na posição 40 na sequência de aminoácidos da proteína do *MOR*. A troca dos aminoácidos causa a perda de um dos cinco sítios de glicosilação descritos para o receptor (77). Os resultados obtidos por estudos experimentais (78, 79) e clínicos (80, 81) sugerem que a presença do alelo G está associada a um aumento da percepção dolorosa e a diminuição dos efeitos de analgésicos opióides. Entretanto, mais estudos ainda são necessários para que a avaliação deste polimorfismo seja incorporada em uma estratégia individualizada da terapia analgésica com opióides. Paralelamente, esse mesmo polimorfismo foi associado a alterações na resposta de recompensa após o contato com nicotina (82), a diferentes taxas de sucesso de uma terapia antitabágica (83) e à susceptibilidade ao vício de diferentes substâncias (84).

Tabela 4.1 - Frequência alélica do polimorfismo A118G em diversos povos

Genótipos	África	Américas	Ásia	Europa	Total
Alelo A	97%	65%	39%	70%	81%
Alelo G	3%	35%	61%	30%	19%

Estudos prévios mostraram que a prevalência do alelo G varia substancialmente entre os diferentes povos (tabela 4.1) (20). A descrição da frequência e distribuição alélica do polimorfismo A118G do gene *OPRM1* ainda não foi descrita entre brasileiros.

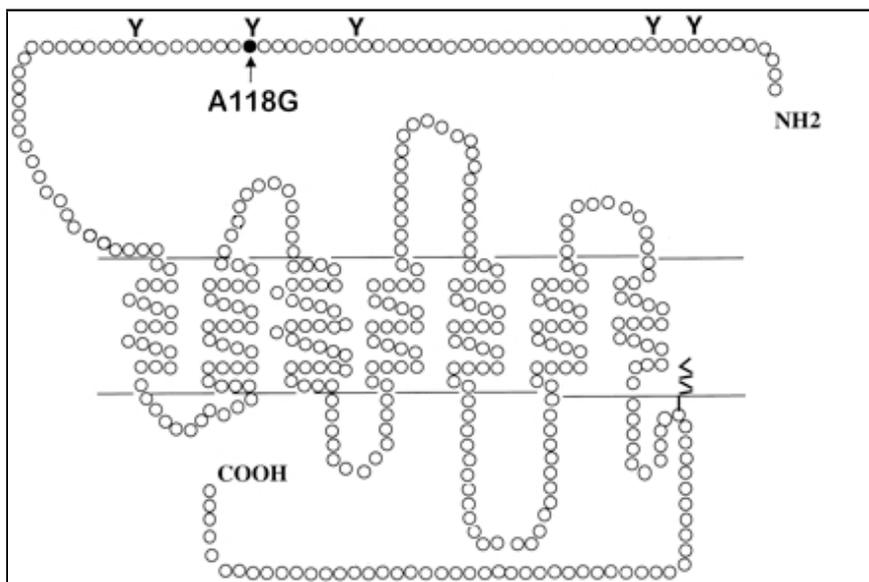


Figura 4.2 - O polimorfismo A118G do receptor opióide-mu, localizado na posição 40 do domínio extracelular do receptor (Fonte da imagem: *Journal of Biological Chemistry* (85) - Direitos Autorais: *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*).

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivos Gerais

- Aumentar os conhecimentos a respeito de variações genéticas que podem influenciar a prática da Anestesiologia.
- Gerar novos métodos de diagnóstico molecular de variações genéticas.

4.2.2 Objetivos Específicos

- Definir a frequência alélica do polimorfismo A118G do receptor opióide-mu na população de pacientes do Distrito Federal internados no Hospital Universitário de Brasília.
- Avaliar possíveis consequências funcionais do polimorfismo A118G na prevalência de tabagismo e na exposição ao tabaco entre brasileiros.
- Estabelecer uma metodologia rápida e custo-efetiva para estudo do polimorfismo A118G do receptor opióide-mu através da técnica de *PCR* quantitativo alelo-específico.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 População de Pacientes

Os pacientes foram convidados para participar do estudo se tivessem 18 anos ou mais, se possuíssem nacionalidade e ancestralidade brasileiras (até a segunda geração) e se fossem moradores do Distrito Federal. Os pacientes foram recrutados de forma probabilística entre os pacientes que seriam submetidos a cirurgias eletivas no Hospital Universitário de Brasília durante o período de janeiro a julho de 2012. Os indivíduos incapazes e os analfabetos funcionais foram excluídos do estudo.

4.3.2 Questionário e Coleta de Amostra Sanguínea

A coleta de informações foi realizada no dia anterior ao da cirurgia, e os dados sobre a idade, o sexo, o estado civil, a raça, o tempo de educação, a presença do hábito de tabagismo e a carga tabágica foram obtidos (Anexo D). A carga tabágica corresponde ao número de maços (de 20 cigarros) que um indivíduo fuma por dia multiplicado pelo tempo em anos desde o início do hábito de fumar, sendo apresentada na unidade de maços-ano. Ao final da entrevista, uma amostra de 3 ml de sangue venoso periférico era colhida em um tubo contendo o anticoagulante *EDTA*, sendo em seguida congelada (-20°C) até o momento da extração de *DNA*.

4.3.3 Análise Laboratorial

A extração de *DNA* foi realizada usando o método da resina Chelex-100® (57), da mesma forma como descrita no item 3.3. Materiais e métodos do Projeto 1.

A genotipagem dos polimorfismos A118G foi feita através do sistema de amplificação refratária à mutação (58), também como descrito no item 3.3 Materiais e métodos do Projeto 1. Os oligonucleotídeos iniciadores alelo-específicos foram desenhados seguindo recomendações publicadas previamente (86), sendo que os demais oligonucleotídeos foram desenhados usando o *software PRIMER3Plus* (87) (tabela 4.2). Duas reações de *qPCR* foram conduzidas em paralelo, cada uma usando um dos oligonucleotídeos iniciadores diretos alelo-específicos, e ambas gerando um produto de amplificação de 275 pares de base. Cada um dos tubos de reação era composto por: 5 µl da solução SYBR® Green (Maxima SYBR® Green *qPCR* Master Mix 2X, Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA), 100 ng de cada oligonucleotídeo iniciador (Direto A ou G, e Reverso) e 1 µl da solução de *DNA* extraído em um volume final de 10 µl. Os controles negativos foram compostos por tubos de reação onde não era adicionado *DNA*. O programa da reação no termociclador foi: ativação da polimerase de *DNA* a 95°C por 10 minutos, seguida por 35 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento e extensão a 72°C por 1 minuto. A especificidade da reação foi confirmada pela análise da curva de desnaturação, feita pelo aquecimento dos produtos de amplificação de 60 a 90°C em incrementos de 0,3°C enquanto o decaimento da emissão de fluorescência era detectado. Tanto a amplificação quanto a análise da curva de desnaturação foram feitas no aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Tabela 4.2 - Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados

Identificação	Sequência	Uso
Direto A	5' - GTCAACTTGTCCCACTTAGATGGAA - 3'	Identificação do alelo A
Direto G	5' - GTCAACTTGTCCCACTTAGATGGAG - 3'	Identificação do alelo G
Reverso	5' - AGCCTTGGGAGTTAGGTGTCTC - 3'	Comum a todas as reações
Direto S	5' - GAAAAGTCTCGGTGCTCCTG - 3'	Sequenciamento

Novamente, o protocolo de genotipagem foi validado pelo envio de produtos de reações de amplificação em cadeia de polimerase convencional (*PCR*) para sequenciamento da região contendo o polimorfismo. Este procedimento foi feito com as amostras dos primeiros 25 pacientes selecionados para participação em nosso

estudo. As reações foram feitas usando um kit de *PCR* usando a enzima *Taq DNA* polimerase (Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Direto S e Reverso) geravam um produto de amplificação de 427 pares de bases. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguida por 30 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão por 72°C por 45 segundos. A extensão final foi feita a 72°C por 7 minutos. A amplificação foi feita em um termociclador TC-312 (Techne Inc. Burlington, NJ, EUA). A especificidade da reação de *PCR* foi testada por eletroforese em gel de agarose. Os produtos de amplificação foram enviados para a empresa de sequenciamento Macrogen (Macrogen Inc, Coréia). A técnica utilizada para o sequenciamento foi a mesma descrita anteriormente para o Projeto 1. Os resultados das reações de sequenciamento foram comparados aos resultados da genotipagem usando a reação de *qPCR*.

4.3.4 Análise Estatística

O tamanho da amostra foi de 200 pacientes, sendo que o cálculo da estimativa foi baseado no estudo de Ott (fórmula 4.1) (88), onde assumimos que os alelos A e G teriam a mesma frequência, o que torna o cálculo mais conservador. A margem de erro do cálculo foi selecionada para 2,5%.

$$m > \frac{1}{2} \left(1 - \frac{1}{a} \right) / (ad^2)$$

Fórmula 4.1 - Fórmula usada para o cálculo do tamanho da amostra. A variável *m* corresponde ao número de indivíduos, a variável *a* corresponde ao número de alelos de um mesmo locus e a variável *d* corresponde à margem de erro selecionada.

A distribuição genotípica encontrada foi avaliada quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg pela comparação com a distribuição esperada pela fórmula $A^2 + 2AG + G^2 = 1$, onde A e G correspondem à frequência dos alelos em nossa amostra

de pacientes. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a distribuição normal das variáveis contínuas. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de qui-quadrado. Os dados paramétricos foram comparados pelo teste t de Student. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. As análises foram feitas pelo programa *SPSS for Mac* versão 20 (*SPSS Inc.*, Chicago, IL, EUA).

4.3.5 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (Anexo C) e todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado.

4.4 RESULTADOS

A determinação dos genótipos foi feita pela comparação das curvas de eficiência das reações de *qPCR* alelo específicos. Se a eficiência da reação de amplificação foi maior (definida por um valor de C_t inferior) quando um oligonucleotídeo direto específico foi usado (Direto A ou G), o paciente era identificado como homozigoto para a variante associada àquele oligonucleotídeo. Os indivíduos heterozigotos eram identificados quando a eficiência das reações de amplificação era similar entre as duas reações de *qPCR*. Obtivemos perfeita correlação entre a genotipagem feita por *qPCR* e os resultados do sequenciamento (figura 4.3).

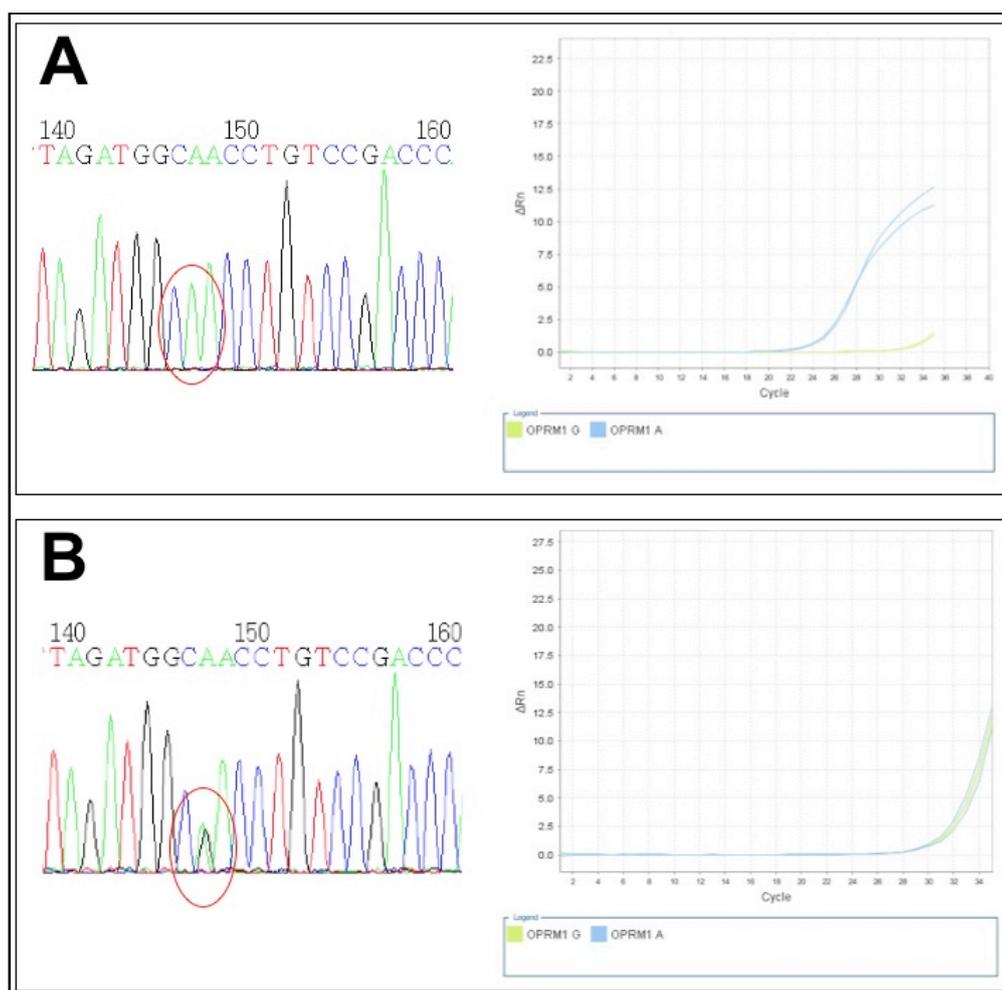


Figura 4.3 - Correlação entre os achados do sequenciamento e da genotipagem por *qPCR*. O painel A mostra o resultado de um paciente homozigoto A, enquanto que no painel B, está demonstrado um paciente heterozigoto.

As demais análises foram feitas a partir dos dados completos de 200 pacientes. O intervalo de idade dos indivíduos foi de 18 a 92 anos (média de $50,8 \pm 15,6$), sendo que 79 deles eram mulheres. Entre os 400 alelos avaliados, observamos a variante A em 336 casos e a variante G em 64 casos. Desta forma, a frequência do alelo G entre os pacientes foi de 16% (intervalo de confiança de 95% de 12,7-19,9%). A distribuição dos alelos e dos genótipos correspondentes está demonstrada na tabela 4.3. A maioria dos pacientes se identificou como sendo da raça branca (49%), seguidos pelos de raça parda (35,5%), de raça negra (15%) e apenas um indivíduo que se identificava como da etnia indígena (0,5%). Não detectamos diferenças nas frequências alélicas entre as raças branca, parda e negra ($X^2 = 0,94$, $P = 0,62$). A distribuição observada em todos os pacientes não correspondeu àquela esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 6,59$; $P = 0,01$).

Tabela 4.3 - Distribuição de alelos e genótipos entre as raças da população estudada

	Branco	Pardo	Negro	Índios	Total
Alelos					
A	163 (83,2)	119 (83,8)	53 (88,3)	1 (50)	336 (84)
G	33 (16,8)	23 (16,2)	7 (11,7)	1 (50)	64 (16)
Genótipos					
AA	70 (71,4)	53 (74,6)	23 (76,7)	0	146 (73)
AG	23 (23,5)	13 (18,3)	7 (23,3)	1 (100)	44 (22)
GG	5 (5,1)	5 (7)	0	0	10 (5)
Valor de P do EHW	0,10	6	0,47	-	0,01

Os valores em parênteses correspondem a porcentagens

Devido às repercussões funcionais da variante G, os pacientes foram divididos em dois grupos (pacientes homocigotos para o alelo A e os heterocigotos somados aos homocigotos para o alelo G) de acordo com um modelo dominante de herança genética. As características gerais dos pacientes podem ser verificadas na tabela 4.4. Não observamos diferenças entre os grupos em relação à idade e a distribuição de sexos, estados civis e raças. Entretanto, os pacientes com alelo G presente apresentaram níveis de educação superiores em relação aos homocigotos A.

A prevalência de tabagismo não diferiu entre os pacientes homozigotos para o alelo A e os que possuíam uma ou duas cópias do alelo G. Entretanto, os pacientes com a variante G mostraram cargas tabágicas significativamente maiores que os homozigotos para a variante A ($28,9 \pm 12,5$ versus $21,5 \pm 10,8$ respectivamente; $P = 0,02$), como visto na tabela 4.5. A distribuição alélica entre os fumantes não diferiu dos valores esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1,78$; $P = 0,18$).

Tabela 4.4 - Comparação das características gerais dos pacientes, quando divididos de acordo com a presença do alelo G

	Homozigoto A	Alelo G presente	Valor de P
Sexo, N (%)	Feminino, 53 (36,3) Masculino, 93 (63,7)	Feminino, 26 (48,1) Masculino, 28 (51,9)	0,13
Idade, anos (DP)	51,5 (16)	48,8 (14,8)	0,29
Estado civil, N (%)	Casado 93 (63,7) Solteiro 27 (18,5) Separado 19 (13) Viúvo 7 (4,8)	Casado 40 (74,1) Solteiro 6 (11,1) Separado 5 (9,3) Viúvo 3 (5,6)	0,48
Raça, N (%)	Branco, 70 (47,9) Negro, 23 (15,8) Moreno, 53 (36,3)	Branco, 28 (51,9) Negro, 7 (13) Moreno, 18 (33,3) Oriental, 1 (1,9%)	0,37
Tempo de educação, N (%)	Não frequentou, 2 (1,4) 1 a 4 anos, 77 (53,1) 5 a 9 anos, 52 (35,9) 10 anos ou mais, 14 (9,7)	1 a 4 anos, 17 (31,5) 5 a 9 anos, 30 (55,6) 10 anos ou mais, 7 (13)	0,03
Tabagismo, N (%)	52 (35,2)	18 (32,7)	0,76

Tabela 4.5 - Características dos pacientes fumantes quando comparados em relação à presença do alelo G

	Homozigotos A	Alelo G presente	Valor de P
Sexo, N (%)	Feminino, 11 (21,2) Masculino, 41 (78,8)	Feminino, 8 (44,4) Masculino, 10 (55,6)	0,07
Idade, anos (DP)	53,5 ($\pm 14,5$)	56,7 (± 11)	0,40
Raça, N (%)	Branco, 25 (48,1) Negro, 8 (15,4) Moreno, 19 (36,5)	Branco, 10 (55,6) Negro, 2 (11,1) Moreno, 6 (33,3)	0,84
Carga tabágica, maços-ano (DP)	21,5 ($\pm 10,8$)	28,9 ($\pm 12,5$)	0,02

4.5 DISCUSSÃO

Nós desenvolvemos um método de genotipagem rápido e reprodutível para identificação da distribuição alélica do polimorfismo A118G do gene do receptor opióide-mu entre pacientes cirúrgicos da região Centro-Oeste do Brasil. Os dados de prevalência deste polimorfismo em uma população brasileira ainda não haviam sido descritos.

O método de amplificação refratária à mutação através de *PCR* quantitativo tem sido frequentemente usado para a genotipagem de *SNPs*, e apresenta consideráveis vantagens em relação aos métodos que foram previamente descritos para genotipar o polimorfismo A118G (89). Esta técnica apresenta maior eficiência e facilidade em comparação a métodos complexos e trabalhosos como sequenciamento e aqueles baseados em eletroforese de *DNA* (39). Paralelamente, os custos do ensaio de amplificação refratária à mutação são inferiores em relação ao método igualmente eficiente que usa sondas de *DNA* cuja extremidade 5' possui ação hidrolítica (90).

Nossos resultados indicam que a frequência da variante 118G se aproxima de 16% (encontrados 64 entre os 400 alelos avaliados) entre os indivíduos da região Centro-Oeste do Brasil. De modo interessante, a região Centro-Oeste foi ocupada nos últimos 50 anos por imigrantes do todo o país, e pode ser considerada uma boa representante da composição genética da maioria das outras regiões geográficas brasileiras, com exceção da região Sul (91). Apesar de não termos observado diferenças significativas entre a frequência do alelo G nas raças avaliadas, verificamos que os pacientes que se identificavam como negros apresentaram uma frequência menor em relação às outras etnias. A distribuição genotípica observada desviou ligeiramente da distribuição esperada pelo modelo de Hardy-Weinberg, sugerindo a existência de subpopulações geneticamente diversas em nossa amostra. Apesar disso, acreditamos que se trata de uma ocorrência espúria uma vez que a população brasileira é altamente mesclada do ponto de vista genético, uma característica que não se encontra relacionada à aparência física individual (71).

Após agruparmos os pacientes de acordo com a presença da variante G, nós observamos uma prevalência de tabagismo semelhante entre os grupos. Entretanto,

notamos que os pacientes fumantes que possuíam o alelo G referiam uma maior carga tabágica em relação aos pacientes homocigotos para o alelo A, sugerindo uma possível associação entre o polimorfismo A118G e um aumento da vontade de fumar. Nossos resultados são compatíveis com achados recentes na literatura que mostraram que indivíduos portadores do alelo G apresentaram maior liberação de dopamina em regiões cerebrais associadas à resposta de recompensa, após fumarem cigarros contendo nicotina (92). Um efeito semelhante em relação a liberação de dopamina também foi observado após o consumo de álcool por indivíduos com o alelo G (82). Por outro lado, os resultados de estudos clínicos têm sido, na maioria das vezes, inconclusivos a respeito do efeito deste polimorfismo na susceptibilidade ao vício de tabaco (93, 94). Diferenças entre os desenhos dos estudos realizados, assim como variações na frequência do alelo G nos diferentes grupos étnicos pesquisados, poderiam explicar a falta de concordância desses resultados. É importante frisar, entretanto, que nossos resultados devem ser vistos apenas como preliminares em relação aos efeitos funcionais do polimorfismo A118G, uma vez que este projeto não foi desenhado especificamente para avaliar os comportamentos associados à adição ao cigarro.

Os mecanismos moleculares que explicariam a associação entre a presença do alelo 118G e modificações na função do MOR ainda não foram completamente estabelecidos. Estudos *in vitro* mostraram que a modificação A118G resulta em redução da expressão do gene *OPRM1* (95) (tanto no nível do *mRNA* quanto da proteína), atenuação da sinalização intracelular induzida por agonistas opióides e diminuição da inibição de correntes de cálcio em neurônios tratados com morfina (79, 96). Comparavelmente, estudos experimentais que usaram um modelo de camundongo, portando uma mutação equivalente a humana, revelaram redução da expressão do receptor opióide-mu em regiões cerebrais relacionadas à dor, ao estresse e à recompensa (78). Quando estes animais foram testados em um ensaio com estímulo doloroso (uso de uma placa aquecida sob as patas), os camundongos que portavam o alelo G apresentaram diminuição da resposta antinociceptiva após administração de morfina (79). Um estudo que avaliou o tecido cerebral de autópsias humanas demonstrou menor expressão de *mRNA* do gene *OPRM1* em indivíduos que possuíam o alelo G (97). Ao contrário dos resultados inconsistentes vistos nos estudos relacionados ao vício, as evidências clínicas dos efeitos do polimorfismo

A118G do *OPRM1* na percepção dolorosa estão cada vez mais claras, e foi mostrado que as doses de morfina administradas para indivíduos com o alelo G foram maiores, tanto para o tratamento da dor aguda pós-operatória (98, 99), quanto para alívio da dor crônica relacionada ao câncer (80, 100).

4.6 CONCLUSÃO

Até que a avaliação do polimorfismo A118G do *OPRM1* se torne uma rotina no planejamento da terapia de pacientes que receberão drogas opióides, mais estudos ainda precisam ser feitos. Esperamos que os métodos e os resultados que descrevemos serão úteis no planejamento destes estudos e que, uma vez estabelecido o papel clínico do polimorfismo A118G, a terapia dispensada aos pacientes acometidos por síndromes dolorosas e diferentes vícios melhore, especialmente entre pacientes brasileiros.

5 REFERÊNCIAS

1. Shields PG, Harris CC. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J Clin Oncol*. 2000;18(11):2309-15.
2. Mendel, G. Versuche über Pflanzhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn*, Bd. IV für das Jahr 1865, Abhandlungen, 3–47 (Bateson translation)
3. Asashima M, Ikeuchi M, Ishiura S, Ide T, Irimura T, Ohya Y, et al. A Comprehensive approach to life science [Internet]. 2nd Edition. Tokyo (Japan): Division of Life Sciences, Komaba Organization for Educational Excellence, College of Arts and Sciences, The University of Tokyo; 2010 [atualizada em 2010]. Chapter 3, Biological Proliferation; [acesso em 2013 Jan 8]; Disponível em: http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/03_02.html.
4. Garrod AE. The Incidence of alkaptonuria: A study in chemical individuality. *The Lancet*. 1902;160(4137):1616-20.
5. Meyer UA. Pharmacogenetics - Five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet*. 2004;5(9):669-76.
6. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM® [Internet]. Baltimore (USA): McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University; [atualizada em 2013 Jan 7; acesso em 2013 Jan 8]. Disponível em: <http://omim.org>.
7. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine - A primer. *N Engl J Med*. 2002;347(19):1512-20.
8. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-8.
9. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York (USA): Garland Science; 2007.
10. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
11. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.

12. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, et al. A physical map of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):934-41.
13. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
14. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*. 2011;470(7333):187-97.
15. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
16. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*. 2002;32(4):650-4.
17. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med*. 2010;363(2):166-76.
18. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74.
19. Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Dermitzakis E, Schaffner SF, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 2010;467(7311):52-8.
20. 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467(7319):1061-73.
21. Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, et al. The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1045-8.
22. International Human Epigenome Consortium [Internet]. [local desconhecido]; [acesso em 2013 Jan 8]. Disponível em: <http://ihec-epigenomes.net>.
23. Green ED, Guyer MS, National Human Genome Research I. Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature*. 2011;470(7333):204-13.
24. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(8):790-800.
25. Thanassoulis G, Peloso GM, Pencina MJ, Hoffmann U, Fox CS, Cupples LA, et al. A genetic risk score is associated with incident cardiovascular disease and

- coronary artery calcium: The Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(1):113-21.
26. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics - Drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*. 2003;348(6):538-49.
 27. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med*. 2011;364(12):1144-53.
 28. Palmer SN, Giesecke NM, Body SC, Shernan SK, Fox AA, Collard CD. Pharmacogenetics of anesthetic and analgesic agents. *Anesthesiology*. 2005;102(3):663-71.
 29. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. 2003;421(6921):448-53.
 30. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 2012;489(7414):101-8.
 31. Searle R, Hopkins PM. Pharmacogenomic variability and anaesthesia. *Br J Anaesth*. 2009;103(1):14-25.
 32. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Sampas N, Graves T, et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature*. 2008;453(7191):56-64.
 33. Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine - An updated primer. *N Engl J Med*. 2010;362(21):2001-11.
 34. Raponi M, Baralle D. Alternative splicing: good and bad effects of translationally silent substitutions. *FEBS Journal*. 2010;277(4):836-40.
 35. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12(10):683-91.
 36. Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature*. 2011;470(7332):59-65.
 37. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010;466(7304):368-72.
 38. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007;316(5823):445-9.

39. Koch WH. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(9):749-61.
40. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.* 2006;7(10):781-91.
41. Lunetta KL. Genetic association studies. *Circulation.* 2008;118(1):96-101.
42. Ngan Kee WD. Prevention of maternal hypotension after regional anaesthesia for caesarean section. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2010;23(3):304-9.
43. Kundra P, Khanna S, Habeebullah S, Ravishankar M. Manual displacement of the uterus during Caesarean section. *Anaesthesia.* 2007;62(5):460-5.
44. McDonald S, Fernando R, Ashpole K, Columb M. Maternal cardiac output changes after crystalloid or colloid coload following spinal anesthesia for elective cesarean delivery: A randomized controlled trial. *Anesth Analg.* 2011;113(4):803-10.
45. Ngan Kee WD, Khaw KS, Ng FF. Comparison of phenylephrine infusion regimens for maintaining maternal blood pressure during spinal anaesthesia for caesarean section. *Br J Anaesth.* 2004;92(4):469-74.
46. Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz.* 2002;27(7):683-90.
47. von Homeyer P, Schwinn DA. Pharmacogenomics of beta-adrenergic receptor physiology and response to beta-blockade. *Anesth Analg.* 2011;113(6):1305-18.
48. Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. Amino-terminal polymorphisms of the human beta-2 adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry.* 1994;33(32):9414-9.
49. Israel E, Chinchilli VM, Ford JG, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, et al. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet.* 2004;364(9444):1505-12.
50. Bao X, Mills PJ, Rana BK, Dimsdale JE, Schork NJ, Smith DW, et al. Interactive effects of common beta-2 adrenoceptor haplotypes and age on susceptibility to hypertension and receptor function. *Hypertension.* 2005;46(2):301-7.
51. Tse SM, Tantisira K, Weiss ST. The pharmacogenetics and pharmacogenomics of asthma therapy. *Pharmacogenomics J.* 2011;11(6):383-92.

52. Smiley RM, Blouin JL, Negron M, Landau R. Beta-2 adrenoceptor genotype affects vasopressor requirements during spinal anesthesia for cesarean delivery. *Anesthesiology*. 2006;104(4):644-50.
53. Magalhaes E, Gomes MD, Barra GB, Goveia CS, Ladeira LC. Evaluation of the influence of the codon 16 polymorphism of the Beta-2 adrenergic receptor gene on the incidence of arterial hypotension and ephedrine use in pregnant patients submitted to subarachnoid anesthesia. *Rev Bras Anesthesiol*. 2010;60(3):228-36.
54. Dewar JC, Wheatley AP, Venn A, Morrison JF, Britton J, Hall IP. Beta-2 adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in an adult population. *Clin Exp Allergy*. 1998;28(4):442-8.
55. Taylor MR. Pharmacogenetics of the human beta-adrenergic receptors. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(1):29-37.
56. Zee RY, Cook NR, Reynolds R, Cheng S, Ridker PM. Haplotype analysis of the beta-2 adrenergic receptor gene and risk of myocardial infarction in humans. *Genetics*. 2005;169(3):1583-7.
57. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991;10(4):506-13.
58. Newton C, Graham A, Heptinstall L, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*. 1989; 17: 2503–16.
59. Landau R, Liu SK, Blouin JL, Smiley RM, Ngan Kee WD. The effect of maternal and fetal beta-2 adrenoceptor and nitric oxide synthase genotype on vasopressor requirement and fetal acid-base status during spinal anesthesia for cesarean delivery. *Anesth Analg*. 2011;112(6):1432-7.
60. Kirstein SL, Insel PA. Autonomic nervous system pharmacogenomics: a progress report. *Pharmacol Rev*. 2004;56(1):31-52.
61. Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggett SB. Influence of beta-2 adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;13(1):25-33.

62. Nakada TA, Russell JA, Boyd JH, Aguirre-Hernandez R, Thain KR, Thair SA, et al. Beta-2 adrenergic receptor gene polymorphism is associated with mortality in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(2):143-9.
63. Mansur AJ, Fontes RS, Canzi RA, Nishimura R, Alencar AP, de Lima AC, et al. Beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms Gln27Glu, Arg16Gly in patients with heart failure. *BMC Cardiovasc Disord*. 2009;9:50.
64. Bleecker ER, Postma DS, Lawrance RM, Meyers DA, Ambrose HJ, Goldman M. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting beta-2 agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *Lancet*. 2007;370(9605):2118-25.
65. Dishy V, Sofowora GG, Xie HG, Kim RB, Byrne DW, Stein CM, et al. The effect of common polymorphisms of the beta-2 adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization. *N Engl J Med*. 2001;345(14):1030-5.
66. Ferdinands JM, Mannino DM, Gwinn ML, Bray MS. ADRB2 Arg16Gly polymorphism, lung function, and mortality: results from the Atherosclerosis Risk in Communities study. *PLoS One*. 2007;2(3):e289.
67. Hanss R, Bein B, Ledowski T, Lehmkuhl M, Ohnesorge H, Scherkl W, et al. Heart rate variability predicts severe hypotension after spinal anesthesia for elective cesarean delivery. *Anesthesiology*. 2005;102(6):1086-93.
68. Matsunaga T, Yasuda K, Adachi T, Gu N, Yamamura T, Moritani T, et al. Association of beta-adrenoceptor polymorphisms with cardiac autonomic modulation in Japanese males. *Am Heart J*. 2007;154(4):759-66.
69. Masuo K, Katsuya T, Fu Y, Rakugi H, Ogihara T, Tuck ML. Beta-2 adrenoceptor polymorphisms relate to insulin resistance and sympathetic overactivity as early markers of metabolic disease in nonobese, normotensive individuals. *Am J Hypertens*. 2005;18(7):1009-14.
70. Suarez-Kurtz G. Pharmacogenetics in the brazilian population. *Front Pharmacol*. 2010;1:118.
71. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):177-82.
72. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011;115(6):1363-81.

73. Ballantyne JC, Mao J. Opioid therapy for chronic pain. *N Engl J Med.* 2003;349(20):1943-53.
74. Lotsch J, Geisslinger G, Tegeder I. Genetic modulation of the pharmacological treatment of pain. *Pharmacol Ther.* 2009;124(2):168-84.
75. Finco G, Pintor M, Sanna D, Orru G, Musu M, De Conno F, et al. Is target opioid therapy within sight? *Minerva Anestesiol.* 2012;78(4):462-72.
76. Miller RD. *Miller's Anesthesia.* 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2010.
77. Lotsch J, Geisslinger G. Are μ -opioid receptor polymorphisms important for clinical opioid therapy? *Trends Mol Med.* 2005;11(2):82-9.
78. Mague SD, Isiegas C, Huang P, Liu-Chen LY, Lerman C, Blendy JA. Mouse model of OPRM1 (A118G) polymorphism has sex-specific effects on drug-mediated behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(26):10847-52.
79. Mahmoud S, Thorsell A, Sommer WH, Heilig M, Holgate JK, Bartlett SE, et al. Pharmacological consequence of the A118G mu-opioid receptor polymorphism on morphine- and fentanyl-mediated modulation of Ca(2)(+) channels in humanized mouse sensory neurons. *Anesthesiology.* 2011;115(5):1054-62.
80. Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, Holthe M, Dale O, Borchgrevink PC, et al. The 118 A > G polymorphism in the human mu-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2004;48(10):1232-9.
81. Hayashida M, Nagashima M, Satoh Y, Katoh R, Tagami M, Ide S, et al. Analgesic requirements after major abdominal surgery are associated with OPRM1 gene polymorphism genotype and haplotype. *Pharmacogenomics.* 2008;9(11):1605-16.
82. Ramchandani VA, Umhau J, Pavon FJ, Ruiz-Velasco V, Margas W, Sun H, et al. A genetic determinant of the striatal dopamine response to alcohol in men. *Mol Psychiatry.* 2011;16(8):809-17.
83. Lerman C, Wileyto EP, Patterson F, Rukstalis M, Audrain-McGovern J, Restine S, et al. The functional mu-opioid receptor (OPRM1) Asn40Asp variant predicts short-term response to nicotine replacement therapy in a clinical trial. *Pharmacogenomics J.* 2004;4(3):184-92.

84. Schinka JA, Town T, Abdullah L, Crawford FC, Ordorica PI, Francis E, et al. A functional polymorphism within the mu-opioid receptor gene and risk for abuse of alcohol and other substances. *Mol Psychiatry*. 2002;7(2):224-8.
85. Befort K, Filliol D, Decaillet FM, Gaveriaux-Ruff C, Hoehe MR, Kieffer BL. A single nucleotide polymorphic mutation in the human mu-opioid receptor severely impairs receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001;276(5):3130-7.
86. Wangkumhang P, Chaichoompu K, Ngamphiw C, Ruangrit U, Chanprasert J, Assawamakin A, et al. WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics*. 2007;8:275.
87. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W71-4.
88. Ott J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am J Hum Genet*. 1992;51(2):283-90.
89. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*. 2006;363(1-2):32-47.
90. Bai RK, Wong LJ. Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach. *Clin Chem*. 2004;50(6):996-1001.
91. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol*. 2010;22(2):187-92.
92. Domino EF, Evans CL, Ni L, Guthrie SK, Koeppe RA, Zubieta JK. Tobacco smoking produces greater striatal dopamine release in G-allele carriers with mu-opioid receptor A118G polymorphism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;38(2):236-40.
93. Arias A, Feinn R, Kranzler HR. Association of an Asn40Asp (A118G) polymorphism in the mu-opioid receptor gene with substance dependence: a meta-analysis. *Drug Alcohol Depend*. 2006;83(3):262-8.
94. Mague SD, Blendy JA. OPRM1 SNP (A118G): involvement in disease development, treatment response, and animal models. *Drug Alcohol Depend*. 2010;108(3):172-82.

95. Kroslak T, Laforge KS, Gianotti RJ, Ho A, Nielsen DA, Kreek MJ. The single nucleotide polymorphism A118G alters functional properties of the human mu-opioid receptor. *J Neurochem.* 2007;103(1):77-87.
96. Margas W, Zubkoff I, Schuler HG, Janicki PK, Ruiz-Velasco V. Modulation of Ca²⁺ channels by heterologously expressed wild-type and mutant human mu-opioid receptors (hMORs) containing the A118G single-nucleotide polymorphism. *J Neurophysiol.* 2007;97(2):1058-67.
97. Zhang Y, Wang D, Johnson AD, Papp AC, Sadee W. Allelic expression imbalance of human mu-opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. *J Biol Chem.* 2005;280(38):32618-24.
98. Chou WY, Yang LC, Lu HF, Ko JY, Wang CH, Lin SH, et al. Association of mu-opioid receptor gene polymorphism (A118G) with variations in morphine consumption for analgesia after total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006;50(7):787-92.
99. Sia AT, Lim Y, Lim EC, Goh RW, Law HY, Landau R, et al. A118G single nucleotide polymorphism of human mu-opioid receptor gene influences pain perception and patient-controlled intravenous morphine consumption after intrathecal morphine for postcesarean analgesia. *Anesthesiology.* 2008;109(3):520-6.
100. Reyes-Gibby CC, Shete S, Rakvag T, Bhat SV, Skorpen F, Bruera E, et al. Exploring joint effects of genes and the clinical efficacy of morphine for cancer pain: OPRM1 and COMT gene. *Pain.* 2007;130(1-2):25-30.

**ANEXO A - MANUSCRITO DO ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO
ANAESTHESIA**

**The Effect of Beta-2 Adrenergic Receptor Haplotype Variations on the
Haemodynamic Response Following Spinal Anaesthesia for Caesarean
Delivery†**

M. Daher,¹ R. B. Saito,² G. B. Barra,³ C. S. Govêia,⁴ E. Magalhães,⁵ F. A. R. Neves⁶

Anaesthesia 2012;67(11):1251-1259

DOI:10.1111/j.1365-2044.2012.07296.x

Author Information

¹Lecturer, Department of Anaesthesiology, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

²Anaesthesiologist, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

³Chief Researcher, Sabin Institute and Sabin Laboratory of Clinical Analysis, Brasilia, Brazil.

⁴Assistant Professor, Department of Anaesthesiology, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

⁵Professor and Associate Researcher, Department of Anaesthesiology, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

⁶Professor and Head of the Molecular Pharmacology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

*Correspondence: Dr. Mauricio Daher - Email: mdagomes@gmail.com

SUMMARY

We investigated whether genetic variations of beta-2 adrenergic receptor modulate the haemodynamic response following spinal anaesthesia for caesarean delivery. We focused on the effects of haplotypes formed by combinations of the Arg16Gly and Gln27Glu polymorphisms. Clinical data from 143 healthy parturients was collected. Only the ArgGln haplotype appeared to influence the risk of hypotension, most probably through a recessive mode of inheritance ($X^2=4.92$, $P=0.027$). Therefore, patients were grouped according to ArgGln homozygosity in two groups: presence of one or no copies of the haplotype ($N=120$) or two copies of the haplotype ($N=23$). Both groups presented similar baseline characteristics. Comparatively, patients homozygous for the ArgGln haplotype presented consistently higher blood pressure levels throughout the evaluated period ($F=11.2$, $P=0.001$ for repeated-measures ANOVA of systolic arterial pressure variation from baseline). In conclusion, our results demonstrate that haplotype variations of the beta-2 adrenergic receptor modulate the haemodynamic response following spinal anaesthesia for caesarean delivery.

INTRODUCTION

Maternal arterial hypotension is a frequent complication following spinal anaesthesia for caesarean delivery [1]. The relative hypovolaemia resulting from aortocaval compression by the gravidic uterus, associated with the sympathetic blockage caused by local anaesthetics can explain this occurrence. The main treatment strategies involve the use of different vasopressors [2], manual uterine displacement [3] and variable amounts of crystalloids or colloids [4].

The description of genetic markers that could identify parturients more susceptible to develop hypotension would have a therapeutic interest, and a more individualised approach could be undertaken. Moreover, the informations collected would improve our knowledge of the genetic mechanisms involved with haemodynamic regulation, contributing to investigations in different clinical scenarios, like septic shock for example.

The beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) is an important player in the sympathetic nervous system modulation, causing primarily bronchodilatative, vasodilatative, inotropic and chronotropic stimulating effects. The ADRB2 gene (NCBI, Gene ID: 154) contains several variations, and the polymorphisms Arg16Gly (changing an arginine for a glycine at position 16 of the receptor protein) and Gln27Glu (glutamine for glutamic acid at position 27) are known to modulate ADRB2 agonist induced desensitisation [5]. These genetic polymorphisms have been studied in diverse clinical contexts like the chronic treatment of asthma [6] and as potential risk factors for chronic arterial hypertension [7].

The role of ADRB2 genetic variations in modulating haemodynamic responses following spinal anaesthesia for caesarean delivery is still controversial. Preliminary results from our group [8], and others [9], have suggested an association of ADRB2 genotypes with different haemodynamic responses following spinal anaesthesia induction. Nevertheless, results have been conflicting regarding which genotype confers a protective effect and, in a more recent study, a genotype associated effect was not detected at all [10].

A strong linkage disequilibrium between the Arg16Gly and Gln27Glu polymorphisms has been demonstrated [11], indicating conserved haplotype structures in the ADRB2 gene. Consequently, a genotype associated effect could

actually represent the manifestation of non-evaluated mutations, located in adjacent DNA regions within the same haplotype as the imputed allele.

In the present study, we further explored the influences of ADRB2 variations on haemodynamic response following spinal anaesthesia for caesarean delivery, focusing our analyses on the effects of different ADRB2 haplotypes. Our results demonstrate that haplotype variations of the beta-2 adrenergic receptor modulate haemodynamic outcomes, and that patients homozygous for the ArgGln haplotype appear to be protected against arterial hypotension.

METHODS

Study design and patient selection

The study was approved by the University of Brasilia ethics committee and written informed consent was obtained from all participants. The design was a case-control evaluation of prospectively collected data. One hundred new subjects were added to our previous cohort of 50 patients [8], all recruited from a tertiary public hospital during the period of January of 2008 to July of 2010.

Patients were eligible if aged 16 or above, scheduled for elective caesarean delivery and classified as American Society of Anesthesiologists physical status I or II. The exclusion criteria were: contraindications for the selected anaesthetic technique; allergy to local anaesthetics or opioids; partial or full anaesthetic failure; gestational age < 37 weeks; multiple pregnancy; body weight \geq 100 kg; diagnosis of cardiovascular diseases, eclampsia or pre-eclampsia; current treatment with corticosteroids, magnesium, adrenergic agonists or antagonists.

Anaesthetic procedure

Arterial blood pressure was determined non-invasively using an automated oscillometric monitor with the cuff positioned on the patient's arm. Baseline blood pressure was defined by the mean of three consecutive measurements executed before spinal anaesthesia induction, with the patient in a left lateral decubitus position. All patients received spinal anaesthesia in the sitting position, between the

L3-L4 or L4-L5 intervertebral spaces, with a 25G or 27G Quincke type needle. A fixed dose of 10 mg of 0,5% hyperbaric bupivacaine added with 3 µg of sufentanil was administered. Patients were positioned supine on a flat operating table, and left lateral displacement of the uterus was performed manually until delivery. Fluid coloaded with 2000 ml of a crystalloid solution (lactated Ringer's or 0,9% saline) was administered at maximum infusion rate (~80 ml.min⁻¹) through an 18G intravenous catheter positioned on the superior member. After initial fluid administration, infusion was decreased so as to maintain a pervious venous line.

Maternal hypotension was defined by a 20 mmHg reduction from the baseline systolic arterial pressure (SAP) value or a 20% drop from the baseline mean arterial pressure (MAP) value. Either of these two definitions were considered at each time unit as a trigger to initiate therapy. Hypotension treatment was made with a 10 mg dose of ephedrine initially, and 5 mg doses subsequently, until arterial blood pressure increased above both hypotension threshold values.

The sensory block level was tested with a pinprick 15 minutes after spinal injection. Time from anaesthesia induction to delivery, haemodynamic parameters and ephedrine administration were recorded until 30 minutes after spinal anaesthesia induction, using 3 minute time units. Clinical data was prospectively collected during the anaesthetic procedure by an investigator directly involved with the study, unaware of genetic profiles of the patients.

ADRB2 genetic profiling

Blood samples were collected in EDTA containing vials. DNA was isolated from peripheral leukocytes using the CHELEX 100® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) resin method. Genotyping was determined using the amplification refractory mutation system [12], in which four quantitative real-time polymerase chain reactions (qPCR) were run in parallel, each using a different primer pair combination (see appendix). The forward primers 5'-AGCGCCTTCTTGCTGGCACCCACTA-3' and 5'-AGCGCCTTCTTGCTGGCACCCACTG-3' were used to genotype the Arg16Gly polymorphism (NCBI, RefSNP ID: rs1042713), while the reverse primers 5'-CCACCACCCACACCTCGTCCCTCTC-3' and 5'-CCACCA CCCACACCTCGTCCCTCTG-3' identified the Gln27Glu polymorphism (NCBI,

RefSNP ID: rs1042714). Amplification analysis of qPCR products were made using a SYBR® green based assay (Maxima SYBR® Green qPCR Master Mix 2X, Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) in a Step One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Our qPCR genotyping protocol was validated by sequencing of the region containing the polymorphisms, performed in 50 of our patient samples.

Statistical analysis

The allele and genotype frequencies were calculated for each polymorphism and tested for Hardy-Weinberg equilibrium among all patients using Pearson's chi-squared test (X^2).

The genetic effects on maternal hypotension incidence and haemodynamic response were studied using a two-step approach: selection of relevant haplotype associations followed by clinical outcomes comparison between haplotype groups. Initially, each detected haplotype was tested for association between copy number and risk of arterial hypotension using the X^2 test, assuming a general genetic model (each category is independently analysed). If an association was inferred (by a value of $p < 0.1$), the mode of inheritance was further examined using dominant (patients with one or two haplotype copies versus patients with no copies), recessive (patients with two copies versus patients with one or no copies) and additive (each haplotype copy is assumed to have an additive effect) models, and the one that provided the best fit to the data (highest X^2 value, and lowest p value) was used to group patients for further analyses.

The groups were compared with respect to baseline characteristics, sensory block level, time from anaesthesia induction to delivery, arterial hypotension incidence, dosage of administered ephedrine and haemodynamic variations. The systolic and mean components of the arterial blood pressure were compared between the groups in regard to the maximal drop from baseline value, the sequential variation from baseline and the cumulative mean variation from baseline (the averaged variation of each time unit).

Depending on skewness, continuous data is presented as mean (SD) or median [interquartile range], while categorical data is presented as number

(proportion), unless stated otherwise. Kolmogorov-Smirnov test was employed to check for normality distribution of continuous data. Categorical variables were compared with Pearson's chi-squared test or Fisher's exact test, as appropriate. Armitage's test for trend was used in the additive genetic model analysis. Normally distributed data was compared with Student's *t*-test and, in case of non-parametric distribution, Mann-Whitney-*U* test was performed. Sequential haemodynamic parameters were contrasted with two-way repeated-measures analysis of variance (two-way ANOVA). The Kaplan-Meier method was applied to evaluate the hypotension propensity during the 30 minutes following spinal anaesthesia. Survival curve differences were studied with the log rank test. A two-tailed *p* value of less than 0.05 was considered significant and correction for multiple comparisons was made by the Bonferroni procedure (resulting in a corrected *p* value ≤ 0.002). Analyses were made with SPSS for Windows (version 17, SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

During analyses of data collected from 150 patients, we found that seven patients did not meet the protocol specifications: one was underaged; the gestational ages of five patients were under 37 weeks; the gestational age of one patient was missing. Analyses were conducted using clinical data from 143 parturients. Anaesthesia was successfully administered to all patients and no major complications occurred. The overall arterial hypotension incidence was 71,3%.

Allele, genotype and haplotype frequencies are summarised in table 1. Genotype distribution of the codon 16 and 27 polymorphisms were in equilibrium with expected proportions of the Hardy-Weinberg model ($X^2=1.06$, $P=0.3$ and $X^2=1.35$, $P=0.25$ respectively). Only three haplotypes, among four possible combinations of genotypes, were detected. None of our patients were carrying the ArgGlu haplotype.

The association between haplotype copy number and maternal hypotension risk is displayed in table 2. Only the ArgGln haplotype appeared to influence the risk of hypotension ($X^2=5.09$, $P=0.078$), when the effect of each haplotype was evaluated using a general genetic model (table 2, upper section). When testing different forms of inheritance of the ArgGln haplotype (table 2, lower section), the recessive genetic model (comparison of patients with two haplotype copies against those with one or

no copies) provided the best fit for the data ($X^2=4.92$, $P=0.027$).

Based on these initial observations, patients were divided in two groups according to ArgGln copy number: those with one or no copies of the haplotype ($N=120$) and those with two copies of the haplotype ($N=23$). When baseline patient characteristics were compared, no significant differences were detected between the groups (table 3).

The clinical outcomes following spinal anaesthesia induction are presented in table 4. The sensory block level, was generally located at the same dermatomes, and no differences in the time to delivery after anaesthesia induction were noticed among the groups.

The presence of two copies of the ArgGln haplotype appeared to reduce the risk of arterial hypotension (52.2% vs 75.0%; odds ratio 0.36; 95% confidence interval, 0.15 to 0.91; $P=0.042$), and reduce the dosage of ephedrine required for elevation of blood pressure above hypotension threshold values ($P=0.038$). Nevertheless, these differences did not reach statistical significance after correcting for multiple comparisons.

Time to hypotension occurrence was studied using the Kaplan-Meier method (figure 1). A similar protective effect of the ArgGln haplotype was observed when survival curves were compared using the log rank test, but again it did not reach corrected significance ($X^2=4.13$, $P=0.042$).

After spinal anaesthesia induction, patients with two copies of the ArgGln haplotype presented less arterial blood pressure decrease from baseline values, and higher averaged arterial blood pressure (table 4 and figure 2). These effects reached corrected statistical significance when maximal MAP decrease from baseline ($p<0.001$) and cumulative SAP variation from baseline ($p<0.001$) were compared between the groups. Repeated-measures ANOVA of sequential haemodynamic parameters showed significant differences between the groups for SAP variation from baseline ($F=11.2$, $P=0.001$), but not for MAP variation ($F=6.47$, $P=0.012$) and heart rate values ($F=0.04$, $P=0.85$).

DISCUSSION

We evaluated the role of ADRB2 haplotypes on the haemodynamic response following spinal anaesthesia for caesarean delivery using a nested case-control study design. Our analyses followed a two-step approach: selection of grouping variables followed by comparison of outcomes between groups.

For grouping variable selection, we searched for associations between haplotype copy number and arterial hypotension risk following anaesthesia induction. Interestingly, we found that only the ArgGln haplotype appeared to influence the hypotension risk. By comparing different forms of inheritance, we observed that the recessive model, where two copies of the genetic variation need to be present for the effect to manifest, portrayed more accurately the ArgGln haplotype effect. Therefore, patients were divided in two groups, according to homozygosity for the ArgGln haplotype.

Even though both groups presented similar baseline characteristics, and both presented an initial drop in arterial blood pressure following spinal anaesthesia, patients homozygous for the ArgGln haplotype appeared to be protected against this decrease, as this group of patients presented consistently higher blood pressure levels throughout the evaluated period. These differences remained significant even after statistical correction for multiple analyses, which strengthened our results.

Our present study provide new insights into the relationship between genetic variations of the beta-2 adrenergic receptor and haemodynamic regulation, adding up to our previous report [8]. In this small, preliminary study, we had observed that patients homozygous for the Arg16 genotype were protected against arterial hypotension after spinal anaesthesia induction for caesarean delivery. Now, evaluating both Arg16Gly and Gln27Glu polymorphisms and their interrelations, we found that effects attributed to the Arg16 genotype cannot be dissociated from the ArgGln combination, since every Arg16 copy was accompanied by a Gln27 variation, in an haplotype organisation. This represents that other non-evaluated mutations inside the ArgGln haplotype, could be responsible for the observed protective effects against maternal hypotension.

Previous reports have described somewhat contradictory results in the same clinical context as ours. The first study, made in a North American cohort, found that

the homozygous Gly16 and Glu27 genotypes conferred less necessity for vasopressor infusion to maintain blood pressure above hypotension thresholds, during the first 15 minutes after spinal anaesthesia for caesarean delivery [9]. In a more recent paper, made in a Chinese cohort, no genotype variations were found to significantly influence vasopressor requirements to maintain blood pressure near the baseline value. Intriguingly, the lowest plasmatic concentration of ephedrine required to maintain arterial pressure near baseline values, was observed in parturients homozygous for the Arg16 genotype [10]. Nonetheless, these discrepancies should be considered in light of the fact that evaluating vasopressor use is not the same as measuring arterial hypotension incidence, even though both variables are clearly related. Also, our analyses concentrated on the effects of beta-2 adrenergic receptor haplotypes instead of individual genotypes.

The Arg16Gly and Gln27Glu polymorphisms are frequent modifications of the beta-2 adrenergic receptor, and have been implicated in modulating pharmacological and clinical aspects of receptor function [5,13]. Seminal in vitro studies showed that the Gly16 variation enhanced agonist induced receptor desensitisation, while the Glu27 form conferred desensitisation resistance [14,15]. Clinical translation of these mutations have been found in chronic treatment of asthma [6], susceptibility to chronic arterial hypertension [7,16] and in septic shock [17] and heart failure mortality risk [18]. Nonetheless, several studies present conflicting results, sometimes negating a previously described genotype effect [19], while other times associating the same effect with another genotype [20]. Also, differences in genotype effect have been found for specific races, and this is generally explained by influences of other non-evaluated genetic factors [21].

The autonomic system function has been linked to maternal arterial hypotension after spinal anaesthesia induction [22]. Data obtained from heart rate variability analysis (HRV) showed that patients with an increased sympathetic activity before spinal anaesthesia induction had an increased risk of arterial hypotension. One explanation would be that anaesthetic sympathectomy would not be adequately compensated by the other systems responsible for blood pressure elevation, already adapted to a state of higher sympathetic tone. In parallel, ADRB2 polymorphisms have been shown to influence the autonomic nervous system. Individuals

homozygous for the Arg16 genotype demonstrated lower sympathetic activity and higher parasympathetic drive when compared to carriers of the Gly variation [23,24].

Based on previous observations and our results, we speculate that patients with two copies of the ArgGln haplotype of the beta-2 adrenergic receptor have a decreased risk of hypotension incidence and severity following spinal anaesthesia for caesarean delivery, possibly due to a decreased sympathetic activity prior to spinal anaesthesia induction, although this association remains to be tested. These inferences may not apply for populations with a different ethnic background from the Brazilian people.

Our study has several limitations. Our small sample size does not provide the necessary power for adequate multivariate regression analyses, that will be necessary to confirm the relevance of ADRB2 genetic variations among several other variables that could also modulate the haemodynamic response of parturients subjected to spinal anaesthesia. Also, due the scarcity of patients homozygous for the GlyGlu haplotype and the absence of patients with the ArgGlu haplotype, few conclusions could be definitely draw from the influences of these variants in our sample.

Another possible criticism is that we did not grouped patients according to race or ethnic background (aside from them being Brazilians), and our sample could be contaminated by subpopulations. Nonetheless, allele distribution followed the Hardy-Weinberg model and, genotype proportions were very similar to another study of ADRB2 variations in a Brazilian cohort [16], both facts argue against subpopulation stratification. Besides, Brazilian people are highly genetically heterogeneous [25], and self identification as being white, brown or black has little correspondence with genetic background [26]. We believe that by evaluating genetic effects in the “general population”, results become more pertinent in real, every day practice, even though it makes the association process more arduous.

The perspective of personalised medicine is very appealing for patients and doctors alike, and the identification of genetic influences on the haemodynamic regulation and its disturbances would be of great interest to medical specialties that care for the critically ill, like anaesthesiology and critical care medicine [27,28]. Several difficulties exist in the process of translating genetic association studies to

the clinical practice. Contextualising discovered effects, especially if they are small, can be very challenging and should be evaluated in specific clinical situations.

In conclusion, our results suggest that haplotype variations of the beta-2 adrenergic receptor modulate the haemodynamic response of patients subjected to spinal anaesthesia for caesarean delivery. We propose that more studies should be conducted to better clarify these effects with larger sample sizes, using multivariate regression analyses and concomitantly evaluating the perioperative autonomic activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Guilherme Martins Santos for his insightful and constructive remarks during manuscript preparation.

COMPETING INTERESTS

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). No competing interests declared.

REFERENCES

1. Ngan Kee WD. Prevention of maternal hypotension after regional anaesthesia for caesarean section. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2010; 23: 304–9.
2. Ngan Kee WD, Khaw KS, Ng FF. Comparison of phenylephrine infusion regimens for maintaining maternal blood pressure during spinal anaesthesia for Caesarean section. *British Journal of Anaesthesia* 2004; 92: 469–74.
3. Kundra P, Khanna S, Habeebullah S, Ravishankar M. Manual displacement of the uterus during Caesarean section. *Anaesthesia* 2007; 62: 460–5.
4. McDonald S, Fernando R, Ashpole K, Columb M. Maternal cardiac output changes after crystalloid or colloid coload following spinal anaesthesia for elective cesarean delivery: a randomized controlled trial. *Anesthesia & Analgesia* 2011; 113: 803–10.
5. Kirstein SL, Insel PA. Autonomic nervous system pharmacogenomics: a progress report. *Pharmacological Reviews* 2004; 56: 31–52.

6. Israel E, Chinchilli VM, Ford JG, et al. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *The Lancet* 2004; 364: 1505–12.
7. Bao X, Mills PJ, Rana BK, et al. Interactive effects of common β 2-adrenoceptor haplotypes and age on susceptibility to hypertension and receptor function. *Hypertension* 2005; 46: 301–7.
8. Magalhães E, Gomes MDA, Barra GB, Govêia CS, Ladeira LCA. Evaluation of the influence of the codon 16 polymorphism of the beta-2 adrenergic receptor gene on the incidence of arterial hypotension and ephedrine use in pregnant patients submitted to subarachnoid anesthesia. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 2010; 60: 228–36.
9. Smiley RM, Blouin J-L, Negron M, Landau R. β 2-adrenoceptor genotype affects vasopressor requirements during spinal anesthesia for cesarean delivery. *Anesthesiology* 2006; 104: 644–50.
10. Landau R, Liu S-K, Blouin J-L, Smiley RM, Ngan Kee WD. The effect of maternal and fetal β 2-adrenoceptor and nitric oxide synthase genotype on vasopressor requirement and fetal acid-base status during spinal anesthesia for cesarean delivery. *Anesthesia & Analgesia* 2011; 112: 1432–7.
11. Dewar J, Wheatley A, Venn A. β 2-adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in an adult population. *Clinical and Experimental Allergy* 1998; 28: 442-8.
12. Newton C, Graham A, Heptinstall L, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 1989; 17: 2503–16.
13. von Homeyer P, Schwinn DA. Review Articles: Pharmacogenomics of β -adrenergic receptor physiology and response to β -blockade. *Anesthesia & Analgesia* 2011; 113: 1305–18.
14. Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. Amino-terminal polymorphisms of the human β 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 1994; 33: 9414–9.
15. Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggett SB. Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth

- muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1995; 13: 25–33.
16. Pereira AC, Floriano MS, Mota GFA, et al. β 2-adrenoceptor functional gene variants, obesity, and blood pressure level interactions in the general population. *Hypertension* 2003; 42: 685–92.
 17. Nakada T-A, Russell JA, Boyd JH, et al. β 2-adrenergic receptor gene polymorphism is associated with mortality in septic shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010; 181: 143–9.
 18. Mansur AJ, Fontes RS, Canzi RA, et al. Beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms Gln27Glu, Arg16Gly in patients with heart failure. *BMC Cardiovascular Disorders* 2009; 9: 50.
 19. Bleecker ER, Postma DS, Lawrance RM, Meyers DA, Ambrose HJ, Goldman M. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting β 2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *The Lancet* 2007; 370: 2118–25.
 20. Dishy V, Sofowora GG, Xie HG, et al. The effect of common polymorphisms of the β 2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization. *The New England Journal of Medicine* 2001; 345: 1030–5.
 21. Ferdinands JM, Mannino DM, Gwinn ML, Bray MS. ADRB2 Arg16Gly polymorphism, lung function, and mortality: results from the Atherosclerosis Risk in Communities study. *PLoS ONE* 2007; 2: e289.
 22. Hanss R, Bein B, Weseloh H, et al. Heart rate variability predicts severe hypotension after spinal anesthesia. *Anesthesiology* 2006; 104: 537–45.
 23. Matsunaga T, Yasuda K, Adachi T, et al. Association of β -adrenoceptor polymorphisms with cardiac autonomic modulation in Japanese males. *American Heart Journal* 2007; 154: 759–66.
 24. Masuo K, Katsuya T, Fu Y, Rakugi H, Ogihara T, Tuck ML. β 2-adrenoceptor polymorphisms relate to insulin resistance and sympathetic overactivity as early markers of metabolic disease in nonobese, normotensive individuals. *American Journal of Hypertension* 2005; 18: 1009–14.
 25. Suarez-Kurtz G. Pharmacogenetics in the brazilian population. *Frontiers in Pharmacology* 2010; 1: 118.

26. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 177–82.
27. Zaugg M, Schaub MC. Genetic modulation of adrenergic activity in the heart and vasculature: implications for perioperative medicine. *Anesthesiology* 2005; 102: 429–46.
28. Searle R, Hopkins PM. Pharmacogenomic variability and anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia* 2009; 103: 14–25.

Table 1 Genetic variations of the beta-2 adrenergic receptor encountered in our population. Frequencies are described according to allele, genotype or haplotype. Values are number (proportion). Genotype distribution for the codon 16 and 27 polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Codon 16 polymorphism		Codon 27 polymorphism		
Alleles		Alleles		
Arg	122 (42.7)	Gln	216 (75.5)	
Gly	164 (57.3)	Glu	70 (24.5)	
Genotypes		Genotypes		
Arg16Arg	23 (16.1)	Gln27Gln	79 (55.2)	
Arg16Gly	76 (53.1)	Gln27Glu	58 (40.6)	
Gly16Gly	44 (30.8)	Glu27Glu	6 (4.2)	
HWE p value	0.30	HWE p value	0.25	
No. of haplotype copies				
Haplotypes	No copies	1 copy	2 copies	Total haplotype copies
ArgGln	44 (30.8)	76 (53.1)	23 (16.1)	122 (42.7)
GlyGln	68 (47.5)	55 (38.5)	20 (14)	95 (33.2)
GlyGlu	80 (55.9)	57 (39.9)	6 (4.2)	69 (24.1)

Table 2 Description of maternal hypotension risk according to the effects of beta-2 adrenergic receptor haplotypes. The upper section presents risk according to a general mode of inheritance for all haplotypes. The lower section presents risk when different modes of inheritance were tested for the ArgGln haplotype. Values represent odds ratios.

No. of haplotype copies					
Haplotypes	No copies	1 copy	2 copies	X²	p value
ArgGln	1	1.21	0.41	5.09	0.078
GlyGln	1	1.4	1.43	0.86	0.65
GlyGlu	1	1.1	2.14	0.48	0.49
No. of ArgGln copies					
Genetic model	No copies	1 copy	2 copies	X²	p value
Additive	1	0.71	0.5	1.93	0.16
Dominant	1	0.9	0.9	0.06	0.8
Recessive	1	1	0.36	4.92	0.027

Table 3 Baseline characteristics. Patients were grouped according to homozygosity for the ArgGln haplotype. Values are mean (SD), median [IQR] or number (proportion).

	No. of ArgGln copies		p value
	≤1 (N=120)	2 (N=23)	
Age; years	26.0 (6.3)	23.3 (4.9)	0.061
Gestacional age; weeks	40 [39-40]	39 [38-40]	0.59
Height; cm	159.6 (6.8)	160.4 (6.6)	0.60
Weight; kg	72.4 (10.2)	70.7 (7.7)	0.44
BMI; kg.m ⁻²	28.5 (4.2)	27.6 (3.4)	0.31
Physical status	I (89%) II (11%)	I (91%) II (9%)	0.76
Systolic Blood Pressure; mmHg	117.8 (14.3)	114.5 (12.7)	0.31
Mean Blood Pressure; mmHg	82.9 (11.6)	81.9 (10.8)	0.72

Table 4 Clinical outcomes following spinal anaesthesia induction. Patients were grouped according to homozygosity for the ArgGln haplotype. Values are mean (SD), median [IQR] or number (proportion).

	No. of ArgGln copies		p value
	≤1 (N=120)	2 (N=23)	
Sensory block level; dermatome	T5 [T4-T5]	T5 [T4-T6]	0.30
Time to delivery; min	9 [9-12.75]	12 [9-12]	0.76
Hypotension incidence; n	90 (75%)	12 (52.2%)	0.042
Ephedrine dosage; mg	10 [0-20]	10 [0-15]	0.038
Maximal SAP* decrease from baseline; %	-20.0 (13.6)	-12.0 (13.4)	0.011
Maximal MAP† decrease from baseline; %	-26.0 (11.6)	-16.0 (12.2)	< 0.001
Cumulative SAP* variation from baseline; %	-2.7 (8.2)	4.2 (9.3)	< 0.001
Cumulative MAP† variation from baseline; %	-5.1 (10.1)	1.6 (10)	0.004

*SAP; systolic arterial pressure

†MAP; mean arterial pressure

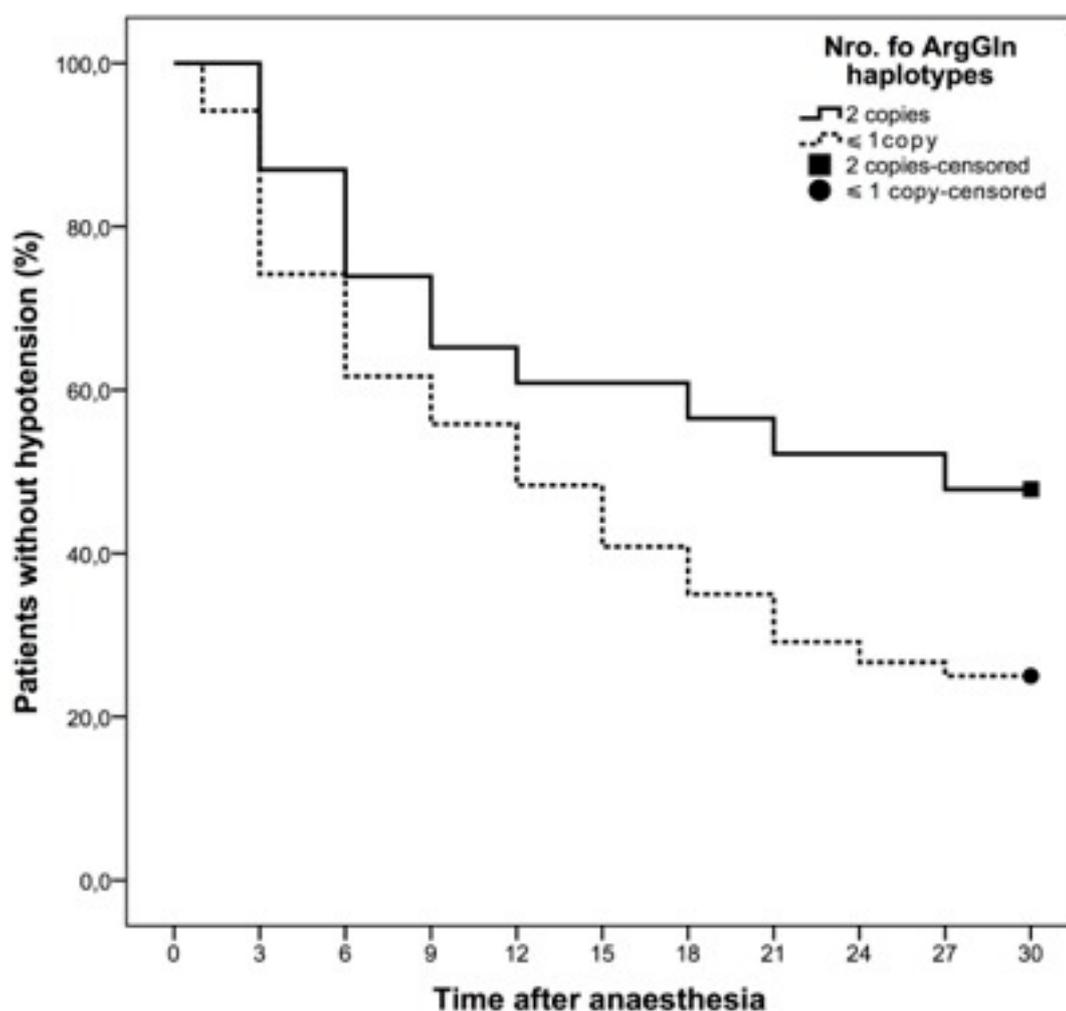


Figure 1 Time to arterial hypotension occurrence following spinal anaesthesia induction plotted as Kaplan-Meier survival curves. Patients were grouped according to homozygosity for the ArgGln haplotype as: patients with one or no copies of the haplotype (dotted line, and ● for censored data) and patients with two copies (solid line, and ■ for censored data). No significant differences were detected between the curves after correcting for multiple analyses ($X^2=4.13$, $P=0.042$ by the log rank test).

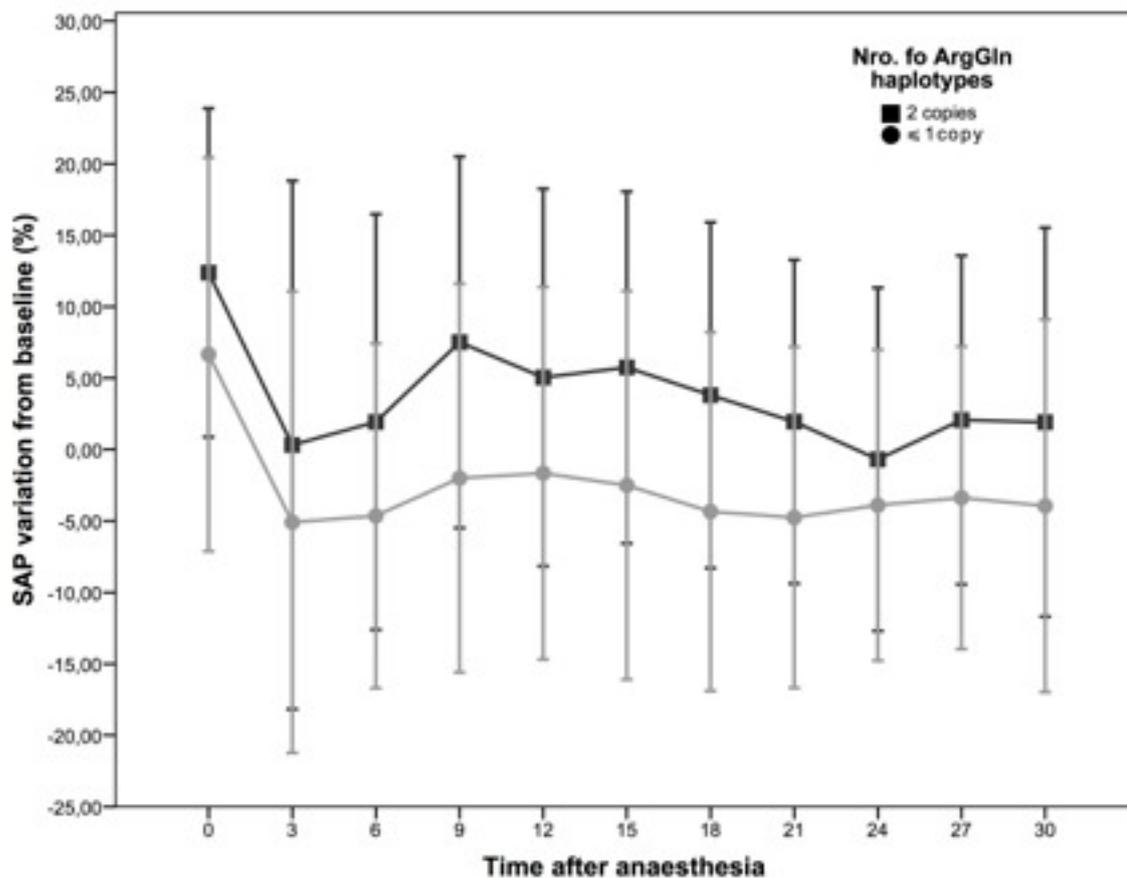


Figure 2 Systolic arterial pressure (SAP) percentage variation from baseline after anaesthesia induction. Patients were grouped according to homozygosity for the ArgGln haplotype as: patients with one or no copies of the haplotype (●) and patients with two copies (■). Error bars represent SD. Patients homozygous for the ArgGln haplotype presented higher SAP values throughout the evaluated period in comparison to patients with one or no copies of the haplotype ($F=11.2$, $P=0.001$ by two-way repeated-measures ANOVA).

**ANEXO B - MANUSCRITO DO ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO
PERIÓDICO *PAIN PRACTICE***

Genotyping the Mu-Opioid Receptor A118G Polymorphism Using the Real-time Amplification Refractory Mutation System: Allele Frequency Distribution Among Brazilians

DOI: 10.1111/papr.12042

Mauricio Daher, MD*; Felipe M. M. Costa†, MS; Francisco A. R. Neves MD, PhD‡

Author Information

**Department of Anesthesiology, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.*

†Medical School, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

‡Molecular Pharmacology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

Correspondence: Dr. Mauricio Daher - Email: mdagomes@gmail.com

ABSTRACT

Background: The mu opioid receptor (OPRM1) A118G polymorphism has been associated with decreased analgesic effects of opioids and predisposition to addiction. However, its role in specific clinical scenarios and in different ethnicities must be better defined. No studies evaluating the A118G polymorphism in the Brazilian population have yet been published.

Methods: Genomic DNA was isolated from peripheral leucocytes of 200 surgical patients of the Center-West region of Brazil. Our genotyping protocol was developed based on the real-time amplification refractory mutation system and validated by comparison to cycle sequencing. Functional consequences of the A118G polymorphism were studied by comparing tobacco smoking prevalence and exposure between genotype groups.

Results: We observed perfect correlation between genotyping and sequencing results. Frequency of the G allele was 16% (IC 95% 12.7-19.9%) in our sample. Genotype distribution revealed 146 (73%) patients 118A homozygous, 44 (22%) heterozygous and 10 (5%) homozygous for the G variant. After grouping patients according to the presence of the G allele, we did not observe differences in smoking prevalence, however patients with one or two copies of the 118G allele reported higher tobacco exposure than patients 118A homozygous measured in pack-years (28.9 ± 12.5 vs. 21.5 ± 10.8 respectively, $P = 0.02$).

Conclusions: We developed a fast and reliable genotyping method to identify the allele frequency distribution of the OPRM1 A118G polymorphism among patients from Center-West Brazil. Our preliminary results suggest functional consequences of the polymorphism on smoking behavior among Brazilians.

Keywords

mu-opioid receptor; genetic polymorphisms; genotyping techniques; smoking; pain management

INTRODUCTION

The mu-opioid receptor (MOR) takes central stage in important signaling pathways of human physiology and disease, influencing mechanisms of pain, stress and addiction.¹ Agonists targeting MOR have been used to treat acute and chronic pain syndromes for centuries and still figure among the most commonly prescribed pharmaceuticals in clinical practice today.² Despite their widespread use, considerable heterogeneity in response to these drugs is observed, which can be partially attributed to genetic variations that influence their pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles.^{3, 4}

A number of reports analyzing mu-opioid receptor gene (OPRM1) modifications have described an association between the single nucleotide polymorphism A118G (NCBI, RefSNP ID: rs1799971) and altered receptor function. Located in exon 1, this genetic mutation results in the substitution of an asparagine residue for an aspartic acid at position 40 of the mu-opioid receptor protein, causing the loss of a putative glycosylation site.⁵ Data from experimental^{6, 7} and clinical^{8, 9} studies suggest that the presence of the 118G allele translates to increased pain perception and decreased analgesic effects of administered opioids. However, further studies are still needed before an individualized approach to opioid therapy is developed. In parallel, the A118G polymorphism has also been linked to altered nicotine reward signaling,¹⁰ relapse after anti-smoking therapy¹¹ and addiction susceptibility to various substances.¹²

The design of studies to evaluate the influences of the A118G polymorphism in diverse clinical scenarios should consider *a priori* the allele distribution of the study population. It has been demonstrated that the frequency of 118G carriers differs considerably between ethnic groups around the globe.¹³ We are not aware of studies evaluating the allele frequency distribution of the OPRM1 A118G polymorphism in Brazilian individuals.

Our primary objective was to facilitate the design and conduct of studies evaluating the effects of the A118G polymorphism by means of two approaches: (i) present an affordable and reliable genotyping technique based on real-time

polymerase chain reaction (qPCR) technology, and (ii) describe the allele frequency distribution of the A118G polymorphism in individuals from Center-West Brazil.

Because of the importance of mu-opioid receptor signaling in addictive disorders,¹⁴ we also evaluated functional consequences of the 118G allele by comparing tobacco smoking prevalence and exposure between genotype groups.

METHODS

Patients

The study was approved by the University of Brasilia ethics committee and written informed consent was obtained from all participants. Patients were invited to participate if aged 18 years or above, born in Brazil and of Brazilian descent (for 2 or more generations) and living in the Federal District. Patients were randomly recruited among those scheduled to undergo an elective surgery at the University Hospital of Brasilia from January to July of 2012. Individuals with cognitive impairments and those who could not read and write were excluded from the study.

Patients were interviewed the night before their scheduled surgeries. Information regarding age, gender, self-reported race, smoking status and tobacco exposure (pack-years) was collected. At the same time, a 3 ml sample of peripheral blood was obtained for DNA isolation, collected in EDTA containing vials.

DNA isolation

Genomic DNA was isolated from the blood sample using the Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) resin protocol.¹⁵ In brief, 50 µl of whole blood was mixed with 1 ml of ultrapure water and incubated for 5 minutes at room temperature, causing lysis of erythrocytes. Leukocytes were recovered by centrifugation of samples for 3 minutes at 8.000g. The supernatant was discarded and another 1 ml of water was added to the pellet. The incubation, centrifugation,

and supernatant discard steps were repeated under the same conditions. Then, 200 μ l of Chelex® 100 5% suspension was added to the samples, which were vortex mixed for 10 seconds. The resulting leukocyte lysate was incubated at 56°C for 30 minutes and then at 95°C for 8 minutes. Prepared samples were stored at -20°C for later use in PCR reactions.

Genotyping

We selected the real-time amplification refractory mutation system (ARMS-qPCR) as the genotyping method.¹⁶ Allele-specific forward primers (ForwA and ForwG) were designed using published guidelines,¹⁷ while reverse (Rev) and sequencing (ForwS) primers were designed using PRIMER3Plus software¹⁸ (Table 1). Two qPCR reactions, each using one of the allele-specific forward primers, were run in parallel (duplicates), both producing an amplification product of 275 bp. The reaction mixtures contained: 5 μ l of SYBR® Green Mix (Maxima SYBR® Green qPCR Master Mix 2X, Fermentas, Glen Burnie, MD, USA), 125 nM of each primer and 1 μ l of isolated DNA in a final volume of 10 μ l. The amplification program was: DNA polymerase activation at 95°C for 10 minutes, followed by 35 repeated cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds and annealing-extension at 55°C for 1 minute. Amplification specificity was tested by melt curve analysis, which was performed by heating the samples from 60°C to 95°C at increments of 0.3°C, while recording the fluorescence signal decay. Reactions were conducted in a Step One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sequencing

The genotyping protocol was validated by standard PCR amplification followed by DNA sequencing of the region containing the A118G polymorphism, performed in the first 25 patients enrolled. PCR reactions were carried out using a standard Taq DNA polymerase kit (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA). The designed primers (ForwS and Rev) produced a 427 bp amplification product. The PCR cycling

conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 45 seconds and extension at 72°C for 45 seconds. Final extension was carried out at 72°C for 7 min. The reactions were performed using a TC-312 thermocycler (Techne Inc., Burlington, NJ, USA). Agarose gel electrophoresis of the PCR products confirmed the specificity of the reaction. Amplification products were sent to MacroGen Sequencing Service (MacroGen Inc., Korea) for cycle sequencing using the ForwS primer. Results were compared to reference sequences flanking the A118G polymorphism from the NCBI refSNP database, using the software Sequencher (Gene Code Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

Statistical analyses

The sample size was calculated to be 200 patients, as described by Ott¹⁹ (Formula 8). The margin of error was set to $\pm 2.5\%$, and we assumed an equal distribution of the alleles to produce a conservative sample size estimate. Data are presented as mean (\pm SD) or number (percentage), unless stated otherwise. Allele distribution is presented as frequency with 95% confidence intervals. Normal distribution of continuous variables was tested by the Kolmogorov-Smirnov test. Categorical variables were contrasted using Pearson's chi-squared test or Fisher's exact test, as appropriate. Parametric data was analyzed with Student's t-test. A two-tailed *P* value of ≤ 0.05 was considered significant. Analyses were performed using SPSS for Mac version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Genotypes were determined by comparing the efficiency of allele-specific qPCR reactions. If amplification efficiency was higher (defined by a lower C_t value) when a particular forward primer (ForwA or ForwG) was used, the patient was identified as homozygous for the variant associated with the primer. Heterozygous individuals were identified when amplification efficiency was similar between qPCR

reactions, independent of the forward primer used. We observed perfect correlation between the results of our genotyping protocol and the sequencing data from the 25 samples used for the validation procedure.

Further analyses were conducted using data from 200 patients. Subjects ranged in age from 18 to 92 years (50.8 ± 15.6), 79 (39.5%) of whom were women. Among the 400 alleles evaluated, we observed 64 copies of the G variant (16%; IC 95% 12.7-19.9%). Allele and genotype distribution, considering self-reported race, is shown in Table 2. Most patients identified themselves as whites (49%), followed by browns (35.5%), blacks (15%) and only one Amerindian (0.5%). Allele frequency did not differ significantly between white, brown and black races ($\chi^2 = 0.94$; $P = 0.62$).

Assuming a dominant model of inheritance of the G allele, we did not observe significant differences in smoking prevalence between 118A homozygous patients versus those with one or two copies of the G allele (35.6 vs. 33.3% respectively; $P = 0.76$). However, patients with the 118G allele reported higher tobacco exposure, even though the other patient characteristics were similar (Table 3). We did not detect differences in genotype distribution among smokers (G allele frequency of 15%) when compared to predicted numbers by the Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 1.78$; $P = 0.18$).

DISCUSSION

We developed a fast and reliable genotyping method to identify the allele frequency distribution of the OPRM1 A118G polymorphism among surgical patients from Center-West Brazil. The ARMS-qPCR technique we adopted has been extensively used for SNP genotyping,²⁰ and it has considerable advantages over some of the methods previously used to genotype the OPRM1 A118G polymorphism. It offers increased throughput performance and ease of use in comparison to cumbersome and labor intensive sequencing and gel-based methods.²¹ Additionally, reagent costs for the ARMS-qPCR assay are lower than those for the similarly effective method featuring 5' nuclease hydrolysis probes (TaqMan® probes).²²

Our results indicate that prevalence of the 118G allele among individuals from Center-West Brazil is close to 16%. Previous reports described substantial G allele

frequency variability in different regions of the world (Table 4). Interestingly, the Center-West region has been occupied in the last 50 years by streams of immigrants from all over the country and can be considered a good proxy for the genetic composition of most other regions of Brazil.³³ Genotype distribution diverged from expected proportions of the Hardy-Weinberg equilibrium to a small degree, suggesting the presence of genetically diverse subpopulations in our sample. The divergence was especially strong among individuals self-reported as brown or “*pardo*” (a mixture of white, black and Amerindian races). Nonetheless, we believe this was a spurious occurrence as Brazilians are generally highly genetically admixed presenting significant genomic overlapping regardless of physical appearance.³⁴

After grouping patients according to the presence of the G variant, we observed similar prevalences of tobacco smoking between the groups. However, patients with the 118G allele reported higher tobacco exposure than 118A homozygous individuals, suggesting a possible association between the G variant and increased craving for smoking. Our observations are compatible with recent findings that carriers of the 118G allele have greater release of dopamine in brain regions associated with the reward response after smoking nicotine cigarettes.³⁵ A similar increase in dopamine release was also observed after alcohol consumption by individuals with the 118G allele.¹⁰ Clinical studies, however, have been inconclusive about the effect of this polymorphism on susceptibility to nicotine addiction.^{36, 37} One possible reason for these inconsistencies is related to different study designs and variability in the 118G allele frequency among different ethnicities. It is important to note that our results should be viewed only as preliminary as the present study was not specifically designed to evaluate craving behavior.

The precise mechanistic consequences of the 118G allele on MOR function still remain unclear. *In vitro* studies have described decreased MOR expression,³⁸ reduced agonist-induced signaling efficiency and attenuated inhibition of calcium currents.^{7, 39} Comparably, experimental data, using a mouse model with an equivalent mutation, demonstrated decreased mRNA and MOR expression in brain regions related to pain, stress and reward.⁶ When tested with the hot-plate assay, mice harboring the G allele showed impaired morphine-induced antinociceptive response.⁷ A study of human autopsy brain tissues also revealed decreased OPRM1 mRNA expression in carriers of the 118G allele.⁴⁰ Contrary to the inconsistent results

seen in addiction behavior studies, clinical-translational studies evaluating pain perception present considerable evidence regarding the association between the 118G allele and increased postoperative morphine consumption^{41, 42} and higher doses of morphine to relieve pain of cancer patients.^{8, 43}

Before the evaluation of OPRM1 A118G polymorphism is used to guide the therapy of patients receiving opioid drugs, further studies are still needed to clarify the influences of the 118G allele on the analgesic effects of opioids used during acute and chronic pain episodes, as well as its effects on human behavior especially in relation to addiction to opioids, nicotine and alcohol. In this context, the correct protocol design, based on sufficient sample size to account for confounding variables and genotype distribution in different ethnicities, should be considered critical prerequisites for the generation of trustable results.

CONCLUSION

To our knowledge, this is the first report to evaluate allele frequency distribution and functional consequences of the mu-opioid receptor A118G polymorphism among Brazilians. We expect our results and described methods will **be** useful in future studies that will define the clinical role of the OPRM1 A118G polymorphism, hopefully improving the care of patients afflicted by pain and addiction, particularly among the Brazilian population.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). Authors declare not to have any competing interests.

REFERENCES

1. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011;115:1363-1381
2. Ballantyne JC, Mao J. Opioid therapy for chronic pain. *N Engl J Med*. 2003;349:1943-1953
3. Lotsch J, Geisslinger G, Tegeder I. Genetic modulation of the pharmacological treatment of pain. *Pharmacol Ther*. 2009;124:168-184
4. Finco G, Pintor M, Sanna D, et al. Is target opioid therapy within sight? *Minerva Anesthesiol*. 2012;78:462-472
5. Lotsch J, Geisslinger G. Are μ -opioid receptor polymorphisms important for clinical opioid therapy? *Trends in Molecular Medicine*. 2005;11:82-89
6. Mague SD, Isiegas C, Huang P, Liu-Chen LY, Lerman C, Blendy JA. Mouse model of OPRM1 (A118G) polymorphism has sex-specific effects on drug-mediated behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:10847-10852
7. Mahmoud S, Thorsell A, Sommer WH, et al. Pharmacological consequence of the A118G mu opioid receptor polymorphism on morphine- and fentanyl-mediated modulation of Ca^{2+} channels in humanized mouse sensory neurons. *Anesthesiology*. 2011;115:1054-1062
8. Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, et al. The 118 A > G polymorphism in the human mu-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48:1232-1239
9. Hayashida M, Nagashima M, Satoh Y, et al. Analgesic requirements after major abdominal surgery are associated with OPRM1 gene polymorphism genotype and haplotype. *Pharmacogenomics*. 2008;9:1605-1616
10. Ramchandani VA, Umhau J, Pavon FJ, et al. A genetic determinant of the striatal dopamine response to alcohol in men. *Mol Psychiatry*. 2011;16:809-817
11. Lerman C, Wileyto EP, Patterson F, et al. The functional mu opioid receptor (OPRM1) Asn40Asp variant predicts short-term response to nicotine replacement therapy in a clinical trial. *Pharmacogenomics J*. 2004;4:184-192

12. Schinka JA, Town T, Abdullah L, et al. A functional polymorphism within the mu-opioid receptor gene and risk for abuse of alcohol and other substances. *Mol Psychiatry*. 2002;7:224-228
13. 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467:1061-1073
14. Levran O, Yuferov V, Kreek MJ. The genetics of the opioid system and specific drug addictions. *Hum Genet*. 2012;131:823-842
15. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991;10:506-513
16. Newton CR, Heptinstall LE, Summers C, et al. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet*. 1989;2:1481-1483
17. Wangkumhang P, Chaichoompu K, Ngamphiw C, et al. Wasp: A web-based allele-specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics*. 2007;8:275
18. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:W71-74
19. Ott J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am J Hum Genet*. 1992;51:283-290
20. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*. 2006;363:32-47
21. Koch WH. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:749-761
22. Bai RK, Wong LJ. Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: A single-step approach. *Clin Chem*. 2004;50:996-1001

23. Troisi A, Frazzetto G, Carola V, et al. Social hedonic capacity is associated with the A118G polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) in adult healthy volunteers and psychiatric patients. *Soc Neurosci*. 2011;6:88-97
24. Franke P, Wang T, Nothen MM, et al. Nonreplication of association between mu-opioid-receptor gene (OPRM1) A118G polymorphism and substance dependence. *Am J Med Genet*. 2001;105:114-119
25. Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, et al. Mu opioid receptor gene variants: Lack of association with alcohol dependence. *Mol Psychiatry*. 1997;2:490-494
26. Ginosar Y, Davidson EM, Meroz Y, Blotnick S, Shacham M, Caraco Y. Mu-opioid receptor (A118G) single-nucleotide polymorphism affects alfentanil requirements for extracorporeal shock wave lithotripsy: A pharmacokinetic-pharmacodynamic study. *Br J Anaesth*. 2009;103:420-427
27. Kim SG, Kim CM, Kang DH, et al. Association of functional opioid receptor genotypes with alcohol dependence in koreans. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004;28:986-990
28. Fukuda K, Hayashida M, Ide S, et al. Association between OPRM1 gene polymorphisms and fentanyl sensitivity in patients undergoing painful cosmetic surgery. *Pain*. 2009;147:194-201
29. Zhang W, Chang YZ, Kan QC, et al. Association of human micro-opioid receptor gene polymorphism A118G with fentanyl analgesia consumption in chinese gynaecological patients. *Anaesthesia*. 2010;65:130-135
30. Kumar D, Chakraborty J, Das S. Epistatic effects between variants of kappa-opioid receptor gene and A118G of mu-opioid receptor gene increase susceptibility to addiction in indian population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;36:225-230
31. Dlugos AM, Hamidovic A, Hodgkinson C, et al. OPRM1 gene variants modulate amphetamine-induced euphoria in humans. *Genes Brain Behav*. 2011;10:199-209
32. Du Y, Wan YJ. The interaction of reward genes with environmental factors in contribution to alcoholism in mexican americans. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33:2103-2112

33. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol.* 2010;22:187-192
34. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:177-182
35. Domino EF, Evans CL, Ni L, Guthrie SK, Koeppe RA, Zubieta JK. Tobacco smoking produces greater striatal dopamine release in G-allele carriers with mu opioid receptor A118G polymorphism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;38:236-240
36. Arias A, Feinn R, Kranzler HR. Association of an Asn40Asp (A118G) polymorphism in the mu-opioid receptor gene with substance dependence: A meta-analysis. *Drug Alcohol Depend.* 2006;83:262-268
37. Mague SD, Blendy JA. OPRM1 SNP (A118G): Involvement in disease development, treatment response, and animal models. *Drug Alcohol Depend.* 2010;108:172-182
38. Kroslak T, Laforge KS, Gianotti RJ, Ho A, Nielsen DA, Kreek MJ. The single nucleotide polymorphism A118G alters functional properties of the human mu opioid receptor. *J Neurochem.* 2007;103:77-87
39. Margas W, Zubkoff I, Schuler HG, Janicki PK, Ruiz-Velasco V. Modulation of Ca²⁺ channels by heterologously expressed wild-type and mutant human micro-opioid receptors (hMORs) containing the A118G single-nucleotide polymorphism. *J Neurophysiol.* 2007;97:1058-1067
40. Zhang Y, Wang D, Johnson AD, Papp AC, Sadee W. Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. *J Biol Chem.* 2005;280:32618-32624
41. Chou WY, Yang LC, Lu HF, et al. Association of mu-opioid receptor gene polymorphism (A118G) with variations in morphine consumption for analgesia after total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006;50:787-792
42. Sia AT, Lim Y, Lim EC, et al. A118G single nucleotide polymorphism of human mu-opioid receptor gene influences pain perception and patient-controlled

intravenous morphine consumption after intrathecal morphine for postcesarean analgesia. *Anesthesiology*. 2008;109:520-526

43. Reyes-Gibby CC, Shete S, Rakvag T, et al. Exploring joint effects of genes and the clinical efficacy of morphine for cancer pain: OPRM1 and COMT gene. *Pain*. 2007;130:25-30

Table 1. Primers utilized in qPCR and sequencing reactions

Primer ID	Sequence	Use
ForwA	5' - GTCAACTTGTCCCACTTAGATGGAA - 3'	Detecting A variant
ForwG	5' - GTCAACTTGTCCCACTTAGATGGAG - 3'	Detecting G variant
ForwS	5' - GAAAAGTCTCGGTGCTCCTG - 3'	Sequencing
Rev	5' - AGCCTTGGGAGTTAGGTGTCTC - 3'	Common to all reactions

Table 2. Allele and genotype distribution according to self-identified race

	White	Brown	Black	Amerindian	Total
Alleles					
A	163 (83.2)	119 (83.8)	53 (88.3)	1 (50)	336 (84)
G	33 (16.8)	23 (16.2)	7 (11.7)	1 (50)	64 (16)
Genotypes					
AA	70 (71.4)	53 (74.6)	23 (76.7)	0	146 (73)
AG	23 (23.5)	13 (18.3)	7 (23.3)	1 (100)	44 (22)
GG	5 (5.1)	5 (7)	0	0	10 (5)
HWE* <i>P</i> value	0.10	0.006	0.47	-	0.01

Values are number (percentage)

* HWE - Hardy-Weinberg equilibrium

Table 3. Characteristics of smokers when compared according to the presence of the G allele

	Homozygous A	G allele present*	P value
Gender, N (%)	Women, 11 (21.2)	Women, 8 (44.4)	0.07
	Men, 41 (78.8)	Men, 10 (55.6)	
Age, years (SD)	53.5 (\pm 14.5)	56.7 (\pm 11)	0.40
Race, N (%)	White, 25 (48.1)	White, 10 (55.6)	0.84
	Black, 8 (15.4)	Black, 2 (11.1)	
	Brown, 19 (36.5)	Brown, 6 (33.3)	
Tobacco exposure, pack-years (SD)	21.5 (\pm 10.8)	28.9 (\pm 12.5)	0.02

*Among the smokers with the 118G allele, three were homozygous.

Table 4. Frequency of the G allele in different regions of the world

Region	Country	Ethnicity	Author (year)	<i>N</i>	G allele frequency* (%)	Reference
Europe						
	Italy	Caucasian	Troisi (2011)	214	13.8	23
	Germany	Caucasian	Franke (2001)	365	12.1	24
	Norway	Caucasian	Klepstad (2004)	207	10.4	8
	Finland	Caucasian	Bergen (1997)	184	11.1	25
Asia						
	Israel	Not described	Ginosar (2009)	99	15.2	26
	Korea	Not described	Kim (2004)	140	31.1	27
	Japan	Not described	Fukuda (2009)	280	43.75	28
	China	Han	Zhang (2010)	174	31.3	29
	India	Not described	Kumar (2012)	200	17.7	30
Americas						
	USA	Caucasian	Dlugos (2011)	161	12.4	31
	USA	Latin-american	Du (2009)	338	23.7	32

*In reports with case-control design, the displayed allele frequency corresponds to that of controls.

ANEXO C - PARECERES DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 061/2006

Título: Avaliação da influência do polimorfismo do códon 16 do receptor Beta-2 adrenérgico na incidência de hipotensão e uso de efedrina em grávidas submetidas à anestesia subaracnóide

Pesquisador responsável: Edno Magalhães

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

Data de entrada: 21/09/2006

Proposição do(a) relator(a)

(x) Aprovação

() Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 24/10/2006

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 31/01/2007

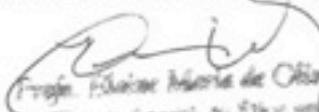
PARECER

Com base nas Resoluções CNS/MS N.º 196/1996 e CSN/MS N.º 340/2004, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 31/01/2007, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;

2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 16 de fevereiro de 2007.


 Sérgio Falcão Moreira de Oliveira Alencar
 Diretor do Comitê de Ética em Pesquisa
 Faculdade de Medicina - UnB


 UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
 FACULDADE DE MEDICINA
 Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 087/2011.

Título: "Avaliação da prevalência polimorfismo A118G do receptor Opióide Um em pacientes cirúrgicos do Brasil".

Pesquisador Responsável: Maurício Daher Andrade Gomes.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 09/12/2011.

Parecer do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 13/12/2011.

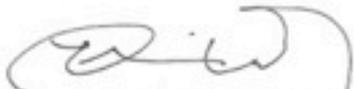
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 14/12/2011.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 14/12/2011, conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para 20 de junho de 2012.

Brasília, 16 de Dezembro de 2011.


 Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 Faculdade de Medicina-UNB

ANEXO D - MODELO DO QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PACIENTES DO PROJETO 2



Avaliação da Prevalência do Polimorfismo A118G Dados Demográficos

Identificação		
Nome <input style="width: 90%;" type="text"/>	Registro HUB <input style="width: 80%;" type="text"/>	Sexo <input type="radio"/> Masculino <input type="radio"/> Feminino
Morador do Distrito Federal? <input type="text" value="v"/>	Cidade de Residência <input style="width: 90%;" type="text"/>	
Nascido no Brasil? <input type="text" value="v"/>	Data de Nascimento <input style="width: 60%;" type="text" value="- -"/>	Pais e avós nascidos no Brasil? <input type="text" value="v"/>
Anos de educação <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 - 4 <input type="radio"/> 5 - 9 <input type="radio"/> 10 ou mais	Estado civil <input type="radio"/> Casado <input type="radio"/> Solteiro <input type="radio"/> Separado <input type="radio"/> Viúvo	Com qual raça se identifica? <input type="radio"/> Branco <input type="radio"/> Negro <input type="radio"/> Moreno <input type="radio"/> Índio <input type="radio"/> Oriental
Tabagista? <input type="text" value="v"/>	Carga tabágica (maços/ano) <input style="width: 60%;" type="text"/>	

Cirurgia	
Qual é a especialidade cirúrgica responsável? <input style="width: 90%;" type="text"/>	Qual é a cirurgia planejada? <input style="width: 90%;" type="text"/>

Genética		
Data da extração de DNA <input style="width: 60%;" type="text" value="- -"/>	Genótipo A118G <input type="radio"/> 118 A <input type="radio"/> 118 G	Confirmado por sequenciamento? <input type="text" value="v"/>
Data da genotipagem <input style="width: 60%;" type="text" value="- -"/>		

Coleta dos dados	
Data da coleta dos dados <input style="width: 60%;" type="text" value="- -"/>	Responsável pela coleta <input style="width: 90%;" type="text" value="v"/>

**ANEXO E - CLASSIFICAÇÃO DE ESTADO FÍSICO SEGUNDO A SOCIEDADE
AMERICANA DE ANESTESIOLOGISTAS
(AMERICAN SOCIETY OF ANESTHESIOLOGISTS - ASA)**

Estado Físico	Descrição
ASA1 (P1)	Paciente sadio sem alterações orgânicas
ASA2 (P2)	Paciente com alteração sistêmica leve ou moderada causada pela doença cirúrgica ou doença sistêmica
ASA3 (P3)	Paciente com alteração sistêmica grave de qualquer causa com limitação funcional
ASA4 (P4)	Paciente com alteração sistêmica grave que representa risco de vida
ASA5 (P5)	Paciente moribundo que não é esperado sobreviver sem cirurgia
ASA6 (P6)	Paciente doador de órgãos
E	Condição de emergência