

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Estudo farmacogenético do metabolismo do tamoxifeno: avaliação
genotípica e fenotípica da *CYP2D6*

Autora

MARINA VENZON ANTUNES

Orientadora: Dra. Daniela Dornelles Rosa

Porto Alegre, janeiro de 2012.

MARINA VENZON ANTUNES

Estudo farmacogenético do metabolismo do tamoxifeno: avaliação
genotípica e fenotípica da *CYP2D6*

Orientadora: Dra. Daniela Dornelles Rosa

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas, como requisito para
obtenção de título de Mestre em
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, janeiro de 2012.

CIP - Catalogação na Publicação

Venzon Antunes, Marina

Estudo farmacogenético do metabolismo do tamoxifeno: avaliação genotípica e fenotípica da CYP2D6 / Marina Venzon Antunes. -- 2012.
102 f.

Orientadora: Daniela Dornelles Rosa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. tamoxifeno. 2. CYP2D6. 3. farmacogenética. 4. câncer de mama. I. Dornelles Rosa, Daniela, orient.
II. Título.

“O maior sucesso que uma pessoa pode alcançar é ser Feliz.”

(Leomar Antônio Brustolin -1967)

AGRADECIMENTOS

Várias pessoas estiveram envolvidas de alguma maneira na execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos:

Às pacientes pela disposição em participar do estudo.

À Dra. Daniela Dornelles Rosa, por oportunizar a realização desta pesquisa, pela confiança depositada e pelas contribuições para a qualificação do trabalho.

Ao professor Dr. Rafael Linden pelos inúmeros ensinamentos e essenciais contribuições ao planejamento e execução deste estudo.

Aos colegas biomédicos Me. Tiago Ozelame Fontanive e Me. Huander Andreolla e às alunas de iniciação científica Tamyris dos Santos e Nathália Costa, pelo auxílio com as coletas, revisão de prontuários e análises laboratoriais.

Aos colegas Belgas Dr. Pierre Wallemacq, Dr. Vincent Haufroid e Jean-François Classen, da “Université Catholique de Louvain”, pela realização das análises de genotipagem.

A Universidade Feevale, por propiciar as condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos especiais aos meus pais Jaime e Nara pela dedicação na minha formação pessoal, acadêmica e profissional. Ao Fabrício Zanella, pelo companheirismo, cumplicidade e pelas palavras de apoio e incentivo. Às minhas irmãs Priscila, Giovana e Fabiana, pelo convívio e amizade e à minha madrinha prof. Me. Janete R. Antunes pelo incentivo na busca pelos meus objetivos e na construção do conhecimento. Agradeço também o importante apoio dos amigos durante a trilha deste caminho.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	10
1. INTRODUÇÃO	13
2. JUSTIFICATIVA	15
3. REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Câncer de mama	16
<i>3.1.1 Epidemiologia e etiologia do câncer de mama</i>	16
<i>3.1.2 Relação estrogênio</i>	17
<i>3.1.3 Tratamento do câncer de mama</i>	18
3.2 Tamoxifeno	20
<i>3.2.1 Mecanismo de ação e farmacocinética</i>	21
<i>3.2.2 Efeitos adversos</i>	23
3.3 Farmacogenética na terapia com tamoxifeno	24
<i>3.3.1 Genótipos da CYP2D6</i>	25
<i>3.3.2 Fenótipos CYP2D6</i>	27
<i>3.3.3 Inibidores CYP2D6</i>	28
<i>3.3.4 Fenotipagem versus genotipagem</i>	30
<i>3.3.5 Estudos farmacogenéticos</i>	32
<i>3.3.5.1 Considerações níveis plasmáticos de endoxifeno</i>	33
<i>3.3.5.2 Contrapontos na relação CYP2D6 e resposta ao TAM</i>	36

4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo geral	39
4.2 Objetivos específicos	39
5. MÉTODOS	41
5.1 Delineamento experimental	41
5.2 População em Estudo	41
5.3 Escolha dos participantes, critérios de inclusão e exclusão	41
5.4. Cálculo do tamanho da amostra	42
5.5 Coleta dos Dados e Amostra	42
<i>5.5.1 Ficha de avaliação</i>	42
<i>5.5.2. Procedimento de coleta das amostras</i>	43
5.6 Análises laboratoriais	43
<i>5.6.1 Genotipagem da CYP2D6</i>	43
<i>5.6.2 Determinação de DMT e DTF e fenotipagem da CYP2D6</i>	44
<i>5.6.3 Determinações das concentrações de TAM, HTF, NDT e EDF</i>	45
<i>5.6.4 Análise qualitativa de fármacos inibidores da CYP2D6</i>	46
<i>5.7 Análise estatística</i>	47
<i>5.8 Aspectos éticos</i>	48
REFERÊNCIAS	49
6. ARTIGO	56
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS	92
ANEXOS	93
Parecer aprovação comitê de ética em Pesquisa	93
Termo de consentimento livre e esclarecido	94
Ficha de avaliação	96
Resumo resultados análises laboratoriais por paciente	99

RESUMO

Introdução: As variações da *CYP2D6* estão associadas com o desfecho clínico das pacientes na terapia adjuvante do câncer de mama com tamoxifeno (TAM). Esta associação deve-se principalmente a hidroxilação do N-desmetiltamoxifeno (NDT) pela *CYP2D6* a endoxifeno (EDF) que, por sua alta potência antiestrogênica, é o principal responsável pela eficácia terapêutica. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre o genótipo e o fenótipo da *CYP2D6* com os níveis de EDF e a razão metabólica [NDT]/[EDF] em uma população do Sul do Brasil.

Métodos: Foram obtidas amostras de plasma em vale de 97 pacientes em terapia com o tamoxifeno. A genotipagem da *CYP2D6* foi realizada com ensaio Luminex, com determinação de escores de atividade genotípica (EAG). As concentrações do TAM e seus metabólitos foram determinados por CLAE-DAD e classificadas em metabolizadores lentos (ML), intermediários (MI), rápidos com atividade diminuída (MR-D), rápidos com atividade rápida (MR-R) e ultra-rápidos (UR). A fenotipagem foi realizada através da determinação do dextrometorfano (DMT) e do dextrorfano (DTF) por CLAE-FL nas amostras de plasma coletadas três horas após administração oral de 33 mg de DMT. A atividade da *CYP2D6* foi avaliada pela razão metabólica [DMT]/[DTF].

Resultados: A genotipagem da *CYP2D6* mostrou prevalência de 4,1% de ML, 4,1% de MI, 49,5% de MR-D, 39,2% de MR-R e 3,1% de UR. O genótipo (EAG) foi significativamente correlacionado com o fenótipo ([DMT]/[DTF]), com uma

associação moderada ($r_s = -0,463$; $p < 0,001$). As medianas das concentrações plasmáticas do TAM e seus metabólitos (ng mL^{-1}) foram: TAM 57,17; HTF 1,01; EDF 6,21; NDT 125,50. Os níveis de EDF foram inferiores nos ML em comparação aos MR ($p < 0,05$). O fenótipo apresentou maior associação, porém ainda moderada, com os níveis de EDF e $[\text{NDT}]/[\text{EDF}]$ em comparação ao genótipo ($r = -0,507$ $r = 0,625$, $p < 0,001$ *versus* $r = 0,356$ $r = 0,516$; $p < 0,01$). Ao fenótipo da *CYP2D6* foram atribuídas 26% da variabilidade dos níveis de EDF e 38 % das razões metabólicas $[\text{NDT}]/[\text{EDF}]$, enquanto que ao genótipo foram atribuídas 12% e 27 %, respectivamente.

Conclusão: A genotipagem e/ou fenotipagem da *CYP2D6* não foram capazes de prever completamente as concentrações de EDF. Desta forma, sugerimos que estudos futuros utilizem o monitoramento dos níveis de EDF durante a terapia com TAM, com o objetivo de avaliar a sua efetividade.

ABSTRACT

Background: An association between *CYP2D6* variation and clinical outcomes among women with breast cancer treated with tamoxifen (TAM) has been demonstrated, such that the presence of 2 functional *CYP2D6* alleles was associated with better clinical outcomes. This association is mainly due the *CYP2D6* mediated hydroxylation of N-desmethyltamoxifen (NDT) to yield endoxifen (EDF), which because of its high antiestrogenic potency, is the main responsible for the therapeutic efficacy of TAM. The aim of this study was to evaluate the relation of *CYP2D6* genotyping and phenotyping with EDF levels and [NDT]/[EDF] metabolic ratio in breast cancer patients from South of Brazil under TAM therapy.

Methods: Trough blood samples were collected from 97 patients. *CYP2D6* genotyping was performed with a Luminex assay and calculation of Genotypic activity scores (GAS). Tamoxifen and metabolites EDF, NDT and 4-hidroxy-tamoxifen (HTF) were measured in plasma by HPLC-PDA. *CYP2D6* phenotyping was performed by determination of dextromethorphan (DMT) and dextrorphan (DTF) by HPLC-FL at plasma collected three hours after oral administration of 33 mg of DMF. Phenotypes were given according to [DMT]/[DTF] metabolic ratio.

Results: *CYP2D6* genotyping indicated a prevalence of 4.1% PM, 4.1% IM, 49.5% EM-S, 39.2% EM-F and 3.1% UM. Genotype (GAS), was significantly correlated with phenotype ([DMT]/[DTF]), with a moderate association ($r_s = -0.463$; $p < 0.001$). Median plasma concentrations (ng mL^{-1}) (N=97) were: TAM 57.17; HTF 1.01; EDF 6.21; NDT

125.50. EDF levels were lower in PM than in EM ($p < 0.05$). Phenotype showed stronger, but still moderate, association with EDF and [NDT]/[EDF] than genotype ($r = -0.507$ $r = 0.625$, $p < 0.001$ versus $r = 0.356$ $r = 0.516$, $p < 0.01$). Phenotype accounted for 26% of the variability in EDF levels and 38 % of [NDT]/[EDF], while genotype for 12% and 27 %, respectively.

Conclusion: *CYP2D6* genotyping and/or phenotyping could not fully predict EDF concentrations. Monitoring EDF itself could be considered in further studies during TAM therapy in order to evaluate its efficacy

Keywords: Tamoxifen, endoxifen, *CYP2D6*, genotype, phenotype.

LISTA DE ABREVIATURAS

TAM - Tamoxifeno

RE – Receptores de estrogênio

EDF – (Z)-endoxifeno

ML – Metabolizadores lentos

MI – Metabolizadores intermediários

RP – Receptores de progesterona

TGF β – Fator transformador de crescimento beta

NDT – N-desmetil-tamoxifeno

HTF – 4-hidroxi-tamoxifeno

MR – Metabolizador rápido

UR – Metabolizador ultra-rápido

MR-R Metabolizador rápido com atividade rápida

MR-D Metabolizador rápido com atividade diminuída

DMT – Dextrometorfano

DTF – Dextrorfano

PM- Poor metabolizer

IM – Intermediate metabolizer

EM – Extensive metabolizer

UM – Ultra rapid metabolizer

NF – Normal function

LOF – Loss of function

DOF – Decrease of function

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo do Tamoxifeno, adaptado de Irarrázaval (2011).

Figura 2 – Frequência dos alelos da *CYP2D6*, adaptado de Bradford (2002).

1. INTRODUÇÃO

O tamoxifeno (TAM) é um modulador não-esteroidal dos receptores de estrogênio (RE), sendo um dos principais tratamentos em pacientes com câncer de mama com expressão de receptores hormonais (1-4). No tecido mamário, depois de ligar-se aos receptores, o TAM apresenta efeito antagonista ao estrogênio, o que leva à redução da proliferação das células neoplásicas (3).

A terapia com o TAM diminui a mortalidade por câncer de mama em aproximadamente 31% (2) e as recorrências em 50 % (5).

A enzima do citocromo P450 *CYP2D6* é a responsável pela conversão do TAM a seu metabólito ativo (Z)-endoxifeno (EDF), o qual é até 100 vezes mais potente do que o fármaco na supressão da proliferação das células estrógeno-dependentes (1,4-6). Polimorfismos no gene codificador da *CYP2D6* ou fatores ambientais como a presença de patologias hepáticas ou o uso de fármacos inibidores podem levar à redução da atividade enzimática, com conseqüente diminuição dos níveis de EDF (1). Estudos apontam que níveis baixos de EDF estão relacionados ao pior prognóstico durante o tratamento, incluindo maior possibilidade de recidivas e mortalidade (6-9).

É conhecida a ampla variabilidade na prevalência de alelos não funcionais da *CYP2D6* entre as diferentes etnias. Estudos demonstraram que cerca de 7 a 11% dos indivíduos caucasianos (10), 1 % dos chineses, coreanos e japoneses, 4,8 % dos indianos, 1 a 9 % dos árabes, 0 a 19 % das populações negras e 3,2 % dos

mexicanos são afetados pelo traço autossômico recessivo e classificados como metabolizadores lentos (ML), em virtude da ausência de atividade enzimática (11).

São escassos os estudos que abordam a frequência dos polimorfismos da *CYP2D6* na população brasileira, cuja alta miscigenação é oriunda dos escravos (africanos), da população indígena e dos povos colonizadores (europeus). Prado (2009) estudou 148 indivíduos e encontrou uma prevalência de 4,7 % de ML e 6,1 % de MI (12).

Pesquisas recentes têm aumentado as expectativas de que a avaliação farmacogenética da *CYP2D6* associando o genótipo e fenótipo da enzima aos níveis plasmáticos de EDF possa ser uma ferramenta para indicar as pacientes que possivelmente não responderão de forma satisfatória à terapia com TAM, apontando nestes casos a necessidade de ajuste individual das doses ou ainda o uso de tratamento alternativo com inibidores da aromatase em pacientes na pós-menopausa (9,13-19).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a larga utilização do TAM no tratamento do câncer de mama e a potencial importância dos polimorfismos e inibidores da *CYP2D6* na resposta terapêutica, a avaliação farmacogenética desta via metabólica é de grande relevância clínica. O propósito deste estudo foi avaliar a capacidade de predição do metabolismo do TAM, através da associação dos níveis plasmáticos de EDF com o genótipo e fenótipo da enzima, de forma a identificar pacientes que possam se beneficiar em maior ou menor grau do tratamento hormonal.

Este é o primeiro estudo realizado em uma população brasileira com o intuito de avaliar o metabolismo do tamoxifeno em um contexto farmacogenético, associando o genótipo e o fenótipo da enzima com os níveis de EDF.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer de mama

3.1.1 *Epidemiologia e etiologia do câncer de mama*

Com exceção do câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres, com mais de 1 milhão de casos diagnosticados no mundo a cada ano (8). São altas as taxas de mortalidade em decorrência desta neoplasia, anualmente são atribuídas à doença mais de 400 mil mortes. Nos países desenvolvidos, é a segunda maior causa de óbitos por câncer em mulheres, ficando atrás somente do câncer de pulmão (20).

Estimativas indicam para o ano de 2011, nos Estados Unidos, aproximadamente 230 mil novos casos e 40 mil mortes relacionadas ao câncer de mama invasivo (21). No Brasil, a incidência estimada é de 50,7 casos para cada 100.000 mulheres; considerando somente o estado do Rio Grande do Sul, esta taxa aumenta para 81,6 casos (22).

Cerca de 5 a 10 % dos casos da neoplasia são atribuídos a fatores hereditários, em decorrência da predisposição genética associada a mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, envolvidas no reparo do DNA e na regulação transcriptacional (23). Mulheres com parentes de primeiro grau com histórico de câncer de mama possuem risco da doença 2 a 3 vezes maior em comparação a

população em geral. Este risco é ainda mais pronunciado quando tanto mãe quanto irmã já foram acometidas; nestes casos, aos 65 anos, a mulher possui risco aproximado de 50 % de desenvolver a neoplasia (24).

Acredita-se que a maior parte dos casos (90 a 95%) sejam esporádicos (não familiares) e decorram de mutações somáticas que ocorrem durante a vida. Dentre os fatores reprodutivos/hormonais relacionados a tais mutações incluem-se: idade precoce de menarca, menopausa tardia, nuliparidade, idade avançada na primeira gestação, uso prolongado de anticoncepcionais orais e uso de terapia de reposição hormonal na pós-menopausa (25).

Entre os fatores de risco para o câncer de mama relacionados ao estilo de vida destacam-se dieta, obesidade, nível de atividade física, consumo de álcool e tabagismo. Com relação ao risco ambiental, são importantes as exposições a compostos químicos sintéticos, radiação ionizante, campos eletromagnéticos e pesticidas organoclorados, entre outros (23).

3.1.2 Relação do câncer de mama com o estrogênio

O crescimento e o desenvolvimento do tecido epitelial mamário são regulados pelo estrogênio, que é um hormônio esteróide que interage com receptores intracelulares, de modo a ativar a transcrição do gene via elementos responsivos ao hormônio. Além disso, induz a síntese e secreção de alguns fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento vascular endotelial, o fator de crescimento ligado a insulina e o fator de crescimento de fibroblastos, o que sugere uma provável regulação da sobrevivência e do crescimento das células malignas (23).

A maior parte dos tumores malignos invasores de mama apresenta células com receptores de estrogênio (RE 75 %), sendo que destes, 65% também possuem receptores de progesterona (RP). Em contraste, 3 a 5 % dos tumores são de células RE negativas e RP positivas. Assim como os REs, os RPs também são ativados pelo estrogênio e pacientes com câncer de mama com a presença destes receptores podem se beneficiar do tratamento hormonal antiestrogênico (26).

3.1.3 Tratamento do câncer de mama

Ainda que se considere a eficácia do autoexame da mama, da avaliação clínica e da mamografia, esses exames não são suficientes para detectar e tratar a tempo todos os casos. O câncer de mama quando diagnosticado em fases iniciais tem grandes chances de cura, porém, na medida em que os tumores são diagnosticados em estádios avançados os recursos terapêuticos se tornam limitados, sendo maior a morbi-mortalidade pós-tratamento (27).

A abordagem terapêutica do câncer de mama envolve tratamento loco-regional com cirurgia e/ou radioterapia e tratamento adjuvante sistêmico, que inclui a quimioterapia, os anticorpos monoclonais, os inibidores de tirosino-quinase e a hormonioterapia. Geralmente, os tratamentos propostos associam duas ou mais abordagens, com estratégia de tratamento dependendo diretamente dos seguintes fatores: estágio da doença e grau do tumor, idade, condição geral da saúde da paciente, presença de mutações conhecidas nos genes para o câncer de mama, *status* pré ou pós-menopáusico e a presença de receptores de estrogênio ou progesterona no tumor (28).

O tratamento cirúrgico (mastectomia radical ou cirurgia conservadora) tem por objetivo promover o controle local com a remoção mecânica das células malignas presentes no câncer primário, proporcionar maior sobrevida as pacientes, orientar a terapia sistêmica, definir o estadiamento cirúrgico da doença e identificar grupos com maior risco de metástase à distância (29).

O uso da radioterapia associada à cirurgia conservadora diminui o risco de recidiva loco-regional e aumenta o tempo livre de doença, podendo também ser indicada de forma exclusiva (quando as lesões são inoperáveis ou a paciente não possui condições clínicas de submeter-se a procedimento cirúrgico) (28).

O tratamento sistêmico com quimioterapia neoadjuvante (ou primária) é utilizado com o objetivo de reduzir o volume tumoral, possibilitando a cirurgia conservadora nos tumores inicialmente candidatos à mastectomia radical, eliminando também metástases sistêmicas ocultas (30). Também tem importante papel em testar a sensibilidade das células neoplásicas à quimioterapia. Já a quimioterapia adjuvante, realizada após o tratamento cirúrgico, auxilia na redução do risco de recorrência da doença, tentando eliminar qualquer célula neoplásica remanescente. De um modo geral, a quimioterapia adjuvante é realizada em ciclos que podem ser constituídos de um ou vários dias de aplicações, cada ciclo é repetido dentro de um intervalo de tempo hábil para o organismo se recuperar dos efeitos adversos (31).

A inclusão da terapia endócrina adjuvante é recomendada para as pacientes cujos tumores mostram evidência de resposta endócrina, definida como a presença de qualquer RE ou RP detectável. A realização do tratamento hormonal oferece grande benefício terapêutico, reduzindo a mortalidade e a recorrência pelo câncer de mama (32).

A indicação do tratamento difere entre mulheres na pré e pós-menopausa. Para pacientes na pré-menopausa, o uso de 5 anos de TAM é a primeira opção de bloqueio hormonal. Pode-se também realizar a supressão da função ovariana com ooforectomia ou bloqueio do eixo hipotálamo-hipofise-gonadas (com inibidores do GnRH). No entanto, a supressão ou ablação do ovário deve ser considerada somente em circunstâncias extraordinárias (32) e o uso de inibidores GnRh por 2 anos geralmente é uma opção para mulheres que pretendem engravidar logo.

Com relação às pacientes na pós-menopausa, além do TAM pode ser considerada a indicação de fármacos inibidores da aromatase. Apesar da terapia com os inibidores da aromatase estar associada a um percentual de sobrevida livre da doença 3 a 5 % superior em relação ao TAM, este continua sendo um fármaco de alto valor terapêutico. Algumas indicações permanecem exclusivas para ele, como em mulheres na pré-menopausa e no câncer em homens, assim como na terapia profilática. Além disso, o TAM apresenta custo consideravelmente inferior aos inibidores da aromatase (2).

3.2 Tamoxifeno

O uso de TAM por pacientes com câncer de mama foi aprovado em 1977, e há mais de 25 anos é considerada a principal terapia endócrina adjuvante para o tratamento dessa neoplasia. Além disso, também é utilizado na prevenção do desenvolvimento do carcinoma em pacientes saudáveis sob alto risco (33).

A terapia com o TAM tem impacto significativo na sobrevida das pacientes. O tratamento durante 5 anos após cirurgia definitiva reduz as taxas de recorrência e de mortalidade da doença em 41 % e 34 % respectivamente, traduzindo-se em uma redução absoluta de 9,2% na mortalidade em 15 anos pelo câncer de mama (34).

3.2.1 Mecanismo de ação e farmacocinética

O TAM pertence a classe de medicamentos conhecidos como moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (RE), cujo efeito é promovido através da ação antagonista de bloqueio do sítio de ligação do estrogênio ao receptor tecidual mamário, mediado através da ativação da via de transdução de sinal antiproliferativa do fator de crescimento transformador-beta (TGF β). Na sua ausência, o estrogênio estimularia o crescimento das células RE-positivas do tecido mamário maligno, através da ligação com seu sítio no receptor e da interação com o DNA da célula, alterando a atividade do gene e promovendo o crescimento celular (3).

Dependendo da orientação de sua cadeia lateral (alquilaminoetóxi), o TAM também pode apresentar atividade agonista sobre o estrogênio. Na conformação “*trans*”, possui ação antiestrogênica, e na conformação “*cis*”, tem atividade predominante estrogênica. Além disso, seu efeito parece depender dos níveis de estrogênio circulantes e do tecido alvo. No tecido endometrial e no osso, por exemplo, o TAM pode apresentar ação agonista ao estrogênio (2).

Sua comercialização é feita na forma de comprimidos como citrato de tamoxifeno, em dosagens de 10 e 20 mg de isômero *trans* puro. A dose diária recomendada para as pacientes é de 20 mg. O TAM apresenta alta ligação a proteínas plasmáticas (98 %); após a administração oral, atinge concentração sérica máxima em torno de 4 a 7 horas, com meia-vida de sete dias. Devido a longa meia-vida dos metabólitos, que pode chegar a ser de 14 dias, com uma dose típica de 20 mg de TAM o equilíbrio dinâmico é alcançado no período de três a quatro meses. A excreção ocorre predominantemente nas fezes, sendo a excreção urinária mínima (4).

O TAM é extensivamente metabolizado por enzimas hepáticas do sistema citocromo P450 a muitos metabólitos primários e secundários. Alguns metabólitos do TAM formados *in vivo* são mais ativos que o próprio fármaco, motivo pelo qual ele pode ser considerado um pró-fármaco (1).

Na figura 1 são apresentadas as vias de maior relevância no metabolismo do TAM. As enzimas *CYPs 3A4* e *3A5* são responsáveis pela N-desmetilação do TAM à N-desmetiltamoxifeno (NDT), sendo esta considerada quantitativamente a maior via primária. Posteriormente, através da ação catalisadora da *CYP2D6*, este metabólito passa por múltiplas oxidações, com destaque para a oxidação ao metabólito 4-hidroxi-N-desmetil-tamoxifeno ou (Z)-endoxifeno (EDF). Outra importante via primária do metabolismo do TAM é a sua 4-hidroxilação catalisada pela *CYP2D6* a 4-hidroxi-tamoxifeno (HTF) (35).

A ação antiestrogênica do TAM é especialmente atribuída ao EDF, que assim como o HTF é até 100 vezes mais potente que o fármaco em suprimir a proliferação das células estrógeno-dependentes. Adicionalmente, as concentrações plasmáticas do EDF superam em até 6 vezes as de HTF, sendo assim, o EDF é considerado o principal metabólito do TAM (1,4-6).

Mürdter *et al.* (2011) observaram em seu estudo que embora a *CYP2C9* não tenha relação com a formação do EDF pelo metabolismo do NDT, esta enzima, bem como a *CYP3A*, catalisa a sua formação em pequena via através da N-demetilação do HTF (36). Grann *et al.* (2011) sugerem que apesar destas enzimas serem menos importantes do que a *CYP2D6* na formação do EDF, poderiam, em parte, contribuir para as variações interindividuais dos níveis de EDF.

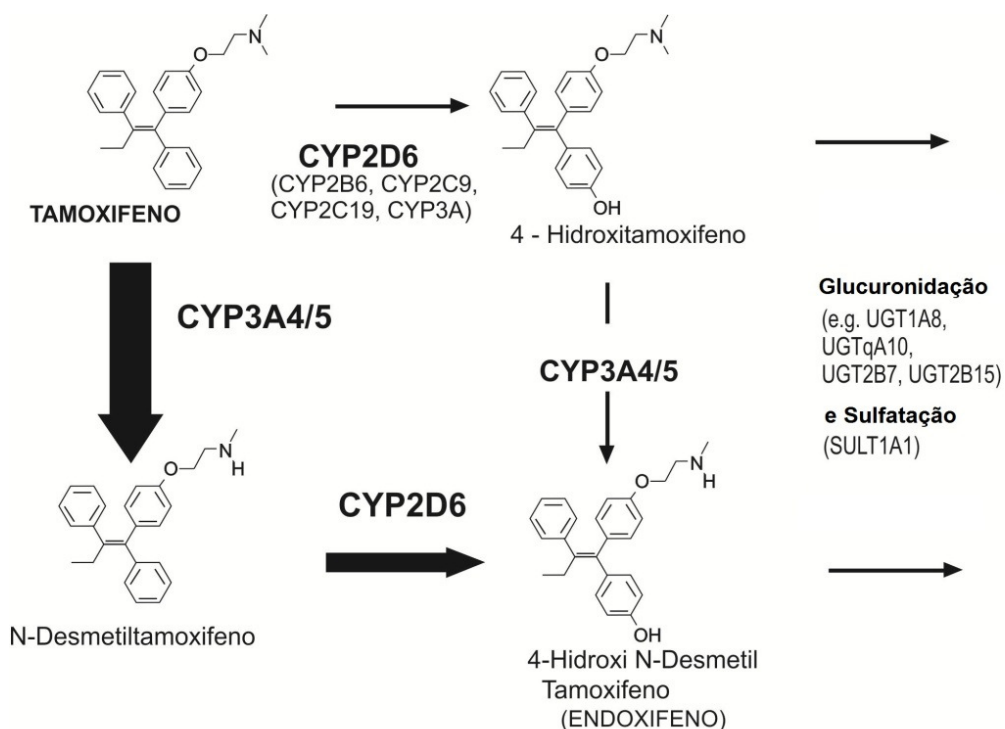


Figura 1 - Metabolismo do Tamoxifeno, adaptado de Irrázaval (2011)

3.2.2 Efeitos adversos

Apesar da terapia com o TAM estar associada a efeitos secundários benéficos, como a melhora no perfil lipídico e o aumento da densidade óssea em mulheres na pós-menopausa, ela também está associada a efeitos adversos, observados em até 25 % das pacientes. Com maior destaque estão náuseas, vômitos e o aumento das “ondas de calor” (“fogachos”), sintoma este relacionado ao climatério, com risco 2 a 3 vezes maior em comparação às mulheres que não usam TAM. Outros efeitos adversos com menor frequência são: irregularidade menstrual, sangramento vaginal, prurido vulvar, dermatite, hipercalcemia, edema periférico, anorexia, depressão, trombocitopenia, leucopenia, cefaléia, doença tromboembólica, retinopatia, carcinoma hepático e carcinoma de endométrio (4).

Para amenizar os “fogachos”, são comumente prescritos antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ex. fluoxetina, paroxetina, citalopram e clomipramina). Entretanto, estes fármacos possuem ação inibitória sobre a *CYP2D6* e podem promover a redução do metabolismo do TAM, diminuindo a formação dos seus metabolitos ativos (11).

A associação da terapia com TAM a efeitos colaterais indesejáveis em algumas mulheres ainda não está esclarecida, parecendo estar relacionado ao metabolismo do TAM e níveis de EDF, sendo dose/concentração-dependentes (37). Além disso, é importante ressaltar que a presença constante de efeitos adversos é um fator de resistência na adesão ao tratamento hormonal, podendo levar à ineficácia da terapia (38). Estudos apontam a redução da adesão ao TAM com o passar dos anos, variando de 87 % no primeiro ano para até 50 % no quarto ano de tratamento (39).

3.3 Farmacogenética na terapia com tamoxifeno

A resposta clínica aos fármacos pode variar amplamente entre os indivíduos. Em um grupo de pacientes utilizando o mesmo fármaco, na mesma dose e para a mesma indicação, alguns terão resposta terapêutica, outros terão resposta parcial e outros poderão apresentar efeitos adversos severos. Diversos fatores podem afetar a eficácia e segurança de um fármaco, incluindo a idade do paciente, gênero, genética e fatores ambientais. A farmacogenética avalia a influência dos fatores genéticos relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos e objetiva, através do estabelecimento de terapia individualizada, o alcance da resposta adequada em um tratamento farmacológico (26).

Uma série de estudos têm considerado o papel da farmacogenética no tratamento do câncer de mama, e recentemente o foco tem sido direcionado para o metabolismo do TAM. Os polimorfismos genéticos estão associados à diferença interindividual na atividade metabólica das CYP450 influenciando a farmacocinética, eficácia e efeitos adversos da terapia (8).

As variações genéticas e/ou geradas por inibidores da *CYP2D6* podem ocasionar falhas na resposta terapêutica ao TAM, levando a ineficiência do tratamento em virtude de concentrações subterapêuticas, ou até mesmo o aumento de efeitos adversos em virtude de concentrações tóxicas. Desta forma, as pacientes com polimorfismos do gene que codifica a *CYP2D6* podem não ser completamente beneficiadas pelo uso do TAM em virtude do metabolismo lento do pró-fármaco aos seus metabólitos ativos (40).

3.3.1 Genótipos da *CYP2D6*

A isoenzima *CYP2D6* se situa no cromossomo 22q13.1 e contém 9 éxons com um total de 4378 pares de bases. São conhecidos mais de 150 alelos para o gene da *CYP2D6*; o *1 é o alelo selvagem, que codifica a enzima funcional completa, enquanto os alelos *2, *33 e *35 contêm alguns pontos de mutação que não afetam as propriedades catalíticas da enzima. Alguns dos alelos associados à ausência de atividade enzimática são: *3-*8, *11-*16, *18-*20, *38, *40, *42, *44; os alelos relacionados à atividade enzimática reduzida são: *9, *10, *17, *29, *36, *37, *41 (6).

A variabilidade genética dos alelos da *CYP2D6* e suas frequências variam de acordo com a etnia das populações (Figura 2). Indivíduos caucasianos apresentam prevalência 71% de alelos funcionais, índice superior aos aproximados 50%

encontrados em asiáticos, africanos e afro-americanos. Apesar da alta frequência de alelos funcionais, a prevalência de alelos não funcionais em caucasianos também é elevada em comparação aos demais grupos, representando 26% (41). Desta forma, cerca de 8 a 11% dos indivíduos caucasianos são afetados pelo traço autossômico recessivo, com a presença de 2 alelos não funcionais, levando a ausência de atividade enzimática (42-44).

Os alelos de atividade nula *3, *4 e *5 são os mais freqüentes nas populações caucasianas, sendo que o *4 está presente em cerca de 70 a 90% dos indivíduos que possuem a presença de 2 alelos não funcionais. No estudo realizado por Sachse *et al.* (1997) em 581 indivíduos caucasianos, caracterizou-se a distribuição da freqüência entre os alelos nulos de aproximadamente 71% para *4; 16% para *5; 3% para *3 e inferior a 1% para os demais.

Em orientais, a frequência de indivíduos com 2 alelos não funcionais é consideravelmente inferior aos caucasianos (cerca de 1%), porém a presença de alelos com atividade reduzida é grande: 41% da população carrega o alelo *10 (45). As frequências de alelos de atividade reduzida entre africanos e afro-americanos são próximas de 35 %, principalmente devido ao *CYP2D6*17*. Os afro-americanos entretanto, possuem mais do que o dobro da média de alelos não funcionais do que os africanos (14,5% versus 6,3%) (41).

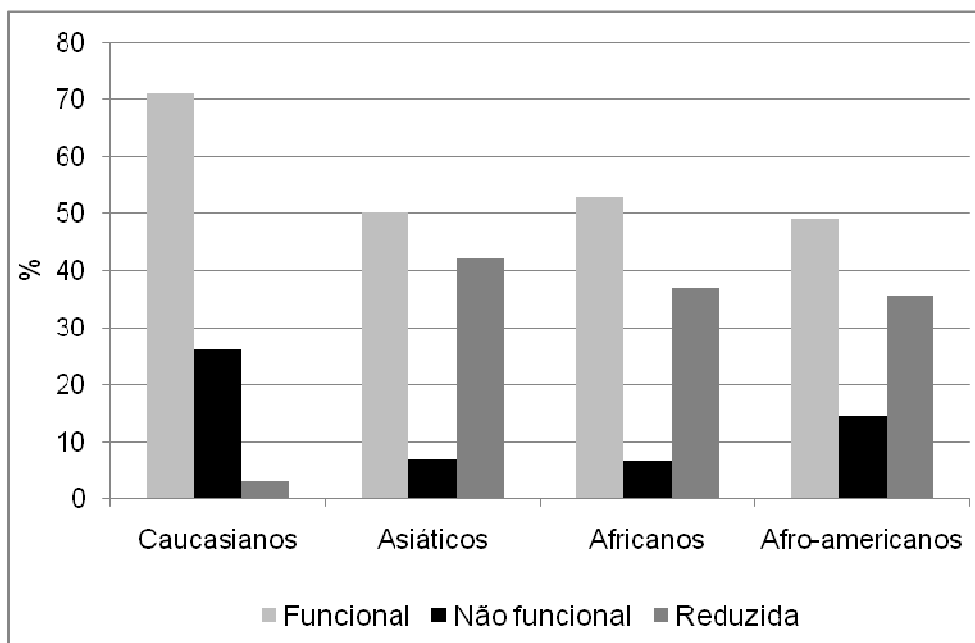


Figura 2 – Frequência dos alelos da *CYP2D6*, adaptado de Bradford (2002)

São escassos os estudos que tratam da frequência dos polimorfismos da *CYP2D6* na população brasileira, cuja alta miscigenação é oriunda dos escravos (africanos), da população indígena e dos povos colonizadores (europeus). Em dois estudos, realizados com 148 e 186 indivíduos moradores da região Sul do Brasil, foram encontradas as frequências de alelos funcionais de 60,5% e 62,8% e do alelo recessivo de atividade nula *4 de 13,2% e 14,5%, respectivamente (12,46).

3.3.2 Fenótipos *CYP2D6*

O genótipo da *CYP2D6* pode ser traduzido em quatro fenótipos distintos: metabolizadores lentos (ML) que não possuem enzima funcional (presença de dois alelos nulos), intermediários (MI) que possuem atividade enzimática residual (presença heterozigótica de alelo de atividade reduzida), rápidos (MR) com atividade enzimática normal (presença de pelo o menos 1 alelo funcional) e ultra-rápidos (UR) com elevada atividade enzimática (presença de multiplicação gênica) (2,47). Se os MR carregam 1 ou 2 alelos funcionais, o fenótipo para este grupo pode ser

subdividido em homozigotos metabolizadores rápidos com atividade rápida (MR-R) ou heterozigotos metabolizadores rápidos com atividade diminuída (MR-D) (2). Os MR-D que carregam um alelo *1 , *2 ou *35 em combinação com um alelo de atividade reduzida ou nula, possuem expressão da enzima pouco prejudicada, porém não é correto afirmar que podem ser classificados como MI, visto que este apresenta fenótipo e genótipo distintos (45).

Estudos demonstraram que cerca de 7 a 11% dos indivíduos caucasianos (10), 1 % dos chineses, coreanos e japoneses, 4,8 % dos indianos, 1 a 9 % dos árabes, 0 a 19 % das populações negras e 3,2 % dos mexicanos são afetados pelo traço autossômico recessivo e classificados como metabolizadores lentos (ML), em virtude da ausência de atividade enzimática (11). No Brasil, os poucos trabalhos publicados indicam prevalência de 3 a 4,7 % de ML e 6,1 a 27 % de MI (12,48).

Devido à influência de alguns fatores, como a co-administração de outros fármacos e a presença de certas patologias, especialmente hepáticas e renais, um determinado genótipo pode ser expresso como um fenótipo diferente do grupo ao qual está relacionado (49). As variações fenotípicas resultam em marcantes diferenças na capacidade metabólica dos indivíduos. Conseqüentemente, indivíduos submetidos a regimes de mesma dosagem podem apresentar uma ampla variabilidade de concentrações plasmáticas (50).

3.3.3 Inibidores CYP2D6

A *CYP2D6* participa do metabolismo enzimático de aproximadamente 25% dos fármacos, incluindo betabloqueadores, antiarrítmicos, antipsicóticos, antieméticos, opióides, antidepressivos e TAM. A atividade da enzima também pode ser afetada por fatores não genéticos, como a presença de disfunção hepática e,

sobretudo, a inibição da atividade catalítica devido ao uso simultâneo de medicamentos inibidores da enzima (40).

Tal como acontece com as variações genéticas, as interações medicamentosas também podem levar a importantes consequências clínicas. Nestes casos, é possível que um indivíduo com a presença de dois alelos funcionais expresse a atividade da enzima de forma reduzida, reduzindo a formação do seu metabólito ativo EDF (4,6,51).

Os antidepressivos inibidores da recaptção da serotonina (ex. fluoxetina, sertralina e paroxetina), além de alguns anti-hipertensivos (ex. amlodipina e nicardipina), antipsicóticos (ex. clorpromazina e haloperidol), analgésicos (ex. metadona), antieméticos (ex. metoclopramida), antiretrovirais (ex. indinavir e ritonavir), antiplaquetários (ex. ticlopidina), antiarrítmicos (ex. amiodarona e quinidina) e antialérgicos (ex. clorfeniramina) estão entre os fármacos conhecidamente redutores da atividade desta enzima (52).

Na Tabela 1 são apresentados os fármacos administrados com maior frequência durante a terapia com o TAM e a sua influência sobre a atividade da *CYP2D6*. Dentre eles, destacam-se os inibidores da recaptção de serotonina paroxetina e fluoxetina, usualmente prescritos para reduzir os efeitos adversos resultantes da ação antiestrogênica do TAM (53).

Tabela 1 - Medicamentos inibidores da *CYP2D6* comumente administrados com TAM, adaptado de Stearns e Rae (2008)

Ação inibitória sobre <i>CYP2D6</i>	Fármacos
Forte ^a	Paroxetina, fluoxetina, bupropiona, quinidina
Moderada	Duloxetina, tioridazina, amiodarona, difenidramina, cimetidina
Fraca ou nula ^b	Sertralina, venlafaxina, citalopram, escitalopram

^a Devem ser evitados por mulheres que utilizam o TAM

^b Provavelmente seguros

3.3.4 Fenotipagem versus genotipagem

A relação entre o genótipo e o fenótipo da *CYP2D6* e o resultado clínico apontam para um possível benefício da genotipagem da *CYP2D6* antes do início do tratamento, de forma a auxiliar na decisão da terapia adjuvante endócrina. Um ensaio de genotipagem robusto, padronizado e com controle de qualidade da *CYP2D6* deve testar variações genéticas que podem afetar o metabolismo do TAM. O valor preditivo da genotipagem para os fenótipos ML e MI é muito bom, desde que a avaliação abranja diversos alelos relacionados a não funcionalidade da enzima e não se restrinja somente ao alelo *4. Tais ensaios devem incluir testes para alelos ML comuns (*CYP2D6**3, *4, e *5) e para alelos MI, conforme a prevalência no grupo populacional estudado (45).

É importante ressaltar que a genotipagem remete a um dado para a vida toda, enquanto a fenotipagem é momentânea. Compreendem-se por genótipo as características genéticas específicas de um organismo e por fenótipo as características observáveis, que se manifesta como resultado de fatores genéticos e ambientais. Assim, deve-se considerar que organismos com o mesmo genótipo podem apresentar diferentes fenótipos devido à interferência de fatores ambientais na atividade da *CYP2D6* (45).

Segundo Linden e Souto (2005) a genotipagem apresenta relevância clínica apenas quando é capaz de prever o fenótipo. A consideração da combinação de fatores genéticos e ambientais na avaliação da atividade da *CYP2D6* durante o tratamento com TAM é de grande valor, visto que, freqüentemente, as pacientes

fazem uso concomitante de fármacos que inibem a atividade catalítica da enzima (16).

O procedimento para a determinação fenotípica da *CYP2D6* é relativamente simples. A inferência da atividade enzimática *in vivo* é feita administrando-se um fármaco sonda e após algumas horas coletando-se amostras de sangue periférico ou urina. São quantificados o fármaco sonda e o seu metabólito, geralmente através de técnicas cromatográficas. Após as dosagens, são estabelecidas as razões metabólicas das concentrações do fármaco em função do metabólito da *CYP2D6* (54).

Uma forma estabelecida para a caracterização do fenótipo da *CYP2D6* é através do seu índice de atividade por meio da determinação da razão metabólica do fármaco sonda dextrometorfano (DMT) e seu metabólito, o dextrorfano (DTF). Além do DMT, outros substratos da *CYP2D6* como a debrisoquina, esparteína, tramadol e metoprolol podem ser utilizados (10).

A preferência pelo uso do DMT se dá em virtude da sua segurança e disponibilidade. Este fármaco é um agonista de receptores opióides normalmente administrado como agente antitussígeno, que raramente apresenta efeitos adversos e quando presentes são toleráveis, como vertigem ou indisposição gastrointestinal (55). Além disso, a *CYP2D6* fica saturada mesmo com concentrações relativamente baixas do substrato de alta especificidade, portanto, a dosagem do fármaco sonda pode ser baixa, reduzindo o risco de efeitos adversos (56).

Uma forma simplificada para a realização da fenotipagem é através da administração de uma dose oral de 30 mg do fármaco sonda e, passadas 3 horas, coleta de uma única amostra de sangue periférico para a realização das determinações plasmáticas de DMT e DTF (54). Os fenótipos são classificados

considerando os valores das razões metabólicas [DMT] / [DTF] em: $ML \geq 0,3$; $0,3 > MI \geq 0,03$; $0,03 > MR \geq 0,0003$; $UR < 0,0003$ (5).

Lötsh *et al.* (2009) realizaram um estudo avaliando o perfil metabolizador de voluntários para a codeína, convertida pela *CYP2D6* em seu principal metabólito ativo, a morfina, associando o genótipo à razão metabólica do DTM. Para a avaliação dos achados foram utilizados três sistemas de predição: dois baseados no fenótipo previsto a partir do genótipo e um sistema baseado na fenotipagem com DMT. Os resultados do estudo indicam que os sistemas de predição tiveram desempenho idêntico na avaliação dos indivíduos com formação mínima da morfina, ou seja, ML e MI. Ao passo que, quando avaliados os indivíduos com níveis altos de morfina, os sistemas de genotipagem identificaram corretamente indivíduos com duplicação gênica (UR), mas apenas metade destes indivíduos tiveram identificação de alta atividade enzimática baseada na fenotipagem. Em contrapartida, indivíduos sem duplicação gênica, mas com formação alta de morfina, foram identificados apenas pela fenotipagem (sistema 3). Estes achados remetem a relevância da avaliação conjunta da genotipagem e fenotipagem da *CYP2D6* (13).

3.3.5 Estudos farmacogenéticos

A importância da *CYP2D6* no tratamento hormonal adjuvante do câncer de mama tem sido discutida na literatura. Fortes evidências clínicas e farmacológicas indicam que a eficácia do tratamento com o TAM depende do metabolismo da *CYP2D6* controlado pelos polimorfismos da enzima e pelas interações farmacológicas (4,6,9,15-19,26,33,57,58).

Quando administrados por pacientes ML, os pró-fármacos (que requerem biotransformação para serem ativados), com frequência não cumprem o seu papel

terapêutico (16). Schroth *et al.* (2009) em um estudo retrospectivo com 1.325 pacientes evidenciaram uma forte associação entre os polimorfismos da *CYP2D6* e o desfecho clínico não favorável ao tratamento adjuvante do câncer de mama com TAM. Neste estudo, as pacientes ML apresentaram percentual significativamente reduzido de sobrevida livre da doença em comparação aos MR (29 % contra 14,9 % $P=0,005$). Contudo, não houve diferença significativa com relação ao percentual total de sobrevida das pacientes para estes grupos.

Os resultados obtidos no estudo de Lammers *et al.* (2010) com 102 pacientes para avaliar o efeito do fenótipo previsto da *CYP2D6* (considerando a combinação do genótipo e uso de inibidores) no tempo para a progressão do câncer ou na sobrevida total, indicaram uma redução significativa do percentual de sobrevida das pacientes com fenótipo ML em comparação as MR. Apesar dos pacientes ML não apresentarem diferença significativa, tendem a apresentar tempo reduzido para a progressão do câncer em comparação aos MR. Na avaliação exclusiva da co-administração dos inibidores também foi verificada a relação com o pior desfecho clínico em comparação as pacientes que não os utilizavam.

3.3.5.1 Considerações níveis plasmáticos de endoxifeno

Outra área de interesse é a avaliação da concentração plasmática do EDF como uma prerrogativa do fenótipo da *CYP2D6*. Estudos têm demonstrado consistentemente que as concentrações plasmáticas de EDF estão relacionadas com o perfil metabolizador da *CYP2D6* e o desfecho clínico. Neste sentido, Jin *et al.* (2005) publicaram um estudo com 80 pacientes, em que observaram uma redução significativa dos níveis plasmáticos médios de EDF nas pacientes com genótipo ML (20 nM) ou MI (43,1 nM) em comparação aos MR (78 nM). Dentre os indivíduos com

genótipo MR os que utilizavam concomitantemente antidepressivos inibidores da enzima tiveram 58% de redução dos níveis de EDF em comparação aos que não utilizavam (38,6 nM contra 91,4 nM).

Graan *et al.*(2011) conduziram um estudo considerando a genotipagem e a fenotipagem como preditor dos níveis de EDF em 40 pacientes. Os autores encontraram uma correlação significativa ($r = -0,72$ $p < 0.01$) entre os níveis de EDF e do fármaco sonda utilizado para a fenotipagem. Foram encontradas discrepâncias em diversos pacientes entre as concentrações de EDF e os genótipos observados. Apesar das pacientes terem genótipo MR, os níveis de EDF encontrados pertenciam à faixa dos valores 25 % mais baixos de todo o grupo. Desta forma, neste estudo a fenotipagem se mostrou um teste mais confiável em comparação a genotipagem para prever os níveis de EDF. Esse teste contribuiu, segundo os autores, para a personalização e otimização do tratamento com TAM, comprovando a importância da fenotipagem na otimização da terapia do câncer de mama.

Alguns estudos sugerem que a redução dos níveis de EDF estão relacionados a resultados negativos no tratamento, incluindo maior chance de recidivas e mortalidade (6-8,19). Borges *et al.* (2006) avaliaram 158 pacientes e demonstraram fortes evidências da relação entre os polimorfismos da *CYP2D6* e a capacidade de metabolizar o TAM à EDF. Os autores sugerem que as concentrações plasmáticas de EDF, podem impactar na resposta terapêutica, particularmente no tratamento a longo prazo.

Em um estudo com 1.380 pacientes, Madlensky *et al.* (2011) exploraram a associação entre o desfecho no tratamento do câncer de mama e os metabólitos do TAM, além disso examinaram a correlação entre os níveis séricos de EDF, o genótipo da *CYP2D6* e o índice de massa corporal (IMC). Os autores observaram

não haver associação entre os níveis de TAM, HTF, NDT e o desfecho clínico, porém sugerem ser bastante provável que o alcance do resultado terapêutico depende de se alcançar um limiar mínimo na concentração do EDF. Adicionalmente verificou-se que os genótipos ML e MI, alto IMC e baixas concentrações séricas de TAM estão associados com concentrações de EDF abaixo deste limiar.

Irvin *et al.* (2011) avaliaram a viabilidade do ajuste de dose do TAM de acordo com o genótipo da *CYP2D6*. Adicionalmente, verificaram a possibilidade das concentrações séricas de EDF serem ajustadas pela dosagem guiada pela genotipagem em pacientes com genótipo MI. Na avaliação de 190 pacientes utilizando uma dose diária de 20 mg de TAM, a concentração mediana de EDF em MR (34.3 ng mL⁻¹) foi maior em comparação com MI (18.5 ng mL⁻¹) ou ML (4.2 ng mL⁻¹) (P = 0,0045 e P < 0,001, respectivamente). Quando a dose foi aumentada para 40 mg, as concentrações de EDF aumentaram significativamente nos grupos MI e ML (P < 0,001 e P = 0,020), com alteração mediana intrapaciente de + 7,6 ng mL⁻¹ (-0,6 a 23,9 ng mL⁻¹) para MIs e + 6,1 ng mL⁻¹ (2,6 a 12,5 ng mL⁻¹) para ML. Após 4 meses, os níveis de EDF para pacientes MR (dose 20 mg) e MI (dose 40 mg) não apresentaram mais diferença significativa, entretanto mesmo com o aumento das concentrações de EDF em pacientes ML, ainda eram significativamente inferiores aos MI e MR. Os resultados do estudo demonstraram a viabilidade da otimização da dose individual de TAM guiada pela genotipagem, verificando-se que dobrando a dose podia-se aumentar as concentrações de EDF em pacientes MI e ML.

É importante ressaltar, que apesar de já ser discutida na literatura (18), a concentração sérica de EDF relacionada com a eficácia do tratamento ainda não foi completamente estabelecida. Para demonstrar o impacto no desfecho clínico do ajuste de dose do TAM direcionado pelo genótipo, seria necessário a realização de

um estudo prospectivo, randomizado e controlado com diferentes doses de TAM para MIs e possivelmente MLs, em que as concentrações séricas de EDF fossem relacionadas com a avaliação clínica das pacientes.

3.3.5.2 Contrapontos na relação *CYP2D6* e resposta ao TAM

Apesar das fortes evidências relacionando o papel da *CYP2D6* na terapia com o TAM, em quatro estudos retrospectivos não foi observada relação entre o status da *CYP2D6* e a resposta ao TAM (26,45,58-61).

Borges *et al* (2010) sugerem que outros fatores ainda não identificados podem estar envolvidos com a ativação do TAM à EDF, visto que em seu estudo o genótipo e fenótipo da *CYP2D6* houve predição somente de parte da variabilidade dos níveis de EDF (28-38%).

Em um estudo conduzido nos Estados Unidos no ano de 2005 com 162 pacientes, não foi encontrada associação entre os genótipos da *CYP2D6* e o desfecho do tratamento com TAM (59). No mesmo ano, um grupo sueco apresentou resultados contraditórios a tal resultado, onde o alelo variante *CYP2D6*4* estava associado ao risco diminuído de desenvolver a doença (risco relativo = 0,28; $p=0,0089$) (60). Em uma extensão deste estudo com 667 pacientes, os autores reafirmaram o desfecho favorável na sobrevida livre da doença em portadores do alelo *4, em comparação aos homozigotos ou heterozigotos para o alelo funcional da enzima (61). Estes dados conflitantes podem ser justificados com respeito aos critérios de inclusão das pacientes, classificação do tumor e estadiamento da doença, doses e duração do tratamento com o TAM, quimioterapia adicional, falta de testes ER consistentes e número de alelos avaliados (45).

Siegelmann-Danieli *et al.* (2011) conduziram um estudo com 902 pacientes tratados com TAM em média por 4,9 anos e avaliaram o impacto da coadministração de fármacos inibidores da *CYP2D6* na sobrevida livre de doença e na sobrevida global. Cinquenta e nove (6,5%) pacientes usavam inibidores da enzima (duração mediana de 23 meses). A sobrevida livre de doença em três anos não diferiu entre os usuários e não usuários de fármacos que inibem a *CYP2D6* (92,7 vs 93,0%, respectivamente; ajustado $P=0,44$). A sobrevida global em 3 anos foi menor nos pacientes usando os inibidores, 89,4 contra 93,8%, mas após ajuste por idade e comorbidades esta diferença não foi significativa ($P = 0,20$). As taxas de recidiva tumoral total não diferiram entre os grupos, 11,8 % contra 19,0 % ($P = 0,23$). Desta forma, os autores sugerem que a terapia prolongada com TAM concomitante à fármacos que inibem a *CYP2D6* não afeta adversamente o prognóstico do paciente. Entretanto, é importante ressaltar que neste estudo não foi feita qualquer avaliação com relação ao genótipo da *CYP2D6* das participantes.

Em uma revisão da literatura, Brauch *et al.* (2009) sugerem que a farmacogenética dos genes da *CYP2D6* poderia explicar parcialmente a farmacogenômica do TAM. Dessa forma, é importante explorar a contribuição da farmacodinâmica dos genes na avaliação da resistência antiestrógena como uma característica da célula tumoral e na abordagem do papel dos genes associados com a proliferação das células pelo estrogênio. Nesse contexto, é interessante pesquisar como os genes codificadores de ER, seus coativadores, seus corepressores, bem como a resistência dos receptores afetam a resposta ao TAM.

No mesmo sentido, Hoskins *et al.*(2009) concluíram que a identificação da resistência de base genética ao TAM é apenas um primeiro passo na busca para garantir uma terapia anticâncer segura e eficaz. Investigações clínicas e

mecanicistas são crucialmente necessárias para compreender o tratamento do câncer de mama baseado na resistência, e a penetrância da relação gene-fármacos e os métodos ideais de tratamento de pacientes com *CYP2D6* através da resistência mediada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Avaliar o metabolismo do tamoxifeno mediado pela *CYP2D6*, através da genotipagem e fenotipagem da enzima e da avaliação dos níveis de EDF em uma amostra de pacientes em tratamento hormonal adjuvante do câncer de mama.

4.2 Objetivos específicos:

- Desenvolver uma metodologia empregando cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação plasmática do TAM e seus metabólitos HTF, NDT, EDF;
- Desenvolver uma metodologia para a determinação do fenótipo da *CYP2D6* através da quantificação plasmática do fármaco sonda DMT e seu metabólito DTF;
- Determinar as concentrações plasmáticas de TAM, HTF, NDT, EDF e as razões metabólicas [NDT]/[EDF] como indicador da atividade de *CYP2D6*;
- Determinar as frequências dos fenótipos da *CYP2D6* na população estudada;
- Identificar a frequência de alelos relacionados aos polimorfismos da *CYP2D6* na população em estudo;
- Determinar o genótipo da *CYP2D6* na população estudada;
- Analisar qualitativamente a presença plasmática de fármacos inibidores da *CYP2D6*;

- Avaliar a correlação entre genótipo e fenótipo de *CYP2D6* com as razões metabólicas de hidroxilação do NDT e níveis de EDF.

5. MÉTODOS

5.1 Delineamento experimental

Estudo transversal.

5.2 População em Estudo

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC) (número do projeto 09-241).

Foram estudadas 97 pacientes com diagnóstico de câncer de mama em tratamento com tamoxifeno. As participantes foram recrutadas a partir da lista de dispensação do tamoxifeno, obtida na farmácia interna do Hospital Fêmeina de Porto Alegre, no período de janeiro a abril do ano de 2010. Através de contato telefônico, as pacientes foram convidadas a comparecer a ambulatório específico para receberem o esclarecimento sobre a pesquisa. As participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da Pesquisa (Anexo I). Posteriormente, foi aplicada ficha de avaliação e coletada amostra de sangue venoso para realização de análises laboratoriais.

5.3 Escolha dos participantes, critérios de inclusão e exclusão

Foram considerados critérios de inclusão no estudo, ser do sexo feminino com diagnóstico de câncer de mama em qualquer estágio da doença, com tumores

de células receptoras de estrogênio, em tratamento hormonal adjuvante com tamoxifeno por pelo o menos 4 meses. Os critérios de exclusão do estudo foram a presença de doença renal ou hepática de base. O estudo foi realizado com um total de 97 pacientes atendidas no Serviço de Oncologia do Hospital Fêmeina (Grupo Hospitalar Conceição), em Porto Alegre.

5.4. Cálculo do tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho amostral levou-se em consideração o número total de pacientes com câncer de mama em terapia com tamoxifeno atendidas no Hospital Fêmeina em Porto Alegre, sendo $N = 407$, além da média de 9 % da frequência de alelos nulos da *CYP2D6* na população, resultantes em perfil metabolizador lento (Lötsh *et al.* 2009), sendo $P = 0,09$. Considerou-se um intervalo de confiança de 95 % ($z = 1,96$) e erro máximo permissível de 5 % ($e = 0,05$), e $Q = 0,91$ ($1 - P$). O valor foi calculado a partir de equação de amostragem aleatória simples, conforme Mundstock (2005).

$$n_0 = \left(\frac{z^2 * P * Q}{e^2} \right) \qquad n = \left(\frac{N * n_0}{N + n_0} \right)$$

O valor de “n” resultante do cálculo foi de 96 pacientes.

5.5 Coleta dos Dados e Amostra

5.5.1 Ficha de avaliação

Para auxiliar na avaliação da predição do perfil metabolizador foi preenchida ficha de avaliação (Anexo II), com informações que incluem dados como o uso de terapia com outros medicamentos, a data da última menstruação, a presença de

sintomas do climatério e outros possivelmente correlacionados ao tratamento com TAM. Foram avaliados detalhes da presença de receptores de progesterona e de estrogênio, idade e cor/etnia. O nível de adesão ao TAM foi avaliado através da contagem do número de comprimidos utilizados dispensados mensalmente.

5.5.2. Procedimento de coleta das amostras

Para a realização da fenotipagem através da determinação das concentrações plasmáticas de DMT e DTF, as voluntárias, que estavam em jejum de 8 horas, receberam uma dose oral de 33 mg de DMT. Passadas 3 horas da administração do DMT, foi coletada uma amostra de sangue venoso. Foram coletados 12 mL de sangue, através de punção venosa, distribuídos em quatro tubos, um deles contendo anticoagulante heparina e outros três contendo anticoagulante EDTA. O tubo contendo sangue heparinizado e dois tubos contendo EDTA foram imediatamente centrifugados e em seguida, as frações plasmáticas aliqüotadas e armazenadas em tubos de polipropileno de 2 mL em freezer -70 °C até a realização das dosagens de TAM, HTF e EDF, NDT, DMT e DTF, e avaliação qualitativa de inibidores da *CYP2D6*. O segundo tubo contendo sangue com EDTA foi encaminhado ao laboratório de referência para a realização dos ensaios de genotipagem da *CYP2D6*.

5.6 Análises laboratoriais

5.6.1 Genotipagem da CYP2D6

O DNA foi extraído das amostras de sangue total em sistema de extração automatizado Magna Pure Compact® (Roche Diagnósticos). A genotipagem foi

realizada com o kit Luminex xTAG® *CYP2D6* v3 (Luminex), que identifica os alelos: *CYP2D6**1, *2, *35 (funcional) *9, *10, *17, *29, *41 (atividade reduzida), *3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *15 (nulo) e duplicações.

Os genótipos foram classificados de acordo com o sistema de pontuação proposto por Gaedigk *et al.* (2008), no qual os alelos funcionais receberam pontuação 1,0, alelos de atividade reduzida 0,5 e alelos de atividade nula 0. De acordo com a soma da pontuação dos dois alelos as pacientes foram classificadas em: ML (0), MI (0,5); MR-D (1,0 ou 1,5); MR-R (2,0); UR (2,5 ou 3,0) (2).

5.6.2 Determinação de DMT e DTF e fenotipagem da *CYP2D6*

As quantificações plasmáticas do DMT e DTF foram determinadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência CLAE-FL. Para a preparação das amostras de plasma foi realizada a hidrólise enzimática das ligações das formas conjugadas do DTF e DMT com o ácido glicurônico, seguida de técnica de extração líquido-líquido. Em tubos de ensaio de 10 mL com tampa rosca foram adicionados 500 µL de plasma, seguidos de 500 µL de β-glucuronidase 1.000 U/mL, mantidos em banho-maria a 37 °C. Após incubação por 18 horas, as amostras foram adicionadas de 50 µL de padrão interno (codeína 5 µg mL⁻¹), 400 µL de tampão tris pH 10 e 3 mL de metil-*tert*-butil éter. Os tubos foram homogeneizados por 1 minuto e posteriormente centrifugados a 4.000 g por 10 minutos. A fase orgânica foi transferida para novo tubo de ensaio e os analitos re-extraídos com 200 µL de solução aquosa de ácido fosfórico 0,1 %. Após homogeneização por 1 minuto, os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm por 20 minutos e uma fração de 50 µL da fase aquosa foi injetada no sistema CLAE-FL.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa Lichrospher® RP 8ec (250 x 4,6 mm, d.p. 5 µm), mantida a 40 °C durante a análise. A fase móvel foi uma mistura de tampão fosfato pH 6,0 (100 mM) e acetonitrila (75:25, v/v), com vazão inicial de 1,1 mL min⁻¹, passando em 6 minutos a 1,5 mL min⁻¹ e retornando em 19 minutos a vazão inicial. O tempo total de análise cromatográfica foi de 20 minutos. Os cromatogramas foram adquiridos com comprimentos de onda de excitação de 180 nm e emissão de 320 nm. O método foi linear na faixa de 5 a 1000 ng mL⁻¹, com limite de detecção de 2 ng mL⁻¹ para ambos analitos. Os parâmetros precisão e exatidão foram satisfatórios, com CV % intra e inter dias entre 2,8 e 8,9 % e exatidão entre 99,2 e 109,7 %. O rendimento de extração médio dos analitos foi de 86 %.

Para avaliação do fenótipo metabolizador da *CYP2D6*, foram calculadas as concentrações de DMT e DTF através das suas curvas de calibração e posterior estabelecimento das razões [DMT] / [DTF]. Os fenótipos foram classificados em quatro classes, considerando os valores de razões metabólicas [DMT] / [DTF]: ≥ 0,3 ML; 0,3 < MI ≥ 0,03; 0,03 < MR ≥ 0,0003; 0,0003 > UR. Apesar destes valores terem sido estabelecidos para a classificação em amostras de urina, foi observada uma alta correlação $r^2=0,8736$ ($p<0,0001$), com baixo viés (0,023) entre as razões metabólicas nas amostras de urina e plasma, portanto esta classificação pode ser aplicada no contexto do presente estudo (44).

5.6.3 Determinações das concentrações de TAM, HTF, NDT e EDF

As quantificações do TAM e metabólitos foram realizadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Para a preparação das amostras, 2 mL de plasma foram adicionados de 100

μL de padrão interno (verapamil) e 700 μL de tampão tris pH 10. Os analitos foram extraídos com 5,2 mL de mistura de solvente orgânico na proporção 95:5 hexano:propanol (v/v). As fases foram misturadas durante 10 minutos e em seguida separadas por centrifugação a 4.000 g por 10 minutos. A fase orgânica foi transferida para novo tubo de ensaio e os analitos re-extraídos através da adição de 100 μL de solução aquosa de ácido fosfórico 0,1 %. Após homogeneização por 1 minuto, os tubos foram centrifugados a 4.000 g por 20 minutos e uma fração de 50 μL da fase aquosa foi injetada no sistema CLAE-DAD. O método foi linear na faixa de 0,75 a 500 ng mL^{-1} , com limite de detecção de 0,2 ng mL^{-1} para HTF, 0,7 ng mL^{-1} para EDF, 2,0 ng mL^{-1} para NDT e 3,0 ng mL^{-1} para TAM. Os parâmetros precisão e exatidão foram satisfatórios, com CV % intra e inter dias entre 3,2 e 10,5 % e exatidão entre 95,3 e 104,2 %. O rendimento de extração médio para HTF foi 95,8 % EDF 80,5 %, NDT 85,9 % e TAM 75,3 %.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa Hypersil Goldr® (150 x 4,6 mm, d.p. 5 μm), mantida a 30 °C durante a análise. A fase móvel foi uma mistura de tampão trietilamônio 5 mM pH 3,3 e acetonitrila (57:43, v/v), com vazão inicial de 1 mL min^{-1} , passando a 1,3 mL min^{-1} durante o ensaio. O tempo total de análise cromatográfica foi de 16 minutos, com monitoramento em 280 nm.

5.6.4 Análise qualitativa de fármacos inibidores da CYP2D6

A presença de fármacos inibidores da CYP2D6 foi identificada em sistema CLAE-DAD. Para isto, foi realizado protocolo de rastreamento toxicológico, conforme proposto por Pragst *et al.* (2004). As extrações das amostras com metil-*tert*-buril éter foram realizadas em dois procedimentos distintos, um com o ajuste de pH com tampão tris pH 9, para a extração dos componentes de caráter alcalino e outro com

o ajuste de pH com ácido clorídrico 0,1M, para a extração de componentes de caráter ácido. Posteriormente, os extratos foram injetados em sistema CLAE-DAD. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna de fase reversa Lichrospher RP 8ec (250 X 4mm, d.i. 5 μ m) e para a eluição dos compostos uma fase móvel contendo tampão fosfato 50 mM pH 2,3 e acetonitrila, na proporção 63:37. Os cromatogramas foram monitorados em 220 nm. Os analitos foram identificados com base em seus tempos de retenção cromatográfica e pela busca espectral em biblioteca de referência. Foi considerado critério para identificação positiva, um índice de similaridade espectral superior a 0,998, considerando 1 como índice máximo e uma variação no tempo de retenção relativo máxima de 10 %.

5.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS, versão 17.0. Inicialmente foi realizada análise descritiva de todas as variáveis. Para análise dos fenótipos da *CYP2D6*, as frequências das distribuições das razões metabólicas foram estimadas em histograma, descritas como $\log [DMT] / [DTF]$. A avaliação da normalidade da curva de distribuição metabólica foi analisada em teste Kolmogorov-Smirnov.

As razões $[NDT]/[EDF]$ e as concentrações de EDF foram comparadas entre grupos de genótipo e fenótipo e entre os grupos de pacientes utilizando ou não inibidores da *CYP2D6* empregando teste *Kruskal-Wallis*, seguido de teste *Mann-Whitney*. Os grupos de fenótipos e genótipos, razões de hidroxilação NDT/EDF e níveis de EDF foram associados em correlação de Pearson ou Spearman. Da mesma forma, a presença de efeitos adversos foi associada com os níveis de EDF. O poder de predição dos níveis de EDF a partir da genotipagem e fenotipagem foi

avaliado em regressão linear múltipla. Em todas as análises $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.8 Aspectos éticos

As pacientes receberam esclarecimentos com relação ao estudo e somente participaram após terem assinado o termo de consentimento (Anexo II). A administração oral do dextrometorfano não implica em danos à saúde das pacientes, visto que este raramente apresenta efeitos adversos, sendo estes toleráveis, como vertigem ou indisposição gastrointestinal (55). Não houve implicação do estudo sobre o atendimento prestado às pacientes no Serviço de Oncologia do Hospital Fêmeina. A retirada de amostra de sangue venoso não requer procedimento especial e envolve riscos mínimos para os pacientes. Foi garantido às pacientes sigilo em relação às informações obtidas, bem como sua identificação e uso absolutamente restrito para fins de pesquisa científica. Os resultados do estudo serão divulgados somente em reuniões e revistas científicas.

REFERÊNCIAS

1. Teunissen SF, Rosing H, Koornstra RHT, Linnb SC, Schellensc JHM, Schinkel, AH, Beijnen JH. Development and validation of a quantitative assay for the analysis of tamoxifen with its four main metabolites and flavonoids daidzein, genistein and glycitein in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromat B*. 2009; 877:2519-2529.
2. Ahsen NV, Binder C, Brosckmoller J, Oellerich M. *CYP2D6* and tamoxifen: pharmacogenetic reinvention of an established drug? *J Lab Med*. 2009;33(5):1-9.
3. Santana DP, Braga RM, Satrattman R, Albuquerque MM, Bedor DCG, Leal LB. Reversed phase HPLC determination of tamoxifen in dog plasma and its pharmacokinetics after a single oral dose administration. *Quim Nova*. 2008;31(1):47-52.
4. Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH, Skaar T, Storniolo AM, Li L, Araba A, Blanchard R, Nguyen A, Ullmer L, Hayden J, Lemler Z, Weinshilboum RM, Rae JM, Hayes DF, Flockhart DA. *CYP2D6* Genotype, Antidepressant Use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Nac Cancer Inst*. 2005;97(1):30-39.
5. Beverage JN, Sissung T, Sion AM, Danesi R, Figg W. *CYP2D6* polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Scienc*. 2007;96(9):2224-2231.
6. Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A, Jin Y, Storniolo AM, Nikoloff M, Wu L, Hillman G, Hayes DF, Stearns V, Flockhart DA. Quantitative effect of *CYP2D6* genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(1):61-74.

7. Johnson-Thompson MC, Guthrie MPA. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer*. 2000;88:1224-1229.
8. Newman WG, Hadfield KD, Latif A, Roberts SA, Shenton A, McHague C, Laloo F, Howell Evans, SG. Impaired Tamoxifen Metabolism Reduces Survival in Familial Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14(18):5913-5918.
9. Graan AJM, Teunissen SF, de Vos FYFL, Loos WJ, Van Schaik RHN, Jongh FE, Vos A, Van Alphen, RJ, Van der Holt B, Verweij J, Seynaeve C, Beijnen JH, Mathijssen RHJ. Dextromethorphan As a Phenotyping Test to Predict Endoxifen Exposure in Patients on Tamoxifen Treatment. *J Clin Onc*. 2011;29(24):3240-3246.
10. Frank D, Jaehde U, Fuhr, U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for *CYP2D6* phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007;63:321-333.
11. Afshar M, Rouini M, Shahram A. Dextromethorphan metabolic phenotyping in an Iranian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;60:849–854.
12. Prado CM. Desenvolvimento de metodologia para a determinação dos genótipos principais dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*: aplicação na farmacogenética. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo. 2009; 141p.
13. Lotsch J, Rohrbacher M, Schmidt H, Doehring A, Brockmöller J, Geisslinger G. Can extremely low or high morphine formation from codeine be predicted prior to therapy initiation? *Pain*. 2009;144:119-124.
14. Schroth W, Goetz M, Hamma U, Schmidt M, Winter, S, Fritz, P, et al. Association Between *CYP2D6* Polymorphisms and Outcomes Among Women with Early Stage Breast Cancer Treated with Tamoxifen. *JAMA*, 2009;302(13):1429-1436.
15. Dieudonné AS, Lambrechts D, Claes D, Vandorpe T, Wildiers H, Timmerman D, Billen J, Leunen K, Amant F, Berteloot F, Smeets A, Paridaens R, Weltens D, Van Limbergen, E, Van den Bogaert W, Vergote I, Van Huffel S, Christiaens MR, Neven P. Prevalent breast cancer patients with a homozygous mutant status for *CYP2D6*4*: response and biomarkers in tamoxifen users. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;118:531-538.
16. Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS, Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med*. 2002;113(9):746-50.

17. Lammers LA, Mathijssen RHJ, van Gelder T, Bijl MJ, de Graan A-JM, Seynaeve C, van Fessem MA, Berns EMA, Vulto G, van Schaik RHN. The impact of *CYP2D6*-predicted phenotype on tamoxifen treatment outcome in patients with metastatic breast cancer. *Brit J of Cancer*. 2010;103(6):765–771.
18. Madlenski L, Natarajan L, Tchu T, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, Nikoloff DM, Hillman G, Fontecha MR, Lawrence HJ, Parker BA, Wu2 AHB, Pierce JP. Tamoxifen Metabolite Concentrations, *CYP2D6* Genotype, and Breast Cancer Outcomes. *Clin Pharm & Therap*. 2011;89(5):718-725.
19. Irvin WJ, Walko CM, Weck KE, Ibrahin JG, Chiu WK, Dees EC, Moore SG, Olajide, OA, Grahan ML, Canale ST, Raab, RE, Corso SW, Peppercorn JM, Anderson SM, Friedman KJ, Ogburn ET, Desta Z, Flockhart DA, McLeod HL, Evans JP, Carey LA. Genotype-Guided Tamoxifen Dosing Increases Active Metabolite Exposure in Women With Reduced *CYP2D6* Metabolism: A Multicenter Study. *J Clin Onc*. 2011;29(24):3232-3239.
20. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer Statistics, 2011. The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:212–236.
21. De Santis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast Cancer Statistics, 2011. *CA Cancer J Clin*. 2011; published online.
22. Instituto Nacional de Câncer. INCA. Ministério da Saúde. Estimativa [internet]. 2010 [acesso em 2011 Out. 11]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=mapa.asp&ID=13>
23. Salehi F, Turner MC, Phillips KP, Wigle DT, Krewski D, Aronson KJ. Review of the Etiology of Breast Cancer with Special Attention to Organochlorines as Potential Endocrine Disruptors. *J Toxicol and Environ Health*. 2008;11:276–300.
24. Kelsey JL, Gammon MD. The epidemiology of breast cancer. *CA: Cancer J Clin*. 1991;41(3):146-165.
25. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Mark ES. Etiology of Hormone Receptor–Defined Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(10):1558
26. Hoskins JM, Carey LA, McLeod, HL. *CYP2D6* and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9:576-586.
27. Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Rev Brasil Cancerologia*. 2002;48(1):113-31.

28. Barros ACSD, Barbosa EM, Gebrim LH, Anelli A, Figueira Filho A, Del Giglio A, Gusmão CB, Pelizon C, Martella E, Motta E, Fernandes JL, Pinotti JA, Ribeiro LCB, Santos MO, Araújo MB, Abreu e Lima MC, Mourão Neto M, Yamaguchi NH, Carmo PAO, Marques R. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2001;1:1-15.
29. Schwartz GF, Lawrence MBA, Solin J, Olivotto IA, Ernster VL, Pressman PI. The consensus conference on the treatment of in situ ductal carcinoma of the breast. *Breast. Cancer.* 2000;6:4-13.
30. Smith IC, Steven DH, Hutcheon AW, Miller ID, Payne S, Gilbert FJ, Ah-See AK, Eremin O, Walker LG, Sarkar TK, Eggleton SP, Ogston KN. Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: Significantly Enhanced Response With Docetaxel. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1456-1466.
31. Kirjner A, Pinheiro RL. Interferencia da obesidade no tratamento quimioterápico em mulheres com câncer de mama. *Rev Brasil de Cancerologia.* 2007; 53(3):345-54.
32. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Rlimann BT, Senn HJ. Panel members. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Annals of Oncol.* 2009;20:1319–1329.
33. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive Evaluation of Tamoxifen Sequential Biotransformation by the Human Cytochrome P450 System in Vitro: Prominent Roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol and Experiment Therapeut.* 2004; 310 (3):1062-1075.
34. Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF, Paridaens R, Coleman RE, Jones SE, Jassem J, Van de Velde CJH, Delozier T, Alvarez I, Del Mastro L, Ortmann O, Diedrich K, Coates AS, Bajetta E, Holmberg SB, Dodwell D, Mickiewicz E, Andersen J, Lønning PE, Cocconi G, Forbes J, Castiglione M, Stuart N, Stewart A, Fallowfield LJ, Bertelli G, Hall E, Bogle RG, Carpentieri M, Colajori E, Subar M, Ireland E, Bliss JM. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2–3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;369:559–570.
35. Irrarrázaval ME. Tamoxifeno y antidepresivos: ¿Antagonistas en la prevención del cáncer de mama? *Rev Med Chile.* 2011;139:89-99.

36. Mürdter, T.E.; Schroth, W.; Bacchus-Gerybadze, L.; Winter, S.; Heinkele, G.; Simon, W.; Fasching, P.A.; Fehm, T.; German Tamoxifen and AI Clinicians Group, Eichelbaum, M.; Schwab, M.; Brauch, H. Activity Levels of Tamoxifen Metabolites at the Estrogen Receptor and the Impact of Genetic Polymorphisms of Phase I and II Enzymes on Their Concentration Levels in Plasma. *Clinical pharmacology & Therapeutics*. 2011;1-10.
37. Zhu, YB, Zhang Z, Zou JJ, Yu ZX, Xiao DW. Optimizing high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection for quantification of tamoxifen and two metabolites in human plasma: Application to a clinical study. *J Pharm Biom Anal*. 2008; 46:349-355.
38. Grunfeld EA, Hunter MS, Sikka P, Mittal S. Level of adherence was analyzed either as a continuous measure or categorized. Adherence beliefs among breast cancer patients taking tamoxifen. *Patient Education and Counseling*. 2005;59:97–102.
39. Dezentjé VO, Van Blijderveen NJC, Gelderblom H, Putter H, Van Herk-Sukel MPP, Casparie MK, Egberts ACG, Nortier JWR, Guchelaar HJ. Effect of Concomitant *CYP2D6* Inhibitor Use and Tamoxifen Adherence on Breast Cancer Recurrence in Early-Stage Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (14):2423-2429.
40. Borges S, Desta Z, Jin Y, Faouzi A, Robarge JD, Philip S, Nguyen A, Stearns V, Hayes D, Rae JM, Skaar TD, Flockhart DA, Li L. Composite Functional Genetic and Comedication *CYP2D6* Activity Score in Predicting Tamoxifen Drug Exposure Among Breast Cancer Patients. *J Clin Pharmacol*. 2010;50:450-458.
41. Bradford LD. *CYP2D6* allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*. 2002;3:229-243.
42. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 Variants in a Caucasian Population: Allele Frequencies and Phenotypic Consequences. *Am. J. Hum. Genet*. 1997; 60:284-295.
43. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona, C. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20:342-349.
44. Raimundo S.; Toscano C.; Klein K.; Fischer J.; Griese, E.U.; Eichelbaum, M.; Schwab, M.; Zanger, U.M. A novel intronic mutation, 2988G>A, with high

- predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. Clin Pharmacol Ther 2004;76:128–38.
45. Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M, Schwab, M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. Clin Chem. 2009;55:1770-1782.
 46. Kohlrausch, F. B.; Gama, C. S.; Lobato, M. I.; Belmonte-de-Abreu, P.; Callegari-Jacques, S. M.; Gesteira, A.; Barros, F.; Carracedo, Á.; Hutz, M. H. Naturalistic pharmacogenetic study of treatment resistance to typical neuroleptics in European-Brazilian schizophrenics. Pharmacogenetics & Genomics. 2008; 18 (7):599-609.
 47. Hinrichs JW, Looovers HM, Scholten B, Van der Weide J. Semi-quantitative *CYP2D6* gene doses in relation to metabolic ratios of psychotropics. Eur J Clin Pharmacol. 2008;64:979-986.
 48. Jardim DLF, Calabrich AFC, Katz A. Determinação da frequência de polimorfismos de *CYP2D6* em mulheres brasileiras e revisão de literatura. Rev. bras. mastologia. 2010;20(1):15-21.
 49. Bachmann KA. Genotyping and Phenotyping the cytochrome p-450 Enzymes. American J Therapeut, 2002;9(4):309-316.
 50. Linden R, Souto A. Fenotipagem de enzimas metabolizadoras polimórficas e monitoramento terapêutico como uma ferramenta na farmacologia clínica dos antidepressivos tricíclicos, uma revisão. Rev Bras Toxicol. 2005;18(2):131-142.
 51. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, Hayes DF, Desta Z, Flockhart DA. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. J Natl Cancer Inst. 2003;95:1758-1764.
 52. Dale J, Fletcher T, Laven M, Masoner D, Novak D, Gaffey T, Goetz M, O’Kane D, Reynolds C. The Pharmacogenetics of Tamoxifen Therapy. Communiqué. 2007;32(1):1-8.
 53. Stearns V, Rae J. Pharmacogenetics and breast cancer endocrine therapy: *CYP2D6* as a predictive factor for tamoxifen metabolism and drug response? Expert Rev Molecular Med. 2008;10(34) 1-13.
 54. Afshar M, Rouini M, Amini M. Simple chromatography method for simultaneous determination of dextromethorphan and its main metabolites in human plasma with fluorimetric detection. J Chromat B. 2004;802:317-322.

55. Weinbroum AA, Rudick V, Paret G, Ben-Abraham R. The role of dextromethorphan in pain control. *Can J Anesth.* 2000;47(6):585-596.
56. Streetman DS, Bertino JS Jr, Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics.* 2000;10(3):187-216.
57. Klein T, Chang JT, Cho MK, Easton KL, Fergerson MH, Lin Z, Liu Y, Liu S, Oliver DE, Rubin DL, Shafa F, Stuart JM, Altman RB. Integrating Genotype and Phenotype Information: An Overview of the PharmGKB Project. *Pharmacogenom J.* 2001;1:167-170.
58. Siegelmann-Danieli N, Kurnik D, Lomnický Y, Vesterman-Landes J, Katzir I, Bialik M, Loebstein R. Potent *CYP2D6* Inhibiting drugs do not increase relapse rate in early breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125:505–510.
59. Nowell SA, Ahn J, Rae JM, Scheys JO, Trovato A, Sweeney C, *et al.* Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2005;91:249 –58.
60. Wegman P, Vainikka L, Stal O, Nordenskjold B, Skoog L, Rutqvist LE, Wingren S. Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2005;7:284 –290.
61. Wegman P, Elingarami S, Carstensen J, Stal O, Nordenskjold B, Wingren S. Genetic variants of *CYP3A5*, *CYP2D6*, *SULT1A1*, *UGT2B15* and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007; 9:R7.
62. Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The *CYP2D6* activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:234-242.
63. Pragst F, Herzler M, Erxleben BT. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(11):1325-1340.

6. ARTIGO

O presente artigo será submetido ao periódico

Breast Cancer Research and Treatment

ENDOXIFEN LEVELS AND ITS ASSOCIATION WITH *CYP2D6* GENOTYPE AND PHENOTYPE: EVALUATION OF A SOUTHERN BRAZILIAN POPULATION UNDER TAMOXIFEN PHARMACOTHERAPY

Antunes, M.V.*^{1,2}, Linden, R.², Santos, T. V.², Wallemacq, P.³, Haufroid, V.³, Classen, J. F.³, Andreolla, H.⁴, Costa, N.⁴, Fontanive, T.O.¹, Rosa, D. D.^{1,4}.

¹ Pós graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Brazil.

³ Center for Toxicology and Applied Pharmacology, Université Catholique de Louvain, Belgium.

⁴ Hospital Fêmeina, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil.

**Corresponding author:*

dornellesrosa@hotmail.com

Hospital Fêmeina – Grupo Hospitalar Conceição

Rua Mostardeiro, nº 17

Porto Alegre – RS – Brazil

Zip code: 90430-001

Telephone: 55-51- 33145200

Fax: 55-51-33145200

ABSTRACT

Background: An association between *CYP2D6* variation and clinical outcomes among women with breast cancer treated with tamoxifen (TAM) has been demonstrated, such that the presence of 2 functional *CYP2D6* alleles was associated with better clinical outcomes. This association is mainly due the *CYP2D6* mediated hydroxylation of N-desmethyltamoxifen (NDT) to yield endoxifen (EDF), which because of its high antiestrogenic potency, is the main responsible for the therapeutic efficacy of TAM. The aim of this study was to evaluate the relation of *CYP2D6* genotyping and phenotyping with EDF levels and [NDT]/[EDF] metabolic ratio in breast cancer patients from South of Brazil under TAM therapy.

Methods: Trough blood samples were collected from 97 patients. *CYP2D6* genotyping was performed with a Luminex assay and calculation of Genotypic activity scores (GAS). Tamoxifen and metabolites EDF, NDT and 4-hydroxy-tamoxifen (HTF) were measured in plasma by HPLC-PDA. *CYP2D6* phenotyping was performed by determination of dextromethorphan (DMT) and dextrorphan (DTF) by HPLC-FL at plasma collected three hours after oral administration of 33 mg of DMF. Phenotypes were given according to [DMT]/[DTF] metabolic ratio.

Results: *CYP2D6* genotyping indicated a prevalence of 4.1% PM, 4.1% IM, 49.5% EM-S, 39.2% EM-F and 3.1% UM. Genotype (GAS), was significantly correlated with phenotype ([DMT]/[DTF]), with a moderate association ($r_s = -0.463$; $p < 0.001$). Median plasma concentrations (ng mL^{-1}) (N=97) were: TAM 57.17; HTF 1.01; EDF 6.21; NDT 125.50. EDF levels were lower in PMs than in EMs ($p < 0.05$). Phenotype showed stronger, but still moderate, association with EDF and [NDT]/[EDF] than genotype

($r = -0.507$ $r = 0.625$, $p < 0.001$ versus $r = 0.356$ $r = 0.516$, $p < 0.01$). Phenotype accounted for 26% of the variability in EDF levels and 38 % of [NDT]/[EDF], while genotype for 12% and 27 %, respectively.

Conclusion: *CYP2D6* genotyping and/or phenotyping could not fully predict EDF concentrations. Monitoring EDF itself could be considered during TAM therapy.

Keywords: Tamoxifen, endoxifen, *CYP2D6*, genotype, phenotype.

INTRODUCTION

Tamoxifen (TAM) is a non-steroidal modulator of the estrogen receptor (ER), being considered the standard hormonal treatment in breast cancer patients with ER-positive tumors [1-3]. After binding to the receptors in breast tissue, TAM has an antagonistic effect on estrogen, which leads to a reduced proliferation of neoplastic cells [2]. TAM therapy has a significant impact on the survival rates of women with breast cancer, reducing mortality by approximately 31% [4] and recurrences by 50% [5].

In the largest primary metabolic route, the cytochrome P450 enzyme *CYP3A4* converts TAM to N-desmethyl-tamoxifen (NDT). Via *CYP2D6*, NDT undergoes 4-hydroxylation and is converted to the active metabolite (Z)-endoxifen (EDF), which is about 100 times more potent than TAM in suppressing the proliferation of estrogen-dependent cells. *CYP2D6* also catalyzes the metabolism of TAM to 4-hydroxy-tamoxifen (HTF), which, as EDF, presents superior antiestrogen action than TAM. However, HTF mean plasma levels are considerably lower than EDF [1,5,6].

Polymorphisms in the gene encoding *CYP2D6* or environmental factors such as the presence of liver diseases or the use of inhibitors may lead to reduced enzyme activity and consequent decreased EDF levels [3]. Studies suggest that low EDF levels are related to worse prognosis, including a greater chance of recurrence and mortality [6-9].

CYP2D6 genotype may be translated into distinct phenotypes: poor metabolizers (PM) with no enzyme activity; intermediate metabolizers (IM) with residual enzyme activity; extensive metabolizers (EM) with normal enzyme activity and ultra rapid metabolizers (UM) with elevated activity. Depending on whether the EM carries one or two functional alleles, the phenotype for this group can be divided

into EM with homozygous fast activity (EM-F) or heterozygous slow activity (EM-S) [4].

It is well known that there is a large variability in the prevalence of non-functional *CYP2D6* alleles among different ethnicities. Studies demonstrate that about 7-11% of Caucasians [10], 1% of Chinese, Japanese and Koreans, up to 4.8% of Indians, 1-9% of Arabs, 0-19% of black population and 3.2% of Mexicans are PM and affected by an autosomal recessive trace, leading to the absence of enzymatic activity [11].

Recent researches have raised expectations that pharmacogenetic evaluation of *CYP2D6*, associating the genotype and phenotype of the enzyme to the plasma EDF levels, might be a useful tool to identify patients with possibly poor treatment response, and suggesting the need for individual dose adjustment or the use of alternative treatment with aromatase inhibitors in post-menopausal women [12-18].

The purpose of this study was to evaluate the ability to predict TAMs metabolism, through the association of genotype and phenotype of *CYP2D6* with EDF plasma levels, in order to identify patients who may benefit from a higher or lower degree of hormonal treatment. This is the first study conducted in a Southern Brazilian population with purpose of evaluating the metabolism of TAM in a pharmacogenetic context, associating *CYP2D6* genotype, phenotype and EDF levels.

METHODS

Study Population and Data Collection

After approval by institutional review board and ethics committee, a cross-sectional study was performed enrolling patients previously diagnosed with breast

cancer who were taking hormonal therapy with TAM. The 97 participants of the study were recruited between January and April 2010, from the list of patients receiving TAM obtained from the oncology pharmacy service of Fêmima Hospital (Conceição Hospital Group) in the city of Porto Alegre, Brazil. The participants of the study were female patients diagnosed with ER-positive breast cancer at any stage of the disease, in adjuvant treatment with TAM for at least 4 months. The study exclusion criteria were the presence of kidney or liver disease.

After patient consent, a blood sample was drawn for laboratory analysis. The date of initiation of therapy, the hour of the last TAM dose, as well as the age, race (ethnicity), symptoms of menopause and other possible information related to treatment with TAM and co-administration of CYP2D6 inhibitors were recorded. The adherence to TAM was estimated by counting the number of dispensed tablets used monthly, as reported by the patients.

CYP2D6 Genotype

DNA was extracted from EDTA-whole blood samples using the automated extraction system Magna Pure Compact[®] (Roche Diagnostics). Genotyping was performed using the Luminex xTAG[®] CYP2D6 Kit v3 (Luminex Corporation), which identifies the following alleles: normal function (NF) *1, *2, *35; decrease of function (DOF) *9, *10, *17, *29, *41; loss of function (LOF) *3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *15 and duplications, according to the manufacturer instructions. The Luminex xTAG[®] technology, based on the flow cytometry principles, is a multiplex microsphere-based suspension array capable of analyzing 19 CYP2D6 SNPs as well as the presence of gene deletion or duplication in a single well (*Duplication, deletion, -1584C>G, 31G>A, 100C>T, 124G>A, 138insT, 883G>C, 1023C>T, 1659G>A, 1661G>C,*

1707T>del, 1758G>T/A, 1846G>A, 2549A>del, 2613delAGA, 2850C>T, 2935A>C, 2988G>A, 3183G>A and 4180G>C). The amount of DNA engaged in the PCR reaction was standardized at 10 ng/mL. Briefly, the first step of the reaction is a long range multiplex PCR, followed by a multiplex Allele Specific Primer Extension (ASPE). ASPE products are then hybridized with a bead mix and incubated with a reporter solution. A TPersonal Thermocycler (Westburg) was used for the PCR and hybridization reactions. Data were acquired on the Luminex[®] 200[™] Instrument. The data analysis software is the xTAG[®] Data Analysis Software (TDAS) that proposes automatically the final CYP2D6 genotype. Genotypes were classified according to the scoring system proposed by Gaedigk *et al.* (2008) in which NF alleles receive 1.0, DOF alleles 0.5 and LOF alleles 0 points [19]. According to the sum of the alleles, patients were classified as PM (0), IM (0.5), EM-S (1.0 or 1.5), EM-F (2.0); UM (>2.0) [4].

CYP2D6 phenotype

CYP2D6 phenotype was evaluated through the determination of metabolic ratio of the probe drug dextromethorphan (DMT) and its O-demethylated metabolite dextrorphan (DTF). All patients received an oral dose of 33 mg of DMT and a peripheral blood sample was collected three hours after drug intake for DMT and DTF quantitation.

Drug measurements were carried out by high performance liquid chromatograph with fluorescence detection (HPLC-RF). Sample preparation was performed by enzymatic hydrolysis of conjugated forms of DMT and DTF with glucuronic acid, followed by liquid-liquid extraction. Five hundred microliters of plasma were added to 10 mL

screw cap test tubes, followed by 500 μL of β -glucuronidase 1000 U mL^{-1} . This mixture was kept in a water bath at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 18 hours. After incubation, samples were added of 50 μL of internal standard (codeine 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 400 μL of tris buffer pH 10 and 3.0 mL of methyl-*tert*-butyl ether. Tubes were vortex-mixed for one min and then centrifuged at 4,000 g for 10 min. The organic layer was transferred to a clean test tube and the analytes were re-extracted with 200 μL of an aqueous solution of phosphoric acid 0.1 % (v/v). After homogenization and centrifugation, 50 μL of aqueous layer were injected into the HPLC-RF. The chromatographic separation was obtained in a reversed-phase column LiChrospher® RP 8ec (250 x 4.6 mm, id 5 μm), maintained at 40 $^{\circ}\text{C}$. The mobile phase was a mixture of phosphate buffer pH 6.0 (100 mM) and acetonitrile (75:25, v/v), with flow rate ranging from 1.1 to 1.5 ml min^{-1} . Under these chromatographic conditions the total analytical run time was 20 min. Chromatograms were acquired with excitation and emission wavelengths of 180 nm and 320 nm, respectively. The method was linear in the range of 5 to 1000 ng mL^{-1} , with lower limit of detection (LLOD) of 2 ng mL^{-1} for both analytes. Accuracy and precision parameters were adequate with CV % within and between-assay in the range of 2.8 to 8.9 and accuracy of 99.2 – 109.7 %. The average extraction yield was 86 %.

For the evaluation of *CYP2D6* phenotype the concentrations of DMT and DTF were used to determine the [DMT] / [DTF] metabolic ratio. The phenotypes were classified into four classes considering the values of [DMT] / [DTF] metabolic ratio: PM $\geq 0,3$; $0,3 > \text{IM} \geq 0,03$; $0,03 > \text{EM} \geq 0,0003$; $0,0003 > \text{UM}$ [12]. Although these values have been established for the classification in urine samples, previous studies observed a high correlation $r^2=0.8736$ ($p<0.0001$), and a low bias of 0.023 for the

difference between plasma and urine metabolic ratios [20], supporting the application of these classification values in the present study

Determination of TAM, HTF, NDT and EDF

Blood samples to measure TAM and metabolites (N-desmethyldoxifen (NDT), 4-hydroxytamoxifen (HTF) and endoxifen (EDF) were collected from patients between 16 to 24 hours after the last dose intake. The analytes were measured by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). For sample preparation, 2 mL of plasma was added of 100 μL of internal standard (verapamil, 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and 700 μL of Tris buffer pH 10. The analytes were extracted with 5.2 mL of a solvent mixture composed of 95:5 hexane: isopropanol (v/v). The phases were mixed for 10 min and then separated by centrifugation at 4,000 g for 10 min. The organic layer was transferred to a clean test tube and the analytes re-extracted with 100 μL of an aqueous solution of phosphoric acid 0.1 % (v/v). After homogenization and centrifugation, 50 μL of aqueous layer were injected into HPLC-DAD. The chromatographic separation was obtained in a reversed-phase column Hypersil Gold[®] (150 x 4,6 mm, id. 5 μm) maintained at 40 °C. The mobile phase was a mixture of triethylammonium phosphate buffer pH 3.3 (5 mM) and acetonitrile (57:43, v/v) with a flow rate ranging from 1.0 to 1.3 mL min^{-1} . Under these chromatographic conditions, the total analytical run time was 16 min. The chromatograms were monitored at 280 nm. The method was found to be linear in the range of 0.75 to 500 ng mL^{-1} , with a LLOD of 0.2 ng mL^{-1} for HTF, 0.7 ng mL^{-1} for EDF, 2.0 ng mL^{-1} for NDT and 3 ng mL^{-1} for TAM. Accuracy and precision were acceptable with CV % within and between-assay in the range of 3.2 to 10.5 and

accuracy of 95.3 – 104.2 %. The average extraction yield was 80.5 % for EDF, 95.8 % for HTF, 85.9 % for NDT and 75.3 % for TAM.

Screening for CYP2D6 inhibitor drugs

The possible presence of *CYP2D6* inhibitors was assessed by HPLC-DAD according to the systematic toxicological analysis procedure as proposed by Pragst *et al.* (2004) [21].

The extraction of 0.5 mL of plasma sample was performed with methyl-*tert*-butyl ether in two separate procedures, one to extract alkaline components, adjusting the pH with Tris buffer pH 9.0, and another setting pH with 0.1 M hydrochloric acid for the extraction of acidic components. Subsequently, the extracts were injected into the HPLC-DAD system. For chromatographic separation we used a reverse phase column LiChrospher RP 8ec (250 X 4 mm, id 5 µm) maintained at 40 °C. The mobile phase was a mixture of phosphate buffer pH 2.3 (50 mM) and acetonitrile (63:37, v/v) with a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. Chromatograms were monitored at 220 nm with a total analytical run time of 30 min. Relative retention times were calculated with respect to internal standard 5-(4-Methylphenyl)-5-phenyl-hydantoin. The analytes were identified based on their chromatographic retention times and spectral similarities with a comprehensive spectral library. The criteria for identification was a spectral similarity index greater than 0.998, considering 1 as a maximum index, and a relative retention time ±10% (RRT) of the target value.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SPSS version 17.0. Descriptive analysis was initially performed for all variables. For phenotypes analysis, the

frequency of distributions of the metabolic ratios described as $\log_{10} [\text{DMT}]/[\text{DTF}]$ were estimated in a histogram. The evaluation of the distribution curve was examined by Kolmogorov-Smirnov test.

The hydroxylation ratio $[\text{NDT}]/[\text{EDF}]$ and EDF concentrations were compared between genotype and phenotype groups and between groups of patients using or not using *CYP2D6* inhibitors with Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test. Genotypes and phenotypes groups, $[\text{NDT}] / [\text{EDF}]$ metabolic ratios and EDF levels were associated in Spearman or Pearson correlation analysis. Likewise, the presence of adverse effects was associated to EDF concentrations. The predictive power of EDF levels from genotyping and phenotyping was evaluated in multiple linear regression. In all tests $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Patient Characteristics

A total of 97 women using TAM on steady-state were recruited between April and December 2010. Patients started endocrine therapy between January 2004 and April 2010. All women received adjuvant TAM at a dose of 20 mg daily, and were pathologically diagnosed with ER and/or PR-positive cancer. The demographic and clinical characteristics of the patients are listed in Table 1. The median age was 59 years (range 30 to 90 years). Most of the patients were caucasians (85.6 %), with a small representation of other ethnic groups. As expected due to TAM anti-estrogenic effects, hot flashes were the most prevalent side effect of treatment, occurring in 64 % of patients. Four women reported the used of fluoxetine and two of sertraline as

antidepressant agents on a daily basis. All patients were classified as adherent to TAM, since reported the use of 30 tablets monthly.

Table 1. Patients demographic characteristics.

Characteristic	(n=97)
Age (years)	
Median (Percentiles 25-75)	59 (51 – 65)
Range	30 – 90
Race/Ethnicity (n)	
Caucasian	83
Others	14
Tamoxifen duration (months)	
Median (Percentiles 25-75)	24.5 (11 – 40)
Range	(4 – 82)
Receptor (n)	
ER +	94
PR +	90
ER + / PR +	88
Strong <i>CYP2D6</i> inhibitor (n)	
Fluoxetine	4
Paroxetine	2
Weak <i>CYP2D6</i> inhibitor (n)	
Sertraline	2
Venlafaxine	1
Ritonavir	1
Adverse effects (n) yes/no	
Hot flashes	62/35
Vaginal bleeding	11/86
Vaginal discharge	37/60
Vulvar Itching	23/74
Nausea or vomiting	36/61
Dizziness	36/61
Cutaneous rash	9/88
Hydric retention	29/68
Alopecia	30/67
Vision problems	38/59
Thrombosis	9/88

ER +: estrogen receptor positive, PR +: progesterone receptor positive.

CYP2D6 inhibiting drugs

During the systematic toxicological screening, we confirmed the presence of fluoxetine in three samples of patients who had previously reported the use. There was also a positive identification for paroxetine in one plasma sample. With respect to weak *CYP2D6* inhibitors we confirmed the presence of all the drugs self-reported by the patients, sertraline was identified in two samples, venlafaxine and ritonavir in one.

There were no strong or weak inhibitors identified in samples from women who had not reported its use. Surprisingly we did not identify fluoxetine in one and paroxetine in another patient who reported the use, which might suggest an irregular drug intake with possibly a lower impact on TAM metabolism.

CYP2D6 Genotype

We screened 16 different alleles, including multiple copies of the gene and gene deletion. *CYP2D6* alleles and frequencies are listed in Table 2. Alleles scores were given according to Gaedigk *et al.* (2008) activity scoring system, in which null alleles (*3, *4, *5, *6, *7, *8, *11 and *15) received 0 point, dysfunctional alleles (*9, *10, *17, *29, and *41) received 0.5 point and functional alleles (*CYP2D6**1, *2, and *35) received 1 point [19]. The most frequent alleles were *1 (37.8 %), *2 (21.1%) and *4 (18.1%). Considering all tested alleles, 65.9 % were functional, 24.6 % null and 9.5 % were dysfunctional.

Table 2. *CYP2D6* alleles and frequencies.

n	Allele	Activity score	Allele frequency (%)	Activity score frequency (%)
75	*1		37.8	
42	*2	1	21.1	65.9
14	*35		7.0	
1	*17		0.5	
7	*9		3.5	
2	*10	0.5	1.0	9.5
1	*29		0.5	
8	*41		4.0	
4	*3		2.0	
36	*4	0	18.1	24.6
8	*5		4.0	
1	*6		0.5	
199			100	100

Table 3 displays the frequencies of individual *CYP2D6* genotypes and predicted phenotypes, based on alleles scores [4]. Poor metabolizers patients (LOF/LOF alleles, score 0) with deficient enzyme activity represented 4.1 % of the study population. The same prevalence was found for IM patients (LOF/DOF alleles, score 0.5) with slow activity. If NF/LOF patients (alleles, score 1) were included in IM group, as reported in previous works [13,16], the frequency rises up to 41.2 %. However, although the enzyme activity in this case is slightly impaired, this group should not be classified strictly as IM, since it corresponds to a distinct phenotype and genotype [22]. Considering the patients with functional alleles, 49.5 % were classified as EM-S (NF/LOF, DOF/DOF, NF/DOF, alleles score 1 or 1.5), related to moderate/rapid activity, and 39.2 % as EM-F (NF/NF alleles, score 2), with rapid activity. The UM group (NF/NF_{xn} alleles, score >2) represented 3.1% of the patients.

With regard to ethnicity, we found all genotypes in Caucasians except for the *1/*3. Afro-descendants carried the *CYP2D6* *1/*1 (n=3), *1/*2_x (n=2), *2/*3 (n=1),

*2/*4 (n=1), *1/*5 del (n=2) or *1/*41 (n=1). In our study we did not find any individual carrying the low-frequency alleles (*CYP2D6**7, *8, *11 or *15).

Table 3. *CYP2D6* genotypes, predicted phenotypes and frequencies.

n (Genotype)	Alleles phenotype	Score	Activity	Predicted phenotype	n	Frequency (%)
2 (*4/*4) 2 (*4/*4 DUP)	LOF/LOF	0	Deficient	PM	4	4.1
1 (*4*17) 1 (*4/*41) 2 (*5/*41 DEL)	LOF/DOF	0,5	Slow	IM	4	4.1
12 (*1/*4) 6 (*1/*5, DEL) 7 (*2/*4) 2 (*2/*4 DUP) 1 (*1/*3) 1 (*4/*35) 1 (*5/*35, DEL) 2 (*2/*3)	NF/LOF	1				
1 (*3/*35) 1 (*1/*6)			Moderate			
1 (*9/*9) 1 (*17/*29)	DOF/DOF	1		EM-S	48	49.5
2 (*2/*9) 2 (*2/*41) 2 (*1/*41) 1 (*1/*9) 2 (*1/*10) 1 (*9/*35) 1 (*2/*9) 1 (*1/*41)	NF/DOF	1,5	Moderate/ Rapid			
14 (*1/*1) 3 (*2/*35) 11 (*1/*2) 7 (*1/*35) 3 (*2/*2)	NF/NF	2	Rapid	EM-F	38	39.2
3 (*1/*2,DUP)	NF/NF *2	3	Ultra-rapid	UM	3	3.1

DUP: duplication; DEL: deletion; LOF: loss of function; DOF: decrease of function; NF: normal function; PM: poor metabolizer; IM: intermediate metabolizer; EM-S: extensive metabolizer slow activity; EM-F: extensive metabolizer fast activity; UM: ultra-rapid metabolizer.

CYP2D6 Phenotype

Dextromethorphan was well tolerated by all women, without any report of adverse reactions. Subjects were classified according to metabolic ratio [DMT]/[DTF] as follows: 6 (6.2%) PM, 4 (4.1%) IM and 87 (89.7%) EM. A marked difference between EMs, IMs and PMs with respect to the concentrations of DMT and DTF was observed. Considerable amounts of DTF were detected in plasma samples of EMs, while concentrations of DMT were beyond the limit of detection in most of the patients, being quantified in just 5 samples. In these cases, metabolic ratio values were calculated considering DMT concentration as 2 ng mL⁻¹ (LLOD). EM, PM and IM phenotyping status were well differentiated, however, due to analytical limitation related to methods sensitivity, the UM group was not differentiated from EM.

Median (25-75 percentiles) concentrations of DMT and DTF as well as metabolic ratios ranges obtained at 3 h after DMT administration were as follows: DTF (ng mL⁻¹): 12.5 (6.4–17.9) PM, 340.2 (73.9-377.4) IM and 637.5 (528.5–833.2) EM; DMT (ng mL⁻¹): 23.9 (8.5 – 29.6) PM, 11.7 (7.7-17.1) IM and <2.0-10 EM; metabolic ratio 0.512-3.709 for PM; 0.034-0.136 for IM and 0.002-0,019 for EM.

Dextromethorphan metabolic ratio was not normally distributed as assessed by the Kolmogorov-Smirnov test of normality (KS=0.482, p<0.01, n=97). Figure 1 shows the frequency distribution histogram for *CYP2D6* metabolic ratios, described as Log₁₀ [DMT] / [DTF].

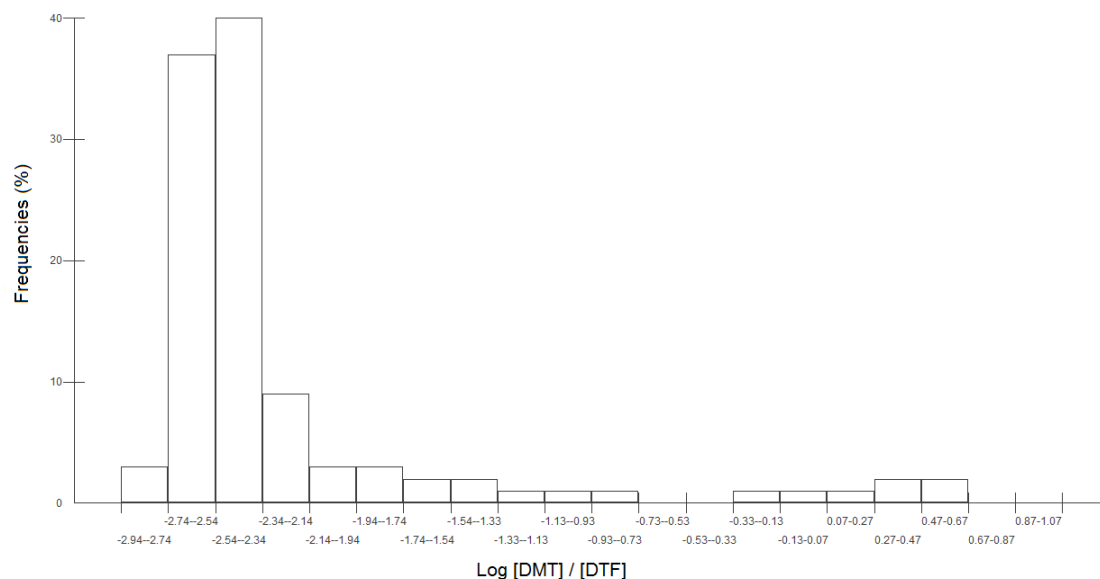
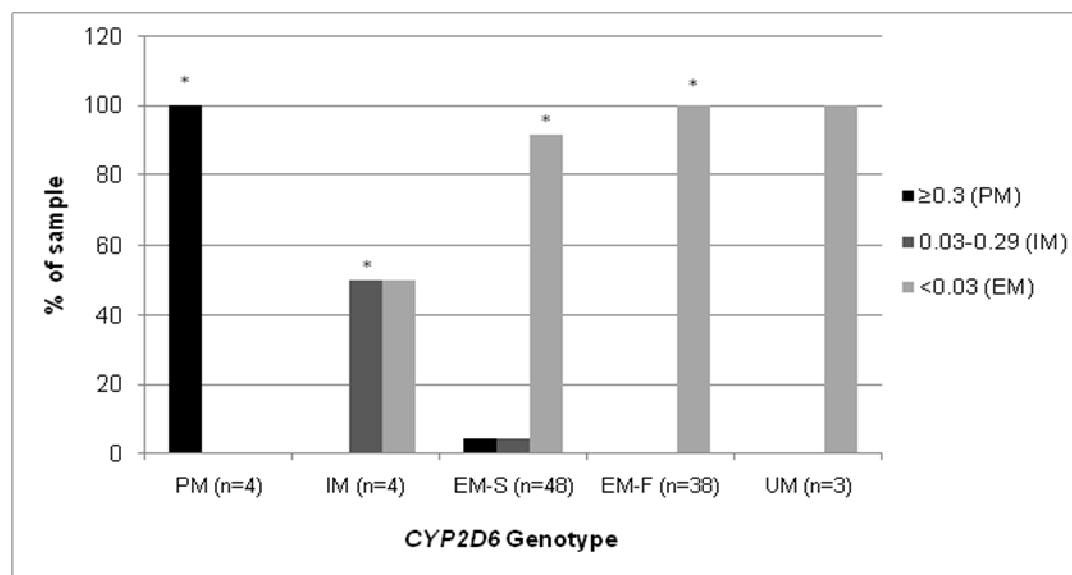


Figure 1. Frequency histogram distribution of *CYP2D6* metabolic ratios, described as $\text{Log}_{10} [\text{DMT}] / [\text{DTF}]$ (n=97).

Association CYP2D6 genotype and phenotype

After identifying distinct phenotype and genotype subgroups within the study population, we analyzed how these groups could be related to each other. Genotype, assessed as *CYP2D6* gene score, was significantly correlated with phenotype assessed by [DMT]/[DTF] ratio, an association considered moderate ($r_s = -0.463$; $p < 0.001$). The association between phenotyping and genotyping results is shown in Figure 2. As expected, the four carriers (100 %) of two null alleles were classified as PMs in both evaluations. Two other women listed in PM phenotype group received genotype classification as EM-S, however it is important to emphasize that one of them was under fluoxetine. There was also discordance between two other patients genetically classified as EM-S, who showed reduced enzyme activity in the phenotype analysis (IM), one of them also was treated by fluoxetine. Additionally, half of the women (n=2) with IM genotype did not present IM phenotype status. With

respect to patients with normal enzyme activity EM-F, there was 100 % of concordance with the EM phenotype classification. Considering that phenotyping failed to differentiate UM from EM, there was no significant association between genotype and phenotype in this group.



*Statistically significant association in Chi-square test ($p < 0,05$)

Figure 2. Association between *CYP2D6* genotype and phenotype.

Plasma concentrations of TAM and its main metabolites

Samples were obtained after the fourth month of adjuvant therapy on the steady-state trough plasma concentrations of TAM and its metabolites. Median plasma concentrations (range) in the whole cohort (N=97) were: TAM 57.07 ng mL⁻¹ (6.42 to 163.99 ng mL⁻¹); HTF 1.01 ng mL⁻¹ (0.39 to 3.57 ng mL⁻¹); EDF 6.21 ng mL⁻¹ (1.24 to 18.05 ng mL⁻¹); NDT 125.50 ng mL⁻¹ (15.29 to 412.47 ng mL⁻¹). Plasma concentrations of EDF were statistically significantly correlated with plasma concentrations of HTF ($r_s = 0.609$, $p < 0,001$). Median concentration of EDF was 6.1-

fold (range, 1.73 to 11.79-fold) higher than that of HTF. The magnitude of this difference was similar to the 6.8-fold previously reported by Jin *et al.* (2005) [1].

Medians and percentiles of genotype and phenotype groups are summarized in Table 4. There was no statistically significant difference of TAM and HTF levels among genotype ($p=0.465$; $p=0.053$) or phenotype ($p=0.162$; $p=0.144$) groups.

Plasma concentrations of EDF were significantly different between genotype ($p=0.002$) groups. Median EDF level was lower in the PM patients compared to either EM-S, EM-F or UM (42 %, 36 % and 33 % of these groups medians, $p<0.05$). Median EDF concentration in IM patients was lower than in EM-F and UM patients (60 % and 65 %, respectively, $p<0.05$). This is reflected by an increase in plasma concentrations of EDF according to the number of functional alleles. The median EDF level were slightly lower in PM subjects in comparison to IM subjects (2.52 ng mL⁻¹ vs 4.17 ng mL⁻¹, respectively), as well as IM subjects in comparison to EM-S subjects (4.17 ng mL⁻¹ vs 5.92 ng mL⁻¹), although with no statistically significance. In regard to phenotype classification, there was a significant difference in median EDF level between groups of enzyme activity ($p<0.001$). Patients with reduced *CYP2D6* activity presented reduced EDF plasma concentrations, PM had the lowest median EDF level (2.25 ng mL⁻¹), followed by IM (4.43 ng mL⁻¹) and EM (6.53 ng mL⁻¹).

Median NDT was superior in PM and IM compared to those with functional alleles ($p<0.001$) as a result of lower hydroxylation ratio in subjects with reduced *CYP2D6* activity. However, there was no statistically significant difference in median concentration of NDT between PM and IM (312.54 ng mL⁻¹ vs 273.23 ng mL⁻¹, $p=0.886$ for genotype; 312.54 ng mL⁻¹ vs 225.58 ng mL⁻¹, $p=0.114$ for phenotype). The Median NDT hydroxylation ratio in PM was approximately 2-fold higher as compared to IM and about 5-fold higher than in carriers of functional alleles (EM-S

and EM-F). Surprisingly EDF levels were only moderately associated to [NDT]/[EDF] ($r=-0.453$, $p<0.001$).

Table 4. Median TAM and metabolites concentrations and hydroxylation ratio according to *CYP2D6* genotype and phenotype.

	N	TAM (ng mL ⁻¹) MD (P25 – P75)	EDF (ng mL ⁻¹) MD (P25 – P75)	HTF (ng mL ⁻¹) MD (P25 – P75)	NDT (ng mL ⁻¹) MD (P25 – P75)	[NDT]/[EDF] MD (P25 – P75)
Genotype						
PM	4	69.83 ^a (14.71-126.41)	2.52 ^a (2.10–3.52)	0.54 ^a (0.41-0.92)	312.54 ^a (173.71-398.79)	108.9 ^d (77.3 – 176)
IM	4	78.91 ^a (73.95-84.69)	4.17 ^{a,b} (3.10–5.76)	0.88 ^{a,b} (0.75-1.01)	273.23 ^a (206.27-358.39)	67.2 ^c (55.9 – 75.3)
EM-S	48	59.80 ^a (37.69-83.70)	5.92 ^{b,c} (4.09–7.87)	0.91 ^{a,c} (0.66-1.48)	135.72 ^b (86.37-220.25)	22.6 ^{a,b} (11.5 – 32.7)
EM-F	38	55.19 ^a (31.49-84.19)	6.90 ^c (4.88–10.0)	1.32 ^{b,c} (0.80-1.8)	106.16 ^b (76.46-152.23)	15.9 ^a (11.5 – 23.0)
UM	3	45.41 ^a (40.18-45.90)	7.52 ^c (7.39–8.08)	1.33 ^{b,c} (0.82-1.68)	83.79 ^b (31.52-153.14)	11.1 ^{a,b} (3.9 – 30.1)
P		0.465	0.002	0.053	<0.001	<0.001
Phenotype						
PM	6	96.31 ^a (31.30-109.18)	2.25 ^a (2.08 – 3.11)	0.64 ^a (0.41-1.16)	312.54 ^a (222.93-403.73)	108.9 ^c (66.2 – 163.5)
IM	4	74.80 ^a (72.01-81.64)	4.43 ^b (3.10 – 5.20)	0.77 ^a (0.67-1.48)	225.58 ^a (206.27-238.08)	54.2 ^b (42.2 – 67.2)
EM	87	55.37 ^a (36.04-81.63)	6.53 ^c (4.63 – 8.71)	1.04 ^a (0.71-1.53)	114.71 ^b (79.83-173.07)	18.5 ^a (11.0 – 26.4)
P		0.162	<0.001	0.144	<0.001	<0.001

P value as Kurskal-Wallis test ($\alpha = 0.05$)

(^{a,b,c} same letter in the column do not differ in Mann-Whitney at 5 % of significance)

A box plot of *CYP2D6* genotypes showed that 100% of PM, 50 % of IM and 33 % of EM-S subjects had EDF levels below 4.67 ng mL⁻¹, the concentration required for 90% ER inhibition (IC₉₀) [23]. In contrast, 82 % of EM-F and 100 % of UM, subjects with fully functional *CYP2D6* activity had plasma metabolite concentrations superior to the IC₉₀. Considering the phenotype evaluation, 100 % of

PM and 75 % of IM were below and 77 % of EM were above the IC₉₀ concentration (Figure 3).

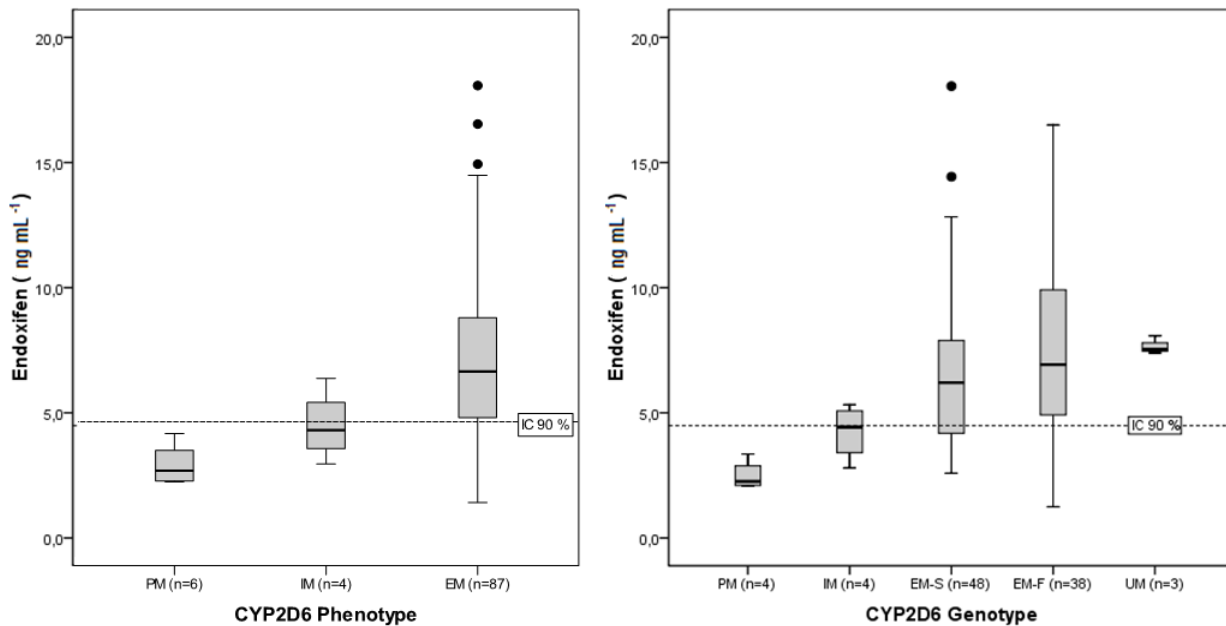


Figure 3. Endoxifen (EDF) levels according to *CYP2D6* phenotypes and genotypes. The data are represented as median, 25% and 75% percentiles, and range.

We also examined the association between the use of strong or weak *CYP2D6* inhibitors (based on toxicological screening criteria) and plasma concentrations of EDF. Surprisingly, there was no statistically significant difference in median EDF level and hydroxylation ratio between patients with wild-type allele taking strong inhibitors (n=4) or not (n=85) (EDF: 4.67 vs 6.40 ng mL⁻¹, p=0.089; [NDT]/[EDF]: 33.89 vs 18.88, p=0.579). A similar observation was made for those taking weak inhibitors (n=4) (EDF: 5.72 vs 6.40 ng mL⁻¹, p=0.727; [NDT]/[EDF]: 23.81 vs 18.88, p=0.84). Also, other factors as age, ethnicity, hot flashes or number of side effects were not significantly associated to EDF exposure (p=0.437; p=0.585;

p=0.578; p=0.609, respectively). These findings might be explained by the relatively small population size in the groups.

Genotype and Phenotype as predictors of EDF levels and hydroxylation ratio

CYP2D6 phenotype, assessed as \log_{10} [DMT]/[DTF], and genotype, assessed as gene score, were both associated to EDF exposure (\log_{10} [EDF]) and NDT hydroxylation ratio (\log_{10} [NDT]/[EDF]) in linear regression. Phenotype showed stronger association with plasma concentrations of EDF and hydroxylation ratio than genotype ($r = -0.507$ and $r = 0.625$, $p < 0.001$ versus $r = 0.356$ and $r = 0.516$, $p < 0.01$), however, the association were still moderate. *CYP2D6* genotype accounted for 12% of the variability in plasma steady-state concentrations of EDF and 27 % of NDT metabolic ratio, while phenotype accounted for 26 % and 38 %, respectively.

Multiple linear regression revealed that *CYP2D6* genotype and phenotype together can predict 26% of EDF plasma levels, nevertheless genotype showed no statistically significance in the test ($p = 0.274$), as did phenotype ($p < 0.001$). Genotype and phenotype performed better in estimating NDT hydroxylation, with prediction power of 42 % of *CYP2D6* metabolic ratio [NDT]/[EDF] ($p < 0.01$ genotype; $p < 0.001$ phenotype).

DISCUSSION

To our knowledge this was the first study evaluating the *CYP2D6* activity on TAM metabolism in a Southern Brazilian population.

The Brazilian population is highly heterogeneous, as a result of a large population mixing from European, African and Amerindian origins. However, this intermixture is uneven across the country, and it is known that the southern population is characterized by a higher density of citizen from European origin than any other Brazilian regions [24]. There are significant ethnic differences with respect to alleles and genotypes frequencies. In our study, the most frequent alleles *CYP2D6* *1 (37.8 %), *2 (21.1%) and *4 (18.1%) were in agreement with those previously reported in Southern Brazilian populations (38.4%–39.2%; 18.2-17.2% and 13.2%-14.5%, respectively) [24,25]. As expected, the prevalence of functional (65.9%), dysfunctional (9.5%) and null alleles (24.6%) are also comparable to those described previously (60.5%, 12.2% and 17.9%, respectively) [25]. These alleles frequencies are as close to Caucasians for functional (71%) and null alleles (26%), however, the prevalence of dysfunctional alleles were about three times higher than the expected for European descendents (3 %) [26].

The most frequent alleles related to slow or deficient enzyme activities in our study were: *CYP2D6**4 (18.1%); *5 (4.0%); *41 (4.0%); *9 (3.5%); *3 (2.0 %); *10 (1%), indicating that the evaluation of these alleles should be considered in further genetic studies within Southern Brazilian populations. We also identified alleles in frequencies lower than 1 % : *6 (0.5%), *29 (0.5%); *17 (0.5%). The frequency of *17 allele was surprisingly low, given that it is highly prevalent in Africans and that our population had Afro-descendent people.

We identified five *CYP2D6* predicted phenotypes, based on gene scores: PM (4.1%), IM (4.1 %), EM-S (49.5%), EM-F (39.2%) and UM (3.1%). The frequencies of PM and EM (EM-S plus EM-F) genotypes matched those reported by Prado *et al.* (2009) (4.1% and 83.1 %), and were slightly lower for IM and UM (both 6.1 %).

Despite the similarity on distribution of null alleles, the prevalence of PM in our study was lower than the prevalence found in Caucasians 7-11%. Due to the European contribution on genetic inheritance of Southern Brazilians, it is reasonable to consider that some of our genotype data are comparable to those reported for Caucasians, although the influence of other ethnicities can justify a number of differences in these groups.

It is noteworthy that genotyping refers to an information for life, while the phenotype is transient. On the other hand genotyping is clinically relevant only when it is able to predict the phenotypic expression [27]. We found a significant, but moderate association ($r_s = -0.463$; $p < 0.001$) between *CYP2D6* genotype and phenotype, reflecting most likely the contribution of environmental factors on enzyme activity, not taken into account in the genetic evaluation. However, in the presence of 2 non-functional alleles, the PM status could be deduced with 99% reliability, therefore, in these cases it was possible to exactly predict the *CYP2D6* PM phenotype by genotyping the patient's DNA without need of phenotyping [28]. Our data support this assumption, in which the four carriers of two null alleles were classified as PMs in both evaluations. However, phenotype prediction for PM (without 2 null alleles) and IM was not as accurate, four patients were genetically classified as EM-S and presented impaired metabolism during phenotype evaluation (at that time 50% of them were ranked as PM and 50% as IM). The use of *CYP2D6* inhibitors might have contributed to these discrepancies, given that two of the patients were concomitantly treated by fluoxetine. In two other patients with functional alleles, the use of strong *CYP2D6* inhibitors did not seem impairing significantly the enzyme activity, as they showed no reduction of activity in phenotypic analysis and were also classified as EM. Two other patients genetically classified as IMs did not present any

significant reduction in enzyme activity and were therefore phenotypically ranked as EM. These findings corroborate to the idea that perfect metabolism prediction is hard to reach with models based either on genotype or phenotype. They merely provide a probabilistic classification that is further influenced by hepatic disease, ethnicity and environmental factors such, co-medication and nutrition, among others [4].

Regarding TAM and its metabolites dosages, median TAM plasma level (57.07 ng mL^{-1}) was consistent with those reported in literature (40 to 183 ng mL^{-1}) [1,29-37]. The wide range of values might be attributed to interindividual pharmacokinetic variability (time of blood drawing, volume of distribution, etc...), or methodological aspects. An adequate sampling should be performed prior the next dose (C_0 or trough level), and we know that TAM peak concentration occurs approximately 5 hours after dosing [29]. However, most of these studies did not provide any information regarding the moment of sampling. As expected, since TAM is metabolized by number of enzymes (not only *CYP2D6*), we found no *CYP2D6* gene association with its levels. Median NDT (125.5 ng mL^{-1}) plasma level was also in accordance to previously reported values ($99.9\text{-}285.6 \text{ ng mL}^{-1}$) [1,24,32,37]. NDT levels were partly associated to *CYP2D6* genetic polymorphism, where impaired metabolism subjects had superior levels than EM and UM. However, NDT median levels in PM were slightly but not significantly higher than in IM, since NDT is not exclusively metabolized by this pathway, in the case of *CYP2D6* reduced metabolism other P450 enzyme may compensate NDT hydroxylation. Likewise, median HTF (1.0 ng mL^{-1}) plasma concentration was also similar to previous ($1.1 \text{ to } 6.5 \text{ ng mL}^{-1}$). The HTF production does not appear to be closely dependent on *CYP2D6* genetic (even though *CYP2D6* is involved), since HTF levels did not diverge between groups of

genotype and phenotype. Indeed, the TAM biotransformation to HTF is also attributed to *CYP3A4*, *2C9*, *2B6*, and *2C19*.

Median EDF plasma concentration (6.2 ng mL⁻¹) was also in good agreement with those reported by others (5.1-12.4 ng mL⁻¹) [1,9,32,35]. However some studies reported higher median concentrations, in a range of 22.9 to 34.3 ng mL⁻¹ [1,6,18], which is probably due to differences in *CYP2D6* genotypes prevalence, and influences of non genetic factors in the populations, as well as methodological aspects that includes sampling time and method selectivity. Median EDF plasma levels as well as metabolic ratio [NDT]/[EDF] differed according to *CYP2D6* gene activity, of which PMs and IMs had lower EDF concentration and superior metabolic ratio than EMs, as a result of diminished hydroxylation ratio in subjects with reduced *CYP2D6* activity. In addition, EDF concentrations in 100% of PMs and 50% of IMs (75% in phenotype classification) were below the IC₉₀, as observed for EM individuals, a higher percentage of EM-S (33%) in comparison to EM-F (18%), were under this threshold. These data corroborate those from Murdert *et al.* (2011) (93% PMs and 56 % IM), underscoring the role of *CYP2D6* deficiency in impaired TAM bioactivation [23].

Despite the differences observed in EDF plasma levels between women with impaired and functional *CYP2D6* activity, we found small or moderate association between EDF levels and *CYP2D6* genotype and/or phenotype. Median EDF concentrations differed between groups, but with many outliers values. As expected, the *CYP2D6* gene score alone was poorly associated with EDF levels ($r= 0.356$) and had moderate association to NDT hydroxylation ratio ($r= 0.516$). Indeed, genotype scores could not satisfactorily predict the variability of plasma EDF concentrations (prediction to the extent of 12%) or its metabolic ratio (prediction to the extent of

26%). As a result of considering the non-genetic aspects on *CYP2D6* activity, phenotyping presented slightly stronger association to EDF levels ($r = -0.507$) and hydroxylation ratio ($r = 0.625$). Additionally phenotype evaluation did not fully predict the variability of neither plasma EDF concentrations (26%) nor metabolic ratio (38%). Borges *et al* (2010), suggested that other unidentified factors must be involved in TAM activation to EDF [38]. In fact, in many studies including ours, *CYP2D6* genotyping and/or phenotyping have been shown to predict only part of the variability in TAM pharmacokinetics (23-38% of EDF levels) (38-68% NDT hydroxylation ratio) [1,9,38]. Therefore, it is important to identify contributors to EDF variability, unrelated to *CYP2D6*.

Murdert *et al.* (2011) in a recent study evaluated the potential role of other cytochromes in the EDF variability. They observed significantly lower plasma levels of EDF in patients carriers of reduced activity alleles (*CYP2C9**2 and *3), but not in [NDT]/[EDF] ratio, thus the authors excluded a direct role of *CYP2C9* in the formation of EDF from NDT, but confirmed the relation to its *in vivo* formation through N-demethylation of HTF, since PM have quantifiable amounts of EDF formed by this alternative via, which is probably responsible for 20 to 30% of total EDF. Furthermore the authors found no association between the *CYP2D6*, *CYP2C19*, and *CYP3A5* variants with EDF. The study indicates that EDF formation is partly affected by *CYP2D6* combined to *CYP2C9*, and that presence of additional contributors is possible [24]. Recently, Gran *et al.* (2011) suggested that the role of *CYP3A* in the formation of EDF might be underestimated, affecting also possibly TAM pharmacokinetic [9].

Our data indicate a higher association between NDT hydroxylation ratio and *CYP2D6* phenotype than between NDT hydroxylation ratio and EDF levels ($r = 0.625$

vs $r=0.453$), reinforcing the idea that the ratio NDT to EDF is a marker of *CYP2D6* activity, but does not take into account other factors or enzymes than *CYP2D6* in the variability of EDF, and cannot fully predict EDF levels.

Low EDF levels are related to worse prognosis in TAM treatment, including a greater chance of recurrences and mortality. [6-9]. In a recent study, Madlensky *et al.* (2011) evaluated 1,380 subjects and suggested that a minimum EDF concentration should be reached to get an adequate therapeutic response [17]. Although the efficacy of TAM is generally not considered dose-dependent, evidences suggest higher doses are required for patients deficient in *CYP2D6* enzyme activity [39] or even if other enzyme affecting its metabolism to EDF. Monitoring of the active metabolite EDF levels could be a way to individualize and optimize dose adjustment and clinical response [23].

An other approach of dose optimization could be obtained through genetic guidance, as illustrated by two fairly recent studies evaluated the feasibility of dose adjustment in IM and PM subjects [18,40]. Kiyotani *et al.* (2012) reported a significant increase in EDF levels of IM subjects, after changing TAM dosage from 20 mg to 30 or 40 mg/daily (depending on allele carrying) and observed that for these subjects the new TAM doses were likely to be sufficient to achieve similar plasma levels of active metabolites to those of the patients with two wild-type alleles. This study did not provide any information on PM patients absent in their population studied. Irvin *et al.* (2011) published similar data, with baseline EDF concentrations in PM and IM patients significantly lower than in EM, but similar to EM 4 months after TAM dose adjustment (from 20 to 40 mg/daily). However, these studies demonstrating the feasibility of genotype-driven dosing of TAM for IM, concluded also to a probable lack of efficacy to reaching sufficient EDF plasma concentration in PM patients. Kiyotani

et al. (2012) postulated that since EM-S subjects (who carry at least one decreased-function allele or one null allele) still have a certain level of enzymatic activity, dose adjustment could also be beneficial. None of the studies observed any toxicity due to the increased TAM dosage. Kiyotani, *et al* (2012) did not observe any significant difference in the incidence of adverse events before and after the dose adjustment. Irvin *et al.* related one episode of grade 3 vaginal bleeding (endometrial biopsy negative for carcinoma) and no difference in hot flashes. It is important to emphasize that these are preliminary studies and the relation between dose adjustment and side effects must still be confirmed. To demonstrate the impact of TAM dose adjustment on clinical outcome, it would be necessary to perform prospective, randomized, controlled trials with different doses of TAM for IM and EM-S and possibly to PM, in which EDF concentrations were related to clinical aspects of the patients. These clinical trials would support such a change in clinical practice and are indispensable before this change is advocated.

In conclusion, our data indicates that neither *CYP2D6* genotype or phenotype, nor NDT hydroxylation ratio, can fully predict EDF levels, considered as a marker of efficacy. These findings suggest that EDF levels are most likely influenced by other factors than *CYP2D6* activity, and that the drug monitoring of EDF concentrations could be superior than *CYP2D6* genotype and/or phenotype to identify patients requiring higher TAM doses, or even those considered as non-responder and who should be treated by other therapies. However, taking into account the duration of about 4 months to reach steady state concentrations (also after any dose change) and to justify the EDF measurement, a genetic *CYP2D6* evaluation prior onset of hormonal adjuvant treatment would already identify the PM

post-menopausal patients for whom prescription of aromatase inhibitors should be considered instead of TAM.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Universidade Feevale for financial support.

ETHICAL STANDARDS

The experiments comply with the current laws of Brazil and were performed after approval by institutional review board.

REFERENCES

1. Jin, Y.; Desta, Z.; Stearns, V.; Ward, B.; Ho, H.; Lee, K. H.; Skaar, T.; Storniolo, A. M.; Li, L.; Araba, A.; Blanchard, R.; Nguyen, A.; Ullmer, L.; Hayden J.; Lemler, Z.; Weinshilboum, R. M.; Rae, J. M.; Hayes, D. F.; Flockhart, D. A. *CYP2D6* Genotype, Antidepressant Use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Nat Cancer Inst.* 2005;97(1):30-39.
2. Santana, D. P.; Braga, R. M.; Satrattman, R.; Albuquerque, M. M.; Bedor, D. C. G.; Leal, L. B. Reversed phase HPLC determination of tamoxifen in dog plasma and its pharmacokinetics after a single oral dose administration. *Quim Nova.* 2008;31(1):47-52.
3. Teunissen, S. F.; Rosing, H.; Koornstra, R. H. T.; Linnb, S.C.; Schellensc, J.H.M.; Schinkel, A.H.; Beijnen, J. H. Development and validation of a quantitative assay for the analysis of tamoxifen with its four main metabolites and flavonoids daidzein, genistein and glycitein in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromat B.* 2009;877:2519-2529.
4. Ahsen, N. V.; Binder, C.; Brosckmoller, J.; Oellerich, M. *CYP2D6* and tamoxifen: pharmacogenetic reinvention of an established drug? *J Lab Med.* 2009;33(5):1-9.
5. Beverage, J. N.; Sissung, T.; Sion, A. M.; Danesi, R.; Figg, W. *CYP2D6* polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Scienc.* 2007;96(9):2224-2231
6. Borges, S.; Desta Z.; Li, L.; Skaar, T. C.; Ward, B. A.; Nguyen, A.; Jin, Y.; Storniolo, A. M.; Nikoloff, M.; Wu, L.; Hillman, G.; Hayes, D.F.; Stearns, V.; Flockhart, D. A. Quantitative effect of *CYP2D6* genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80(1):61-74.
7. Johnson-Thompson M. C.; Guthrie, M. P. A. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer.* 2000;88:1224-1229.

8. Newman, W. G.; Hadfield, K. D., Latif A.; Roberts, S. A.; Shenton, A.; McHague, C.; Lalloo, F; Howell; Evans, S. G. Impaired Tamoxifen Metabolism Reduces Survival in Familial Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2008;14(18):5913-5918.
9. Graan, A. J. M.; Teunissen, S. F.; de Vos, F.Y.F.L.; Loos, W. J ; Van Schaik, R. H. N.; Jongh, F. E.; Vos, A.; Van Alphen, R. J.; Van der Holt, B.; Verweij, J.; Seynaeve, C.; Beijnen, J. H.; Mathijssen, R. H. J. Dextromethorphan As a Phenotyping Test to Predict Endoxifen Exposure in Patients on Tamoxifen Treatment. *J Clin Onc.* 2011;29(24):3240-3246.
10. Frank, D.; Jaehde, U.; Fuhr, U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for *CYP2D6* phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63:321-333.
11. Afshar, M., Rouini, M., Shahram,A. Dextromethorphan metabolic phenotyping in an Iranian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;60:849–854.
12. Lotsch, J.; Rohrbacher, M.; Schmidt, H.; Doehring, A.; Brockmöller, J.; Geisslinger, G.Can extremely low or high morphine formation from codeine be predicted prior to therapy initiation? *Pain.* 2009;144:119-124.
13. Schroth W.; Goetz, M.; Hamma, U.; et al. Association Between *CYP2D6* Polymorphisms and Outcomes Among Women with Early Stage Breast Cancer Treated with Tamoxifen. *JAMA,* 2009;302(13):1429-1436.
14. Dieudonné, A. S.; Lambrechts, D.; Claes, D.; Vandorpe, T.; Wildiers, H.; Timmerman, D.; Billen, J.; Leunen, K.; Amant, F.; Berteloot, F.; Smeets, A.; Paridaens, R.; Weltens, D.; Van Limbergen, E.; Van den Bogaert, W.; Vergote, I.; Van Huffel, S.; Christiaens, M.R.; Neven, P. Prevalent breast cancer patients with a homozygous mutant status for *CYP2D6**4: response and biomarkers in tamoxifen users. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;118:531-538.
15. Rogers J. F., Nafziger, A. N., Bertino, J. S.; Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med.* 2002;113(9):746-50.
16. Lammers, L.A., Mathijssen, R. H. J.; van Gelder, T.; Bijl, M. J.; de Graan, A-J. M.; Seynaeve, C.; van Fessem, M. A.; Berns, E. M. A.; Vulto, G.; van Schaik, R. H.

- N. The impact of *CYP2D6*-predicted phenotype on tamoxifen treatment outcome in patients with metastatic breast cancer. *Brit J of Cancer*. 2010;103(6):765–771.
17. Madlenski L.; Natarajan, L.; Tchu, T.; Pu, M.; Mortimer, J.; Flatt, S. W.; Nikoloff, D. M.; Hillman, G.; Fontecha, M. R.; Lawrence, H. J.; Parker, B. A.; Wu2 and, A. H. B.; Pierce, J. P. Tamoxifen Metabolite Concentrations, *CYP2D6* Genotype, and Breast Cancer Outcomes. *Clin Pharm & Therap*. 2011;89(5):718-725.
18. Irvin W.J.; Walko, C. M.; Weck, K. E.; Ibrahin, J. G.; Chiu, W. K.; Dees, Genotype-Guided Tamoxifen Dosing Increases Active Metabolite Exposure in Women With Reduced *CYP2D6* Metabolism: A Multicenter Study. *J Clin Onc*. 2011;29(24):3232-3239.
19. Gaedigk, A.; Simon, S. D.; Pearce, R. E.; Bradford, L. D.; Kennedy, M. J.; Leeder, J. S. The *CYP2D6* activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ter*. 2008;83:234-242.
20. Raimundo S.; Toscano C.; Klein K.; Fischer J.; Griese, E.U.; Eichelbaum, M.; Schwab, M.; Zanger, U.M. A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76:128–38.
21. Pragst, F.; Herzler, M.; Erxleben, B. T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(11):1325-1340.
22. Brauch, H.; Mürdter, T. E.; Eichelbaum, M.; Schwab, M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin Chem*. 2009; 55:1770-1782
23. Mürdter, T.E.; Schroth, W.; Bacchus-Gerybadze, L.; Winter, S.; Heinkele, G.; Simon, W.; Fasching, P.A.; Fehm, T.; German Tamoxifen and AI Clinicians Group, Eichelbaum, M.; Schwab, M.; Brauch, H. Activity Levels of Tamoxifen Metabolites at the Estrogen Receptor and the Impact of Genetic Polymorphisms of Phase I and II Enzymes on Their Concentration Levels in Plasma. *Clinical pharmacology & Therapeutics*. 2011:1-10.

24. Kohlrausch, F. B.; Gama, C. S.; Lobato, M. I.; Belmonte-de-Abreu, P.; Callegari-Jacques, S. M.; Gesteira, A.; Barros, F.; Carracedo, Á.; Hutz, M. H. Naturalistic pharmacogenetic study of treatment resistance to typical neuroleptics in European-Brazilian schizophrenics. *Pharmacogenetics & Genomics*. 2008;18(7):599-609.
25. Prado, C. M. Desenvolvimento de metodologia para a determinação dos genótipos principais dos genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*: aplicação na farmacogenética. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo. 2009;141p.
26. Bradford, L. D. *CYP2D6* allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*. 2002;3:229-243.
27. Linden, R.; Souto, A. Fenotipagem de enzimas metabolizadoras polimórficas e monitoramento terapêutico como uma ferramenta na farmacologia clínica dos antidepressivos tricíclicos, uma revisão. *Rev Bras Toxicol*. 2005;18(2):131-142.
28. Zanger U.M. The CYP2D subfamily. In: Ioannides C, ed. *Cytochromes P450: role in the metabolism and toxicity of drugs and other xenobiotics*. London: Royal Chemical Society; 2008; 241–75.
29. Furr, B. J. A.; Jordan, V. C. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen; *Pharmacol. Ther.* 1984;25:127-5.
30. Dowsett M, Cuzick J, Howell A, Jackson I, and the ATAC Trialists' Group. Pharmacokinetics of anastrozole and tamoxifen alone, and in combination, during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer in postmenopausal women: a sub-protocol of the 'Arimidex™ and Tamoxifen Alone or in Combination' (ATAC) trial. *Br J Cancer* 2001;85:317–24.
31. Hutson PR, Love RR, Havighurst TC, Rogers E, Cleary JF. Effect of exemestane on tamoxifen pharmacokinetics in postmenopausal women treated for breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:8722–8727.
32. Lee KH, Ward BA, Desta Z, Flockhart DA, Jones DR. Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to a clinical trial. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;791:245–253.

33. Sheth HR, Lord G, Tkaczuk K, Danton M, Lewis LM, Langenberg P, et al. Aging may be associated with concentrations of tamoxifen and its metabolites in breast cancer patients. *J Womens Health (Larchmt)* 2003;12:799–808.
34. Lim HS, Ju LH, Seok LK, Sook LE, Jang IJ, Ro J. Clinical implications of *CYP2D6* genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:3837–3845.
35. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95:1758–1764.
36. Gjerde J, Hauglid M, Breilid H, Lundgren S, Varhaug JE, Kisanga ER, et al. Effects of *CYP2D6* and *SULT1A1* genotypes including *SULT1A1* gene copy number on tamoxifen metabolism. *Ann Oncol* 2008;19:56–61.
37. Kisanga, E. R.; Gjerde, J.; Guerrieri-Gonzaga, A.; Pigatto, P.; Pesci-Feltri, A.; Robertson, C.; Serrano, D.; Pelosi, G.; Decensi, A.; Lien, E. A. Tamoxifen and Metabolite Concentrations in Serum and Breast Cancer Tissue during Three Dose Regimens in a Randomized Preoperative Trial. *Clin Cancer Res.* 2004;10:2336–2343.
38. Borges, S.; Desta, Z.; Jin, Y.; Faouzi, A.; Robarge, J.D.; Philip, S.; Nguyen, A.; Stearns, V.; Hayes, D.; Rae, J.M.; Skaar, T.D.; Flockhart, D.A.; Li, L. Composite Functional Genetic and Comedication *CYP2D6* Activity Score in Predicting Tamoxifen Drug Exposure Among Breast Cancer Patients. *J Clin Pharmacol.* 2010;50:450-458.
39. Hoskins, J. M.; Carey, L. A.; McLeod, H. L. *CYP2D6* and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2009;9:576-586.
40. Kiyotani, K.; Imamura, C.K.; Tanigawara, Y.; Hosono, N.; Kubo, M.; Sasa, M.; Nakamura, Y.; Zembutsu, H. Dose-adjustment study of tamoxifen based on *CYP2D6* genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;131:137–145.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Os alelos mais frequentes na população foram *CYP2D6**1 (37,8 %), 2 (21,1%) e *4 (18,1%).
- Foi verificada a prevalência dos genótipos da *CYP2D6*: 4,1 % ML, 4,1 % MI, 49,5 % MR-D, 39,2 % MR-R e 3,1 % UR .
- As pacientes foram classificadas de acordo com o fenótipo da *CYP2D6* em: 6,2% ML, 4,1 % MI e 89,7 MR.
- A genotipagem e fenotipagem apresentaram associação significativa ($r_s = -0.463$, $p < 0,001$).
- As medianas das concentrações plasmáticas do tamoxifeno e metabólitos em toda a corte (N=97) foram: TAM 57,17 ng mL⁻¹; HTF 1,01 ng mL⁻¹; EDF 6,21 ng mL⁻¹; NDT 125,50 ng mL⁻¹.
- As pacientes ML e MI apresentaram níveis reduzidos de EDF em comparação aos MR e UR.
- Cem por cento das pacientes com fenótipo *CYP2D6* ML e 75 % das MI apresentaram concentrações de EDF abaixo da concentração inibitória de 90% dos receptores de estrogênio, ao passo que 77 % das EM estavam acima deste limiar.
- A genotipagem da *CYP2D6* teve associação significativa, porém baixa, com os níveis de EDF ($R = 0,356$, $P < 0.01$) e moderada com a razão de hidroxilação [NDT]/[EDF] ($r = 0,516$, $p < 0.01$).
- A fenotipagem, por considerar fatores ambientais além dos genéticos, apresentou correlação superior ao genótipo com níveis de EDF e razão de hidroxilação, porém ainda moderados ($r = -0,507$ e $r = 0,625$, respectivamente).
- A genotipagem e/ou fenotipagem da *CYP2D6*, bem como as razões de hidroxilação [NDT]/[EDF] não foram capazes de prever completamente os níveis de EDF, é importante, portanto, considerar a influência de outros fatores além da *CYP2D6* na ativação do TAM à EDF.

ANEXO I

Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em reunião extraordinária realizada em 24 de março de 2010, analisou o seguinte projeto de pesquisa:

Projeto: 09-241

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

HUANDER FELIPE ANDREOLLA
RAFAEL LINDEN
REJANE GIACOMELLI TAVARES
MARINA VENZON ANTUNES
DANIELA DORNELLES ROSA


Título: Estudo farmacogenético do perfil metabolizador do tamoxifeno: avaliação genotípica e fenotípica de CYPD6.

Documentação: Aprovados
Aspectos Metodológicos: Aprovados
Aspectos Éticos: Aprovados

Parecer final: Este projeto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.

Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC, bem como os Eventos Adversos ocorridos. O Pesquisador compromete-se a encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e/ou final ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e ao Centro de Resultado onde a pesquisa for desenvolvida.

Porto Alegre, 12 de abril de 2010.


Vitto Giancristoforo dos Santos
Coordenador do CEP

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PESQUISA: Estudo farmacogenético do perfil metabolizador do Tamoxifeno: avaliação genotípica e fenotípica de CYP2D6

FICHA # _____

PACIENTE _____

Prezada Sra.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar variações genéticas ou ocasionadas pelo uso de medicamentos que interferem no metabolismo do tamoxifeno, o que pode levar à ineficiência do tratamento com este medicamento. Como a Sra. tem câncer de mama e realiza tratamento com o tamoxifeno, gostaríamos de convidá-la para participar do estudo. Caso aceite, após realizarmos o registro de suas informações médicas, você receberá uma dose oral de 33 mg de dextrometorfano, seguida de coleta de sangue venoso (12 mL de sangue) passadas 3 horas da administração do medicamento. Com a amostra de sangue, faremos a verificação se há a presença de alteração genética que implique na metabolização inadequada do tamoxifeno, além de verificar através da dosagem do dextrometorfano como é o comportamento do metabolismo do grupo enzimático, que também é responsável pelo metabolismo do tamoxifeno.

A assinatura desse consentimento informado dará autorização aos pesquisadores do estudo de utilizarem os dados obtidos somente para fins científicos, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a identidade dos pacientes.

Eu, _____ fui informado (a) dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre os procedimentos diagnósticos e tratamento aos quais serei submetido(a), ressaltando que fui suficientemente informado de que minha participação neste estudo não ocasionará qualquer alteração em meu tratamento quimioterápico. Declaro que fui suficientemente esclarecido que: A) O estudo será realizado a partir da coleta de amostra de sangue, para posterior análise dos mesmos. B) Que não haverá riscos à minha saúde, podendo, entretanto, haver desconforto em função da punção venosa e devido a ingestão do dextrometorfano, em casos raros, presença de efeitos adversos brandos, como vertigem ou indisposição gastrointestinal. C) Que poderei consultar os pesquisadores responsáveis em qualquer época pessoalmente ou por telefone, para esclarecimento de qualquer dúvida. D) Que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar dessa pesquisa, que não precisarei apresentar quaisquer justificativas para isso, e caso deixe o estudo, não terei prejuízos no atendimento por esta instituição. E) Que todas as informações por mim fornecidas e/ou resultados

obtidos serão mantidos em sigilo e que, estes somente serão utilizados para divulgações em reuniões e revistas sem a minha identificação. F) Que serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato de mudar o meu consentimento em participar da pesquisa. G) Que não terei quaisquer benefícios e/ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. H) Todos os custos relacionados a exames diagnósticos serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

O profissional Dr^a. _____ certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial. Em caso de dúvidas, poderei contatar _____, no telefone _____, ou através do email _____, para esclarecimentos.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

Assinatura do paciente: _____

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 20____.

OBS: Este termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário (a) ou seu representante legal e a outra, ao pesquisador responsável.

ANEXO III

Ficha de avaliação

Código de identificação da paciente:

Data de nascimento:

Cor:

Estado civil:

Escolaridade:

Idade da menarca:

Idade da menopausa:

Número de anos em menopausa:

Paridade:

Idade do primeiro parto:

Uso prévio de anticoncepcional:

Uso prévio de terapia de reposição hormonal:

História familiar de câncer:

Tabagismo:

Uso de bebida alcoólica:

Nível de atividade física:

Presença de co-morbidades:

Doença cardíaca

Diabete mérito

Doença vascular cerebral

Doença respiratória

Patologia do tumor:

- tamanho:

- tipo histológico (ductal invasor, lobular invasor, carcinoma não especificado, doença de Paget ou outro)

- grau histológico (1, 2 ou 3):

- receptores de estrogênio:

- receptores de progesterona:

- c-erbB2
- linfonodos axilares:
- metástases à distância:

Estadiamento clínico: T N M

Cirurgia:

- Mastectomia radical modificada:
- Setorectomia:
- Linfonodo sentinela:
- Esvaziamento axilar:

Quimioterapia:

- Neoadjuvante (esquema com doses e datas)
- Adjuvante (esquema com doses e datas)
- Paliativa (esquemas com doses e datas)

Hormonioterapia:

- Tamoxifen (data de início)
- Número de comprimidos utilizados/mês:

Uso de inibidores da *CYP2D6*:

- citalopram
- fluoxetina
- paroxetina
- venlafaxina
- bupropiona
- duloxetina
- terbinafrina
- quinidina
- amiodarona
- difenidramina
- clorpromazina
- haloperidol
- celecoxib
- cimetidina

- clomipramina
- cloranfenicol
- metoclopramida
- metadona
- ranitidina
- ritonavir
- imipramina
- levomepromazina

Uso de indutores da *CYP2D6*:

- glutetimida
- carbamazepina
- dexametasona
- rifampicina

Efeitos adversos do tamoxifeno:

- ondas de calor (fogachos)
- sangramento vaginal
- corrimento vaginal
- prurido vulvar
- náuseas
- vômitos
- tonturas
- erupção cutânea
- retenção hídrica
- alopecia
- distúrbios visuais
- eventos tromboembólicos

ANEXO IV

Genotipagem CYP2D6			Fenotipagem CYP2D6			Tamoxifeno e metabólitos				
Alelos	Escore alelos	Genótipo	Dextrorfano (ng/mL)	Dextrometorfano (ng/mL)	Razão DMT/DTF	Endoxifeno (ng/mL)	OH-tamoxifeno (ng/mL)	Desmetiltamoxifeno (ng/mL)	Tamoxifeno (ng/mL)	Razão NDT/EDF
*4/*4	0	ML	16.72	23.8	1.4245	2.11	0.40	142.51	6.42	67.5044514
*4/*4	0		18.37	41.9	2.2798	2.07	0.42	412.47	135.19	198.8412453
*4/*4, DUP	0		6.62	24.5	3.7090	2.41	0.66	267.30	39.60	111.0151935
*4/*4, DUP	0		10.48	8.4	0.8058	3.35	1.01	357.78	100.06	106.8062566
*4/*17	0.5	MI	345.44	11.7	0.0337	4.02	0.74	217.04	73.86	53.9437145
*4/*41	0.5		371.90	19.2	0.0517	2.80	0.81	202.68	83.62	72.4420932
*5/*41, DEL	0.5		515.66	10.0	0.0194	4.83	0.96	368.05	74.20	76.2013344
*5/*41, DEL	0.5		392.39	2.0	0.0051	5.32	1.03	329.42	85.05	61.9279185
*1/*4	1	MR-D	770.44	2.0	0.0026	6.53	0.80	145.03	67.23	22.2152503
*1/*4	1		631.82	2.0	0.0032	10.86	1.15	114.71	73.99	10.5584233
*1/*4	1		986.72	2.0	0.0020	4.53	0.65	28.05	49.89	6.1845731
*1/*5, DEL	1		656.55	2.0	0.0030	7.12	1.48	122.27	92.11	17.1819588
*9/*9	1		201.76	2.0	0.0099	2.85	0.39	21.35	16.08	7.4923304
*1/*4	1		293.09	2.0	0.0068	3.82	0.56	55.45	28.59	14.5296451
*2/*4	1		845.20	2.0	0.0024	8.38	0.87	339.56	125.31	40.5345247
*1/*3	1		424.70	2.0	0.0047	6.21	0.73	230.86	93.10	37.1957958
*4/*35	1		889.11	2.0	0.0022	4.70	0.82	130.18	36.04	27.6751499
*2/*4	1		553.59	2.0	0.0036	4.93	0.69	161.30	49.96	32.7212387
*5/*35, DEL	1		515.89	2.0	0.0039	8.29	1.35	231.57	63.43	27.9465074
*1/*4	1		620.80	2.0	0.0032	7.78	0.73	173.08	55.79	22.2357550
*1/*5, DEL	1		667.62	2.0	0.0030	2.59	1.49	15.29	40.53	5.9107247
*2/*3	1		577.66	2.0	0.0035	4.40	1.57	144.08	57.07	32.7762329
*1/*5, DEL	1		621.43	2.0	0.0032	12.83	1.61	102.98	87.43	8.0275843
*1/*41	1		616.21	2.0	0.0032	4.03	2.12	268.05	86.63	66.5780422

Alelos	Escore alelos	Dextrorfanos (ng/mL)	Dextrometorfano (ng/mL)	Razão DMT/DTF	Endoxifeno (ng/mL)	OH-tamoxifeno (ng/mL)	Desmetiltamoxifeno (ng/mL)	Tamoxifeno (ng/mL)	Razão NDT/EDF
*1/*4	1	905.78	2.0	0.0022	7.04	0.68	62.92	46.91	8.9386382
*1/*5, DEL	1	579.98	2.0	0.0034	8.71	1.77	235.76	81.63	27.0705811
*2/*4	1	584.02	2.0	0.0034	6.75	0.81	170.52	63.07	25.2556532
*1/*4	1	153.35	2.0	0.0130	4.60	0.43	77.28	18.90	16.8041867
*2/*4	1	545.84	2.0	0.0037	12.25	1.41	248.90	63.45	20.3245756
*1/*4	1	293.08	2.0	0.0068	4.01	0.89	101.94	65.44	25.4317876
*1/*4	1	760.98	2.0	0.0026	10.27	1.53	104.67	89.61	10.1930347
*1/*4	1	591.42	2.0	0.0034	3.53	0.93	68.14	38.71	19.3293772
*1/*4	1	403.34	2.0	0.0050	8.96	1.94	225.67	84.40	25.1740290
*1/*5, DEL	1	41.69	21.3	0.5116	4.02	1.59	249.74	100.51	62.1068627
*3/*35	1	519.23	9.7	0.0186	4.86	1.04	141.64	41.71	29.1578507
*2/*4	1	580.42	2.0	0.0034	6.77	1.12	155.68	116.85	23.0012154
*2/*3	1	600.68	2.0	0.0033	3.59	0.52	86.17	23.36	24.0151638
*2/*4, DUP	1	668.50	2.0	0.0030	6.43	0.56	87.02	24.59	13.5399489
*2/*4 DUP	1	425.15	2.0	0.0047	6.09	0.93	102.96	37.35	16.9197947
*1/*4	1	505.00	2.0	0.0040	5.62	0.52	196.16	64.16	34.9004480
*1/*5, DEL	1	799.82	2.0	0.0025	7.89	0.71	203.99	55.75	25.8466931
2/*4*	1	385.26	2.0	0.0052	4.18	0.71	136.71	40.02	32.7049455
*1/*6	1	1.16	3.7	3.2124	2.64	0.62	400.82	92.56	151.7053342
*2/*9	1.5	820.86	2.0	0.0024	5.68	0.87	161.51	71.18	28.4164734
*2/*41	1.5	386.27	14.5	0.0375	6.25	1.71	239.41	71.39	38.3079437
*1/*9	1.5	866.65	2.0	0.0023	11.62	1.04	160.79	62.53	13.8418799
*1/*41	1.5	85.54	6.7	0.0785	4.30	0.65	234.11	75.73	54.3871985
*1/*10	1.5	1066.99	2.0	0.0019	6.40	1.92	123.88	42.16	19.3467231
*1/*9	1.5	609.29	2.0	0.0033	14.43	1.31	134.72	48.40	9.3335905
*2/*41	1.5	911.87	2.0	0.0022	5.75	1.29	63.53	30.58	11.0468400
*9/*35	1.5	517.33	2.0	0.0039	4.63	0.64	29.35	7.54	6.3448885
*1/*10	1.5	632.98	2.0	0.0032	3.67	0.64	24.69	23.88	6.7367928

Alelos	Escore alelos		Dextrorfano (ng/mL)	Dextrometorfano (ng/mL)	Razão DMT/DTF	Endoxifeno (ng/mL)	OH-tamoxifeno (ng/mL)	Desmetiltamoxifeno (ng/mL)	Tamoxifeno (ng/mL)	Razão NDT/EDF
*2/*9	1.5		905.99	2.0	0.0022	4.06	0.54	52.97	31.23	13.0323645
*17/*29	1.5		945.43	2.0	0.0021	18.05	2.10	125.50	93.09	6.9519786
*1/*1	2	MR-R	373.48	2.0	0.0054	3.49	0.65	84.30	29.53	24.1838181
*2/*35	2		653.21	2.0	0.0031	9.91	1.01	237.85	95.76	23.9956009
*1/*1	2		872.53	2.0	0.0023	1.24	0.12	95.91	108.95	77.0608311
*1/*2	2		895.71	2.0	0.0022	10.28	1.16	276.66	99.70	26.9064745
*1/*2	2		715.59	2.0	0.0028	4.74	2.39	108.68	57.31595904	22.9421816
*1/*1	2		625.40	2.0	0.0032	10.46	1.50	144.55	85.04	13.8249321
*1/*35	2		537.81	2.0	0.0037	4.13	0.78	101.67	66.71	24.6001806
*1/*1	2		803.26	2.0	0.0025	2.94	0.61	46.46	27.08	15.8005508
*1/*1	2		828.22	2.0	0.0024	6.93	1.34	135.12	83.92	19.5079406
*1/*1	2		1374.64	2.0	0.0015	12.01	1.32	29.08	54.00	2.4210682
*2/*35	2		620.52	2.0	0.0032	8.16	1.81	24.04	21.72	2.9455097
*1/*2	2		664.29	2.0	0.0030	5.95	0.80	79.83	23.45	13.4085777
*1/*2	2		698.65	2.0	0.0029	6.87	0.81	93.42	57.67	13.5933494
*1/*35	2		918.87	2.0	0.0022	12.32	1.60	222.96	91.24	18.1021685
*1/*2	2		682.62	2.0	0.0029	4.34	0.53	38.53	23.76	8.8717697
*1/*1	2		140.63	2.0	0.0142	6.68	0.82	106.16	31.50	15.8998285
*1/*2	2		1010.03	2.0	0.0020	6.24	2.83	66.34	47.61	10.6367917
*1/*2	2		600.47	2.0	0.0033	9.29	1.80	181.60	70.49	19.5438961
*2/*35	2		706.65	2.0	0.0028	7.25	1.01	96.72	55.37	13.3400908
*1/*35	2		549.68	2.0	0.0036	7.20	1.44	190.22	71.38	26.4070337
*1/*2	2		1216.27	2.0	0.0016	8.93	1.15	207.23	118.52	23.2062930
*1/*35	2		626.08	2.0	0.0032	12.42	1.32	58.74	55.02	4.7279839
*2/*2	2		1731.36	2.0	0.0012	14.89	2.85	211.94	80.86	14.2381890
*1/*35	2	704.13	2.0	0.0028	3.07	0.48	25.26	20.39	8.2369797	
*1/*1	2	640.90	2.0	0.0031	7.37	2.22	117.57	163.99	15.9572143	

Alelos	Escore alelos		Dextrorfano (ng/mL)	Dextrometorfano (ng/mL)	Razão DMT/DTF	Endoxifeno (ng/mL)	OH-tamoxifeno (ng/mL)	Desmetiltamoxifeno (ng/mL)	Tamoxifeno (ng/mL)	Razão NDT/EDF
*2/*2	2		829.89	2.0	0.0024	6.70	1.12	124.15	38.19	18.5292170
*1/*1	2		368.12	3.4	0.0091	10.53	2.39	151.40	106.73	14.3759521
*2/*2	2		572.90	2.0	0.0035	8.67	1.77	102.74	77.24	11.8490503
*1/*2	2		836.49	2.0	0.0024	4.92	0.69	112.16	58.19	22.8030542
*1/*1	2		911.24	2.0	0.0022	16.50	3.57	103.83	52.54	6.2923998
*1/*35	2		718.36	2.0	0.0028	5.29	1.43	99.45	32.16	18.8141174
*1/*1	2		338.55	2.0	0.0059	5.27	2.42	154.75	38.50	29.3508608
*1/*35	2		745.33	2.0	0.0027	11.70	1.76	141.75	51.48	12.1126309
*1/*2	2		944.62	2.0	0.0021	9.67	2.40	266.19	145.30	27.5256107
*1/*1	2		614.47	2.0	0.0033	5.95	0.85	107.81	49.15	18.1268803
*1/*1	2		1066.01	2.0	0.0019	4.77	0.40	105.37	31.49	22.0881941
*1/*2	2		454.43	2.0	0.0044	3.66	0.90	30.83	19.57	8.4251576
*1/*2, DUP	3	UR	451.23	2.0	0.0044	8.08	0.82	31.53	46.41	3.9023134
*1/*2, DUP	3		774.16	2.0	0.0026	7.52	1.33	83.79	40.18	11.1373899
*1/*2, DUP	3		1086.79	2.0	0.0018	7.39	2.04	222.51	45.41	30.0914443