

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
UFCSPA
CURSO DE BIOMEDICINA

Bianca Rodrigues Martinello

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A IMPLEMENTAÇÃO DO
SEQUENCIAMENTO DO FARMACOGENE *CYP2D6***

Porto Alegre
2026

Bianca Rodrigues Martinello

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A IMPLEMENTAÇÃO DO
SEQUENCIAMENTO DO FARMACOGENE *CYP2D6***

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado à Universidade
Federal de Ciências da Saúde de
Porto Alegre, como requisito parcial
para obtenção do grau de
bacharelado.

Orientadora: Profa. Dra. Júlia
Pasqualini Genro

Coorientadora: Profa. Dra.
Raíssa dos Santos Nunes.

Porto Alegre

2026

AGRADECIMENTOS E DEDICATÓRIAS

Dedico esse trabalho a todos aqueles que estiveram presentes durante essa trajetória tão importante para mim. Aos meus pais, Andressa e Isac, por sempre priorizarem a minha educação e nunca medirem esforços para criar uma mulher corajosa o suficiente para perseguir seus sonhos. Ao meu irmão, Gianluca, e meu padrasto, Vinicius, que me ensinam diariamente sobre cuidado e carinho. Meus sinceros agradecimentos aos demais familiares e amigos que formam uma rede de apoio indispensável para eu ter chegado até aqui e que fomentam a minha vontade de almejar por mais. Ao meu amor, Ritiele Larissa, que toma conta dos meus pensamentos e, cuja presença, escolho religiosamente.

Não poderia deixar de estender as dedicatórias à minha madrinha, Sandra Roberta Rodrigues Mores. Bióloga de formação e professora de ciências durante meus anos escolares, representa uma das principais inspirações para meu direcionamento à área das ciências biomédicas e biológicas. “Dinda Sandra” me ensinou de tudo e muito mais, sendo símbolo de inteligência emocional, força feminina e independência.

Ademais, gostaria de agradecer à minha orientadora, Júlia Genro, que foi a responsável por despertar a paixão pela pesquisa e alimentar ainda mais o sonho de uma acadêmica recém-chegada à universidade de se tornar pesquisadora e contribuir para a ciência brasileira. Assim como, agradeço à minha coorientadora, Raíssa Nunes, que, com seus ensinamentos, dedicação e cuidado, alavancou minha experiência no mundo acadêmico e tornou essa caminhada muito mais leve e prazerosa.

Por fim, expresso minha eterna gratidão à ciência brasileira e às universidades públicas espalhadas pelo país que, mesmo diante de tantas adversidades, representam a resistência da educação, inovação e transformação social diante de um mundo cada vez mais caótico. Reconheço, com tremendo orgulho, o papel da educação pública na minha formação e espero reverberar esses valores ao longo da minha trajetória, assumindo o compromisso social de contribuir para o fortalecimento da educação, da ciência e da produção de conhecimento no Brasil.

RESUMO

A farmacogenômica investiga a influência da variabilidade genética na resposta a medicamentos, constituindo uma ferramenta fundamental para a implementação da medicina de precisão. Entre os farmacogenes de maior relevância clínica destaca-se o *CYP2D6*, responsável pela metabolização de aproximadamente 25% dos fármacos utilizados na prática clínica. Entretanto, sua elevada complexidade genética, caracterizada pela presença de múltiplas variantes de ponto, variações estruturais e alta homologia com pseudogenes adjacentes, representa um desafio para sua caracterização molecular por metodologias convencionais de genotipagem. Nesse contexto, tecnologias de sequenciamento por *long reads* surgem como alternativas promissoras para a análise abrangente desse gene. O presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar estratégias de preparo de bibliotecas genômicas para o sequenciamento do *CYP2D6* utilizando a plataforma MinION Oxford Nanopore. Foram avaliadas duas abordagens de enriquecimento da região alvo: clivagem direcionada por CRISPR-Cas9 baseada no protocolo nanopore Cas9-targeted sequencing (nCATS e amplificação por PCR Long-Range. Para a realização desta pesquisa, amostras provenientes do banco da Rede Nacional de Farmacogenética (REFARGEN) foram submetidas a etapas de triagem e purificação para seleção de DNA genômico com qualidade adequada. Os experimentos permitiram estabelecer e adaptar protocolos para ambas as estratégias de enriquecimento, bem como identificar etapas críticas relacionadas à amplificação de fragmentos de grande extensão, à purificação de DNA de alto peso molecular e à implementação da metodologia nCATS. Embora os resultados obtidos não tenham permitido a validação conclusiva das abordagens propostas, os dados gerados forneceram subsídios importantes para a otimização dos protocolos e para a futura implementação do sequenciamento do *CYP2D6* por long-reads. Os achados reforçam o potencial das tecnologias de sequenciamento de terceira geração para a caracterização de farmacogenes complexos e evidenciam a importância do desenvolvimento de metodologias adaptadas à diversidade genética da população brasileira.

Palavras-chave: Farmacogenômica; *CYP2D6*; Sequenciamento de Nova Geração.

ABSTRACT

Pharmacogenomics investigates the influence of genetic variability on drug response and constitutes a fundamental tool for the implementation of precision medicine. Among the most clinically relevant pharmacogenes is *CYP2D6*, which is responsible for the metabolism of approximately 25% of commonly prescribed drugs. However, its high genetic complexity, characterized by the presence of multiple single nucleotide variation, structural variants, and high homology with adjacent pseudogenes, poses significant challenges for molecular characterization using conventional genotyping methodologies. In this context, long-read sequencing technologies have emerged as promising alternatives for the comprehensive analysis of this gene. The present study aimed to develop and evaluate genomic library preparation strategies for *CYP2D6* sequencing using the MinION Oxford Nanopore platform. Two target-enrichment approaches were assessed: CRISPR-Cas9-mediated targeted cleavage based on the nanopore Cas9-targeted sequencing (nCATS) protocol and Long-Range PCR amplification. Initially, samples obtained from the Brazilian National Pharmacogenetics Network (REFARGEN) biobank underwent screening and purification procedures to select genomic DNA with adequate quality parameters. The experiments enabled the establishment and adaptation of protocols for both enrichment strategies, as well as the identification of critical steps related to long-fragment amplification, high-molecular-weight DNA purification, and implementation of the nCATS methodology. Although the results did not allow for the conclusive validation of the proposed approaches, the data generated provided important insights for protocol optimization and for the future implementation of *CYP2D6* long-read sequencing. The findings highlight the potential of third-generation sequencing technologies for the characterization of complex pharmacogenes and emphasize the importance of developing methodologies adapted to the genetic diversity of the Brazilian population.

Keywords: Pharmacogenomics; *CYP2D6*; Next-generation sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais farmacogenes e respectivos fármacos.....	15
Figura 2 – Representação das principais variantes estruturais do CYP2D6.....	18
Figura 3 – Representação esquemática do processo de purificação com beads magnéticas.....	28
Figura 4 – Eletroforese das amostras submetidas ao screening de qualidade do DNA. M: marcador de peso molecular de 1 kb.....	32
Figura 5 – Eletroforese para checagem da integridade das amostras purificadas. M: marcador de peso molecular de 1 kb.....	35
Figura 6 – Eletroforese após clivagem com Cas9 para sgRNAs 1_CYP2D6 e 2_CYP2D6. M: marcador de peso molecular de 1 kb.....	37
Figura 7 – Eletroforese após ajustes no protocolo de clivagem com Cas9. M: marcador de peso molecular de 1 kb.....	38
Figura 8 – Eletroforese longa com todas as amostras pós-clivagem. M: marcador de peso molecular de 1 kb.....	39
Figura 9 – Eletroforese com amplicons advindo da reação de 10 µL.....	40
Figura 10 – Eletroforese obtidos durante a padronização experimental. (A) Amplicons das amostras NE_39 e NO_110 após otimização das condições de PCR. (B) Avaliação da integridade dos amplicons após a etapa de purificação. M: marcador de peso molecular de 1 kb.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – RNAs guias desenhados para clivagem com Cas9.....	29
Tabela 2 – Oligonucleotídeos desenhados para PCR Long-Range.....	30
Tabela 3 – Amostras selecionadas para purificação e suas respectivas informações...	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AS - *Activity Score* (Escore de atividade)

bp - *Base pair* (Pares de base)

Cas9 - Caspase 9

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CNVs - *Copy Number Variations* (Variações do Número de Cópias)

CPIC - Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium

CRISPR - *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas)

CYP450 - Complexo citocromo p450

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

gDNA - *Genomic DNA* (DNA genômico)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IM - *Intermediate metabolizer* (Metabolizador intermediário)

INDELS - *Insertion and Deletion* (Inserção e Deleção)

kb - *Kilobases* (Quilopares de base)

MAF - *Minor Allele Frequency* (Frequência de alelo minoritário)

nCATS - *Nanopore Cas9-Targeted Sequencing*

NGS - *Next Generation Sequencing* (Sequenciamento de Nova Geração)

NM - *Normal metabolizer* (Metabolizador normal)

ONT - *Oxford Nanopore Technologies*

PAM - *Protospacer Adjacent Motif* (Motivo Adjacente Protoespaçador)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PharmCAT - Pharmacogenomics Annotation Tool

PharmGKB - Pharmacogenomics Knowledge Base

PharmVar - Pharmacogene Variation Consortium

PM - *Poor metabolizer* (Metabolizador pobre)

RAMs - Reações Adversas a Medicamentos

RNA - *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RNP - Partícula de ribonucleoproteína

REFARGEN - Rede Nacional de Farmacogenética

sgRNA - *Single-guide RNA* (RNA guia)

SNVs - *Single Nucleotide Variants* (Variantes de Nucleotídeo Único)

SPRI - *Solid Phase Reversible Immobilization*

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFCSPA - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

UM - *Ultrarapid metabolizer* (Metabolizador ultrarrápido)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Reações adversas a medicamentos e falhas terapêuticas.....	11
1.2 Farmacogenética e farmacogenômica.....	12
1.3 Enzimas CYP.....	13
1.3 Gene CYP2D6.....	14
1.3.1 Fenótipos metabolizadores para o CYP2D6.....	15
1.3.2 Variantes e alelos do CYP2D6.....	16
1.4 Metodologias de genotipagem do CYP2D6.....	20
1.4.1 Sequenciamento de nova geração e Oxford Nanopore.....	21
1.5 Tecnologia CRISPR/Cas9 para preparo de bibliotecas genômicas.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivos Gerais.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Delineamento da Pesquisa.....	27
4.2 Amostra.....	27
4.3 Procedimento.....	27
4.3.1 Preparo das amostras para biologia molecular.....	27
4.3.2 Estratégias de enriquecimento de regiões-alvo para o preparo de bibliotecas genômicas.....	28
4.3.2.1 Clivagem com CRISPR-Cas9.....	28
4.3.2.2 PCR Long-Range.....	30
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Screening de amostras.....	32
5.2 Purificação por beads.....	34
5.3 Clivagem por Cas9.....	35
5.3.1 Primeira rodada experimental.....	36
5.3.2 Segunda rodada experimental.....	37
5.3.3 Terceira rodada experimental.....	38
5.3.2 Amplificação por PCR Long-Range.....	39
6. DISCUSSÃO.....	42
6.1 Protocolo de purificação com beads.....	42
6.2 Clivagem com Cas9.....	43
6.3 PCR Long-Range.....	46
6.4 Considerações gerais e perspectivas futuras.....	47
7. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS.....	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Reações adversas a medicamentos e falhas terapêuticas

As Reações Adversas a Medicamentos (RAMs), ou *adverse drug reactions* (ADRs) do inglês, podem ser definidas como um efeito nocivo e não intencional gerado a partir de um agente farmacológico. Esses eventos representam um grande obstáculo no contexto clínico para os sistemas de saúde em escala global. Dados epidemiológicos previram que 5,3% das admissões hospitalares mundiais estão associadas a RAMs, sendo que 25% desses pacientes apresentam risco de morte em decorrência das complicações associadas (Kongkaew; Noyce; Ashcroft, 2008).

Outro fator a ser considerado é a ineficácia do tratamento, em que o fármaco não promove a resposta desejada ou não há a correta aderência do paciente à farmacoterapia. É estimado que, no cenário brasileiro, 59% dos pacientes apresentam ao menos um evento de falha terapêutica relacionada a medicamentos após uma consulta médica, quando fazem uso de pelo menos um fármaco (de Freitas *et al.*, 2018).

Nesse contexto, tais problemas relacionados a medicamentos podem não apenas comprometer o bem-estar dos pacientes, mas também impor um expressivo impacto médico e financeiro ao sistema de saúde (Awada; Zgheib, 2014). O custo global associado a reações adversas a medicamentos foi estimado em 42 bilhões de dólares gastos por ano (WHO, 2023). No panorama brasileiro, anualmente o valor para subsidiar as despesas hospitalares necessárias para o manejo dessas condições representa mais de 20% do orçamento anual direcionado à saúde pública no Brasil, configurando um relevante ônus econômico e social para o Sistema Público de Saúde (SUS) (de Freitas *et al.*, 2018).

Em um cenário em que falhas na eficácia e eventos adversos considerados evitáveis se aproximam da metade dos casos e 25% destes são classificados como graves ou potencialmente fatais, torna-se importante considerar a implementação de estratégias voltadas para intervenções clínicas eficazes, com o objetivo de minimizar a ocorrência desses eventos e alcançar o sucesso terapêutico (Hakkarainen *et al.*, 2012; WHO, 2023).

1.2 Farmacogenética e farmacogenômica

Muitos fatores já são conhecidos por influenciarem o risco de problemas de saúde relacionados a medicamentos, como idade, sexo, comorbidades, fármacos prescritos concomitantemente e a dose utilizada. No entanto, observa-se considerável variabilidade interindividual na resposta aos medicamentos que não é completamente justificada por fatores clínicos convencionais (Marques-Garcia; Martinez-Bravo, 2026). Dessa forma, a variação genética representa um dos fatores determinantes dessa heterogeneidade, podendo exercer significativa influência na eficácia e na segurança do tratamento medicamentoso (Becquemont, 2009).

A hipótese de que fatores hereditários poderiam contribuir para essas diferenças individuais foi inicialmente proposta por Arno Motulsky em 1957, e poucos anos depois, em 1959, Friedrich Vogel cunhou o termo “farmacogenética”, consolidando as bases conceituais da área (Müller; Rizhanovsky, 2020). Desde então, os campos de estudo da farmacogenética e da farmacogenômica evoluíram de forma expressiva, buscando compreender os diferentes perfis de resposta farmacológica e fornecer suporte científico para estratégias terapêuticas individualizadas (Friedrich *et al.*, 2014). Após décadas de pesquisa, variantes capazes de influenciar a resposta a diversos medicamentos amplamente utilizados já foram identificadas, possibilitando avanços na incorporação da farmacogenética como ramo da medicina de precisão na prática clínica (Relling; Evans, 2015).

Diversas bases de dados especializadas desempenham um papel fundamental na consolidação e disseminação do conhecimento em farmacogenética. Nesse contexto, destaca-se o ClinPGx, plataforma lançada em 2024 e liderada pela Universidade de Stanford e pelo St. Jude Children's Research Hospital, que integrou os recursos anteriormente disponíveis de forma independente pelo PharmGKB (Thorn; Klein; Altman, 2013), pelo Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) e pelo Pharmacogenomics Clinical Annotation Tool (PharmCAT) em um único recurso centralizado. A plataforma reúne dados sobre interações gene-fármaco, vias de biotransformação, farmacocinética e dinâmica e marcadores farmacogenéticos, integrando diretrizes clínicas baseadas em evidências e ferramentas para interpretação de variantes farmacogenéticas. Complementarmente aos demais recursos citados, o repositório Pharmacogene Variation Consortium (PharmVar) apresenta um panorama com dados clínicos, variantes genéticas e

diretrizes de implementação em diferentes contextos populacionais (Chang *et al.*, 2021).

Diante da vasta quantidade de dados já existentes que corroboram a crescente ascensão da área, torna-se necessário priorizar as informações com maior evidência de impacto clínico. Nesse sentido, a plataforma ClinPGX organiza os farmacogenes e suas variantes a partir de anotações clínicas aplicadas a distintos fármacos, atribuindo níveis de evidência determinados por estudos replicados e diretrizes consolidadas, incluindo orientações de prescrição provenientes de bulas aprovadas pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Whirl-Carrillo *et al.*, 2021). A partir da base científica promovida pelo banco de dados da plataforma, alguns farmacogenes se destacam por apresentar variantes com impacto clínico bem estabelecido e alta prevalência entre os fármacos mais prescritos, tornando-se alvos prioritários para a implementação da farmacogenética na medicina moderna (Awada; Zgheib, 2014). Dentre os genes estudados, evidenciam-se os que codificam as enzimas da família citocromo P450 (CYP450), responsáveis pelo metabolismo de grande parte dos fármacos de uso clínico. O CPIC, consórcio internacional responsável por reunir evidências e elaborar recomendações clínicas, atualmente disponibiliza 78 diretrizes específicas para ajustes terapêuticos baseados em informações genéticas, sendo cerca de 70% relacionadas aos genes do sistema CYP450 (CPIC, 2026).

1.3 Enzimas CYP

A eficácia de muitos fármacos depende da concentração plasmática em equilíbrio, que por sua vez é influenciada por fatores cinéticos, como absorção, distribuição, metabolização e excreção, e dinâmicos, como a ligação ao sítio de ação (Lin, 2007). Diferenças genéticas em nível molecular que afetam enzimas metabolizadoras, transportadores e receptores são, portanto, determinantes centrais da variabilidade observada na resposta terapêutica entre os indivíduos (Suriya *et al.*, 2026). Nesse contexto, destacam-se as enzimas CYP450, responsáveis pelas reações de metabolização de fase I de mais de 80% dos fármacos clinicamente utilizados, convertendo-os em metabólitos mais hidrossolúveis e facilitando sua excreção. A superfamília é composta por 57 genes funcionais e 58 pseudogenes, organizados em 18 famílias e 43 subfamílias, sendo as famílias CYP1, CYP2 e

CYP3 as principais responsáveis pelo metabolismo oxidativo da maioria dos fármacos (Zhang *et al.*, 2024). Os genes codificadores dessas enzimas estão dentre os mais relevantes para a implementação de dados farmacogenômicos na prática clínica, uma vez que as variações genéticas que afetam essas vias podem alterar significativamente tanto a dose necessária para alcançar o efeito terapêutico quanto o risco de reações adversas (Eissenberg; Aurora, 2019; Zanger; Schwab, 2013).

A superfamília CYP engloba genes altamente polimórficos que apresentam uma relevante quantidade de variantes, incluindo variantes de nucleotídeo único (SNVs), variações do número de cópias (CNVs) e inserções e deleções (INDELs). Dada tamanha variabilidade, buscou-se padronizar e implementar uma nomenclatura dos alelos para facilitar a leitura dos haplótipos, sendo designados por “alelos estrela” (*) (Zhou; Ingelman-Sundberg; Lauschke, 2017). Sendo assim, o PharmVar atua atualmente como referência central para a nomenclatura dos alelos estrela de 15 farmacogenes principais, incluindo diversos genes CYP, com definições regularmente atualizadas à medida que novos alelos são identificados e validados funcionalmente (van der Maas *et al.*, 2025). Entre os genes de maior relevância clínica, destacam-se *CYP2C9*, *CYP2C19* e *CYP2D6*, cada uma apresentando variantes genéticas capazes de alterar significativamente as taxas de metabolização dos fármacos (Petrović; Pešić; Lauschke, 2020).

1.3 Gene *CYP2D6*

A enzima codificada pelo gene *CYP2D6*, mesmo representando apenas 2 a 4% do conteúdo total de CYP hepático, é responsável pelo metabolismo de aproximadamente 20% dos medicamentos mais prescritos atualmente, incluindo opióides, antidepressivos, betabloqueadores e antineoplásicos (Figura 1) (Jarvis; Peter; Shaman, 2019). Muitas das variações genéticas nesse gene influenciam diretamente a atividade enzimática, que pode estar aumentada, reduzida ou completamente ausente, determinando a variabilidade interindividual na resposta aos fármacos (Qiao *et al.*, 2019).

Localizado na região 22q13.2 do cromossomo 22 e com extensão de aproximadamente 4,4 kilobases (kb), o *CYP2D6* integra um *cluster* gênico com dois pseudogenes homólogos, *CYP2D7* e *CYP2D8*, o que contribui significativamente

para a complexidade de sua estrutura e genotipagem (Carvalho Henriques *et al.*, 2021).

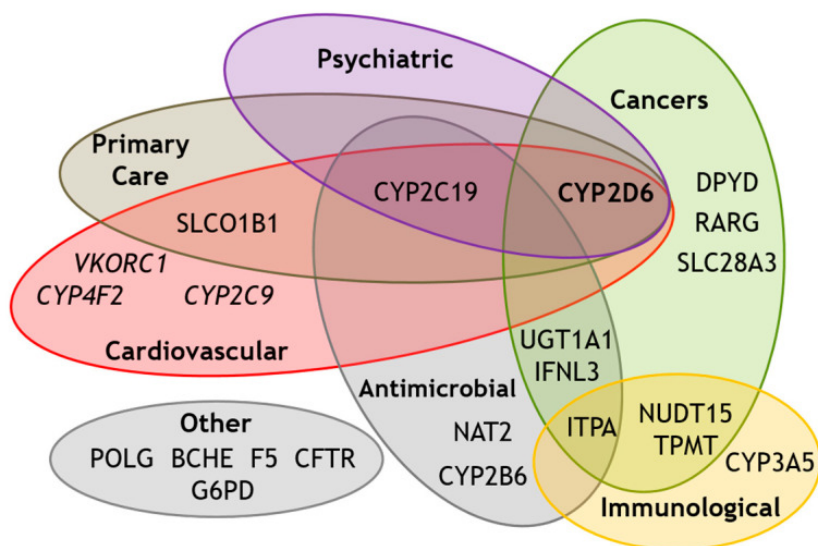


Figura 1 – Principais farmacogenes e respectivos fármacos.

Fonte: Taylor et al., 2020.

1.3.1 Fenótipos metabolizadores para o CYP2D6

Cada indivíduo apresenta dois haplótipos (também denominados de alelos) para o gene *CYP2D6*, um proveniente de cada cromossomo homólogo, formando em conjunto o seu diplótipo. A caracterização desses haplótipos permite a inferência do fenótipo metabolizador, classificação utilizada pela farmacogenética para estimar a capacidade funcional da enzima CYP2D6 e orientar a interpretação clínica das variações genéticas identificadas. Os indivíduos são categorizados em quatro grupos: metabolizadores pobres (PM), metabolizadores intermediários (IM), metabolizadores normais (NM) – anteriormente chamados de "extensos" – e metabolizadores ultrarrápidos (UM) (Nofziger *et al.*, 2020; Caudle *et al.*, 2017).

Para simplificar a predição de fenótipo para o *CYP2D6*, foi desenvolvido o modelo de Activity Score (AS), publicado pela primeira vez em 2008 e amplamente adotado na área desde então, inclusive presente em *guidelines* de alta evidência do CPIC (Gaedigk, A. *et al.*, 2008). Nesse sistema, cada alelo recebe um valor que

reflete sua função enzimática: 0 para alelos sem função, 0,25 ou 0,5 para função reduzida, 1 para função normal e 2 ou 3 para função aumentada. Assim, o AS do diplótipo corresponde à soma dos valores atribuídos a cada alelo. A tabela de diplótipos-fenótipos disponibilizada pela ClinPGx serve como referência para o cálculo do AS de cada genótipo (Nofziger *et al.*, 2020; ClinPGx, 2026). Essa abordagem é útil e é periodicamente atualizada à medida que evidências sobre a função metabolizadora de haplótipos individuais se acumulam.

Com o sistema de classificação fenotípica consolidado, torna-se possível estimar a prevalência de cada grupo metabolizador nas diferentes populações. Uma meta-análise inferiu que cerca de 36,4% da população mundial apresenta um fenótipo não-normal (PM, IM ou UM) para o *CYP2D6*, achado que indica que uma expressiva parcela de indivíduos apresentem risco aumentado de falha terapêutica ou reações adversas quando expostos a fármacos metabolizados por essa enzima. Além disso, é importante ressaltar que as frequências tendem a se distinguir entre diferentes populações e grupos étnicos (Koopmans *et al.*, 2021).

Os *guidelines* internacionais que implementam as informações farmacogenéticas na prática clínica – como do CPIC ou do Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) – utilizam essas categorias de metabolizador para fornecer aos profissionais da saúde recomendações específicas por fármaco, com o objetivo de evitar doses ou medicamentos que se espera serem ineficazes ou prejudiciais em pacientes com um determinado status de metabolizador do *CYP2D6* (Taylor *et al.*, 2020). Dessa forma, a correta inferência fenotípica a partir do genótipo é, portanto, crucial para a segurança e eficácia do tratamento, tarefa que, contudo, permanece desafiadora dada a expressiva complexidade da arquitetura genética do gene *CYP2D6* (Hicks; Swen; Gaedigk, 2014).

1.3.2 Variantes e alelos do *CYP2D6*

Com 186 alelos-estrela e mais de 400 sub-alelos catalogados pelo PharmVar, o *CYP2D6* configura entre os farmacogenes mais polimórficos conhecidos. As variações genéticas que determinam os haplótipos abrangem desde variantes pontuais, como SNVs e INDELs, até alterações estruturais complexas, incluindo deleções do gene inteiro, duplicações, multiplicações e rearranjos com os pseudogenes adjacentes (PharmVar, 2026).

A maioria das variantes identificadas no *CYP2D6* consiste em SNVs, que englobam tanto polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, com frequência do alelo menor $\geq 1\%$) quanto substituições nucleotídicas mais raras (MAF $< 1\%$). Essas variantes podem ocorrer em regiões não codificantes, como promotores e íntrons, com efeitos variáveis sobre a expressão proteica, ou em regiões codificantes, resultando em alterações sinônimas ou não sinônimas, incluindo mutações *missense* e *nonsense*. INDELs em regiões intrônicas geralmente têm consequências limitadas, embora possam interferir na ligação de fatores de transcrição, uma vez que podem alterar a leitura de códons e gerar mutações *frameshift* com impacto funcional significativo. Além dessas formas de variação de menor escala, o *CYP2D6* se distingue dos demais farmacogenes CYP pela extensão e complexidade das variantes estruturais que podem ocorrer em seu *locus* (Taylor *et al.*, 2020; Nofziger *et al.*, 2020).

Os pseudogenes *CYP2D7* e *CYP2D8*, que integram o *cluster* gênico com o *CYP2D6*, estão localizados a 9 e 19 kb a montante do *CYP2D6* e compartilham um total de 94,2% e 89,1% de similaridade, respectivamente. Particularmente, os genes *CYP2D6* e *CYP2D7* compartilham um elemento *downstream* de 0,6 kb de comprimento, além de sequências repetitivas quase idênticas nomeadas de REP6 e REP7 (Turner; Nofziger; *et al.*, 2023). A presença desses elementos similares favorece a recombinação homóloga não-alélica, resultando na formação de variantes estruturais, incluindo duplicações, multiplicações, deleções e alelos híbridos *CYP2D6-CYP2D7* em diferentes configurações (Figura 2). Tal complexidade estrutural representa um dos principais desafios metodológicos para a genotipagem precisa desse farmacogene. Desse modo, a caracterização incorreta dessas variantes estruturais pode impactar diretamente na determinação alélica e, conseqüentemente, nas recomendações de dosagem (Kane, 2025; Yang *et al.*, 2017).

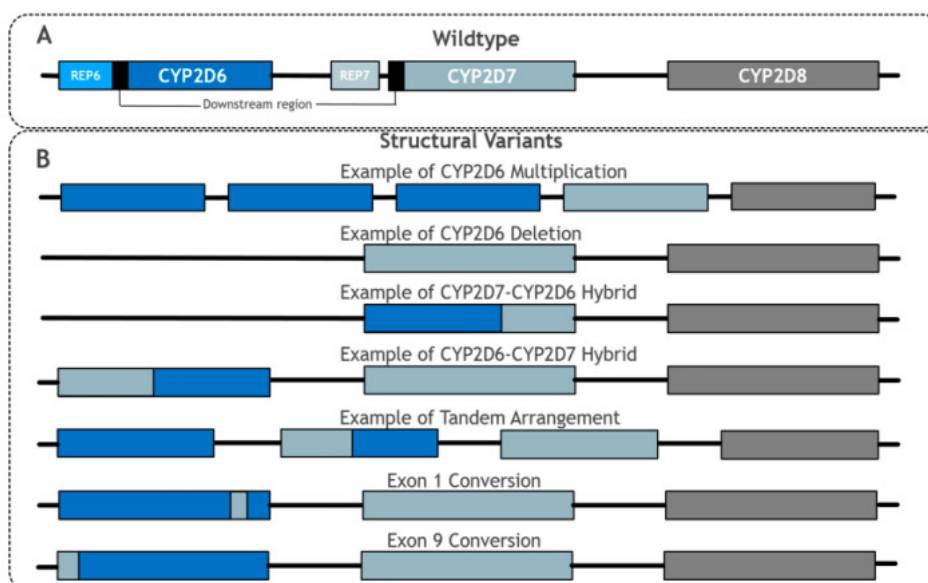


Figura 2 – Representação das principais variantes estruturais do *CYP2D6*.

Fonte: Taylor et al., 2020.

Ademais, outro tipo de variantes estruturais são as CNVs, que representam, para um genoma diplóide, a presença de menos ou mais de duas cópias de um gene, englobando deleções do gene inteiro, duplicações e multiplicações. O impacto clínico causado por esse tipo de variação depende diretamente do haplótipo. Por exemplo, duplicações e multiplicações de alelos funcionais, como o *1 e o *2, aumentam a dose de enzima disponível e resultam em metabolização rápida, enquanto a duplicação de alelos não funcionais, como o *4, não confere aumento de atividade e pode ser erroneamente interpretada sem o adequado rastreamento do alelo duplicado (Jarvis; Peter; Shaman, 2019).

Um estudo que analisou mais de 100 mil indivíduos de diferentes etnias estimou que, dentre os alelos que correspondem às variações de duplicações e multiplicações, 67% foram classificados como sem função, 6% como de função reduzida e apenas 27% como de função normal (Del Tredici *et al.*, 2018). Esses dados indicam que esse tipo de variante estrutural, para a maioria dos casos, tende a não exercer impacto significativo sobre o fenótipo metabolizador do indivíduo. Entretanto, quando o aumento do número de cópias envolve um alelo funcional, o resultado é a classificação do paciente como metabolizador ultrarrápido (UM), o que representa um risco clínico relevante caso não seja detectado pelos métodos de genotipagem. Dependendo do fármaco em questão, essa condição pode levar tanto à falha terapêutica, pela metabolização excessivamente rápida e consequente

redução das concentrações plasmáticas do medicamento, quanto à toxicidade, em casos de pró-fármacos (Hicks, 2015).

A devida identificação das variantes presentes em um dos cromossomos homólogos permite a determinação de um alelo. Cada alelo pode estar associado a diferentes níveis de atividade enzimática, sendo classificado como de função normal, reduzida, ausente ou aumentada. O *CYP2D6*1* representa o alelo de referência, correspondendo ao tipo selvagem com função enzimática normal. Na sua presença e de outro alelo de função normal, é definido o fenótipo NM (Kane, 2025). O alelo *CYP2D6*2*, caracterizado por dois SNVs de tipo *missense*, também é classificado como alelo de função normal. Quando os alelos estão presentes em múltiplas cópias, por exemplo em **1xN* e **2xN*, estão associados ao aumento da função enzimática e fenótipo UM (Ray *et al.*, 2019; Nofziger *et al.*, 2020).

Quanto a alelos não funcionais, aqueles de maior relevância clínica global são *CYP2D6*4* e **5*. O *CYP2D6*4* é caracterizado por um defeito de *splicing* que apresenta como produto final uma proteína não funcional, enquanto *CYP2D6*5* corresponde à deleção completa do gene. Em adição, cita-se os alelos de função reduzida: o *CYP2D6*10*, mais frequentemente encontrado em populações do Leste Asiático, e o *CYP2D6*17* que apresenta alta prevalência apenas em populações africanas, sendo raramente encontrado em outros grupos étnicos. (PharmVar, 2026; Nofziger *et al.*, 2020; Jarvis; Peter; Shaman, 2019).

Não obstante, a complexidade alélica apresentada pelo *CYP2D6* não se restringe apenas à sua diversidade estrutural. As frequências alélicas variam consideravelmente entre as populações, e a expressão polimórfica do *CYP2D6* constitui o principal fator individual responsável pela variabilidade de atividade enzimática e, conseqüentemente, resposta a medicamentos entre esses distintos grupos étnicos. Enquanto determinadas variantes são observadas em múltiplas populações com frequências relativamente semelhantes, outras apresentam distribuição restrita ou frequências marcadamente distintas entre grupos populacionais, refletindo a complexa história evolutiva e demográfica desse gene (Gaedigk, Andrea *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2020).

Como consequência dessa heterogeneidade genética, a frequência dos diferentes fenótipos metabolizadores também varia substancialmente entre populações. Estimativas baseadas em frequências alélicas demonstram que a proporção de metabolizadores pobres pode variar de 0,4% a 5,4%, enquanto a

frequência de metabolizadores ultra rápidos pode atingir aproximadamente 21% em determinados grupos populacionais (Gaedigk, Andrea *et al.*, 2017). Essas diferenças exercem impacto direto sobre a resposta farmacológica e o risco de eventos adversos associados a medicamentos metabolizados pela enzima CYP2D6.

Ademais, ressalta-se a importante lacuna decorrente da sub-representação de determinados grupos populacionais, especialmente populações africanas e latino-americanas, em estudos de larga escala utilizados para estimar frequências alélicas. Isso sugere que parte da variabilidade apresentada pelo gene *CYP2D6* nessas populações permanece insuficientemente caracterizada, havendo a possibilidade da existência de variantes ainda não identificadas ou adequadamente descritas (Rodrigues-Soares *et al.*, 2020). Diante disso, recorrer à métodos de genotipagem capazes de capturar com maior precisão a complexidade genética desse gene torna-se indispensável para a prática clínica, uma vez que o desempenho de metodologias convencionalmente empregadas para a caracterização do *CYP2D6*, bem como a interpretação dos resultados gerados, podem variar significativamente entre populações. Assim, a escolha de abordagens adequadas constitui um aspecto fundamental para a determinação acurada dos genótipos e a consequente predição dos fenótipos metabolizadores.

1.4 Metodologias de genotipagem do *CYP2D6*

Atualmente, diferentes métodos já foram descritos e protocolados para identificar os genótipos do *CYP2D6*, como reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, sequenciamento Sanger e plataformas baseadas em *microarrays*. Embora amplamente utilizadas, essas abordagens são, em geral, direcionadas à identificação de variantes previamente estabelecidas e incluídas em seus respectivos painéis de análise (Liau *et al.*, 2019). Os painéis de SNVs destacam-se como metodologia mais frequentemente empregada na rotina clínica devido ao seu baixo custo, elevada reprodutibilidade e facilidade de implementação. Todavia, apresentam limitações importantes para a caracterização completa do *CYP2D6*, uma vez que não são capazes de detectar adequadamente variantes raras, novas variantes ou alterações estruturais complexas, como deleções, duplicações e genes híbridos *CYP2D6-CYP2D7* (van der Lee *et al.*, 2020). Considerando essas limitações, metodologias que apresentam maior robustez e abrangência para a

caracterização desse *locus* de tamanha complexidade genética tornam-se atrativas para a prática clínica.

1.4.1 Sequenciamento de nova geração e Oxford Nanopore

Com o advento de metodologias mais robustas de sequenciamento, tornou-se possível a obtenção de dados em larga escala em um menor tempo e custo relativo. As primeiras plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) surgiram há duas décadas e revolucionaram a genômica. Esse desenvolvimento permitiu a criação de diferentes plataformas com abordagens que permitem sequenciar milhões de pequenos fragmentos ou mesmo moléculas mais longas (Behjati; Tarpey, 2013).

A tecnologia de sequenciamento por *long-reads* – também conhecida por sequenciamento de terceira geração – surge para suprir a demanda de sequenciar genomas de alta complexidade, que incluem longas sequências de elementos repetitivos, CNVs e variantes estruturais. Essa abordagem permite cobrir com alta resolução regiões complexas ou repetitivas em uma única e contínua leitura de muitos kilobases, descartando a possibilidade de ambiguidade de posição ou tamanho da região genômica, obstáculo geralmente encontrado nos métodos de *short-reads* (Goodwin; McPherson; McCombie, 2016; Satam *et al.*, 2023).

Nesse âmbito, propõe-se a utilização da plataforma MinION de tecnologia Oxford Nanopore (ONT). Esse sequenciador foi comercialmente lançado em 2014 pela ONT e, devido à sua portabilidade, baixo custo de equipamento e rapidez na geração de resultados, se mostrou particularmente atrativo para a aplicação na área clínica de diagnóstico (Lu; Giordano; Ning, 2016). Considerando esses fatores, a tecnologia de Oxford Nanopore demonstra elevado potencial para aplicação no contexto da genotipagem e determinação fenotípica de regiões genômicas complexas como o gene *CYP2D6*, representando uma promissora ferramenta para a farmacogenética.

O sequenciamento por nanoporos tem seu princípio a partir da passagem das moléculas de DNA pelos pequenos bioporos dispostos na *flowcell*, em que um sensor acoplado detecta a mudança na corrente iônica causada pela alteração do nucleotídeo da sequência que ocupa o poro. Essa movimentação é comandada por uma proteína motora secundária (Goodwin; McPherson; McCombie, 2016). Isso é

uma replicação baseada nas propriedades dos bioporos proteicos, canais transmembrana com papel biológico de possibilitar a perturbação de voltagem a partir da passagem de qualquer molécula através do canal. Dessa forma, é possível converter informações propriamente estruturais das moléculas em sinais mensuráveis de corrente iônica. Ademais, uma vantagem fundamental da aplicação dos nanoporos está na capacidade de captura de moléculas de forma sucessiva com desejáveis taxas de rapidez, atingindo a análise de *reads* de tamanho maior que 5 kb com velocidade de 1 par de base (pb) por nanosegundo (Jain *et al.*, 2016; Liu, L. *et al.*, 2012; Ying *et al.*, 2022).

Os alvos a serem sequenciados são previamente preparados e incluídos em uma biblioteca genômica. Diversos métodos podem ser utilizados no preparo das bibliotecas para o sequenciamento via MinION e sua escolha dependerá essencialmente do tempo disponível e região alvo do sequenciamento (Levy; Myers, 2016; Deamer; Akeson; Branton, 2016). Estratégias de enriquecimento direcionadas às regiões genômicas específicas podem ser essenciais quando se objetiva sequenciar genes de alta complexidade com cobertura ótima e custos relativamente mais baixos. Dentre essas, destaca-se a metodologia de *nanopore Cas9-targeted sequencing* (nCATS), abordagem que se mostrou precisa no passo de seleção da região-alvo específica e eficiente no sequenciamento da região complexa do *CYP2D6-CYP2D7* a partir da clivagem com sistemas CRISPR-Cas9 (Gilpatrick *et al.*, 2020; Rubben *et al.*, 2022).

1.5 Tecnologia CRISPR/Cas9 para preparo de bibliotecas genômicas

Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas, do inglês *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR), é um sistema de defesa natural de bactérias e arqueias contra ácidos nucleicos estranhos que, via proteínas nucleases, como a Caspase 9 (Cas9), reconhece essas sequências específicas advindas de vírus e plasmídeos invasores (Mojica *et al.*, 2000). Para o funcionamento do CRISPR/Cas9, são necessários a proteína nuclease e os RNAs guias (sgRNAs), que se combinam e formam um complexo com função de se ligar a uma molécula de DNA dupla-fita. Essa ligação ocorre principalmente a partir de um pareamento da sequência com os primeiros 20 nucleotídeos do sgRNA. Impõe-se, também, que esse reconhecimento só é possível

se, logo à jusante da sequência alvo, houver a presença de uma PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), pequeno *locus* com papel de ajudar a enzima a distinguir DNA próprio de não-próprio. Assim que o complexo sgRNA e Cas9 se combina ao genoma, a Cas9 realiza a clivagem de ambas as fitas de forma independente (Gilpatrick *et al.*, 2020; López-Girona *et al.*, 2020; Zhu, 2022).

Essa tecnologia já é amplamente utilizada com sucesso como ferramenta de edição gênica. Todavia, têm se mostrado muito promissora para a clivagem de DNA em modelos *in vitro*, o que possibilita o sequenciamento de regiões genômicas alvo de forma extremamente precisa (Gilpatrick *et al.*, 2020). Dessa maneira, a implementação de protocolos de enriquecimento para a preparação de bibliotecas genômicas representa uma etapa fundamental para a obtenção de dados de alta qualidade em regiões genômicas específicas. Ao aumentar a eficiência da captura e do sequenciamento de *loci* de interesse, essa abordagem favorece a caracterização abrangente de farmacogenes complexos e fortalece a aplicação de tecnologias de longa leitura para fins de genotipagem farmacogenética (Warburton; Sebra, 2023).

2. JUSTIFICATIVA

A variabilidade interindividual na resposta aos medicamentos constitui um importante desafio para a medicina moderna. Fatores genéticos exercem influência significativa sobre os processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, o que pode acarretar em diferenças expressivas na eficácia e na segurança dos tratamentos. Ao investigar o impacto de variantes genéticas na resposta a fármacos e subsidiar *guidelines* para sua implementação no contexto clínico, a farmacogenética surge como uma ferramenta crucial para a individualização do tratamento farmacológico. Entre os farmacogenes de maior relevância clínica, ressalta-se o *CYP2D6*, responsável pelo metabolismo de aproximadamente 20% dos fármacos mais prescritos. No entanto, a genotipagem precisa do *CYP2D6* ainda enfrenta importantes desafios metodológicos, uma vez que as técnicas convencionalmente empregadas na rotina clínica restringem-se à detecção de variantes previamente descritas e frequentemente falham na identificação de variantes raras, variações no número de cópias (CNVs) e rearranjos estruturais envolvendo o pseudogene *CYP2D7*. Essa limitação é particularmente relevante para o *CYP2D6*, dada sua arquitetura genética de elevada complexidade e alta homologia com pseudogenes adjacentes, resultando em 186 alelos e mais de 400 sub-alelos catalogados. Em populações altamente miscigenadas, como a brasileira, cuja diversidade genética remanesce insuficientemente caracterizada, a dependência de painéis baseados em variantes de referência pode resultar em genotipagens incompletas e, consequentemente, em inferências fenotípicas equivocadas, comprometendo a segurança e a eficácia das recomendações terapêuticas.

Nesse contexto, o sequenciamento de nova geração por *long reads*, em especial a plataforma MinION da Oxford Nanopore Technologies, emerge como uma alternativa promissora para a caracterização abrangente do *CYP2D6*. Ao possibilitar a geração de leituras contínuas de grande extensão, essa tecnologia permite cobrir por completo o *locus CYP2D6-CYP2D7* em uma única *read*, favorecendo a identificação precisa de variações que frequentemente permanecem ambíguas em abordagens baseadas em *short reads*. Todavia, a utilização eficiente dessa tecnologia para a caracterização do *CYP2D6* depende da implementação de estratégias de enriquecimento capazes de garantir cobertura adequada e qualidade das bibliotecas genômicas. Diante disso, a metodologia *Cas9-targeted sequencing*

(nCATS), baseada na clivagem de DNA pelo sistema CRISPR-Cas9, destaca-se por possibilitar o enriquecimento seletivo da região de interesse sem a necessidade de amplificação prévia, preservando informações relevantes sobre variantes estruturais e número de cópias.

Dessa forma, o presente trabalho se justifica pela necessidade do desenvolvimento e da avaliação de metodologias robustas para o preparo de bibliotecas genômicas voltadas ao sequenciamento do *CYP2D6* pela plataforma Oxford Nanopore, com foco na estratégia de enriquecimento por CRISPR-Cas9 e na amplificação por PCR Long-Range como abordagens complementares. A padronização dessas metodologias em amostras de DNA com genótipos conhecidos, provenientes de uma amostra populacional brasileira, representa um passo inicial concreto para futuras análises com metodologias de sequenciamento de nova geração, contribuindo para o avanço da farmacogenética e da medicina de precisão no país.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e avaliar metodologias de preparo de bibliotecas genômicas para implementar o sequenciamento do farmacogene *CYP2D6* a partir da plataforma Oxford Nanopore.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e otimizar uma estratégia de enriquecimento do *locus CYP2D6-CYP2D7* baseada em clivagem direcionada por CRISPR-Cas9;
- Avaliar a amplificação do gene *CYP2D6* por PCR Long-Range utilizando diferentes pares de oligonucleotídeos e condições reacionais;
- Comparar as abordagens de enriquecimento por CRISPR-Cas9 e PCR Long-Range quanto à sua aplicabilidade no preparo de bibliotecas para sequenciamento Oxford Nanopore.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento da Pesquisa

O presente estudo configura-se como uma pesquisa experimental de abrangência nacional, de caráter não randomizado, cujo objetivo é avaliar as metodologias de preparo de bibliotecas para sequenciamento de nova geração aplicadas à genotipagem do farmacogene *CYP2D6*. A relevância científica da proposta reside na crescente demanda por estratégias de personalização da administração farmacológica, visando minimizar a incidência de reações adversas e otimizar a eficácia terapêutica.

4.2 Amostra

A pesquisa foi realizada utilizando amostras de DNA com genótipos já conhecidos para 13 variantes do gene *CYP2D6* previamente genotipado por meio de técnicas baseadas em PCR com sondas TaqMan. Essas amostras originam-se do estudo intitulado “*Caracterização de polimorfismos de interesse farmacogenético e correlação com a ancestralidade genética*”, conduzido pela Rede Nacional de Farmacogenética (REFARGEN), cujos resultados foram publicados por Friedrich *et al.* (2014).

4.3 Procedimento

4.3.1 Preparo das amostras para biologia molecular

Alíquotas de DNA dessas amostras, anteriormente extraído pelo método *Salting Out* (Lahiri; Nurnberger, 1991), foram estocadas a -20 °C no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA. Inicialmente, foi realizada uma triagem dessas alíquotas por eletroforese em gel de agarose, objetivando selecionar amostras de maior qualidade para seguirem para as etapas de preparo de bibliotecas. As amostras escolhidas alcançaram parâmetros de corrida condizentes com o objetivo proposto: bandas demarcadas de alto peso molecular (>10 kb). Além disso, realizou-se a quantificação de DNA a partir do Shimadazu® BioSpec-nano para

reunir dados de qualidade (parâmetros de densidade óptica e influência de compostos fenóis advindos da extração e do procedimento de purificação) e quantidade (concentração de DNA) dessas amostras.

As amostras selecionadas que apresentaram bons parâmetros de quantificação e qualidade foram purificadas com Illumina® Purification Beads (número de catálogo 20060057). O método baseia-se no princípio SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization) (DeAngelis; Wang; Hawkins, 1995), que consiste na ligação reversível do DNA às *beads* magnéticas, seguida de separação magnética, lavagem e eluição do material purificado (Figura 1). Para o procedimento, foram utilizados 0,5 µL da solução de *beads* para cada µL de amostra, 200 µL de etanol 70% para cada uma das duas etapas de lavagem e proporção 1:1 de Tris-HCl 10 mM pH 8,5. As amostras que passaram pela etapa de purificação também foram checadas em gel de agarose.

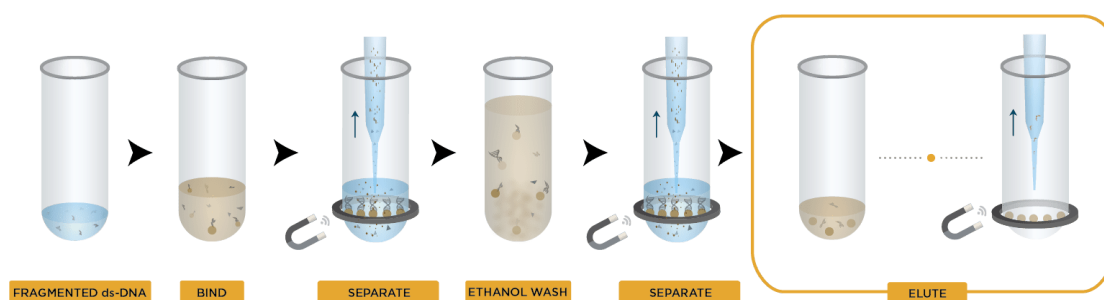


Figura 3 – Representação esquemática do processo de purificação com *beads* magnéticas.

Fonte: Beckman Coulter, 2026.

4.3.2 Estratégias de enriquecimento de regiões-alvo para o preparo de bibliotecas genômicas

4.3.2.1 Clivagem com CRISPR-Cas9

O enriquecimento do *CYP2D6* com a metodologia CRISPR-Cas9 foi realizado conforme o protocolo Cas9-target sequencing da Oxford Nanopore Technologies (ONT). O protocolo prevê a utilização do kit Ligation sequencing gDNA - Cas9 enrichment (SQK-LSK109, 2018) da mesma fabricante.

Os RNA guias (sgRNAs), utilizados para a formação do complexo de ribonucleoproteínas (RNP) com a nuclease Cas9, foram desenhados previamente utilizando a plataforma CHOPCHOP (Labun *et al.*, 2019) no modo “Nanopore enrichment”. As sequências foram selecionadas de modo a capturar a região alvo correspondente ao locus *CYP2D6-CYP2D7*, permitindo isolar o gene inteiro e regiões homólogas.

Foram desenhados 3 sgRNAs para serem utilizados nos procedimentos de clivagem, resultando nos pares A (1_CYP2D6 e 2_CYP2D6) e B (2_IDT e 2_CYP2D6). A utilização dos pares de sgRNA prevê que fragmentos de 6.982 pares de base (bp) e 7.331bp, respectivamente. As sequências alvo e PAM e posições genômicas dos sgRNAs empregados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – RNAs guias desenhados para clivagem com Cas9.

sgRNA	Sequência alvo	PAM	Coordenadas	Posição
1_CYP2D6	GTGGTGAGGTGACGAGGCTG	AGG	3568...3587	<i>Upstream</i>
2_CYP2D6	TGAGGCTGATCCTCCCGAGC	AGG	10568...10587	<i>Downstream</i>
2-IDT	GCCACATCAAGTACCACTCA	TGG	3237...4782	<i>Upstream</i>

Os sgRNA liofilizados, produzidos pela Synthego®, foram reidratados com 15 µL de água *nuclease-free*, objetivando a concentração de 100 µM (100 pmol/µL). A concentração do produto foi verificada a partir de procedimento de quantificação de RNA com o BioSpec-nano. Posteriormente, foi realizada a diluição da solução de estoque de sgRNA em alíquotas de solução de trabalho com concentração de 10 µM.

Os experimentos para a digestão com a nuclease TrueCut® Cas9 Protein v2 (número de catálogo A36497 – Invitrogen®) foram conduzidos a partir de três etapas: montagem dos complexos de ribonucleoproteínas (RNPs), digestão de gDNA e inativação enzimática. Visando obter a proporção ideal de 1:1 entre enzima Cas9 e sgRNAs, foram adicionados 1 µg/µL de Cas9, 100 ng/µL de cada sgRNA, 1X Buffer Cas9, 100 µg/ml de albumina de sangue bovino (BSA) e água ultrapura para completar 10 µL. Após a pipetagem de reagentes, iniciou-se a primeira incubação de 15 minutos a 25°C com banho seco. Após o tempo de incubação, o gDNA

proveniente das amostras previamente selecionadas e água foram adicionados à reação para completar seu volume. Os tubos foram submetidos a mais um período de incubação de 90 minutos a 37°C objetivando digestão mais robusta pela nuclease. Por fim, a inativação enzimática ocorreu após a adição de Proteinase K (20 mg/mL) e mais um tempo de incubação no banho seco de 15 minutos a 56°C.

4.3.2.2 PCR Long-Range

A metodologia de PCR Long-Range foi adotada buscando a amplificação de toda a extensão do *locus* do gene *CYP2D6*, incluindo regiões *upstream* e *downstream*. Os dois pares de primers, sintetizados pela Exxtend®, foram desenhados para gerar fragmentos de 6,6 kb, conforme indicado por estudos prévios (Gaedigk, A. *et al.*, 2007; van der Lee *et al.*, 2021). A tabela 2 demonstra a relação dos fragmentos desenhados e as referências. Os primers liofilizados foram hidratados em 430 µL de água ultrapura, a partir da recomendação do fabricante, e diluídos para atingir concentração final de 10 µM para solução de trabalho utilizada nos experimentos descritos a seguir.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos desenhados para PCR Long-Range.

Identificação dos primers	Sequência (5'→3')	Comprimento	Referência
A	5' - ATG GCA GCT GCC ATA CAA TCC ACC TG (F)	6,6 kb	Gaedigk <i>et al.</i> (2007)
	5' - ACT GAG CCC TGG GAG GTA GGT AG (R)		
B	5' - ATG GCA GCT GCC ATA CAA TCC ACC TG (F)	6,6 kb	Van der Lee <i>et al.</i> (2021)
	5' - CGA CTG AGC CCT GGG AGG TAG GTA G (R)		

As regiões-alvo foram amplificadas utilizando a enzima Takara® PrimeStar HS DNA Polimerase (número de catálogo R010A), segundo o protocolo descrito no manual do produto. Foram testadas reações de dois diferentes volumes: 10 µL e 25 µL. A reação de 10 µL continha 50-100 ng de DNA genômico (gDNA) purificado, 1X

PCR Buffer Takara® PrimeStar, 0,4 mM de dNTP Mix, 0,4 μ M de primer forward (F), 0,4 μ M de primer reverse e 0,25 U de enzima e água ultrapura até completar o volume. Já para as reações de 25 μ L, os volumes dos reagentes foram ajustados proporcionalmente, mantendo-se as mesmas concentrações finais. O mix para PCR foi preparado pela técnica Cool Start, recomendada pelo fabricante da enzima, que consiste em realizar o preparo e a pipetagem dos reagentes em *rack* congelada, visando reduzir a amplificação inespecífica e aumentar a estabilidade da reação. Assim, imediatamente após a pipetagem de mix e amostras nos poços, a placa foi colocada em termociclador, com temperatura de desnaturação alcançada.

Os parâmetros estabelecidos no termociclador para a PCR Long-Range foram de 3 minutos a 98 °C, seguidos de 30 ciclos de 10 segundos a 98 °C e 7 minutos a 68 °C, e finalizando com 15 minutos a 68 °C.

Com os amplicons gerados, realizou-se o *check-up* para garantir o devido funcionamento do método a partir de gel de agarose, utilizando marcador para 1 kb. As amostras com bandas evidentes na posição de 6 a 7 kb seguiram para a etapa de purificação subsequente, também utilizando Illumina® Purification Beads.

5. RESULTADOS

5.1 Screening de amostras

Com o objetivo de selecionar amostras de pureza e qualidade, foi realizado um *screening* por eletroforese em gel de agarose das amostras do banco da REFARGEN. Foram realizadas cinco corridas totalizando 52 amostras distribuídas em géis de agarose a 1,0% e 1,5%, com corridas entre 25 e 35 minutos a 80 – 95 volts, conforme ilustrado pela figura 4. Para cada amostra, foram pipetados 3 μ L.

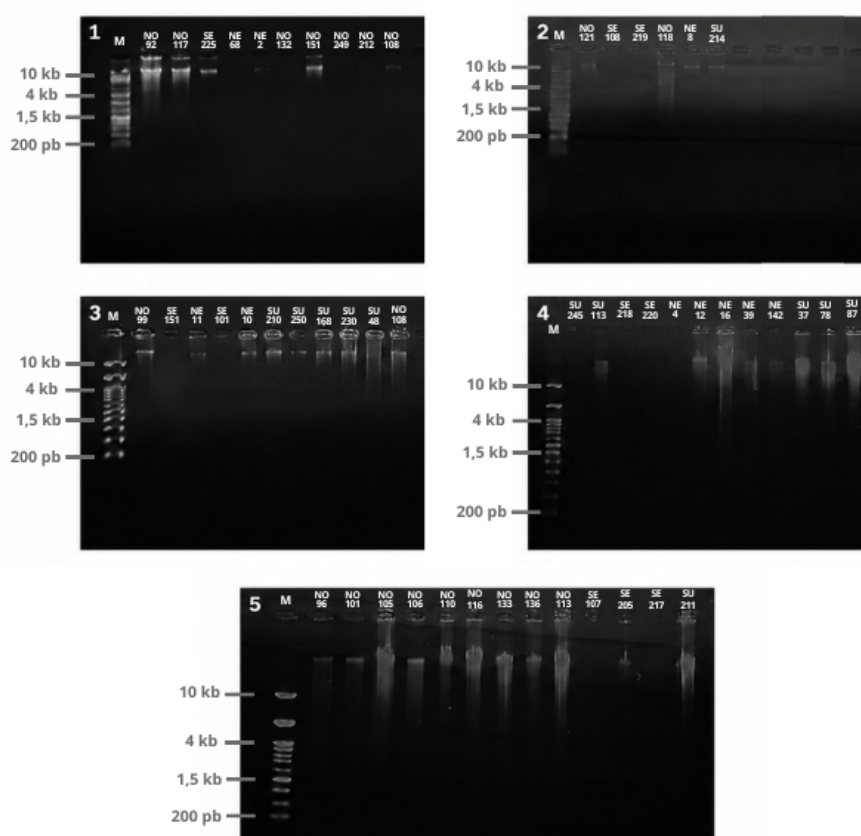


Figura 4 – Eletroforese das amostras submetidas ao *screening* de qualidade do DNA. **M**: marcador de peso molecular de 1 kb.

As amostras selecionadas apresentaram bandas de alto peso molecular, com padrão condizente com DNA genômico. As amostras que não atenderam ao critério foram identificadas como degradadas e não foram utilizadas para os experimentos

subsequentes. Ao final da triagem, foram selecionadas 37 amostras para a etapa de clean-up, com suas informações compiladas na Tabela 3.

Tabela 3 – Amostras selecionadas para purificação e suas respectivas informações.

Amostra	Concentração (ng/ul)	OD260/280	OD260/230	Alelo	Alelo	Fenótipo
NO_92	99,42	1,84	2,16	*4	*5	PM
NO_96	100,13	1,84	1,62	*1	*1	EM
NO_99	181,79	1,65	1,37	*39	*39	EM
NO_101	308,28	1,48	1,60	*2A	*41	EM
NO_105	151,00	1,82	2,03	*35	*41	EM
NO_106	80,65	1,80	1,99	*2A	*1	EM
NO_108	61,07	1,77	1,76	*4	*4	PM
NO_110	112,46	1,86	1,67	*35	*2A	UM
NO_113	79,16	1,81	2,13	*1	*3	EM
NO_116	130,74	1,83	1,41	*2A	*17	EM
NO_117	68,23	1,78	1,82	*2A	*1	UM
NO_118	123,98	2,00	0,25	*2A	*3	EM
NO_121	48,70	1,73	1,41	*1	*4	EM
NO_133	131,30	1,96	0,19	*2A	*17	EM
NO_136	64,18	1,92	0,14	*2A	*4J	EM
NO_151	192,5	1,94	0,26	*1	*1XN	UM
SE_108	13,33	1,63	0,71	*2A	*5	EM
SE_205	26,82	1,79	1,57	*1	*5	EM
SE_219	20,51	1,63	0,96	*2 others	*5	EM
SE_225	30,90	1,81	1,64	*41	*4	IM
NE_2	20,74	1,82	0,69	*1	*5	EM
NE_8	25,10	1,56	0,96	*2A	*4	EM
NE_10	35,35	1,65	1,36	*2A	*41	EM

Amostra	Concentração (ng/ul)	OD260/280	OD260/230	Alelo	Alelo	Fenótipo
NE_12	226,68	1,73	1,76	*2A	*29	EM
NE_16	750,38	1,84	2,01	*35	*1	EM
NE_39	131,31	1,70	1,79	*2A	*41	EM
NE_142	36,18	2,36	1,54	*35	*4	EM
SU_37	469,85	1,84	1,79	*1	*5	EM
SU_78	107,55	1,86	1,31	*1	*4	EM
SU_87	60,20	1,85	1,49	*35	*2A	EM
SU_113	130,78	1,74	1,85	*1	*1	EM
SU_168	49,30	1,62	1,70	*41	*2	IM
SU_210	176,03	1,80	1,87	*29	*9	IM
SU_211	99,57	1,80	1,60	*17	other	ND
SU_214	104,13	1,66	1,81	*2A	*1	UM
SU_230	43,98	1,83	1,64	*2A	*9	EM
SU_240	21,30	1,51	0,54	*1	*1	EM

5.2 Purificação por *beads*

As amostras selecionadas no *screening* foram submetidas à etapa de purificação com o objetivo de remover resíduos que pudessem interferir nas etapas subsequentes, como sais e fragmentos de DNA de baixo peso molecular. Para essa etapa, foram transferidos 15 µL de cada amostra para microtubos de 1,5 mL compatíveis com o suporte magnético utilizado para o experimento. Desse modo, utilizou-se 7,5 µL da solução de *beads*, 400 µL totais de etanol 80% e 15 µL de Tris.

A eficiência do experimento de clean-up foi checada com eletroforese em gel de agarose (Figura 5). Os géis de agarose apresentaram concentrações de 1,0% a 1,5% e padronizaram-se os parâmetros de corrida em 80 volts por 35 minutos.

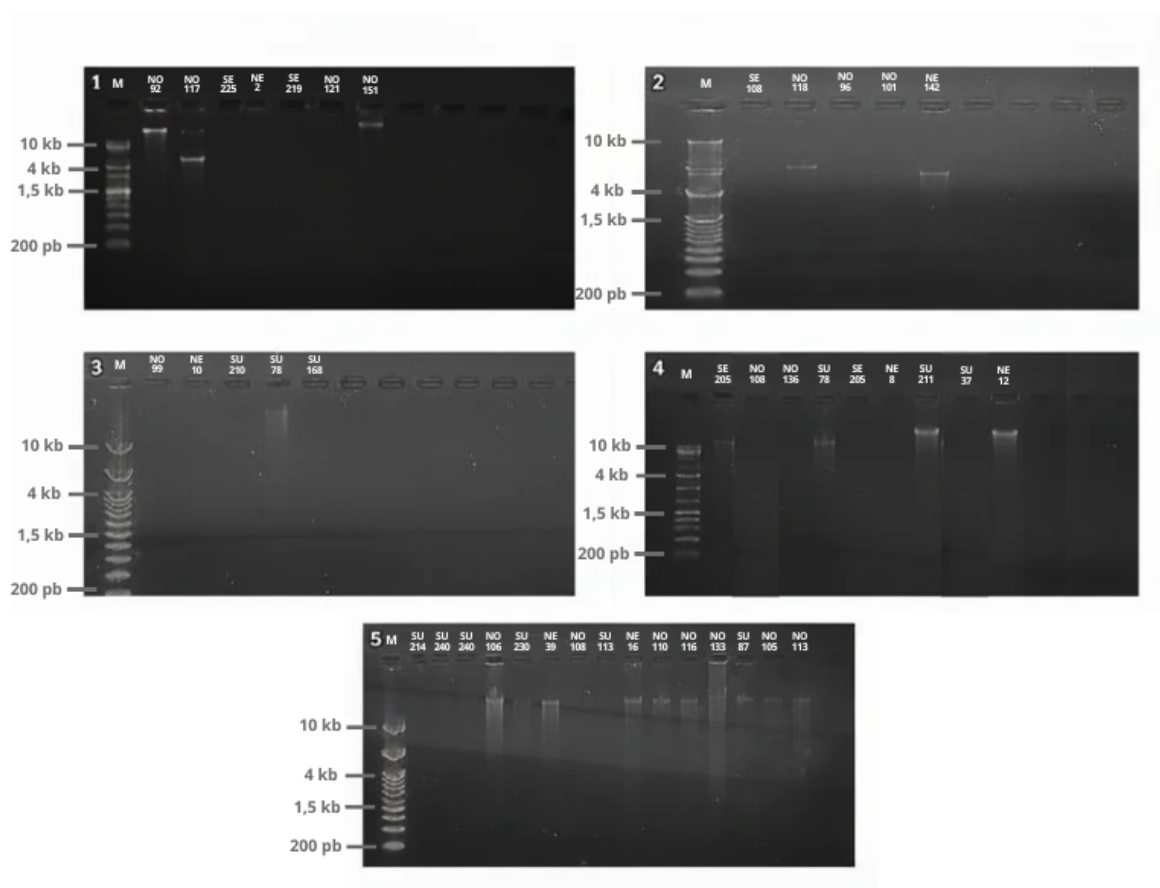


Figura 5 – Eletroforese para checagem da integridade das amostras purificadas. **M**: marcador de peso molecular de 1 kb.

Com base nos critérios de qualidade estabelecidos para o estudo, foram selecionadas 18 amostras para prosseguimento às etapas de preparo das bibliotecas. As amostras selecionadas foram: NO_92, NO_105, NO_106, NO_110, NO_113, NO_116, NO_117, NO_118, NO_133, NO_151, SE_205, NE_12, NE_16, NE_39, NE_142, SU_78, SU_87 e SU_211.

5.3 Clivagem por Cas9

As amostras selecionadas foram incluídas no protocolo de preparo de bibliotecas genômicas a partir do enriquecimento das regiões alvo por CRISPR-Cas9. A estratégia baseia-se na propriedade enzimática de clivagem específica que a nuclease caspase 9 apresenta. O protocolo previsto para a clivagem com Cas9 advém do kit descontinuado pelo fabricante, Oxford Nanopore

Technologies® (ONT). Portanto, os reagentes foram adquiridos e preparados separadamente.

Antes de dar seguimento ao protocolo, foi realizada a checagem de concentrações dos sgRNA. Diluições de 1:400 com os 4 produtos foram preparadas para o procedimento. Para as quantificações, foram utilizados 2 µL da solução diluída com o BioSpec-nano em abertura óptica de 0,7 mm. A partir da leitura de absorbância a 260 nm, a concentração foi calculada por meio da equação de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot l \cdot C$), considerando os valores de absorbância lidos pelo equipamento, o caminho óptico do equipamento (0,7 mm) e o coeficiente médio de extinção molar dos sgRNAs utilizados ($\epsilon = 1.010.436,667 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). As concentrações obtidas após correção com o fator de diluição situaram-se na faixa de 60 a 62 µM, valor coerente com as concentrações esperadas para sgRNAs sintetizados comercialmente.

5.3.1 Primeira rodada experimental

Em um primeiro momento, as amostras NO_105, NO_106, SU_78, SU_87 e NO_101 foram escolhidas para a etapa de formação do complexo RNP entre a enzima Cas9 e os sgRNAs, processo essencial para haver a clivagem do gDNA na região de interesse. Para todas as amostras, realizou-se o experimento com a combinação A de RNA guias, estabelecida por 1_CYP2D6 e 2_CYP2D.

Foram utilizados 1 µL da enzima Cas9, 1 µL de cada sgRNA, 2 µL de tampão Cas9 10X e 5 µL de água livre de nucleases. Ao final do primeiro tempo de incubação, foram pipetados 2 µL de gDNA e 8 µL de água ultrapura, objetivando atingir o volume de reação 20 µL previamente estabelecido.

Ressalta-se que a solução de 10X Buffer Cas9 foi inicialmente preparada com 200 mM de Tris-Base, 1 M de NaCl, 50 mM de MgCl₂ hexahidratado e 1 mM de EDTA, com pH ajustado para 7,8 a 25 °C, visando proporcionar condições adequadas para a atividade da enzima. A formulação foi elaborada com base nas especificações do tampão comercial rCutSmart® Buffer (número de catálogo B6004S), da New England Biolabs (NEB).

Após a segunda incubação, 1 µL de Proteinase K foi incluído e a reação permaneceu por 15 minutos a 56 °C em banho seco. Ao final dessa etapa, foi realizada a eletroforese padronizada em gel de agarose a 1% por 35 minutos a 80

volts (Figura 6). Apenas para a amostra NO_106 a banda de alto peso molecular (acima de 10 kb), indicativa da presença de DNA genômico íntegro, mostrou-se evidente. Enquanto isso, nas demais corridas, com exceção daquela referente à amostras NO_106, foram observados pequenos fragmentos em torno de 200 pb, acompanhados por arraste entre aproximadamente 500 e 100 pb.

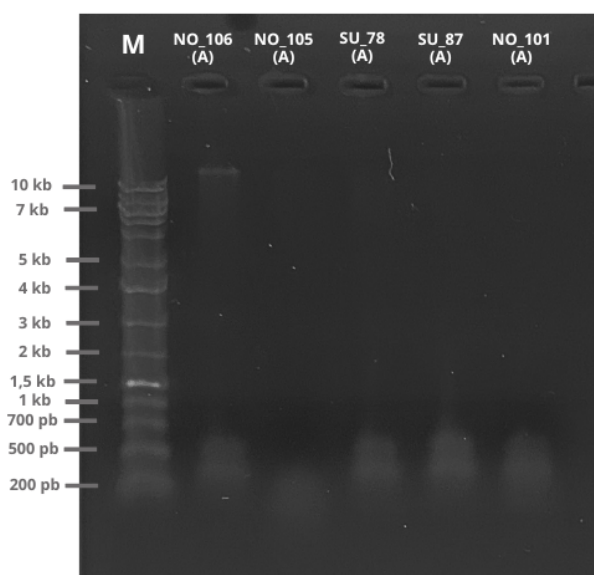


Figura 6 – Eletroforese após clivagem com Cas9 para sgRNAs 1_CYP2D6 e 2_CYP2D6. **M:** marcador de peso molecular de 1 kb.

5.3.2 Segunda rodada experimental

Buscou-se realizar novamente o experimento ajustando a composição do tampão. Foi retirado o EDTA e incluído o dobro de $MgCl_2$ (100 mM), ajustes realizados com o objetivo de aumentar a eficiência da reação. As concentrações de Tris e NaCl mantiveram-se as mesmas. Dessa vez, utilizou-se novamente a amostra NO_106 e o experimento também foi testado com as amostras NE_16 e NE_39. As concentrações para a reação e os parâmetros de incubação estipulados pelo protocolo não foram alterados. Para cada uma das três amostras, foi realizado o procedimento duas vezes, alternando as combinações de sgRNA, sendo utilizados o par A (1_CYP2D6 e 2_CYP2D6) e o par B, definido por 2-IDT e 2_CYP2D6. A eletroforese com as amostras após procedimento de clivagem foi realizada (Figura 7). As amostras NO_106 e NE_39 apresentaram bandas de alto peso molecular.

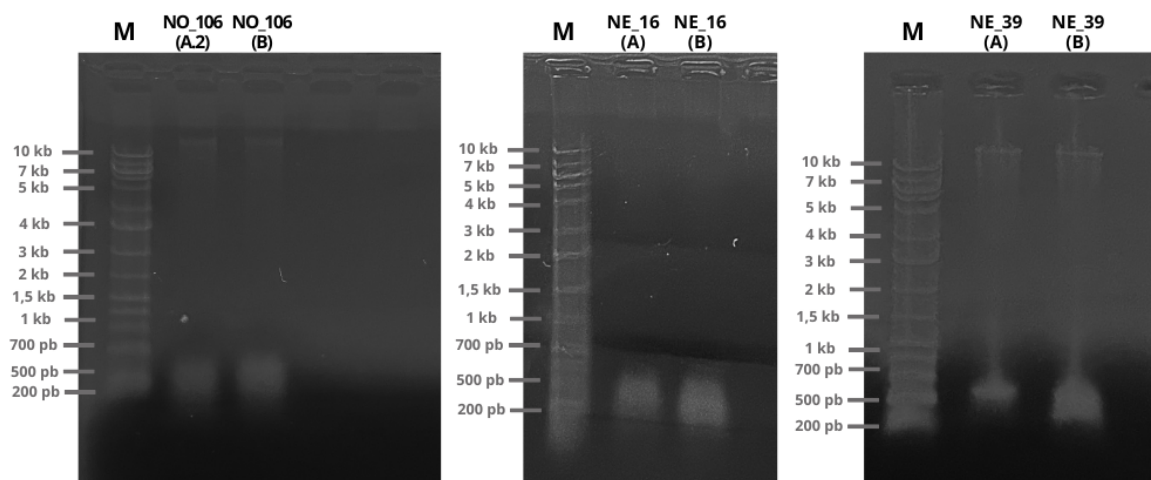


Figura 7 – Eletroforese após ajustes no protocolo de clivagem com Cas9. **M**: marcador de peso molecular de 1 kb.

5.3.3 Terceira rodada experimental

Com o objetivo de ampliar a avaliação da metodologia proposta, foi conduzida uma nova rodada experimental utilizando a amostra NO_106 sem a realização da etapa de purificação. Em adição, o banho seco em bloco foi substituído pelo termociclador, visando garantir maior precisão e uniformidade no controle das temperaturas de incubação, fator potencialmente relevante para o desempenho das etapas de formação do complexo ribonucleoproteico e clivagem mediada por Cas9.

Visando uma avaliação mais detalhada das amostras submetidas ao procedimento, realizou-se uma nova eletroforese utilizando gel de agarose a 0,8%, com corrida de 2 horas a 85 volts (Figura 8). A redução da concentração de agarose, associada ao maior tempo de corrida, foi adotada objetivando aumentar a resolução dos fragmentos de DNA. Após a corrida, foram visualizadas bandas acima de 10 kb apenas referentes a amostras NE_16 com as duas combinações de pares A e B.



Figura 8 – Eletroforese longa com todas as amostras pós-clivagem. **M**: marcador de peso molecular de 1 kb.

5.3.2 Amplificação por PCR Long-Range

Além de serem utilizadas para os procedimentos de digestão com Cas9, as amostras previamente selecionadas foram submetidas ao preparo de bibliotecas genômicas a partir da estratégia de amplificação de amplicons de grande extensão. A utilização da metodologia de PCR Long-Range teve como objetivo amplificar todo o gene *CYP2D6*, incluindo regiões flanqueadoras à montante e à jusante, de forma a obter fragmentos adequados para etapas subsequentes de sequenciamento por long reads.

Inicialmente, testou-se um protocolo utilizando reações de volume final de 10 μ L por amostra. Para cada uma das 16 amostras, foram realizadas duas reações independentes, correspondentes aos pares de oligonucleotídeos A e B. Assim, foram preparados dois *mixes* para a amplificação, um para cada conjunto de *primers*. Além das amostras, foram incluídos dois controles negativos para cada par de *primers* empregados. As quantidades de reagentes foram calculadas com um excedente de 10%, visando compensar possíveis perdas durante a pipetagem, especialmente em função dos pequenos volumes manipulados, bem como minimizar impactos decorrentes de variações instrumentais e operacionais. Devido às distintas faixas de concentração das amostras definidas pelos procedimentos de quantificação, foi realizada a diluição de amostras que apresentaram concentração maior que 80 ng/ μ L. Assim, a reação de PCR contou com 1 μ L de DNA genômico

purificado. Para os demais reagentes, as quantidades pipetadas foram: 2 μ L PCR Buffer, 0,4 μ L dNTP mix, 0,3 μ L *primer* F, 0,3 μ L *primer* R, 0,1 μ L enzima Takara Primestar e 5,9 de água livre de nucleases.

Após a conclusão dos ciclos de amplificação no termociclador, os produtos de PCR foram submetidos a 3 corridas de eletroforese em gel de agarose para avaliação do desempenho da metodologia. Entretanto, não foram observadas bandas correspondentes aos fragmentos de tamanho esperado, indicando ausência de amplificação nas condições testadas (Figura 9, A, B e C).

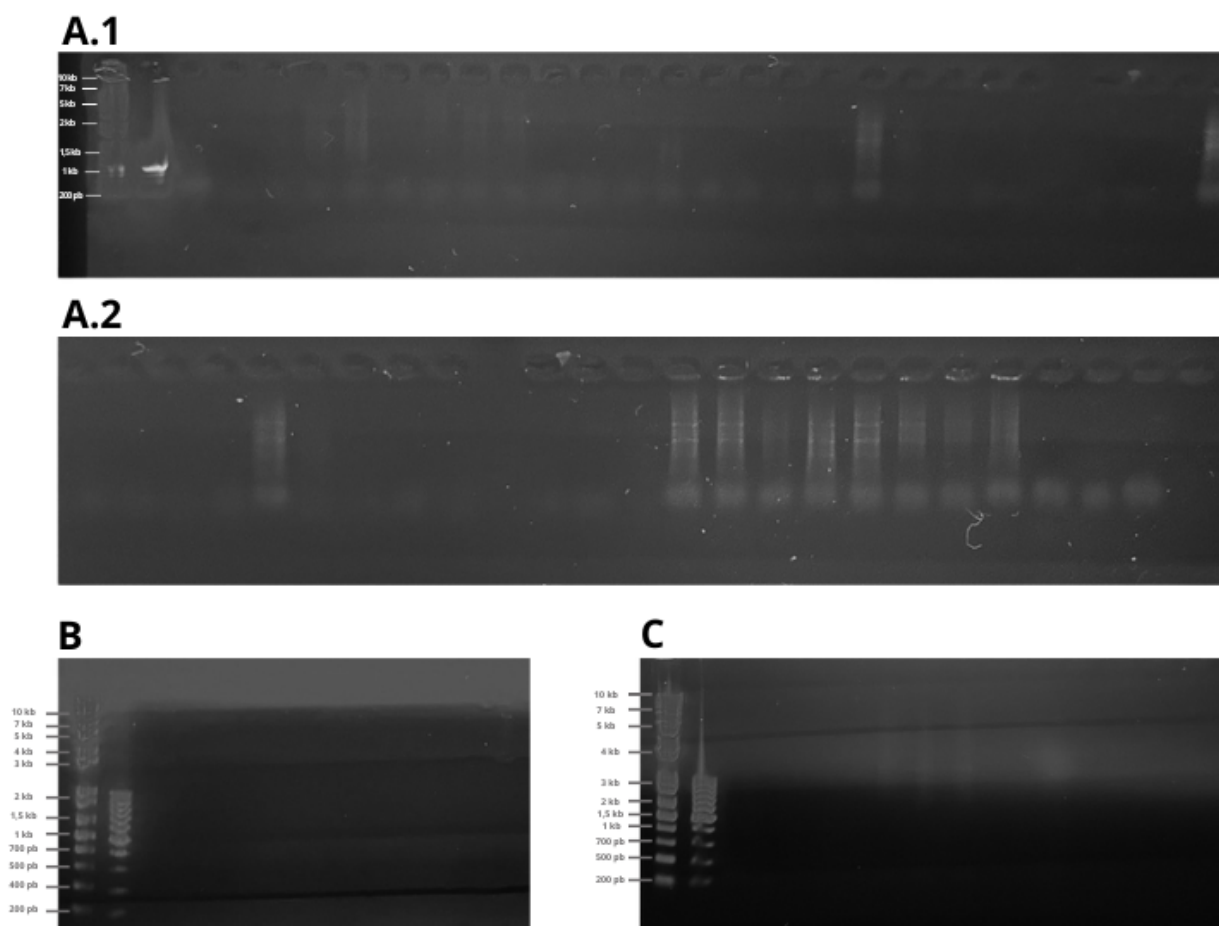


Figura 9 – Eletroforese com amplicons advindo da reação de 10 μ L.

Com os resultados obtidos, buscou-se repetir a PCR com reagentes ajustados para 25 μ L (5 μ L PCR Buffer, 0,5 μ L dNTP mix, 0,7 μ L *primer* F, 0,7 μ L *primer* R, 0,25 μ L enzima Takara Primestar e 16,85 de água livre de nucleases). A

reação foi realizada apenas para 10 amostras, sendo elas NO_92, NO_142, NO_116, NO_133, NO_113, SU_211, NE_12, NO_108, SU_211, NE_12, NO_108, SU_230 e SU_37. Após a otimização das condições de amplificação, foi possível observar a obtenção de amplicons compatíveis com o tamanho esperado nas amostras NE_39 e NO_110, conforme gel de agarose corrido com marcador de 1 kb (Figura 10, A). Em seguida, os produtos foram submetidos à etapa de purificação com beads magnéticas, conforme previsto no protocolo de preparo de bibliotecas. Entretanto, após a etapa de *clean-up*, a checagem por eletroforese não evidenciou a presença dos fragmentos previamente observados, sugerindo perda significativa do material genético durante essa etapa (Figura 10, B).

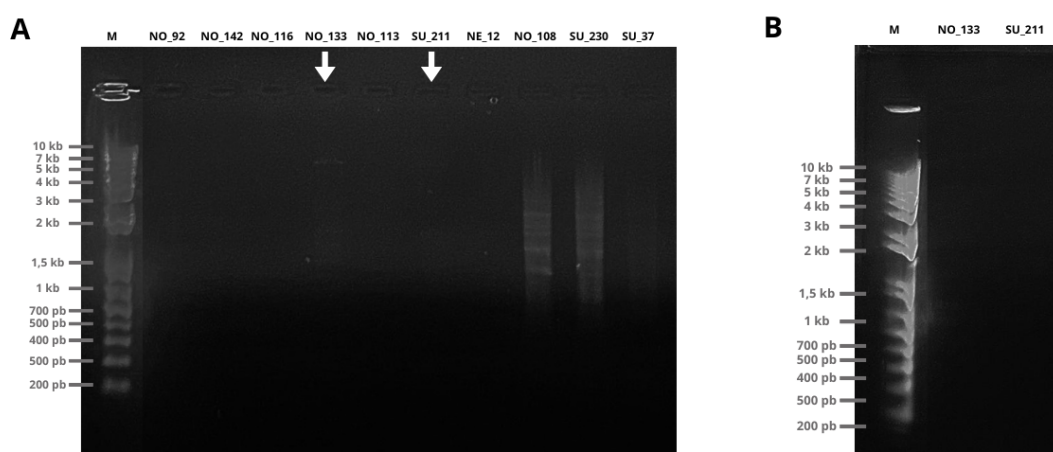


Figura 10 – Eletroforese obtidos durante a padronização experimental. **(A)** Amplicons das amostras NE_39 e NO_110 após otimização das condições de PCR. **(B)** Avaliação da integridade dos amplicons após a etapa de purificação. **M:** marcador de peso molecular de 1 kb.

6. DISCUSSÃO

A elevada complexidade genética do *CYP2D6*, caracterizada por mais de 186 alelos já descritos, variantes estruturais diversas e alta homologia com pseudogenes adjacentes, representa um dos principais desafios para a consolidação da farmacogenética na prática clínica. Os métodos tradicionalmente empregados para a genotipagem desse farmacogene apresentam importantes limitações que restringem sua capacidade de capturar de forma abrangente a variabilidade do gene. Como consequência, a determinação dos haplótipos e a inferência acurada dos fenótipos metabolizadores permanecem obstáculos relevantes para a implementação da farmacogenética como ferramenta da rotina clínica (Schwarz; Gulilat; Kim, 2019). Diante desse cenário, o presente trabalho propôs desenvolver e avaliar metodologias para o preparo de bibliotecas genômicas voltadas ao sequenciamento completo do farmacogene *CYP2D6* a partir da plataforma de Oxford Nanopore, com foco em duas estratégias de enriquecimento da região alvo: a clivagem mediada por CRISPR-Cas9 e a amplificação por PCR Long-Range.

6.1 Protocolo de purificação com *beads*

A partir de uma etapa inicial de triagem, as amostras advindas do banco da REFARGEN que apresentaram parâmetros de integridade e pureza adequados foram selecionadas. A etapa de purificação com *beads*, baseada no princípio SPRI, resultou na seleção de 18 amostras para o prosseguimento dos experimentos. A utilização de *beads* para fins de purificação é amplamente empregada em protocolos de preparo de bibliotecas genômicas por sua capacidade de remover resíduos como sais, *primers* e demais fragmentos de baixo peso molecular, sem exigir centrifugação ou a utilização de solventes orgânicos (Liu, D. *et al.*, 2023). No entanto, sua aplicação ao DNA genômico de alto peso molecular requer considerações metodológicas específicas, principalmente referentes à proporção entre *beads* e amostra e às condições de eluição (Beckman, 2016).

Embora protocolos otimizados para fragmentos menores, tipicamente de 100 a 1500 pb, apresentem taxas de recuperação satisfatórias, a eficiência de purificação tende a diminuir com o aumento do tamanho dos fragmentos. Um estudo experimental observou que mais de 50% dos fragmentos acima de 7 kb poderiam

permanecer no sobrenadante sob determinadas condições de purificação, evidenciando uma redução significativa da recuperação quando comparada à observada para fragmentos menores. Os autores indicaram que a quantidade de beads empregadas é um fator crítico para maximizar o rendimento do protocolo, uma vez que a saturação da capacidade de ligação das partículas magnéticas pode contribuir para perdas substanciais de DNA de alto peso molecular (Stortchevoi; Kamelamela; Levine, 2020). Mesmo com o ajuste da proporção de *beads*, a recuperação de DNA de alto peso molecular permaneceu suscetível a perdas decorrentes das características físico-químicas desses fragmentos e das sucessivas etapas de manipulação necessárias durante o processo de purificação.

Adicionalmente, o caráter predominantemente manual do protocolo constitui uma potencial fonte de variabilidade dos resultados. Etapas críticas como a remoção do sobrenadante durante a separação magnética e as lavagens com etanol exigem precisão de pipetagem, a fim de evitar o contato inadvertido com o pellet de *beads* e a remoção incompleta do sobrenadante. Da mesma forma, resíduos de etanol remanescentes das etapas de lavagem, particularmente difíceis de eliminar completamente em volumes pequenos, podem atuar inibindo as enzimas essenciais para o preparo das bibliotecas, como a Cas9 e as polimerases utilizadas na amplificação de fragmento longo. Para minimizar esse efeito, alguns protocolos recomendam períodos prolongados de secagem das *beads*, frequentemente superiores a 15 minutos (Illumina, 2026). Todavia, essa estratégia não foi adotada nesse estudo, uma vez que a secagem excessiva (*overdry*) pode dificultar a ressuspensão das *beads* e comprometer a recuperação do DNA durante a etapa de eluição. Esses fatores, incluindo à variabilidade entre operadores, reforçam a necessidade de padronização rigorosa do protocolo, principalmente nesses casos em que é requerido a reprodutibilidade dos resultados.

6.2 Clivagem com Cas9

A metodologia de enriquecimento por CRISPR-Cas9, baseada no protocolo nCATS (*nanopore Cas9-targeted sequencing*), foi escolhida por seu potencial de, a partir da clivagem específica do gDNA, capturar o *locus CYP2D6-CYP2D7* sem necessidade de amplificação prévia, preservando assim informações sobre variantes estruturais, número de cópias e rearranjos com o pseudogene *CYP2D7* (Rubben et

al., 2022) Para avaliar sua implementação no contexto deste trabalho, foram conduzidos três rodadas experimentais, nas quais ajustes metodológicos foram realizados com base nos resultados obtidos e em evidências da literatura.

Na primeira tentativa, observou-se banda de peso molecular maior que esperado para uma amostra e fragmentos curtos de aproximadamente 200 pb acompanhados de arraste entre 500 e 1000 pb nas demais. Inicialmente, esses resultados foram interpretados como possível falha na clivagem, no entanto há de se considerar as limitações metodológicas impostas pela utilização da eletroforese convencional para avaliar a eficiência dessa metodologia. A região alvo corresponde apenas a uma pequena fração do DNA genômico total e, conseqüentemente, a quantidade de fragmento específico gerada após a digestão pode ser insuficiente para produzir uma banda detectável no gel de agarose. Em condições usuais de visualização, o aparecimento de bandas visíveis depende da presença de uma quantidade mínima de 10 a 20 ng de DNA (Green; Sambrook, 2019a). Dessa forma, mesmo quando a clivagem ocorre de maneira eficiente, os produtos gerados podem permanecer abaixo do limite de detecção da técnica.

Dessa forma, a banda observada acima de 10 kb provavelmente reflete a predominância do DNA genômico íntegro presente na amostra, mascarando os produtos da digestão específica. Além disso, a permanência de gDNA de alto peso molecular após a etapa de clivagem pode comprometer a eficiência do enriquecimento e o rendimento do sequenciamento da região alvo por constituir uma fonte potencial de ruído analítico, indicando que esse resultado provavelmente não está relacionado ao sucesso metodológico (Vereecke *et al.*, 2026).

De maneira análoga, os fragmentos menores observados também não devem ser atribuídos diretamente à atividade da enzima, uma vez que os sgRNAs foram desenhados para gerar fragmentos de aproximadamente 7 kb. Assim, se sugere que essas bandas resultem de fragmentação prévia do DNA durante a manipulação das amostras, da presença de resíduos de RNA não removidos durante a purificação ou ainda da presença de componentes da própria reação, como sgRNAs remanescentes. Ressalta-se que, nas etapas subsequentes, esses fragmentos de baixo peso molecular tenderiam a ser removidos a partir do protocolo de purificação por *beads* magnéticas previsto no preparo de biblioteca (ONT, 2018).

Na próxima rodada de experimentos, foram realizados ajustes na composição do tampão da reação, com a remoção do EDTA e o aumento da concentração de

MgCl₂. A modificação justifica-se pela propriedade do EDTA de atuar como quelante de íons divalente, incluindo o Mg²⁺, que é cofator para a atividade catalítica da enzima nuclease utilizada nesse processo (Hart, 2000). Essa observação é consistente com as especificações dos tampões comerciais recomendados para a Cas9, que não contém EDTA em sua formulação (NEB, 2021). Os resultados demonstraram o mesmo padrão de eletroforese anteriormente observado, indicando resultados inconclusivos quanto à eficiência das modificações.

Na terceira tentativa, substituiu-se o banho seco pelo termociclador para o controle das temperaturas de incubação e contribuir com a reprodutibilidade experimental. O controle preciso das condições térmicas no processo de formação do complexo ribonucleoproteico e na digestão enzimática pela Cas9 representa um fator importante a ser considerado, principalmente se tratando de atividade enzimática que requerem temperaturas adequadas e homogêneas para ocorrerem eficientemente (David *et al.*, 2022). Além disso, optou-se por aumentar o tempo de corrida eletroforética, objetivando aumentar a resolução dos fragmentos de alto peso molecular observados a partir da distribuição mais claras das bandas.

Quanto à necessidade de uma etapa destinada à verificação da eficiência da clivagem, é evidente a divergência apresentada pela literatura. Enquanto alguns estudos avaliam o desempenho do método apenas nas etapas finais do sequenciamento, por meio da análise de dados de cobertura e tamanho das reads geradas (Alfano *et al.*, 2022; McDonald *et al.*, 2021), outros optam por realizar essa verificação logo após a clivagem, empregando distintas metodologias de biologia molecular. Entre as abordagens descritas, destaca-se a utilização de PCR quantitativa (qPCR) para comparar a quantidade de fragmentos *on-targets* em relação ao DNA de *background*, permitindo estimar a eficiência do enriquecimento ao qual a amostra foi submetida antes do sequenciamento (Benarroch *et al.*, 2025; Xie *et al.*, 2024). Ademais, a utilização do Agilent TapeStation® - sistema automatizado de eletroforese com a detecção mais sensível e eficiente - para verificar a eficiência desse método, bem como a aplicação de PCR convencional para amplificação das regiões alvo da clivagem e sua posterior verificação no gel também configuram como alternativas para a checagem do sucesso experimental.

6.3 PCR Long-Range

A PCR Long-Range foi testada como abordagem complementar ao nCATS, visando a amplificação completa do locus *CYP2D6* para o preparo de bibliotecas. Neste estudo, os amplicons requeridos a partir da reação com os oligonucleotídeos desenhados eram de aproximadamente 6,6 kb. Como trata-se de uma reação de amplificação, a visualização dos resultados com eletroforese, com bandas do tamanho definido demarcadas, segue o padrão protocolado (Green; Sambrook, 2019).

Na primeira tentativa com volume de reação de 10 µL, não foram observadas bandas nos géis de agarose para nenhuma das amostras testadas, indicando ausência de amplificação nas condições utilizadas. Esse resultado pode ser atribuído a diferentes fatores, entre eles, cita-se o volume reduzido de reação, tornando o protocolo mais suscetível a variações de pipetagem, especialmente nos volumes menores de enzima e primers utilizados.

Com o aumento do volume de reação para 25 µL, foram obtidos amplicons compatíveis com o tamanho esperado em duas amostras, resultados que demonstram a viabilidade da implementação da metodologia. A ausência de amplificação nas demais amostras pode refletir as variações na qualidade do DNA entre as amostras, uma vez que amostras com maior degradação prévia podem apresentar desempenho sub-ótimo em reações de PCR Long-Range, que são mais exigentes em termos de integridade do DNA template do que PCRs convencionais de fragmentos curtos. Ademais, fatores como a quantidade de DNA insuficiente ou excessiva e a não adequação das condições de termociclagem aos *primers* utilizados podem ter contribuído para o insucesso da metodologia, indicando a necessidade da condução de mais testes visando proporcionar a otimização protocolar desse método (Arnemann, 2019; Waggott, 2000; Jansson; Hedman, 2019). Sobre a não detecção das bandas após a etapa de purificação dos amplicons obtidos, sugere perda significativa de material durante esse processo, limitação previamente discutida por representar um ponto crítico na manipulação de ácidos nucleicos de maior peso molecular.

6.4 Considerações gerais e perspectivas futuras

Os resultados encontrados nos experimentos conduzidos estão relacionados às barreiras impostas quanto ao desenvolvimento e à padronização de metodologias na área da biologia molecular, particularmente se direcionadas a regiões genômicas complexas como o *CYP2D6*. Embora diversas limitações tenham sido observadas ao longo das etapas, a natureza experimental deste trabalho configura um contexto de etapa inicial de desenvolvimento metodológico, proporcionando informações relevantes para a adaptação e otimização dos protocolos às condições laboratoriais disponíveis, bem como possibilitando o desenvolvimento do conhecimento técnico necessário para futuras implementações da metodologia.

Isso é particularmente relevante diante da lacuna existente na literatura sobre abordagens de preparo de bibliotecas genômicas para o sequenciamento por *long-reads* do *CYP2D6*. Para a estratégia de enriquecimento com Cas9, por exemplo, apenas dois estudos replicaram protocolos bem-sucedidos capazes de realizar a predição com acurácia das diversas variantes do gene (Rubben *et al.*, 2022; Turner; Derezinski; *et al.*, 2023). Quanto à PCR Long-Read, um número maior de estudos descreve sua utilização para o enriquecimento da região de interesse (Gaedigk, A. *et al.*, 2007; van der Lee *et al.*, 2021; Ammar *et al.*, 2015; Chua *et al.*, 2025; Liao *et al.*, 2019). No entanto, apesar da ampla adoção da técnica, os protocolos publicados apresentam consideráveis diferenças entre si, sem a existência de um procedimento amplamente padronizado. Essa heterogeneidade experimental, constituída pelas enzimas empregadas, às concentrações dos reagentes e às condições de termociclagem, dificultam a reprodutibilidade desses métodos e, conseqüentemente, contribuem para a necessidade de repetidas etapas de otimização experimental e *troubleshooting*. Como resultado, o maior consumo de insumos e aumento do tempo despendido em laboratório tornam-se desafios relevantes pensando na implementação dessas metodologias no cenário da pesquisa acadêmica.

Nesse sentido, estabelecem-se perspectivas futuras de continuidade do projeto, visando otimizar os protocolos desenvolvidos para que haja a implementação do sequenciamento na plataforma MinION. Inicialmente, planeja-se adquirir reagentes e insumos necessários para a utilização do sistema Agilent

TapeStation®, uma plataforma de eletroforese automatizada capaz de fornecer análises mais sensíveis e acuradas da integridade e distribuição do tamanho dos fragmentos de DNA. A obtenção dessas informações será fundamental para avaliar a viabilidade e o desempenho das estratégias de enriquecimento empregadas, especialmente da abordagem baseada em clivagem por Cas9, permitindo uma caracterização mais precisa dos produtos gerados e superando parte das limitações observadas na eletroforese convencional.

Para a abordagem baseada em PCR Long-Range, destaca-se a necessidade de aperfeiçoamento das etapas de amplificação e purificação de amplicons de alto peso molecular. Para isso, pretende-se adquirir a Roche® KAPA Long-Range DNA polimerase, enzima frequentemente empregada em protocolos específicos ao *locus CYP2D6-CYP2D7* descritos na literatura, apresentando resultados consistentes em termos de rendimento e fidelidade (Effendi *et al.*, 2025; Gaedigk, A. *et al.*, 2007; Sheng *et al.*, 2007). Ademais, a otimização do protocolo mediante a utilização da enzima Takara® PrimeStar HS DNA Polimerase ainda não está descartada, dada sua robustez notável na amplificação de fragmentos longos (Jia *et al.*, 2014).

Adicionalmente, determina-se que, assim que estabelecido o protocolo de preparo de bibliotecas, serão realizadas as corridas de sequenciamento e a subsequente análise bioinformática. Os dados gerados permitirão avaliar mais precisamente os parâmetros de cobertura da região *CYP2D6-CYP2D7*, proporção de *reads on-target* e desempenho na identificação de variantes e demais alterações estruturais (Vereecke *et al.*, 2026). A comparação desses resultados com genótipos previamente determinados por metodologias convencionais nas amostras do biobanco utilizado possibilitará validar a abordagem proposta e definir parâmetros para sua futura aplicação em estudos farmacogenéticos e, potencialmente, na prática clínica.

Além dos aspectos metodológicos, os resultados deste trabalho reforçam a necessidade de ampliar os estudos farmacogenômicos em populações brasileiras. O Brasil apresenta uma das maiores populações recentemente miscigenadas do mundo, resultado da contribuição genética de povos indígenas, europeus e africanos, entre outros grupos populacionais. Em um estudo recente que buscou sequenciar o genoma de aproximadamente 3 mil brasileiros, cerca de 8 milhões de variantes genéticas previamente não descritas foram identificadas, das quais mais de 36 mil foram classificadas como potencialmente deletérias para a saúde (Nunes

et al., 2025). Esses dados evidenciam que porção importante da variabilidade genética, com potencial impacto na resposta aos medicamentos, permanece insuficientemente caracterizada no país. Nesse contexto, os objetivos propostos contribuem diretamente para a superação dessas limitações, visto que o desenvolvimento de metodologias capazes de detectar não apenas variantes previamente conhecidas, mas também variantes novas, raras e alterações estruturais complexas, torna-se essencial para a construção de um conhecimento farmacogenômico verdadeiramente representativo da população brasileira (Friedrich *et al.*, 2014; Torres-Loureiro *et al.*, 2022).

Por fim, a consolidação dessas abordagens poderá viabilizar sua aplicação em amostras populacionais de maior escala e sua integração a iniciativas nacionais da medicina de precisão, ampliando o conhecimento sobre a diversidade alélica de farmacogenes no Brasil. Além do *CYP2D6*, a adaptação dos protocolos desenvolvidos para outros farmacogenes de elevada relevância clínica e complexidade estrutural poderá contribuir para a incorporação do sequenciamento por *long reads* como uma ferramenta estratégica para a farmacogenômica e para a consolidação de políticas voltadas à personalização terapêutica no contexto brasileiro.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo buscou desenvolver e avaliar metodologias de preparo de bibliotecas genômicas para o sequenciamento do farmacogene *CYP2D6* pela plataforma Oxford Nanopore, com foco em duas estratégias de enriquecimento da região alvo: a clivagem mediada por CRISPR-Cas9, baseada no protocolo nCATS, e a amplificação por PCR Long-Range. Embora os resultados obtidos não tenham permitido a validação conclusiva de nenhuma das abordagens propostas, os experimentos conduzidos possibilitaram o estabelecimento e a adaptação de protocolos para ambas as estratégias, bem como a identificação de etapas críticas que deverão ser priorizadas nas etapas subsequentes do projeto.

No que se refere à estratégia de enriquecimento por CRISPR-Cas9, as três rodadas experimentais conduzidas permitiram identificar fatores determinantes para o desempenho da metodologia, como a composição do tampão de reação, o controle preciso das temperaturas de incubação e as limitações inerentes à avaliação da eficiência de clivagem por eletroforese convencional. Para a abordagem de PCR Long-Range, a obtenção de amplicons compatíveis com o tamanho esperado em duas amostras, após a otimização das condições reacionais com volume de 25 µL, demonstrou a viabilidade da metodologia, ao mesmo tempo em que evidenciou a necessidade de aprimoramento das etapas de amplificação e purificação de fragmentos de alto peso molecular.

De modo geral, os resultados reforçam que a padronização de metodologias voltadas à caracterização de farmacogenes complexos como o *CYP2D6* constitui um processo que demanda rigoroso controle das variáveis experimentais. Os achados gerados ao longo desta pesquisa fornecem subsídios para a continuidade do projeto a partir da definição de perspectivas futuras, as quais incluem a aquisição de insumos complementares, como a polimerase KAPA Long-Range e reagente para o sistema Agilent TapeStation, e a condução de novas rodadas experimentais visando à implementação do sequenciamento na plataforma MinION.

Por fim, este trabalho contribui para o avanço da farmacogenética no contexto brasileiro, ao buscar desenvolver metodologias robustas e adaptadas à diversidade genética de uma população altamente miscigenada e ainda insuficientemente caracterizada. A consolidação dessas abordagens representa um passo concreto em direção à implementação do sequenciamento por long reads como ferramenta

estratégica para a genotipagem do *CYP2D6*, com potencial impacto direto sobre a segurança e a eficácia do tratamento farmacológico no país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFANO, M. *et al.* Characterization of full-length CNBP expanded alleles in myotonic dystrophy type 2 patients by Cas9-mediated enrichment and nanopore sequencing. **eLife**, Cambridge, v. 11, p. e80229, ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.80229>.

AMMAR, R. *et al.* Long read nanopore sequencing for detection of *HLA* and *CYP2D6* variants and haplotypes. **F1000Research**, London, v. 4, n. 17, mai. 2015. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.6037.2>.

ARNEMANN, J. Long range PCR. In: GRESSNER, A. M.; ARNDT, T. (org.). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin: Springer Nature, 2019. p. 1529–1530. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3519.

AWADA, Z.; ZGHEIB, N. K. Pharmacogenovigilance: a pharmacogenomics pharmacovigilance program. **Pharmacogenomics**, London, v. 15, n. 6, p. 845–856, abr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.2217/pgs.14.44>.

BECQUEMONT, L. Pharmacogenomics of adverse drug reactions: practical applications and perspectives. **Pharmacogenomics**, London, v. 10, n. 6, p. 961–969, jun. 2009. DOI: <https://doi.org/10.2217/pgs.09.37>.

BEHJATI, S.; TARPEY, P. S. What is next generation sequencing? **Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition**, London, v. 98, n. 6, p. 236–238, dez. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>.

BENARROCH, L. *et al.* Comparative Analysis of CRISPR/Cas9-targeted Nanopore Sequencing Approaches in Repeat Expansion Disorders. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, Beijing, qzaf094, out. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1093/gpbjnl/qzaf094>.

CARVALHO HENRIQUES, B. *et al.* Methodology for clinical genotyping of *CYP2D6* and *CYP2C19*. **Translational Psychiatry**, New York, v. 11, n. 1, p. 596, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01717-9>.

CAUDLE, K. E. *et al.* Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). **Genetics in Medicine**, Baltimore, v. 19, n. 2, p. 215–223, fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/gim.2016.87>.

CHANG, W. C. *et al.* Challenges and Opportunities in Implementing Pharmacogenetic Testing in Clinical Settings. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 61, p. 65–84, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030920-025745>.

CHUA, E. W. *et al.* Nanopore sequencing-based genotyping suggested an association between *CYP2D6* function and susceptibility to anxiety and depression. **BMC research notes**, London, v. 18, n. 1, p. 88, fev. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-025-07156-9>.

CLINICAL PHARMACOGENETICS IMPLEMENTATION CONSORTIUM (CPIC). *CPIC*. 2026. Disponível em: <https://www.clinpgx.org/cpic>. Acesso em: 30 maio 2026.

DAVID, S. R. *et al.* Temperature dependent in vitro binding and release of target DNA by Cas9 enzyme. **Scientific Reports**, London, v. 12, n. 1, p. 15243, set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19485-x>.

DE FREITAS, G. R. M. *et al.* Drug-Related Morbidity in Brazil: A Cost-of-Illness Model. **Value in Health Regional Issues**, New York, v. 17, p. 150–157, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vhri.2018.07.002>.

DEAMER, D.; AKESON, M.; BRANTON, D. Three decades of nanopore sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 34, n. 5, p. 518–524, maio 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3423>.

DEANGELIS, M. M.; WANG, D. G.; HAWKINS, T. L. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n. 22, p. 4742–4743, nov. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/23.22.4742>.

DEL TREDICI, A. L. *et al.* Frequency of CYP2D6 Alleles Including Structural Variants in the United States. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 9, abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00305>.

DUTCH PHARMACOGENETICS WORKING GROUP (DPWG). *DPWG*. 2026. Disponível em: <https://www.clinpgx.org/page/dpwg>. Acesso em: 1 jun. 2026.

EFFENDI, R. *et al.* Distribution of CYP2D6 multiplication, CYP2D6*5, and clinical implications in postoperative patients receiving tramadol analgesia in the Minangkabau ethnic group, Indonesia. **F1000Research**, London, v. 13, p. 1526, 2025. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.155988.3>.

EISSENBERG, J. C.; AURORA, R. Pharmacogenomics: What the Doctor Ordered? **Missouri Medicine**, St. Louis, v. 116, n. 3, p. 217–225, mai. 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6690297/>. Acesso em: 28 mai. 2026.

EXXTEND. 2026. Disponível em: <https://www.exxtend.com.br>. Acesso em: 2 jun. 2026.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *FDA*. 2026. Disponível em: <https://www.fda.gov/>. Acesso em: 29 maio 2026.

FRIEDRICH, D. C. *et al.* Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e110691, out. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110691>.

GAEDIGK, A. *et al.* Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: characterization of gene duplication events. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 81, n. 2, p. 242–251, fev. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100033>.

GAEDIGK, A. *et al.* The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 83, n. 2, p. 234–242, fev. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100406>.

GAEDIGK, A. *et al.* Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. **Genetics in Medicine**, Baltimore, v. 19, n. 1, p. 69–76, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/gim.2016.80>.

CLINPGX. *Gene-specific information tables for CYP2D6*. **ClinPGx**. [S.d.]. Disponível em: <https://www.clinpgx.org/page/cyp2d6RefMaterials>. Acesso em: 31 maio 2026.

GILPATRICK, T. *et al.* Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation. **Nature Biotechnology**, New York, v. 38, n. 4, p. 433–438, abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0407-5>.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 17, n. 6, p. 333–351, mai. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. **Cold Spring Harbor Protocols**, Cold Spring Harbor, n. 1, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.top100388>.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Long and Accurate Polymerase Chain Reaction (LA PCR). **Cold Spring Harbor Protocols**, Cold Spring Harbor, n. 3, mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095158>.

HAKKARAINEN, K. M. *et al.* Percentage of patients with preventable adverse drug reactions and preventability of adverse drug reactions--a meta-analysis. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e33236, mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033236>.

HART, J. R. Ethylenediaminetetraacetic Acid and Related Chelating Agents. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Washington: John Wiley & Sons, Ltd, 2000. DOI: https://doi.org/10.1002/14356007.a10_095.

HICKS, J. K. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of selective serotonin reuptake inhibitors. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, St. Louis, v. 98, n. 2, p. 127–134, jun. 2015. DOI: 10.1002/cpt.147.

HICKS, J. K.; SWEN, J. J.; GAEDIGK, A. Challenges in CYP2D6 phenotype assignment from genotype data: a critical assessment and call for standardization. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 15, n. 2, p. 218–232, fev. 2014. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389200215666140202215316>.

PHARMCAT. *Home*. 2026. Disponível em: <https://pharmcat.clinpgx.org/>. Acesso em: 8 jun. 2026.

ILLUMINA. *Bead types in Illumina library preparation kits*. 2026. Disponível em: https://knowledge.illumina.com/library-preparation/general/library-preparation-general-reference_material-list/000003342. Acesso em: 7 jun. 2026.

JAIN, M. *et al.* The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. **Genome Biology**, London, v. 17, n. 1, p. 239, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>.

JANSSON, L.; HEDMAN, J. Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase. **Biomolecular Detection and Quantification**, [S.l.], v. 17, p. 100082, 1 mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100082>.

JARVIS, J. P.; PETER, A. P.; SHAMAN, J. A. Consequences of CYP2D6 Copy-Number Variation for Pharmacogenomics in Psychiatry. **Frontiers in Psychiatry**, Munich, v. 10, p. 432, mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00432>.

JIA, H. *et al.* Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. **Scientific Reports**, St. Louis, v. 4, p. 5737, jul. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep05737>.

KANE, M. CYP2D6 Overview: Allele and Phenotype Frequencies. In: *Medical Genetics Summaries* [Internet]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US), jan. 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574601/>. Acesso em: 30 mai. 2026.

KONGKAEW, C.; NOYCE, P. R.; ASHCROFT, D. M. Hospital admissions associated with adverse drug reactions: a systematic review of prospective observational studies. **The Annals of Pharmacotherapy**, Cincinnati, v. 42, n. 7, p. 1017–1025, jul. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1345/aph.1L037>.

KOOPMANS, A. B. *et al.* Meta-analysis of probability estimates of worldwide variation of CYP2D6 and CYP2C19. **Translational Psychiatry**, New York, v. 11, n. 1, p. 141, fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01129-1>.

LABUN, K. *et al.* CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. **Nucleic Acids Research**, London, v. 47, n. W1, p. W171–W174, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 19, p. 5444, out. 1991. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>.

LEVY, S. E.; MYERS, R. M. Advancements in Next-Generation Sequencing. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 17, p. 95–115, ago. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022413>.

LIAU, Y. *et al.* Nanopore sequencing of the pharmacogene CYP2D6 allows simultaneous haplotyping and detection of duplications. **Pharmacogenomics**, London, v. 20, n. 14, p. 1033–1047, set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0080>.

OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. *Ligation Sequencing gDNA – Cas9 Enrichment (SQK-LSK109)*. Oxford Nanopore Technologies. jul. 2018. Disponível em: <https://nanoporetech.com/document/cas9-targeted-sequencing>. Acesso em: 1 jun. 2026.

LIN, J. H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic variability: a daunting challenge in drug therapy. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 8, n. 2, p. 109–136, fev. 2007. DOI: <https://doi.org/10.2174/138920007779816002>.

LIU, D. *et al.* An SPRI beads-based DNA purification strategy for flexibility and cost-effectiveness. **BMC genomics**, London, v. 24, n. 1, p. 125, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09211-w>.

LIU, L. *et al.* Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, Akron, v. 2012, p. 251364, jul. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/251364>.

LÓPEZ-GIRONA, E. *et al.* CRISPR-Cas9 enrichment and long read sequencing for fine mapping in plants. **Plant Methods**, London, v. 16, p. 121, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00661-x>.

LU, H.; GIORDANO, F.; NING, Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, Beijing, v. 14, n. 5, p. 265–279, out. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>.

MARQUES-GARCIA, F.; MARTINEZ-BRAVO, C. A review of pharmacogenomics in the individualization of pharmacological treatment: present and future. **Journal of Laboratory and Precision Medicine**, Hong Kong, v. 11, jan. 2026. DOI: <https://doi.org/10.21037/jlpm-25-9>.

MCDONALD, T. L. *et al.* Cas9 targeted enrichment of mobile elements using nanopore sequencing. **Nature Communications**, New York, v. 12, n. 1, p. 3586, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23918-y>.

MOJICA, F. J. *et al.* Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 244–246, abr. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.

MÜLLER, D. J.; RIZHANOVSKY, Z. From the Origins of Pharmacogenetics to First Applications in Psychiatry. **Pharmacopsychiatry**, Stuttgart, v. 53, n. 4, p. 155–161, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1055/a-0979-2322>.

NEW ENGLAND BIOLABS (NEB). rCutSmart™ Buffer. Disponível em: <https://www.neb.com/en/products/b6004-rcutsmart-buffer>. Acesso em: 1 jun. 2026.

NOFZIGER, C. *et al.* PharmVar GeneFocus: CYP2D6. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 107, n. 1, p. 154–170, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpt.1643>.

NUNES, K. *et al.* Admixture's impact on Brazilian population evolution and health. **Science**, New York, v. 388, n. 6748, p. ead13564, mai. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.adl3564>.

OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. ONT. Disponível em: <https://nanoporetech.com/>. Acesso em: 1 jun. 2026.

PETROVIĆ, J.; PEŠIĆ, V.; LAUSCHKE, V. M. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. **European Journal of Human Genetics**, Basel, v. 28, n. 1, p. 88–94, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0480-8>.

PHARMVAR. *PharmVar*. 2026. Disponível em: <https://www.pharmvar.org/>. Acesso em: 29 maio 2026.

PHARMVAR. *CYP2D6*. Disponível em: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>. Acesso em: 30 maio 2026.

QIAO, W. *et al.* Integrated CYP2D6 interrogation for multiethnic copy number and tandem allele detection. **Pharmacogenomics**, London, v. 20, n. 1, p. 9–20, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.2217/pgs-2018-0135>.

RAY, B. *et al.* CYP2D6 haplotypes with enhancer single-nucleotide polymorphism rs5758550 and rs16947 (*2 allele): implications for CYP2D6 genotyping panels. **Pharmacogenetics and Genomics**, Hagerstown, v. 29, n. 2, p. 39–47, fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000363>.

RELLING, M. V.; EVANS, W. E. Pharmacogenomics in the clinic. **Nature**, New York, v. 526, n. 7573, p. 343–350, out. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature15817>.

RODRIGUES-SOARES, F. *et al.* Genomic Ancestry, CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 Among Latin Americans. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 107, n. 1, p. 257–268, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpt.1598>.

RUBBEN, K. *et al.* Cas9 targeted nanopore sequencing with enhanced variant calling improves CYP2D6-CYP2D7 hybrid allele genotyping. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 18, n. 9, p. e1010176, set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010176>.

SATAM, H. *et al.* Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. **Biology**, Basel, v. 12, n. 7, p. 997, jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology12070997>.

SCHWARZ, U. I.; GULILAT, M.; KIM, R. B. The Role of Next-Generation Sequencing in Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Cold Spring Harbor, v. 9, n. 2, p. a033027, fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033027>.

SHENG, H. *et al.* Allelic distributions of CYP2D6 gene copy number variation in the Eastern Han Chinese population. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 28, n. 2, p. 279–286, fev. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00479.x>.

BECKMAN COULTER. *SPRIselect Beads | Size Selection Reagent*. Disponível em: <https://www.beckman.com/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/size-selection>. Acesso em: 8 jun. 2026.

STORTCHEVOI, A.; KAMELAMELA, N.; LEVINE, S. S. SPRI Beads-based Size Selection in the Range of 2-10kb. **Journal of Biomolecular Techniques: JBT**,

Santa Fe, v. 31, n. 1, p. 7–10, abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.7171/jbt.20-3101-002>.

SURIYA, D. *et al.* Genetic Determinants of Drug Response Variability: A Pharmacogenomic Investigation. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, mar. 2026. DOI: <https://doi.org/10.4238/v2bk1748>.

SYNTHEGO. *Your Guide to CRISPR & Molecular Diagnostics*. Disponível em: <https://www.synthego.com/>. Acesso em: 9 jun. 2026.

TAKARA. *PrimeSTAR HS DNA Polymerase*. Disponível em: <https://www.takarabio.com/products/pcr/high-fidelity-pcr/primestar-hs-dna-polymerase>. Acesso em: 1 jun. 2026.

AGILENT. *Tapestation Automated Electrophoresis for DNA & RNA Quality Control*. Disponível em: <https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/tapestation-systems?srltid=AfmBOOpUNllykpY89sJ-zxoUVvwpJl3leo1ta2IJZuz9FGCCtZ93-e9T>. Acesso em: 9 jun. 2026.

TAYLOR, C. *et al.* A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics. **Genes**, Basel, v. 11, n. 11, p. 1295, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11111295>.

THORN, C. F.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. *PharmGKB: The Pharmacogenomics Knowledge Base*. In: INNOCENTI, F.; VAN SCHAIK, R. H. N. (org.). **Pharmacogenomics: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 311–320. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-435-7_20. Acesso em: 29 maio 2026.

TORRES-LOUREIRO, S. *et al.* Pharmacogenetics research in Brazil: a systematic review. **Pharmacogenomics**, London, v. 23, n. 4, p. 263–275, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.2217/pgs-2021-0128>.

THERMOFISHER. *TrueCut™ Cas9 Protein v2 10 mg. INVITROGEN™*. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/br/en/A36496>. Acesso em: 9 jun. 2026.

TURNER, A. J. *et al.* Characterization of complex structural variation in the CYP2D6-CYP2D7-CYP2D8 gene loci using single-molecule long-read sequencing. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 14, jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1195778>.

TURNER, A. J. *et al.* PharmVar Tutorial on CYP2D6 Structural Variation Testing and Recommendations on Reporting. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 114, n. 6, p. 1220–1237, dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpt.3044>.

VAN DER LEE, M. *et al.* Toward predicting CYP2D6-mediated variable drug response from CYP2D6 gene sequencing data. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 13, n. 603, p. eabf3637, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf3637>.

VAN DER LEE, M. *et al.* Technologies for Pharmacogenomics: A Review. **Genes**, Basel, v. 11, n. 12, p. 1456, n. 12, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11121456>.

VAN DER MAAS, S. *et al.* Dynamic star allele definitions in Pharmacogenomics: impact on diplotype calls, Phenotype predictions and statin therapy recommendations. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 16, p. 1584658, maio 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1584658>.

VEREECKE, N. *et al.* Improved Cas9-targeted nanopore sequencing facilitates ultra-deep analysis of genomic variation. **Cell Reports Methods**, New York, v. 6, n. 5, p. 101410, abr. 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2026.101410>.

WAGGOTT, W. Long-Range Polymerase Chain Reaction. *In*: RAPLEY, R. (org.). **The Nucleic Acid Protocols Handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p. 633–641. DOI: <https://doi.org/10.1385/1-59259-038-1:633>. Acesso em: 9 jun. 2026.

WARBURTON, P. E.; SEBRA, R. P. Long-Read DNA Sequencing: Recent Advances and Remaining Challenges. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, London, v. 24, p. 109–132, ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-101722-103045>.

WHIRL-CARRILLO, M. *et al.* An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 110, n. 3, p. 563–572, set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpt.2350>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *WHO calls for urgent action by countries for achieving Medication Without Harm*. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/16-09-2022-who-calls-for-urgent-action-by-countries-for-achieving-medication-without-harm>. Acesso em: 28 maio 2026.

XIE, S. *et al.* Simultaneous detection of methylation and genetic variations of BCR-ABL1 gene by nanopore Cas9-targeted sequencing. **Genes & Diseases**, Chongqing, v. 11, n. 6, p. 101190, nov. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.101190>.

YANG, Y. *et al.* Sequencing the CYP2D6 gene: from variant allele discovery to clinical pharmacogenetic testing. **Pharmacogenomics**, London, v. 18, n. 7, p. 673–685, mai. 2017. DOI: <https://doi.org/10.2217/pgs-2017-0033>.

YING, Y.-L. *et al.* Nanopore-based technologies beyond DNA sequencing. **Nature Nanotechnology**, London, v. 17, n. 11, p. 1136–1146, nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01193-2>.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, St. Louis, v. 138, n. 1, p. 103–141, abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.

ZHANG, Y. *et al.* CYP3A4 and CYP3A5: the crucial roles in clinical drug metabolism and the significant implications of genetic polymorphisms. **PeerJ**, Corte Madera, v. 12, p. e18636, dez. 2024. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.18636>.

ZHOU, Y.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; LAUSCHKE, V. M. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 102, n. 4, p. 688–700, out. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpt.690>.

ZHU, Y. Advances in CRISPR/Cas9. **BioMed Research International**, New York, v. 2022, p. 9978571, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/9978571>.

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação de metodologias de análise genética em CYP2D6 uma amostragem da população brasileira

Pesquisador: Marilu Fiegenbaum

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 77729524.9.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.845.404

Apresentação do Projeto:

Trata-se de análise de resposta ao parecer pendente n. 6.722.961 emitido pelo CEP em 25/03/2024. As informações elencadas neste campo foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2290938, DE 09/04/2024 versão 2).

Estudo de implementação e padronização de metodologias para detecção de variantes genéticas. O estudo original em que a amostra foi coletada tinha um desenho observacional, com coleta de dados visando uma caracterização populacional. A farmacogenômica estuda a influência da variabilidade genética na resposta a fármacos, objetivando individualizar a prescrição de medicamentos baseada no genoma do paciente para minimizar a ocorrência de eventos adversos e melhorar a eficácia. A incorporação de dados genéticos em sistemas de saúde tem desafios diversificados, incluindo a identificação de reações adversas ou falhas terapêuticas, treinamento de equipes de saúde, assim como a utilização de ferramentas moleculares capazes de captar a variabilidade genética em grande escala. Dentre os farmacogenes importantes, destaca-se o gene que codifica a enzima CYP2D6 responsável por metabolizar mais de 25% de todos os medicamentos prescritos. Esse gene apresenta mais de 170 variantes alélicas descritas resultando em distintos fenótipos metabolizadores. Outro ponto

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245, prédio 03, sala 605

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 6.845.404

importante é a ampla variabilidade populacional das variações gênicas de CYP2D6, o que torna mais difícil detectar todas as suas variações em populações miscigenadas. As metodologias atualmente utilizadas não são robustas o suficiente para a caracterização de populações com genótipos ainda desconhecidos. A partir dessa demanda, o sequenciamento de nova geração (NGS) representa uma tecnologia de sequenciamento em larga escala com potencial relevância como uma plataforma abrangente de genotipagem e identificação de novas variantes genéticas. O presente projeto tem como objetivo a utilização de um banco de dados de amostras da população brasileira previamente genotipadas para padronização de sequenciamento de nova geração bem como análise e predição de fenótipos dessa população.

O estudo será conduzido com amostras de DNA com genótipos conhecidos de CYP2D6 previamente determinados através de técnicas baseadas em PCR. Estas amostras são provenientes do estudo „Caracterização de polimorfismos de interesse farmacogenético e correlação com a ancestralidade genética“, realizado pela Rede Nacional de Farmacogenética (REFARGEN) com resultados publicados em (Friedrich et al., 2014). No referido trabalho, foram analisadas 13 variações genéticas: -1584C>G (rs1080985), 31G>A (rs769258), 100C>T (rs1065852), 1023C>T (rs28371706), 1846G>A (rs3892097), 2549A>del (rs35742686), 2615_2617delAAG (rs28371720), 2850C>T (rs16947), 2988G>A (rs28371725), 3183G>A (rs59421388), 4180G>C (rs1135840), assim como a deleção e a duplicação completa do gene.

Todos os participantes concordaram em participar de estudos sobre variabilidade genética, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, então amostras de sangue foram coletadas para extração de DNA. O projeto que prevê a avaliação desta amostra em estudos de farmacogenética/farmacogenômica/variabilidade genética foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer sob coordenação do Dr. Guilherme Suarez-Kurtz (Anexo 2) e posteriormente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (57392616.7.0000.5345, Anexo 3). Cabe ressaltar que não existem bancos de dados que vinculem as amostras de DNA com a identificação dos indivíduos e suas informações clínicas ou pessoais. Os dados disponíveis no banco de dados para o presente estudo são da região brasileira de origem da amostra; cor autodeclarada (branca, parda, preta, amarela e indígena), conforme padrão do IBGE; a ancestralidade determinada por marcadores genéticos e genótipos de diferentes genes associados ao metabolismo farmacológico.

As avaliações previstas no presente projeto não incluem novas coletas ou intervenções com os indivíduos participantes, apenas a identificação de variações genéticas através de nova metodologia molecular (sequenciamento de nova geração). Este estudo será realizado após

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245, prédio 03, sala 605
Bairro: Sarmento **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 6.845.404

apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Sequenciamento de nova geração: Este projeto prevê a testagem de duas plataformas de sequenciamento de alta performance (NGS) para captura das variantes no gene CYP2D6. Este gene é altamente polimórfico, com mais de 170 alelos, entre os quais encontram grandes deleções e duplicações gênicas completas. A primeira plataforma será Illumina MiSeq, com preparo de bibliotecas a partir de amplicons e a segunda será a plataforma MinION (Oxford Nanopore), utilizando preparo de biblioteca através de CRISPR-Cas9 (RNA guias).

Objetivo da Pesquisa:

As informações elencadas neste campo foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2290938, DE 09/04/2024 versão 2).

Objetivo Primário:

Este projeto prevê a testagem de duas plataformas de sequenciamento de alta performance (NGS) para captura das variantes no gene CYP2D6 em amostras previamente genotipadas para 13 variantes já descritas no gene.

Objetivo Secundário:

Padronizar e implementar o sequenciamento NGS Illumina para o gene CYP2D6;

Padronizar e implementar o sequenciamento por Minion nanopore para o gene CYP2D6;

Comparar os genótipos e fenótipos estimados através das plataformas de NGS com os genótipos já disponíveis na amostra;

Comparação das metodologias NGS quanto à sensibilidade na captura de variantes e performance (tempo de execução, tempo de análise e custo);

Descrever possíveis novas variantes;

Gerar protocolo para avaliação da variabilidade de CYP2D6 através de NGS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As informações elencadas neste campo foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2290938, DE 09/04/2024 versão 2).

Riscos:

Por se tratar de uma pesquisa que utilizará análise de variantes genéticas em uma amostras já

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245, prédio 03, sala 605

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 6.845.404

coletada com esta finalidade e por não envolver a correlação destas variantes com informações clínicas ou pessoais, este estudo não apresenta risco aos participantes.

Benefícios:

Os benefícios deste estudo podem ser obtidos a médio prazo através da implementação de testes farmacogenéticos na prática clínica, permitindo a individualização terapêutica com redução de riscos de efeitos adversos e falha terapêutica. Os dados gerados com este projeto permitirão conhecer de maneira completa a variabilidade de um farmacogene extremamente importante para individualização de tratamentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme Informações Básicas do projeto na PB, trata-se de estudo nacional e não randomizado. Patrocinado pela Chamada CNPq/MCTI No 10/2023 - Faixa A - Grupos Emergentes - Processo: 403567/2023-8 pela proponente Marilu Fiegenbaum 780.152.510-87. Número de participantes incluídos no Brasil: 1200 amostras de DNA. Centros de pesquisa participantes no Brasil: INCA. Armazenamento de amostras em banco de material biológico no Brasil: sim. Previsão de início e encerramento do estudo: 01/05/2024 a 14/01/2027

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados de forma adequada.

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a análise, a relatoria do projeto solicitou a inclusão e/ou os esclarecimentos necessário(s) no(s) documento(s), seguidos pela resposta do pesquisador e análise respectiva:

1-PENDENCIA: a solicitação de dispensa do TCLE, justificada pelo pesquisador por tratar-se de uma amostra coletada para fins de avaliação populacional de variabilidade genética, sem identificado do indivíduo com os dados contidos no banco de dados, sendo que os projetos prévios realizados com esta mesma amostra já foram aprovados pelos CEPs (comprovações de aprovação anexados ao projeto), e por tratar-se de um projeto que objetiva a implementação de metodologias novas para detecção de variabilidade genética, já prevista no projeto original- é necessário anexar a este projeto a cópia do TCLE do projeto original intitulado "Caracterização de polimorfismos de interesse farmacogenético e correlação com a

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245, prédio 03, sala 605
Bairro: Sarmento **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 6.845.404

ancestralidade genética, realizado pela Rede Nacional de Farmacogenética, para caracterizar a informação dada pelo pesquisador de que os participantes concordaram em participar de estudos sobre variabilidade genética, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Caso não seja possível a disponibilização deste TCLE, sugerimos a inclusão de carta do coordenador do projeto acima referido informando a cedência das amostras ao Lab de Biologia Molecular da UFCSPA e anuência da utilização destas amostras neste projeto.

RESPOSTA: O projeto original foi conduzido há muito tempo e desta maneira não conseguimos recuperar o termo de consentimento original com o coordenador Guilherme Suarez-Kurtz. Conforme sugerido pelo CEP como alternativa, foi anexado um termo de anuência para realização do projeto e guarda do material biológico pela coordenadora do projeto aqui proposto. Este termo de anuência foi citado no projeto (marcado em amarelo na versão 2 do projeto) e incluído como um anexo na plataforma Brasil. ANÁLISE: Atendida.

OBS: Para futuros projetos envolvendo o uso das amostras deste banco haverá a necessidade de incluir nova anuência do coordenador do projeto original especificamente para cada projeto apresentado ao CEP.

CONCLUSÃO: Aprovado.

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar o(s) relatório(s) - parciais e final - da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo 'relatório' para que sejam devidamente apreciadas no CEP, conforme Norma Operacional CNS nº 001/12, item XI.2.d.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2290938.pdf	09/04/2024 15:55:50		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_respostaCEP_assinado.pdf	09/04/2024 15:54:49	Marilu Fiegenbaum	Aceito
Declaração de concordância	anexoanuenciaGUILHERME.pdf	09/04/2024 15:52:15	Marilu Fiegenbaum	Aceito
Projeto Detalhado	FiegenbaumCYP2D6_versao2.pdf	09/04/2024	Marilu Fiegenbaum	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245, prédio 03, sala 605
Bairro: Sarmento **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 6.845.404

/ Brochura Investigador	FiegenbaumCYP2D6_versao2.pdf	15:51:47	Marilu Fiegenbaum	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	FiegenbaumCYP2D6.docx	23/02/2024 10:57:15	Marilu Fiegenbaum	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoFiegenbaum.pdf	23/02/2024 10:44:24	Marilu Fiegenbaum	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anexo4_termo_anuencia.pdf	23/02/2024 10:37:59	Marilu Fiegenbaum	Aceito
Outros	anexo5.pdf	21/02/2024 14:58:50	RAISSA NUNES DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 23 de Maio de 2024

Assinado por:
Fernanda Bordignon Nunes
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245, prédio 03, sala 605
Bairro: Sarmento **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br