

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CYP3A65 de *Danio rerio* como responsável pela metabolização de escitalopram: uma abordagem por biologia computacional

Lucas Mizuki Leme

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba, MG
Outubro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CYP3A65 de *Danio rerio* como responsável pela metabolização de escitalopram: uma
abordagem por biologia computacional**

Lucas Mizuki Leme
Discente

Profa. Dra. Carla Patrícia Bejo Wolkers
Orientadora

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende
Coorientador

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba, MG
Outubro – 2021

Dedico este trabalho à minha família por sempre me incentivar e me apoiar nas minhas decisões. Tenho muito a retribuí-los. Principalmente ao meu avô que sempre foi muito atencioso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço profundamente à Deus, pois graças a ele me foi concedida a dádiva da vida onde tenho a permissão de desfrutar de uma boa saúde, bons estudos, um lar aconchegante, boa educação, pais maravilhosos, etc. Agradeço aos meus pais que me incentivaram a ir para uma universidade pública e por me acompanharem durante toda a graduação. Graças aos seus esforços e por sempre trabalharem arduamente para pagarem meus estudos, a minha alimentação, meu conforto, etc., pude ter a permissão de chegar até aqui e ainda de continuar me desenvolvendo constantemente buscando me tornar a cada dia uma pessoa melhor. Agradeço a todos os integrantes da Família Mizuki e da Família Lemes por serem pessoas que sempre procuram manter uma relação harmônica e que mesmo quando estão distantes um do outro procuram ligar para saber como o outro está. Obrigado por sempre estarem me apoiando e espero, algum dia, poder retribuí-los diretamente e/ou indiretamente.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia e a coordenação do meu curso por proporcionar um bom espaço a todos os estudantes para aprimorar seus estudos e sempre atendê-los da melhor forma possível. Agradeço ao PET Bio pontal e a todos os integrantes por me permitirem aprender e ver o mundo com outros olhos, pude ter uma formação melhor como pessoa graças a vocês e a tudo que o grupo proporcionou. Agradeço em especial a minha orientadora Carla Wolkers por não me abandonar mesmo nos momentos mais difíceis da sua vida, por ter me apresentado a Fisiologia e me acolher amorosamente no PET. E também ao meu coorientador Alexandre Rezende por me fazer gostar de Genética, por sempre ser atencioso e me ensinar que “tudo bem não estar bem as vezes”. Agradeço também a Luciana Calábria e o Leonardo Marson por aceitarem o convite em fazer parte da banca examinadora e por colocarem suas contribuições nesse trabalho.

Agradeço aos meus amigos Amanda, Fernanda, David, Rafael, Bruna, Gabriela e Beatriz por sempre me ensinarem e me apoiarem. Embora não tenha mais tanto contato com alguns, os considero muito, pois fizeram parte de momentos importantes durante a minha formação. Agradeço aos meus colegas mais próximos Gabriela Ganzelli, por me fazer rir muito e se desesperar junto comigo em diversos momentos, principalmente trabalho em grupo ou em dupla; Beatriz dos Santos, por me acompanhar no vôlei, ser atenciosa, me ajudar, trabalhar comigo em algumas disciplinas e por sempre me ensinar a “pensar duas vezes antes de falar” (vou continuar tentando); Karen, por me ensinar a abrir minha mente para filmes e me interessar a comer comida vegana; Sofia, por sempre me acalmar em diversos momentos de euforia e também por sempre procurar me ajudar; Giulia, por

me acompanhar na trajetória PET e por compartilhar suas ideias incríveis. Desejo boa sorte a todos na trajetória que desejarem percorrer!

RESUMO

A depressão é um dos transtornos mentais mais comuns na sociedade atual, podendo ser classificada em: Transtorno Depressivo Maior, Transtorno Dístimico e Transtorno Depressivo Sem Outra Especificação. Seu tratamento é realizado, principalmente, pelo uso de antidepressivos. Estes medicamentos são divididos em diversas classes, sendo uma delas a dos Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina, na qual está o escitalopram, considerado o composto mais potente, seletivo e eficaz na inibição da recaptação da serotonina comparado com os demais antidepressivos da mesma classe. Em *Homo sapiens*, o escitalopram é metabolizado no fígado pela ação das enzimas do citocromo P450 (CYP450), CYP2C19, CYP3A4 e CYP2D6. O presente estudo objetivou avaliar a similaridade entre as enzimas associadas à metabolização do escitalopram em seres humanos e em *zebrafish* (*Danio rerio*), com intuito de subsidiar o uso deste peixe como modelo biológico para os estudos dos efeitos do escitalopram e seus metabólitos. Por meio de ferramentas de biologia computacional e a análise de similaridade da sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da enzima CYP2D6 foi possível demonstrar que a enzima CYP3A65 de *D. rerio* é candidata na biotransformação do escitalopram nesta espécie. Este resultado baseia-se em análises realizadas *in silico* e em dados já existentes na literatura, substanciando a necessidade da realização de experimentos *in vivo* para comprovar o papel da CYP3A65 na metabolização do escitalopram e dos seus metabólitos formados.

Palavras-chave: serotonina; CYP450; *in silico*; *Homo sapiens*; *zebrafish*.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	OBJETIVO.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3.	METODOLOGIA.....	16
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1	Via de metabolização do escitalopram em <i>H. sapiens</i>	18
4.2	Relação do complexo CYP450 e a metabolização do escitalopram em humanos.....	19
4.2.1.	Citocromo P450 família 2 subfamília C membro 19 (CYP2C19) [<i>Homo sapiens</i> (humano)].....	20
4.2.2.	Citocromo P450 família 2 subfamília D membro 6 (CYP2D6) [<i>Homo sapiens</i> (humano)].....	22
4.2.3.	Citocromo P450 família 3 subfamília A membro 4 (CYP3A4) [<i>Homo sapiens</i> (humano)].....	24
4.3	Análise comparativa dos genes CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 de <i>H. sapiens</i> e <i>D. rerio</i>	26
4.4	Citocromo P450 em zebrafish.....	27
4.4.1.	Citocromo P450 família 2 subfamília X membro 6 (CYP2X6) [<i>Danio rerio</i> (zebrafish)].....	29
4.4.2.	Citocromo P450 família 3 subfamília A membro 65 (CYP3A65) [<i>Danio rerio</i> (zebrafish)].....	31
5.	CONCLUSÃO.....	34
6.	REFERÊNCIAS.....	35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Proteína transportadora de 5-HT (SERT) em <i>Homo sapiens</i>	12
Figura 2.	Destaque dos sítios de ligação da SERT para o escitalopram. Setas indicam a ligação do escitalopram no sítio de ligação primário/central (A) e no sítio de modulação alostérica (B).....	12
Figura 3.	Escitalopram e seus metabólitos.....	19
Figura 4.	Localização cromossômica do gene <i>CYP2C19</i> no cromossomo 10 (10q23.33), destacado pelo traço em azul.....	21
Figura 5.	Análise transcriptômica do gene <i>CYP2C19</i> de <i>Homo sapiens</i> (Gene ID: 1557) em diferentes tecidos, expresso em RPKM (<i>reads per kilobase por milion mapped reads</i>).....	22
Figura 6.	Localização cromossômica do gene <i>CYP2D6</i> no cromossomo 22 (22q13.2), destacado pelo traço em azul.....	23
Figura 7.	Análise transcriptômica do gene <i>CYP2D6</i> de <i>Homo sapiens</i> (Gene ID: 1565) em diferentes tecidos, expresso em RPKM (<i>reads per kilobase por milion mapped reads</i>).....	24
Figura 8.	Localização cromossômica do gene <i>CYP3A4</i> no cromossomo 7 (7q22.1), destacado pelo traço em azul.....	25
Figura 9.	Análise transcriptômica do gene <i>CYP3A4</i> de <i>Homo sapiens</i> (Gene ID: 1576) em diferentes tecidos, expresso em RPKM (<i>reads per kilobase por milion mapped reads</i>).....	26
Figura 10.	Alinhamento entre o gene <i>CYP2D6</i> (<i>H. sapiens</i>) e <i>CYP2X6</i> (<i>D. rerio</i>).....	27
Figura 11.	Alinhamento entre o gene <i>CYP3A4</i> (<i>H. sapiens</i>) e <i>CYP3A65</i> (<i>D. rerio</i>).....	28
Figura 12.	Gene <i>CYP2X6</i> e suas variantes	30
Figura 13.	Gene <i>CYP3A65</i>	32
Figura 14.	Alinhamento entre as enzimas <i>CYP3A4</i> (<i>H. sapiens</i>) e <i>CYP3A65</i> (<i>D. rerio</i>).....	33

1. INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno de humor crônico que gera impactos profundos na vida do indivíduo, assim como na vida das pessoas que convivem com ele (AGUIAR et al., 2011). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V, os transtornos depressivos podem ser classificados em transtorno disruptivo da regulação do humor, transtorno depressivo maior, transtorno depressivo persistente (distímia), transtorno disfórico pré-menstrual, transtorno depressivo induzido por substância ou medicamento, transtorno depressivo devido à outra condição médica e transtorno depressivo não especificado (DMS-V, 2013). O transtorno depressivo maior representa a condição clássica deste grupo de transtornos, caracterizado pela presença de humor triste, vazio ou irritável, acompanhada de alterações somáticas e cognitivas (DMS-V, 2013).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2021), estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, quase 4% da população mundial, sofrem com transtornos depressivos. Este número corresponde a 39,1% dos brasileiros, segundo uma pesquisa realizada pela Secretaria de Atenção Primária à Saúde (SAPS, 2020). Esta doença é gerenciada em estabelecimentos de atenção primária de saúde, que, em tese, concedem aos pacientes os suportes e tratamentos necessários. No Brasil, estes locais são conhecidos como Unidades de Saúde da Família, Estratégia de Saúde da Família, Programa Saúde na Hora, entre outros (PINCUS et al., 2001; BRASIL, 2021).

As causas biológicas da depressão estão geralmente relacionadas às alterações bioquímicas cerebrais, tais como flutuações nos níveis de neurotransmissores em regiões encefálicas específicas. Além disso, a depressão pode ocorrer devido a causas genéticas, muitas vezes hereditárias. A combinação entre fatores genéticos e ambientais resultantes de situações emocionais estressantes, pode induzir à depressão (ROSHDY; SHOMAN, 2004).

O principal tratamento medicamentoso voltado para a depressão é o uso de antidepressivos, os quais são fármacos que possuem efeitos de longa duração e que são aplicados a inúmeros pacientes com transtornos mentais (BRAMBILLA; MATTIOLI; MARTELLI, 2009; COBANOGU et al., 2017). Os antidepressivos foram desenvolvidos, pela primeira vez, em 1952 durante estudos para o tratamento da tuberculose com o composto iproniazida, que além de apresentar efeito antimicobacteriano, possui propriedades psicoativas por diminuir a degradação enzimática das monoaminas noradrenalina (NE), serotonina (5-HT) e dopamina (DA) por meio da inibição da enzima mitocondrial monoamina oxidase (MAO), originando a classe de medicamentos

conhecida como inibidores da monoamina oxidase (IMAOs) (JOSEPH, 2003). Posteriormente foram sintetizadas outras classes, como os antidepressivos tricíclicos (ATCs), tetracíclicos (ATeCs), inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRSs), inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSNs), inibidores seletivos de recaptação de serotonina-noradrenalina (ISRSNs), inibidores seletivos de recaptação de noradrenalina (ISRNs) e os inibidores seletivos de recaptação de dopamina (ISRDs) (JOSEPH, 2003; THEN et al., 2017).

A classe dos ISRSs foi desenvolvida a partir de 1970 (JOSEPH, 2003). Dentre os antidepressivos presentes nesta classe, está o citalopram e o escitalopram, sendo este último, o enântiômero-S ativado do antidepressivo citalopram (RS-citalopram). Apesar de ambos pertencerem ao grupo dos ISRSs, o escitalopram é o composto mais potente, seletivo e eficaz em inibir a recaptação da 5-HT comparado com os demais (MURDOCH; KEAM; 2005).

O escitalopram possui maior grau de seletividade para a proteína transportadora de 5-HT (SERT), que realiza a recepção da 5-HT na fenda sináptica, quando comparado a outros antidepressivos pertencentes à classe dos ISRSs, como a sertralina e a paroxetina. Esta maior seletividade torna menos provável a interação do escitalopram com alvos indesejados, levando-o às taxas mais baixas de efeitos adversos que os demais antidepressivos da classe dos ISRSs (SANCHEZ; REINES; MONTGOMERY, 2014). Ainda, o escitalopram pode ser utilizado no tratamento de Transtorno Depressivo Maior (TDM) de grau moderado a grave (FOREST LABORATORIES, 2014), Transtorno de Pânico (WAUGH; GOA, 2003), Transtorno de Ansiedade Social (KASPER; LOFT; SMITH, 2002), Transtorno de Ansiedade Generalizada (DAVIDSON et al., 2004) e Transtorno Obsessivo-Compulsivo (FOREST LABORATORIES, 2014).

Há dois sítios de ligação para o escitalopram na proteína SERT (**Figura 1**), sendo eles o sítio primário de alta afinidade (**Figura 2A**) e o sítio alostérico secundário de baixa afinidade (**Figura 2B**) que estabiliza e prolonga a ligação do medicamento ao sítio primário, além de favorecer a regulação da proteína por meio de uma mudança conformacional neste sítio, inibindo o transporte/absorção do neurotransmissor pelos neurônios serotoninérgicos e deixando-o disponível por mais tempo na fenda sináptica (PLENGE; MELLERUP; LAURSEN, 1991).

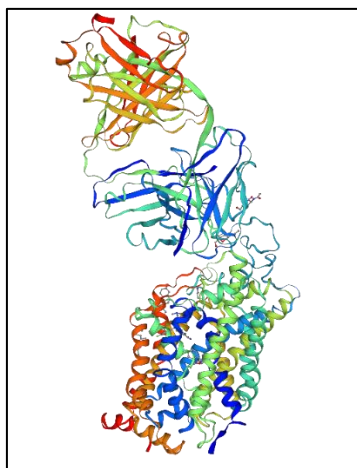


Figura 1. Proteína transportadora de 5-HT (SERT) em *Homo sapiens*. Fonte: SWISS-MODEL (2021).

Assim como outros medicamentos antidepressivos que agem na inibição da SERT, após a ingestão o escitalopram é metabolizado no fígado por enzimas do complexo enzimático do citocromo P-450 (CYP450) (WAUGH; GOA, 2003), gerando os metabólitos S-monodesmetilcitalopram (S-DCT) e S-didesmetilcitalopram (S-DDCT). Segundo Waugh e Goa (2003), estes metabólitos tem baixa afinidade à SERT, não exercendo efeitos antidepressivos significativos.

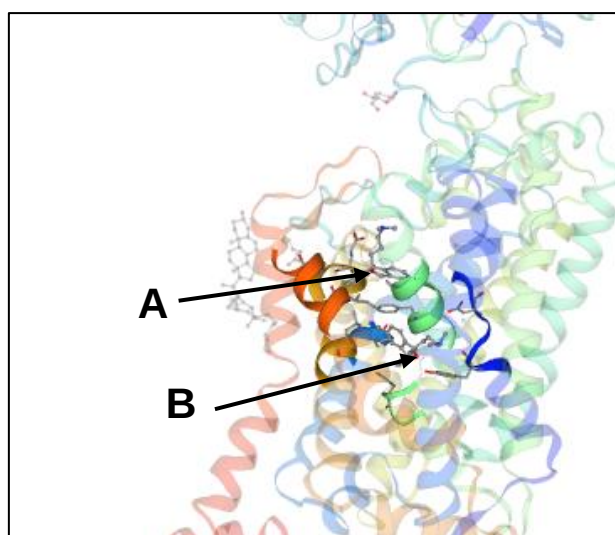


Figura 2. Destaque dos sítios de ligação da SERT para o escitalopram. Setas indicam a ligação do escitalopram no sítio de ligação primário/central (A) e no sítio de modulação alostérica (B). Fonte: SWISS-MODEL (2021).

Embora apresentem importância clínica e farmacológica comprovada no tratamento de diversos transtornos mentais, incluindo os quadros de depressão, os medicamentos antidepressivos

comumente prescritos, bem como seus metabólitos, podem causar efeitos secundários, dentre os quais podemos citar efeitos genotóxicos, mutagênicos e até mesmo carcinogênicos. Segundo Brambilla; Mattioli; Martelli (2009), dentre os 33 antidepressivos submetidos a testes de genotoxicidade em roedores, efeitos genotóxicos e carcinogênicos foram encontrados no uso do citalopram e da fenelzina, e apenas genotóxicos no uso da bupropiona e da clomipramina. Além disso, a bupropiona se mostrou altamente recombinogênica, apresentando efeitos tóxicos em altas concentrações. Embora a fluoxetina não tenha demonstrado efeitos nos testes realizados por Brambilla; Mattioli; Martelli (2009), estudo de Joseph (2003) utilizando linfócitos periféricos humanos revelou efeitos genotóxicos, indicando que modelos biológicos diferentes podem apresentar respostas diferentes no que concerne a genotoxicidade e carcinogenicidade.

Com relação ao escitalopram, estudo de Roshdy; Shoman (2004), com indivíduos fêmeas e embriões de camundongos, demonstrou efeitos genotóxicos e mutagênicos que ocasionaram o aumento na formação de micronúcleos, levando à malformação fetal e perda pós-implante, além da contraindicação deste antidepressivo durante a gravidez. Contradizendo Roshdy; Shoman (2004), Cobanoglu et al. (2017), em teste *in vitro* utilizando linfócitos periféricos de humanos não-fumantes, não observaram efeitos mutagênicos do escitalopram, indicando que esta diferença pode estar relacionada com a influência dos metabólitos secundários presentes no modelo *in vivo* e ausentes no modelo *in vitro*.

Neste contexto, para se conhecer os efeitos secundários das drogas antidepressivas sobre as células e a estabilidade cromossômica, é essencial considerar os possíveis efeitos de seus metabólitos gerados após a biotransformação hepática. Com relação ao escitalopram, não foram encontradas pesquisas que comprovem efetivamente os efeitos adversos causados por seus metabólitos nas células, tornando essencial a realização de estudos mais aprofundados sobre os efeitos mutagênicos e genotóxicos deste medicamento e seus metabólitos. Para isso, a definição de modelos biológicos *in vivo* que permitam a análise dos efeitos da droga inalterada, bem como de seus metabólitos, é de essencial importância.

Assim, o presente estudo busca avaliar o potencial uso do *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo biológico para estudo dos efeitos mutagênicos e genotóxicos do escitalopram e seus metabólitos. O *zebrafish* é um modelo alternativo para pesquisas toxicológicas em fármacos, inclusive para estudo dos efeitos de antidepressivos (LACHOWICZ et al, 2021; MESHALKINA et al., 2018; STEWART et al., 2014; VERMOESEN et al., 2011), entretanto, para uma avaliação acurada é necessário ter domínio sobre o processo de biotransformação dos fármacos aplicados

(SAAD et al., 2016), reforçando a necessidade do conhecimento sobre o complexo enzimático responsável pela biotransformação do escitalopram nesta espécie.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar se as enzimas responsáveis pela metabolização do escitalopram, pertencentes no complexo enzimático CYP450, foram filogeneticamente conservadas no subfilo dos vertebrados, visando a utilização do *zebrafish* como modelo biológico para o estudo dos efeitos genotóxicos e mutagênicos *in vivo*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Analisar a via de metabolização do escitalopram e seus produtos em *Homo sapiens*;
- 2) Investigar a existência de homologia entre os nucleotídeos dos genes codificadores das enzimas metabolizadoras do escitalopram (CYP2C19, CYP3A4 e CYP2D6) de humanos e *zebrafish*;
- 3) Avaliar se as enzimas CYP2C19, CYP3A4 e CYP2D6 de *H. sapiens*, responsáveis pela metabolização do escitalopram, possuem moléculas correlatas em *Danio rerio*;
- 4) Checar a existência de homologia da sequência de aminoácidos da enzima CYP3A4 de *H. sapiens* com CYP3A65 de *D. rerio* e inferir se esta enzima pode ser responsável pela metabolização do escitalopram.

3. METODOLOGIA

Estudo exploratório e descritivo foi realizado no período de Janeiro/2021 a Setembro/2021, baseando-se em revisão bibliográfica e no uso de ferramentas de biologia computacional para obtenção de dados sobre a metabolização do escitalopram e o complexo enzimático CYP450 em *Homo sapiens* e em *Danio rerio*. Revisão da literatura foi realizada nas bases de dados Google Scholar, SciELO, PubMed e Periódicos Capes utilizando como entrada os seguintes descritores: “escitalopram”, “S-didesmetilcitalopram”, “S-monodesmetilcitalopram”, “CYP450”, “genotoxicidade”, e seus correspondentes em inglês. Além disso, os termos foram combinados utilizando o operador booleano “AND” para compor a estratégia de busca.

Para obtenção e análise do mapa de metabolização do escitalopram em humanos foi utilizado o banco de dados DrugBank (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01175>; WISHART et al., 2006).

A localização cromossômica do(s) gene(s) codificadores de CYP450, assim como a descrição da sua composição, foi obtida a partir do banco de dados *Medline Plus* na *National Library of Medicine* (<https://medlineplus.gov/about/>).

As sequências de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos (FASTA) do(s) gene(s) e proteína(s) CYP450 de *H. sapiens* e *D. rerio* foram obtidas no banco de dados NCBI - *National Center of Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), UniProtKB - UniProt Knowledgebase (<https://www.uniprot.org/>; BERMAN et al., 2000) e no Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>; KOPP; SCHWEDE, 2004; WATERHOUSE et al., 2018), respectivamente. O banco de dados NCBI também foi utilizado para revelar a análise transcriptômica em diferentes tecidos e órgãos.

A construção dos alinhamentos locais e a análise de identidade e grau de similaridade foram feitas utilizando a ferramenta BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), selecionando a opção “*Nucleotide>Nucleotide*”, seguindo como “*Nucleotide collection (nr/nt)*” no tópico “*Database*” para os genes. Para as proteínas (CYP3A4 – *GenBank*: ABI96208.1; CYP2D6 – *GenBank*: AFX95842.1), selecionou-se a opção “*Protein>Protein*”, seguindo como “*Non-redundant protein sequences (nr)*” no tópico “*Database*”. Em ambos os alinhamentos inseriu-se o código 7955 no tópico “*Organism*” para restrição da análise à espécie *Danio rerio*.

Os resultados do BLAST foram apresentados de acordo com dois parâmetros: o valor do *score* (*Score bits*) e o valor E (*e-value*). O valor de *score* depende do tamanho da sequência a ser

alinhada e do número de *matches/mismatches/gaps* encontrados e da matriz de comparação utilizada (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/Blast_output.html); enquanto o valor E representa o número de alinhamentos com *scores* iguais ou melhores do que se ocorressem ao acaso. Dessa maneira, quanto menor o valor E, melhor o alinhamento, de forma que um valor de E que tende a zero significa que não há chance de que tenha ocorrido por mero acaso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/glossary2.html>). Assim, os resultados dos alinhamentos foram categorizados por *e-value*, sendo selecionados os genes e proteínas com menor *e-value* e maior percentual de identidade. Os genes de *D. rerio* selecionados foram analisados utilizando-se a base de dados *ZFIN - Zebrafish Information Network* (<https://zfin.org/>; RUZICKA et al., 2019) e as regiões de codificação de cada gene foram avaliadas por meio do *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/>; HUBBARD et al., 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Via de metabolização do escitalopram em *H. sapiens*

O processo de metabolização do escitalopram em seres humanos ocorre por meio da ação das enzimas do CYP450, que atua em larga escala com a CYP2C19, contribuindo com 37% da metabolização, e em menor escala com a CYP3A4, com 35% e a CYP2D6 com até 28% do processo metabólico (VON MOLTKE et al., 2001). Os genes responsáveis pela codificação destas três enzimas são descritos detalhadamente na seção seguir.

Estudos *in vitro* demonstram que o escitalopram (**Figura 3A**) é metabolizado no fígado, onde ocorre sua biotransformação (WAUGH; GOA, 2003). Nesse processo, o escitalopram sofre N-desmetilação oxidativa por ação do CYP450, resultando na formação de dois metabólitos: o S-monodesmetilcitalopram (S-DCT) (**Figura 3B**), considerado como o metabólito principal, e o S-didesmetilcitalopram (S-DDCT) (**Figura 3C**) (LUNDBECK, 2018). Há ainda evidências de que o escitalopram possa ser metabolizado no cérebro a ácido propiônico escitalopram (APE) por ação das monoamina oxidases A e B (**Figura 3D**) (DRUGBANK, 2021). No final do processo de biotransformação, 1/3 da concentração total de escitalopram corresponde ao metabólito S-DCT, no estado estacionário. Porém, além dos metabólitos (S-DCT, S-DDCT e APE), também há a preservação do composto escitalopram na sua íntegra (inalterado), com concentração predominante no plasma sanguíneo (FDA, 2019).

Quando em grandes quantidades, os metabólitos do escitalopram (S-DCT e S-DDCT) podem estar presentes nos pulmões, coração, cérebro, rins e fígado (LUNDBECK, 2018). Segundo Waugh; Goa (2003) e o FDA (2019), o escitalopram é considerado de 7 a 27 vezes mais potente que o S-DCT e S-DDCT na inibição da recaptação de serotonina na proteína SERT, pelo fato desses metabólitos não possuírem afinidade ou terem pouca afinidade com receptores serotoninérgicos (5-HT₁₋₇) ou outros receptores como alfa e beta-adrenérgicos (α - e β -AR), dopaminérgicos (D₁₋₅), histaminérgicos (H₁₋₃), muscarínicos (M₁₋₅) e de benzodiazepina (BZ). Além disso, os metabólitos não se ligam a inúmeros canais iônicos, como Na⁺, K⁺, Cl⁻ e Ca²⁺, portanto, pode-se concluir que eles não contribuem significativamente para a ação antidepressiva do escitalopram (FDA, 2019). Ainda, os metabólitos são secretados facilmente pela via renal como glicuronídeos e o escitalopram inalterado pode ser eliminado por meio das vias renal e hepática (FOREST LABORATORIES, 2014).

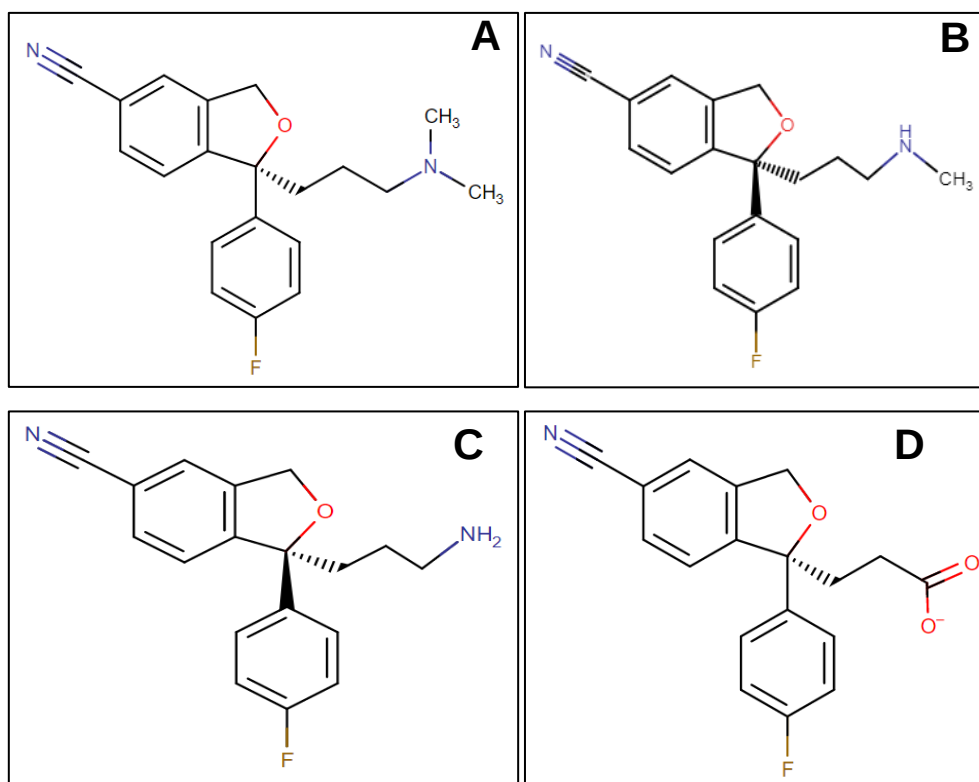


Figura 3. Escitalopram e seus metabólitos. **A.** Escitalopram. **B.** S-monodesmetilcitalopram **C.** S-didesmetilcitalopram **D.** Ácido propiônico escitalopram. Fonte: DRUGBANK (2021).

4.2. Relação do complexo CYP450 e a metabolização do escitalopram em humanos

O CYP450 é um complexo enzimático composto por isoenzimas que contribuem no processo de metabolização. Ele é constituído por uma das maiores superfamílias de proteínas com funções enzimáticas que podem ser encontradas no fígado, local onde ocorre a depuração de moléculas endógenas e xenobióticos (FOREST LABORATORIES, 2014; SHANKAR; MEHENDALE, 2014).

Em mamíferos, de forma geral, o complexo CYP450 é dividido em dois principais grupos: o primeiro com enzimas que possuem especificidade de substratos com estreita ligação e que estão incluídos na síntese, ativação ou inativação de moléculas reguladoras de compostos endógenos, e o segundo grupo composto por enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos e de compostos endógenos. Dessa forma, as enzimas do CYP450 podem determinar os efeitos e a persistência de muitos medicamentos, incluindo antidepressivos como o escitalopram, de moléculas reguladoras de compostos endógenos e de substâncias tóxicas e cancerígenas que podem estar em contato com o organismo. Além disso, estas enzimas também podem levar à ativação ou inativação de diversas substâncias endógenas e exógenas por meio da catalização da transformação oxidativa, podendo

alterar a fisiologia normal do organismo, como também os processos patológicos (GOLDSTONE et al., 2010).

Os genes responsáveis por codificar as enzimas do complexo CYP450 estão presentes em quase todos os genomas de procariotos e eucariotos (SHANKAR; MEHENDALE, 2014). No genoma humano, os genes CYP450 são divididos em 18 famílias: *CYP1*, *CYP2*, *CYP3*, *CYP4*, *CYP5*, *CYP7*, *CYP8*, *CYP11*, *CYP17*, *CYP19*, *CYP20*, *CYP21*, *CYP24*, *CYP26*, *CYP27*, *CYP39*, *CYP46* e *CYP51*, albergando um total de 115 genes, sendo 57 ativos e 58 pseudogenes (DANIELSON, 2002; NELSON et al., 2004; GOLDSTONE et al., 2010; SHANKAR; MEHENDALE, 2014).

Especificamente com relação à metabolização do escitalopram em seres humanos, como mencionado anteriormente, as principais enzimas envolvidas são a CYP2C19, a CYP3A4 e a CYP2D6, descritas detalhadamente a seguir.

4.2.1. Citocromo P450 família 2 subfamília C membro 19 (CYP2C19) [*Homo sapiens* (humano)]

Dentro da família CYP2, pertencente à superfamília das enzimas CYP450, a subfamília CYP2C é considerada importante devido ao fato de metabolizar aproximadamente 20% dos medicamentos usados clinicamente. Além dos medicamentos, as CYP2Cs metabolizam alguns compostos endógenos, como o ácido araquidônico, por exemplo. Os membros desta subfamília são geneticamente polimórficos, sendo que o mais conhecido deles é o *CYP2C19* (GOLDSTEIN, 2001), cujo código de identificação no NCBI é 1557 (NCBI, 2021a).

A enzima CYP2C19 está localizada, principalmente, no retículo endoplasmático e na membrana celular, sendo responsável por metabolizar inúmeros xenobióticos, incluindo a mefenitoína, o omeprazol, o diazepam e alguns barbitúricos. Sua expressão pode ser induzida no fígado e em outros tecidos por inúmeros compostos exógenos, incluindo drogas, pesticidas e carcinógenos. A enzima apresenta uma sequência de 490 aminoácidos e aproximadamente 55,9 KDa de massa molecular (UNIPROT, 2021a). Além disso, trata-se de uma monooxigenase que catalisa muitas reações envolvidas no metabolismo de drogas e na síntese de colesterol e outros lipídeos (ALLIANCE GENOME RESOURCES, 2021).

O gene que codifica a enzima CYP2C19 é altamente polimórfico, está localizado no cromossomo 10 (10q23.33), apresenta 9 éxons (**Figura 4**) e diferenças significativas na frequência de alelos são observadas na população. De acordo com Hicks et al. (2015), mais de 30 variantes e

subvariantes alélicas já foram identificadas em seres humanos, no entanto a maior parte dos pacientes carrega os alelos *CYP2C19**1, *2, ou *17. O *CYP2C19**1 codifica uma enzima de função normal, enquanto a *CYP2C19**2 é o alelo inativo mais comum, seguido pelo *CYP2C19**3. Já o alelo *CYP2C19**17 é definido por uma variante na região promotora que resulta em aumento na transcrição do gene e na capacidade metabolizadora (SIM et al., 2006).

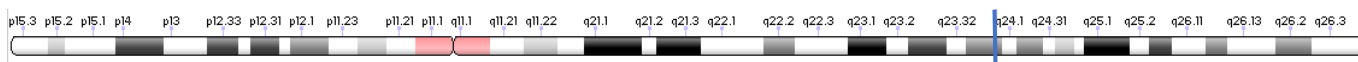


Figura 4. Localização cromossômica do gene *CYP2C19* no cromossomo 10 (10q23.33), destacado pelo traço em azul.

Fonte: NCBI (2021a).

No que se refere à metabolização de antidepressivos, os níveis plasmáticos de amitriptilina, citalopram e escitalopram, variam consideravelmente de acordo com a composição alélica para *CYP2C19* (KEERS; AITCHISON, 2011), havendo pacientes que apresentam um fenótipo de metabolizadores ultrarrápidos, que apresentam dois alelos de função aumentada ou um alelo de função normal e um de função aumentada (5 a 30% dos pacientes; alelos *17/*17, *1/*17); extensivos, com dois alelos de função normal (35 a 50% dos pacientes; alelos *1/*1); intermediários, que apresentam um alelo de função normal ou aumentada e um sem função (18 a 45% dos pacientes; alelos *1/*2, *1/*3, *2/*17); e fracos, com dois alelos inativos (2 a 15% dos pacientes; alelos *2/*2, *2/*3, *3/*3) (HICKS et al., 2015).

Assim, dependendo do fenótipo apresentado pelo paciente com relação à capacidade de metabolização da *CYP2C19*, recomendações terapêuticas específicas podem ser indicadas no uso de antidepressivos, como o escitalopram, incluindo reduções da dosagem para metabolizadores fracos ou uso de medicamentos não metabolizados pela *CYP2C19* para metabolizadores ultra rápidos (HICKS et al., 2015). Ainda, esse gene é preferencialmente expresso no fígado, duodeno, estômago, vesícula biliar e intestino delgado (NCBI, 2021a) (**Figura 5**).

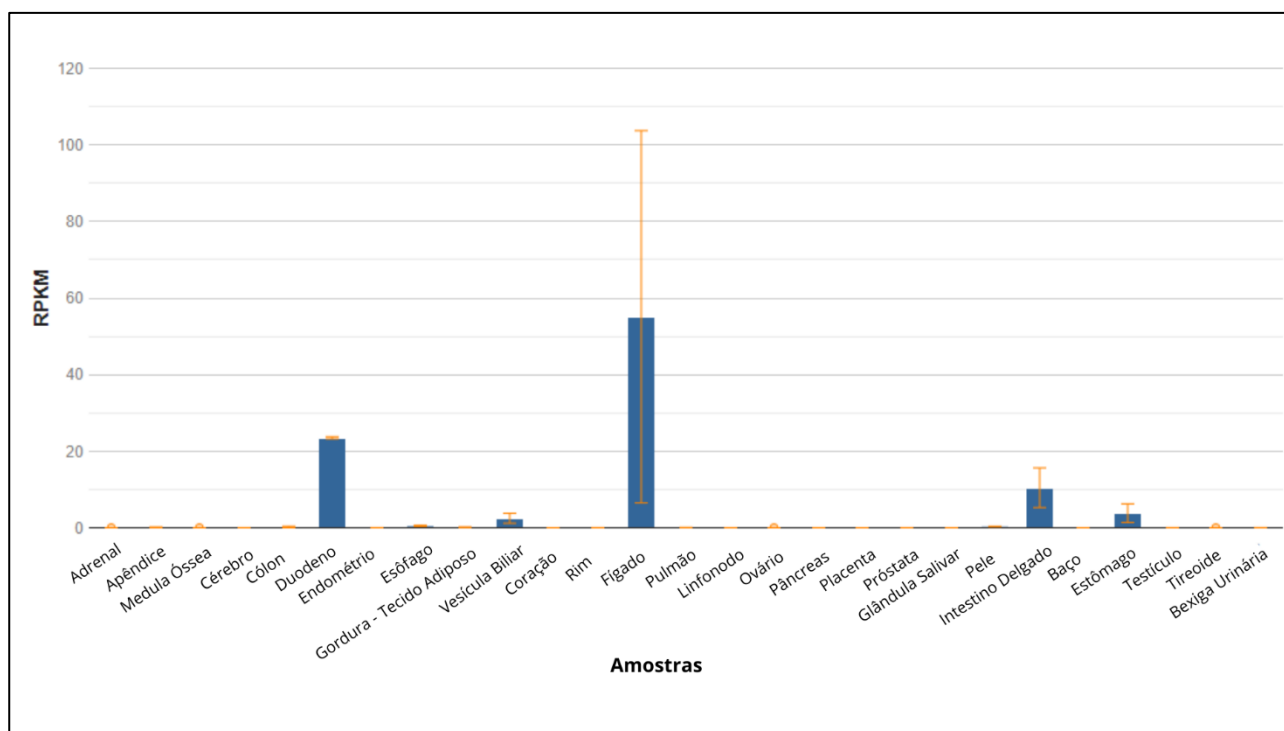


Figura 5. Análise transcriptômica do gene *CYP2C19* de *Homo sapiens* (Gene ID: 1557) em diferentes tecidos, expresso em RPKM (reads per kilobase por milion mapped reads). Fonte: Adaptado de NCBI (2021a).

4.2.2. Citocromo P450 família 2 subfamília D membro 6 (*CYP2D6*) [*Homo sapiens* (humano)]

Dentro da subfamília CYP2D existem isoformas de enzimas que estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos, incluindo antidepressivos, bloqueadores β -adrenérgicos, antiarrítmicos e anti-hipertensivos, além de compostos endógenos, como neuroesteroides e traços de amina (FUNAE et al., 2003). Uma das isoformas é a enzima CYP2D6, a qual se localiza, principalmente, no retículo endoplasmático (UNIPROT, 2021b) e metaboliza até 25% dos medicamentos prescritos comumente (NCBI, 2021b). Os substratos da enzima do CYP2D6 incluem antidepressivos, antipsicóticos, analgésicos, antitússicos, agentes bloqueadores β -adrenérgicos, antiarrítmicos e antieméticos. Esta enzima é responsável pela hidroxilação de todos os ATCs e da maioria dos ISRSs (KEERS; AITCHISON, 2011).

O gene *CYP2D6* está localizado no cromossomo 22, região 22q13.2 (**Figura 6**), seu código de identificação no NCBI é 1565 e possui em sua composição 9 éxons, sendo expresso preferencialmente no fígado (RPKM 40.1) e no intestino delgado (RPKM 14.6) (**Figura 7**). Trata-se de um gene altamente polimórfico, assim como o *CYP2C19*, apresentando mais de 100 variantes e subvariantes alélicas conhecidas, as quais foram associadas à atividade enzimática alterada. Os

alelos do *CYP2D6* têm sido estudados em grupos geograficamente diversos, incluindo diferentes etnias, sendo encontradas diferenças significantes nas frequências alélicas. Os alelos mais comuns são os de função normal (ex. *CYP2D6**1 e *CYP2D6**2), de função reduzida (ex. *CYP2D6**9, *10, e *41) e sem função (ex. *CYP2D6**3-*6). Ainda, o gene *CYP2D6* está sujeito à duplicações, indicadas por “xN” (HICKS et al., 2015).



Figura 6. Localização cromossômica do gene *CYP2D6* no cromossomo 22 (22q13.2), destacado pelo traço em azul.

Fonte: NCBI (2021b).

Neste contexto, assim como observado com o gene *CYP2C19*, os polimorfismos do gene *CYP2D6* resultam em quatro fenótipos diferentes: metabolizadores fracos (MFs), com baixa capacidade de metabolizar os substratos e com cópias funcionalmente inativas de ambos os alelos; intermediários (MIs), com um ou dois alelos de atividade reduzida e um alelo não funcional; extensivos (MEs), com pelo menos um alelo ativo; e ultrarrápidos (MUs), com aumento da atividade enzimática devido à amplificação do gene (por exemplo, *CYP2D6**1xN) (HUEZO-DIAZ et al., 2011; KEERS; AITCHISON, 2011; BRÅTEN et al., 2019; BEITELSHEES et al., 2020; NCBI, 2021b). Em certos indivíduos que possuem o fenótipo de metabolizador deficiente do gene *CYP2D6* não há a presença de uma proteína funcional por carregarem 2 alelos nulos em sua composição. Já em outros indivíduos com o mesmo fenótipo, o gene *CYP2D6* está ausente. Esse gene pode variar diversas vezes em número de cópias e os indivíduos com o fenótipo MU podem ter 3 ou mais cópias ativas (NCBI, 2021b).

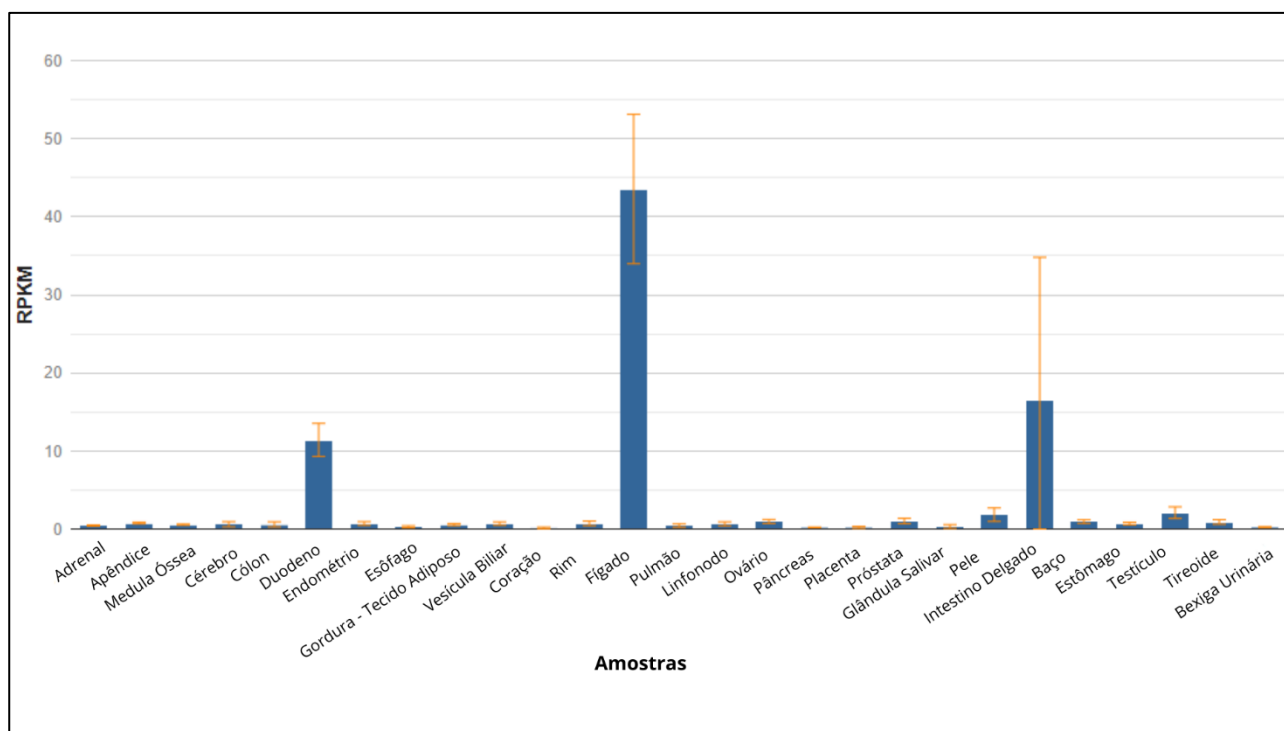


Figura 7. Análise transcriptômica do gene *CYP2D6* de *Homo sapiens* (Gene ID: 1565) em diferentes tecidos, expresso em RPKM (*reads per kilobase por milion mapped reads*). Fonte: Adaptado de NCBI (2021b).

Dentre as variantes e subvariantes alélicas para o gene *CYP2D6* que podem alterar a atividade enzimática (PETROVIĆ; PELIĆ; LAUSCHKE, 2019), vários transcritos de *splicing* alternativo que codificam diferentes isoformas enzimáticas foram encontradas para este gene (NCBI, 2021b). A variação deste gene demonstrou ter um efeito nos níveis plasmáticos de antidepressivos (substratos da enzima), incluindo os ATCs, a nortriptilina, os ISRSs, a venlafaxina e os IRSNs (KEERS; AITCHISON, 2011). Considerando o composto escitalopram, assim como a CYP2C19 e a CYP3A4 atuam em seu metabolismo formando o S-DCT, a CYP2D6 é responsável pela transformação do S-DCT em S-DDCT (VON MOLTKE et al., 2001).

4.2.3. Citocromo P450 família 3 subfamília A membro 4 (*CYP3A4*) [*Homo sapiens* (humano)]

Dentro da família CYP3 encontramos a subfamília CYP3A, a qual apresenta as enzimas com maiores níveis de expressão no fígado e no intestino delgado, por possuírem um papel importante na desintoxicação de compostos exógenos (QIU et al., 2008; NCBI, 2021c). Dentre as enzimas pertencentes à subfamília CYP3A, a isoforma hepática mais abundante em humanos adultos é a CYP3A4 (QIU et al., 2008). A enzima CYP3A4 está envolvida no metabolismo de

alguns esteroides e carcinógenos e de, aproximadamente, metade dos medicamentos que atualmente são comercializados, incluindo o paracetamol, a codeína, o diazepam, a cloroquina, a eritromicina e a ciclosporina A. Localizada no retículo endoplasmático, a CYP3A4 tem sua expressão induzida por glicocorticoides e alguns agentes farmacológicos. Com código de identificação 1576 no NCBI (2021c), o gene *CYP3A4* possui 13 éxons e está localizado no cromossomo 7, região 7q22.1 (**Figura 8**).



Figura 8. Localização cromossômica do gene *CYP3A4* no cromossomo 7 (7q22.1), destacado pelo traço em azul.

Fonte: NCBI (2021c).

Estudos avaliando diferentes fenótipos na capacidade de metabolização de drogas, como o midazolam (benzodiazepínico), têm demonstrado diferenças individuais na atividade enzimática da CYP3A4, sem, contudo, haver distinção entre grupos metabolizadores rápidos ou lentos, conforme observado para as enzimas CYP2C19 e CYP2D6. Entretanto, considera-se que variantes gênicas do *CYP3A4* possam contribuir para sua atividade metabólica variável em diferentes indivíduos (WERK; CASCORBI, 2014). Diferentemente de genes que codificam outras enzimas do complexo CYP450, apenas poucos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram identificados e relacionados às influências na expressão e atividade da CYP3A4. De acordo com o Comitê de Nomenclatura de Alelos CYP humanos foram identificadas 53 mutações não sinônimas e 34 variantes do *CYP3A4* até o ano de 2020 (PHARMVAR, 2020). Apenas uma variante intrônica (*CYP3A4**22) demonstrou estar associada à redução na atividade enzimática, enquanto dois SNPs foram identificados como mutações com perda de função para a CYP3A4 (WERK; CASCORBI, 2014).

Segundo TSAI et al. (2010), a enzima CYP3A4 está envolvida no processo de metabolização do escitalopram e sua primeira atuação é na etapa do processo metabólico que envolve a N-desmetilação, juntamente com a CYP2C19, formando o metabólito S-DCT, sendo que especialmente para este metabólito a CYP3A4 apresenta uma alta afinidade pelo substrato (RENDIC; GUENGERICH, 2012; SINGH et al., 2003).

Os diferentes níveis de atividade e expressão desta enzima podem levar à variações individuais no metabolismo de seus substratos, podendo resultar em falhas no tratamento de doenças ou ainda em reações adversas aos medicamentos. Portanto, a relação dos polimorfismos do

gene *CYP3A4* com os efeitos metabólicos de medicamentos é um amplo campo de estudos ainda inexplorado (TANG et al, 2020). Na **figura 9** é possível verificar a expressão do gene *CYP3A4*.

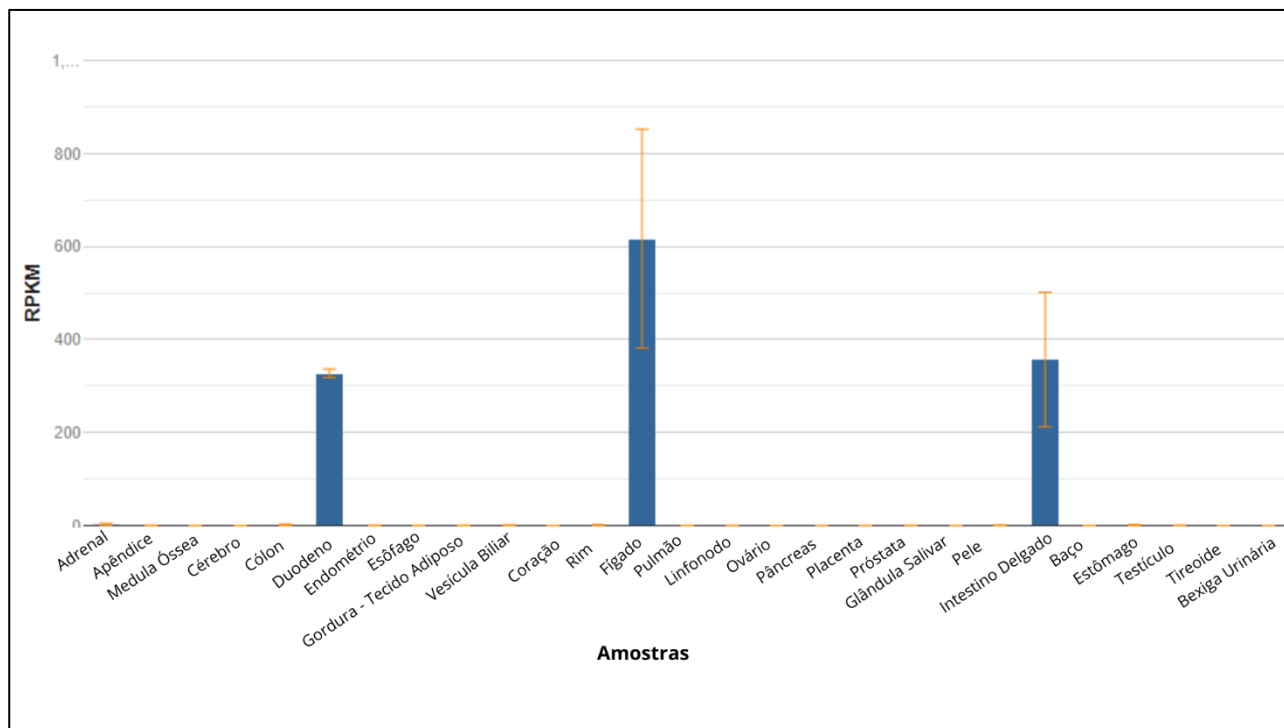


Figura 9. Análise transcriptômica do gene *CYP3A4* de *Homo sapiens* (Gene ID: 1576) em diferentes tecidos, expresso em RPKM (*reads per kilobase por milion mapped reads*). Fonte: Adaptado de NCBI (2021c).

4.3. Análise comparativa dos genes *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* de *H. sapiens* e *D. rerio*

Para avaliar a presença de genes do complexo CYP450 de *zebrafish* que possam estar relacionados à metabolização do escitalopram, realizou-se o alinhamento da sequência dos genes *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4* humanos contra o genoma completo do *zebrafish* (taxid: 7955). Os resultados demonstraram que não há, no genoma do *zebrafish*, regiões que apresentam similaridade com o gene *CYP2C19*, principal metabolizador do escitalopram em seres humanos (DRUGBANK, 2021). Já com relação ao gene *CYP2D6*, foi encontrada similaridade com o gene *CYP2X6* do *zebrafish* (**Figura 10**).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
125 bits(138)	2e-25	218/310(70%)	8/310(2%)	Plus/Plus
Query 1076	ATGCCCTACACCACTGCC-GTGATTCATGAGGTGCAGCGCTTTGGGGACATCGTCCCCCT	1		
Sbjct 1065	ATGCCGTACAC-ACTGGCTGTGATTCATGAGGTTACGCGTGTGCTAACACTGTACCGCT	1		
Query 1135	GGGTGTGACCCATATGACATCCCGTGACATCGAAGTACAGGGCTTCCGCATCCCTAAGGG	1		
Sbjct 1124	AAGTGTGTTTCACTCCACCACACGAGACACAGAGCTAATGGGCTACAGCATCCCAAAGGG	1		
Query 1195	AACGACACTCATCACC AACCTGTCATCGGTGCTGAAGGATGAGGCCGTCTGGGAGAAGC-	1		
Sbjct 1184	AACATAATCATTCCCAACCTTACCAGGGTGCTAAAGAAGAAG--GTCAGTG-GAAGTT	1		
Query 1254	-CCTTCCGC-TTCCACCCCGAACACTTCCTGGATGCCAGGGCCACTTTGTGAAGCCGGA	1		
Sbjct 1241	TCCTTATGAGTTCAACCCAGCAAACTTCCTGAATGAGCAGGGCCAGTTTGAGAAGCCTGA	1		
Query 1312	GGCCTTCCTGCCTTTCTCAGCAGGCCCGCTGCATGCCTCGGGAGCCCTTGGCCCGCAT	1		
Sbjct 1301	GGCTTTCATACCCTTCTCCACAGGTCTCCGTATGTGTCTGGGTGAAGGTCTGGCCCGTAT	1		
Query 1372	GGAGCTCTTC	1381		
Sbjct 1361	GGAGCTCTTC	1370		

Figura 10. Alinhamento entre o gene *CYP2D6* (*H. sapiens*) e *CYP2X6* (*D. rerio*). Fonte: Dados obtidos a partir do alinhamento realizado no BLAST (NCBI, 2021d).

O alinhamento revelou identidade de 70,32% (218/310 bn), com *e-value* de 2e-25 e 8 gaps (2%). Já para o gene *CYP3A4* de humanos foi encontrada similaridade com o gene *CYP3A65* do *zebrafish*. O alinhamento revelou identidade de 63% (824/1307 bn), com *e-value* de 2 e-34 e 48 gaps (3%) (**Figura 11**). O complexo enzimático CYP450 de *zebrafish* e os genes que codificam as enzimas CYP2X6 e CYP3A65 são descritos detalhadamente nas próximas seções.

4.4. Citocromo P450 de *zebrafish* e metabolização do escitalopram

O complexo enzimático CYP450 em *zebrafish* atua de forma similar no sistema humano, ou seja, contribui no processo de metabolização e/ou biotransformação de compostos endógenos e xenobióticos (GOLDSTONE et al., 2010). Os genes para este complexo enzimático possuem, inclusive, a mesma divisão em 18 famílias: *CYP1*, *CYP2*, *CYP3*, *CYP4*, *CYP5*, *CYP7*, *CYP8*, *CYP11*, *CYP17*, *CYP19*, *CYP20*, *CYP21*, *CYP24*, *CYP26*, *CYP27*, *CYP39*, *CYP46* e *CYP51*, havendo 94 genes que codificam estas enzimas (GOLDSTONE et al., 2010; UNO; ISHIZUKA; ITAKURA, 2012). Assim como nos genes *CYP450* humanos, os genes de *zebrafish* são divididos em dois grupos funcionais principais: aquele em que estão incluídas as enzimas envolvidas principalmente em funções endógenas (enzimas pertencentes às famílias CYP5-51), e naquele grupo em que há enzimas fortemente envolvidas na metabolização de xenobióticos (enzimas pertencentes às famílias CYP1-3) (GOLDSTONE et al., 2010).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
156 bits(172)	2e-34	824/1307(63%)	48/1307(3%)	Plus/Plus	
Query 200	TTTAAGAAGCTTGGAAATCCAGGGCCACACCTCTGCCTTTTTTGGGAAATATTTTGTCC	259			
Sbjct 105	TTCAAGAAGCTGGGCATCCCGGGGCCAAAGCCATCCCATCTCTCGGCACCATGCTGAGA	164			
Query 260	TACCATAAGGGCTTTTGTATGTTTGACATGGAATGTCATAAAAAGTATGGAAAAGTGTGG	319			
Sbjct 165	TACAAGGATGGCTTTCATGTCTTCGATATGGATTGTTTGAAGAATATGGACGGATCTGG	224			
Query 320	GGCTTTTATGATGGTCAACAGCCTGTGCTGGCTATCACAGATCCTGACATGATCAAAACA	379			
Sbjct 225	GGTATCTATGACGGGAGGCAGCCTGTCTGTGCATCATGGACCAAAACCATCATCAAAACC	284			
Query 380	GTGCTAGTGAAGAATGTTATCTGTCTTCCAAACCGGAGGCTTTTGGTC---CAGT	435			
Sbjct 285	GTTCTGATCAAGAGTGTACTCCCTCTTCCAAACAGAGGAAGTCTCCGTCTGAACGGG	344			
Query 436	GGGATTTATGAAAAGTGCCATCTCTATAGCTGAGGATGAAGAATGAAGAGATTACGATC	495			
Sbjct 345	GCGCTGTACGA---TGCCGTGTCCATCGCAGAAGATGACGACTGGAGGAGGATCCGCAG	400			
Query 496	ATTGCTGTCTCCAACTTCACCACTGGAAAACCTCAAGGAGATGGTCCCTATCATTTGCCCA	555			
Sbjct 401	CGTCTCTCGCCATCTTTCACCAGCGAAGGCTGAAGGAGATGTTTGGCATCATGAAGAA	460			
Query 556	GTATGGAGATGTGTTGGTGAGAAATC-TGAGGCGGGAAGCAGAGACAGGCAAGCCTGTCA	614			
Sbjct 461	ACACAGTCACATTCTGGTT-GACAGCATGGGGAAAAACAGAAAGAGAGAGAGTCTGCGG	519			
Query 615	CCTTGAAGACGCTCTTTGGGGCCTACAGCATGGATGTGATCACTAGCACATCATTTGGAG	674			
Sbjct 520	ATATTAAAGAGTTCTTCGGTGCCTACAGTATGGATGTGGTGACACGACTGCGTTTCAGCG	579			
Query 675	TGAACATCGACTCTCTCAACATCCACAAGACCCCTTTGTGGAAAACACCAAGAAGCTTT	734			
Sbjct 580	TCGACATCGACTCCCTCAACACCCCAAGACCCATTGTGACCAACATCAAGAAAATGC	639			
Query 735	TAAGATTTGATTTTTTGGATCCATTCTTCTCTCAATAACAGTCTTTCATTCTCATCC	794			
Sbjct 640	TGAAGTTGACCTGCTGAACCTCTCTCTCTGTTGATCGCTTTTTCCTCTCATGGCCC	699			
Query 795	CAATTCTTGAAGTATTAATATCTGTGTGTTTCCAAAGAGAAGTTACAAATTTTTTA----	850			
Sbjct 700	CCGTCTGGAGAAGATGGATTTCGCCCTTTTCCACATCTGTGACCGATTCTTCTACG	759			
Query 851	-----AGAAAATCT-GT---AAAAAGGATGAAAGAAAGTCGCCTCGAAGATACACA	897			
Sbjct 760	CCGCCTTACAGAAGATCAAGTCCGACAGAGACACGAAGACAGTGGCCA--AAGACA-ACA	816			
Query 898	A-AAGCACCAGTGGATTTCTCTCAGCTGATGATTGACTCTCAGAATT-----CA	946			
Sbjct 817	CGAAGAAAGAGTGGACTTCCTGCAGCTGATGGTTGATTCTCAGACTGGAGTGAACACA	876			
Query 947	AAAGAACTGAGTCC-CAC---AAAGCTCTGTCCGACTCTGGAGCTCGTGGCCCAATCAA	1001			
Sbjct 877	AAAGTGATGGAGAGCACACGGAGAAAGTCTGAGTGACACGAGATCTTATCGCAGTCCA	936			
Query 1002	TTATCTTTATTTTGTGGCTATGAAACCACGAGCAGTGTCTCTCTCTTCTATGTATG	1061			
Sbjct 937	TGATCTTCATCTTCGCGGTTACGAGACCAGCAGCAGCTCTGTCTCTCTCTCTACA	996			
Query 1062	AACTGGCCACTCACCTGATGTCCA-GCAGAAACTGCAGGAGAAATGATGCAGTTTA	1120			
Sbjct 997	ATCTGGCAACCAACCCAGA-GACCATGAAGAACTGCAGGAGAGATCGACGAGACCTTC	1055			
Query 1121	CCCAATAAGGCACCACCACCTATGATACTGTGCTACAGATGGAGTATCTTGACATGGTG	1180			
Sbjct 1056	CCCAACCAGGCCCGGTGGACTATGAAACCTGATGAGCATGGACTACCTGGACGCAGCG	1115			
Query 1181	GTGAATGAACGCTCAGATTATTTCCCAATTGCTATGAGACTTGAGAGGGTGTGCAAAAAA	1240			
Sbjct 1116	CTGTCCGAGTCTCTGCGGCTGTTCCTCGCTGCACGCTTGAGCGGCTCTGCAAGAAAG	1175			
Query 1241	GATGTTGAGATCAATGGGATGTTTCATTCCTAAAGGGTGGTGGTATGATTCCAAAGCTAT	1300			
Sbjct 1176	ACAGTGGAGATCAACGGCCTCTCATCCCCAAAGACTTGGTGGTATGTTGCCGACCTAC	1235			
Query 1301	GCTCTTCACCGTGACCCAAAGTACTGGACAGAGCCTGAGAAGTTCCTCCCTGAAAGATT	1360			
Sbjct 1236	GCCCTCCACAGAGACCCGATTACTGGAGCGAACCGGAGAGCTTCAAAACCGAGAGGTT	1295			
Query 1361	AGCAAGAAGACAAGGACAACATAGATCCTTACATATACACACCTTTGGAAGTGGACCC	1420			
Sbjct 1296	ACTAAAGGCAATAAAGAGTCGATAGACCCCTACATGTACATGCCGTTCGGTCTGGGCCCC	1355			
Query 1421	AGAAACTGCATTGGCATGAGGTTTGTCTCTCATGAACATGAAACTTGC	1467			
Sbjct 1356	AGGAACTGCATCGGCATGCGTTTCGCTCAGGTGACCATGAAGCTGGC	1402			

Figura 11. Alinhamento entre os genes *CYP3A4* (*H. sapiens*) e *CYP3A65* (*D. rerio*). Fonte: Dados obtidos a partir do alinhamento realizado no BLAST (NCBI, 2021d).

O *zebrafish* vem sendo utilizado com maior frequência nos últimos anos como um modelo alternativo para pesquisas toxicológicas em fármacos, inclusive para o estudo dos efeitos de antidepressivos. Alguns estudos já foram conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito dos

antidepressivos em diversos comportamentos de *zebrafish* (VERMOESEN et al., 2011; RICHENDRER; CRETON, 2017; MESHALKINA et al., 2018), no entanto, é necessário ter domínio do processo de biotransformação para a realização de interpretações adequadas no que se refere aos dados toxicológicos e farmacêuticos (SAAD et al., 2016). Embora haja estudos avaliando os efeitos do escitalopram sobre o comportamento de *zebrafish* (SCHAEFER et al., 2015; NIELSEN et al. 2018; 2019), que são indivíduos altamente sociais podendo auxiliar nas pesquisas que envolvem alterações comportamentais induzidas por transtornos mentais (CHOI et al., 2021), não foram encontradas evidências na literatura acerca da metabolização desta droga, bem como dos possíveis efeitos de seus metabólitos. Os resultados do presente estudo apontam a possibilidade do envolvimento de duas enzimas no metabolismo do escitalopram, a CYP2X6 e a CYP3A65, com base na similaridade dos genes codificadores destas enzimas, quando comparados aos de humanos. A seguir, os genes que codificam estas enzimas são descritos detalhadamente, e são apresentados os alinhamentos proteicos (BLASTp), visando validar os resultados obtidos por meio do alinhamento de nucleotídeos (BLASTn).

4.4.1. Citocromo P450 família 2 subfamília X membro 6 (CYP2X6) [*Danio rerio* (*zebrafish*)]

Assim como em mamíferos, a família 2 é a maior família de genes *CYP450* em *zebrafish*, possuindo 47 genes, quase o triplo do número observado no ser humano com 16 genes. Muitas enzimas CYPs do *zebrafish* apresentam ortólogos de genes *CYPs* humanos, sugerindo que seus perfis metabólicos podem ser semelhantes aos dos mamíferos. Dentre as subfamílias dos *CYP2s*, alguns genes apresentam ortólogos de genes humanos indicados pela identidade de sequência, incluindo o *CYP2R* e *CYP2U*, considerados ortólogos dos humanos *CYP2R1* e *CYP2U1*. Há, ainda, subfamílias que apresentam homologia indicada pela sequência, como o *CYP2N*, *CYP2P*, *CYP2V* e *CYP2AD*, cujos 11 genes apresentam sintenia com o gene humano *CYP2J2*, sugerindo um compartilhamento do ancestral de origem (GOLDSTONE et al., 2010).

Como nos humanos, a maioria das espécies de actinoptérgeos expressa apenas um gene da subfamília X, porém o *zebrafish* apresenta seis genes nesta subfamília, incluindo os *CYP2X6-9* e o *CYP2X10* que ambos apresentam duas cópias semelhantes. Estes genes não compartilham sintenia com nenhum *CYP450* mamífero e possuem atividade catalítica pouco conhecida; no entanto, algumas isoformas de genes pertencentes à subfamília *CYP2X* foram bem documentadas em outras espécies de peixes, como no experimento de Saad et al. (2016) com peixe *Ictalurus punctatus* onde

a atividade de desmetilação de xenobióticos, como a aminopirina e a benzofetamina foi observada, porém nenhuma função biológica foi atribuída diretamente à subfamília (GOLDSTONE et al., 2010; SAAD et al., 2016).

De acordo com a base de dados ZFIN (2021a), a CYP2X6 pode realizar atividade de ligação ao grupo heme, atividade de oxidoredutase atuando com incorporação ou redução de oxigênio molecular em doadores pareados, redução de flavina ou flavoproteína como um doador e incorporação de um átomo de oxigênio, além da atividade de esteroide hidroxilase. Ainda, pode estar envolvida no catabolismo de medicamentos exógenos, metabolismo de ácidos orgânicos e de xenobióticos. A proteína codificada pelo gene *CYP2X6* pode ser localizada na membrana das células do peixe, podendo ser uma proteína integral, ou pode ser encontrada no citoplasma, sendo delimitada por uma membrana intracelular (ZFIN, 2021a).

O gene *CYP2X6* possui 235 ortólogos, 43 parálogos e três variantes de *splicing* alternativo: *CYP2X6-201*, *CYP2X6-202* e *CYP2X6-203* (**Figura 12**) (ENSEMBL, 2021a), porém não foram encontradas pesquisas relacionadas a essas variantes. Além disso, existem estudos que apresentam o padrão de expressão gênica apenas para estágio larval, não havendo informações sobre a expressão para adultos (ZFIN, 2021a). Em relação à função, embora seja atualmente desconhecida para todos os genes pertencentes à subfamília X, no caso do gene *CYP2X6*, segundo os experimentos de Rendic; Guengerich (2012) e Hurem et al. (2018), há evidências de que ele seja capaz de expressar resposta à radiação ionizante. No geral, todas as enzimas do CYP450 são conhecidas por serem altamente afetadas pela radiação ionizante e, assim, como apresentado por Saad et al. (2016), é possível que a subfamília CYP2X em teleósteos também apresentem capacidade de resposta a poluentes ambientais.

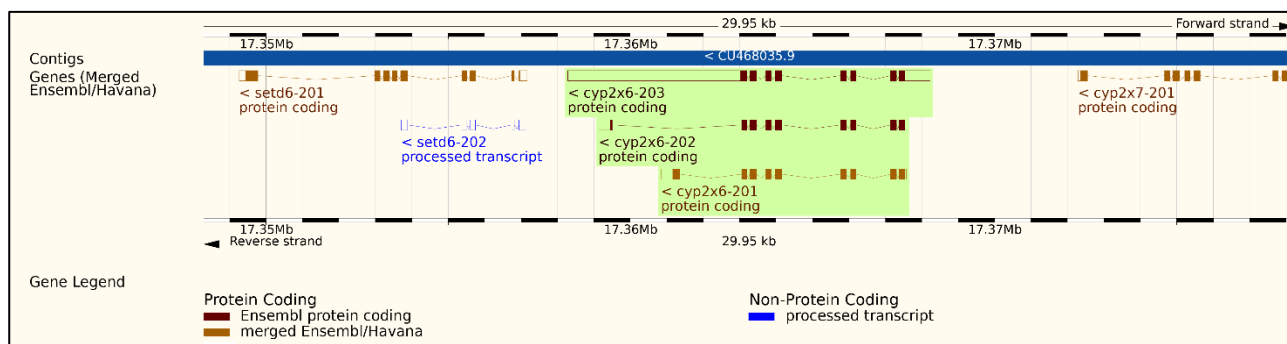


Figura 12. Gene CYP2X6 e suas variantes. Fonte: ENSEMBL (2021a).

De acordo com Goldstone et al. (2010), a subfamília CYP2X, incluindo o gene *CYP2X6*, parece não apresentar homologia evidente com os genes de CYP humanos, o que sugere que, embora o alinhamento de sequências realizado no presente estudo indique similaridade, esta pode não estar associada a uma homologia verdadeira com o gene humano. O gene *CYP2D6* humano apresenta 9 éxons e 4.312 pares de base, constituindo-se em uma longa sequência que, quando alinhada ao genoma do *zebrafish*, pode ter apresentado similaridade sem, contudo, se tratar de um gene verdadeiramente similar. De fato, quando realizado alinhamento proteico (BLASTp), buscando validar a similaridade encontrada entre estes genes, o resultado não indicou similaridade significativa entre a estrutura proteica da enzima *CYP2X6* de *D. rerio* e a enzima *CYP2D6* de humano. Quando o alinhamento da proteína *CYP2D6* foi realizado contra o proteoma de *D. rerio*, encontra-se maior grau de similaridade com outra enzima do complexo CYP450, a *CYP2P9* (identidade de 45,82%, e-value de 6e-144 e cobertura de 98%) (NCBI, 2021d).

Embora os dados obtidos por meio do alinhamento não sejam suficientes para se determinar similaridade de função entre o gene *CYP2D6* humano e o gene *CYP2X6* de *zebrafish*, a evidência de atividade de desmetilação atribuída à enzima codificada pelo gene *CYP2X6* por Saad et al. (2016) em *Ictalurus punctatus* pode sugerir uma atividade enzimática similar, já que a *CYP2D6* humana realiza um processo de N-desmetilação oxidativa no metabolismo do escitalopram (DRUGBANK, 2021). Neste contexto, não é possível descartar que o sítio de ação enzimático apresente similaridade e que esta enzima possa metabolizar o escitalopram por meio da desmetilação também em peixes.

4.4.2. Citocromo P450 família 3 subfamília A membro 65 (*CYP3A65*) [*Danio rerio* (*zebrafish*)]

A *CYP3A65* é uma enzima presente no *zebrafish* que realiza atividade esteroide hidroxilase, podendo, também, atuar em resposta a um estímulo xenobiótico, sendo localizada na membrana de células, como um componente integral (ZFIN, 2021b). O gene que codifica a enzima *CYP3A65* possui 13 éxons em sua composição (GOLDSTONE et al., 2010), uma variante de *splicing* alternativo (*CYP3A65-201*) (**Figura 13**), 594 genes ortólogos e quatro genes parálogos (ENSEMBL, 2021b), podendo ser expresso em várias estruturas do peixe, incluindo sistema digestivo, brânquias, ovário, olhos, coração (ZFIN, 2021b) e fígado (TSENG et al., 2005).

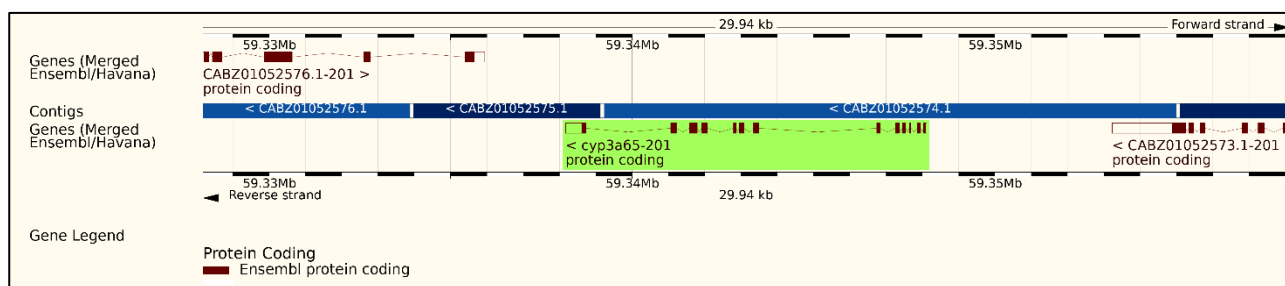


Figura 13. Gene CYP3A65. Fonte: ENSEMBL (2021b).

As famílias CYP1-3 representam as principais enzimas que estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos, sendo que muitos desses genes *CYP* podem ter sua expressão induzida por substratos metabólicos ou por quantidade variável de xenobióticos por meio da ação de fatores de transcrição, como os receptores pregnano X (RPX), de androstano constitutivo (RAC) e o aril hidrocarboneto (RAh) (TOMPKINS; WALLACE, 2007; CHANG et al., 2013). No *zebrafish*, a expressão do gene *CYP3A65* é induzida por alguns agonistas do complexo heterodimérico do RPX (TSENG et al., 2005). O RPX é um membro da superfamília de receptores nucleares que contém domínios funcionais modulares envolvendo o domínio de ligação ao DNA e um domínio de ligação ao ligante. Dessa forma, a ação do RPX na expressão da *CYP3A65* pode estar correlacionada à sua ação na expressão do gene *CYP3A4* humano, já que este também é induzido por xenobióticos por ação da RPX (TOMPKINS; WALLACE, 2007). Neste contexto, as evidências sugerem que o gene *CYP3A65* de *zebrafish* seja um ortólogo do *CYP3A4* em humano (ROBINSON et al., 2017). Em termos funcionais, o *CYP3A65* é expresso nos tecidos intestinais e fígado do *zebrafish*, enquanto o *CYP3A4* também pode ser expresso nos mesmos órgãos nos humanos (MCKINNON et al., 1995; TSENG et al., 2005; CHANG et al., 2013; ROBINSON et al., 2017).

Durante a fase larval do desenvolvimento do *zebrafish*, ao contrário dos *CYP3A* em mamíferos, o *CYP3A65* é fortemente induzido por tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). Além do TCDD, esse gene pode ser regulado positivamente pelo tratamento com dexametasona ou rifampicina, entretanto, segundo Chang et al. (2013), o mecanismo subjacente da transcrição do *CYP3A65* (mediada por TCDD) não é evidente.

Dentre os antidepressivos existentes, a venlafaxina, pertencente à família dos ISRSs, é um dos psicofármacos encontrados em águas superficiais podendo influenciar no comportamento e níveis reprodutivos ou moleculares de organismos aquáticos. No estudo realizado por Hodkovicova et al. (2019) em embriões de *zebrafish*, foi demonstrada uma regulação positiva da expressão de alguns genes, incluindo o *CYP3A65*, relacionados à fase I de biotransformação desta droga. Não

foram encontradas pesquisas que mostram a ação da enzima CYP3A65 na presença do escitalopram.

Objetivando validar a similaridade encontrada no alinhamento de nucleotídeos (BLASTn) entre o gene *CYP3A65* de *D. rerio* e o gene *CYP3A4* de *H. sapiens*, foi realizado um alinhamento da estrutura proteica da enzima CYP3A4 humana contra o proteoma de *D. rerio*. O resultado deste alinhamento demonstrou que, de fato, a enzima codificada pelo gene *CYP3A65* do *D. rerio* apresenta o maior grau de similaridade à enzima CYP3A4 humana, com identidade de 56,4%, e-value de 0 e cobertura de 97% (**Figura 14**) (NCBI, 2021d). Este resultado, associado ao alinhamento de nucleotídeos e à literatura, sugere que estes genes e estas enzimas tenham funções biológicas similares nestes dois organismos. Neste contexto, é possível que a enzima CYP3A65 seja uma candidata à molécula responsável pela metabolização do escitalopram em *zebrafish*.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
597 bits(1538)	0.0	Compositional matrix adjust.	282/500(56%)	375/500(75%)	11/500(2%)
Query 7	LAMETWLLLVAVSLVLLYLYGTHSHGLFKKLGIPGPTPLPFLGNILSYHKGFCMFDMECHK	66			
Sbjct 3	FSAETWTLAFLVALLVIYGSWPHRYFKKLGIPGPKAIPFFGTMLRYKDGPHVFDMDCFE	62			
Query 67	KYGKVGWGFYDGGQPVLAITDPMIKTVLVKECYSVFTNRRPFGPVGFMKSAISIAEDEEW	126			
Sbjct 63	KYGRWGIYDGRQPVLCIMDQTIKTVLKECYSVFTNRRPFGPVGFMKSAISIAEDDDW	122			
Query 127	KRLRSLLSPTFTSGKLEKEMVPIIAQYGDVLRNLRREAETGKPVTLKDVFGAYSMDVITS	186			
Sbjct 123	RRIRSVLSPTSFTSGRLKEMFGIMKKHSHILVDSMGKTAKRGESADIKFFFGAYSMDVVTS	182			
Query 187	TSFGVNIDSLNNPQDPFVENTKKLLRFDLDFPFLSI-IFPFLIPILEVLNICVFPREVT	245			
Sbjct 183	TAFSDIDSLNNPKDPFVTNIKKMLKFDLLNPLFLLIAFFPFMAPVLEKMDLALFPTSVT	242			
Query 246	NFLRKSVMKESR-----LEDTQKHRVDFLQMLIDSQN-----SKETESHKALSDELEV	295			
Sbjct 243	DFFYAALQIKSDRDRTKTVAKDNTKKRVDFLQMLVDSQTGVKHKSDGEHTEKGLSDHEIL	302			
Query 296	AQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMYELATHPDVQKQLQEEIDAVLPNKAPPTYDVTVLQMEYL	355			
Sbjct 303	SQSMIFIFAGYETSSSTLSFLFYNLATNPETMKKQLQEEIDETFPNQAPVDYETLMSMDYL	362			
Query 356	DMVVNETLRLFPPIAMRLERVCKKDVEINGMFIPKGVVVMIPSYALHRDPKYWTEPEKFLP	415			
Sbjct 363	DAALSESRLRFPVAARLERVCKKTVEINGLLIPKDLVVMVPTYALHRDPDYWSEPESEFKP	422			
Query 416	ERFSKKNKDNIIDPYIYTPFGSGPRNCIGMRFAIMNMKLALIRVLQNFSEFKPKETQIPLK	475			
Sbjct 423	ERFTKGNKESIDPYMYMPFGLGPRNCIGMRFAQVTMKLAIVEILQRFDVSVCDDETQVPLE	482			
Query 476	LSLGGLLQPEKPVVLKVESR	495			
Sbjct 483	L GLL P+ P+ LK++ R	502			

Figura 14. Alinhamento entre as enzimas CYP3A4 (*H. sapiens*) e CYP3A65 (*D. rerio*). Fonte: Dados obtidos a partir do alinhamento realizado no BLAST (NCBI, 2021d).

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, baseado no estudo das similaridades da sequência de nucleotídeos das enzimas responsáveis pela metabolização do escitalopram em *H. sapiens* e em *D. rerio*, e nos dados disponíveis na literatura, os resultados do presente estudo sugerem que não há correlatos do gene que codifica a enzima CYP2C19 de humano, principal responsável pela metabolização da droga, em *D. rerio*.

Já com relação ao gene que codifica a enzima CYP2D6 de humano, embora o alinhamento tenha demonstrado similaridade com o gene *CYP2X6* de *D. rerio*, dados presentes na literatura, associados ao alinhamento proteico, não confirmam a relação entre as enzimas.

Considerando as similaridades da sequência de nucleotídeos, bem como da sequência de aminoácidos, sugerimos, portanto, que a enzima CYP3A65 de *D. rerio* seja candidata a exercer um papel metabólico na biotransformação do escitalopram.

Este resultado baseia-se apenas em análises realizadas *in silico*, sendo necessária a comprovação experimental *in vivo*, revelando o papel da CYP3A65 na metabolização do escitalopram, bem como a avaliação dos metabólitos formados.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR C. C. et al. Drogas antidepressivas. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, p. 91-98, 2011. Disponível em: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/339>. Acesso em: 28 mar. 2020.

ALLIANCE GENOME RESOURCES. **CYP2C19**. 2021. Disponível em: <https://www.alliancegenome.org/gene/HGNC:2621#alleles-and-variants>. Acesso em: 08 set. 2021.

BEITELSHEES, A. L. et al. Evaluating the extent of reusability of CYP2C19 genotype data among patients genotyped for antiplatelet therapy selection. **Genetics in Medicine**. v. 22, n. 11, p. 1898-1902, 2020. DOI: 10.1038/s41436-020-0894-2.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000. DOI: 10.1093/nar/28.1.235.

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI, F.; MARTELLI, A. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. **Toxicology Journal**, v. 261, n. 3, p. 77-88, 2009. DOI: 10.1016/j.tox.2009.04.056.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Atenção Primária à Saúde (SAPS)**. O que é Atenção Primária?. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/smp/smpoquee>. Acesso em: 21 mar. 2021.

BRÅTEN, L. S. et al. Impact of CYP2C19 genotype on sertraline exposure in 1200 Scandinavian patients. **Neuropsychopharmacology**, v.45, n.3, p.570-576, 2019. DOI: 10.1038/s41386-019-0554-x.

CHANG, C-T. et al. Regulation of *zebrafish* CYP3A65 transcription by AHR2. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 270, n. 2, p. 174–184, 2013. DOI: 10.1016/j.taap.2013.04.010.

CHOI, T.-Y., et al. *Zebrafish* as an animal model for biomedical research. **Experimental & Molecular Medicine**, v.53, n.3, p.310–317, 2021. DOI: 10.1038/s12276-021-00571-5

COBANOGLU, H. et al. In vitro genotoxic and cytotoxic effects of doxepin and escitalopram on human peripheral lymphocytes. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1-7, 2017. DOI: 10.1080/01480545.2017.1365885.

DANIELSON, P. B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 561–597, 2002. DOI: 10.2174/1389200023337054.

DAVIDSON, J. R. T. et al. Escitalopram in the treatment of generalized anxiety disorder: double-blind, placebo controlled, flexible-dose study. **Depression and Anxiety Journal**, v. 19, n. 4, p. 234-240, 2004. DOI: 10.1002/da.10146.

DMS-V. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. 5 ed. Artmed: São Paulo, 2013.

DRUGBANK. **Escitalopram - DB01175**. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01175>. Acesso em: 12 abr. 2021.

ENSEMBL. Ensembl Genome Browser. **cyp2x6**. 2021a. Disponível em: https://www.ensembl.org/Danio_rerio/Gene/Summary?db=core;g=ENSDARG00000079653;r=25:17358287-17368231. Acesso em: 06 jul. 2021.

ENSEMBL. Ensembl Genome Browser. **cyp3a65**. 2021b. Disponível em: https://www.ensembl.org/Danio_rerio/Gene/Summary?db=core;g=ENSDARG00000103295;r=1:59338175-59348118;t=ENSDART00000170901. Acesso em: 24 ago. 2021.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Medicamentos aprovados pela FDA: Lexapro (Escitalopram) para uso oral. 2019. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/021323s051,021365s036lbl.pdf. Acesso em: 06 jun. 2020.

FOREST LABORATORIES. Escitalopram prescribing information [online]. 2014. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021323s044,021365s032lbl.pdf.

Acesso em: 06 jun. 2020.

FUNAE, Y. et al. CYP2D in the brain. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.18, n.6, p.337–349, 2003. DOI: 10.2133/dmpk.18.337.

GOLDSTEIN, J. A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 349–355, 2001. DOI: 10.1046/j.0306-5251.2001.01499.x.

GOLDSTONE, J. V. et al. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in *Zebrafish*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-643>.

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**, v. 98, n. 2, p. 127-134, 2015. DOI: 10.1002/cpt.147.

HODKOVICOVA, N. et al. The effect of the antidepressant venlafaxine on gene expression of biotransformation enzymes in *zebrafish* (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 1686–1696, 2019. DOI: 10.1007/s11356-019-06726-2.

HUBBARD, T. et al. The Ensembl genome database project. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 38-41, 2002. DOI: 10.1093/nar/30.1.38.

HUEZO-DIAZ, P. et al. CYP2C19 genotype predicts steady state escitalopram concentration in GENDEP. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 398–407, 2011. DOI: 10.1177/0269881111414451.

HUREM, S. et al. Parental exposure to gamma radiation causes progressively altered transcriptomes linked to adverse effects in *zebrafish* offspring. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 855–863, 2018. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.023.

JOSEPH, A. L. History of the use of antidepressants in primary care, primary care companion. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 5, p. 6-10, 2003. Disponível em: <https://paindr.com/wp-content/uploads/2012/09/History-of-the-Use-of-Antidepressants-in-Primary-Care.pdf>. Acesso em: 30 dez. 2019.

KASPER S.; LOFT H.; SMITH J. R. O escitalopram é eficaz e bem tolerado no tratamento do Transtorno de Ansiedade Social (TAS) [resumo]. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. 2002; 5 Supl. 1: Pôster S131 plus apresentado no 23º Congresso CINP, de 23 a 27 de junho de 2002, Montreal. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Siegfried-Kasper/publication/268060094_Escitalopram_is_Efficacious_and_Well_Tolerated_in_the_Treatment_of_Social_Anxiety_Disorder/links/548d5f190cf214269f20ebdc/Escitalopram-is-Efficacious-and-Well-Tolerated-in-the-Treatment-of-Social-Anxiety-Disorder.pdf. Acesso em: 27 out. 2021.

KEERS, R.; AITCHISON, K. J. Pharmacogenetics of antidepressant response. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 11, n. 1, p. 101–125, 2011. DOI: 10.1586/ern.10.186.

KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISSMODEL Repository of annotated three dimensional protein structure homology models. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. D230–D234, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh008.

LACHOWICZ, J., et al. *Zebrafish* as an Animal Model for Testing Agents with Antidepressant Potential. **Jornal Acadêmico Life**, v.11, n.8, p.792-811, 2021. doi:10.3390/life11080792.

LUNDBECK. DPD Approved Drugs: Escitalopram. 2018. Disponível em: https://www.lundbeck.com/upload/ca/en/files/pdf/pm/Ciprallex%20JUN2018_PM_E_clean.pdf. Acesso em: 06 jun. 2020.

MCKINNON, R. A. et al. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. **Gut**, v. 36, n. 2, p. 259–267, 1995. DOI: 10.1136/gut.36.2.259.

MESHALKINA, D. A. et al. The effects of chronic amitriptyline on *zebrafish* behavior and monoamine neurochemistry. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 6, p. 1191-1199, 2018. DOI: 10.1007/s11064-018-2536-5.

MURDOCH, D.; KEAM, S. J. Escitalopram. **Drugs**, v. 65, n. 16, p. 2379-2404, 2005. DOI: 10.2165/00003495-200565160-00013.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **CYP2C19 - cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19** [*Homo sapiens* (human)]. 2021a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1557>. Acesso em: 01 set 2021.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **CYP2D6 - cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6** [*Homo sapiens* (human)]. 2021b. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1565>. Acesso em: 01 set 2021.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **CYP3A4 - cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4** [*Homo sapiens* (human)]. 2021c. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=1576>. Acesso em: 01 set 2021.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **BLAST Basic Local Alignment Search Tool**. 2021d. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 1 set 2021.

NELSON, D. R. et al. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-18, 2004. DOI: 10.1097/00008571-200401000-00001.

NIELSEN et al. The psychoactive drug Escitalopram affects swimming behaviour and increases boldness in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 485-497, 2018.

NIELSEN et al. The Psychoactive Drug Escitalopram Affects Foraging Behavior in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology**, v. 38, n. 9, 2019.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Organização Mundial da Saúde (OMS)**. Depressão. Washington: OPAS/OMS. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/depressao#:~:text=Em%20todo%20o%20mundo%2C%20estima,s%C3%A3o%20mais%20afetadas%20que%20homens>. Acesso em: 21 de mar. 2021.

PETROVIĆ, J.; PELIĆ, V.; LAUSCHKE, V.M. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. **European Journal of Human Genetics**, v. 28, n. 1, p. 88-94, 2019. DOI: 10.1038/s41431-019-0480-8.

PHARMVAR. Pharmacogene Variation Consortium. **CYP3A4**. 2020. Disponível em: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A4>. Acesso em: 29 maio 2021.

PINCUS, H. A. et al. Depression in primary care: linking clinical and systems strategies. **General Hospital Psychiatry**, v. 23, n. 6, p. 311-318, 2001. DOI: 10.1016/s0163-8343(01)00165-7.

PLENGE, P.; MELLERUP, E. T.; LAURSEN, H. Affinity modulation of [3H]imipramine, [3H]paroxetine and [3H]citalopram binding to the 5-HT transporter from brain and platelets. **European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology**, v. 206, n. 3, p. 243-250, 1991. DOI: 10.1016/s0922-4106(05)80025-2.

QIU H. et al. CYP3 phylogenomics: evidence for positive selection of CYP3A4 and CYP3A7. **Pharmacogenet Genomics**, n. 1, v. 18, p. 53-66, 2008. Disponível em: https://www.medizin.uni-muenster.de/fileadmin/einrichtung/zmbe/iep/schmitz/Pdfs/37_Qiu2008.pdf.

RENDIC, S.; GUENGERICH, P. F. Summary of information on the effects of ionizing and non-ionizing radiation on cytochrome P450 and other drug metabolizing enzymes and transporters. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 6, p. 787–814, 2012. DOI: 10.2174/138920012800840356.

RICHENDRER, H.; CRETON, R. Cluster analysis profiling of behaviors in *zebrafish* larvae treated with antidepressants and pesticides. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 69, p. 54-62, 2017. DOI: 10.1016/j.ntt.2017.10.009.

ROBINSON, B. L. et al. Cyclosporine exacerbates ketamine toxicity in *zebrafish*: Mechanistic studies on drug-drug interaction. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 12, p. 1438–1447, 2017. DOI:10.1002/jat.3488.

ROSHDY, H. M.; SHOMAN, T. M. T. Cytogenetic and developmental effects of antidepressant drug (Escitalopram) on female mice and embryos. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 17, p. 63–69, 2004. DOI: 10.21608/EJHM.2004.18158.

RUZICKA, L. et al. The *Zebrafish* Information Network: new support for non-coding genes, richer Gene Ontology annotations and the Alliance of Genome Resources. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. D867-D873, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1090.

SAAD, M. et al. Xenobiotic metabolism in the *zebrafish*: a review of the spatiotemporal distribution, modulation and activity of cytochrome p450 families 1 to 3. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, n. 1, p. 1-11, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.41.1>.

SANCHES, C.; REINES, E. H.; MONTGOMERY, S. A. A comparative review of escitalopram, paroxetine and sertraline: Are they all alike?. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 29, n. 4, p. 185-196, 2014. DOI: 10.1097/YIC.0000000000000023.

SAPS. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Brasileiros buscaram suporte profissional durante a pandemia. Ministério da Saúde. 2020. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/noticia/10658>. Acesso em: 27 out. 2021.

SCHAEFER, I.C. et al. The side-by-side exploratory test: a simple automated protocol for the evaluation of adult zebrafish behavior simultaneously with social interaction. **Behavioural Pharmacology**, v.26, n.1, p. 691-696, 2015.

SHANKAR, K.; MEHENDALE, H. M. Cytochrome P450. **Encyclopedia of Toxicology**, p. 1125-1127, 2014. Elsevier. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00299-2>.

SIM, S. C. et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, p. 103–113, 2006. DOI: 10.1016/j.clpt.2005.10.002.

SINGH, S. B. et al. A model for predicting likely sites of CYP3A4-mediated metabolism on drug-like molecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1330–1336, 2003. DOI: 10.1021/jm020400s.

STEWART, A.M., et al. Aquatic toxicology of fluoxetine: Understanding the knowns and the unknowns. **Aquatic Toxicology**, v.156, p.269–273, nov. 2014. DOI:10.1016/j.aquatox.2014.08.014.

SWISS-MODEL. **Sodium-dependent serotonin transporter P31645 (SC6A4_HUMAN)**. 2021. Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P31645>. Acesso em: 8 set 2021.

TANG, P. F. et al. Functional measurement of CYP2C9 and CYP3A4 allelic polymorphism on sildenafil metabolism. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 5129-5141, 2020. DOI: 10.2147/dddt.s268796.

THEN, C. K. et al. Risk analysis of use of different classes of antidepressants on subsequent dementia: a nationwide cohort study in Taiwan. **Plos One**, v. 12, n. 4, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0175187.

TOMPKINS, L. M.; WALLACE, A. D. Mechanisms of cytochrome P450 induction. **Journal Biochemistry Molecular Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 176–181, 2007. DOI: 10.1002/jbt.20180.

TSAI, M. H. et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes influence metabolism of the antidepressant escitalopram and treatment response. **Pharmacogenomics**, v. 11 n. 4, p. 537–546, 2010. DOI: 10.2217/pgs.09.168.

TSENG, H-P. et al. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from *zebrafish* larva. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 205, n. 3, p. 247–258, 2005. DOI: 10.1016/j.taap.2004.10.019

UNIPROT. **UniProtKB - P33261 (CP2CJ_HUMAN). Cytochrome P450 2C19**. 2021a. Disponível em: https://www.uniprot.org/uniprot/P33261#subcellular_location. Acesso em: 08 set. 2021.

UNIPROT. **UniProtKB - P10635 (CP2D6_HUMAN). Cytochrome P450 2D6**. 2021b. Disponível em: https://www.uniprot.org/uniprot/P10635#subcellular_location. Acesso: 08 set. 2021.

UNO, T.; ISHIZUKA, M.; ITAKURA, T. Cytochrome P450 (CYP) in fish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 1-13, 2012. DOI: 10.1016/j.etap.2012.02.004.

VERMOESEN, K. et al. Assessment of the convulsant liability of antidepressants using *zebrafish* and mouse seizure models. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 3, p. 450-460, 2011. DOI: 10.1016/j.yebeh.2011.08.016.

VON MOLTKE L. L. et al. Escitalopram (S-citalopram) and its metabolites in vitro: cytochromes mediating biotransformation, inhibitory effects, and comparison to R-citalopram. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 8, p. 1102-1109, 2001. Disponível em: <https://dmd.aspetjournals.org/content/29/8/1102.long>. Acesso em: 22 out. 2021.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. 296-303, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky427.

WAUGH, J.; GOA, K. L. Escitalopram. **CNS Drugs**, v. 17, n. 5, p. 343-362, 2003. DOI: 10.2165/00023210-200317050-00004.

WERK, A.N.; CASCOBI, I. Functional Gene Variants of CYP3A4. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 3, p. 340-348, 2014. DOI: 10.1038/clpt.2014.129.

WISHART, D. S. et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D668-672, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkj067.

ZFIN. The *Zebrafish* Information Network. **Gene: cyp2x6**. 2021a. Disponível em: <https://zfin.org/ZDB-GENE-050320-144>. Acesso em: 11 ago. 2021.

ZFIN. The *Zebrafish* Information Network. **Gene: cyp3a65**. 2021b. Disponível em: <https://zfin.org/ZDB-GENE-050604-1>. Acesso em: 25 ago. 2021.