



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

MAYARA FERREIRA MOTA
TAYSSA CRISTINA LIMA DE VILHENA

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES MOLECULARES
DE MEDICINA DE PRECISÃO NO GENE *DPYD* COMO
PREDITOR DE TOXICIDADE A TERAPIA COM USO DE
FLUOROPYRIMIDINAS EM PACIENTES COM NEOPLASIA
GASTROINTESTINAL**

BELÉM-PA
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES MOLECULARES
DE MEDICINA DE PRECISÃO NO GENE *DPYD* COMO
PREDITOR DE TOXICIDADE A TERAPIA COM USO DE
FLUOROPIRIMIDINAS EM PACIENTES COM NEOPLASIA
GASTROINTESTINAL**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado para a obtenção de grau
em medicina pela Universidade
Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Ney Pereira
Carneiro dos Santos

BELÉM
2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se mostrar presente nos apoiando em todos os momentos da vida, iluminando as nossas tomadas de decisão, fortalecendo e orientando durante essa jornada, todos os dias nos dando saúde e sabedoria para a realização dos nossos objetivos.

Ao nosso querido orientador, prof. Doutor Ney Pereira Carneiro Dos Santos, pela orientação, pela compreensão, disponibilidade, paciência, dedicação, amizade, por ser um exemplo de profissional e por compartilhar conosco seu vasto conhecimento como pesquisador. Obrigada por ser o melhor orientador que poderíamos ter!

Aos oncologistas Danielle Feio, e Williams Barra por nos apresentarem a especialidade da melhor forma possível e por serem nossos grandes exemplos como profissionais. Obrigada por nos incluírem nesse grande projeto de pesquisa.

Ao Núcleo de pesquisa em Oncologia, por viabilizar a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, José Mota e Neli Mota por toda a dedicação, amor e comprometimento, vocês foram os alicerces que me permitiram chegar até aqui. Aos meus irmão, Eduardo e Elaine, por todo o apoio e companheirismo.

Ao meu namorado, Rafael Freire, por toda a paciência, compreensão, companheirismo e amor durante esta jornada.

Aos meus avós, Francisca Maria e Raimundo Lima, pelo amor incondicional por toda a minha vida, mesmo em meio às dificuldades me deram todo o amor e compreensão que se possa imaginar. A minha mãe, Maria Francinete Lima, que se dedica à me dar o conforto e todas as possibilidades de sair da minha cidade natal, e vir conquistar esse sonho, estando presente em todas as etapas da minha trajetória.

Ao meu tio, Raildo Lima, pela educação concreta que me ensinou à correr atrás dos meus objetivos e perseguir meu sonho, obrigada por acreditar em mim e por todos os livros! À minha tia Conceição Lima, minha segunda mãe, exemplo de amor e perseverança. Ao meu namorado, Rafael Novaes, pela compreensão, amor e companheirismo que jamais tive, obrigada por estar ao meu lado em todos os sentidos.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Capacidades adquiridas das células tumorais durante os múltiplos passos da carcinogênese.....	9
Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2016/2017 por gênero, na região Norte do Brasil, exceto câncer de pele não melanoma.....	6
Figura 3 - Estrutura química do 5-FU, Uracil e Timina, respectivamente. Fonte: Adaptado de PubChem/NCBI (Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).....	13
Figura 4 Metabolismo de 5-Fluorouracil. DPD-diidropirimidina desidrogenase; DHFU-diidrofluorouracil; OPRT-rotato fosforibosiltransferase; PRPP-fosforibosil pirofosfato; FUMP-monofosfato de fluorouridina; FUDPdifosfato de fluorouridina; FUTP-trifosfato de fluorouridina; RRribonucleotídeo redutase; FdUMP-monofosfato de fluorodeoxiuridina; FdUDP-difosfato de fluorodeoxiuridina; FdUTP-trifosfato de fluorodeoxiuridina; TS-timidilatosintase; TK-timidina cinase; TP-timidina fosforilase; UP-uridina fosforilase; FUR-fluorouridina; UK- uridina cinase; FUDRfluorodeoxiuridina. Adaptado de Longley et al., 2003.....	17

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa para o biênio 2016/2017.....	6
Tabela 2 - Ajustes de dose terapêutica das fluoropirimidinasdeacordo com o fenótipo/ genótipo do gene <i>DPYD</i> , sugerido pela FDA.....	21
Tabela 3 - Características clinico-epidemiológicas de 142 pacientes tratados com quimioterapia à base de fluoropirimidinas.....	27
Tabela 4 - Frequência das principais toxicidades, segundo o grau de ocorrência, apresentadas em 106 pacientes oncológicos tratados com 5-FU.....	28
Tabela 5 - Distribuição genotípica dos polimorfismos investigados entre os pacientes que tiveram ausência ou presença de toxicidades (grau 1-4) durante o tratamento com 5-FU.....	29
Tabela 6 - Correlação entre as toxicidades e os polimorfismos no gene <i>DPYD</i> em pacientes tratados com fluoropirimidinas que apresentaram e não apresentaram toxicidades de qualquer grau (1-4).....	31

RESUMO

Introdução: As fluoropirimidinas são os principais quimioterápicos no tratamento de neoplasias malignas do trato gastrointestinal. Contudo, cerca de 30% dos pacientes apresentam toxicidades graves, levando a descontinuidade terapêutica e óbito por toxicidade. Biomarcadores capazes de prever o tempo ótimo para o início do tratamento, a combinação de drogas a ser escolhida e a dose-efetiva minimamente tóxica são instrumentos norteadores essenciais. O objetivo deste trabalho é investigar a associação de nove marcadores moleculares recomendados por agências internacionais implicados na via metabólica do 5-FU: DPYD*2A (rs3918290), DPYD*5 (rs1801159), DPYD (rs17116806), DPYD (rs17376848), DPYD (rs1760217), DPYD (rs1801265), DPYD (rs4970722), DPYD (rs55886062), DPYD (rs67376768) com o perfil de toxicidade a esse fármaco, em pacientes com câncer do trato gastrointestinal na região norte do país. **Métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo, transversal, tipo caso-controle, com avaliação de dados clínicos e epidemiológicos de 142 pacientes tratados com fluoropirimidinas em monoterapia ou combinação. O sistema TaqMan® foi utilizado na investigação dos polimorfismos do gene *DPYD*. **Resultados:** O polimorfismo rs3918290 apresentou associação significativa com a presença de toxicidades graves (grau 3-4), assim como o marcador rs1801159 e a presença de diarreia ($p=0,038$). As variantes polimórficas rs1801159 e rs4970722 apresentaram associação significativa para o desenvolvimento de neuropatia ($p=0,015$ e $p=0,025$, respectivamente). Adicionalmente, os polimorfismos rs17376848, rs4970722 e rs1801265 foram estatisticamente significantes para o desenvolvimento de reações hematológicas nos pacientes tratados com 5-FU ($p=0,043$, $p=0,025$ e $p=0,016$). **Conclusão:** Os dados do presente projeto corroboram com os estudos que sugerem que polimorfismos no gene *DPYD* são preditores de toxicidades em pacientes oncológicos tratados com fluoropirimidinas. Entretanto, há a necessidade de estudos adicionais para reforçar a importância de estudos clínicos com 5-FU e fluoropirimidinas orais em populações miscigenadas, como é o caso da população brasileira.

Palavras-chave: *DPYD*; Fluoropirimidinas, câncer gastrointestinal, farmacogenética, toxicidade.

ABSTRACT

Background: Fluoropyrimidines are the main chemotherapy treatment of gastrointestinal tumors. However, approximately 30% of patients exhibit severe toxicities, leading to treatment discontinuation by toxicity and death. Biomarkers capable of predicting the optimum time for onset of treatment, combination of drugs to be chosen and minimally toxic-effective dose are essential guiding instruments. **Purpose:** To investigate association of molecular markers recommended by international agencies involved in the metabolic pathway of 5-FU: DPYD*2A (rs3918290), DPYD*5 (rs1801159), DPYD (rs17116806), DPYD (rs17376848), DPYD (rs1760217), DPYD (rs1801265), DPYD (rs4970722), DPYD (rs55886062), DPYD (rs67376768), with the toxicity profile to these drug in patients with gastrointestinal tumors in the Brazilian's northern region. **Methods:** A retrospective, cross-sectional, case-control was performed with evaluation of clinical and epidemiological data of 142 patients treated with fluoropyrimidines in monotherapy or combination. The TaqMan® system was used to investigate the *DPYD* polymorphisms. **Results:** The polymorphism rs3918290 showed a significant association with the presence of severe toxicities (grade 3-4), as well as the marker rs1801159 and the presence of diarrhea ($p = 0.038$). The polymorphic variants rs1801159 and rs4970722 showed a significant association for the development of neuropathy ($p = 0.015$ and $p = 0.025$, respectively). In addition, the polymorphisms rs17376848, rs4970722 and rs1801265 were statistically significant for the development of hematological reactions in patients treated with 5-FU ($p = 0.043$, $p = 0.025$ and $p = 0.016$). **Conclusion:** The data from this project corroborate with studies that suggest that polymorphisms in the *DPYD* gene are predictors of toxicities in cancer patients treated with fluoropyrimidines. However, there is a need for additional studies to reinforce the importance of clinical studies with 5-FU and oral fluoropyrimidines in miscegenated populations, such as the Brazilian population.

Keywords: DPYD; Fluoropyrimidines, gastrointestinal cancer, pharmacogenetics, toxicity.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES.....	IV
ÍNDICE DE TABELAS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 O CÂNCER NO CENÁRIO NACIONAL E REGIONAL	9
1.2 CÂNCER GASTROINTESTINAL	12
1.3 5- FLUOROURACIL	13
1.4 FARMACOGENÉTICA APLICADA AO CÂNCER	14
1.5 FARMACOGENÉTICA DO 5-FU	16
1.6 DIHIDROPIRIMIDINA DESIDROGENASE HUMANA (DPYD).....	18
1.7 TESTES FARMACOGENÉTICOS VALIDADOS PELA FDA.....	20
2. APLICABILIDADE CLÍNICA	21
3. OBJETIVOS	22
3.2 OBJETIVO GERAL.....	22
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 CASUÍSTICA.....	23
4.1 TIPO DE ESTUDO.....	23
4.2 LOCAL.....	23
4.3 POPULAÇÃO	23
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:.....	24
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	24
4.6 CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	24
4.7 COLETAS DE DADOS E MATERIAIS.....	24
4.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA.....	24
4.7.2 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS	25
4.7.3 ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA	25
4.7.4 PROTOCOLOS DE PESQUISA.....	25
4.8 MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	26
4.9 ANÁLISE DOS RISCOS E BENEFÍCIOS	26
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	39
APÊNDICE 2 – FICHA CLINICO-EPIDEMIOLÓGICA.....	42
APÊNDICE 3 - ARTIGO	43

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HOSPITAL JOÃO DE BARROS BARRETO	56
ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HOSPITAL OPHIR LOYOLA.....	59
ANEXO 3– ACEITE DO ORIENTADOR	63
ANEXO 4- FOLHA DE ROSTO DA PLATAFORMA BRASIL.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER NO CENÁRIO NACIONAL E REGIONAL

O câncer pode ser definido como uma doença multifatorial, que resulta de interações complexas entre alterações genéticas e fatores ambientais. A origem de um tumor ocorre através de várias alterações genéticas e epigenéticas. Essas alterações podem ser aberrações cromossômicas, ganho de função, perda de função, polimorfismos, ocorrendo comprometimento da manutenção da integridade genômica (Hanahan e Weinberg, 2011).

Segundo Hanahan e Weinberg (2011), os tumores são mais do que massas insulares de proliferação de células cancerosas. Em vez disso, eles são tecidos complexos compostos de múltiplos tipos de células distintas que participam de interações heterotípicas uma com a outra. Assim a biologia dos tumores já não pode ser entendida simplesmente enumerando as características das células cancerosas, mas sim deve englobar as contribuições do “microambiente do tumor” para tumorigênese. Dessa forma, as características das células tumorais englobam autossuficiência quanto ao sinal de crescimento, insensibilidade aos fatores inibitórios, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, reprogramação do metabolismo energético, evasão da vigilância imune, invasão celular e metástase (Figura 1), demonstrando o quão complexa é a doença neoplásica (Hanahan e Weinberg, 2011).



Figura 1. Capacidades adquiridas das células tumorais durante os múltiplos passos da carcinogênese.

Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Nos últimos anos as pesquisas na área da oncologia têm ganhado uma atenção especial, principalmente devido ao aumento dos casos de câncer em todo o mundo. Do ponto de vista laboratorial, a busca pela compreensão dos mecanismos que levam ao desenvolvimento do câncer e investigações de marcadores genéticos que possam identificar precocemente a doença ou contribuir na aplicação de uma terapia individualizada, são algumas das formas de investigações mais desenvolvidas no presente.

O Câncer é considerado um problema de saúde pública mundial (OMS, IARC). Segundo dados do instituto nacional do câncer a incidência de câncer no mundo aumentou em 20% na última década. Estima-se para o ano de 2030 aproximadamente 27 milhões de casos novos no mundo, realidade esta que também pode ser associada ao processo de envelhecimento e crescimento populacional (Stewart e Wild, 2014).

A estimativa mundial mais recente, para o ano de 2012, previa 14,1 milhões de casos novos de câncer (excluindo câncer de pele não-melanoma) e 8,2 milhões de mortes causadas pela doença. Os tipos de tumores com maior incidência e taxas de mortalidade entre os homens são câncer de pulmão (16,7%), próstata (15,0%), colorrectal (10,0%) e estômago (8,5%). Entre mulheres, os tipos mais incidentes são mama (25,2%), Colorrectal (9,2%), pulmão (8,7%), Colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%). As estimativas dos generos reunidos, demonstrou que os tipos mais incidentes eram pulmão (13%), mama (12%), colorrectal (10%), próstata (8%) e estômago (7%). Quanto a mortalidade, o cancer de pulmão demonstrou-se o mais incidente com 19%, seguido pelo empate do cancer de fígado, estômago e colorrectal (9%) e mama (6%); (Stewart e Wild, 2014).

O câncer colorretal (CCR) e o câncer gástrico são as principais neoplasias malignas do trato gastrointestinal (TGI). O CCR é o terceiro mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres no mundo, enquanto o câncer gástrico é o quarto mais incidente entre os homens e o quinto entre as mulheres. O câncer gástrico é quinta neoplasia maligna mais incidente no mundo e a segunda causa de morte por câncer (GLOBOCAN, 2012; INCA, 2016).

As estimativas do INCA para o biênio 2016-2017 apontam a estimativa de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer no Brasil. Destes, 16.660 mil

casos novos de câncer de cólon e reto em homens e de 17.620 em mulheres e 12.920 casos novos de Câncer gástrico em homens e 7600 em mulheres.

Tabela 1. Estimativa para o biênio 2016/2017 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de números de casos novos por câncer no Brasil, segundo sexo e localização primária*.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.380	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,38	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

*Números redondos de 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: INCA/MS, 2015.

A região Norte do Brasil, segundo as estimativas para o biênio 2016/2017, seria responsável por 17.190 casos novos de câncer, excluindo neoplasia de pele não melanoma. Para a região, o CCR é o quarto mais frequente entre os homens, com estimativa de 440 casos novos e o terceiro entre as mulheres, com estimativa de 480 casos novos. O Câncer gástrico é o segundo mais frequente em homens, com estimativa de 970 casos novos e o quarto mais frequente entre as mulheres, com estimativa de 480 casos novos (inca 2016).



Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.470	28,6%	Homens 	Mulheres 	Colo do Útero	1.970	23,1%
Estômago	970	11,2%			Mama Feminina	1.810	21,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	680	7,9%			Cólon e Reto	480	5,6%
Cólon e Reto	440	5,1%			Estômago	480	5,6%
Bexiga	370	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	410	4,8%
Leucemias	310	3,6%			Glândula Tireoide	270	3,2%
Cavidade Oral	290	3,4%			Leucemias	250	2,9%
Laringe	250	2,9%			Ovário	250	2,9%
Linfoma não Hodgkin	230	2,7%			Corpo do Útero	230	2,7%
Sistema Nervoso Central	230	2,7%			Sistema Nervoso Central	190	2,2%

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2016/2017 por gênero, na região Norte do Brasil, exceto câncer de pele não melanoma.

Fonte: Modificado de INCA/MS, 2015.

1.2 CÂNCER GASTROINTESTINAL

Entre os tumores do trato gastrointestinal, podemos destacar, o câncer gástrico (CID-10 C16), que é o quinto tumor maligno mais frequente no Brasil e no mundo, com alta incidência de mortalidade (9% em todo o mundo). A maioria dos cânceres gástricos são adenocarcinomas (neoplasias epiteliais malignas) do tipo esporádico (90%);(Stewart e Wild, 2014).

Entre os fatores ambientais que podem contribuir para o aumento do risco de câncer gástrico, a infecção por *Helicobacter pylori*, é a principal, além da composição da dieta e do tabagismo (Stewart e Wild, 2014).

Outra neoplasia muito incidente em nossa região, incluída entre os tumores malignos do trato gastrointestinal é o câncer colorrectal, definição utilizada para carcinomas localizados no cólon ou reto. O câncer de cólon e reto (CID-10 C18 e C20) é o terceiro tipo de tumor mais frequente no Brasil e no mundo, com alta incidência de mortalidade (9%, do total); (Stewart e Wild, 2014).

O câncer colorrectal é uma doença associada ao “estilo de vida”, altas incidências são observadas em países com dieta rica em calorias e gordura animal, carnes processadas, populações com hábitos sedentários, obesidade e ingestão de álcool e tabagismo. Em alguns países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, o padrão de incidência mantém-se estável ou em redução nos últimos anos, esta realidade pode estar associada à detecção precoce de lesões pré-cancerosas (NCI, 2016). A história natural do câncer de cólon e reto fornecem condições para a realização da prevenção e detecção precoce da doença. Métodos endoscópicos (colonoscopia) e a pesquisa por sangue oculto nas fezes são ferramentas de detecção precoce capazes de detectar pólipos adenomatosos e diagnosticar

tumores em fases iniciais. A sobrevida associada a este tipo de câncer está diretamente ligada ao estágio em que a doença é diagnosticada, quando mais cedo ocorrer o diagnóstico, maiores são as chances de cura e sobrevida (INCA/MS, 2015).

1.3 5- FLUOROURACIL

As fluoropirimidinas são agentes quimioterápicos amplamente utilizados para o tratamento de neoplasias malignas. Desde a sua introdução há mais de 50 anos, o 5-fluorouracil (5-FU), um antimetabólito que interfere na duplicação e transcrição do DNA (fase G1/S), permanece como o quimioterápico mais empregado no tratamento oncológico e assume papel preponderante no esquema terapêutico de neoplasias malignas do trato gastrointestinal, tanto em monoterapia quanto em combinação (DUSCHINSKY R *ET AL.*, 1957; LONGLEY *ET AL.*, 2003; SHIRASAKA, 2009)

Estima-se que 2 milhões de pacientes são tratados com Fluoropirimidinas anualmente, em todo o mundo. A 5-Fluorouracil (5-FU) e seus pró-fármacos orais Capecitabine e Tegafur desempenham um papel chave no tratamento do câncer (Matsusaka e Lenz, 2015; Meulendijks et al., 2016).

O 5-FU é um composto análogo de uracil e timina, que apresenta um átomo de flúor ligado ao carbono 5, em substituição ao átomo de hidrogênio ou ao grupamento metil, característicos destas bases nitrogenadas (Figura 3). Ele entra rapidamente na célula usando o mesmo mecanismo de transporte facilitado da uracil (Savva-Bordalo et al., 2010).

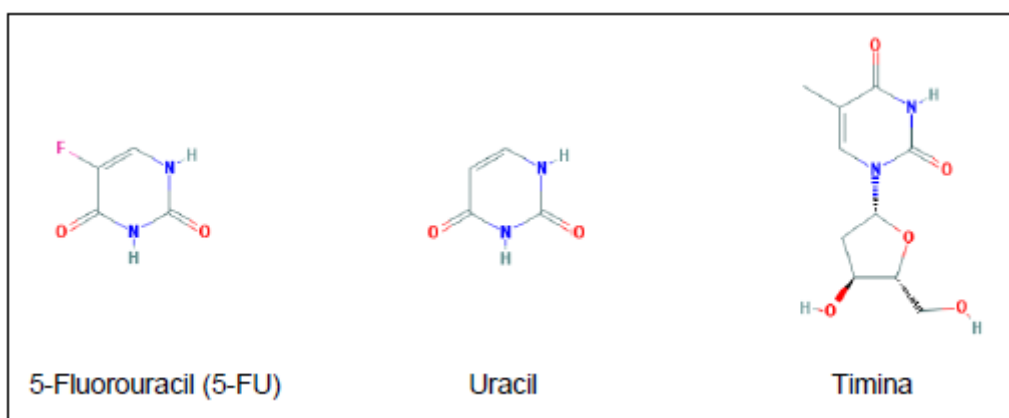


Figura 3: Estrutura química do 5-FU, Uracil e Timina, respectivamente. Fonte: Adaptado de PubChem/NCBI (Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

O 5-Fluorouracil (5-FU) possui dois mecanismos principais de ação descritos. Primeiramente, age como um antimetabolito através da forma ativa FdUMP que inibe a função do gene timidilato sintetase (TYMS) na produção de TS, uma enzima chave na duplicação e transcrição do DNA. Outro mecanismo utilizado seria a promoção da morte celular e apoptose, através da incorporação de produtos ativos FUTP ou FdUTP no RNA e DNA, respectivamente (Wang et al., 2014).

Muitos estudos discutem os fatores que determinam a eficácia clínica da quimioterapia baseada em 5-FU. Os pacientes tratados com 5-FU podem apresentar distintas reações adversas: mielosupressão, cardiotoxicidade, reações hematológicas (leucopenia, incluindo neutropenia febril, anemia, e trombocitopenia), reações gastrointestinais (mucosite oral e intestinal, estomatite, diarreia, náuseas e vômitos) e toxicidades dermatológicas (perda de cabelo, síndrome mão e pé (HFS) e pele seca); (Champbel et al., 2016).

As reações adversas ao tratamento com 5-FU são consideradas severas quando classificadas em grau 3 e 4 de toxicidade, de acordo com o Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Do total de pacientes tratados com 5-FU, de 10-40% apresentam toxicidades severas, em geral estes casos resultam em hospitalizações prolongadas e onerosas (Matsusaka e Lenz, 2015; Champbel et al., 2016).

A mortalidade relacionada a complicações decorrentes do tratamento quimioterápico com 5-FU tem taxas de 0,5-1,0% dos pacientes (Meulendijks et al., 2016).

1.4 FARMACOGENÉTICA APLICADA AO CÂNCER

A farmacogenética por definição refere-se ao estudo das diferenças genéticas em vias metabólicas que podem afetar as repostas de um indivíduo a fármacos em termos de efeitos terapêuticos e adversos. Diversos fatores tais como: sexo, idade, etnia, fumo, etilismo e variações genéticas podem influenciar na resposta de um paciente ao medicamento. Assim a farmacogenética busca estudar como as diferenças genéticas influenciam na resposta a agentes farmacológicos (Suarez-Kurtz, 2010; Ahmed et al., 2016).

Tradicionalmente a terapia do câncer tem como alvo células em divisão no corpo, entretanto as células cancerosas não são as únicas células em divisão, por isso os tratamentos para o câncer tendem a ter muitos efeitos adversos.

A aplicação da farmacogenética na área oncológica é um processo complexo, por que envolve o difícil manejo clínico da quimioterapia aplicada a dois genomas: o do indivíduo (representado por mutações germinativas) e o do tumor (representado por mutações somáticas) este último apresenta um papel crítico na resposta antineoplásica (Reis, 2006; Wang et al., 2011).

A busca por novas estratégias terapêuticas, menos tóxicas e invasivas, evidencia a interface entre a pesquisa e o atendimento clínico. Essa procura é uma tendência global da farmacogenética, que associa o desenvolvimento de esquemas terapêuticos ao perfil genético dos pacientes.

O advento de novos esquemas terapêuticos com agentes químicos de nova geração oferece novas esperanças para melhorar os resultados de tratamento entre pacientes. De forma convergente, os rápidos avanços no campo da genômica funcional têm permitido estabelecer novas estratégias de quimioterapia, que permitem a escolha do fármaco ideal, na dose adequada, para cada indivíduo, tomando por base os perfis moleculares do paciente (tanto de células normais como de células tumorais, dependendo do caso), o que se descreve comumente como a medicina personalizada (Nishiyama e Eguchi, 2009).

Esses avanços representam a possibilidade de, em um futuro próximo, oferecer um tratamento personalizado (com fármaco adequado em dose exata) que pode melhorar condição clínica e sobrevida do paciente, que seja eficiente em termos de máxima resposta e mínima toxicidade (Loh et al., 2011).

É comum que pacientes que recebem quimioterapia apresentem reações adversas a medicamentos (ADRs). Nos Estados Unidos, as ADRs classificam-se entre a 4ª e 6ª causa de morte (Liou et al., 2007). Muitas vezes as ADRs resultam em risco de vida ou incapacidade significativa que exige internação ou prolongamento da estadia hospitalar existente, o que acaba por aumentar os gastos com saúde.

A FDA recomenda análises genéticas em alguns genes entre eles, o DPYD, como exame de prognóstico em pacientes oncológicos que deverão ser tratados com 5-FU. As recomendações incluem ajuste de dose ou modificação do fármaco na terapia com intuito de evitar ou minimizar as reações adversas, até mesmo o óbito dos pacientes tratados que possuam genótipo de risco (PharmGKB: www.pharmgkb.com).

1.5 FARMACOGENÉTICA DO 5-FU

Grande parte do metabolismo de 5-FU ocorre no fígado, onde a enzima DPD é expressa abundantemente. A enzima DPD converte o 5-FU no composto DHFU, que é metabolicamente inativado e excretado pelo organismo (Shimoyama, 2009).

A via principal de degradação do 5-FU é pela ação da enzima orotato fosforibosiltransferase (OPRT), que requer o co-fator fosforibosil pirofosfato (PRPP) para exercer sua função e metabolizar o 5-FU formando o composto monofosfato de fluorouridina (FUMP). Este composto é fosforilado, gerando o difosfato de fluorouridina (FUDP) que por fim interrompe a síntese normal de RNA através da formação de trifosfato de Fluorouridina (FUTP).

O composto FUDP pode ainda sofrer ação da enzima ribonucleotídeo redutase (RR) e ser convertido em difosfato de fluoro deoxiuridina (FdUDP). O FdUDP, formado a partir do FUMP pode ser desfosforilado ou fosforilado, gerando os metabólitos monofosfato de fluoro deoxiuridina (FdUMP) ou trifosfato de fluoro deoxiuridina (FdUTP), respectivamente (Figura 4).

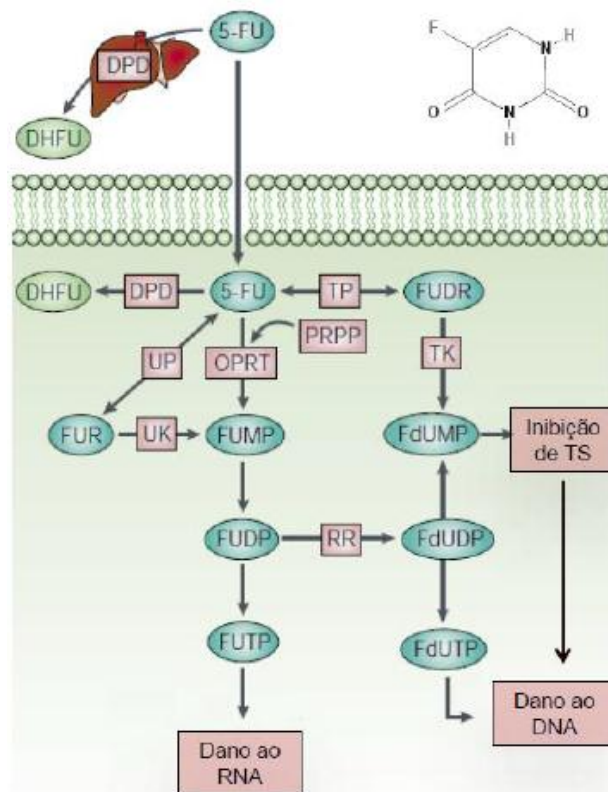


Figura 4. Metabolismo de 5-Fluorouracil. DPD-diidropirimidina desidrogenase; DHFU-diidrofluorouracil; OPRT-orotato fosforibosiltransferase; PRPP-fosforibosil pirofosfato; FUMP-monofosfato de fluorouridina; FUDPdifosfato de fluorouridina; FUTP-trifosfato de fluorouridina; RRribonucleotídeo redutase; FdUMP-monofosfato de fluoro deoxiuridina; FdUDP-difosfato de

fluorodeoxiuridina; FdUTP-trifosfato de fluorodeoxiuridina; TS-timidilatosintase; TK-timidina cinase; TP-timidina fosforilase; UP-uridina fosforilase; FUR-fluorouridina; UK- uridina cinase; FUDRfluorodeoxiuridina. Adaptado de Longley et al., 2003.

FdUMP é um importante metabólito ativo de 5-FU capaz de se ligar a enzima timidilato sintase (TS). Esta enzima é responsável pela metilação de monofosfato deoxiuridina (dUMP) para produzir deoxitimidina monofosfato (dTMP) e formar um complexo ternário estável com a molécula (5,10- metilenotetrahidrofolato).

A TS funciona como um dímero, e ambas as subunidades possuem dois sítios de ligação específicas, sendo um para o dUMP e o outro para a molécula de CH₂THF (5,10-metilenotetrahidrofolato), doadora do grupamento metil necessário para a produção do timidilato.

O composto FdUMP é capaz de ligar-se ao sítio específico do nucleotídeo, formando um complexo ternário estável com a enzima e o CH₂THF, impedindo a ligação do composto dUMP e conseqüentemente a formação do timidilato, essencial na composição do DNA. Esta é uma das vias de ação do 5- FU sobre a síntese do DNA (Longley et al., 2003; Shimoyama, 2009).

Uma via alternativa de produção de FdUMP é mediada pela enzima timidina fosforilase (TP), que metaboliza o 5-FU em FUDR o qual é convertido em FdUMP pela ação da timidina cinase (TK). Por sua vez, o metabólito ativo FdUTP gerado a partir da fosforilação do composto FdUDP é incorporado pelo DNA, levando a danos em sua estrutura e resultando em morte celular.

Outra via alternativa de degradação do 5-FU é mediada pela enzima uridina fosforilase (UP) que converte o 5-FU em fluorouridina (FUR) então metabolizada pela enzima uridina cinase (UK) formando o composto FUMP. FUMP segue sua via de metabolização conforme descrito anteriormente (Longley et al., 2003; Shimoyama, 2009).

Após a administração de fluoropirimidinas, apenas uma pequena fração de 5-FU (1-5%) é convertida em metabólitos citotóxicos intracelulares com efeito antitumoral. Dessa forma a via catabólica exerce um papel especialmente importante na determinação da resposta de um paciente ao 5-FU, uma vez que a atividade reduzida de enzimas envolvidas no catabolismo de 5-FU pode resultar em um aumento substancial da meia-vida do fármaco e assim um aumento de risco de toxicidade grave dose-dependente (Meulendijks et al., 2016).

A eficácia da citotoxicidade de 5-FU é determinada pela atividade das enzimas envolvidas no seu metabolismo, tais como DPD, TS, OPRT e MTHFR. Recentes avanços na farmacogenética elucidaram alguns polimorfismos genéticos nesses genes que poderiam explicar a variabilidades da eficácia e toxicidades relacionadas ao 5-FU (Shimoyama, 2009).

As agências regulamentadoras de fármacos: Agencia de fármacos europeia (EMA), Administração de fármacos e alimentos dos Estados Unidos (FDA), Agencia de produtos farmacêuticos e dispositivos médicos do Japão (PMDA) e Agencia de saúde do Canadá (HCSC) possuem recomendações de ajuste de dose e modificação da terapêutica oncológica com Fluoropirimidinas, de acordo com os genótipos de *2, *13 e rs67376798, do gene DPYD (PharmGKB: <https://www.pharmgkb.org/>).

1.6 DIHIDROPIRIMIDINA DESIDROGENASE HUMANA (DPYD)

O gene da dihidropirimidina desidrogenase humana (DPYD), está localizado no cromossomo 1 na região p22, com 843 kb e 23 éxons. O gene DPYD codifica a enzima DPD que regula o metabolismo inicial da via de catabolismo das bases de pirimidina e uracil (Matsusaka e Lenz, 2015). A atividade de DPD é responsável pela maioria da metabolização de 5-FU (80%) por isso é considerado um dos principais determinantes do acúmulo de 5-FU no organismo, levando a toxicidades (Shimoyama, 2009). Vários fatores influenciam a ação da enzima DPD, incluindo biorritmos, interações medicamentosas e variantes genéticas (Matsusaka e Lenz, 2015).

DPYD é um gene altamente polimórfico, com mais de 35 alelos variantes descritos nas regiões codificantes, no qual um terço é funcionalmente relevante 33 (Meulendijks et al., 2016). A deficiência de DPD foi descrita pela primeira vez como doença recessiva em pacientes que com diversas complicações neurológicas e acúmulo de uracil e timina na sua urina. O paciente com deficiência completa da atividade DPD possui uma doença metabólica familiar rara, pirimidemia, que leva a neurotoxicidade grave relatada durante o tratamento com Fluoropirimidinas (Matsusaka e Lenz, 2015). As variantes genéticas em DPYD podem afetar a atividade enzimática gerando grande impacto em reações adversas e eficácia do tratamento com Fluoropirimidinas. A atividade enzimática do DPD é altamente

variável na população, entre 3 a 5% dos indivíduos possuem atividade de DPD baixa ou deficiente e as deficiências completas de DPD (0% de atividade) são muito raras com uma incidência estimada de 0.01-0,1% na população (Meulendijks et al., 2016).

A farmacogenética da toxicidade de 5-FU tem sido principalmente direcionada para a atividade de DPD. A diminuição da ativação do DPYD pode resultar na toxicidade grave ou mesmo letal, após uma exposição elevada ao fármaco ou seus metabólitos. A via catabólica envolvida na farmacocinética de 5-FU aumenta as toxicidades relacionadas à Fluoropirimidinas (Matsusaka e Lenz, 2015).

Uma mutação de ponto situada no íntron 14 (1905+ 1G>A), previamente nomeada de IVS14 + 1G> A; DPYD *2A (rs3918290) provoca uma deleção dos aminoácidos correspondentes ao exón 14. Estudos sugerem que esta mutação representa até 29% de todas as toxicidades de grau 3-4, em pacientes tratados com 5-FU. Os tipos de toxicidades encontradas com associação significativa com a mutação 1905+1G>A, foram mucosite e leucopenia (Shimoyama, 2009).

As frequências da mutação IVS14+ G>A foram investigadas em alguns grupos étnicos, com variabilidade étnica de 0% em asiáticos a 3% em caucasianos. O genótipo *2A é utilizado como preditor de resposta e toxicidade associados à administração de 5-FU. (Shimoyama, 2009; Matsusaka e Lenz, 2015).

A mutação 2846A>T (rs67376798) resulta em uma mudança de aminoácido Asp949Val. Esta mutação foi relatada em associação com baixa atividade enzimática de DPD, e conseqüentemente um risco elevado de toxicidade quando administrado 5-FU (Matsusaka e Lenz, 2015).

A mutação 1679T>G (DPYD * 13; rs55886062) causou a alteração de aminoácidos de Ile560Ser em um mononucleótido de flavina no domínio de ligação de DPD. Esta mutação é muito rara, apesar de ser relatada em associação com baixas atividades enzimáticas de DPD, ainda pode representar uma parcela pequena das toxicidades associadas a 5-FU (Matsusaka e Lenz, 2015).

O trabalho de Matsusaka e Lenz em 2015 observaram que a presença das mutações no gene DPYD (rs3918290; rs67376798; rs55886062) em pacientes oncológicos tratados com 5FU causavam reduzida depuração plasmática deste fármaco e conseqüentemente associados a toxicidade severa. (Matsusaka e Lenz, 2015).

A atividade de DPD tem um efeito previsível nos níveis de 5-FU, dessa forma, realizar um tratamento personalizado com ajuste de dose baseando-se no perfil de

funcionalidade de DPD (deficiente, normal ou reduzido) pode ser usado como estratégia para reduzir a incidência de toxicidades graves e potencialmente fatais em associação ao uso de fluoropirimidinas (Meulendijks et al., 2016).

As mutações de DPYD (*2A; *13; rs67376798) que levam a deficiência parcial ou completa de fenótipos de DPD tem demonstrado ser importantes biomarcadores moleculares preditivos de toxicidade grave em pacientes submetidos a terapia com Fluoropirimidinas. As agências internacionais regulamentadoras de fármacos recomendam a utilização desses marcadores moleculares nas Diretrizes sobre o uso de testes farmacogenômicos na dosagem de fluoropirimidinas (Matsusaka e Lenz, 2015).

1.7 TESTES FARMACOGENÉTICOS VALIDADOS PELA FDA

Atualmente está disponível uma grande variedade de fármacos que podem contribuir para o aprimoramento da terapia oncológica e que tem aproveitamento clínico diferenciado em relação à presença de polimorfismos genéticos conhecidos. Para esses medicamentos a “Food and Drug Administration-FDA” recomenda utilização de testes farmacogenéticos específicos capazes de predizer a resposta do paciente a determinado medicamento (CAUDLE ET AL., 2013).

A FDA recomenda também análises genéticas em alguns genes entre eles, o *DPYD* e *TYMS*, como exame de prognóstico em pacientes oncológicos que deverão ser tratados com 5-FU. As recomendações incluem ajuste de dose ou modificação do fármaco na terapia com intuito de evitar ou minimizar as reações adversas, ausência de resposta terapêutica e até mesmo o óbito decorrentes de toxicidades potencialmente presumíveis.

Nas Diretrizes sobre o uso de testes farmacogenômicos, as agências internacionais regulamentadoras de fármacos recomendam a utilização de marcadores preditivos de toxicidade no gene *DPYD* na dosagem de fluoropirimidinas, conforme sumarizado a seguir na **Tabela 2** (MATSUSAKA E LENZ, 2015).

Tabela 2-Ajustes de dose terapêutica das fluoropirimidinas de acordo com o fenótipo/ genótipo do gene *DPYD*, sugerido pela FDA.

Fenótipo (Genótipo)	Diplótipos	Implicações de fenótipos	Recomendações de dosagem	Classificação da recomendação
Homozigoto selvagem ou atividade normal Alta atividade de DPD (2 ou mais alelos funcionais)	*1/*1	Atividade normal de DPD Risco normal de toxicidade às fluoropirimidinas	Dosagem e administração de acordo com a bula	Moderada
Heterozigoto ou atividade intermediária (3-5% dos pacientes) Atividade parcial de DPD (um alelo funcional *1 + um alelo não funcional)	*1/*2 ^a *1/*13 *1/rs67376798A	Atividade reduzida de DPD (30-70%) Risco aumentado de toxicidade grave e fatal às fluoropirimidinas	Redução de dose inicial em 50% e titulação de dose com base na toxicidade* ou teste farmacocinético	Moderada
Homozigoto mutante ou atividade deficiente (0,2% dos pacientes) Inatividade de DPD (2 alelos não funcionais)	*2 ^a /*2 ^a *13/*13 rs67376798A/ rs67376798A	Deficiência completa de DPD Risco aumentado de toxicidade grave e fatal às fluoropirimidinas	Selecionar fármaco alternativo	Forte

***Aumentar a dose em pacientes sem toxicidade ou toxicidade tolerável para manter eficácia e diminuir a dose em pacientes que não tolerem a dose inicial para minimizar toxicidades.**

FONTE: Adaptado de Caudle *et al.*, 2013.

Nesse contexto, a descoberta de biomarcadores capazes de predizer o tempo ótimo para o início do tratamento, a combinação de drogas a ser escolhida e a dose efetiva minimamente tóxica são instrumentos norteadores essenciais, uma vez que a eficácia e toxicidade dos antineoplásicos são determinadas pela concentração do fármaco nas células tumorais e nos tecidos normais, estreitamente relacionada à atividade enzimática de metabolização e transporte farmacológico (MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, 2014).

2. APLICABILIDADE CLÍNICA

Por ser o câncer um problema de saúde pública mundial e o estado do Pará apresentar alta incidência e mortalidade decorrente dessa enfermidade, é imprescindível a busca de esquemas terapêuticos individualizados aplicados à prática clínica. As informações obtidas podem beneficiar populações brasileiras nas quais o câncer colorretal e gástrico é endêmico.

O desenvolvimento de pesquisas em farmacogenética iniciou uma nova era na medicina, estabelecendo o conceito de uma terapia individualizada e medicina de precisão, onde o fármaco certo é administrado na dose adequada para determinado paciente. Trata-se de um conceito bastante promissor, na medida que possibilitará a redução dos efeitos adversos através da seleção do melhor fármaco em dose adequada para pacientes que possuem metabolização fármaco-específica deficiente. Ademais, poderá, futuramente, abrir portas para a pesquisa e o

desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, que não necessitem ser metabolizados por determinada via ou enzima deficiente.

O gene *DPYD* é amplamente utilizados na prática clínica pelas agências americana (FDA -Food and Drug Administration) e européia (European Medicines Agency) na predição de toxicidade e resposta ao tratamento com fluoropirimidinas. Dados regionais sobre toxicidades e avaliação de resposta relacionadas ao tratamento quimioterápico para câncer do trato gastrointestinal são escassos, assim como informações nacionais sobre polimorfismos no gene *DPYD* e suas correlações clínicas com uso de 5-FU.

O presente trabalho se propõe a contribuir para a medicina de precisão, através da aplicação da farmacogenômica, no tratamento de neoplasias do trato gastrointestinal.

3. OBJETIVOS

3.2 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação de nove marcadores moleculares recomendados por agências internacionais implicados na via metabólica do 5-FU: *DPYD**2A (rs3918290), *DPYD**5 (rs1801159), *DPYD* (rs17116806), *DPYD* (rs17376848), *DPYD* (rs1760217), *DPYD* (rs1801265), *DPYD* (rs4970722), *DPYD* (rs55886062), *DPYD* (rs67376768) com o perfil de toxicidade a esse fármaco, em pacientes com câncer do trato gastrointestinal na região norte do país.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o levantamento de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos de pacientes com neoplasias do trato gastrointestinal tratados com 5-FU.
- Subestruturar os pacientes tratados com uso de 5fu de acordo com o grau de toxicidade e tipo de toxicidade relatada durante o curso da terapia.
- Genotipar os biomarcadores *DPYD**2A (rs3918290), *DPYD**5 (rs1801159), *DPYD* (rs17116806), *DPYD* (rs17376848), *DPYD* (rs1760217), *DPYD* (rs1801265), *DPYD* (rs4970722), *DPYD* (rs55886062), *DPYD* (rs67376768) nos pacientes investigados.

- Investigar a associação das mutações DPYD*2A (rs3918290), DPYD*5 (rs1801159), DPYD (rs17116806), DPYD (rs17376848), DPYD (rs1760217), DPYD (rs1801265), DPYD (rs4970722), DPYD (rs55886062), DPYD (rs67376768) envolvidas na metabolização do 5-FU, com os tipos e graus de toxicidade relatados pelos pacientes.

- Aplicar um conjunto Multiplex de 61 marcadores do tipo *INDELS* (Inserção/Deleção) para realizar o controle genômico de ancestralidade individual nos pacientes do estudo.

4 CASUÍSTICA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo retrospectivo, transversal, tipo caso-controle, com avaliação de dados clínicos e epidemiológicos dos indivíduos incluídos na pesquisa, e investigação da ocorrência das mutações DPYD*2A (rs3918290), DPYD*5 (rs1801159), DPYD (rs17116806), DPYD (rs17376848), DPYD (rs1760217), DPYD (rs1801265), DPYD (rs4970722), DPYD (rs55886062), DPYD (rs67376768).

4.2 LOCAL

Os dados clínicos e amostras foram coletadas dos pacientes recrutados em dois Serviços de Referência em Oncologia do SUS em Belém do Pará, que são o Hospital Ophir Loyola (HOL) – CACON, e o Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) – UNACON.

4.3 POPULAÇÃO

Foram recrutados para este estudo 142 pacientes portadores de neoplasia do trato gastrointestinal, submetidos a tratamento oncológico com Fluoropirimidinas no HUJBB-UNACON e no Hospital Ophir Loyola. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido serão coletadas amostras de sangue venoso periférico em tubo EDTA para as análises genéticas, bem como informações epidemiológicas, clínicas e laboratoriais contidas nos prontuários.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Idade maior ou igual a 18 anos.
- Diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma gástrico, carcinoma de esôfago, adenocarcinoma colorretal, carcinoma epidermóide de canal anal ou carcinoma de vias biliares.
- Tratamento quimioterápico baseado em monoterapia com fluoropirimidina (5-FU ou capecitabina) ou combinação baseada em fluoropirimidina.
- Pacientes obrigatoriamente tratados no HOL e/ou HUIBB

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Todos os pacientes previamente tratados com drogas mielotóxicas.
- Indivíduos previamente submetidos a tratamento radioterápico ou nuclear sabidamente mielotóxico
- Pacientes portadores de aplasia medular de qualquer origem diagnóstica antes da exposição às fluoropirimidinas
- Pacientes sem registro de informações essenciais à interpretação de dados

4.6 CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Todos os sujeitos recrutados receberão esclarecimentos acerca da natureza, dos objetivos, riscos e benefícios da pesquisa. O paciente também será orientado que é livre para não participar da pesquisa se assim preferir. Após as orientações, será solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1).

4.7 COLETAS DE DADOS E MATERIAIS

4.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA

O material genético foi extraído a partir do sangue total periférico dos pacientes utilizando o kit comercial de extração de DNA BiopurKit Mini Spin Plus – 250 (Biopur, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram medidas a concentração e pureza do DNA com o equipamento NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Termo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

4.7.2 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

Para a análise da genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP*) foi realizada por discriminação alélica utilizando a tecnologia TaqMan OpenArray Genotyping, com um painel de 32 ensaios customizados, no equipamento QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, EUA), de acordo com o protocolo recomendado por Applied Biosystems. O software Taqman Genotyper foi utilizado para a análise dos dados das placas e precisão de leitura dos genótipos, além do controle de qualidade da genotipagem.

4.7.3 ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA

Quanto a análise da ancestralidade, um painel de 61 marcadores Informativos de Ancestralidade (IAMs) foi usado como método de controle genômico da ancestralidade para determinar com precisão o papel de polimorfismos nos genes candidatos em populações miscigenadas da região Norte do Brasil, assumindo três populações parentais (européia, africana e ameríndia), conforme descrito por Santos et al., 2010.

4.7.4 PROTOCOLOS DE PESQUISA

Os dados clínico-epidemiológicos e as informações referentes ao esquema de tratamento, o perfil de toxicidade e a resposta terapêutica foram coletados através da aplicação de Protocolo de Pesquisa (APÊNDICE 2), tendo como fonte os prontuários dos pacientes.

Foram utilizados, quando possível, os Critérios de Terminologia Comum para Eventos Adversos versão 4.0 (CTCAEv4.0); (NCI, 2009); . Dado o caráter retrospectivo de avaliação de toxicidade, em que toxicidades leves podem ser ocultadas, os grupos foram divididos quanto a ocorrência ou não de toxicidades (qualquer grau) e a ocorrência ou não de toxicidades graves (grau 3-4). Ademais, a redução na dose do quimioterápico durante o tratamento também foi interpretada como toxicidade ao esquema terapêutico.

Para a avaliação de resposta radiológica, foram utilizados os Critérios de RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) versão 1.1 (Eisenhauer et

al., 2009) e a resposta clínica foi documentada a partir dos registros das evoluções médicas dos pacientes.

4.8 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os dados foram tabulados em planilhas utilizando o programa Microsoft Office Excel 2010® e analisados através de dois programas:

- Programa Structure v.22, utilizado para estimar a proporção individual e global de ancestralidade dos pacientes com câncer tratados com 5-FU de maneira a realizar o controle e o efeito da ancestralidade genômica entre os indivíduos.

- Programa SPSS 14.0, empregado nas análises de regressão logística para correlacionar toxicidade, resposta terapêutica e características clínico-epidemiológicas com os marcadores genéticos investigados (SPSS Ins. Chicago, IL, USA).

4.9 ANÁLISE DOS RISCOS E BENEFÍCIOS

Riscos: o único procedimento invasivo que os indivíduos foram submetidos foi a coleta de 10 ml de sangue periférico para posterior extração de DNA e genotipagem das mutações nos genes *DPYD*.

Benefícios: não há benefício direto, todavia os participantes contribuíram para o avanço do tratamento do câncer do trato gastrointestinal na região Norte do Brasil, em particular no Pará.]

5. RESULTADOS

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram coletadas amostras de sangue periférico e dados clínicos de 142 pacientes tratados com quimioterapia à base de fluoropirimidinas, no HOL e UNACON-HUJBB. O gênero feminino foi predominante entre os participantes com 51,4% da casuística (Tabela 3). A idade média foi de 53,5 anos, variando entre 18 e 81 anos. Os sítios primários de tumores mais frequentes foram estômago e colón com 39,4% e 33,8%, respectivamente. Os estádios clínicos que se sobressaíram dos demais foram o III (41,3%) e IV (34,8%).

Os diferentes tipos de regimes quimioterápicos estão descritos na Tabela 3, com suas respectivas frequências. Destaca-se o predomínio do esquema 5-FU + Leucovorin aplicado a 47,2% do total de pacientes. A prevalência desse regime pode ser explicada, em partes, pelo emprego no esquema de adjuvância do câncer

gástrico (Macdonald), na neoadjuvância de câncer de reto baixo/médio concomitante à radioterapia, e ainda como alternativa para o tratamento paliativo de pacientes com performance status desfavorável à poliquimioterapia. Dos 142 pacientes, 57 (40,1%) foram submetidos à radioterapia concomitante a quimioterapia.

Tabela 3. Características clínico-epidemiológicas de 142 pacientes tratados com quimioterapia à base de fluoropirimidinas*.

Características	Número de pacientes (%)
Gênero	N=142
Masculino	69(48,6)
Feminino	73(51,4)
Idade Média (n= 128)	53,51(+ou- 13,926)
Localização primária	N=142
Estômago	56(39,4)
Cólon	48(33,8)
Reto	38(26,8)
Estadiamento^a	N = 138
I	6 (4,3)
II	27(19,6)
III	57(41,3)
IV	48(34,8)
Regime Quimioterápico	N= 142
5FU	9(6,3)
5-FU + Leucovorin	66(47,2)
5-FU + Leucovorin + Oxaliplatina	1(0,7)
5-FU + Leucovorin + Irinotecano	10(7)
5-FU + Platina	12 (9,5)
5-FU + Oxaliplatina	03 (2,4)
Pacientes submetidos à radioterapia (n=142)	57(40,1)
Presença de toxicidade Grau	n=142
Qualquer grau de toxicidade (grau 1-4)	106(74,6)
Toxicidade grave (grau 3-4)	27(19,3)
Ancestralidade Média	
Europeia	0,475 (±0,145)
Ameríndia	0,310 (±0,120)
Africana	0,216 (±0,115)

*O número de indivíduos (n) refere-se aos que possuem dados para a referida característica.

± Desvio Padrão

a Segundo o TNM da American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2010).

Durante o tratamento, 106 (74,6%) pacientes desenvolveram toxicidades e, destes, 27 (19,3%) apresentaram toxicidades consideradas graves (grau 3-4). Dentre as toxicidades específicas analisadas, Diarreia e êmese se destacaram como os principais tipos de toxicidade, relatadas em 54,2% e 40,8% dos pacientes respectivamente, e em graus 3-4, 19,8%. e 11,3%. dos pacientes, respectivamente. Além disso, verificou-se, também, a presença de mucosite (17,6%, sendo de grau 3

ou 4 em 6,6% dos indivíduos), reações hematológicas (14,8%, onde 7,5% ocorreram como grau 3 ou 4), neuropatia (11,6% das toxicidades de qualquer grau e 3,7% nos pacientes que sofreram por toxicidade grau 3 ou 4) e Síndrome Mão-Pé (2,1%, onde um indivíduo apresentou esta toxicidade como grau 3 ou 4, sendo representado por 0,9%).

Tabela 4. Frequência das principais toxicidades, segundo o grau de ocorrência, apresentadas em 106 pacientes oncológicos tratados com 5-FU.

Tipo de toxicidade N = 106 (100%)	Grau 1-4	Grau 3-4
Hematológica	21 (14,8)	8 (7,5)
Diarréia	77(54,2)	21(19,8)
Mucosite	25(17,6)	7(6,6)
Êmese	58(40,8)	12(11,3)
Neuropatia	16(11,6)	4(3,7)
Síndrome mão-pé	3(2,1)	1(0,9)

A frequência genotípica e alélica dos polimorfismos no gene *DPYD* (rs55886062A>C, rs17376848A>G, rs67376798T>A, rs4970722T>A, rs3918290 C>T, rs1760217A>G, rs1801159 T>C, rs17116806A>C e rs1801265 A>G) estão descritas na Tabela 5. Os pacientes foram subdivididos entre aqueles que apresentaram toxicidade (seja ela de qualquer grau, logo, grau 1-4) e aqueles que não apresentaram toxicidades durante o tratamento com o 5-Fluorouracil. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os pacientes, com ou sem toxicidade geral, e os genótipos estudados ($p \leq 0,05$). As mutações usadas na prática clínica em países desenvolvidos (EUA e Europa), *2, *13 e rs67376798, não foram significativos na associação, pois a frequência encontrada destes marcadores na população investigada foram baixas .

Tabela 5. Distribuição genotípica dos polimorfismos investigados entre os pacientes que tiveram ausência ou presença de toxicidades (grau 1-4) durante o tratamento com 5-FU.

GENÓTIPO	TOXICIDADE No. (%)		p VALOR^a
	Ausência	Presença	
<i>DPYD</i> (rs55886062)	36	105	0,411
AA	36 (100%)	100 (95,2%)	
AC	0 (0%)	4 (3,8%)	
CC	0 (0%)	1 (1,0%)	
<i>Alelo A</i>	1	0,971	
<i>Alelo C</i>	0	0,029	
<i>DPYD</i> (rs17376848)	36	105	
AA	20 (55,6%)	66 (64,7%)	
AG	15 (41,7%)	35 (34,3%)	

GG	1 (2,8%)	1 (1%)	
<i>Alelo A</i>	0,764	0,818	
<i>Alelo G</i>	0,236	0,182	
DPYD (rs67376798)	34	100	
AA	0 (0%)	8 (8%)	0,205
AT	7 (20,6%)	23 (23%)	
TT	27 (79,4%)	69 (69%)	
<i>Alelo A</i>	0,103	0,195	
<i>Alelo T</i>	0,897	0,805	
DPYD (rs4970722)	36	105	0,855
AA	3 (8,3%)	11 (10,5%)	
AT	14 (38,9%)	36 (34,3%)	
TT	19 (52,8%)	58 (55,2%)	
<i>Alelo A</i>	0,277	0,276	
<i>Alelo T</i>	0,723	0,724	
DPYD (rs3918290)	36	106	0,709
CC	36 (100%)	104 (98,1%)	
CT	0 (0%)	1 (0,9%)	
TT	0 (0%)	1 (0,9%)	
<i>Alelo C</i>	1	0,985	
<i>Alelo T</i>	0	0,015	
DPYD (rs1760217)	36	102	0,510
AA	20 (55,6%)	66 (64,7%)	
AG	15 (41,7%)	35 (34,3%)	
GG	1 (2,8%)	1 (1%)	
<i>Alelo A</i>	0,764	0,818	
<i>Alelo G</i>	0,236	0,182	
DPYD (rs1801159)	36	106	0,155
CC	0 (0%)	9 (8,6%)	
CT	15 (41,7%)	46 (43,8%)	
TT	21 (58,3%)	50 (47,6%)	
<i>Alelo C</i>	0,208	0,305	
<i>Alelo T</i>	0,792	0,695	
DPYD (rs17116806)	33	100	0,788
AA	8 (24,2%)	24 (24%)	
AC	18 (54,5%)	49 (49%)	
CC	7 (21,2%)	27 (27%)	
<i>Alelo A</i>	0,514	0,485	
<i>Alelo C</i>	0,486	0,515	
DPYD (rs18012265)	35	104	
AA	16(45,7%)	54 (51,9%)	
AG	15(42,9%)	37 (35,6%)	
GG	4 (11,4%)	13 (12,5%)	
Alelo A	0,672	0,697	
Alelo G	0,328	0,303	

^ap valor obtido pelo Teste de Qui-Quadrado de Pearson

Foram feitas análises de associação entre os polimorfismos investigados e o desenvolvimento de toxicidades associadas ao tratamento com fluoropirimidinas. Para estas análises, as toxicidades foram estratificadas em duas categorias: Grave (graus 3 e 4) e moderada (grau 1 e 2). Para todos os nove marcadores investigados os genótipos foram analisados sempre em um modelo de dominância (homozigotos de um alelo contra os outros genótipos).

As alterações significativas estão representadas na tabela 6. Houve associação significativa entre o marcador rs1801159 e a ocorrência de diarreia. As análises revelaram que a presença do alelo C confere um risco aproximadamente 7,5 vezes maior ao desenvolvimento desta toxicidade ($p=0,038$).

O polimorfismo rs3918290 apresentou uma correlação significativa com a presença de toxicidades mais graves (grau 3-4). A presença do alelo C entre pacientes confere uma razão de probabilidade de aproximadamente 5,5 vezes maior de se desenvolver reações adversas graves ($p=0,036$).

As variantes polimórficas rs1801159 e rs4970722 apresentaram associação estatisticamente significativa para o desenvolvimento de neuropatia ($p=0,015$ e $p=0,025$, respectivamente), embora em situações opostas. Portadores do alelo T do marcador rs1801159 têm chance cinco vezes menor de desenvolver este tipo de toxicidade, enquanto que portadores do alelo T do polimorfismo rs4970722 tem uma chance cinco vezes maior de desenvolver neuropatia medicamentosa.

Reações hematológicas a drogas estão relacionadas significativamente aos polimorfismos rs17376848, rs4970722 e rs1801265. Nos três casos as variantes polimórficas estão correlacionadas com a maior probabilidade de aparecimento de reações hematológicas nos pacientes oncológicos tratados à base de 5-FU (rs17376848, $p= 0,043$ OR= 1,212 (1,116- 1,316); rs4970722, $p=0,025$ OR=4,599 (1,210-17,480) e rs1801265, $p= 0,016$ OR=3,793 (1,304-11,029)).

Tabela 6. Correlação entre as toxicidades e os polimorfismos no gene *DPYD* em pacientes tratados com fluoropirimidinas que apresentaram e não apresentaram toxicidades de qualquer grau (1-4).

GENÓTIPO	TOXICIDADE No.(%)		p VALOR ^a	OR (IC 95%) ^b
	Diarreia			
	Ausência	Presença		
DPYD (rs55886062)	65	76		
TT + CT	64 (98,5)	68 (89,5)		
CC	1 (1,5)	8 (10,5)	0,038	7,529 (0,916–

		Mucosite			
		Ausência	Presença		
DPYD (rs17116806)		108	25		
AA + AC		86(79,6)	13(52)		
CC		22(20,4)	12(48)	0,009	3,608 (1,447-8,998)
		Grau 3 ou 4			
		Ausência	Presença		
DPYD (rs3918290)		113	27		
CT + TT		0 (0)	2 (7,4)		
CC		113(100)	25(92,6)	0,036	5,520 (3,872-7,870)
		Neuropatia			
		Ausência	Presença		
DPYD (rs1801159)		124	16		
CC+ CT		57(46)	13(81,2)		
TT		67(54)	3 (18,8)	0,015	0,196 (0,053-0,723)
DPYD (rs4970722)		124	16		
AA+AT		61 (49,2)	3 (18,8)		
TT		63 (50,8)	13 (81,2)	0,025	4,599(1,210-17,480)
		Hematológica			
		Ausência	Presença		
DPYD (rs17376848)		120	21		
GG + AG		21(17,5)	0 (0)		
AA		99 (82,5)	21 (100)	0,043	1,212 (1,116-1,316)
DPYD (rs4970722)		121	20		
AA+AT		60(49,6)	4 (20%)		
TT		61(50,4)	16 (80%)	0,016	3,934(1,243-12,452)
DPYD (rs1801265)		118	21		
GG+AG		64 (54,2)	5(23,8)		
AA		54(45,8)	16(76,2)	0,016	3,793(1,304-11,029)

^aTodos os *p* valores foram controlados pela ancestralidade por Regressão Logística.

^bOdds Ratio a Intervalo de Confiança de 95%.

6. DISCUSSÃO

Desde a sua introdução há mais de cinco décadas, o 5-FU permanece como o farmaco quimioterápico mais utilizado, sozinho ou em combinação, para o tratamento de câncer do trato gastrointestinal, incluindo câncer gástrico e colorrectal.

Apesar do amplo uso em prática clínica, há uma substancial taxa de variabilidade interindividual que influencia na farmacocinética do 5-FU, podendo trazer, desta forma, toxicidades severas aos pacientes oncológicos, que podem até abandonar o tratamento (Sistonen, Johanna et al, 2012).

Grande parte dessa heterogeneidade clínica de resposta ao tratamento com fluoropirimidinas é devida a variação da atividade enzimática da enzima DPD, que por sua vez é dependente de variantes genéticas presentes no gene que codifica esta proteína (Tuchman, Mendel et al, 1985). Mais ainda, as frequências de variantes sabidamente responsáveis pela alteração da expressão da enzima DPD variam consideravelmente entre grupos populacionais geograficamente distintos (The International Genome Sample Resource and the Genome Project, 2016).

A importância da enzima DPD para a metabolização do 5-FU, a elevada variabilidade genética (mais de 326 mutações somente em regiões codificadoras), a variabilidade de expressão do gene e a variação entre populações geograficamente distintas são fatores que tornam ainda mais complexas as investigações de marcadores que possam prever a resposta ao tratamento com este fármaco (Froehlich, Tanja K. et al, 2015), principalmente em populações miscigenadas, como é o caso das populações da Amazônia brasileira.

No presente trabalho investigamos nove marcadores genéticos do gene *DPYD* e testamos prováveis associações destes marcadores com as toxidades apresentadas pelos pacientes com câncer gastrointestinal que foram submetidos ao tratamento com 5-FU.

Uma das associações mais relevantes observadas neste estudo foi a associação significativa entre a presença do alelo C do rs1801159 e a diarreia ($p=0,038$). Esta associação já foi descrita anteriormente em populações asiáticas (Zhang, Hong et al, 2007; Teh, Lay Kek et al, 2013). Nesta última investigação citada os autores observaram que este polimorfismo junto com rs17376848 foram responsáveis por 37% da variação dos níveis plasmáticos de 5-FU e que os portadores do alelo C apresentavam maiores níveis plasmáticos do fármaco.

A importância da investigação deste polimorfismo pode ser ressaltada pelo fato de que a população investigada apresenta a frequência do alelo C (0,28) superior à frequência observada em outros grupos populacionais para os quais existem dados disponíveis (0,19 em europeus, 0,15 em africanos e 0,27 em

populações do leste da Ásia) (The International Genome Sample Resource and the Genome Project, 2016).

A partir dos dados apresentados é possível inferir que a genotipagem desse marcador pode ser uma boa ferramenta para tentar monitorar a dosagem a ser administrada e prever a eficácia do tratamento com 5-FU (Cavalcante, Giovanna C. et al, 2015). Entretanto, ainda não foi relatada a correlação significativa entre o alelo T do marcador rs1801150 e a diminuição no risco de se ter neuropatias, achado este relatado no presente trabalho ($p=0,015$).

O polimorfismo rs3918290 apresentou uma correlação significativa com a presença de toxicidades grau 3-4 com uma razão de probabilidade de aproximadamente 5,5 vezes maior de se desenvolver reações adversas severas ($p=0,036$). Esta variante polimórfica é uma das principais mutações relacionadas com a perda total de atividade enzimática e toxicidade grave com risco de morte relacionado ao 5-FU. Trata-se de uma mutação pontual dentro do éxon 14, que resulta em defeitos durante o processo de *splicing*, suprimindo completamente o éxon e, portanto, resultando numa proteína não funcional (Li, 2011; Caudle, Kelly E. et al, 2013). Esta mutação já foi relatada com a presença de toxicidades severas em diversos trabalhos (Thorn, Caroline F. et al, 2011; Offer, Steven M. et al, 2013; Deenen, Maarten J. et al, 2016), o que corrobora com o achado deste estudo.

Na nossa investigação, o polimorfismo rs17116806 apresentou uma correlação significativa com a presença de mucosite ($p=0,009$). Apesar de a literatura citar esta mutação como um provável modulador de toxicidade à terapia com base em fluoropirimidinas (Maekawa, Keiko et al, 2007), ainda não há estudos suficientes para determinar sua função no metabolismo do 5-FU e nem há correlação da presença do mesmo com reações adversas observadas em pacientes oncológicos.

Por fim, na presente investigação, os polimorfismos rs17376848, rs4970722 e rs1801265 apresentaram significância para as toxicidades que envolvem reações hematológicas. Esses dados conferem em parte com a literatura já que trabalhos têm correlacionado esses polimorfismos com a baixa atividade da enzima DPD, o que reduz a decomposição natural da droga, aumentando a concentração plasmática de 5-FU e, portanto, aumentando a chance de ocasionar complicações durante o tratamento com terapias à base de 5-FU (Caudle, Kelly E. et al, 2013; Maekawa, Keiko et al, 2007, Toffoli, Giuseppe et al, 2015). Entretanto, não há

estudos que associem esses polimorfismos com um tipo de toxicidade específica, como é o caso das reações hematológicas.

Apesar dos resultados significativos do presente projeto, é válido ressaltar as limitações deste estudo em virtude do caráter de investigação retrospectivo, da diversidade de esquemas quimioterápicos utilizados e do tamanho da casuística. Dessa forma, a perspectiva de realização de um estudo controlado prospectivo com análise de todos os polimorfismos no gene *DPYD* conhecidos por ter resposta em prática clínica poderia confirmar os achados desta investigação e definir uma linha de tratamento com 5-FU, na população da Região Norte do Brasil para maximizar o efeito do fármaco minimizando os riscos de toxicidade e mortes relacionadas ao tratamento com fluoropirimidinas.

7. CONCLUSÃO

Os dados do presente projeto corroboram com os estudos que sugerem que polimorfismos no gene *DPYD* são preditores de toxicidades em pacientes oncológicos tratados com fluoropirimidinas.

Entretanto, há a necessidade de estudos adicionais para reforçar a importância de estudos clínicos com 5-FU e fluoropirimidinas orais em populações miscigenadas, com o objetivo de melhorar a personalização da medicina diagnóstica e terapêutica, oferecendo a máxima eficácia do tratamento ao paciente com o mínimo possível de efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, S., Zhou, Z., Zhou, J., & Chen, S.Q. (2016). *Pharmacogenomics of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters: Relevance to Precision Medicine. Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(5), 298-313.

Caudle, Kelly E. et al. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 94, n. 6, p. 640-645, 2013.

CAVALCANTE, Giovanna C. et al. *Investigation of Potentially Deleterious Alleles for Response to Cancer Treatment with 5- Fluorouracil. Anticancer research*, v. 35, n. 12, p. [6971-6977](#), 2015

Deenen, Maarten J. et al. *Upfront genotyping of DPYD* 2A to individualize fluoropyrimidine therapy: a safety and cost analysis. Journal of Clinical Oncology*, v. 34, n. 3, p. 227-234, 2016.

Froehlich, Tanja K. et al. *Clinical importance of risk variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene for the prediction of early-onset fluoropyrimidine toxicity. International Journal of Cancer*, v. 136, n. 3, p. 730-739, 2015.

Gimenes D.L. e Costa A.A.B.A. (2013) Princípios de terapia sistêmica. In Lopes A, Chammas R, Iyeyasu. *Oncologia para a graduação*. 3ª edição. Lemar editora. capítulo 27: 229-233.

Hanahan D e Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74.

Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva – INCA/ Ministério da Saúde (2015) *Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 126p.

Liou SY, Stephens JM, Carpiuc KT, Feng W, Botteman MF, Hay JW (2007). Economic burden of haematological adverse effects in cancer patients: A systematic review. *Clin Drug Investig.* 27:381-96.

Li, Jing; Bluth, Martin H. *Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy. Pharmacogenomics Personalized Med*, v. 4, p. 11-33, 2011.

Loh M, & Soong R (2011) Challenges and pitfalls in the introduction of pharmacogenetics for cancer. *Annals of the Academy of Medicine Singapore* 40(8): 369–74.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature reviews. Cancer* 3(5): 330–8.

Maekawa, Keiko et al. *Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences. Journal of human genetics*, v. 52, n. 10, p. 804-819, 2007.

Matsusaka, S., & Lenz, H. J. (2015). Pharmacogenomics of fluorouracil-based chemotherapy toxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 11(5), 811-821.

Meulendijks, D., Cats, A., Beijnen, J.H., Schellens, J.H. (2016). Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity - Ready for clinical practice?. *Cancer Treat Rev.*, 50:23-34.

Mohelnikova-Duchonova, B., Melichar, B., & Soucek, P. (2014) FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(30), 10316

Nishiyama, M., e Eguchi, H (2009) Pharmacokinetics and pharmacogenomics in gastric cancer chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, 61(5), 402–7.

Offer, Steven M. et al. *Phenotypic profiling of DPYD variations relevant to 5-fluorouracil sensitivity using real-time cellular analysis and in vitro measurement of enzyme activity. Cancer research*, v. 73, n. 6, p. [1958-1968](#), 2013.

Reis M (2006) Farmacogenética aplicada ao câncer. *Quimioterapia Individualizada e especificidade molecular. Simpósio: Farmacogenética*, 39: 577-586.

Savva-bordalo J, Ramalho-carvalho J, Pinheiro M, Costa VL, Rodrigues Â, Dias PC, Veiga I, et al. (2010) Promoter methylation and large intragenic 83 rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5- fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. *BMC Cancer* 10: 420.

Sistonen, Johanna et al. *A new DPYD genotyping assay for improving the safety of 5-fluorouracil therapy. Clinica Chimica Acta*, v. 414, p. 109-111, 2012.

Shimoyama, S. (2009). Pharmacogenetics of fluoropyrimidine and cisplatin. A future application to gastric cancer treatment. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(6), 970-981.

Stewart, B. W., e Wild, C. P. (2014). *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, 505.

Suarez-Kurtz, G. (2010). Pharmacogenetics in the Brazilian population. *Frontiers in Pharmacology*, 1(118), 1 – 10.

Teh, Lay Kek et al. *Potential of dihydropyrimidine dehydrogenase genotypes in personalizing 5-fluorouracil therapy among colorectal cancer patients. Therapeutic drug monitoring*, v. 35, n. 5, p. 624-630, 2013.

The International Genome Sample Resource and the Genome Project. www.1000genomes.org Accessed 25 April 2016.

Thorn, Caroline F. et al. *PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. Pharmacogenetics and genomics*, v. 21, n. 4, p. 237, 2011.

Toffoli, Giuseppe et al. *Clinical validity of a DPYD-based pharmacogenetic test to predict severe toxicity to fluoropyrimidines. International Journal of Cancer*, v. 137, n. 12, p. [2971-2980](#), 2015.

Tuchman, Mendel et al. *Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. New England Journal of Medicine*, v. 313, n. 4, p. 245-249, 1985.

Zhang, Hong et al. *DPYD* 5 gene mutation contributes to the reduced DPYD enzyme activity and chemotherapeutic toxicity of 5- FU. Medical Oncology*, v. 24, n. 2, p. 251-258, 2007.

Wang L, Mcleod HL, Weinshilboum RM (2011) Genomics and drug response. *N Engl J Med*. 364: 1144-1153.

Wang W, Yang Y, Zhao Y, Zhang T, Liao Q, Shu H (2014) Recent studies of 5-fluorouracil resistance in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 20(42):15682-15690.

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: **Determinação da prevalência dos polimorfismos de enzimas relacionadas ao metabolismo do 5-fluoruracil (5-FU) em uma população do Norte do Brasil.**

Instituições Envolvidas: Hospital Ophir Loyola; Universidade Federal do Pará; Núcleo de Pesquisa em Oncologia/ UNACON.

Esclarecimento da Pesquisa

O câncer caracteriza-se como um problema de saúde pública, sendo o seu desenvolvimento um processo complexo no qual estão envolvidas anormalidades em muitos genes. Um dos quimioterápicos mais administrados aos pacientes no combate ao câncer em todo o mundo é o fluorouracil (5-FU). Entretanto a utilização deste quimioterápico possui variabilidade interindividual e pode causar efeitos adversos graves em alguns pacientes. Desta forma busca-se analisar e identificar possíveis mutações e genes que estejam associados com a farmacogenética do 5-FU e que possam estar relacionados com os efeitos adversos que alguns pacientes em tratamento com este quimioterápico apresentam. De nenhuma forma seu tratamento quimioterápico atual será modificado. Para desenvolvê-lo precisamos da sua participação, e faremos algumas perguntas sobre dados pessoais como data de nascimento, sexo, endereço, antecedentes de doenças, sintomas apresentados durante o curso da doença e medicamentos utilizados. Para as análises genéticas necessitaremos de 5 ml de seu sangue, o qual será colhido com material estéril e descartável, em 1 tubo, não apresentando risco para sua saúde, a não ser pequena dor local e/ou hematoma relacionados a técnica de colheita. Quanto ao sigilo da sua participação na pesquisa e de toda informação fornecida, esta equipe de pesquisadores garantirá total sigilo (segredo). Os dados que interessam da pesquisa serão publicados em conjunto, sem identificação de qualquer pessoa. Somente os médicos deste estudo e as autoridades de saúde poderão ter acesso as informações confidenciais. Deixa-se claro que sua participação é de seu livre-arbítrio, não havendo pagamento pela mesma, podendo, em qualquer momento do estudo, recusar-se a responder quaisquer perguntas, permitir análise e divulgação dos dados contidos em seu questionário. O pesquisador responsável pelo estudo está à sua disposição para esclarecer qualquer dúvida antes que você assine o termo de consentimento, durante e após o término do mesmo. É preciso esclarecer que caso você desista de continuar nesta pesquisa, não haverá nenhum prejuízo no seu acompanhamento médico.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre o projeto de pesquisa “**Determinação da prevalência dos polimorfismos de enzimas relacionadas ao metabolismo do 5-fluoruracil (5-FU) em uma população do Norte do Brasil**”, e que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo do mesmo, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame, além de fornecer informações sobre minha pessoa que constarão em uma ficha clínico-epidemiológica, as quais só poderão ser utilizadas em relatórios e publicações científicas.

Belém, ____/____/____

Nome do Sujeito: _____ Assinatura: _____

Nome do responsável: _____ Assinatura: _____

Pesquisador Responsável: Williams Fernandes Barra Assinatura: _____

APÊNDICE 3 - ARTIGO

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE
MEDICINA DE PRECISÃO NO GENE *DPYD* COMO PREDITOR DE
TOXICIDADE A TERAPIA COM USO DE FLUOROPIRIMIDINAS EM
PACIENTES COM NEOPLASIA GASTROINTESTINAL**

MAYARA FERREIRA MOTA^{1,2,3}; TAYSSA CRISTINA LIMA DE VILHENA^{1,2,3};
NEY PEREIRA CARNEIRO DOS SANTOS^{1,2,3,4}; WILLIAMS FERNANDES BARRA^{1,2,3,4};
DANIELLE DA COSTA FEIO¹.

¹*Núcleo de Pesquisas em Oncologia;*

²*Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil;*

³*Instituto de Ciências da Saúde;*

⁴*Hospital Universitário João de Barros Barreto.*

RESUMO

Introdução: As fluoropirimidinas são os principais quimioterápicos no tratamento de neoplasias malignas do trato gastrointestinal. Contudo, cerca de 30% dos pacientes apresentam toxicidades graves, levando a descontinuidade terapêutica e óbito por toxicidade. Biomarcadores capazes de prever o tempo ótimo para o início do tratamento, a combinação de drogas a ser escolhida e a dose-efetiva minimamente tóxica são instrumentos norteadores essenciais. O objetivo deste trabalho é investigar a associação de nove marcadores moleculares recomendados por agências internacionais implicados na via metabólica do 5-FU: DPYD*2A (rs3918290), DPYD*5 (rs1801159), DPYD (rs17116806), DPYD (rs17376848), DPYD (rs1760217), DPYD (rs1801265), DPYD (rs4970722), DPYD (rs55886062), DPYD (rs67376768) com o perfil de toxicidade a esse fármaco, em pacientes com câncer do trato gastrointestinal na região norte do país. **Métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo, transversal, tipo caso-controle, com avaliação de dados clínicos e epidemiológicos de 142 pacientes tratados com fluoropirimidinas em monoterapia ou combinação. O sistema TaqMan® foi utilizado na investigação dos polimorfismos do gene *DPYD*. **Resultados:** O polimorfismo rs3918290 apresentou associação significativa com a presença de toxicidades graves (grau 3-4), assim como o marcador rs1801159 e a presença de diarreia ($p=0,038$). As variantes polimórficas rs1801159 e rs4970722 apresentaram associação significativa para o desenvolvimento de neuropatia ($p=0,015$ e $p=0,025$, respectivamente). Adicionalmente, os polimorfismos rs17376848, rs4970722 e rs1801265 foram estatisticamente significantes para o desenvolvimento de reações hematológicas nos pacientes tratados com 5-FU ($p=0,043$, $p=0,025$ e rs1801265, $p=0,016$). **Conclusão:** Os dados do presente projeto corroboram com os estudos que sugerem que polimorfismos no gene *DPYD* são preditores de toxicidades em pacientes oncológicos tratados com fluoropirimidinas. Entretanto, há a necessidade de estudos adicionais para reforçar a importância de estudos clínicos com 5-FU e fluoropirimidinas orais em populações miscigenadas, como é o caso da população brasileira.

Palavras-chave: *DPYD*; Fluoropirimidinas, câncer gastrointestinal, farmacogenética, toxicidade

O câncer pode ser definido como uma doença multifatorial, que resulta de interações complexas entre alterações genéticas e fatores ambientais.

O câncer colorretal (CCR) e o câncer gástrico são as principais neoplasias malignas do trato gastrointestinal (TGI)(GLOBOCAN, 2012; INCA, 2016).

As fluoropirimidinas são agentes quimioterápicos amplamente utilizados para o tratamento de neoplasias malignas. Desde a sua introdução há mais de 50 anos, o 5-fluorouracil (5-FU), um antimetabólito que interfere na duplicação e transcrição do DNA (fase G1/S), permanece como o quimioterápico mais empregado no tratamento oncológico e assume papel preponderante no esquema terapêutico de neoplasias malignas do trato gastrointestinal, tanto em monoterapia quanto em combinação (DUSCHINSKY R *ET AL.*, 1957; LONGLEY *ET AL.*, 2003; SHIRASAKA, 2009)

Muitos estudos discutem os fatores que determinam a eficácia clínica da quimioterapia baseada em 5-FU. Os pacientes tratados com 5-FU podem apresentar distintas reações adversas: mielossupressão, cardiotoxicidade, reações hematológicas (leucopenia, incluindo neutropenia febril, anemia, e trombocitopenia), reações gastrointestinais (mucosite oral e intestinal, estomatite, diarreia, náuseas e vômitos) e toxicidades dermatológicas (perda de cabelo, síndrome mão e pé (HFS) e pele seca); (Champbel et al., 2016).

Tradicionalmente a terapia do câncer tem como alvo células em divisão no corpo, entretanto as células cancerosas não são as únicas células em divisão, por isso os tratamentos para o câncer tendem a ter muitos efeitos adversos.

A farmacogenética por definição refere-se ao estudo das diferenças genéticas em vias metabólicas que podem afetar as repostas de um indivíduo a fármacos em termos de efeitos terapêuticos e adversos.

A aplicação da farmacogenética na área oncológica é um processo complexo, por que envolve o difícil manejo clínico da quimioterapia aplicada a dois genomas: o do indivíduo (representado por mutações germinativas) e o do tumor (representado por mutações somáticas) este último apresenta um papel crítico na resposta antineoplásica (Reis, 2006; Wang et al., 2011).

A eficácia da citotóxicidade de 5-FU é determinada pela atividade das enzimas envolvidas no seu metabolismo, tais como DPD, TS, OPRT e MTHFR. Recentes avanços na farmacogenética elucidaram alguns polimorfismos genéticos nesses genes que poderiam explicar a variabilidades da

eficácia e toxicidades relacionadas ao 5-FU (Shimoyama, 2009).

As agências regulamentadoras de fármacos: Agencia de fármacos européia (EMEA), Administração de fármacos e alimentos dos Estados Unidos (FDA), Agencia de produtos farmacêuticos e dispositivos médicos do Japão (PMDA) e Agencia de saúde do Canadá (HCSC) possuem recomendações de ajuste de dose e modificação da terapêutica oncológica com Fluoropirimidinas, de acordo com os genótipos de *2, *13 e rs67376798, do gene DPYD (PharmGKB: <https://www.pharmgkb.org/>).

O gene DPYD codifica a enzima DPD que regula o metabolismo inicial da via de catabolismo das bases de pirimidina e uracil (Matsusaka e Lenz, 2015). A atividade de DPD é responsável pela maioria da metabolização de 5-FU (80%) por isso é considerado um dos principais determinantes do acúmulo de 5-FU no organismo, levando a toxicidades (Shimoyama, 2009).

As variantes genéticas em DPYD podem afetar a atividade enzimática gerando grande impacto em reações adversas e eficácia do tratamento com Fluoropirimidinas. A atividade enzimática do DPD é altamente variável na população, entre 3 a 5% dos indivíduos possuem atividade de DPD baixa ou deficiente e as deficiências completas de DPD (0% de atividade) são muito raras com uma incidência estimada de 0.01-0,1% na população (Meulendijks et al., 2016).

A farmacogenética da toxicidade de 5-FU tem sido principalmente direcionada para a atividade de DPD. A diminuição da ativação do DPYD pode resultar na toxicidade grave ou mesmo letal, após uma exposição elevada ao fármaco ou seus metabólitos. A via catabólica envolvida na farmacocinética de 5-FU aumenta as toxicidades relacionadas à Fluoropirimidinas (Matsusaka e Lenz, 2015).

A atividade de DPD tem um efeito previsível nos níveis de 5-FU, dessa forma, realizar um tratamento personalizado com ajuste de dose baseando-se no perfil de funcionalidade de DPD (deficiente, normal ou reduzido) pode ser usado como estratégia para reduzir a incidência de toxicidades graves e potencialmente fatais em associação ao uso de fluoropirimidinas (Meulendijks et al., 2016).

A descoberta de biomarcadores capazes de prever o tempo ótimo para o início do tratamento, a combinação de drogas a ser escolhida e a dose efetiva minimamente tóxica são instrumentos norteadores essenciais, uma vez que a eficácia e toxicidade dos antineoplásicos são determinadas pela concentração do fármaco nas células tumorais e nos tecidos normais, estreitamente relacionada à atividade enzimática de metabolização e transporte farmacológico (MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, 2014).

O desenvolvimento de pesquisas em farmacogenética iniciou uma nova era na medicina, estabelecendo o conceito de uma terapia individualizada e medicina de precisão, onde o fármaco certo é administrado na dose adequada para determinado paciente.

O gene *DPYD* é amplamente utilizado na prática clínica pelas agências americana (FDA - Food and Drug Administration) e europeia (European Medicines Agency) na predição de toxicidade e resposta ao tratamento com fluoropirimidinas. Dados regionais sobre toxicidades e avaliação de resposta relacionadas ao tratamento quimioterápico para câncer do trato gastrointestinal são escassos, assim como informações nacionais sobre polimorfismos no gene *DPYD* e suas correlações clínicas com uso de 5-FU.

O presente trabalho se propõe a investigar a associação de nove marcadores moleculares recomendados por agências internacionais implicados na via metabólica do 5-FU: *DPYD*2A* (rs3918290), *DPYD*5* (rs1801159), *DPYD* (rs17116806), *DPYD* (rs17376848), *DPYD* (rs1760217), *DPYD* (rs1801265), *DPYD* (rs4970722), *DPYD* (rs55886062), *DPYD* (rs67376768) com o perfil de toxicidade a esse fármaco, em pacientes com câncer do trato gastrointestinal na região norte do país

CASUÍSTICA

Tipo de estudo. Foi realizado um estudo retrospectivo, transversal, tipo caso-controle, com avaliação de dados clínicos e epidemiológicos dos indivíduos incluídos na pesquisa, e investigação da ocorrência das mutações *DPYD*2A* (rs3918290), *DPYD*5* (rs1801159), *DPYD* (rs17116806), *DPYD* (rs17376848), *DPYD* (rs1760217), *DPYD* (rs1801265), *DPYD* (rs4970722), *DPYD* (rs55886062), *DPYD* (rs67376768).

Local Os dados clínicos e amostras serão coletadas dos pacientes recrutados em dois Serviços de Referência em Oncologia do SUS em Belém do Pará, que são o Hospital Ophir Loyola (HOL) – CACON, e o Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB) – UNACON.

População. Foram recrutados para este estudo 142 pacientes portadores de neoplasia do trato gastrointestinal, submetidos a tratamento oncológico com fluoropirimidinas no HUIBB-UNACON e no Hospital Ophir Loyola. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido serão coletadas amostras de sangue venoso periférico em tubo EDTA para as análises genéticas, bem como informações epidemiológicas, clínicas e laboratoriais contidas nos prontuários.

Extração do dna. O material genético foi extraído a partir do sangue total periférico dos pacientes utilizando o kit comercial de extração de DNA

BiopurKit Mini Spin Plus – 250 (Biopur, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram medidas a concentração e pureza do DNA com o equipamento NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Termo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

Análise dos polimorfismos. Para a análise da genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP*) foi realizada por discriminação alélica utilizando a tecnologia TaqMan OpenArray Genotyping, com um painel de 32 ensaios customizados, no equipamento QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, EUA), de acordo com o protocolo recomendado por Applied Biosystems. O software Taqman Genotyper foi utilizado para a análise dos dados das placas e precisão de leitura dos genótipos, além do controle de qualidade da genotipagem.

Análise da ancestralidade genômica. Quanto a análise da ancestralidade, um painel de 61 marcadores Informativos de Ancestralidade (IAMs) foi usado como método de controle genômico da ancestralidade para determinar com precisão o papel de polimorfismos nos genes candidatos em populações miscigenadas da região Norte do Brasil, assumindo três populações parentais (européia, africana e ameríndia), conforme descrito por Santos et al., 2010.

Métodos estatísticos. Os dados foram tabulados em planilhas utilizando o programa Microsoft Office Excel 2010® e analisados através de dois programas:

- Programa Structure v.2.2, utilizado para estimar a proporção individual e global de ancestralidade dos pacientes com câncer tratados com 5-FU de maneira a realizar o controle e o efeito da ancestralidade genômica entre os indivíduos.

- Programa SPSS 14.0, empregado nas análises de regressão logística para correlacionar toxicidade, resposta terapêutica e características clínico-epidemiológicas com os marcadores genéticos investigados (SPSS Ins. Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram coletadas amostras de sangue periférico e dados clínicos de 142 pacientes tratados com quimioterapia à base de fluoropirimidinas, no HOL e UNACON-HUIBB. O gênero feminino foi predominante entre os participantes com 51,4% da casuística (Tabela 3). A idade média foi de 53,5 anos, variando entre 18 e 81 anos. Os sítios primários de tumores mais frequentes foram estômago e colôn com 39,4% e 33,8%, respectivamente. Os estádios clínicos que se sobressaíram dos demais foram o III (41,3%) e IV (34,8%).

Os diferentes tipos de regimes quimioterápicos estão descritos na Tabela 3, com suas respectivas frequências. Destaca-se o predomínio do esquema 5-FU + Leucovorin aplicado a 47,2% do total de pacientes. A prevalência desse regime pode ser explicada, em partes, pelo emprego no esquema de adjuvância do câncer

gástrico (Macdonald), na neoadjuvância de câncer de reto baixo/médio concomitante à radioterapia, e ainda como alternativa para o tratamento paliativo de pacientes com performance status desfavorável à poliquimioterapia. Dos 142 pacientes, 57 (40,1%) foram submetidos à radioterapia concomitante a quimioterapia.

Durante o tratamento, 106 (74,6%) pacientes desenvolveram toxicidades e, destes, 27(19,3%) apresentaram toxicidades consideradas

neuropatia(11,6% das toxicidades de qualquer grau e 3,7% nos pacientes que sofreram por toxicidade grau 3 ou 4)e Síndrome Mão-Pé(2,1%, onde um indivíduo apresentou esta toxicidade como grau 3 ou 4, sendo representado por 0,9%).

A frequência genotípica e alélica dos polimorfismos no gene *DPYD* (rs55886062A>C, rs17376848A>G, rs67376798T>A, rs4970722T>A, rs3918290 C>T, rs1760217A>G, rs1801159 T>C, rs17116806A>C e rs1801265 A>G) estão descritas na Tabela 5. Os pacientes foram subdivididos entre aqueles que apresentaram toxicidade (seja ela de qualquer grau, logo, grau 1-4) e aqueles que não apresentaram toxicidades durante o tratamento com o 5-Fluorouracil. Não houve **correlação estatisticamente** significativa entre os pacientes, com ou sem toxicidade geral, e os genótipos estudados ($p \leq 0,05$). As mutações usadas na prática clínica em países desenvolvidos (EUA e

Tabela 1. Características clínico-epidemiológicas de 142 pacientes tratados com quimioterapia à base de fluoropirimidinas*

Características	Número de pacientes (%)
Gênero	N=142
Masculino	69(48,6)
Feminino	73(51,4)
Idade Média (n= 128)	53,51(+ou- 13,926)
Localização primária	N=142
Estômago	56(39,4)
Cólon	48(33,8)
Reto	38(26,8)
Estadiamento^a	N = 138
I	6 (4,3)
II	27(19,6)
III	57(41,3)
IV	48(34,8)
Regime Quimioterápico	N= 142
5FU	9(6,3)
5-FU + Leucovorin	66(47,2)
5-FU + Leucovorin + Oxaliplatina	1(0,7)
5-FU + Leucovorin + Irinotecano	10(7)
5-FU + Platina	12 (9,5)
5-FU + Oxaliplatina	03 (2,4)
Pacientes submetidos à radioterapia (n=142)	57(40,1)
Presença de toxicidade Grau	n=142
Qualquer grau de toxicidade (grau 1-4)	106(74,6)
Toxicidade grave (grau 3-4)	27(19,3)
Ancestralidade Média	
Europeia	0,475 (±0,145)
Ameríndia	0,310 (±0,120)
Africana	0,216 (±0,115)

*O número de indivíduos (n) refere-se aos que possuem dados para a referida característica.

± Desvio Padrão a Segundo o TNM da American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2010).

graves(grau 3-4). Dentre as toxicidades específicas analisadas, Diarreia e êmese se destacaram como os principais tipos de toxicidade, relatadas em 54,2% e 40,8% dos pacientes respectivamente, e em graus 3-4, 19,8%. e 11,3%. dos pacientes, respectivamente. Além disso, verificou-se, também, a presença de mucosite(17,6%, sendo de grau 3 ou 4 em 6,6% dos indivíduos), reações hematológicas(14,8%, onde 7,5% ocorreram como grau 3 ou 4),

Europa), *2 , *13 e rs67376798, não foram significativos na associação, pois a frequência encontrada destes marcadores na população investigada foram baixas .

Foram feitas análises de associação entre os polimorfismo

As alterações significativas estão representadas na

Tabela 2. Frequência das principais toxicidades, segundo o grau de ocorrência, apresentadas em 106 pacientes oncológicos tratados com 5-FU.

Tipo de toxicidade N = 106 (100%)	Grau 1-4	Grau 3-4
Hematológica	21 (14,8)	8 (7,5)
Diarréia	77(54,2)	21(19,8)
Mucosite	25(17,6)	7(6,6)
Êmese	58(40,8)	12(11,3)
Neuropatia	16(11,6)	4(3,7)
Síndrome mão-pé	3(2,1)	1(0,9)

^a p valor obtido pelo Teste de Qui-Quadrado de Pearson

investigados e o desenvolvimento de toxicidades associadas ao tratamento com fluoropirimidinas. Para estas análises, as toxicidades foram

tabela 6. Houve associação significativa entre o marcador rs1801159 e a ocorrência de diarreia. As análises revelaram que a presença do alelo C confere um risco aproximadamente 7,5 vezes maior ao desenvolvimento desta toxicidade (p=0,038).

Tabela 3. Distribuição genotípica dos polimorfismos investigados entre os pacientes que tiveram ausência ou presença de toxicidade (grau 1-4) durante o tratamento com 5FU

Características	Número de pacientes (%)
Gênero	N=142
Masculino	69(48,6)
Feminino	73(51,4)
Idade Média (n= 128)	53,51(+ou- 13,926)
Localização primária	N=142
Estômago	56(39,4)
Cólon	48(33,8)
Reto	38(26,8)
Estadiamento^a	N = 138
I	6 (4,3)
II	27(19,6)
III	57(41,3)
IV	48(34,8)
Regime Quimioterápico	N= 142
5FU	9(6,3)
5-FU + Leucovorin	66(47,2)
5-FU + Leucovorin + Oxaliplatina	1(0,7)
5-FU + Leucovorin + Irinotecano	10(7)
5-FU + Platina	12 (9,5)
5-FU + Oxaliplatina	03 (2,4)
Pacientes submetidos à radioterapia (n=142)	57(40,1)
Presença de toxicidade Grau	n=142
Qualquer grau de toxicidade (grau 1-4)	106(74,6)
Toxicidade grave (grau 3-4)	27(19,3)
Ancestralidade Média	
Europeia	0,475 (±0,145)
Ameríndia	0,310 (±0,120)
Africana	0,216 (±0,115)

*O número de indivíduos (n) refere-se aos que possuem dados para a referida característica.

± Desvio Padrão

a Segundo o TNM da American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2010).

estratificadas em duas categorias: Grave (graus 3 e 4) e moderada (grau 1 e 2). Para todos os nove marcadores investigados os genótipos foram analisados sempre em um modelo de dominância (homozigotos de um alelo contra os outros genótipos).

O polimorfismo rs3918290 apresentou uma correlação significativa com a presença de toxicidades mais graves (grau 3-4). A presença do alelo C entre pacientes confere uma razão de probabilidade de aproximadamente 5,5 vezes maior de se desenvolver reações adversas graves (p=0,036).

As variantes polimórficas rs1801159 e rs4970722 apresentaram associação

estatisticamente significativa para o desenvolvimento de neuropatia ($p=0,015$ e $p=0,025$, respectivamente), embora em situações opostas. Portadores do alelo T do marcador rs1801159 têm chance cinco vezes menor de desenvolver este tipo de toxicidade, enquanto que portadores do alelo T do polimorfismo rs4970722 tem uma chance cinco vezes maior de desenvolver neuropatia medicamentosa.

Reações hematológicas a drogas estão relacionadas significativamente aos polimorfismos rs17376848, rs4970722 e rs1801265. Nos três casos as variantes polimórficas estão correlacionadas com a maior probabilidade de aparecimento de reações hematológicas nos pacientes oncológicos tratados à base de 5-FU (rs17376848, $p= 0,043$ OR= 1,212 (1,116- 1,316); rs4970722, $p=0,025$ OR=4,599 (1,210-17,480) e rs1801265, $p= 0,016$ OR=3,793 (1,304-11,029)).

Tabela 4. Correlação entre as toxicidades e os polimorfismos no gene DPYD em pacientes tratados com fluoropirimidinas que apresentaram e não apresentaram toxicidades de qualquer grau (1-4)

GENÓTIPO	TOXICIDADE No.(%)		p VALOR ^a	OR (IC 95%) ^b
Diarreia				
	Ausência	Presença		
DPYD (rs55886062)	65	76		
TT + CT	64 (98,5)	68 (89,5)		
CC	1 (1,5)	8 (10,5)	0,038	7,529 (0,916–61,899)
Mucosite				
	Ausência	Presença		
DPYD (rs17116806)	108	25		
AA + AC	86(79,6)	13(52)		
CC	22(20,4)	12(48)	0,009	3,608 (1,447-8,998)
Grau 3 ou 4				
	Ausência	Presença		
DPYD (rs3918290)	113	27		
CT + TT	0 (0)	2 (7,4)		
CC	113(100)	25(92,6)	0,036	5,520 (3,872-7,870)
Neuropatia				
	Ausência	Presença		
DPYD (rs1801159)	124	16		
CC+ CT	57(46)	13(81,2)		
TT	67(54)	3 (18,8)	0,015	0,196 (0,053-0,723)
DPYD (rs4970722)	124	16		
AA+AT	61 (49,2)	3 (18,8)		
TT	63 (50,8)	13 (81,2)	0,025	4,599(1,210-17,480)
Hematológica				
	Ausência	Presença		
DPYD (rs17376848)	120	21		
GG + AG	21(17,5)	0 (0)		
AA	99 (82,5)	21 (100)	0,043	1,212 (1,116-1,316)
DPYD (rs4970722)	121	20		
AA+AT	60(49,6)	4 (20%)		
TT	61(50,4)	16 (80%)	0,016	3,934(1,243-12,452)
DPYD (rs1801265)	118	21		
GG+AG	64 (54,2)	5(23,8)		
AA	54(45,8)	16(76,2)	0,016	3,793(1,304-11,029)

^aTodos os p valores foram controlados pela ancestralidade por Regressão Logística.

^bOdds Ratio a Intervalo de Confiança de 95%.

DISCUSSÃO

Desde a sua introdução há mais de cinco décadas, o 5-FU permanece como o fármaco quimioterápico mais utilizado, sozinho ou em combinação, para o tratamento de câncer do trato gastrointestinal, incluindo câncer gástrico e colorrectal.

Apesar do amplo uso em prática clínica, há uma substancial taxa de variabilidade interindividual que influencia na farmacocinética do 5-FU, podendo trazer, desta forma, toxicidades severas aos pacientes oncológicos, que podem até abandonar o tratamento (Sistonen, Johanna et al, 2012).

Grande parte dessa heterogeneidade clínica de resposta ao tratamento com fluoropirimidinas é devida a variação da atividade enzimática da enzima DPD, que por sua vez é dependente de variantes genéticas presentes no gene que codifica esta proteína (Tuchman, Mendel et al, 1985). Mais ainda, as frequências de variantes sabidamente responsáveis pela alteração da expressão da enzima DPD variam consideravelmente entre grupos populacionais geograficamente distintos (The International Genome Sample Resource and the Genome Project, 2016).

A importância da enzima DPD para a metabolização do 5-FU, a elevada variabilidade genética (mais de 326 mutações somente em regiões codificadoras), a variabilidade de expressão do gene e a variação entre populações geograficamente distintas são fatores que tornam ainda mais complexas as investigações de marcadores que possam prever a resposta ao tratamento com este fármaco (Froehlich, Tanja K. et al, 2015), principalmente em populações miscigenadas, como é o caso das populações da Amazônia brasileira.

No presente trabalho investigamos nove marcadores genéticos do gene *DPYD* e testamos prováveis associações destes marcadores com as toxicidades apresentadas pelos pacientes com câncer gastrointestinal que foram submetidos ao tratamento com 5-FU.

Uma das associações mais relevantes observadas neste estudo foi a associação significativa entre a presença do alelo C do rs1801159 e a diarreia ($p=0,038$). Esta associação já foi descrita anteriormente em populações asiáticas (Zhang, Hong et al, 2007; Teh, Lay Kek et al, 2013). Nesta última investigação citada os autores observaram que este polimorfismo junto com rs17376848 foram responsáveis por 37% da variação dos níveis plasmáticos de 5-FU e que os portadores do alelo C apresentavam maiores níveis plasmáticos do fármaco.

A importância da investigação deste polimorfismo pode ser ressaltada pelo fato de que a população investigada apresenta a frequência do alelo C (0,28) superior à frequência observada em

outros grupos populacionais para os quais existem dados disponíveis (0,19 em europeus, 0,15 em africanos e 0,27 em populações do leste da Ásia) (The International Genome Sample Resource and the Genome Project, 2016).

A partir dos dados apresentados é possível inferir que a genotipagem desse marcador pode ser uma boa ferramenta para tentar monitorar a dosagem a ser administrada e prever a eficácia do tratamento com 5-FU (Cavalcante, Giovanna C. et al, 2015). Entretanto, ainda não foi relatada a correlação significativa entre o alelo T do marcador rs1801150 e a diminuição no risco de se ter neuropatias, achado este relatado no presente trabalho ($p=0,015$).

O polimorfismo rs3918290 apresentou uma correlação significativa com a presença de toxicidades grau 3-4 com uma razão de probabilidade de aproximadamente 5,5 vezes maior de se desenvolver reações adversas severas ($p=0,036$). Esta variante polimórfica é uma das principais mutações relacionadas com a perda total de atividade enzimática e toxicidade grave com risco de morte relacionado ao 5-FU. Trata-se de uma mutação pontual dentro do éxon 14, que resulta em defeitos durante o processo de *splicing*, suprimindo completamente o éxon e, portanto, resultando numa proteína não funcional (Li, 2011; Caudle, Kelly E. et al, 2013). Esta mutação já foi relatada com a presença de toxicidades severas em diversos trabalhos (Thorn, Caroline F. et al, 2011; Offer, Steven M. et al, 2013; Deenen, Maarten J. et al, 2016), o que corrobora com o achado deste estudo.

Na nossa investigação, o polimorfismo *rs17116806* apresentou uma correlação significativa com a presença de mucosite ($p=0,009$). Apesar de a literatura citar esta mutação como um provável modulador de toxicidade à terapia com base em fluoropirimidinas (Maekawa, Keiko et al, 2007), ainda não há estudos suficientes para determinar sua função no metabolismo do 5-FU e nem há correlação da presença do mesmo com reações adversas observadas em pacientes oncológicos.

Por fim, na presente investigação, os polimorfismos rs17376848, rs4970722 e rs1801265 apresentaram significância para as toxicidades que envolvem reações hematológicas. Esses dados conferem em parte com a literatura já que trabalhos têm correlacionado esses polimorfismos com a baixa atividade da enzima DPD, o que reduz a decomposição natural da droga, aumentando a concentração plasmática de 5-FU e, portanto, aumentando a chance de ocasionar complicações durante o tratamento com terapias à base de 5-FU (Caudle, Kelly E. et al, 2013; Maekawa, Keiko et al, 2007, Toffoli, Giuseppe et al, 2015). Entretanto, não há estudos que associem esses polimorfismos

com um tipo de toxicidade específica, como é o caso das reações hematológicas.

Apesar dos resultados significativos do presente projeto, é válido ressaltar as limitações deste estudo em virtude do caráter de investigação retrospectivo, da diversidade de esquemas quimioterápicos utilizados e do tamanho da casuística. Dessa forma, a perspectiva de realização de um estudo controlado prospectivo com análise de todos os polimorfismos no gene *DPYD* conhecidos por ter resposta em prática clínica poderia confirmar os achados desta investigação e definir uma linha de tratamento com 5-FU, na população da Região Norte do Brasil para maximizar o efeito do fármaco minimizando os riscos de toxicidade e mortes relacionadas ao tratamento com fluoropirimidinas.

CONCLUSÃO

Os dados do presente projeto corroboram com os estudos que sugerem que polimorfismos no gene *DPYD* são preditores de toxicidades em pacientes oncológicos tratados com fluoropirimidinas.

Entretanto, há a necessidade de estudos adicionais para reforçar a importância de estudos clínicos com 5-FU e fluoropirimidinas orais em populações miscigenadas, com o objetivo de melhorar a personalização da medicina diagnóstica e terapêutica, oferecendo a máxima eficácia do tratamento ao paciente com o mínimo possível de efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, S., Zhou, Z., Zhou, J., & Chen, S.Q. (2016). *Pharmacogenomics of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters: Relevance to Precision Medicine. Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(5), 298-313.

Caudle, Kelly E. et al. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 94, n. 6, p. 640-645, 2013.

CAVALCANTE, Giovanna C. et al. *Investigation of Potentially Deleterious Alleles for Response to Cancer Treatment with 5- Fluorouracil. Anticancer research*, v. 35, n. 12, p. 6971-6977, 2015

Deenen, Maarten J. et al. *Upfront genotyping of DPYD* 2A to individualize fluoropyrimidine therapy: a safety and cost analysis. Journal of Clinical Oncology*, v. 34, n. 3, p. 227-234, 2016.

Froehlich, Tanja K. et al. *Clinical importance of risk variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene for the prediction of*

early-onset fluoropyrimidine toxicity. International Journal of Cancer, v. 136, n. 3, p. 730-739, 2015.

Gimenes D.L. e Costa A.A.B.A. (2013) Princípios de terapia sistêmica. In Lopes A, Chammas R, Iyeyasu. Oncologia para a graduação. 3ª edição. Lemar editora. capítulo 27: 229-233.

Hanahan D e Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74.

Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva – INCA/ Ministério da Saúde (2015) Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 126p.

Liou SY, Stephens JM, Carpiuc KT, Feng W, Botteman MF, Hay JW (2007). Economic burden of haematological adverse effects in cancer patients: A systematic review. *Clin Drug Investig.* 27:381-96.

Li, Jing; Bluth, Martin H. *Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy. Pharmacogenomics Personalized Med*, v. 4, p. 11-33, 2011.

Loh M, & Soong R (2011) Challenges and pitfalls in the introduction of pharmacogenetics for cancer. *Annals of the Academy of Medicine Singapore* 40(8): 369–74.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature reviews. Cancer* 3(5): 330–8.

Maekawa, Keiko et al. *Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences. Journal of human genetics*, v. 52, n. 10, p. 804-819, 2007.

Matsusaka, S., & Lenz, H. J. (2015). Pharmacogenomics of fluorouracil-based chemotherapy toxicity. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 11(5), 811-821.

Meulendijks, D., Cats, A., Beijnen, J.H., Schellens, J.H. (2016). Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity - Ready for clinical practice?. *Cancer Treat Rev.*, 50:23-34.

Mohelnikova-Duchonova, B., Melichar, B., & Soucek, P. (2014) FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(30), 10316

- Nishiyama, M., e Eguchi, H (2009) Pharmacokinetics and pharmacogenomics in gastric cancer chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, 61(5), 402–7.
- Offer, Steven M. et al. *Phenotypic profiling of DPYD variations relevant to 5-fluorouracil sensitivity using real-time cellular analysis and in vitro measurement of enzyme activity. Cancer research*, v. 73, n. 6, p. 1958-1968, 2013.
- Reis M (2006) Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia Individualizada e especificidade molecular. *Simpósio: Farmacogenética*, 39: 577-586.
- Savva-bordalo J, Ramalho-carvalho J, Pinheiro M, Costa VL, Rodrigues Â, Dias PC, Veiga I, et al. (2010) Promoter methylation and large intragenic 83 rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5- fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. *BMC Cancer* 10: 420.
- Sistonen, Johanna et al. *A new DPYD genotyping assay for improving the safety of 5-fluorouracil therapy. Clinica Chimica Acta*, v. 414, p. 109-111, 2012.
- Shimoyama, S. (2009). Pharmacogenetics of fluoropyrimidine and cisplatin. A future application to gastric cancer treatment. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(6), 970-981.
- Stewart, B. W., e Wild, C. P. (2014). *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, 505.
- Suarez-Kurtz, G. (2010). Pharmacogenetics in the Brazilian population. *Frontiers in Pharmacology*, 1(118), 1 – 10.
- Teh, Lay Kek et al. *Potential of dihydropyrimidine dehydrogenase genotypes in personalizing 5-fluorouracil therapy among colorectal cancer patients. Therapeutic drug monitoring*, v. 35, n. 5, p. 624-630, 2013.
- The International Genome Sample Resource and the Genome Project. www.1000genomes.org Accessed 25 April 2016.
- Thorn, Caroline F. et al. *PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. Pharmacogenetics and genomics*, v. 21, n. 4, p. 237, 2011.
- Toffoli, Giuseppe et al. *Clinical validity of a DPYD-based pharmacogenetic test to predict severe toxicity to fluoropyrimidines. International Journal of Cancer*, v. 137, n. 12, p. 2971-2980, 2015.
- Tuchman, Mendel et al. *Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. New England Journal of Medicine*, v. 313, n. 4, p. 245-249, 1985.
- Zhang, Hong et al. *DPYD* 5 gene mutation contributes to the reduced DPYD enzyme activity and chemotherapeutic toxicity of 5- FU. Medical Oncology*, v. 24, n. 2, p. 251-258, 2007.
- Wang L, Mcleod HL, Weinsilboum RM (2011) Genomics and drug response. *N Engl J Med*. 364: 1144-1153.
- Wang W, Yang Y, Zhao Y, Zhang T, Liao Q, Shu H (2014) Recent studies of 5- fluorouracil resistance in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 20(42):15682-15690.

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HOSPITAL JOÃO DE BARROS BARRETO

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
JOÃO DE BARROS BARRETO -
UFPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da prevalência dos polimorfismos de enzimas relacionadas ao metabolismo do 5-fluoruracil (5-FU) em uma população do Norte do Brasil.

Pesquisador: WILLIAMS FERNANDES BARRA

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 06649713.9.0000.0017

Instituição Proponente: Hospital Universitário João de Barros Barreto - UFPA

Patrocinador Principal: FUNDACAO AMAZONIA PARAENSE DE AMPARO A PESQUISA - FAPESPA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 617.373

Data da Relatoria: 15/04/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda ao projeto de estudo transversal para avaliação da prevalência dos polimorfismos de enzimas relacionadas ao metabolismo do 5-fluoruracil (5-FU) em uma população do Norte do Brasil, aprovado pelo Colegiado do CEP em 26/03/2013, conforme parecer nº230.032. Os pacientes com câncer tratados com fluorpirimidinas serão recrutados em hospitais de referência em oncologia em Belém/PA – UNACON/HUJBB, Hospital Saúde da Mulher e Hospital Ophir Loyola.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a variabilidade de mutações presentes no gene DPYD e TYMS envolvido na via metabólica e na farmacogenética do 5FU, selecionado como provável indicador da toxicidade e eficácia ao tratamento com este fármaco.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O único procedimento invasivo que os indivíduos serão submetidos será a coleta de 10 ml de sangue periférico para posterior extração de DNA e genotipagem dos polimorfismos no gene DPYD.

Endereço: RUA DOS MUNDURUCUS 4487

Bairro: GUAMA

CEP: 66.073-000

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3201-6754

Fax: (91)3201-6663

E-mail: cephujbb@yahoo.com.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
JOÃO DE BARROS BARRETO -
UFPA



Continuação do Parecer: 617.373

Benefícios: Não há benefício direto, todavia todos os participantes estarão contribuindo para o avanço do tratamento do câncer do TGI na região Norte do Brasil, em particular no Pará.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisador principal apresentou justificativa para aumentar o número de membros na equipe de trabalho em função da necessidade de melhorar o recrutamento de participantes no estudo.

O estudo em questão excluiu o grupo-controle de voluntários sem a doença.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não houve modificações no cronograma.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda está de acordo com a Res. CNS 466/12.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, este Colegiado manifesta-se pela APROVAÇÃO da EMENDA ao protocolo de pesquisa por estar de acordo com a Resolução nº466/2012 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Ainda em atendimento a Res. 466/2012 esclarecemos que a responsabilidade do pesquisador é indelegável, indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais. Além de apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; de elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

Cabe ainda ao pesquisador:

1- desenvolver o projeto conforme delineado;

2- elaborar e apresentar os relatórios parciais, e em prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa, apresentar o relatório final, incluindo os resultados finais da pesquisa, impresso e na Plataforma Brasil;

Endereço: RUA DOS MUNDURUCUS 4487

Bairro: GUAMA

CEP: 66.073-000

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3201-6754

Fax: (91)3201-6663

E-mail: cephujbb@yahoo.com.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
JOÃO DE BARROS BARRETO -
UFPA



Continuação do Parecer: 617.373

- 3- apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP, a qualquer momento;
- 4- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 05 anos após o término da pesquisa;
- 5- encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto;
- 6- justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

BELEM, 15 de Abril de 2014

Assinador por:
João Soares Felício
(Coordenador)

Endereço: RUA DOS MUNDURUCUS 4487
Bairro: GUAMA **CEP:** 66.073-000
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-6754 **Fax:** (91)3201-6663 **E-mail:** cephujbb@yahoo.com.br

ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HOSPITAL OPHIR LOYOLA

HOSPITAL OPHIR LOYOLA -
HOL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da prevalência dos polimorfismos de enzimas relacionadas ao metabolismo do 5-fluoruracil (5-FU) em uma população do Norte do Brasil.

Pesquisador: WILLIAMS FERNANDES BARRA

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 06649713.9.0000.0017

Instituição Proponente: Hospital Universitário João de Barros Barreto - UFPA

Patrocinador Principal: FUNDACAO AMAZONIA PARAENSE DE AMPARO A PESQUISA - FAPESPA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 298.994

Data da Relatoria: 02/05/2013

Apresentação do Projeto:

No Brasil, estimativas para os anos 2012 e 2013, espera-se 14.180 casos novos de câncer colorretal (CCR) em homens e 15.960 em mulheres, fazendo do CCR o terceiro mais comum em ambos os sexos, excetuando-se os casos de pele não melanoma (INCA, 2011). Estimou-se, também, no Brasil, para o ano de 2012, 12.670 casos novos de câncer do estômago em homens e 7.420 em mulheres, sendo o quarto mais incidente nos homens e o sexto entre as mulheres. No Pará, o câncer de estômago é o segundo mais frequente entre os homens e o quarto entre as mulheres, sendo Belém a capital brasileira com a maior taxa relativa de câncer gástrico, com 23 casos e 14 casos por 100.000 habitantes entre os homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2011). A cirurgia, com ressecção completa do tumor, é parte essencial do tratamento dos adenocarcinomas gástrico e colorretal. Entretanto, pacientes cirurgicamente tratados com intenção curativa possuem risco de recidiva variável de acordo com o estadiamento inicial. A utilização do tratamento multimodal com quimioterapia e/ou radioterapia demonstrou aumentar as possibilidades de cura de pacientes operados com câncer de estômago (Macdonald, 2001; Cunningham, 2006) e CCR (Wolmark, 1988). Paciente com câncer gástrico ou CCR metastáticos ou recidivados apresentam ganho de sobrevida global e qualidade de vida quando submetidos à

Endereço: GOVERNADOR MAGALHAES BARATA 523/1075

Bairro: SAO BRAS

CEP: 66.063-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3342-1100

E-mail: cepophirloyola.pa@gmail.com

Continuação do Parecer: 298.994

quimioterapia paliativa (Scheithauer, 1993; Wagner, 2010). O tratamento quimioterápico do câncer do TGI é baseado em monoterapia ou combinação de diversas drogas, permanecendo o 5-FU como o quimioterápico mais utilizado para o tratamento de câncer do TGI, incluindo câncer gástrico e CCR (Li, 2011). O 5-FU é uma pró-droga que é convertida no metabólito ativo, 5-fluoro-2-deoxiuridina monofosfato (FdUMP) que promove a inibição da timidilato sintetase (TS) e, subsequentemente, da síntese do DNA. Outro mecanismo de ação antitumoral do 5-FU é a incorporação de FUTP ao RNA e de FdUTP ao DNA, (Longley, 2003). O 5-FU é metabolizado pela dihidropirimidina desidrogenase (DPD) em dihidrofluoruracil (DHFU) que é um metabólito inativo. Cerca de 80% do 5-FU administrado é catabolizado primariamente no fígado, onde a DPD é expressa abundantemente (Longley, 2003). Existe variabilidade farmacocinética interindividual no metabolismo do 5-FU, principalmente devido à variabilidade na atividade enzimática da DPD (Gamelin, 2008). Cerca de 3 a 5% da população é parcialmente, e 0,2% completamente, deficiente da atividade enzimática de DPD (Walther, 2009). Pacientes com redução da atividade enzimática da DPD apresentam toxicidades graves, às vezes fatais, quando expostos ao 5-FU (Longley, 2003; Walther 2009). Há mais que 30 polimorfismos que causam deficiência de DPD, levando a toxicidades de graus variados (Diasio, 2000; Wei, 1996). A nova era da medicina personalizada, baseada na farmacocinética e farmacodinâmica singular de cada indivíduo exposto a uma droga, possibilita meios para atingir maior eficácia e menor toxicidade durante o tratamento quimioterápico. A DPYD é uma enzima de fase I responsável pela inativação hepática de 80% do 5-FU administrado (Longley, 2003), estando sua expressão relacionada com tolerância e resposta ao tratamento com 5-FU. A identificação de genes (e formas alternativas desses genes) responsáveis por efeitos adversos em resposta aos fármacos pode ser muito útil no estabelecimento de políticas de saúde pública e no desenho e interpretação de ensaios clínicos. A existência de diferenças inter-étnicas em relação à variabilidade encontrada em genes envolvidos com resposta aos fármacos, pode ser um fator importante para a interpretação errônea dos resultados (Suarez-Kutz 2005; Daar e Singer. 2005).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar as mutações presentes no gene DPYD e TYMS envolvido na via metabólica e na farmacogenética do 5-FU, selecionado como provável indicador da toxicidade e eficácia ao tratamento com este fármaco.

Objetivo Secundário:

a) Investigar marcadores moleculares do tipo SNPs no gene DPYD que possam ser utilizados como

Endereço: GOVERNADOR MAGALHAES BARATA 523/1075

Bairro: SAO BRAS

CEP: 66.063-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3342-1100

E-mail: cepophirloyola.pa@gmail.com

HOSPITAL OPHIR LOYOLA - HOL



Continuação do Parecer: 298.994

preditivos de toxicidade ao tratamento com 5-FU. b) Descrever a frequência dos polimorfismos no gene DPYD em amostras de 700 indivíduos considerados controles populacionais do estado do Pará. c) Investigar e comparar os genótipos dos pacientes tratados com 5-FU que apresentaram efeitos adversos ao tratamento com o grupo de pacientes que não apresentaram. d) Contribuir para condução de estudos clínicos de tratamento com 5-FU e seus derivados baseados em medicina personalizada;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O único procedimento que os indivíduos serão submetidos será a coleta de 10 ml de sangue periférico para posterior extração de DNA e genotipagem dos polimorfismos no gene DPYD e pode ter um hematoma ou dor local.

Benefícios:

Não há benefício direto, todavia todos os participantes estarão contribuindo para o avanço do tratamento do câncer do TGI na região Norte do Brasil, em particular no Pará.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A avaliação da relevância social da pesquisa mostra que o tema é relevante para a sociedade, pois é na oncologia que a medicina personalizada possui grande importância devido a estreita relação entre dose da droga, eficácia antitumoral e toxicidade da maioria das drogas quimioterápicas e a grande variabilidade farmacocinética e farmacodinâmica interindividual (Li e Bluth, 2011).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão de acordo com a Resolução 196/96 do CNS/MS

Recomendações:

Acrescentar a possibilidade de dor no local da punção entre os Riscos da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, somos pela aprovação do projeto de pesquisa. Este é nosso parecer, SMJ

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: GOVERNADOR MAGALHAES BARATA 523/1075

Bairro: SAO BRAS

CEP: 66.063-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3342-1100

E-mail: cepophirtoyola.pa@gmail.com

HOSPITAL OPHIR LOYOLA -
HOL



Continuação do Parecer: 298.994

BELEM, 10 de Junho de 2013

Assinador por:
Alberto Gomes Ferreira Junior
(Coordenador)

Endereço: GOVERNADOR MAGALHAES BARATA 523/1075

Bairro: SAO BRAS

CEP: 66.063-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3342-1100


E-mail: cepophirloyola.pa@gmail.com

ANEXO 3– ACEITE DO ORIENTADOR

TERMO DE ACEITE DO ORIENTADOR

Eu, Ney Pereira Carneiro dos Santos, aceito orientar o Trabalho de Conclusão de Curso – TCC do curso de medicina da UFPA, intitulado "INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE MEDICINA DE PRECISÃO NO GENE *DPYD* COMO PREDITORES DE TOXICIDADE A TERAPIAS COM USO DE FLUOROPIRIMIDINAS EM PACIENTES COM NEOPLASIA GASTROINTESTINAL", que será desenvolvido pelas discentes Mayara Ferreira Mota e Tayssa Cristina Lima de Vilhena, comprometendo-me a dedicar o tempo mínimo de 2 (duas) horas semanais para o acompanhamento do TCC, assim como, de participar da defesa do trabalho como membro examinador, devendo presidir a banca examinadora. Informo também, ter ciência que a orientação deverá estar de acordo com o manual das orientações para apresentação do TCC e que, na eventual ocorrência de algum fato que prejudique o processo de orientação, o mesmo deverá ser formalmente comunicado a coordenação do TCC.

Belém, 01 de agosto de 2017.




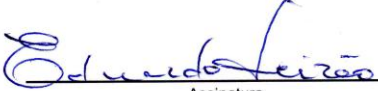
Assinatura.

ANEXO 4- FOLHA DE ROSTO DA PLATAFORMA BRASIL



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Determinação da prevalência dos polimorfismos de enzimas relacionadas ao metabolismo do 5-fluoruracil (5-FU) em uma população do Norte do Brasil.		2. Número de Sujeitos de Pesquisa: 1.000	
3. Área Temática: Área 1. Genética Humana. (Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.)			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas, Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: WILLIAMS FERNANDES BARRA			
6. CPF: 648.392.492-53		7. Endereço (Rua, n.º): CHEDEN BITAR NAZARE CASA 137 BELEM PARA 66040080	
8. Nacionalidade: BRASILEIRA		9. Telefone: (91) 3233-1282	10. Outro Telefone:
		11. Email: ajuru2@gmail.com	
12. Cargo: MÉDICO			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>26</u> / <u>02</u> / <u>2013</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Hospital Universitário João de Barros Barreto - UFPA		14. CNPJ: 34.621.748/0004-76	15. Unidade/Órgão:
16. Telefone:		17. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>EDUARNO LEITÃO MAIA</u>		CPF: <u>037 439 342-72</u>	
Cargo/Função: <u>Diretor HUJBB</u>			
Data: <u>08</u> / <u>03</u> / <u>2013</u>		 Assinatura Dr. Eduardo Leitão Maia Diretor Geral - HUJBB CRM / PA - 1997	
PATROCINADOR PRINCIPAL			