

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

**Influência do polimorfismo *MTHFR* 677C>T no desenvolvimento de
efeitos adversos ao tratamento com 5-fluorouracil / leucovorin em
pacientes com adenocarcinoma colorretal**

THAÍS SILVA DE OLIVEIRA

Porto Alegre, julho de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

**Influência do polimorfismo *MTHFR* 677C>T no desenvolvimento de
efeitos adversos ao tratamento com 5-fluorouracil / leucovorin em
pacientes com adenocarcinoma colorretal**

THAÍS SILVA DE OLIVEIRA

Dra. Mara Helena Hutz
Orientadora

Msc. Luciana Otero Lima
Co-orientadora

Porto Alegre, julho de 2012.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um
pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

Dedico esse trabalho ao meu pai, minha mãe e minha irmã,

essenciais para mim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Mara Helena Hutz, pela oportunidade de poder estagiar em uma área que me despertou grande interesse durante a graduação.

À minha co-orientadora, Luciana Otero Lima, pelos valiosos ensinamentos em cada diferente etapa do estudo, pelo exemplo de determinação, competência e pensamento crítico científico.

Ao Dr. Rui Fernando Weschenfelder, pela disposição ao compartilhar seus conhecimentos na área clínica.

Aos pacientes que confiaram na realização desse estudo.

À Deus e minha família, por sempre estarem presentes em minha vida.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Câncer Colorretal.....	7
1.2. Tratamento do Câncer Colorretal	9
1.3. Farmacogenética do 5-Fluorouracil	13
2. ARTIGO.....	15
3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	36
REFERÊNCIAS.....	38
ANEXOS	41
Anexo A – Orientações aos autores para submissão e publicação de artigo na revista Genetics and Molecular Biology.....	42
Anexo B – Carta de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.	46
Anexo C – Carta de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética do Complexo Hospitalar da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre... ..	47
Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.	49

RESUMO

O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) é amplamente utilizado na terapia contra o câncer colorretal (CCR) e o ácido leucovorin (LV) é rotineiramente combinado a ele com a finalidade de potencializar sua ação. Devido ao fato de se tratar de um fármaco não alvo-específico, diversos efeitos adversos são frequentemente observados entre os pacientes e determinadas variantes genéticas têm sido associadas com maior chance para essa condição. O principal mecanismo de ação do 5-FU é a inibição da enzima Timidilato Sintase (TS), essencial para a síntese correta de DNA. A inibição ótima de TS requer elevadas concentrações celulares de 5,10-metilenotetraidrofolato (5,10-CH₂FH₄), que é degradado pela enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR). O polimorfismo *MTHFR* 677C>T está associado com baixa atividade enzimática, o que parece ter como consequência níveis mais elevados de 5,10-CH₂FH₄, que resultaria em maior sensibilidade a tratamentos baseados em 5-FU/LV e possível maior risco para o desenvolvimento de toxicidade. Os resultados disponíveis na literatura, porém, não são homogêneos a respeito da influência do polimorfismo *MTHFR* 677C>T sobre o desenvolvimento de efeitos adversos ao tratamento baseado em 5-FU. O presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre o polimorfismo *MTHFR* 677C>T e o desenvolvimento de efeitos adversos graves (graus 3 e 4, segundo critérios do CTCAE versão 4.0) em 146 pacientes com adenocarcinoma colorretal que realizaram tratamento quimioterápico exclusivamente baseado em 5-FU/leucovorin (5-FU/LV). Informações clínicas e dados referentes ao desenvolvimento de efeitos adversos foram obtidos dos prontuários médicos dos pacientes. O polimorfismo *MTHFR* 677C>T foi analisado por PCR-RFLP a partir de DNA obtido de amostra de sangue periférico. Não foi encontrada associação entre o polimorfismo *MTHFR* 677C>T e o desenvolvimento de efeitos adversos graves (graus 3 e 4) durante o tratamento baseado em 5-FU/LV ($p > 0,20$; ajustando ou não por covariáveis). Nossos resultados sugerem que apenas a presença do polimorfismo *MTHFR* 677C>T não possui influência sobre o desenvolvimento de efeitos adversos graves ao tratamento com 5-FU/LV, porém a análise em conjunto de outros

SNPs em genes envolvidos na farmacocinética ou farmacodinâmica do 5-FU seria interessante.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) configura-se como a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda em países desenvolvidos. Dados referentes ao Brasil indicam que a previsão para o ano de 2012 será de 14.180 novos casos em homens e 15.960 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres (Estimativa 2012: INCA, 2011).

Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o CCR em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste (22/100 mil) e o terceiro na região Sul (18/100 mil). Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste (23/100 mil) e Sul (20/100 mil) (Estimativa 2012: INCA, 2011).

O CCR abrange tumores que acometem a porção final do sistema digestivo, o cólon e o reto. A maior incidência de casos é de câncer esporádico e ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos de idade, mas as possibilidades de seu desenvolvimento aumentam a partir dos 40 anos (Cunningham *et al.*, 2010).

Tanto fatores ambientais como hereditários podem contribuir para o aparecimento do CCR. O excesso de peso e dieta pobre em vegetais e rica em alimentos de origem animal, podem favorecer o desenvolvimento desse tipo de câncer (Sharp & Little, 2004). A presença de pólipos adenomatosos (incluindo polipose familiar adenomatosa), elevada ingestão de álcool (> 30g etanol/dia), sedentarismo, tabagismo e predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas intestinais também são considerados fatores de risco (Labianca *et al.*, 2010).

A carcinogênese colorretal se caracteriza pelo acúmulo de mutações e alterações epigenéticas em genes supressores de tumor, oncogenes e genes de reparo de malpareamento do DNA. O desenvolvimento do câncer colorretal se inicia a partir do momento em que epitélio normal do cólon alcança o estágio de crescimento hiperplásico, passa por lesões precursoras

benignas (adenomas ou pólipos serráteis), prossegue para estágios avançados de adenoma e, posteriormente, carcinoma. Desse modo, entre 90 a 95% dos casos são histologicamente classificados como adenocarcinomas com múltiplos graus de diferenciação (Cunningham *et al.*, 2010; Labianca *et al.*, 2010).

Como a história natural do CCR propicia condições ideais à sua detecção precoce, a pesquisa de sangue oculto nas fezes e métodos endoscópicos são considerados meios essenciais de rastreamento da doença, uma vez que são capazes de diagnosticar pólipos adenomatosos colorretais e tumores em estádios bem iniciais (Estimativa 2012: INCA, 2011). Desse modo, a sobrevida para esse tipo de câncer é considerada de bom prognóstico se a doença for diagnosticada em fase inicial.

A sobrevida média global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento (Estimativa 2012: INCA, 2011). Entretanto, devido ao fato de os sinais e sintomas do câncer colorretal serem geralmente tardios e o rastreamento a partir dos 50 anos de idade não ser realizado periodicamente, muitos indivíduos já apresentam metástases no momento em que o diagnóstico é estabelecido (Guimarães e Rosa, 2008).

O diagnóstico do CCR é baseado no resultado de biópsia tumoral e o estágio do tumor corresponde ao indicador prognóstico isolado mais importante. A classificação tumoral segue o Sistema TNM e, a partir dessa, o estadiamento tumoral é definido, a fim de se estabelecer o tratamento (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação TNM de CCR e grupos de estadiamento.

Classificação TNM			
Tumor primário (T)			
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado		
T0	Sem evidência de tumor primário		
Tis	Carcinoma in situ: intra-epitelial ou invasão de lâmina própria		
T1	Tumor invade a submucosa		
T2	Tumor invade a muscular própria		
T3	Tumor invade a subserosa ou tecidos não-peritonizados pericólicos ou perirretais		
T4	Tumor invade outros órgãos ou estruturas e/ou perfura o peritônio visceral		
Linfonodos regionais (N)			
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados		
N0	Ausência de metástases linfonodais		
N1	Até três linfonodos regionais pericólicos ou perirretais acometidos		
N2	Quatro ou mais linfonodos regionais pericólicos ou perirretais acometidos		
Metástases a distância (M)			
Mx	Metástases à distância não podem ser avaliadas		
M0	Sem metástases à distância		
M1	Metástases à distância		
Grupos de estadiamento			
Estádio I	T1 / T2	N0	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
Estádio IIB	T4	N0	M0
Estádio IIIA	T1 / T2	N1	M0
Estádio IIIB	T3 / T4	N1	M0
Estádio IIIC	Qualquer T	N2	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

(Guimarães e Rosa, 2008)

1.2. Tratamento do Câncer Colorretal

O tratamento escolhido para o CCR dependerá do local do tumor, do tipo histológico e do estadiamento ao diagnóstico, além da condição clínica do paciente. O tratamento pode consistir em cirurgia e quimioterapia antineoplásica, associada ou não à radioterapia.

A cirurgia corresponde ao tratamento primário para pacientes afetados com adenocarcinoma colorretal potencialmente curável. A quimioterapia baseia-se na administração de medicamentos com o objetivo de erradicar neoplasias não curáveis com o tratamento local e geralmente está associada à radioterapia em pacientes com câncer retal.

A quimioterapia pode ser realizada antes (neoadjuvante) ou depois (adjuvante) da cirurgia, dependendo do estágio do tumor. Já o tratamento paliativo visa reduzir o crescimento tumoral metastático, aliviando os sintomas e eventualmente aumentando a sobrevida do paciente (Kaufman e Chabner, 2001).

O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) tem sido amplamente utilizado desde a década de 60 e corresponde ao quimioterápico de primeira linha para o tratamento do câncer colorretal. O 5-FU é classificado como análogo de pirimidina e se difere do uracil pela substituição de um átomo de hidrogênio no carbono-5 do anel pirimídico por um átomo de flúor (Figura 1).

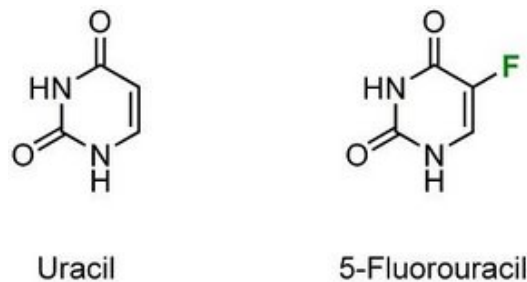


Figura 1. Estrutura química do Uracil e 5-FU (Adaptado de Grem, 1997).

O 5-FU é um pró-fármaco e precisa ser convertido em seu metabólito ativo fluorodioxuridina monofosfato (FdUMP) para realizar sua função: a inibição irreversível da timidilato sintase (TS), que é considerada essencial para a síntese de DNA. O ácido folínico leucovorin (LV) é rotineiramente combinado ao 5-FU (5-FU/LV) com o objetivo de potencializar sua ação (Del Debbio, Tonon and Secoli, 2007) e melhorar a sobrevida global do paciente (Thirion et al., 2004).

A partir das últimas décadas, outros quimioterápicos, como oxaliplatina e irinotecano, foram inseridos como opções de tratamento para o CCR, porém a monoterapia com 5-FU/LV continua sendo frequentemente a primeira opção de tratamento. Desse modo, os protocolos quimioterápicos podem variar com relação à dose, combinação de diferentes fármacos, forma de administração (infusão ou oral), tipo de infusão (contínua ou em bolo) e organização dos ciclos, dependendo da recomendação clínica e da conduta padronizada em cada instituição de acordo com os recursos disponíveis.

Assim como os demais quimioterápicos clássicos, o 5-FU/LV não atua exclusivamente sobre as células tumorais e, conseqüentemente, muitos efeitos adversos são observados entre os pacientes. As toxicidades mais comuns são diarreia, náusea, vômito, mucosite e mielossupressão, que frequentemente são responsáveis pela necessidade de manejo do tratamento ou, até mesmo, por comprometer a continuidade da terapia (Goodwin e Asmis, 2009).

O estudo quantitativo e qualitativo da toxicidade do tratamento do câncer de forma padronizada auxilia na comparação entre os diversos tratamentos disponíveis, permitindo ainda a uniformização da linguagem utilizada. Os Critérios Comuns de Toxicidade (*Common Toxicity Criteria*), desenvolvidos pelo *National Cancer Institute* (NCI), são os mais utilizados na prática clínica para avaliação da toxicidade do tratamento antineoplásico. Com base nesses critérios, os efeitos adversos são classificados de acordo com a gravidade em uma escala que vai de 1 (efeitos adversos leves) a 5 (morte relacionada ao efeito adverso), sendo que efeitos adversos graus 3 e 4 são considerados graves e de importância clínica. Na Tabela 2 estão listados alguns dos efeitos adversos graves mais frequentemente observados nos pacientes tratados com 5-FU/LV.

Tabela 2. Alguns dos feitos adversos graves frequentemente observados em pacientes tratados com 5-FU/LV de acordo com os Critérios Comuns de Toxicidade.

Efeito Adverso	Grau 3	Grau 4
Náusea	Alimentação calórica ou ingestão de líquido via oral inadequados; alimentação por sonda; hospitalização indicada.	—
Vômito	Maior ou igual a 6 episódios em 24h; alimentação por sonda; hospitalização indicada.	Condição ameaçadora da vida; intervenção urgente indicada.
Mucosite Oral	Dor severa; interferência negativa na ingestão oral.	Condição ameaçadora da vida; intervenção urgente indicada.
Diarréia	≥ 7 evacuações em 24h; incontinência; hospitalização indicada.	Condição ameaçadora da vida; intervenção urgente indicada.
Anemia	Hbg < 8g/dL; transfusão indicada.	Condição ameaçadora da vida; intervenção urgente indicada.
Neutropenia febril	Neutrófilos <1000/mm ³ com temperatura > 38.3 °C ou ≥ 38 °C por mais de 1 hora.	Condição ameaçadora da vida; intervenção urgente indicada.
Neutropenia	Neutrófilos < 1000 - 500/ mm ³	Neutrófilos < 500/ mm ³
Leucopenia	Leucócitos totais < 2000 - 1000/mm ³ .	Leucócitos totais <1000/mm ³

(Adaptado de NCI CTCAE versão 4.0, 2009)

O desenvolvimento da capacidade de distinguir quais pacientes responderão melhor a uma determinada terapia, bem como identificar pacientes com risco de desenvolver toxicidade grave é essencial para

otimizar o tratamento do câncer e, assim, aumentar as chances de sucesso terapêutico. A esse respeito, a farmacogenética representa uma abordagem promissora.

1.3. Farmacogenética do 5-Fluorouracil

A farmacogenética consiste no estudo da variabilidade genética que está associada a uma variação na resposta às medicações. As pesquisas farmacogenéticas envolvem a procura por polimorfismos em genes que influenciem a resposta ao tratamento ou o desenvolvimento de efeitos adversos, os genes candidatos (Hutz e Fiegenbaum, 2008).

Entre as proteínas envolvidas no mecanismo de ação do 5-FU/LV está a enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR). A inibição ótima da TS pelo 5-FU/LV requer elevadas concentrações celulares de 5,10-metilenotetraidrofolato ($5,10\text{-CH}_2\text{FH}_4$) e a MTHFR é a enzima que catalisa a sua redução a 5-metiltetraidrofolato ($5\text{-CH}_3\text{FH}_4$), principal forma de folato plasmático circulante (Kristensen *et al.*, 2010) (Figura 2). Dessa forma, variantes no gene que codifica essa enzima são de interesse farmacogenético.

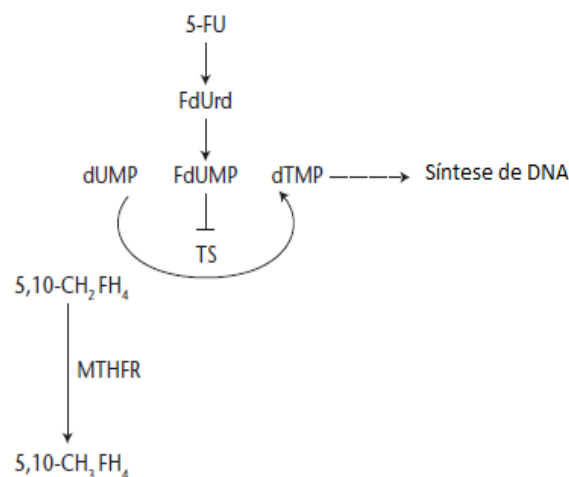


Figura 2. Mecanismo de ação do 5-FU. ($5\text{-CH}_3\text{FH}_4$: 5-metiltetrahidrofolato; $5,10\text{-CH}_2\text{FH}_4$: 5,10-metilenotetraidrofolato; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; dTMP: desoxitimidina monofosfato; dUMP: desoxiuridina monofosfato; FdUrd: 5-fluoro-2'-desoxiuridina; FdUMP: fluorodioxuridina monofosfato) (Adaptado de Kristensen, 2010).

O gene autossômico humano da *MTHFR* está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p36.3) e codifica uma proteína de 656 aminoácidos. A forma variante do gene que implica na transição de uma citosina para uma timina no nucleotídeo 677 (exon 4, códon 222) do gene *MTHFR*, resulta na substituição de uma alanina por uma valina e altera um aminoácido altamente conservado no domínio catalítico N-terminal da enzima (C677T/Ala222Val). Essa substituição está relacionada a uma redução da atividade enzimática (Frosst *et al.*, 1995) e caracteriza o polimorfismo comum mais importante do *MTHFR*.

Os genótipos 677TT e 677CT estão associados à expressão aproximada de 30% e 60%, respectivamente, de atividade enzimática quando comparados com genótipo 677CC (Frosst *et al.*, 1995). A baixa atividade da enzima parece ter como consequência níveis mais elevados de 5,10-CH₂FH₄, o que resultaria em uma sensibilidade aumentada a tratamentos baseados em 5-FU e, possivelmente, um elevado risco de toxicidade (Kristensen *et al.*, 2010).

Diversos estudos foram realizados para investigar a influência do polimorfismo *MTHFR* 677C>T na eficácia e toxicidade de tratamentos que incluem o 5-FU/LV, porém os resultados disponíveis na literatura são heterogêneos e não indicam para uma única direção (Afzal *et al.*, 2009; Etienne-Grimaldi *et al.*, 2010; Glimelius *et al.*, 2011). O efeito desse polimorfismo no tratamento com 5-FU/LV no adenocarcinoma colorretal não está completamente estabelecido.

2. ARTIGO

Artigo formatado segundo as orientações aos autores para submissão e publicação na revista *Genetics and Molecular Biology* (Anexo A).

Influência do polimorfismo *MTHFR* 677C>T no desenvolvimento de efeitos adversos ao tratamento com 5-fluorouracil / leucovorin em pacientes com adenocarcinoma colorretal

Thaís Silva de Oliveira¹; Luciana Otero Lima¹; Patrícia Ashton-Prolla^{1, 2};
Rui Fernando Weschenfelder³; Mara Helena Hutz¹.

¹ Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Serviço de Oncologia Clínica, Hospital Santa Rita, Complexo Hospitalar da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Título resumido: *MTHFR* 677C>T e toxicidade ao 5-FU no tratamento do CCR.

Palavras-chave: fluorouracil, toxicidade, farmacogenética, polimorfismo, *MTHFR* 677C>T.

Autor correspondente:

Dra. Mara Helena Hutz,

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves, 9500

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Telefone: (51) 33086720

Fax: (51) 33087311

E mail: mara.hutz@ufrgs.br

RESUMO

O 5-fluorouracil (5-FU) corresponde a um dos quimioterápicos mais utilizados no tratamento do câncer colorretal e efeitos adversos são frequentemente observados entre os pacientes. O polimorfismo *MTHFR* 677C>T está associado com uma redução na atividade da enzima MTHFR e os resultados disponíveis na literatura não são homogêneos a respeito de sua influência sobre o desenvolvimento de efeitos adversos ao tratamento baseado em 5-FU. Neste estudo foram analisados 146 pacientes com adenocarcinoma colorretal que realizaram tratamento quimioterápico exclusivamente baseado em 5-FU/leucovorin (5-FU/LV). Informações clínicas e dados referentes ao desenvolvimento de efeitos adversos foram obtidos dos prontuários médicos dos pacientes. O polimorfismo *MTHFR* 677C>T foi analisado por PCR-RFLP a partir de DNA obtido de amostra de sangue periférico. Não foi encontrada associação entre o polimorfismo *MTHFR* 677C>T e o desenvolvimento de efeitos adversos graves (graus 3 e 4) durante o tratamento baseado em 5-FU/LV ($p > 0,20$; ajustando ou não por covariáveis). Nossos resultados sugerem que apenas a presença do polimorfismo *MTHFR* 677C>T não possui influência sobre o desenvolvimento de efeitos adversos graves ao tratamento com 5-FU/LV, porém a análise em conjunto de outros SNPs em genes envolvidos na farmacocinética ou farmacodinâmica do 5-FU seria interessante.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) possui incidência mundial de 1 milhão de novos casos por ano e é responsável pelo falecimento de meio milhão de pessoas a cada ano (Parkin *et al.*, 2005). Para o Brasil, no ano de 2012, esperam-se 14.180 casos novos em homens e 15.960 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres. A distribuição do CCR é heterogênea no país, sendo mais comumente observada nas regiões sul e sudeste (Estimativa 2012: INCA, 2011).

O tratamento baseado em 5-fluorouracil (5-FU) corresponde ao principal tipo de quimioterapia para o CCR e sua associação com o ácido folínico medicamentoso (LV), forma reduzida do ácido fólico, intensifica a ação do fármaco (5-FU/LV) e proporciona efeito benéfico na sobrevida global do paciente (Thirion *et al.*, 2004).

Timidilato sintetase (TS), enzima codificada pelo gene *TYMS*, corresponde ao principal alvo de 5-FU. TS forma um complexo ternário com 5,10-metilenotetraidrofolato (5,10-CH₂FH₄) e o metabólito ativo de 5-FU (fluorodioxuridina monofosfato [FdUMP]), resultando em inibição de TS e morte celular. A inibição ótima de TS requer elevada concentração celular de 5,10-CH₂FH₄, que é degradado pela enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) (Schwab *et al.*, 2008).

O gene *MTHFR* está localizado no cromossomo 1p36.3 e, dentre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) descritos, o *MTHFR* 677C>T (rs1801133) foi demonstrado estar associado com atividade alterada da enzima. Os genótipos 677TT e 677CT estão relacionados à atividade

enzimática aproximada de 30% e 60%, respectivamente, quando comparados com genótipo selvagem 677CC. (Frosst *et al.*, 1995; Weisberg *et al.*, 1998).

A função reduzida da enzima *MTHFR* parece ter como consequência níveis mais elevados de 5,10-CH₂FH₄, o que resultaria em maior sensibilidade a tratamentos baseados em 5-FU/LV e possível maior propensão para o desenvolvimento de toxicidade (Kristensen *et al.*, 2010).

Vários estudos tentaram associar o polimorfismo 677C>T do gene *MTHFR* e o desenvolvimento de efeitos adversos do tratamento com 5-FU/LV. Apesar das premissas teóricas e experimentais, algumas abordagens revelaram efeito positivo (Kristensen *et al.*, 2010), outras não demonstraram qualquer efeito do genótipo (Etienne-Grimaldi *et al.*, 2010) e, ainda, há aquelas que mostraram efeito negativo (Afzal *et al.*, 2009). Sendo assim, a relação do polimorfismo com desenvolvimento de toxicidade não está completamente estabelecida.

O objetivo deste estudo consistiu em investigar a influência do polimorfismo *MTHFR* 677C>T no desenvolvimento de efeitos adversos graves ao tratamento com 5-FU/LV em pacientes com CCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra é composta por 146 pacientes provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Santa Rita do Complexo Hospitalar da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA) diagnosticados com adenocarcinoma colorretal (confirmado por laudo

anátomo-patológico) e submetidos, após cirurgia, a tratamento quimioterápico exclusivo baseado em 5-FU/LV de acordo com os protocolos *Mayo* ou *Roswell-Park* (O'Connell *et al.*, 1997; Jager *et al.*, 1996).

O protocolo *Mayo* é caracterizado pela administração de 20mg/m² de LV seguido de 425mg/m² de 5-FU, ambas as administrações intravenosas em bolo e nos dias 1-5 de um ciclo de 28 dias. Já em relação ao *Roswell-Park*, a administração é realizada nos dias 1, 8, 15, 22, 29 e 36 de 500mg/m² (RP) ou 20mg/m² (RPm) de LV por infusão intravenosa durante 2 horas, acompanhada da infusão intravenosa em bolo de 500mg/m² de 5-FU uma hora após o início da infusão de LV, sendo os ciclos a cada 8 semanas.

Esse estudo obteve aprovação pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HCPA e da ISCMPA (números de aprovação 10-0601 e 3485/11, respectivamente) e todos os pacientes foram incluídos no projeto após concordância espontânea e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Dados clínicos e informações referentes ao desenvolvimento de toxicidade ao tratamento, especialmente hematológica e gastrointestinal, foram obtidos a partir dos prontuários médicos dos pacientes. Os critérios de análise de desenvolvimento de efeitos adversos foram baseados na classificação *National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events* (NCI CTCAE versão 4.0, 2009) e objetivou avaliar a presença ou ausência de toxicidade grave (graus 3 ou 4) durante todo o curso do tratamento.

Para a realização da análise molecular, foi feita a extração do DNA genômico a partir de amostra de sangue periférico coletado em tubo EDTA, de acordo com a técnica descrita por Lahiri e Nurnberger (1991).

O estudo do polimorfismo *MTHFR* 677C>T foi realizado através da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction* seguida de *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

O fragmento de interesse de DNA foi amplificado por PCR utilizando-se os *primers* previamente descritos por Frosst *et al.* (1995): *forward* 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'; e *reverse* 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'. A reação foi realizada em um volume total de 25µL contendo 10pmol de cada primer, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs e 0,5 unidade de Taq polimerase (Go Taq® Hot Start Polymerase - Promega). Utilizou-se o termociclador *Veriti® Dx 96-Well Thermal Cycler, 0.2 mL (Applied Biosystems)* para uma reação de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 56°C por 30 segundos e temperatura de extensão de 72°C por mais 30 segundos; períodos de 2 minutos de desnaturação inicial e extensão final foram realizados a 94°C e 72°C, respectivamente.

O produto amplificado foi submetido à clivagem com a enzima de restrição *Hinfl* e posterior eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. A visualização dos perfis de restrição foi realizada através de luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo.

As frequências genotípicas foram obtidas por contagem simples e as frequências alélicas foram calculadas a partir das genotípicas. A verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada através de teste de qui-

quadrado de ajustamento. A análise da associação do polimorfismo *MTHFR* 677C>T com desenvolvimento de toxicidade grave ao tratamento baseado em 5-FU/LV foi realizada através de Regressão de Poisson sem ajuste e ajustando por.

As análises foram realizadas através do pacote estatístico SPSS® versão 18.0. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

RESULTADOS

As características clínicas e demográficas dos 146 pacientes estudados estão descritas na Tabela 1. A idade dos pacientes ao início do tratamento variou entre 27 e 84 anos ($59,93 \pm 11,35$), e 50% eram do sexo masculino.

O cólon correspondia ao local do tumor primário da grande maioria dos pacientes (93,8%). Em 82,9% do total de casos analisados o tratamento com 5-FU/LV tinha caráter adjuvante. Dos 146 pacientes, 49,3% apresentaram algum tipo de toxicidade grave (grau 3 ou 4) durante qualquer momento do tratamento.

A Figura 1 apresenta como os genótipos do polimorfismo *MTHFR* 677C>T são visualizados no gel de poliacrilamida de acordo com o padrão de clivagem pela enzima de restrição. As frequências genotípicas estão de acordo com as esperadas segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,0017$; $gl=1$; $p=0,999$) e estão apresentadas na Tabela 2; o alelo variante T apresentou uma frequência de 0,33.

Não foi encontrada associação entre o genótipo *MTHFR* 677C>T e o desenvolvimento de efeito adverso grave durante o tratamento com 5-FU/LV ($p>0,20$; Tabela 2).

Na Tabela 3 está apresentado o resultado da Regressão de Poisson ajustando por sexo, idade no início do tratamento, cor declarada (recodificada para brancos e não-brancos) e tipo de protocolo quimioterápico utilizado. Da mesma forma, não houve associação entre o genótipo e o desenvolvimento de efeito adverso grave ($p>0,20$).

DISCUSSÃO

Considerando a grande incidência e prevalência do CCR no Brasil e no mundo, aliada a frequente utilização do 5-FU/LV no tratamento dessa neoplasia, o estudo da farmacogenética de esquemas terapêuticos que envolvam esse quimioterápico se torna interessante, uma vez que permitiria identificar, antes mesmo da realização do tratamento, pacientes propensos a desenvolver efeitos adversos graves.

Os resultados deste estudo sugerem que o polimorfismo *MTHFR* 677C>T não está associado com o desenvolvimento de toxicidade grave relacionada ao 5-FU/LV, o que está de acordo com os achados de outros autores (Tsunoda *et al.*, 2011; Schwab *et al.*, 2008). O estudo desenvolvido por Schwab e colaboradores (2008) indica que o polimorfismo isolado *MTHFR* 677C>T provavelmente não pode ser utilizado para prever o desenvolvimento de efeitos adversos em pacientes com CCR tratados com 5-FU/LV.

Contraopondo-se a esses resultados, o estudo realizado por Kristensen e colaboradores (2010) demonstrou relação significativa entre o genótipo *MTHFR* 677CT e risco aumentado de toxicidade, concluindo que o pré-tratamento de detecção de variantes genéticas podem ajudar a prever toxicidades precoces. Entretanto, outro estudo (Afzal *et al.*, 2009) relatou que o genótipo selvagem de *MTHFR* (*MTHFR* 677CC) estaria associado com maior predisposição ao desenvolvimento de efeitos adversos em pacientes tratados com 5FU/LV. Sendo assim, os resultados encontrados na literatura não são homogêneos e indicam para direções divergentes.

Além da ampla quantidade contraditória de informação disponível, temos grande escassez de resultados com relação à farmacogenética do 5-FU/LV no tratamento do CCR na população brasileira. Dessa forma, a análise retrospectiva e naturalística dos esquemas de tratamento utilizados por pacientes provenientes de dois hospitais de referência do estado do Rio Grande do Sul (HCPA e ISCMPA) representa mais um esforço na tentativa de elucidar o papel de *MTHFR* 677C>T no desenvolvimento de efeitos adversos graves a 5-FU/LV em pacientes com CCR.

O polimorfismo *MTHFR* C677C>T é distribuído em diferentes frequências na população mundial de acordo com variações étnicas e regionais. As frequências alélicas e genotípicas encontradas nesse trabalho estão de acordo as descritas em outros estudos que também avaliaram indivíduos da região de Porto Alegre (Brandalize *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010), bem como as disponíveis no HapMap para populações européias.

Apesar de não encontrarmos uma associação significativa entre o genótipo e o desenvolvimento de efeitos adversos, o estudo envolveu

apenas pacientes que receberam tratamento monoterápico baseado em 5-FU/LV, o que evitou o viés que poderia ser introduzido pela administração combinada de diferentes quimioterápicos e possíveis efeitos de tratamentos anteriores realizados.

Evidências sugerem que o polimorfismo *MTHFR* 677C>T pode não possuir efeito funcional em todos os tecidos in vivo, apenas os indivíduos homocigotos para o genótipo variante seriam predispostos a ter tais alterações, que resultariam em modificação do metabolismo de folato apenas se a concentração plasmática já fosse baixa. Desse modo, resultados divergentes podem ser decorrentes da variabilidade resultante do estado de folato individual. Talvez, essa seja uma explicação para a falta de relevância clínica do tratamento do CCR baseado na análise do polimorfismo de *MTHFR* 677C>T (Friso *et al.*, 2002).

O estudo apenas do polimorfismo *MTHFR* 677C>T é limitado, pois a genotipagem restrita de um único variante se torna insuficiente para prever o desenvolvimento de toxicidade no tratamento baseado em 5-FU/LV. O papel do polimorfismo estudado em combinação com outros SNPs relevantes, como o do gene *TYMS*, são sugeridos por outros estudos (Capitain *et al.*, 2008). A análise de combinações de diferentes SNPs em uma determinada rede metabólica são provavelmente melhores preditores de resposta em comparação à investigação de um polimorfismo único. No entanto, esse tipo de abordagem requer tamanho de amostra considerável, o que seria interessante para um estudo futuro.

Sabe-se que outro polimorfismo encontrado no gene *MTHFR*, o 1298A>C, também afeta o domínio regulatório da enzima, reduzindo sua

atividade em até 40% em indivíduos portadores do genótipo *MTHFR* 1298CC (Weisberg *et al.*, 1998). Estudos adicionais envolvendo a análise dessa variante juntamente com o genótipo *MTHFR* C677TT são pertinentes e podem fornecer uma observação mais precisa a respeito da influência da atividade alterada de MTHFR sobre o desenvolvimento de toxicidade.

Portanto, a sensibilidade ao tratamento com 5-FU/LV parece não derivar de um traço monogênico e envolve várias proteínas relacionadas na farmacocinética e farmacodinâmica do quimioterápico. Uma abordagem que combine a análise de vários genes envolvidos no mecanismo de ação do 5-FU/LV seria interessante para melhor compreender as variações individuais relacionadas ao desenvolvimento de toxicidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Profa. Dra. Eliane Bandinelli pela disponibilização dos *primers* e enzima de restrição para esse estudo.

REFERÊNCIAS

Afzal S, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Matsen JP, Sørensen JB, Andersen PK e Poulsen HE (2009) MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Ann Oncol* 20:1660-1666.

Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A e Gamelin E (2008) The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 8:256-267.

dos Santos PA, Longo D, Brandalize AP e Schüler-Faccini L (2010) MTHFR C677T is not a risk factor for autism spectrum disorders in South Brazil. *Psychiatr Genet* 20:187-189.

Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF e Rosenberg IH, Corrocher R, et al. (2002) A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 99:5606-5611.

Kristensen MH, Pedersen PL, Melsen GV, Ellehaug J e Mejer J (2010) Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes

predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *J Int Med Res* 38:870-883.

Lahiri DK e Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J e Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108.

Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, Kerb R, Blievernicht J, Fischer J, Hofmann U, et al. (2008) Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J Clin Oncol* 26:2131-2138.

Thirion P, Michiels S, Pignon JP, Buyse M, Braud AC, Carlson RW, O'Connell M, Sargent P, Piedbois P e Cancer M-AGi (2004) Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J Clin Oncol* 22:3766-3775.

Tsunoda A, Nakao K, Watanabe M, Matsui N, Ooyama A e Kusano M (2011) Associations of various gene polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients receiving oral uracil and tegafur plus leucovorin: a prospective study. *Ann Oncol* 22:355-361.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S e Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64:169-172.

Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F, Chibaudel B, Formento JL, Francoual M, Lledo G, André T, Mabro M, Mineur L, et al. (2010) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 69:58-66.

O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ e Wieand HS (1997) Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 15:246-250.

Jäger E, Heike M, Bernhard H, Klein O, Bernhard G, Lutz D, Michaelis J, Meyer zum Büschenfelde KH e Knuth A (1996) Weekly high-dose leucovorin versus low-dose leucovorin combined with fluorouracil in advanced colorectal cancer: results of a randomized multicenter trial. Study Group for Palliative Treatment of Metastatic Colorectal Cancer Study Protocol 1. *J Clin Oncol* 14:2274-2279.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA e van den Heuvel LP (1995) A

candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 10:111-113.

Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I e Schüler-Faccini L (2009) Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. Am J Med Genet A 149A:2080-2087.

FONTES DA INTERNET

Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/> (03 junho 2012)

National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE - versão 4.0, 2009), <http://ctep.cancer.gov> (09 junho 2012)

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos pacientes analisados.

Característica	N (%) ou média (DP)
Idade ao início do tratamento (anos)	59,93 (\pm 11,35)
Sexo	
Masculino	73 (50%)
Feminino	73 (50%)
Cor auto-declarada	
Branco	118 (80,8%)
Negro	9 (6,2%)
Mulato	7 (4,8%)
Moreno	12 (8,2%)
Local do tumor primário	
Cólon	137 (93,8%)
Reto	8 (5,5%)
Ambos	1 (0,7%)
Estadiamento ao diagnóstico	
II	36 (24,6%)
III	89 (61,0%)
IV	21 (14,4%)
Caráter do tratamento quimioterápico	
Adjuvante	121 (82,9%)
Paliativo	15 (10,3%)
Curativo	10 (6,8%)
Protocolo de 5-FU/LV utilizado	
<i>Mayo</i>	110 (75,4%)
<i>RP</i>	25 (17,1%)
<i>RPm</i>	11 (7,5%)
Desenvolvimento de efeito adverso grave durante o tratamento	
Não	74 (50,7%)
Sim	72 (49,3%)

Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *MTHFR* 677C>T na amostra analisada.

<i>MTHFR</i> 677 C>T	Genótipos			Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
Com efeito adverso	36 (50,0%)	30 (41,7%)	6 (8,3%)	0,70	0,30
Sem efeito adverso	29 (39,2%)	35 (47,3%)	10 (13,5%)	0,63	0,37
Amostra total	65 (44,5%)	65 (44,5%)	16 (11,0%)	0,67	0,33

Razões de prevalência em relação ao genótipo CC: RP (CT)=0,833 (IC 95% 0,592 – 1,172); RP (TT)=0,677 (IC 95% 0,347 – 1,322).

Tabela 3. Análise de Regressão de Poisson do efeito do genótipo *MTHFR* 677 C>T sobre o desenvolvimento de efeito adverso grave ajustando para covariáveis.

Variável	RP (IC 95%)	P
<i>MTHFR</i> 677 TT	0,715 (0,374-1,366)	0,310
<i>MTHFR</i> 677 CT	0,820 (0,597-1,126)	0,221
<i>MTHFR</i> 677 CC	1	-
Protocolo Mayo	2,256 (0,786-6,481)	0,131
Protocolo RP	0,608 (0,153-2,419)	0,480
Protocolo R _{Pm}	1	-
Sexo feminino	1,427 (1,031-1,975)	0,032
Cor declarada não-branca	0,811 (0,528-1,246)	0,339
Idade no início do tratamento	1,002 (0,989-1,016)	0,744

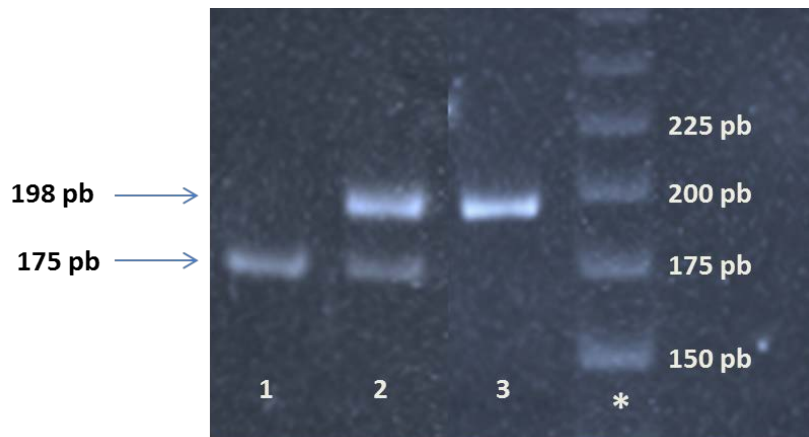


Figura 1. Gel de poliacrilamida corado pelo brometo de etídeo com os genótipos do polimorfismo *MTHFR* 677C>T. As canaletas do gel estão enumeradas em ordem crescente e as bandas representam as amostras após digestão pela enzima *Hinfl*. 1: TT= homozigoto para o alelo T; 2: CT= heterozigoto CT; 3: CC= homozigoto para o alelo C. A banda correspondendo a 23pb não está representada nesse gel. *: marcador de peso molecular de 25 pb.

3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

5-FU/LV corresponde a um dos agentes quimioterápicos mais utilizados para o tratamento do CCR desde a década de 60 e ainda representa o componente chave de muitas combinações com outros fármacos em diferentes esquemas terapêuticos (Scartozzi *et al.*, 2011). As variações em genes relacionados ao metabolismo de 5-FU/LV podem modular sua farmacocinética e farmacodinâmica, de forma a afetar substancialmente a resposta do indivíduo em relação ao desenvolvimento de toxicidade relevante.

O polimorfismo *MTHFR* 677C>T está associado a uma atividade alterada da enzima MTHFR e a sua importância com relação a sensibilidade ao tratamento quimioterápico baseado em 5-FU vem sendo investigada. A literatura é controversa sobre a associação entre os genótipos de *MTHFR* 677C>T e o desenvolvimento de toxicidade, sendo que os resultados podem variar desde efeito positivo do genótipo homozigoto variante (*MTHFR* 677TT), ou seja, indivíduos que o portam possuem realmente maior predisposição para o desenvolvimento de efeitos adversos graves ao longo de todo o curso quimioterápico; até efeito negativo, em que a forma homozigota selvagem (*MTHFR* 677CC) estaria relacionada com maior chance para essa condição. Também há estudos que, assim como o nosso, os resultados não permitem associar os dois eventos (Etienne-Grimaldi *et al.*, 2010).

No presente estudo não foi possível observar associação significativa entre o polimorfismo *MTHFR* C677C>T e o desenvolvimento de efeitos adversos graves (graus 3 e 4) em pacientes com CCR tratados com 5-FU-LV.

Além do polimorfismo *MTHFR* 677C>T, o *MTHFR* 1298A>C também foi demonstrado ser responsável por alterar a atividade da enzima MTHFR, de forma que a combinação em homozigose de ambos (677TT/1298CC) resulta em maior redução da atividade enzimática. Futuros estudos que correlacionem esses dois polimorfismos com a evolução clínica do paciente, assim como de outros SNPs envolvidos com a farmacocinética e farmacodinâmica do 5FU/LV, são interessantes e podem indicar informação mais precisa a respeito da relação estabelecida entre o genótipo e a

predisposição para toxicidade em pacientes com CCR tratados com 5-FU/LV.

REFERÊNCIAS

AFZAL, S. et al. MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. **Ann Oncol**, v. 20, n. 10, p. 1660-6, Oct 2009.

CUNNINGHAM, D. et al. Colorectal cancer. **Lancet**, v. 375, n. 9719, p. 1030-47, Mar 2010.

DEL DEBBIO, C. B.; TONON, L. M.; SECOLI, S. R. [Monoclonal antibody therapy: a literature review]. **Rev Gaucha Enferm**, v. 28, n. 1, p. 133-42, Mar 2007.

ETIENNE-GRIMALDI, M. C. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. **Br J Clin Pharmacol**, v. 69, n. 1, p. 58-66, Jan 2010.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet**, v. 10, n. 1, p. 111-3, May 1995.

GLIMELIUS, B. et al. Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. **Pharmacogenomics J**, v. 11, n. 1, p. 61-71, Feb 2011.

GOODWIN, R. A.; ASMIS, T. R. Overview of systemic therapy for colorectal cancer. **Clin Colon Rectal Surg**, v. 22, n. 4, p. 251-6, Nov 2009.

GREM, J. L. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. **Semin Radiat Oncol**, v. 7, n. 4, p. 249-259, Oct 1997.

GUIMARÃES, J.L.M. e ROSA, D.D. **Rotinas em Oncologia**. 1ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2008. 942 p.

HUTZ, M. H.; FIEGENBAUM, M. Impact of genetic polymorphisms on the efficacy of HMG-CoA reductase inhibitors. **Am J Cardiovasc Drugs**, v. 8, n. 3, p. 161-70, 2008.

KAUFMAN, D.C. e CHABNER, B.A. **Clinical strategies for cancer treatment: the role of drugs**. 3 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

KRISTENSEN, M. H. et al. Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. **J Int Med Res**, v. 38, n. 3, p. 870-83, May-Jun 2010.

LABIANCA, R. et al. Colon cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 74, n. 2, p. 106-33, May 2010.

SCARTOZZI, M. et al. 5-Fluorouracil pharmacogenomics: still rocking after all these years? **Pharmacogenomics**, v. 12, n. 2, p. 251-65, Feb 2011.

SHARP, L.; LITTLE, J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. **Am J Epidemiol**, v. 159, n. 5, p. 423-43, Mar 2004.

THIRION, P. et al. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 18, p. 3766-75, Sep 2004.

FONTES DA INTERNET

Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/> (13 junho 2012)

National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE - versão 4.0, 2009), <http://ctep.cancer.gov> (17 junho 2012)

ANEXOS

Anexo A – Orientações aos autores para submissão e publicação de artigo na revista *Genetics and Molecular Biology*.

Disponível em: <[http:// http://www.scielo.br/revistas/gmb/iinstruc.htm](http://www.scielo.br/revistas/gmb/iinstruc.htm)>.

Acesso em: 07. jun. 2012.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS – Submission of papers – Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to

molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. *PLoS One* 4:e7713.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM),
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software,

http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2005)

g) **Tables** must be in Word format prepared with table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted.

Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included in the main text file and should be typed on a new page that immediately follows the tables.

i) **Nomenclature** should adhere to current international standards.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will delay publication.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and

materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** reports of experiments on live vertebrates must include a statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures, they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement: Supplementary material - the following online material is available for this article:

- Table S1 < short title >
- Figure S1 - < short title >

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

Anexo B – Carta de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 100601

Versão do Projeto: 23/02/2011

Versão do TCLE: 10/03/2011

Pesquisadores:

MARA HELENA HUTZ

PATRICIA ASHTON PROLLA

LUCIANA OTERO LIMA

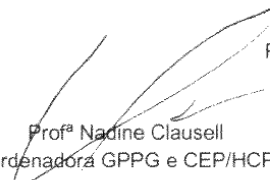
RUI FERNANDO WESCHENFELDER

Título: Farmacogenética de quimioterapias baseadas em 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina ou irinotecano no tratamento do Adenocarcinoma Colorretal

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 29 de março de 2011.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

Anexo C – Carta de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética do Complexo Hospitalar da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br



PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer Complementar II nº 073/11

Protocolo nº 3485/11

Título: “Farmacogenética de quimioterapias baseadas em 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina ou irinotecano no tratamento do Adenocarcinoma Colorretal”.

Pesquisador Responsável: Rui Fernando Weschenfelder

Instituição onde se realizará – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Data de Entrada: 31/01/2010

II – Objetivos – Objetivo Geral: Investigar o envolvimento de variações em genes relacionados com a farmacocinética e farmacodinâmica de protocolos quimioterápicos utilizados no tratamento do adenocarcinoma colorretal em pacientes atendidos pelo SUS em dois hospitais de referência em Porto Alegre, com o desenvolvimento de efeitos adversos graves e sobrevida global.

Objetivos Específicos: • Investigar a influência de polimorfismos no desenvolvimento de efeitos adversos graus 3 e 4 ao tratamento com 5-FU/LV em pacientes com adenocarcinoma colorretal não metastático (estádios II e III).

• Investigar a influência de polimorfismos no desenvolvimento de efeitos adversos graus 3 e 4 e na sobrevida global ao protocolo de tratamento de primeira linha bFOL em pacientes com adenocarcinoma colorretal metastático (estádio IV).

• Investigar a influência de polimorfismos no desenvolvimento de efeitos adversos graus 3 e 4 e na sobrevida global ao protocolo de tratamento de segunda linha com irinotecano em pacientes com adenocarcinoma colorretal metastático (estádio IV).

• Investigar a influência de polimorfismos em genes de receptores nucleares/fatores de transcrição na farmacogenética do tratamento do adenocarcinoma colorretal (não metastático e metastático).

III - Sumário do Projeto

Descrição e caracterização da amostra: Estudo prospectivo. A amostra será composta por 350 pacientes do SUS portadores de adenocarcinoma colorretal tratados no Setor de Oncologia do HCPA e no Hospital Santa Rita do Complexo Hospitalar da ISCMPA, entre fevereiro/março de 2011 e agosto de 2013, segundo os protocolos 5-FU/LV, bFOL e irinotecano já mencionados.

Critério de inclusão: Como critérios de inclusão, teremos o diagnóstico de adenocarcinoma colorretal confirmado por laudo anátomo-patológico, a utilização de um dos protocolos quimioterápicos em estudo e a concordância em participar da pesquisa.

Critério de exclusão: Serão excluídos pacientes menores de 18 anos.

Adequação das condições - Hospital escola com infra-estrutura adequada para a realização do estudo descrito.

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA Fone/Fax: (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br
 Reconhecimento: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br



IV -Comentários:

- **Justificativa do uso de placebo** – não se aplica.

- **Análise de riscos e benefícios** – os riscos são das coletas de sangue nas punções e os possíveis benefícios são de proporcionar conhecimento para aplicação no futuro. O tratamento do paciente não terá interferência do estudo.

- **Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo** – adequado.

- **Informação adequada quanto ao financiamento** – adequado.

- **Outros centros no caso de estudos multicêntricos** – participarão pacientes do HCPA e da ISCMPA, sob responsabilidade do investigador principal que trabalha nas duas instituições.

V -Parecer do Relator — “Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer”.

VI - Data da Reunião: 01/03/2011.

VII - Data da 2ª Reavaliação: 25/04/2011.

“Projeto e Termo de Consentimento, Aprovados”.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Porto Alegre, 25 de Abril de 2011.

Prof. Dr. Cláudio Telöken
 Coordenador do CEP/ISCMPA

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br
 Reconhecido: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.

Parecer 073/11

Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: **Farmacogenética de quimioterapias baseadas em 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina ou irinotecano no tratamento do Adenocarcinoma Colorretal**

Pesquisador responsável: Rui Fernando Weschenfelder (Serviço de Oncologia do HCPA; telefone para contato: 51-3359.8335)

Demais pesquisadores: Mara Helena Hutz (UFRGS), Patricia Ashton-Prolla (HCPA, UFRGS), Luciana Otero Lima (UFRGS).

O câncer colorretal é uma doença bastante freqüente no Brasil e no mundo, e muitas vezes o tratamento envolve o uso de quimioterápicos. Observa-se, porém, que nem todos os pacientes respondem da mesma forma aos medicamentos utilizados, ou seja, que alguns pacientes respondem melhor à medicação do que outros, que alguns pacientes são mais beneficiados do que outros. Observa-se, também, que alguns pacientes apresentam efeitos adversos leves ou mais graves ao uso da medicação, enquanto que outros não desenvolvem esses efeitos. Diversos fatores podem influenciar a resposta do paciente ou o desenvolvimento de sintomas indesejados à medicação, dentre eles fatores genéticos. Desta forma, o objetivo deste projeto é investigar o papel de alguns fatores genéticos na determinação da resposta global e no aparecimento de efeitos adversos aos quimioterápicos utilizados por pacientes com adenocarcinoma colorretal.

Você está sendo convidado a participar deste estudo, e sua participação envolve o preenchimento de uma ficha clínica e a doação de 5ml de sangue, que será utilizado para a extração do DNA. Para que possamos fazer as análises necessárias, você deverá consentir que acompanhamos sua evolução clínica ao longo do tratamento quimioterápico através da observação do seu prontuário médico. Ressaltamos que seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa.

Sua participação no estudo é sigilosa e voluntária. Caso você decida não participar, isto não afetará no atendimento e no tratamento normal que você tem direito. Além disso, você tem liberdade de desistir de participar do estudo a qualquer momento sem nenhum prejuízo, devendo apenas contatar a pesquisadora Luciana Otero Lima pelos telefones 51-3308.6735 (Departamento de Genética) ou 51-8117.0047. Seu material genético e seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente, e os resultados deste estudo poderão ser usados para fins científicos de forma anônima. O presente projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (telefone para contato: 51-3359.8304). O estudo será financiado por verba de agências de fomento, sendo que nenhum custo incidirá sobre o paciente ou seus familiares.

Embora esta pesquisa não possa gerar nenhum benefício imediato aos participantes, ela poderá trazer vários benefícios a longo prazo, uma vez que a determinação do papel genético na resposta global e no desenvolvimento de efeitos adversos de cada pessoa é importante para uma melhor orientação das condutas clínicas. Enfim, a sua participação ajudará no desenvolvimento de conhecimento científico, que poderão eventualmente beneficiar outras pessoas no futuro.

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

28, 03, 2011
LUCIANA OTERO LIMA

Se você quer participar do estudo, por favor, leia cuidadosamente e assine este documento. Muito obrigada por sua atenção!

DOCUMENTAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

1. Declaro que fui convidado a participar do projeto de pesquisa "Farmacogenética de quimioterapias baseadas em 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatina ou irinotecano no tratamento do Adenocarcinoma Colorretal" e fui informado dos seus objetivos.

() SIM () NÃO

2. Declaro que recebi informação a respeito do procedimento que será realizado e esclareci todas as minhas dúvidas.

() SIM () NÃO

3. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade de meu tratamento.

() SIM () NÃO

4. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira.

() SIM () NÃO

5. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

() SIM () NÃO

6. Concordo em preencher uma ficha clínica e autorizo a utilização de meu prontuário médico como fonte de informação sobre minha saúde e sobre minha evolução clínica ao longo do tratamento quimioterápico.

() SIM () NÃO

7. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização futura em estudos com objetivos semelhantes, e entendo que nesse caso serei recontatado para novo consentimento.

() SIM () NÃO

8. Declaro que li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Eu entendo a informação fornecida por este documento e eu tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas

() SIM () NÃO

9. Declaro que consinto em participar do estudo e que meus dados sejam incluídos na análise coletiva dos resultados.

() SIM () NÃO

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Data/Hospital: Porto Alegre, ___/___/____; _____

Eu expliquei a _____ os objetivos e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Nome do entrevistador: _____

Assinatura do entrevistador: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA
28/03/2011
100601 TAV