



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

FARMACOGENÔMICA DAS FLUOROPIRIMIDINAS NO TRATAMENTO
ONCOLÓGICO PERSONALIZADO

MARIANNE RODRIGUES FERNANDES

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia molecular.

Orientador: Dr. Rommel Rodriguez Burbano

Co-orientador no exterior: Dr. Angel Maria Carracedo

Belém-Pará

Dezembro de 2016

FONTES FINANCIADORAS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM)

Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO)

Universidade de Santiago de Compostela (USC)

Centro de Pesquisa em medicina molecular e doenças crônicas (CiMUS)

Hospital Ophir Loyola (HOL)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa do Pará (FAPESPA)

AGRADECIMENTOS

A todos que nesta longa caminhada contribuíram com a minha formação profissional, nos ensinamentos acadêmicos, científicos, técnicos ou pessoais, agradeço muito por tudo que me ensinaram.

Agradeço muito a Deus, por todos os livramentos e proteção, pela saúde que tem me concedido e por sempre guiar meus passos.

Aos Hospitais: Ophir Loyola e Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) através da Unidade de alta complexidade em oncologia, que permitiram a coleta das amostras e o atendimento aos pacientes oncológicos.

A Universidade Federal do Pará, Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa do Pará (Fapespa) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido; e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos, no Brasil e no exterior, que me permitiram desenvolver o estudo com segurança.

A todos os pacientes oncológicos que concordaram em participar do estudo, que mantenham a esperança em nossas pesquisas no combate ao câncer e melhoria da qualidade de vida.

Ao Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO) da UFPA, que me acolheu como uma filha, além de ser um sonho para todos nós que fazemos parte, tomo como compromisso também fazer-lhe sempre forte e contribuir para que cresça com muito sucesso.

Um agradecimento muito especial ao Dr. Paulo Assumpção pelo apoio e liderança e a Dra. Samia Demacki pela amizade e carinho, que me fizeram crescer muito como profissional nestes anos e serviram de exemplo para a minha vida acadêmica.

Aos, Dr. Sidney Santos e Dra. Ândrea Ribeiro dos Santos, que além do incentivo e apoio na vida acadêmica, também sempre me acolheram carinhosamente como membro de sua família.

Ao meu orientador Dr. Rommel Burbano, por me aceitar como sua aluna desde a iniciação científica e pelo grande apoio que tem disponibilizado nesses anos de vida acadêmica.

Aos colegas Danielle Feio e Williams Barra, por nos ajudarem no contato com os pacientes e a desenvolver o projeto

Aos colegas do Núcleo de pesquisas em oncologia: Diego, Marcos e Renato por estarem sempre prontos para “quebrar” todos os galhos que surgiram ao longo deste trabalho. Aos professores e alunos que tornaram esses anos de convivência muito agradáveis e por toda a ajuda concedida. Ao Antônio, por todas as ajudas técnicas, caronas ao NPO e conversas pela manhã.

A Darlen, por ser um exemplo de aluna e profissional. Muito obrigada por toda a ajuda e contribuição com o desenvolvimento do meu trabalho e além de tudo, pela amizade e sempre me emprestar seus ouvidos e conselhos nos momentos de conflito.

Aos alunos do NPO por tornarem o ambiente de estudo e trabalho muito especial e prazeroso de se viver. Em especial a: Juliana, Luciana e Amanda pela ajuda no desenvolvimento da tese e contribuição em muitos detalhes do meu trabalho, além dos momentos de diversão. Saber que cada etapa da vida e conquista de cada um de nós, será comemorada com sinceridade de uma amizade verdadeira é um grande presente pra mim!

A Universidade Santiago de Compostela (USC), ao grupo de Medicina Genômica e ao Centro de Pesquisa em medicina molecular e doenças crônicas (Cimus), por aceitarem a parceria no desenvolvimento do meu estudo.

Ao meu co-orientador na Espanha, Dr. Angel Carracedo, que me recebeu na sua equipe e na sua família, por toda a receptividade, auxílio e carinho neste ano. Foi uma honra fazer parte da sua equipe!

Aos colegas do Cimus, Ana, Olalla, Moyses, Raquel e Carmen, por toda a paciência em entender o meu *castellano* enferrujado, convivência e ensinamentos no laboratório, pelas expedições e aventuras e ajuda na adaptação em outro país.

A querida Fabiane, por seu ombro amigo e risada contagiante que me ajudou muito a aguentar a saudade de casa e descobrir novas “palavras”.

A toda a família Rodrigues-Fernandes que sempre torceram e acreditaram em mim; a família Pereira-Carneiro e Santos e a Dona Therezinha que me proporcionaram muitos momentos especiais nestes anos.

Dedico aos meus pais, Oberdan e Lindalva, pelo grande esforço que fizeram em suas vidas para que eu me formasse e buscasse meus objetivos, somente com o apoio de vocês foi possível realizar tantas coisas na minha vida. Agradeço o amor, dedicação e força que transmitem. A minha mãe por todo o apoio e carinho, por ter segurado a barra nesse ano de ausência e ser uma avó muito cuidadosa!

As minhas irmãs Lilianne e Christianne, agradeço por todos os momentos que passamos juntas, pela segurança e palavras de apoio e incentivo. Ao meu sobrinho Giovanni e cunhado Ricardo pelo carinho e estar sempre disponível para ajudar.

Ao Ney, pelo companheirismo nesses anos de convivência, pela paciência e compreensão em tantos momentos de dúvidas, pela disponibilidade e apoio na vida acadêmica. Agradeço por compartilhar além dos momentos difíceis, muitos momentos de alegria. Por embarcar comigo nessa experiência especial que foi morar em outro país e viver juntos uma aventura. Te amo!

Aos meus amigos: Cilene, Diego, Jaqueline, Rui, Samira, Thiago, Raphael, Souza e Cremilda por entenderem a minha ausência em muitos momentos nesses anos. Por sempre torcerem pelo meu sucesso e estenderem a mão nestes tantos anos de amizade e de vida profissional.

Agradeço ao meu filho peludinho John John, que contribuiu muito para o desenvolvimento da minha tese. Além de um amigo e companheiro muito especial nesses anos, mesmo nos dias mais difíceis sempre me recebeu com toda a felicidade e alegrias do mundo!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
CAPITULO I. INTRODUÇÃO	11
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.1. CÂNCER GÁSTRICO	16
1.2. CÂNCER COLORRECTAL	17
2. TRATAMENTO DO CÂNCER	18
2.1. QUIMIOTERAPIA (QT)	18
2.1.1. 5-FLUOROURACIL (5-FU)	20
3. FARMACOGENÉTICA/FARMACOGENÔMICA (PGx)	22
3.1. FARMACOGENÉTICA APLICADA AO CÂNCER	24
3.1.1. FARMACOGENÉTICA DO 5-FU	28
3.1.2. GENE <i>DPYD</i>	32
3.1.3. GENE <i>TYMS</i>	35
3.2. INFLUÊNCIA ÉTNICA EM ESTUDOS FARMACOGENÔMICOS	38
4. ANCESTRALIDADE	41
5. JUSTIFICATIVA	42
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	45
1. OBJETIVO GERAL	46
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46

CAPÍTULO III: USO DE UM PAINEL DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DE RESPOSTA E TOXICIDADE A TERAPIA COM 5-FU, EM PACIENTES COM CÂNCER DO TRATO GASTROINTESTINAL, EM UMA POPULAÇÃO MISCIGENADA.	47
CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO	70
CAPÍTULO V: CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Capacidades adquiridas das células tumorais durante os múltiplos passos da carcinogênese	13
FIGURA 2. Estimativa de proporções de incidência e mortalidade de câncer, por tipo tumoral, em todo o mundo em 2012	14
FIGURA 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2016/2017 por gênero, na região Norte do Brasil, exceto câncer de pele não melanoma	16
FIGURA 4. Estrutura química do 5-FU, Uracil e Timina	20
FIGURA 5. Metabolismo de 5-Fluorouracil	29
FIGURA 6. Esquema representativo da síntese de monofosfato de deoxitimina (dTMP)	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Estimativa para o biênio 2016/2017 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de números de casos novos por câncer no Brasil, segundo sexo e localização primária*	15
TABELA 2. Biomarcadores farmacogenômicos contidos em rótulos de medicamentos aprovados pela FDA associados à terapêutica oncológica	26
TABELA 3. Dosagem recomendada de Fluoropirimidinas por genótipo/fenótipo ¹	35

RESUMO

Nas últimas décadas, o câncer se tornou um evidente problema de saúde pública mundial. O esquema terapêutico com base em Fluoropirimidinas tem sido a conduta quimioterápica mais utilizada em todo o mundo em vários tipos de tumores sólidos, incluindo câncer gástrico e colorrectal. Do total de pacientes tratados com 5-Fluorouracil (5-FU), de 10-40% apresentam toxicidades severas, em geral estes casos resultam em hospitalizações prolongadas e onerosas. O princípio da medicina personalizada consiste em estudar as respostas a medicamentos baseados na informação genômica individual. O elevado grau de miscigenação é um desafio para a implementação mundial da medicina personalizada na prática clínica. Poucos estudos na literatura especializada relataram a influência de marcadores farmacogenômicos em populações miscigenadas como a população brasileira. O objetivo deste estudo foi investigar a variabilidade farmacogenômica de diferentes biomarcadores em farmacogenes envolvidos na via de metabolismo das Fluoropirimidinas em pacientes com câncer gástrico ou câncer colorrectal, subestruturados de acordo com a resposta e toxicidade ao tratamento. Para a realização da investigação utilizamos 216 pacientes com câncer colorretal ou gástrico que receberam tratamento quimioterápico a base de 5-FU. Foram investigados 33 polimorfismos genéticos em 17 farmacogenes (*ABCB1*, *ABCC2*; *ABCC4*; *ABCG2*, *CYP2A6*, *DPYD*, *FPGS*, *ITGB5*, *MTHFR*, *SLC22A7*, *SLC29A1*, *TP53*, *TYMS*, *UMPS*, *GGH*, *RRM1*, *TYMP*) envolvidos na via de metabolização das fluoropirimidinas. Nossos resultados demonstraram que 77.3% dos pacientes apresentaram algum tipo de toxicidade relacionada ao tratamento com 5-FU e destes, 22% apresentaram toxicidades severas classificadas em grau 3 e 4. O óbito ocorreu em 23 pacientes, onde três casos foram relacionados à toxicidade e quatro casos com a progressão tumoral e toxicidade quimioterápica. O subestruturamento populacional não foi influente nos resultados de associação para os polimorfismos farmacogenéticos com o uso de 5-FU. O gene *FPGS* (rs4451422) mostrou-se significativo em associação com a toxicidade geral ($p=0,0052$; OR 0,32) e com eventos de toxicidades ($p=0,0004$; OR 0,22). O gene *ABCC4* (rs148551) apresentou associação significativa para a resposta clínica ($p=0,0056$; OR 0,28). O gene *SLC29A1* (rs760370) demonstrou-se significativo para toxicidades de grau 3 e 4 ($p=0,0033$; OR 4,73). Em conclusão, devido ao elevado grau de miscigenação da população brasileira, e particularmente do Norte do Brasil, os dados gerados de farmacogenômica do 5-FU são particularmente únicos se comparados com as populações homogêneas investigadas até o presente. Os genes *ABCC4*, *FPGS* e *SLC29A1* demonstraram ser importantes biomarcadores preditivos para a medicina personalizada da terapia com uso de 5-FU.

Palavras-chave: 5-Fluorouracil; toxicidade; resposta; SLC29A1; FPGS; ABCC4.

ABSTRACT

Recently, cancer has become an obvious public health problem worldwide. The Fluoropyrimidine-based regimen has been the most widely used chemotherapy regimen worldwide in several types of solid tumors, including gastric and colorectal cancer. Of the total number of patients treated with 5-Fluorouracil (5-FU), 10-40% have severe toxicities, which usually result in prolonged and costly hospitalizations. The principle of personalized medicine is to study responses to medications based on individual genomic information. The high degree of miscegenation is a challenge for the worldwide implementation of personalized medicine in clinical practice. Many studies in the specialized literature have reported the influence of pharmacogenomic markers in mixed populations such as the Brazilian population. The aim of this study was to investigate the pharmacogenomic variability of different biomarkers in pharmacogenes involved in the metabolism pathway of Fluoropyrimidines in patients with gastric cancer or colorectal cancer, which are sub-structured according to response and toxicity to treatment. To perform the research we used 216 patients with colorectal or gastric cancer who received 5-FU chemotherapy treatment. We investigated 33 genetic polymorphisms in 17 pharmacogens (*ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC4*, *ABCG2*, *CYP2A6*, *DPYD*, *FPSG*, *ITGB5*, *MTHFR*, *SLC22A7*, *SLC29A1*, *TP53*, *TYMS*, *UMPS*, *GGH*, *RRM1*, *TYMP*) involved in the metabolism pathway of fluoropyrimidines. Our results showed that 77.3% of the patients presented some type of toxicity related to 5-FU treatment, of which 22% presented severe toxicities classified in grade 3 and 4. Death occurred in 23 patients, where three cases were related to toxicity and four cases with tumor progression and chemotherapeutic toxicity. Population substructuring was not influential in the association results for pharmacogenetic polymorphisms with the use of 5-FU. The *FPSG* gene (rs4451422) was shown to be significant in association with overall toxicity ($p = 0.0052$; OR 0.32) and toxicity events ($p = 0.0004$; OR 0.22). The *ABCC4* gene (rs148551) had a significant association with the clinical response ($p = 0.0056$; OR 0.28). The *SLC29A1* gene (rs760370) was shown to be significant for grade 3 and 4 toxicities ($p = 0.0033$; OR 4.73). In conclusion, due to the high degree of miscegenation in the Brazilian population, and particularly in the North of Brazil, the generated 5-FU pharmacogenomics data are particularly unique when compared to the homogenous populations investigated to date. The *ABCC4*, *FPSG* and *SLC29A1* genes have been shown to be important biomarkers predictive of personalized medicine therapy using 5-FU.

Keywords: 5-Fluorouracil; Toxicity; response; *SLC29A1*; *FPSG*; *ABCC4*.

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O câncer pode ser definido como uma doença multifatorial, que resulta de interações complexas entre alterações genéticas e fatores ambientais. Desta forma pode se dizer que um único fator ambiental ou apenas uma alteração genética não leva ao desenvolvimento de tumores; são necessárias várias alterações genéticas para que se desenvolva uma neoplasia. A origem de um tumor ocorre através de várias alterações genéticas e epigenéticas. Essas alterações podem ser aberrações cromossômicas, ganho de função, perda de função, polimorfismos, ocorrendo comprometimento da manutenção da integridade genômica (Hanahan e Weinberg, 2011).

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

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

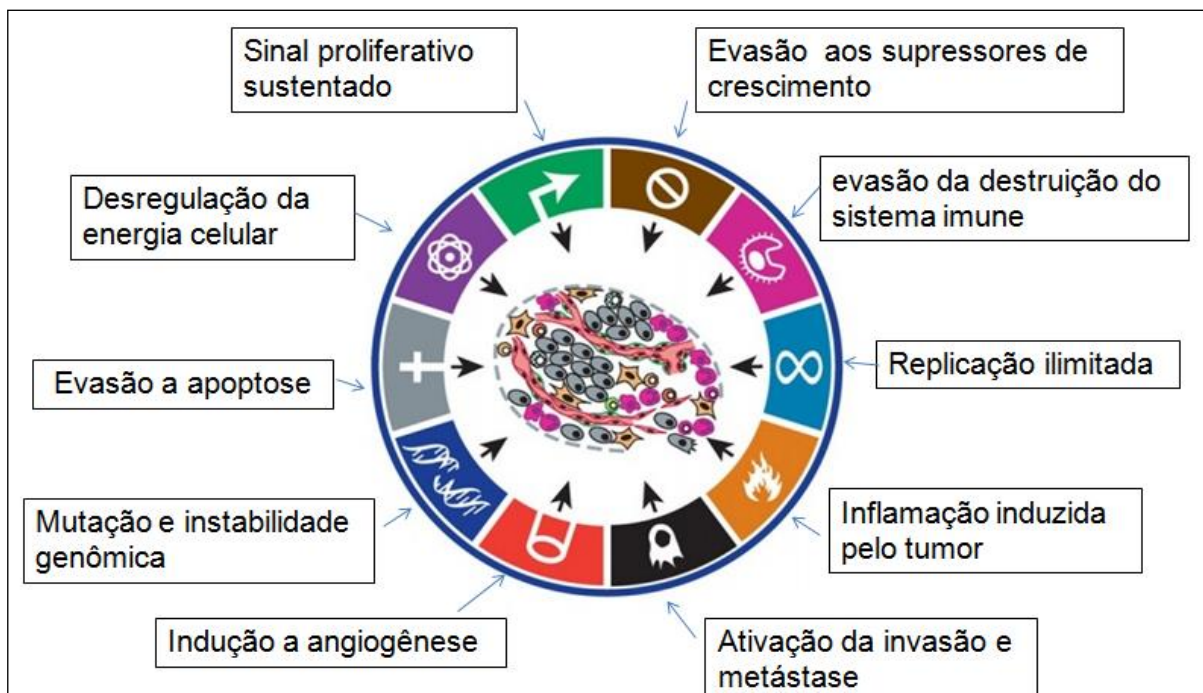


Figura 1. Capacidades adquiridas das células tumorais durante os múltiplos passos da carcinogênese.

Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Nas últimas décadas, o câncer se tornou um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização mundial de saúde (WHO) estima que no ano de 2030 o número de casos novos de câncer seja superior a 20 milhões, realidade esta que também pode ser associada ao processo de envelhecimento e crescimento populacional (Stewart e Wild, 2014).

A estimativa mundial mais recente, para o ano de 2012, previa 14,1 milhões de casos novos de câncer (excluindo câncer de pele não-melanoma) e 8,2 milhões de mortes causadas pela doença (Figura 2).

Os tipos de tumores com maior incidência e taxas de mortalidade entre os homens são câncer de pulmão (16,7%), próstata (15,0%), colorrectal (10,0%) e estômago (8,5%). Entre mulheres, os tipos mais incidentes são mama (25,2%), Colorrectal (9,2%), pulmão (8,7%), Colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%). As estimativas dos generos reunidos, demonstrou que os tipos mais incidentes eram pulmão (13%), mama (12%), colorrectal (10%), próstata (8%) e estômago (7%).

Quanto a mortalidade, o cancer de pulmão demonstrou-se o mais incidente com 19%, seguido pelo empate do cancer de fígado, estômago e colorrectal (9%) e mama (6%); (Stewart e Wild, 2014).

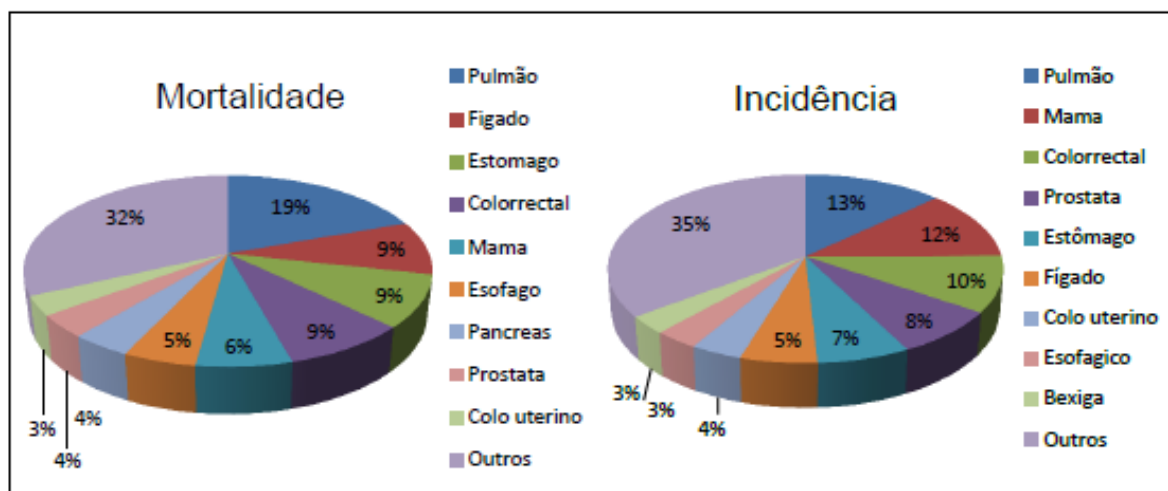


Figura 2. Estimativa de proporções de incidência e mortalidade de câncer, por tipo tumoral, em todo o mundo em 2012.

Fonte: Modificado de Stewart e Wild, 2014.

No Brasil, as estimativas de câncer para o biênio 2016/2017 apontam a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA/MS, 2015).

O câncer de pele não melanoma é o tipo mais incidentes na população em geral (180 mil), para os demais tipos de canceres as estimativas apontam cerca de 420 mil casos novos (INCA/MS, 2015). Na população brasileira, os cânceres mais incidentes serão: câncer de próstata, câncer de mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (Tabela 1). Quando estratificados pela incidência por gênero, as estimativas apontam que os casos mais incidentes para o gênero masculino serão: próstata (28,6%), pulmão (8,1%), cólon e reto (7,8%) e estômago (6%); e para o gênero feminino: câncer de mama(28,1%), cólon e reto (8,6%), colo do útero (7,9%), e pulmão (5,3%);(INCA/MS, 2015).

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

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

*Números redondos de 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: INCA/MS, 2015.

A região Norte do Brasil, segundo as estimativas para o biênio 2016/2017, seria responsável por 17.190 casos novos de câncer, sem a contagem dos casos de neoplasia de pele não melanoma. Deste total, o gênero masculino seria responsável por cerca de 8.650 casos e o gênero feminino por 8.540 casos. A Figura 3 evidencia de acordo com o gênero, a distribuição de diferentes formas de câncer na região Norte do Brasil. No gênero masculino, as formas mais frequentes de câncer seriam o de próstata, estômago, pulmão e colorrectal. Para o gênero feminino os tipos mais frequentes seriam o câncer de colo uterino, seguido pelos casos de câncer de mama, colorrectal e estômago (INCA/MS, 2015).

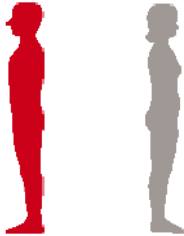
Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.470	28,6%			Colo do Útero	1.970	23,1%
Estômago	970	11,2%			Mama Feminina	1.810	21,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	680	7,9%			Cólon e Reto	480	5,6%
Cólon e Reto	440	5,1%			Estômago	480	5,6%
Bexiga	370	4,3%			Traqueia,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

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2016/2017 por gênero, na região Norte do Brasil, exceto câncer de pele não melanoma.

Os números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Modificado de INCA/MS, 2015.

No estado do Pará, a realidade da incidência do câncer segue o mesmo padrão do resto país, sendo responsável pelo total de 7.300 casos novos no biênio de 2016/2017. O gênero masculino é representado por 3.610 casos e o feminino por 3.690 casos, sem a inclusão do câncer de pele não melanoma. Os tipos de casos de neoplasias mais incidentes em todo o estado seriam próstata, mama feminina, colo do útero e estômago. Para o gênero masculino, as estimativas do estado concordam com as da capital, a cidade de Belém, as quais previam o câncer de próstata como o mais incidente, seguido pelos casos de estômago e pulmão. Para o gênero feminino, as estimativas para o estado do Pará revelaram como os tipos mais incidentes o câncer de mama, colo do útero, e os tipos de estômago e colón e reto, com os mesmos números. Quando as estimativas foram voltadas para a capital do estado, notou-se que o câncer de mama seria o mais incidente, seguido pelo colo do útero, colón e reto e estômago (INCA/MS, 2015).

1.1. CÂNCER GÁSTRICO

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

Segundo a classificação histopatológica de Laurén (1965) os adenocarcinomas gástricos são agrupados em dois tipos principais: difuso e intestinal. O tipo intestinal de adenocarcinoma gástrico também é chamado de tipo “epidêmico”, uma vez que depende em grau superior de fatores ambientais e está associado à presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia. O tipo difuso apresenta prognóstico ruim, geralmente não está associado a lesões pré-cancerosas e apresenta um padrão de crescimento invasivo (Assumpção e Burbano, 2005).

O carcinoma gástrico representa um grupo de tumores biologicamente e geneticamente heterogêneos com etiologia multifatorial. O acúmulo de danos genômicos alteram as funções celulares essenciais para o desenvolvimento do câncer, auto-suficiência da sinalização de crescimento celular, escape de sinalização anti-crescimento, resistência a apoptose, potencial de replicação autossustentável, indução a angiogênese e potencial invasivo ou metastático.

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

1.2. CÂNCER COLORRECTAL

O câncer colorrectal é a definição utilizada para carcinomas, localizados no cólon ou reto. O câncer de cólon e reto (CID-10 C18 e C20) é o terceiro tipo de tumor mais frequente no Brasil e no mundo, com alta incidência de mortalidade (9%, do total); (Stewart e Wild, 2014).

O câncer colorrectal é uma doença associada ao “estilo de vida”, altas incidências são observadas em países com dieta rica em calorias e gordura animal, carnes processadas, populações com hábitos sedentários, obesidade e ingestão de álcool e tabagismo. Em alguns países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, o padrão de incidência mantém-se estável ou em redução nos últimos anos, esta realidade pode estar associada à detecção precoce de lesões pré-cancerosas (NCI, 2016).

A história natural do câncer de cólon e reto fornecem condições para a realização da prevenção e detecção precoce da doença. Métodos endoscópicos (colonoscopia) e a pesquisa por sangue oculto nas fezes são ferramentas de detecção precoce capazes de detectar pólipos adenomatosos e diagnosticar tumores em fases iniciais. A sobrevida associada a este tipo de câncer está diretamente ligada ao estágio em que a doença é diagnosticada, quando mais cedo ocorrer o diagnóstico, maiores são as chances de cura e sobrevida (INCA/MS, 2015).

Esses tipos tumorais podem se desenvolver de forma esporádica; por síndrome familiar (20% dos casos) ou ainda como agravo da doença inflamatória intestinal, em cada uma dessas opções os tumores possuem características distintas (Stewart e Wild, 2014).

2. TRATAMENTO DO CÂNCER

Nos últimos anos, os avanços tecnológicos determinaram uma verdadeira revolução no tratamento do câncer. Cirurgia, quimioterapia e radioterapia integram o amplo arsenal no combate a doença (Stewart e Wild, 2014). Na maioria dos casos, o uso combinado de tratamentos proporciona excelentes resultados. O desafio atual para todos os profissionais da área oncológica consiste em encontrar a maneira mais eficaz de tratar a doença com o mínimo de efeitos colaterais para o paciente.

2.1. QUIMIOTERAPIA (QT)

É a forma de tratamento sistêmico do câncer que usa medicamentos denominados genericamente de “quimioterápicos” (sejam eles quimioterápicos propriamente ditos, hormonioterápicos, bioterápicos, imunoterápicos, alvoterápicos) que são administrados continuamente ou a intervalos regulares, que variam de acordo com os esquemas terapêuticos (INCA/MS, 2015).

A quimioterapia pode ser aplicada em quatro grandes setores: neoadjuvante, adjuvante, terapêutica e radiosensibilizante. Quando a

quimioterapia é o tratamento principal, pode ser então chamada de terapêutica. Em casos onde existe a possibilidade de cura, denomina-se curativa e quando não possui esta possibilidade (tumores em estádios avançados e/ou metastáticos) recebe a denominação de paliativa (Gimenes e Costa, 2013).

A quimioterapia neoadjuvante é aplicada quando existe a intenção e possibilidade de redução no tamanho do tumor primário, para tornar viável a retirada de um tumor avançado em cirurgia, ou mesmo a retirada do tumor com margem de segurança preservando o órgão acometido. A quimioterapia adjuvante é utilizada após a cirurgia e remoção total do tumor, nos casos em que existe o risco de recorrência local ou à distância, baseado em características anatomopatológicas do tumor.

A quimioterapia pode ainda ser usada em combinação a radioterapia, com o objetivo de potencializar o efeito do tratamento, podendo ser aplicado em modalidades neoadjuvante ou adjuvante (Gimenes e Costa, 2013).

Os regimes de quimioterapia variam de acordo com o tipo e estágio da neoplasia e condições clínicas do paciente. A dose básica dos quimioterápicos, geralmente é ajustada para cada paciente de acordo com a superfície corpórea do paciente, com a utilização de uma fórmula matemática que utiliza peso e altura. Alguns quimioterápicos têm dose única, que não se modifica com a superfície corporal, e alguns outros são prescritos por Kg, do peso corporal do paciente (INCA/MS, 2015).

Os esquemas terapêuticos podem ser classificados em monoquimioterapia (utilização de um fármaco) e poliquimioterapia (associação de vários fármacos). Em geral, o tratamento é realizado em ciclos de quimioterapia, e dependendo do regime terapêutico pode ser aplicados por dia, semana, quinzena, de 3/3 semanas, de 4/4 semanas, 5/5 semanas ou de 6/6 semanas. Quando se completa a administração do(s) quimioterápico(s) de um esquema terapêutico, diz-se que se aplicou um ciclo. Cada ciclo é repetido dentro de um intervalo mínimo de dias. O principal objetivo da administração em ciclos é permitir a recuperação do organismo aos efeitos colaterais da quimioterapia, que pode ser variável de acordo com o fármaco utilizado (INCA/MS, 2015; Gimenes e Costa, 2013).

O esquema terapêutico com base em Fluoropirimidinas tem sido a conduta quimioterápica mais utilizada em todo o mundo em vários tipos de tumores sólidos, incluindo casos de câncer gástrico e colorrectal (Shimoyama, 2009; Mohelnikova-Duchonova *et al.*, 2014). O sistema único de saúde do Brasil (SUS) segue esta conduta utilizando largamente este quimioterápico no tratamento oncológico de tumores sólidos.

2.1.1. 5-FLUOROURACIL (5-FU)

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

O 5-FU é um composto análogo de uracil e timina, que apresenta um átomo de flúor ligado ao carbono 5, em substituição ao átomo de hidrogênio ou ao grupamento metil, característicos destas bases nitrogenadas (Figura 4).

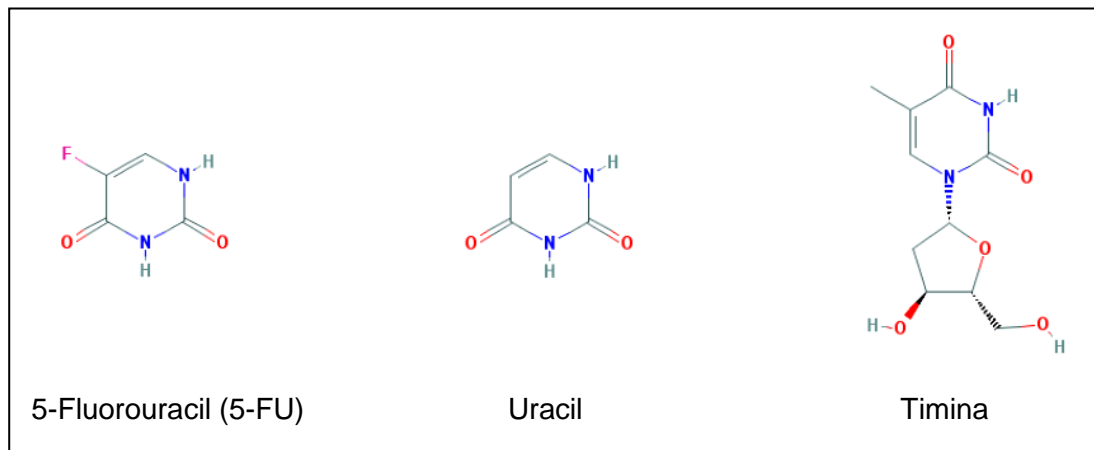


Figura 4: Estrutura química do 5-FU, Uracil e Timina, respectivamente.

Fonte: Adaptado de PubChem/NCBI (Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ele entra rapidamente na célula usando o mesmo mecanismo de transporte facilitado da uracil (Savva-Bordalo *et al.*, 2010).

O 5-Fluorouracil (5-FU) possui dois mecanismos principais de ação descritos, Primeiramente, age como um antimetabolito através da forma ativa

FdUMP que inibe a função do gene timidilato sintetase (TYMS) na produção de TS, uma enzima chave na duplicação e transcrição do DNA. Outro mecanismo utilizado seria a promoção da morte celular e apoptose, através da incorporação de produtos ativos FUTP ou FdUTP no RNA e DNA, respectivamente (*Wang et al.*, 2014).

Desde a sua introdução há mais de 50 anos, o 5-FU permanece como o fármaco quimioterápico mais utilizado para o tratamento de vários tumores sólidos, incluindo de cabeça e pescoço, trato gastrointestinal, mama e pâncreas (*Mohelnikova-Duchonova et al.*, 2014; *Matsusaka e Lenz*, 2015).

O 5-FU, utilizado sozinho ou em combinação, é o mais prevalente e efetivo agente quimioterápico utilizado no tratamento de cânceres do trato gastrointestinal. A combinação de 5-FU com quimioterapias mais recentes, como irinotecano e oxaliplatina melhorou significativamente as taxas de resposta e sobrevida em pacientes com câncer colorretal avançado (*Lamas et al.*, 2011; *Mohelnikova-Duchonova et al.*, 2014).

Muitos estudos discutem os fatores que determinam a eficácia clínica da quimioterapia baseada em 5-FU. Os pacientes tratados com 5-FU, frequentemente recebem poliquimioterapia de 5-FU e Leucovorin (LV). O Leucovorin é um fármaco utilizado no tratamento anticancerígeno, apesar de não exercer ação antitumoral direta, seu efeito desejado é a potencialização da função citotóxica de 5-FU (*Tsukioka et al.*, 2011). O LV é um precursor para 5,10-metilenoTHF, o qual promove a estabilização do complexo ternário inibidor de TS (5,10-metilenoTHF-TS-FdUMP). O composto 5,10-metilenoTHF com cadeia mais longa em formato de poliglutamato é mais facilmente conservado no interior celular e mais eficiente na formação e estabilização do complexo ternário, comparado aos folatos monoglutamatos de cadeia curta. O gene FPGS age na via do folato promovendo a conversão de folatos monoglutamatos em poliglutamatos (*Shimamoto et al.*, 2016).

Os pacientes tratados com 5-FU podem apresentar distintas reações adversas: mielosupressão, cardiotoxicidade, reações hematológicas (leucopenia, incluindo neutropenia febril, anemia, e trombocitopenia), reações gastrointestinais

(mucosite oral e intestinal, estomatite, diarreia, náuseas e vômitos) e toxicidades dermatológicas (perda de cabelo, síndrome mão e pé (HFS) e pele seca); (Champbel *et al.*, 2016).

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

A toxicidade associada ao uso de 5-FU é mais frequente em mulheres e pacientes com idade avançada. Outros fatores clínicos também podem ser relacionados à toxicidade e precisam de maiores investigações, como a influência étnica, estadiamento tumoral, alcoolismo e a via de administração do fármaco (Chansky *et al.*, 2005; Champbel *et al.*, 2016).

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

O perfil de toxicidade entre as duas principais formas de administração de 5-FU são diferentes. A administração por bolus (monoterapia de 5-fu) possui atividade limitada, com risco elevado de desenvolver toxicidade hematológica severa de grau 3 - 4 e principalmente neutropenia, devido as altas concentrações plasmáticas do fármaco, obtendo taxas reduzidas de resposta ao tratamento (10%). As taxas de resposta com a administração de 5-FU por via infusional, estão associadas a ocorrência de síndrome de mão e pé, que ficam em torno de duas vezes mais frequentes. (Di francia *et al.*, 2015; Matsusaka e Lenz, 2015).

3. FARMACOGENÉTICA/FARMACOGENÔMICA (PGx)

A farmacogenética por definição refere-se ao estudo das diferenças genéticas em vias metabólicas que podem afetar as repostas de um indivíduo a fármacos em termos de efeitos terapêuticos e adversos. Diversos fatores tais como: sexo, idade, etnia, fumo, etilismo e variações genéticas podem influenciar

na resposta de um paciente ao medicamento. Assim a farmacogenética busca estudar como as diferenças genéticas influenciam na resposta a agentes farmacológicos (Suarez-Kurtz, 2010; Ahmed *et al.*, 2016).

A abordagem tradicional da farmacogenética baseia-se em estudar polimorfismos na sequência de DNA de genes que, provavelmente, afetam a resposta aos medicamentos. Mais recentemente, na era pós-genômica uma nova linha de ação tem sido desenvolvida, a farmacogenômica, a qual considera que o efeito farmacológico depende da interação de diferentes genes envolvidos na metabolização do fármaco. Além da correlação entre a eficácia do fármaco e toxicidade com as variações do genoma dos pacientes (Suarez-Kurtz, 2010; Matsusaka e Lenz, 2015)

Portanto o objetivo dos estudos em Farmacogenética/Farmacogenômica (PGx) são buscar uma terapia individualizada, que possa maximizar a eficácia dos medicamentos e minimizar os efeitos adversos associados aos fármacos (Suarez-Kurtz 2010; Ahmed *et al.*, 2016). O princípio da medicina personalizada consiste em estudar as respostas a medicamentos baseados na informação genômica individual do paciente (Ahmed *et al.*, 2016).

Cada indivíduo tem uma composição genética diferente, o que influencia na variabilidade no risco de desenvolver doenças, bem como respostas aos fármacos e fatores ambientais. As diferenças genômicas entre os indivíduos são presentes em aproximadamente 300-1000 nucleótidos com mais de 14 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) distribuídos por todo o genoma humano (Ahmed *et al.*, 2016).

A compreensão das variações nos comportamentos interindividuais de resposta a fármacos tem sido melhorada devido ao rápido desenvolvimento da farmacogenômica nos últimos anos. Cada indivíduo em uma grande população de pacientes responde de forma diferente, o que possivelmente explica por que um tratamento que tem sido comprovadamente eficaz em alguns pacientes muitas vezes não consegue obter respostas adequadas em outros (Ahmed *et al.*, 2016).

O paradigma populacional em PGx se baseia na observação de que a frequência de inúmeros polimorfismos em “farmacogenes” varia amplamente

entre as populações (Suarez-Kurtz, 2010). Desta forma, investigações farmacogenéticas em diferentes grupos humanos podem identificar populações que podem se beneficiar de mais de um fármaco, ou identificar efeitos adversos que não são vistos em outras populações (Suarez-Kurtz, 2010).

3.1. FARMACOGENÉTICA APLICADA AO CÂNCER

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

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

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

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

Nos últimos anos muito se tem investigado sobre causas de respostas individuais diferenciadas em relação ao tratamento quimioterápico. Hoje é possível identificar avanços significativos no conhecimento das interações entre

polimorfismos presentes em determinados genes e a resposta individual ao tratamento com fármacos específicos. Este é o caso dos polimorfismos do gene *HER2* e o tratamento com Trastuzumab em câncer de mama, bem como o de polimorfismos do gene *EGFR* e o tratamento com Gefitinib, em câncer de pulmão de não pequenas células (Burstein *et al.*, 2003; Viani *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011). Resultados obtidos nestas investigações sugerem que fatores genéticos podem, de fato, serem considerados os principais determinantes da resposta a fármacos, pelo menos para alguns medicamentos.

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

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

Atualmente está disponível uma grande variedade de fármacos que podem contribuir para o aprimoramento da terapia oncológica e que tem aproveitamento clínico diferenciado em relação à presença de polimorfismos genéticos conhecidos. Para esses medicamentos a “*Food and Drug Administration-FDA*” recomenda a utilização de testes farmacogenéticos específicos capazes de prever a resposta do paciente ao medicamento. Esta é uma tentativa de maximizar a eficácia terapêutica e evitar efeitos tóxicos decorrentes da terapia.

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

pacientes tratados que possuam genótipo de risco (PharmGKB: www.pharmgkb.com).

A Tabela 2 demonstra os principais modelos farmacogenéticos aprovados pela FDA utilizados na prática clínica para terapias antineoplásicas.

Tabela 2. Biomarcadores farmacogenômicos contidos em rótulos de medicamentos aprovados pelo FDA associados à terapêutica oncológica.

MEDICAMENTO	BIOMARCADOR	SEÇÕES DO RÓTULO
Trióxido de arsênio	PML/RAR α	Box de aviso, farmacologia clínica, indicações e utilização, aviso
Brentuximab vedotin	CD30	Indicações e posologia, descrição, farmacologia clínica
Busulfan	Cromossomo Ph	Estudos clínicos
Capecitabina	DPD	Contraindicações, precauções, informações do paciente
Cetuximab	EGFR, KRAS	Indicações e posologia, dosagem e administração, avisos e precauções, descrição, farmacologia clínica, estudos clínicos, reações adversas
Cisplatina	TPMT	Farmacologia clínica, avisos e precauções
Crizotinib	ALK	Indicações e posologia, avisos e precauções, reações adversas, farmacologia clínica, estudos clínicos
Erlotinib	EGFR	Farmacologia clínica
Everolimus	HER2/NEU	Indicações e posologia, avisos e precauções, reações adversas, uso em populações específicas, farmacologia clínica, estudos clínicos
Exemestano	ER e/ PgR receptor	Indicações e posologia, dosagem e administração, farmacologia clínica, estudos clínicos
Fluorouracil	DPD/TS	Contraindicações, precauções, informações do paciente
Fulvestrant	ER receptor	Indicações e posologia, informações de

		aconselhamento do paciente
Gefitinib	EGFR	Farmacologia clínica
Imatinib	C-kit, cromossomo Ph, PDGFR, FIP1L1-PDGFR α	Indicações e posologia, dosagem e administração, farmacologia clínica, estudos clínicos
Irinotecano	UGT1A1	Dosagem e administração, avisos, farmacologia clínica
Lapatinib	Her2/neu	Indicações e posologia, farmacologia clínica, informações de aconselhamento do paciente
Letrozole	ER e/ PgR receptor	Indicações e posologias, reações adversas, estudos clínicos, farmacologia clínica
Mercaptopurina	TPMT	Dosagem e administração, Contraindicações, Precauções, reações adversas, farmacologia clínica
Nilotinib	Cromossomo Ph, UGT1A1	Indicações e posologia, informações de aconselhamento do paciente, avisos e precauções, farmacologia clínica
Panitumumab	EGFR, KRAS	Indicações e posologia, avisos e precauções, farmacologia clínica, estudos clínicos
Pertuzumab	Her2/neu	Indicações e dosagem, avisos e precauções, reações adversas, estudos clínicos, farmacologia clínica
Rasburicase	G6PD	Boxe de aviso, Contraindicações
Tamoxifeno	ER receptor	Indicações e posologia, precauções, guia de medicação
Tioguanina	TPMT	Dosagem e administração, Precauções, avisos
Tositumomab	CD20 antigen	Indicações e posologia, farmacologia clínica
Trastuzumab	Her2/neu	Indicações e posologia, precauções, farmacologia clínica
Vemurafenib	BRAF	Indicações e posologia, avisos e precauções, farmacologia clínica, estudos clínicos, informações de aconselhamento do paciente

Modificado de FDA (www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm).

3.1.1. FARMACOGENÉTICA DO 5-FU

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

A fração restante de 5-FU é incorporada nas vias de síntese de DNA e RNA exercendo seu efeito citotóxico através da formação de três principais metabolitos ativos: trifosfato de fluorouridina (FUTP), monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) ou trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP);(Figura 5).

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

O composto FUDP pode ainda sofrer ação da enzima ribonucleotídeo redutase (RR) e ser convertido em difosfato de fluoro deoxiuridina (FdUDP). O FdUDP, formado a partir do FUMP pode ser desfosforilado ou fosforilado, gerando os metabólitos monofosfato de fluoro deoxiuridina (FdUMP) ou trifosfato de fluoro deoxiuridina (FdUTP), respectivamente (Figura 5).

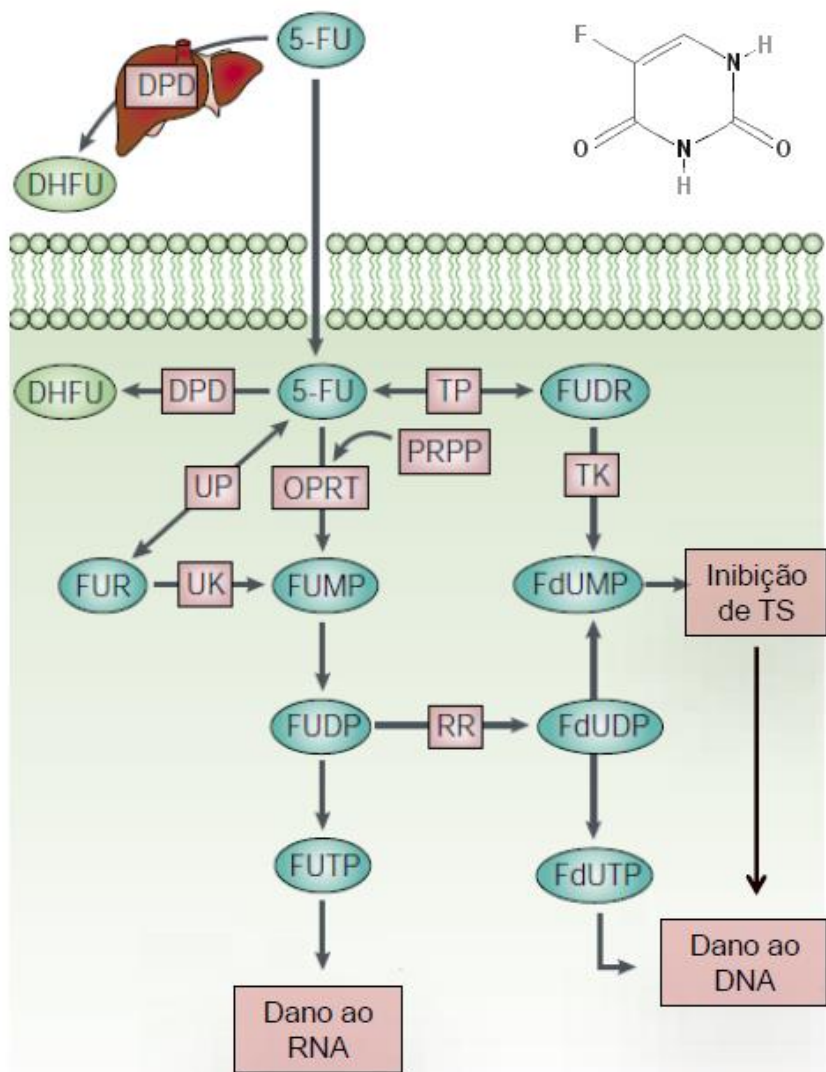


Figura 5. Metabolismo de 5-Fluorouracil.

DPD-diidropirimidina desidrogenase; **DHFU**-diidrofluorouracil; **OPRT**-orotato fosforibosiltransferase; **PRPP**-fosforibosil pirofosfatato; **FUMP**-monofosfato de fluorouridina; **FUDP**-difosfato de fluorouridina; **FUTP**-trifosfato de fluorouridina; **RR**-ribonucleotídeo redutase; **FdUMP**-monofosfato de fluorodeoxiuridina; **FdUDP**-difosfato de fluorodeoxiuridina; **FdUTP**-trifosfato de fluorodeoxiuridina; **TS**-timidilatosintase; **TK**-timidina cinase; **TP**-timidina fosforilase; **UP**-uridina fosforilase; **FUR**-fluorouridina; **UK**- uridina cinase; **FUDR**-fluorodeoxiuridina.

Adaptado de Longley *et al.*, 2003.

FdUMP é um importante metabólito ativo de 5-FU capaz de se ligar a enzima timidilato sintase (TS). Esta enzima é responsável pela metilação de monofosfato deoxiuridina (dUMP) para produzir deoxitimidina monofosfato

(dTMP) e formar um complexo ternário estável com a molécula (5,10-metilenotetrahidrofolato).

A TS funciona como um dímero, e ambas as subunidades possuem dois sítios de ligação específicas, sendo um para o dUMP e o outro para a molécula de CH₂THF (5,10-metilenotetrahidrofolato), doadora do grupamento metil necessário para a produção do timidilato (Figura 6).

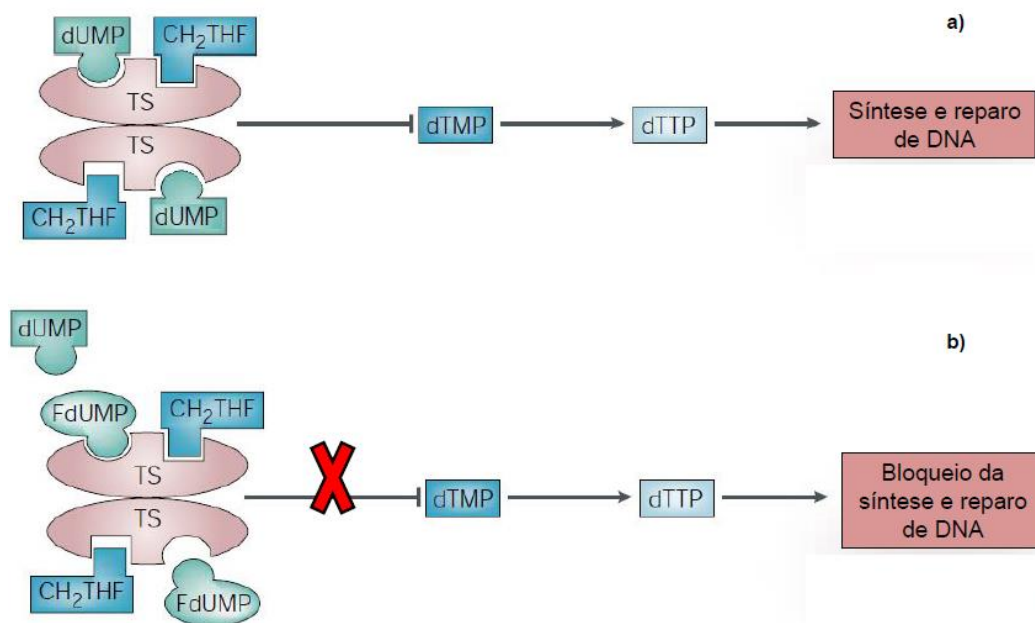


Figura 6. Esquema representativo da síntese de monofosfato de deoxitimina (dTMP). a) Esquema do complexo ternário da enzima TS: Na presença do composto dUMP, a enzima TS pode agir junto ao co-fator CH₂THF e converter dUMP em dTMP, que por sua vez gera dTTP, componente essencial da molécula de DNA; b) Esquema representativo da ação inibitória do metabólito ativo de 5-FU (FdUMP): FdUMP se liga ao sítio ativo da enzima TS formando um complexo ternário estável (TS+CH₂THF+FdUMP) bloqueando a ligação do composto dUMP e como consequência inibe a síntese de dTMP e dTTP, impedindo a síntese e/ou o reparo da molécula de DNA.

Adaptado de Longley *et al.*, 2003.

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

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

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

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

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

As agências regulamentadoras de fármacos: Agencia de fármacos europeia (EMA), Administração de fármacos e alimentos dos Estados Unidos (FDA), Agencia de produtos farmacêuticos e dispositivos médicos do Japão (PMDA) e Agencia de saúde do Canadá (HCSC) possuem recomendações de ajuste de dose e modificação da terapêutica oncológica com Fluoropirimidinas, de acordo com os genótipos de *2, *13 e rs67376798, do gene DPYD e o VNTR de 28 pb no gene TYMS (PharmGKB: <https://www.pharmgkb.org/>).

As diretrizes sobre o uso de testes farmacogenômicos na dosagem de fluoropirimidinas foram publicadas no Consórcio de implementação da

farmacogenética clínica (CPIC) por Caudle et al em 2013. No trabalho, recomenda-se a utilização de um fármaco alternativo em vez de fluorouracil para pacientes com fenótipo metabolizador deficiente de DPYD, e uma dose reduzida (em 50%) de fluorouracil ou, o uso de um fármaco alternativo, em pacientes metabolizadores intermediários (Tabela 3); (Caudle *et al.*, 2013).

Para o gene TYMS, a recomendação ainda está restrita pela FDA, baseada na publicação de Soo e colaboradores em 2016. Neste estudo recomenda-se que pacientes com tumores sólidos avançados tratados com Capecitabine, da Índia, Malásia e China, sejam genotipados na região promotora do gene TYMS (TSER). A recomendação indica que pacientes com genótipo TSER 3R/3R podem responder melhor a uma dose mais elevada (1.500mg/m²) de Capecitabine do que 1.250 mg/m², aprovados pela FDA (Soo *et al.*, 2016).

Diferentes investigações na literatura associam a diversidade de resposta à quimioterapia, com base em Fluorouracil, a diversos genes envolvidos na via de metabolização deste fármaco (Fernandez-Rosadilla *et al.*, 2013; Matsusaka e Lenz, 2015; Rosmarin *et al.*, 2015; Mohelnikova-Duchonova *et al.*, 2014; Campbell *et al.*, 2016).

3.1.2. GENE *DPYD*

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

DPYD é um gene altamente polimórfico, com mais de 35 alelos variantes descritos nas regiões codificantes, no qual um terço é funcionalmente relevante

(Meulendijks *et al.*, 2016). A deficiência de DPD foi descrita pela primeira vez como doença recessiva em pacientes que com diversas complicações neurológicas e acúmulo de uracil e timina na sua urina. O paciente com deficiência completa da atividade DPD possui uma doença metabólica familiar rara, pirimidemia, que leva a neurotoxicidade grave relatada durante o tratamento com Fluoropirimidinas (Matsusaka e Lenz, 2015).

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

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

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

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

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

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

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

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

As mutações de DPYD (*2A; *13; rs67376798) que levam a deficiência parcial ou completa de fenótipos de DPD tem demonstrado ser importantes biomarcadores moleculares preditivos de toxicidade grave em pacientes submetidos a terapia com Fluoropirimidinas. As agências internacionais regulamentadoras de fármacos recomendam a utilização desses marcadores moleculares nas Diretrizes sobre o uso de testes farmacogenômicos na dosagem de fluoropirimidinas (Tabela 3); (Matsusaka e Lenz, 2015).

Tabela 3. Dosagem de Fluoropirimidinas recomendada por genótipo/fenótipo

Fenótipo (Genótipo)	Diplótipos	Implicações de fenótipos	Recomendação de dosagem	Classificação de recomendação
<p>Homozigoto selvagem ou normal</p> <p>Alta atividade de DPD (dois ou mais alelos funcionais)</p>	*1/*1	<p>Atividade normal de DPD</p> <p>Risco “normal” para toxicidade associado a exposição com fluoropirimidinas</p>	Recomendação de dosagem e administração de acordo com a bula	Moderada
<p>Heterozigoto ou atividade intermediária</p> <p>(3-5% de pacientes) Podem ser deficientes parciais de DPD com risco de toxicidade quando expostos ao fármaco (um alelo funcional *1 + um alelo não funcional *2A/*13/rs67376798A)</p>	*1/*2A; *1/*13; *1/rs67376798A	<p>Atividade reduzida de DPD</p> <p>(atividade de 30% a 70% comparada a população normal) atividade DPD e aumento do risco de toxicidade grave e toxicidade fatal quando tratados com fármacos a base de fluoropirimidinas</p>	Iniciar com uma redução de pelo menos 50% na dose inicial seguida de uma titulação da dose com base na toxicidade ^a ou teste farmacocinético (se disponível)	Moderada
<p>Homozigoto mutante</p> <p>Atividade deficiente de DPD</p> <p>(0.2% dos pacientes), com risco de toxicidade na exposição ao fármaco (2 alelos não funcionais *2A/*13/rs67376798A)</p>	*2A/*2A; *13/*13; rs67376798A/rs67376798A	<p>Deficiência completa de DPD</p> <p>Aumento no risco de toxicidade grave e toxicidade fatal quando tratados com fármacos a base de fluoropirimidinas</p>	Selecionar um fármaco alternativo	Forte

^a Aumentar a dose em pacientes sem toxicidade ou toxicidade tolerável para manter a eficácia; diminuir a dose em pacientes que não toleram a dose inicial para minimizar toxicidades.

Adaptada de Caudle *et al.*, 2013.

3.1.3. GENE *TYMS*

O gene da Timidilato sintetase (*TYMS*) está localizado na região 18p11, possui 30kb de tamanho e é composto por sete éxons. O gene *TYMS* produz uma

enzima TS, que catalisa a conversão de desoxiuridinamonofosfato (dUMP) para desoxitimidinamonofosfato (dTMP);(Matsusaka e Lenz, 2015).

O dTMP é a única fonte de timidina intracelular, portanto TS é uma enzima chave para a produção de DNA. O FdUMP metabolito do fármaco 5-FU forma um complexo ternário estável entre TS e 5,10-CH₂THF. Assim, FdUMP inibe a atividade de TS e pode interromper a síntese normal de DNA. A atividade da timidilato sintase é um dos fatores determinantes da toxicidade e eficácia relacionadas ao 5-FU (Shimoyama, 2009; Balboa-Beltran *et al.*, 2015).

Os níveis de expressão de TS e outras enzimas envolvidas no metabolismo de 5-fu desempenham um papel chave na determinação da eficácia de 5-fu. Especificamente, a superexpressão da via TS representa um caminho de resistência das células tumorais ao 5-FU, como amplamente confirmado por estudos pré-clínicos e clínicos. Vários estudos analisaram a correlação entre a expressão de TS e a resposta à quimioterapia com 5-FU (Balboa-Beltran *et al.*, 2015; Matsusaka e Lenz, 2015).

Entre os polimorfismos relevantes na alteração de expressão de TS, destacam-se: a) o VNTR (variação de repetição em tandem) de 28-pb na região promotora do TS (TSER);(rs45445694) e b) Uma inserção/deleção de 6-pb na posição 1494 na região não traduzida 3'-UTR (rs151264360); (Matsusaka e Lenz, 2015).

O VNTR está localizado na região 5'UTR da região promotora de TS (TSER), resultando em alelos com duas ou até nove cópias (TSER*2; TSER*9) de uma sequência repetida de 28-pb (Balboa-Beltran *et al.*, 2015).

No estudo de revisão feito por Matsusaka e Lenz em 2015 foi relatada uma relação inversa entre o número de repetições em tandem no gene TYMS e a severidade da toxicidade ao uso de 5-FU. Pacientes com câncer colorretal que receberam quimioterapia baseada em 5-FU, e com o alelo variante TSER*2 apresentam um risco significativamente maior de toxicidade grave à quimioterapia. Pacientes com genótipo *2/*2 foram 20 vezes mais propensos a ter toxicidade de grau 3-4 em comparação com aqueles que possuem o genótipo *3/*3 (Matsusaka e Lenz, 2015).

Contudo, fenômenos contraditórios foram relatados quanto à relação entre o número de repetições em tandem e a resposta tumoral ou sobrevivência do doente. A sobrevivência ou resposta a 5-FU em pacientes com genótipo 3R/3R foi melhor ou igual ao genótipo 2R/2R (Shimoyama, 2009).

O número de repetições em tandem dos 28pb difere amplamente entre grupos étnicos, com os homozigotos 3R com frequência de 38% em Caucasianos e 67% em chineses. As repetições de 4 ou 9 vezes no gene TYMS podem ser encontradas em altas frequências em africanos (2-7%) em comparação com caucasiano ou asiático (0-1%); (Shimoyama, 2009).

A deleção de 6pb na região 3'UTR do gene TYMS está localizada a 447pb acima do códon de parada da transcrição, assim promovendo uma supressão do sítio de ligação AUF-1 que regula a transcrição deste gene.

Diversos trabalhos na literatura evidenciam frequências divergentes para a deleção no gene TYMS em grupos étnicos diferentes. Nas Populações de origem caucasoide são relatadas frequências variando de 26-29%, em populações de origem africana esta deleção fica em torno de 50% e no grupo étnico asiático foram observadas frequências em torno de 80% (Ulrich *et al.*, 2000; Mandola *et al.*, 2004).

A deleção (6-/6-) tem sido associada com a alteração na estabilidade do RNAm de TYMS levando a diminuição da resposta a quimioterapia a base de 5-FU (Scartozzi *et al.*, 2009).

Um estudo realizado por Mandola et al. encontrou que pacientes com câncer colorretal, homozigotos para a deleção de 6pb em TYMS, apresentaram níveis de expressão de RNAm reduzidos em 3 vezes, quando comparados aos pacientes homozigotos para a presença dos 6bp (Mandola *et al.*, 2004).

Outro estudo também em pacientes com câncer colorretal que possuem duas cópias do VNTR de 28 pb em haplótipo com a inserção de 6 pb no gene TYMS (*2/ins;6bp) apresentaram maior severidade de efeitos adversos ao 5-FU, comparados aos pacientes com outros genótipos (Matsusaka e Lenz, 2015).

A análise das variantes em *TS* pode servir como predição da quimioterapia com 5-FU, avaliando a resposta e risco de toxicidade no tratamento do câncer colorrectal e gástrico (Scartozzi *et al.*, 2009; Shimoyama, 2009).

Com base na publicação de Soo e colaboradores de 2016, a FDA recomenda que pacientes da Índia, Malásia e China com tumores sólidos avançados tratados com Capecitabine, sejam genotipados na região promotora do gene *TYMS* (*TSER*). A recomendação indica que pacientes com genótipo *TSER 3R/3R* podem responder melhor a uma dose mais elevada ($1.500\text{mg}/\text{m}^2$) de Capecitabine em relação ao protocolo padrão de $1.250\text{ mg}/\text{m}^2$ (Soo *et al.*, 2016). Esta determinação demonstra o carácter étnico regional de algumas recomendações das agências reguladoras de fármacos (Soo *et al.*, 2016).

3.2. INFLUÊNCIA ÉTNICA EM ESTUDOS FARMACOGENÉTICOS

A miscigenação é um desafio para a implementação mundial da medicina personalizada (PGx) na prática clínica. A heterogeneidade de miscigenação da população brasileira, entre os três grupos ancestrais: os ameríndios, europeus e africanos, proporcionam grandes implicações nos ensaios clínicos de resposta farmacológica.

A frequência alélica de importantes *locus* farmacogenéticos varia entre diferentes populações geográficas. (Santos *et al.*, 2010). As variações de frequências alélicas entre populações, provavelmente são o resultado de deriva genética, mas podem também refletir a adaptação ao local e a fatores seletivos como condições climáticas e dieta alimentar (Jobling, 2004; Balaresque *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2011).

Essa heterogeneidade tem implicações importantes no desenho e interpretação de ensaios clínicos farmacogenéticos, na implementação dos princípios de PGx, na prescrição de medicamentos e, ainda, em relação à extrapolação de dados farmacogenéticos obtidos de outras populações. A diversidade populacional do Brasil implica que a extrapolação de dados oriundos

de grupos étnicos relativamente bem definidos, não é aplicável à maioria dos brasileiros (Suarez-Kurtz, 2010).

A FDA possui uma orientação na qual recomenda que sejam feitas investigações do perfil de metabolismo diferenciado entre subgrupos étnicos para comparar resultados entre populações e avaliar diferenças individuais potenciais na farmacogenética/farmacogenômica que possam afetar a segurança e eficácia do tratamento nessas populações. A orientação identifica situações para as quais os fármacos podem ser "eticamente sensíveis" e sugere estudos complementares que possam ser necessários para a extrapolação clínica dos resultados de uma região geográfica ou etnia para outras (Yasuda *et al.*, 2008).

Alguns fatores que podem contribuir para essa "sensibilidade étnica" de um fármaco incluem: polimorfismos em genes envolvidos nas vias metabólicas, altas curvas de dose-resposta e alta variação interindividual na biodisponibilidade (Collection of Race and Ethnicity Data in Clinical Trials, FDA, <http://www.fda.gov/downloads/regulatoryinformation/guidances/ucm126396.pdf>).

Entre os exemplos de fármacos etnicamente dependentes destaca-se a Warfarina, um fármaco largamente utilizado com efeito anticoagulante. A principal enzima envolvida na farmacocinética da Warfarina é a CYP2C9, genótipos variantes neste gene estão associados a um risco elevado de hemorragia grave. A frequência destas variações genótípicas no gene CYP2C9 é significativamente maior em populações europeias e americanas do que em afro-americanos (Yasuda *et al.*, 2008).

Variações polimórficas no gene VKORC1, que codifica o alvo farmacológico da Warfarina, a vitamina K epóxi redutase, podem alterar a sensibilidade e ação da Warfarina. A frequência desses polimorfismos varia muito em todo mundo sendo extremamente alta em populações asiáticas (torno de 82%) dessa forma é recomendada a redução da dose administrada nessas populações (Yasuda *et al.*, 2008; Pena *et al.*, 2011).

Devido a grande variação em polimorfismos de grande impacto na expressão de duas enzimas fundamentais no metabolismo da Warfarina a FDA recomenda que indivíduos com ancestralidade afro-americana recebam doses

mais elevadas do fármaco, comparadas às doses recomendadas para indivíduos asiáticos.

Outro exemplo é representado pelo gene *CYP3A5*, cuja enzima é responsável pela inativação de vários fármacos incluindo imunossupressores como Tacrolimus e Ciclosporina. Pacientes submetidos a transplante de rins, de etnicidade afro-americana necessitam doses maiores de Tacrolimus, comparados a pacientes de etnicidade europeia-americana (Yasuda *et al.*, 2008).

O esquema S-1, é um importante exemplo de fármaco etnicamente dependente, consiste numa inovadora quimioterapia utilizada para tratar diferentes tipos de câncer, incluindo câncer gástrico, mama, pulmão, colorretal e pâncreas. Este esquema emprega uma Fluoropirimidina oral (Tegafur) e dois moduladores (Gimeracil e Oteracil);(Ikeda *et al.*, 2000).

O tegafur (FT) é convertido em metabolito ativo (5-FU) no fígado, principalmente pelo citocromo P450 2A6 (*CYP2A6*); (Ikeda *et al.*, 2000). O Gimeracil inibe competitivamente a enzima DPD, a qual tem papel chave na degradação do 5-FU, dessa forma aumentando a atividade anticancerígena e também a meia-vida de 5-FU no organismo. O modulador Oteracil inibe a fosforilação do 5-FU no intestino através do bloqueio da via enzimática do OPRT, reduzindo a ocorrência de toxicidades gastro-intestinais que são causadas pelo metabolito ativo de 5-FU, sem interferir na sua atividade antitumoral (Shirasaka *et al.*, 1993).

A terapia com S-1 está sendo empregada principalmente nos países asiáticos, por apresentar nesse continente as melhores taxas de sobrevida e cura em relação aos esquemas tradicionais de quimioterapia oncológica (Koizumi *et al.*, 2008). No entanto, observou-se que o esquema S-1 não foi bem aceito em pacientes do continente europeu, devido a elevadas taxas de toxicidade e mortalidade associadas ao tratamento (Chuah *et al.*, 2011).

Diversos autores afirmam que a divergência na resposta ao esquema S-1 pode ser explicada por diferenças étnicas (Ajani *et al.*, 2005; Hoff *et al.*, 2003). Essa diferença de tolerância pode estar associada a polimorfismos presentes no

gene *CYP2A6*, cuja atividade mostra variabilidade interindividual considerável (Fujita *et al.*, 2006).

São diversos os exemplos de medicamentos que possuem resposta alterada em decorrência de variações genéticas em diferentes grupos étnicos (Eichelbaum *et al.*, 2006). Para alguns desses medicamentos a FDA acrescenta no rótulo do fármaco algumas informações farmacogenômicas, sugerindo o ajuste da administração de dosagem (Wang *et al.*, 2011).

Poucos estudos na literatura especializada relataram a influência de marcadores farmacogenômicos em populações miscigenadas como a população brasileira, em especial da região norte do Brasil, que possui contribuição significativa da ancestralidade ameríndia. Portanto, estudos que descrevam o perfil epidemiológico molecular nesta população a fim de ajudar na implementação da medicina personalizada direcionada a população brasileira são de extrema importância (Santos *et al.*, 2010; Suarez-Kurtz, 2010).

4. ANCESTRALIDADE

A identificação de genes (e formas alternativas desses genes) responsáveis por efeitos adversos em resposta aos fármacos pode ser muito útil no estabelecimento de políticas de saúde pública e no desenho e interpretação de ensaios clínicos. A existência de diferenças interétnicas em relação à variabilidade encontrada em genes envolvidos com resposta aos fármacos, pode ser um fator importante para a interpretação errônea dos resultados (Suarez-Kurtz, 2010; Daar e Singer 2005).

O controle genômico é particularmente importante nas amostras que serão investigadas, pois foi estimado na população do Norte brasileiro um elevado grau de subestruturamento populacional que justifica a utilização deste controle em estudos de associação com doenças (Santos *et al.*, 2010).

Desta maneira é importante empregar tecnologias capazes de realizar um controle genômico da ancestralidade, de modo que seja realizada a quantificação individual e a proporção de mistura entre as populações ancestrais,

e logo corrigir o provável efeito do subestruturamento populacional na amostra investigada.

Uma ferramenta importante que pode ser empregada nestas análises são os Marcadores Informativos de Ancestralidade (MIAs), também chamados de “marcadores população-específicos” (Parra *et al.*, 2003).

Para atingir o objetivo proposto, o presente trabalho utilizou os 61 marcadores informativos de ancestralidade-MIA do tipo INDELS, (inserção/deleção), capazes de estimar com precisão a mistura individual e global interétnica em populações miscigenadas com diferentes grupos étnicos (Santos *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2016). Este painel já foi utilizado anteriormente em outros estudos para controlar o efeito da ancestralidade genômica em investigações caso-controle (Fernandes *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2015, Vieira *et al.*, 2015)

5. JUSTIFICATIVA

Por ser o câncer um problema de saúde pública de ordem mundial, e o estado do Pará apresentar alta incidência e mortalidade desta patologia, a busca de esquemas terapêuticos que venham trazer benefícios aos pacientes acometidos desta doença se torna extremamente necessário.

Desde a sua introdução há mais de 50 anos, o 5-FU permanece como o fármaco quimioterápico mais utilizado, sozinho ou em combinação, para o tratamento de câncer do trato gastrointestinal, incluindo câncer gástrico e colorrectal

Diferentes publicações na literatura especializada evidenciam o fato que a população brasileira é uma das mais miscigenadas do mundo. Poucos estudos investigaram o perfil molecular de genes de metabolismo das Fluropirimidinas, utilizadas na terapêutica do câncer em populações com elevada miscigenação. O padrão heterogêneo de resposta aos tratamentos oncológicos suscitaram a necessidade de implementar uma terapêutica que possa ser eficaz no combate ao câncer .

Já foram identificados diferentes marcadores já utilizados na prática clínica, como exames preditivos para conduta terapêutica pelas principais agências mundiais regulamentadoras de fármacos.

Como regra geral, esses biomarcadores apresentam variações de frequências entre populações de diferentes continentes geográficos. Essas diferenças entre populações continentais quando associadas a um padrão divergente de resposta ao tratamento permitiu criar o termo “tratamento etnicamente dependente”. São raros os conhecimentos sobre a distribuição desses marcadores em populações miscigenadas do Brasil.

O padrão heterogêneo de resposta individual aos tratamentos oncológicos em outras populações com “background” genético muito mais homogêneo (a maioria das investigações são conduzidas em populações européias) levanta a questão de como seria a resposta ao tratamento em uma população com “background” genético distinto entre seus componentes, como é o caso da população miscigenada brasileira.

A identificação de indivíduos com maior risco de desenvolver um efeito adverso com base no genótipo melhoraria o aconselhamento e as opções de tratamento, sendo o primeiro passo no desenvolvimento de marcadores de prognóstico para reduzir a incidência desses efeitos melhorando assim os resultados do tratamento.

Desta forma, seria possível selecionar fármacos e ajustar a dose individual para cada paciente submetido à quimioterapia, o que melhoraria a sobrevida dos pacientes oncológicos. O objetivo final deste tipo de investigação possibilita elaborar políticas públicas capazes de realizar um tratamento personalizado para o câncer de maneira a maximizar a eficácia terapêutica e diminuir as toxicidades. Para melhor compreender o efeito desses polimorfismos em genes de metabolização e relacionar a respostas aos fármacos, pesquisas de medicina personalizada no Brasil devem controlar o efeito da ancestralidade para realizar inferências a respeito do efeito desses polimorfismos no tratamento do câncer.

Para realização do projeto nosso grupo faz parte da divisão de pesquisa do UNACON (Unidade de Alta Complexidade de Oncologia) no qual possui estrutura clínica para recebimento de diferentes pacientes oncológicos. Com relação às genotipagens das amostras investigadas temos parceria estabelecida de pesquisa com o Centro de Pesquisa em medicina molecular e doenças crônicas (Cimus), da Universidade de Santiago de Compostela (USC).

O desenvolvimento de pesquisas em farmacogenética iniciará uma nova era na medicina. Estabelecendo o conceito de uma terapia individualizada, onde o fármaco certo é administrado na dose certa para o paciente correto também é bastante promissor, pois a redução dos efeitos adversos além de serem alcançadas pela seleção do melhor fármaco e a melhor dose para aqueles pacientes que têm metabolização deficiente, poderá ainda abrir as portas para a pesquisa e o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, que não sejam metabolizados por determinada enzima ou via.

Com base nos resultados obtidos nesse projeto, busca-se viabilizar a implantação da medicina personalizada na nossa região, possibilitando aos pacientes acometidos desta neoplasia um tratamento mais eficaz e com um menor efeito adverso.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Investigar a variabilidade farmacogenômica de diferentes biomarcadores em farmacogenes envolvidos na via de metabolismo das Fluoropirimidinas em pacientes com câncer gástrico ou câncer colorrectal, subestudados de acordo com a resposta e toxicidade ao tratamento. A finalidade desta investigação foi traçar perfis moleculares que possam ser empregados futuramente para maximizar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade na terapia oncológica com uso de Fluorouracil. Desta forma, poderemos realizar futuros estudos clínicos visando à implementação da medicina personalizada na região Norte do Brasil.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um painel multiplex capaz de genotipar 33 biomarcadores moleculares do tipo SNP, localizados em 17 farmacogenes (*ABCB1, ABCC2; ABCC4; ABCG2, CYP2A6, DPYD, FPSG, ITGB5, MTHFR, SLC22A7, SLC29A1, TP53, TYMS, UMPS, GGH, RRM1, TYMP*) envolvidos nas vias de metabolismo das Fluoropirimidinas que possam ser informativos para a medicina personalizada;
2. Investigar os biomarcadores selecionados, em pacientes diagnosticados com câncer gástrico ou colorrectal em tratamento quimioterápico com Fluoropirimidinas, atendidos em hospitais de referência da região norte do Brasil.
3. Investigar possíveis associações entre os biomarcadores de farmacogenômica e reações adversas/toxicidade e resposta ao tratamento quimioterápico, nos pacientes com tumores gástrico e colorrectal.
4. Utilizar os 61 marcadores informativos de ancestralidade do tipo INDEL, como método de controle genômico para o pareamento de ancestralidade individual no grupo de pacientes oncológicos.

**CAPÍTULO III. USO DE UM PAINEL DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DE
RESPOSTA E TOXICIDADE A TERAPIA COM 5-FU, EM PACIENTES COM
CÂNCER DO TRATO GASTROINTESTINAL, EM UMA POPULAÇÃO
MISCIGENADA.**

USO DE UM PAINEL DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DE RESPOSTA E TOXICIDADE A TERAPIA COM 5-FU, EM PACIENTES COM CÂNCER DO TRATO GASTROINTESTINAL, EM UMA POPULAÇÃO MISCIGENADA.

PHARMACOGENOMICS (Artigo em preparação).

Marianne R Fernandes¹, Juliana CG Rodrigues¹, Darlen C Carvalho¹, Antonio C Modesto¹, Williams F Barra², Danielle F da Costa³, Raquel C Guerreiro⁴, Ana L Pellicer⁴, Olalla M Amigo⁴, Paulo P de Assumpção¹, Ândrea KC Ribeiro-dos-Santos¹, Sidney EB Santos¹, Rommel MR Burbano¹, Angel M Carracedo⁴, Ney PC Santos¹.

¹Núcleo de pesquisas em oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

²Hospital João de Barros Barreto; Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

³Hospital Ophir Loyola, Belém, Brasil.

⁴Grupo de Medicina Xenomica, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

USO DE UM PAINEL DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DE RESPOSTA E TOXICIDADE A TERAPIA COM 5-FU, EM PACIENTES COM CÂNCER DO TRATO GASTROINTESTINAL, EM UMA POPULAÇÃO MISCIGENADA.

Marianne R Fernandes¹, Juliana CG Rodrigues¹, Darlen C Carvalho¹, Antônio C Modesto¹, Williams F Barra², Danielle F da Costa³, Raquel C Guerreiro⁴, Ana L Pellicer⁴, Olalla M Amigo⁴, Paulo P de Assumpção¹, Ândrea KC Ribeiro-dos-Santos¹, Sidney EB Santos¹, Rommel MR Burbano¹, Angel M Carracedo⁴, Ney PC Santos¹.

¹Núcleo de pesquisas em oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

²Hospital João de Barros Barreto; Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

³Hospital Ophir Loyola, Belém, Brasil.

⁴Grupo de Medicina Xenomica, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

Correspondence to:
Prof. Dr. Ney PC dos Santos
Núcleo de Pesquisas em Oncologia
Hospital Universitário João de Barros Barreto, UFPA
66073005 Belém, PA, Brasil
Phone: 55 91 3201-6779
Fax: 55 91 3201-6776
E-mail: npcsantos@yahoo.com.br

Running Title: BIOMARCADORES PREDITIVOS DE TERAPIA COM 5-FU

ABSTRACT

Aims: The Fluoropyrimidine scheme has been the most widely used chemotherapy in the world. 5-Fluorouracil (5-FU) has severe toxicity rates between 10-40%. The aim of this study was to investigate the pharmacogenomic variability of biomarkers involved in the 5-FU metabolism pathway, according to response and toxicity to treatment. **Methods e materials:** We studied 216 patients with colorectal or gastric cancer who received 5-FU chemotherapy treatment. We investigated 33 genetic polymorphisms in 17 pharmacogenes (*ABCB1*, *ABCC4*, *ABCG2*, *CYP2A6*, *DPYD*, *FPSG*, *ITGB5*, *MTHFR*, *SLC22A7*, *SLC29A1*, *TP53*, *TYMS*, *UMPS*, *GGH*, *RRM1*, *TYMP*) involved in the metabolism pathway of fluoropyrimidines. **Results:** Our results showed that 77.3% of patients had some type of toxicity and of these, 22% had severe toxicities (grade 3 and 4) related to treatment with 5-FU. Death occurred in 23 patients, where three cases were related to toxicity and four cases with tumor progression and chemotherapy toxicity. Population substructure was not influential in the association results for pharmacogenetic polymorphisms with the use of 5-FU. The *FPSG* gene (rs4451422) was shown to be significant in association with overall toxicity and toxicity events. The *ABCC4* gene (rs148551) had a significant association with the clinical response. The *SLC29A1* gene (rs760370) was shown to be significant for grade 3 and 4 toxicities. **Conclusion:** Because of the high degree of miscegenation of the Brazilian population, and particularly of Northern Brazil, the generated 5-FU pharmacogenomics data are particularly unique compared to the homogenous populations investigated to date. The *ABCC4*, *FPSG* and *SLC29A1* genes have been shown to be important biomarkers predictive of personalized medicine therapy using 5-FU.

Keywords: 5-Fluorouracil; Toxicity; response; *SLC29A1*; *FPSG*; *ABCC4*.

INTRODUÇÃO

Os tumores do trato gastrointestinal são o grupo de cânceres com relevantes taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo [1]. A principal conduta terapêutica em tumores localizados é a ressecção cirúrgica, ainda assim o potencial curativo deste método é limitado, principalmente em doença metastática. Nestes casos são administrados tratamentos sistêmicos, onde a quimioterapia tem sido a modalidade mais amplamente utilizada [2]. 5-Fluorouracil (5-FU), sozinho ou em combinação, é o mais prevalente e efetivo agente quimioterápico utilizado no tratamento de cânceres do trato gastrointestinal [3]. O 5-FU é um fármaco antimetabólito que inibe a conversão de uracil em timidina, bloqueando a síntese de DNA. O 5-FU atua impedindo a metilação do monofosfato de desoxiuridina para monofosfato desoxitimidina através de um complexo estável, 5-FU/TS causando a deficiência de timidina. A reação de metilação requer a disponibilidade de doação de metil, neste caso 5,10-metilenotetrahidrofolato (CH_2THF), cuja concentração é regulada por várias enzimas, tais como metilenotetrahidrofolato Redutase (*MTHFR*). Entre 80-85% da degradação catabólica do fármaco ocorre no fígado por dihydropyrimidine desidrogenase (*DPD*), a deficiência desta enzima leva a toxicidade que pode ser letal. Tanto o nível de expressão de *TYMS*, como o grau de atividade de *MTHFR*, foram associados à eficácia e toxicidade do tratamento, embora este último esteja principalmente relacionado à atividade de *DPYD* [4]. Muitas reações adversas têm sido relatadas em pacientes tratados com 5-FU, incluindo toxicidade hematológica e não hematológica: náuseas, diarreia, mucosite, síndrome de mão e pé (HFS) e toxicidade cardíaca [3]. As reações adversas severas associadas ao tratamento com 5-FU ocorrem entre 10-40% dos pacientes, e de 0,5-1% sofrem toxicidade letal [5]. Dessa forma, a toxicidade associada à Fluoropirimidinas é um problema clínico bem reconhecido que tem um impacto substancial sobre a qualidade de vida dos pacientes [6]. As agências regulamentadora de fármacos, norte-americana (FDA), Européia (EMA), Japonesa (PMDA) e do Canadá (HCSC) possuem uma recomendação de ajuste de dose e possível modificação da terapêutica baseada na genotipagem de *2A, *13 e rs67376798 do gene *DPYD* em pacientes tratados com Fluoropirimidinas. Para o gene *TYMS*, a recomendação ainda está restrita a FDA, onde pacientes tratados com Capecitabine devem ter ajuste de dose se tiverem o genótipo 3R/3R [7]. A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, com cinco séculos de intensa mistura interétnica e contribuições populacionais ancestrais tri-híbridas: ameríndios, europeus e africanos. A região Norte do Brasil apresenta uma das mais elevadas misturas interétnicas, com populações ameríndias amazônicas do mundo [8]. A diversidade étnica do Brasil compromete a extrapolação de dados farmacogenômicos provenientes de grupos étnicos relativamente bem definidos e homogêneos, como o europeu [9]. Vários marcadores moleculares preditores de tratamento que possuem recomendação de ajuste de dose por agências de

regulamentação europeia (EMA) e norte-americana (FDA) não devem ser totalmente aplicáveis para realidade de populações com elevada mistura interétnica, como a brasileira [10]. Desta forma, poucos estudos relatam os resultados encontrados em populações miscigenadas, os quais poderiam preencher lacunas de informações farmacogenômicas, pertinentes a população africana e nativa americana [10]. Os estudos farmacogenômicos em populações brasileiras têm o potencial de contribuir com informações relevantes para a prescrição personalizada de medicamentos em todo o mundo [9]. Neste contexto, a farmacogenômica (PGx) tem um papel crucial na identificação de biomarcadores de prognóstico de toxicidade e eficácia associados ao tratamento. A identificação de polimorfismos em genes que produzem enzimas de importância na metabolização dos fármacos administrados pode sugerir novos protocolos de tratamento ou ajuste de dose para a otimização da quimioterapia individualizada [2]. Portanto, selecionamos os marcadores moleculares de farmacogenômica envolvidos na via metabólica das fluoropirimidinas com anotações clínicas de alto nível na plataforma *PharmGKB* [7] e amplamente relacionados na literatura com 5-FU [7;11]. O objetivo do estudo foi investigar 33 biomarcadores moleculares em 17 farmacogenes de grande relevância na modulação do metabolismo das fluoropirimidinas em pacientes com câncer gástrico ou colorrectal em tratamento oncológico da região Norte do Brasil, com elevada mistura interétnica.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e dados clínicos

Participaram do estudo 216 pacientes, sendo 91 diagnosticados com câncer gástrico e 124 com câncer colorretal, ambos receberam tratamento quimioterápico a base de Fluoropirimidinas, nos Hospitais Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) /Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) e Ophir Loyola (HOL), ambas unidades localizadas na cidade de Belém, no Estado do Pará-Brasil. Foram incluídos pacientes que concordaram em participar do estudo, tratados com fármacos a base de Fluoropirimidinas e com o tratamento do câncer finalizado nos hospitais de referência. Os dados clínicos foram obtidos a partir de registros clínicos (idade, gênero, tumor diagnosticado histopatologicamente, estadiamento tumoral (segundo critério TMN) e *status vital*). Quanto ao tipo de quimioterapia administrada separamos os pacientes do estudo, de acordo com a via de administração (bolus, infusional ou oral) e pelo tipo de tratamento realizado (adjuvante, neoadjuvante ou paliativo). Todos os pacientes receberam quimioterapia a base de fluoropirimidinas e foram agrupados de acordo com o esquema de terapia: 5-FU; 5-FU mais leucovorin; FOLFIRI (5-FU, Irinotecano e Leucovorin) e FOLFOX (5-FU, leucovorin, oxaliplatina). Todas as toxicidades foram classificadas de acordo com o *Common Terminology Criteria for Adverse Events v.4.0* (CTCAE) e respostas de acordo com o *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST).

Seleção de biomarcadores PGx e controle de qualidade

A seleção de 33 polimorfismos genéticos em 17 farmacogenes foi realizada levando-se em consideração o fato de estarem envolvidos na via de metabolização das fluoropirimidinas (5-FU, principalmente); (Tabela 1). Os marcadores foram selecionados com base em três critérios principais: (a) Biomarcadores de PGx com resultados significativos na literatura em pacientes de câncer gástrico ou colorretal em associação com eventos de toxicidade e resposta no tratamento quimioterápico com Fluoropirimidinas, na base de dados PubMed [12]; (b) Biomarcadores de PGx que contém anotações clínicas de alto nível ou VIPs relacionados em bancos de dados públicos: dbSNP [13] e PharmGKB [7]; (c) Biomarcadores PGx que estão entre as recomendações de ajuste de dose de fármacos quimioterápicos pelas agências mundiais regulamentadoras de fármacos.

Extração do DNA

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

Genotipagem e controle de qualidade dos SNPs investigados

A genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP*) foi realizada por discriminação alélica utilizando a tecnologia TaqMan OpenArray Genotyping, com um painel de 32 ensaios customizados, no equipamento QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, EUA) de acordo com o protocolo recomendado por Applied Biosystems. O software Taqman Genotyper foi utilizado para a análise dos dados das placas e precisão de leitura dos genótipos, além do controle de qualidade da genotipagem. A investigação da inserção/deleção de 6pb na região 3' UTR em TYMS (rs16430) foi feito por sequenciamento direto do DNA. Após o controle de qualidade dos biomarcadores PGx investigados, foram descartados aqueles que demonstraram frequências de alelos inferior a 1%, que não estavam no equilíbrio de Hardy e Weinberg e apresentaram taxa igual ou superior a 10% de dados de genotipagem *missings*. Do total de 33 biomarcadores PGx inicialmente selecionados, as análises foram posteriormente direcionadas para 22 marcadores que atenderam as especificações do controle de qualidade realizado (Tabela 1).

Análise da ancestralidade genômica

A análise de ancestralidade foi realizada de acordo com o descrito por Ramos *et al.* 2016 [14] usando 61 marcadores autossômicos informativos de ancestralidade

(MIAs). Realizaram-se três reações de PCR multiplex com o uso dos marcadores inserção/deleção (INDEL), as amplificações de PCR foram analisadas por eletroforese utilizando o sequenciador *ABI Prism 3130* e o software *GeneMapper ID v.3.2*. As proporções de ancestralidades genéticas individuais européia, africana e ameríndia foram estimadas usando o software *STRUCTURE v.2.3.3*, assumindo três populações parentais (européia, africana e ameríndia).

Análise estatística

Os cálculos estatísticos foram feitos utilizando o *software R*, na versão para Windows (*SNPassoc library*)[15]. Inicialmente, antes da análise estatística os dados de farmacogenômica do tratamento a base de fluoropirimidinas (variáveis dependentes) foram log-transformados para aumentar a normalidade da distribuição e homogeneidade de suas variâncias. Além disso, os dados de genotipagem foram filtrados usando taxa de genotipagem (*call rate*) superiores a 90% completos, o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (p valor > 0.001) e o critério de alelo menos frequente superior a 1% (MAF) para garantir a qualidade adequada dos dados no estudo de PGx. Realizou-se uma regressão logística para avaliar a associação entre os biomarcadores e os parâmetros de resposta e toxicidade com as fluoropirimidinas. Todas as análises foram realizadas assumindo um modelo log-aditivo, entretanto nos casos em que os biomarcadores analisados apresentaram menos de cinco eventos em pacientes com genótipo homocigoto, foram utilizados o modelo genético dominante (variante heterocigótica em combinação com a variante homocigótica rara). Idade, gênero, estadiamento, ancestralidade européia, via de administração, radioterapia, tipo de tratamento e tipo de câncer diagnosticado, foram incluídos como covariáveis na regressão logística.

Comitê de ética

O desenvolvimento do estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital João de Barros Barreto (protocolo numero 231.244/2013) e pelo Hospital Ophir Loyola (298.994/2013).

RESULTADOS

Foram incluídos neste estudo 216 pacientes, sendo 92 diagnosticados com câncer gástrico e 124 com câncer colorretal. Encontramos distribuição similar entre os gêneros, com 112 homens (51,8%) e 104 mulheres (48,2%), a média de idade entre os pacientes foi de 54 anos, sendo essas características apresentadas na Tabela 2. As ancestralidades genômicas individuais foram empregadas como controle do subestruturamento genético nas análises da associação para a resposta e toxicidade a 5-FU, contudo esta variável não se mostrou divergente nas comparações realizadas quanto as variáveis clínicas e epidemiológicas. Os resultados demonstram uma variação interindividual nos

pacientes para a ancestralidade européia no intervalo de 0,461-0,502, as ancestralidades africanas foram variáveis entre 0,192-0,223 e para a ancestralidade indígena entre 0,294-0,329. Os dois tipos de tumores investigados no estudo, foram analisados em conjunto devido à similaridade na conduta terapêutica (esquema envolvendo fluoropirimidinas). A maioria dos pacientes envolvidos neste estudo possuíam estadiamento tumoral avançado III(42.6%) e IV(39.8%). Foram aplicados esquemas terapêuticos padrão recomendados de acordo com o tipo tumoral e estadiamento da doença. Todos os pacientes receberam 5-FU, isoladamente (7.4%) ou em associação com outros fármacos, sendo o esquema de tratamento mais frequente: 5-FU combinado a leucovorin (41,2%), seguido por FOLFOX (40,3%) e FOLFIRI (11,1%). A via de administração da quimioterapia também pode influenciar no sucesso terapêutico, a forma mais incidente ocorreu por bolus em quase 70% dos pacientes investigados. O perfil do tipo de tratamento aplicado nos pacientes foi em sua maioria do tipo adjuvante 125 (57,9%). Os eventos de toxicidade e resposta relatados entre os pacientes do estudo estão descritos na Tabela 3. Dos pacientes do estudo 167 (77,3%) apresentaram algum tipo de toxicidade relacionada ao tratamento com 5-FU e destes, 48 (22,2%) apresentaram toxicidades mais severas classificadas em grau 3 e 4. Entre os eventos de toxicidade relatados, o mais frequente foi diarreia com 129 casos (59,7%). Quanto ao critério de resposta ao tratamento com 5-FU, os pacientes foram classificados quanto à presença de resposta radiológica, clínica ou total (resposta clínica e radiológica, em combinação), neste caso a mais frequente entre os pacientes foi resposta clínica (32.4%). Outro desfecho avaliado no estudo foi o óbito, ocorrido em 23 pacientes (10.6%), onde três casos foram relacionados à toxicidade quimioterápica e 13 casos com a progressão tumoral, isoladamente. Houve quatro pacientes que apresentaram combinação de toxicidade e progressão da doença resultando no óbito. E ainda, outros três pacientes tiveram óbito por outras causas, não relacionadas ao câncer (Tabela 3). De um total de 33 biomarcadores PGx utilizados no estudo, 22 estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg para a distribuição alélica e atenderam aos critérios de controle de qualidade da genotipagem. Dessa forma, estes 22 biomarcadores foram avaliados em associação com eventos de toxicidade e resposta ao tratamento quimioterápico com uso de fluoropirimidinas, em pacientes de câncer gástrico ou colorretal, da região Norte do Brasil (Tabela 1). Na análise de regressão logística com os 22 biomarcadores PGx e utilizando como covariáveis de risco: idade, gênero, estadiamento tumoral, ancestralidade européia, administração quimioterápica por bolus, radioterapia, tipo de tratamento e tipo de tumor, foram encontrados três biomarcadores em associação significativa de risco para variáveis clínicas de resposta e toxicidade ao tratamento com 5-FU (Tabela 4). O rs4451422 do gene FPGS no modelo recessivo de análise, mostrou-se significativo em associação com a toxicidade geral ($p=0,0052$; OR 0,32; CI 95% 0,14-0,71) e com eventos de toxicidades ($p=0,0004$; OR 0,22; CI 95% 0,10-0,51) quando tratados com 5-FU. Devido à variedade de eventos de toxicidades relatadas nas amostras estudadas, durante as análises criamos um novo critério chamado “eventos de toxicidades” onde foram incluídos pacientes que tiveram

ocorrência de dois ou mais eventos de toxicidades simultaneamente. O polimorfismo rs148551 do gene ABCC4 no modelo dominante de investigação apresentou associação significativa para a resposta clínica ($p=0,0056$; OR 0,28; CI 95% 0,11-0,69). No gene SLC29A1, o marcador rs760370 demonstrou-se significativo ($p=0,0033$) no modelo recessivo de análise e com um risco aumentado em quatro vezes para toxicidades de grau 3 e 4, em pacientes tratados com 5-FU.

DISCUSSÃO

As estimativas de incidência para o tumor gástrico e colorrectal apontam elevadas taxas no Brasil e na região Norte do país. Os dados de mortalidade revelam taxas consideráveis em todo mundo, onde tanto o tumor gástrico quanto o colorrectal são representados por 9% do número total de óbitos relacionados aos tumores sólidos [1;16]. A 5-Fluorouracil (5-FU) e seus pró-fármacos orais Capecitabine e Tegafur desempenham um papel chave no tratamento do câncer [3;6]. O fármaco 5-FU, utilizado sozinho ou em combinação é o mais prevalente e efetivo agente quimioterápico utilizado no tratamento dos tumores do trato gastrointestinal [3]. As reações adversas ao tratamento com 5-FU são consideradas severas quando classificadas em grau 3 e 4 de toxicidade, de acordo com o CTCAE. Na literatura, são relatadas taxas de incidência variando de 10-40% de toxicidades severas associadas ao uso de 5-FU, em geral estes casos resultam em hospitalizações prolongadas e onerosas [3;5]. No grupo de pacientes investigados neste estudo foram encontradas taxas de 22,2% de ocorrência de toxicidades severas, concordando com os dados existentes na literatura. Meulendijks *et al.* relataram taxas de mortalidade de 0,5-1% associadas a complicações decorrentes do tratamento quimioterápico com 5-FU, no entanto, nesta investigação os casos de óbitos relacionados exclusivamente por complicações da toxicidade quimioterápica foram superiores (1,38%) e se forem considerados casos em que o óbito ocorreu por associação da toxicidade ao tratamento e progressão da doença, as taxas aumentam para 3,24% dos casos investigados. Em ambos os casos, as incidências de mortalidade encontrada foram superiores as estimativas relatadas [6]. Os tipos de tumores investigados neste estudo (gástrico e colorrectal) apesar de afetarem órgãos diferentes, ambos constituem o trato gastrointestinal. Após o diagnóstico, grande parte destes tumores recebem a mesma conduta terapêutica, baseada em Fluoropirimidinas, com ou sem combinação de outros fármacos [2]. Realizamos as análises dos resultados para os biomarcadores farmacogenéticos selecionados e relatos de ocorrências de toxicidade e resposta para os dois tipos tumorais em separados e depois reunidos. Todos os resultados significantes foram mantidos em ambas análises realizadas, por este motivo, mantivemos estes dois tipos tumorais reunidos na apresentação dos resultados. A heterogeneidade da população brasileira têm implicações importantes na implementação dos princípios de PGx em relação à extrapolação de dados farmacogenéticos obtidos de outras populações. A diversidade populacional do Brasil implica que a extrapolação de dados oriundos de grupos étnicos relativamente bem definidos, não é aplicável à maioria dos brasileiros [9].

A FDA já possui uma orientação na qual recomenda que sejam feitas investigações do perfil de metabolismo diferenciado entre subgrupos étnicos para comparar resultados entre populações e avaliar diferenças individuais na farmacogenética/farmacogenômica que possam afetar a segurança e eficácia do tratamento nessas populações [17]. Portanto, o controle genômico da ancestralidade foi aplicado neste estudo para evitar possíveis associações espúrias dos resultados farmacogenéticos [9] em relação aos desfechos investigados (toxicidade e resposta). Apesar da população do norte do Brasil, em que foi realizado o estudo, possuir uma contribuição genética diferencial com elevada contribuição do componente ancestral ameríndio [8], os resultados obtidos em relação à ancestralidade genômica não demonstraram diferenças significativas entre as variáveis clínicas e epidemiológicas analisadas, desta forma concluímos que o subestruturamento populacional não foi influente em nossos resultados na associação para os polimorfismos farmacogenéticos. Nossos resultados não demonstraram associação significativa entre os biomarcadores, DPYD e TYMS, que possuem recomendações farmacogenéticas pelas agências mundiais regulamentadoras de fármacos para o uso de Fluoropirimidinas. Acreditamos que este achado se deve a baixa frequência desses marcadores, logo as conclusões a respeito destes importantes genes devem ser referendadas em um próximo estudo que deve ampliar o número amostral investigado e incluir outros polimorfismos relevantes. Os resultados encontrados para o polimorfismo rs4451422 do gene FPGS foram os mais relevantes desta investigação. Foram encontradas associações significativas para as duas variáveis clínicas relacionadas à toxicidade (toxicidade geral e eventos de toxicidade). O polimorfismo rs4451422 demonstrou um efeito de proteção em torno de 70% para a toxicidade geral e 78% para eventos de toxicidades. O gene FPGS (folilpoliglutanil sintetase) participa na via metabólica de 5-FU, especificamente na via do folato. Logo, a expressão de FPGS afeta os níveis de folato que conseqüentemente pode ter uma atividade antitumoral *in vitro* ou levar a citotoxicidade em terapias com uso de 5-FU [18]. A via na qual o gene FPGS participa é particularmente importante para os pacientes tratados com poliquimioterapia envolvendo Leucovorin e 5-FU, que representa cerca de 93% da amostra investigada. O Leucovorin (LV) é um fármaco utilizado no tratamento anticancerígeno apesar de não exercer ação antitumoral diretamente seu efeito desejado é a potencialização da ação de 5-FU através do aumento dos níveis de folato reduzido dentro da célula [19]. A enzima FPGS converte os folatos monoglutamatos em poliglutamatos, compostos facilmente conservados no interior celular e com maior capacidade de estabilizar o complexo ternário inibidor de TS (5,10-metilenoTHF-TS-FdUMP), potencializando desta forma os efeitos citotóxicos de 5-FU [20;21]. Vários estudos investigam a associação de polimorfismo no gene FPGS com a terapia medicamentosa a base de Metotrexato ou Pemetrexato classificados como fármacos anti-folatos [22;23;24]. Diferentes trabalhos na literatura investigaram parâmetros bioquímicos e de expressão de RNA, demonstrando a influência da expressão do gene FPGS na toxicidade, em pacientes tratados com fármacos a base de Fluorouracil [19;20;21]. Sohn *et al.* encontrou que a diminuição da atividade do FPGS está diretamente ligada a

resistência a 5-FU, em várias linhagens celulares de tumores humanos [21]. De maneira geral, nosso trabalho é o primeiro na literatura a sugerir que polimorfismos, particularmente o rs4451422 no gene FPGS, pode ser preditivo de toxicidade ao uso de 5-FU e Leucovorin. O gene SLC29A1 codifica a proteína humana equilibrativa de transporte de nucleosídeos 1 (*hENT1*) responsável pelo transporte de nucleosídeos, como purinas e pirimidinas nas células tumorais. O papel da *hENT* é o transporte de diversos nucleotídeos e nucleobases, particularmente importante para diferentes fármacos oncológicos, incluindo 5-FU [2]. Diversos estudos demonstraram a relação entre a atividade da enzima *hENT* com o transporte e resistência a fármacos [25;26]. A resistência das células tumorais ao tratamento com 5-FU é modulada pelos mecanismos de transporte. Especialmente, o transportador 29A1 o qual desempenha um papel crucial na absorção celular. Diversas investigações na literatura correlacionaram altos níveis de expressão do gene SLC29A1 com resistência a terapêutica de 5-FU em pacientes com câncer colorrectal [27;28]. Em nossa investigação encontramos uma associação significativa do gene SLC29A1 (rs760370) com a toxicidade severa a 5-FU ($p=0.0033$). O risco estimado da toxicidade severa foi cerca de cinco vezes maior para pacientes submetidos à quimioterapia com derivados de 5-FU. Este resultado concorda com os dados de Phua *et al.* que mostrou um aumento na citotoxicidade de 5-FU em células tumorais, como resultado da inibição de *hENT1* [27]. Outros estudos na literatura evidenciam uma forte influência do polimorfismo rs760370 no gene SLC29A1 para a toxicidade relacionada ao uso de fármacos antivirais [29;30]. Nosso trabalho é o primeiro a evidenciar a associação da toxicidade severa com o SNP rs760370 em quimioterapia oncológica. O gene ABCC4 é um membro da família de transportadores de cassetes de ligação de ATP (ABC) conhecida como proteína de multi-resistência a fármacos. O gene ABCC4 controla a redistribuição e a excreção de muitos fármacos antivirais, antibióticos e medicamentos cardiovasculares, além de desempenhar um papel chave na proteção de células e sinal celular das vias de transdução [31]. Nossos resultados demonstraram uma forte influência do polimorfismo rs4148551 no gene ABCC4 para resistência a terapia com uso de Fluoropirimidinas ($p= 0,0056$). Estudos recentes evidenciaram que a expressão do gene ABCC4 está intimamente associada com a ocorrência de tumores malignos e resistência a fármacos. Este gene participa da farmacocinética do 5-FU removendo a molécula do fármaco para o exterior celular, dessa forma tem sido associado na literatura com a resistência a esta terapia [31]. Zhang *et al.* demonstrou que o gene ABCC4 é altamente expresso em células tumorais de câncer gástrico humano resistentes a fármacos. Neste estudo foi descrito que a baixa expressão de ABCC4, na presença de 5-FU, possibilitou o aumento de apoptose e parada do ciclo celular no câncer gástrico humano [31]. Diferentes trabalhos na literatura confirmaram que a expressão reduzida de ABCC4 é encontrada em gliomas, neuroblastomas, retinoblastomas e melanomas, bem como câncer colorrectal e gástrico. Além disso, a expressão de ABCC4 está correlacionada diretamente com a resistência a fármacos em células leucêmicas e de câncer no ovário [31]. Poucos estudos investigaram polimorfismos no gene ABCC4 em associação ao tratamento com 5-FU [32;33].

Neste estudo, o polimorfismo (rs4148551) demonstrou ser um importante biomarcador preditivo de resposta à quimioterapia com 5-FU. Em conclusão, devido ao elevado grau de miscigenação da população brasileira, e particularmente do Norte do Brasil, os dados gerados de farmacogenômica do 5-FU são particularmente únicos se comparados com as populações homogêneas investigadas até o presente. Os genes ABCC4, FPGS e SLC29A1 demonstraram ser importantes biomarcadores preditivos para a medicina personalizada da terapia com uso de 5-FU.

Resumo executivo

Eventos de toxicidade e resposta associadas à terapia com 5-FU

- Dos 216 pacientes do estudo, 77.3% apresentaram algum tipo de toxicidade relacionada ao tratamento com 5-FU e destes, 22% apresentaram toxicidades severas classificadas em grau 3 e 4.
- Entre os eventos de toxicidade relatados, o mais frequente foi diarreia com 129 casos (59.7%).
- A maioria dos pacientes envolvidos neste estudo possuíam estadiamento tumoral avançado III(42.6%) e IV(39.8%).
- Quanto ao critério de resposta ao tratamento com 5-FU, a mais frequente entre os pacientes foi resposta clínica (32.4%).
- O óbito ocorreu em 23 pacientes, onde três casos foram relacionados à toxicidade e quatro casos com a progressão tumoral e toxicidade quimioterápica.
- Entre os eventos de toxicidade relatados, o mais frequente foi diarreia com 129 casos (59.7%).

Marcadores moleculares preditores de toxicidade e resposta a 5-FU

- O gene FPGS (rs4451422) mostrou-se significativo em associação com a toxicidade geral ($p=0,0052$; OR 0,32) e com eventos de toxicidades ($p=0,0004$; OR 0,22).
- O gene ABCC4 (rs148551) apresentou associação significativa para a resposta clínica ($p=0,0056$; OR 0,28).
- O gene SLC29A1 (rs760370) demonstrou-se significativo para toxicidades de grau 3 e 4 ($p=0,0033$; OR 4,73).
- Os genes ABCC4, FPGS e SLC29A1 demonstraram ser importantes biomarcadores preditivos para a medicina personalizada da terapia com uso de 5-FU.

Controle do subestruturamento genético

- As médias das ancestralidades encontradas na população do estudo foram: 48% de europeu, 31% de ameríndio e 21% de africano.
- O subestruturamento populacional não foi influente nos resultados de associação para os polimorfismos farmacogenéticos com o uso de 5-FU.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Pesquisa em medicina molecular e doenças crônicas (CiMUS) e a Universidade de Santiago de Compostela, por colaborarem no desenvolvimento do estudo.

Financiamento e divulgação de interesses concorrentes

Este trabalho foi financiado pelo Programa de auxílio à pesquisa- Projetos temáticos da Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa do Pará: Saúde, Nº 006/2014 (FAPESPA/CNPq). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) financiou a bolsa de estudos. Os autores não têm outras afiliações relevantes ou envolvimento financeiro com qualquer organização ou entidade com um interesse financeiro ou conflito financeiro com o assunto ou materiais discutidos no artigo para além dos divulgados.

Conduta ética da pesquisa

Os autores afirmam que obtiveram aprovação apropriada do conselho de revisão institucional ou seguiram os princípios esboçados na Declaração de Helsinque. Além disso, para investigações envolvendo seres humanos, o consentimento informado foi obtido dos participantes envolvidos.

Tabela 1. Distribuição de genótipos e controle de qualidade para os biomarcadores PGx investigados, no grupo de pacientes com câncer gástrico e colorrectal tratados com 5-FU.

Gene/rs	Genótipos						Controle de Qualidade (QC)			
	Alelo mais frequente	Alelos encontrados	Missings ⁵	AA ¹	Aa ²	Aa ³	P valor ⁴	Frequência de missings ⁵	MAF ⁶	Resultado do QC
ABCB1_rs1045642	GG	AG	2	61	97	47	0.4809	0.97	0.47	ACEITO
ABCB1_rs1128503	GG	AG	5	62	115	25	0.0113	2.42	0.41	ACEITO
ABCC2_rs717620	CC	CT	4	149	48	6	0.3827	1.93	0.15	ACEITO
ABCC4_rs3742106	AA	AC	6	56	115	30	0.0203	2.9	0.44	ACEITO
ABCC4_rs4148551	CC	CT	8	45	110	44	0.1365	3.86	0.50	ACEITO
ABCG2_rs2231142	GG	GT	3	146	53	5	0.9419	1.45	0.15	ACEITO
CYP2A6_rs28399433	AA	AC	13	136	48	10	0.0447	6.28	0.18	ACEITO
DPYD_rs17116806	CC	AC	8	64	98	37	0.9618	3.86	0.43	ACEITO
DPYD_rs17376848	AA	AG	0	175	31	1	0.7652	0	0.08	ACEITO
DPYD_rs1760217	AA	AG	2	139	61	5	0.5756	0.97	0.17	ACEITO
DPYD_rs1801159	TT	CT	0	107	89	11	0.1693	0	0.27	ACEITO
DPYD_rs1801265	AA	AG	4	107	77	19	0.3483	1.93	0.28	ACEITO
DPYD_rs4970722	TT	AT	1	113	76	17	0.4097	0.48	0.27	ACEITO
FPSG_rs4451422	AA	AC	2	57	100	48	0.7473	0.97	0.48	ACEITO
ITGB5_rs10049380	TT	CT	8	87	81	31	0.1020	3.86	0.36	ACEITO
MTHFR_rs1801133	GG	AG	11	84	87	25	0.7391	5.31	0.35	ACEITO
SLC22A7_rs2270860	CC	CT	2	68	97	40	0.6096	0.97	0.43	ACEITO

<i>SLC22A7</i> _rs4149178	AA	AG	1	129	64	13	0.1958	0.48	0.22	ACEITO
<i>SLC29A1</i> _rs760370	AA	AG	2	99	77	29	0.0322	0.97	0.33	ACEITO
<i>TP53</i> _rs1042522	CC	CG	6	116	71	14	0.4917	2.9	0.25	ACEITO
<i>UMPS</i> _rs1801019	GG	CG	8	108	72	19	0.1781	3.86	0.28	ACEITO
<i>TYMS</i> _rs151264360	AA	AD	0	80	94	33	0.5416	0	0.39	ACEITO
<i>GGH</i> _rs3758149	GG	AG	36	60	84	27	0.7890	17.39	0.40	Excluído (taxa de genotipagem)
<i>DPYD</i> _rs3918290	CC	CT	0	205	1	1	0.0000	0	0.01	Excluído (MAF baixa)
<i>ABCC4</i> _rs9524885	CC	CT	18	102	60	27	0.0007	8.7	0.30	Excluído(desequilíbrio H-W)
<i>CYP2A6</i> _rs8192726	CC	AC	8	143	32	24	0.0000	3.86	0.20	Excluído(desequilíbrio H-W)
<i>DPYD</i> _rs55886062	AA	AC	0	201	5	1	0.0001	0	0.02	Excluído(desequilíbrio H-W)
<i>DPYD</i> _rs67376798	TT	AT	9	162	28	8	0.0001	4.35	0.11	Excluído(desequilíbrio H-W)
<i>MTHFR</i> _rs1801131	TT	GT	2	120	42	43	0.0000	0.97	0.31	Excluído(desequilíbrio H-W)
<i>RRM1</i> _rs1042927	AA	AC	8	176	17	6	0.0000	3.86	0.07	Excluído(desequilíbrio H-W)
<i>RRM1</i> _rs12806698	CC	AC	4	131	53	19	0.0004	1.93	0.22	Excluído(desequilíbrio H-W)
<i>SLC29A1</i> _rs747199	GG	CG	1	154	40	12	0.0002	0.48	0.16	Excluído(desequilíbrio H-W)
<i>TYMP</i> _rs11479	GG	AG	8	128	50	21	0.0000	3.86	0.23	Excluído(desequilíbrio H-W)

¹AA: Homozigoto mais frequente; ²Aa: Heterozigoto; ³aa: Homozigoto menos frequente; ⁴P valor do equilíbrio de Hardy Weinberg; ⁵Dados de genotipagem não obtidos; ⁶MAF: alelo de menor frequência.

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes do estudo.

Pacientes (n)	216
Média da idade ± SD anos	54.06 ±11.90
Gênero, n(%)	
Feminino	104(48.2)
Masculino	112(51.8)
Ancestralidade, média	
Europeu	0.481
Ameríndio	0.311
Africano	0.208
Tipo de Câncer n(%)	
Gástrico	92(42.6)
Colorretal	124(57.4)
Estadiamento tumoral n(%)	
I	6(2.8)
II	32(14.8)
III	92(42.6)
IV	86(39.8)
Esquema de quimioterapia n(%)	
5-FU	16(7.4)
5-FU+Leucovorin	89(41.2)
FOLFIRI ¹	24(11.1)
FOLFOX ²	87(40,3)
Via de administração n(%)	
Bolus	149(69)
Infusional	52(24.1)
Oral	15(6.9)
Tratamento n(%)	
Adjuvante	125(57.9)
Neoadjuvante	34(15.7)
Paliativo	57(26.4)
Radioterapia n(%)	65(30%)

¹FOLFIRI: (5-FU, Irinotecano e Leucovorin); ²FOLFOX: (5-FU, leucovorin, oxaliplatina).

Tabela 3. Eventos de toxicidades e resposta ao tratamento quimioterápico com Fluoropirimidinas

Toxicidade n(%)	167(77.3)
Toxicidade grau 3-4 n(%)	48(22.2)
Eventos de toxicidade¹ n(%)	
Hematológica	32(14.8)
Diarréia	129(59.7)
Mucosite	50(23.1)
Emese	91(42.1)
Neuropatia	26(12)
Síndrome de mão e pé	5(2.31)
Resposta n(%)	159(95.2)
Radiológica	52(24.1)
Clínica	70(32.4)
Total ²	37(17.1)
Morte n(%)	23(10.6)
Toxicidade	3(13)
Progressão	13(56.6)
Toxicidade + progressão	4(17,4)
Outras causas	3(13)

¹Eventos de toxicidade: ocorrência de dois ou mais eventos de toxicidades simultaneamente;

²Resposta clínica e radiológica.

Tabela 4. Associação de risco, entre os SNPs investigados, com toxicidade e resposta ao tratamento com 5-FU.

Gene	rs	Modelo ¹	Controles	Casos	P valor	OR (low-up)	Covariável	
<i>FPGS</i>	rs4451422	recesivo	AA+Aa	30	127	0.0052	0.32 (0.14-0.71)	Toxicidade
			aa	19	29			
<i>FPGS</i>	rs4451422	recesivo	AA+Aa	66	91	0.0004	0.22 (0.10-0.51)	Eventos de Toxicidade ²
			aa	32	16			
<i>SLC29A1</i>	rs760370	recesivo	AA+Aa	140	36	0.0033	4.73 (1.68-13.36)	Toxicidade grau 3 e 4
			aa	18	11			
<i>ABCC4</i>	rs4148551	dominante	AA	23	22	0.0056	0.28 (0.11-0.69)	Resposta clínica
			Aa+aa	112	42			

¹Melhor modelo de probabilidade: exceto se, nas análises de alguma categoria os resultados foram menores do que cinco, então utilizamos o modelo dominante; ²Dois ou mais eventos de toxicidades relatados simultaneamente.

Referências

1. Stewart, B. W., e Wild, C. P. (2014). World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. *World Health Organization*, 505.
2. Mohelnikova-Duchonova, B., Melichar, B., e Soucek, P. (2014) FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(30), 10316.
3. Matsusaka, S., e Lenz, H. J. (2015). Pharmacogenomics of fluorouracil-based chemotherapy toxicity. *Expert opinion on drug metabolism e toxicology*, 11(5), 811-821.
4. Balboa, E., Duran, G., Lamas, M.J., Gomez-Caamano, A., Munoz, C.C., Lopez, R. Carracedo, A., Barros, F. (2010) *Pharmacogenomics*, 11(6), 747-761.
5. Campbell, J. M., Bateman, E., Peters, M. D., Bowen, J. M., Keefe, D. M., e Stephenson, M. D. (2016). Fluoropyrimidine and platinum toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Pharmacogenomics*, 17(4), 435-451.
6. Meulendijks, D., Cats, A., Beijnen, J.H., Schellens, J.H. (2016). Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity - Ready for clinical practice?. *Cancer Treat Rev.*, 50:23-34.
7. PharmGKB (The Pharmacogenomics Knowledgebase). Disponível em: <https://www.pharmgkb.org/>
8. Santos, N.P.C., Ribeiro-Rodrigues, E. M., Ribeiro-dos-Santos, Â.K., Pereira, R., Gusmão, L., Amorim, A., e Santos, S.E. (2010) Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48–insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human mutation*, 31(2), 184-190.
9. Suarez-Kurtz, G. (2010). Pharmacogenetics in the Brazilian population. *Frontiers in Pharmacology*, 1(118), 1 – 10.
10. Suarez-Kurtz, G., Paula, D.P., Struchiner, C.J. (2014) Pharmacogenomic implications of population admixture: Brazil as a model case. *Pharmacogenomics*, 15(2): 209-19.
11. Rosmarin, D., Palles, C., Pagnamenta, A., Kaur, K., Pita, G., Martin, M., Johnstone, E. (2015) A candidate gene study of capecitabine-related toxicity in colorectal cancer identifies new toxicity variants at DPYD and a putative role for ENOSF1 rather than TYMS. *Gut*, 64(1), 111-120.
12. PubMed/Medline-NCBI (The National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
13. dbSNP Short Genetic Variations-NCBI (The National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
14. Ramos, B.R.A., Mendes, N.D., Tanikawa, A.A., Amador, M.A.T., Santos, N.P.C., Santos, S.E.B., Castelli, E.C., Witkin, S.S., Silva, M.G.(2016) Ancestry informative markers and selected single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes on preterm labor and preterm premature rupture of membranes: a case control study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 16: 30.

15. Gonzalez, J.R., Armengol, L., Sole, X., Guino, E., Mercader, J.M., Estivill, X., et al. (2007) SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*, 23: 644e5.
16. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva – INCA/ Ministério da Saúde (2015) Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 126p.
17. Yasuda, S. U., Zhang, L., e Huang, S. M. (2008). The role of ethnicity in variability in response to drugs: focus on clinical pharmacology studies. *Clinical Pharmacology e Therapeutics*, 84(3), 417-423.
18. Sakamoto, E., Tsukioka, S., Oie, S., Kobunai, T., Tsujimoto, H., Sakamoto, K., et al. (2008) Folylpolyglutamate synthase and γ -glutamyl hydrolase regulate leucovorin-enhanced 5-fluorouracil anticancer activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 365(4), 801-807.
19. Shimamoto, Y., Nukatsuka, M., Takechi, T., e Fukushima, M. (2016). Association between mRNA expression of chemotherapy-related genes and clinicopathological features in colorectal cancer: A large-scale population analysis. *International journal of molecular medicine*, 37(2), 319-328.
20. Tsukioka, S., Sakamoto, E., Tsujimoto, H., Nakagawa, F., Saito, H., Uchida, J., e Fukushima, M. (2011). In vivo evidence for a significant role of folypolyglutamate synthase in combined chemotherapy with oral fluoropyrimidine, UFT or S-1, and leucovorin. *Oncology reports*, 25(5), 1407-1412.
21. Sohn, K. J., Smirnakis, F., Moskovitz, D. N., Novakovic, P., Yates, Z., Lucock, M., e Kim, Y. I. (2004) Effects of folypolyglutamate synthetase modulation on chemosensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *Gut*, 53(12), 1825-1831.
22. Yanagimachi, M., Naruto, T., Hara, T., Kikuchi, M., Hara, R., Miyamae, T., e Goto, H. (2011). Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *British journal of clinical pharmacology*, 71(2), 237-243.
23. den Boer, E., de Rotte, M. C., Pluijm, S. M., Heil, S. G., Hazes, J. M., e de Jonge, R. (2014). Determinants of erythrocyte methotrexate polyglutamate levels in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 41(11), 2167-2178.
24. Sala-Icardo, L., Lamana, A., Ortiz, A. M., García, L. E., Moreno, F. P., García-Vicuña, R., e González-Álvaro, I. (2016) Impact of genetic variants of ATP binding cassette B1, AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase, folypolyglutamatesynthetase, and methylenetetrahydrofolatereductase on methotrexate toxicity. *Reumatologia clinica*.
25. Thorn, C. F., Marsh, S., Carrillo, M. W., McLeod, H. L., Klein, T. E., e Altman, R. B. (2011) PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(4), 237.
26. Young, J. D., Yao, S. Y., Baldwin, J. M., Cass, C. E., e Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Molecular aspects of medicine*, 34(2), 529-547.

27. Phua, L. C., Mal, M., Koh, P. K., Cheah, P. Y., Chan, E. C. Y., e Ho, H. K. (2013) Investigating the role of nucleoside transporters in the resistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 71(3), 817-823.
28. Kunicka, T., Prochazka, P., Krus, I., Bendova, P., Protivova, M., Susova, S., e Pitule, P. (2016) Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma. *BMC cancer*, 16(1), 795.
29. Milazzo, L., Peri, A. M., Mazzali, C., Magni, C., Calvi, E., De Nicolò, A., e Falvella, F. S. (2015) SLC29A1 polymorphism and prediction of anaemia severity in patients with chronic hepatitis C receiving triple therapy with telaprevir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 519.
30. Kheloufi F. *et al.* (2016) Estimated glomerular filtration rate but not solute carrier polymorphisms influences anemia in HIV-hepatitis C virus coinfecting patients treated with boceprevir or telaprevir-based therapy. *AIDS*, V 30(13), 2085–2090.
31. Zhang, G., Wang, Z., Qian, F., Zhao, C., e Sun, C. (2015) Silencing of the ABCC4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. *Oncology reports*, 33(3), 1147-1154.
32. McLeod, H. L., Owzar, K., Kroetz, D., Innocenti, F., Das, S., Friedman, P., e Ratain, M. J. (2008). Cellular transporter pharmacogenetics in metastatic colorectal cancer: initial analysis of C80203. *Journal of Clinical Oncology*, V 26 (15) p 3513.
33. Islam, M. S., Islam, M. S., Parvin, S., Ahmed, M. U., Sayeed, M. S. B., Uddin, M. M. N., et al. (2015) Effect of GSTP1 and ABCC4 gene polymorphisms on response and toxicity of cyclophosphamide-epirubicin-5-fluorouracil-based chemotherapy in Bangladeshi breast cancer patients. *Tumor Biology*, 36(7), 5451-5457.

CAPÍTULO IV. DISCUSSÃO

As estimativas de incidência para o tumor gástrico e colorrectal apontam elevadas taxas no Brasil e na região Norte do país. Os dados de mortalidade revelam taxas consideráveis em todo mundo, onde tanto o tumor gástrico quanto o colorrectal são representados por 9% do número total de óbitos relacionados aos tumores sólidos (Stewart e Wild, 2014; INCA/MS, 2015).

A 5-Fluorouracil (5-FU) e seus pró-fármacos orais Capecitabine e Tegafur desempenham um papel chave no tratamento do câncer (Matsusaka e Lenz, 2015; Meulendijks *et al.*, 2016). O fármaco 5-FU, utilizado sozinho ou em combinação é o mais prevalente e efetivo agente quimioterápico utilizado no tratamento dos tumores do trato gastrointestinal (Matsusaka e Lenz, 2015).

As reações adversas ao tratamento com 5-FU são consideradas severas quando classificadas em grau 3 e 4 de toxicidade, de acordo com o CTCAE. Na literatura, são relatadas taxas de incidência variando de 10-40% de toxicidades severas associadas ao uso de 5-FU, em geral estes casos resultam em hospitalizações prolongadas e onerosas (Matsusaka e Lenz, 2015; Campbell *et al.*, 2016).

No grupo de pacientes investigados neste estudo foram encontradas taxas de 22,2% de ocorrência de toxicidades severas, concordando com os dados existentes na literatura. Meulendijks *et al.* relataram taxas de mortalidade de 0,5-1% associadas a complicações decorrentes do tratamento quimioterápico com 5-FU, no entanto, nesta investigação os casos de óbitos relacionados exclusivamente por complicações da toxicidade quimioterápica foram superiores (1,38%) e se forem considerados casos em que o óbito ocorreu por associação da toxicidade ao tratamento e progressão da doença, as taxas aumentam para 3,24% dos casos investigados. Em ambos os casos, as incidências de mortalidade encontrada foram superiores as estimativas relatadas (Meulendijks *et al.*, 2016).

Os tipos de tumores investigados neste estudo (gástrico e colorrectal) apesar de afetarem órgãos diferentes, ambos constituem o trato gastrointestinal. Após o diagnóstico, grande parte desses tumores recebem a mesma conduta terapêutica, baseada em Fluoropirimidinas, com ou sem combinação de outros

fármacos (Mohelnikova-Duchonova *et al.*, 2014). Realizamos as análises dos resultados para os biomarcadores farmacogenéticos selecionados e relatos de ocorrências de toxicidade e resposta para os dois tipos tumorais em separados e depois reunidos. Todos os resultados significantes foram mantidos em ambas análises realizadas, por este motivo, mantivemos estes dois tipos tumorais reunidos na apresentação dos resultados.

A heterogeneidade da população brasileira têm implicações importantes na implementação dos princípios de PGx em relação à extrapolação de dados farmacogenéticos obtidos de outras populações. A diversidade populacional do Brasil implica que a extrapolação de dados oriundos de grupos étnicos relativamente bem definidos, não é aplicável à maioria dos brasileiros (Suarez-Kurtz, 2010).

A FDA já possui uma orientação na qual recomenda que sejam feitas investigações do perfil de metabolismo diferenciado entre subgrupos étnicos para comparar resultados entre populações e avaliar diferenças individuais na farmacogenética/farmacogenômica que possam afetar a segurança e eficácia do tratamento nessas populações (Yasuda *et al.*, 2008). Portanto, o controle genômico da ancestralidade foi aplicado neste estudo para evitar possíveis associações espúrias dos resultados farmacogenéticos (Suarez-Kurtz, 2010) em relação aos desfechos investigados (toxicidade e resposta).

Apesar da população do norte do Brasil, em que foi realizado o estudo, possuir uma contribuição genética diferencial com elevada contribuição do componente ancestral ameríndio (Santos *et al.*, 2010), os resultados obtidos em relação à ancestralidade genômica não demonstraram diferenças significantes entre as variáveis clínicas e epidemiológicas analisadas, desta forma concluímos que o subestruturamento populacional não foi influente em nossos resultados na associação para os polimorfismos farmacogenéticos.

Nossos resultados não demonstraram associação significativa entre os biomarcadores, DPYD e TYMS, que possuem recomendações farmacogenéticas pelas agências mundiais regulamentadoras de fármacos para o uso de Fluoropirimidinas. Acreditamos que este achado se deve a baixa frequência

desses marcadores, logo as conclusões a respeito destes importantes genes devem ser referendadas em um próximo estudo que deve ampliar o número amostral investigado e incluir outros polimorfismos relevantes.

Os resultados encontrados para o polimorfismo rs4451422 do gene FPGS foram os mais relevantes desta investigação. Foram encontradas associações significativas para as duas variáveis clínicas relacionadas à toxicidade (toxicidade geral e eventos de toxicidade). O polimorfismo rs4451422 demonstrou um efeito de proteção em torno de 70% para a toxicidade geral e 78% para eventos de toxicidades.

O gene FPGS (folilpoliglutanil sintetase) participa na via metabólica de 5-FU, especificamente na via do folato. Logo, a expressão de FPGS afeta os níveis de folato que conseqüentemente pode ter uma atividade antitumoral *in vitro* ou levar a citotoxicidade em terapias com uso de 5-FU (Sakamoto *et al.*, 2008). A via na qual o gene FPGS participa é particularmente importante para os pacientes tratados com poliquimioterapia envolvendo Leucovorin e 5-FU, que representa cerca de 93% da amostra investigada.

O Leucovorin (LV) é um fármaco utilizado no tratamento anticancerígeno apesar de não exercer ação antitumoral diretamente seu efeito desejado é a potencialização da ação de 5-FU através do aumento dos níveis de folato reduzido dentro da célula (Shimamoto *et al.*, 2016).

A enzima FPGS converte os folatos monoglutamatos em poliglutamatos, compostos facilmente conservados no interior celular e com maior capacidade de estabilizar o complexo ternário inibidor de TS (5,10-metilenoTHF-TS-FdUMP), potencializando desta forma os efeitos citotóxicos de 5-FU (Tsukioka *et al.*, 2011; Sohn *et al.*, 2004).

Vários estudos investigam a associação de polimorfismo no gene FPGS com a terapia medicamentosa a base de Metotrexato ou Pemetrexato classificados como fármacos anti-folatos (Yanagimachi *et al.*, 2011; den Boer *et al.*, 2014; Sala-Icardo *et al.*, 2016).

Diferentes trabalhos na literatura investigaram parâmetros bioquímicos e de expressão de RNA, demonstrando a influência da expressão do gene FPGS na

toxicidade, em pacientes tratados com fármacos a base de Fluorouracil (Shimamoto *et al.*, 2016; Tsukioka *et al.*, 2011; Sohn *et al.*, 2004). Sohn *et al.* encontrou que a diminuição da atividade do FPGS está diretamente ligada a resistência a 5-FU, em várias linhagens celulares de tumores humanos (Sohn *et al.*, 2004).

De maneira geral, nosso trabalho é o primeiro na literatura a sugerir que polimorfismos, particularmente o rs4451422 no gene FPGS, pode ser preditivo de toxicidade ao uso de 5-FU e Leucovorin. O gene SLC29A1 codifica a proteína humana equilibrativa de transporte de nucleosídeos 1 (*hENT1*) responsável pelo transporte de nucleosídeos, como purinas e pirimidinas nas células tumorais. O papel da *hENT* é o transporte de diversos nucleotídeos e nucleobases, particularmente importante para diferentes fármacos oncológicos, incluindo 5-FU (Mohelnikova-Duchonova *et al.*, 2014).

Diversos estudos demonstraram a relação entre a atividade da enzima *hENT* com o transporte e resistência a fármacos (Thorn *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2013). A resistência das células tumorais ao tratamento com 5-FU é modulada pelos mecanismos de transporte. Especialmente, o transportador 29A1 o qual desempenha um papel crucial na absorção celular. Diversas investigações na literatura correlacionaram altos níveis de expressão do gene SLC29A1 com resistência a terapêutica de 5-FU em pacientes com câncer colorrectal (Phua *et al.*, 2013; Kunicka *et al.*, 2016).

Em nossa investigação encontramos uma associação significativa do gene SLC29A1 (rs760370) com a toxicidade severa a 5-FU ($p=0.0033$). O risco estimado da toxicidade severa foi cerca de cinco vezes maior para pacientes submetidos à quimioterapia com derivados de 5-FU. Este resultado concorda com os dados de Phua *et al.* que mostrou um aumento na citotoxicidade de 5-FU em células tumorais, como resultado da inibição de *hENT1* (Phua *et al.*, 2013).

Outros estudos na literatura evidenciam uma forte influência do polimorfismo rs760370 no gene SLC29A1 para a toxicidade relacionada ao uso de fármacos antivirais (Milazzo *et al.*, 2015; Kheloufi *et al.*, 2016). Nosso trabalho é o

primeiro a evidenciar a associação da toxicidade severa com o SNP rs760370 em quimioterapia oncológica.

O gene ABCC4 é um membro da família de transportadores de cassetes de ligação de ATP (ABC) conhecida como proteína de multi-resistência a fármacos. O gene ABCC4 controla a redistribuição e a excreção de muitos fármacos antivirais, antibióticos e medicamentos cardiovasculares, além de desempenhar um papel chave na proteção de células e sinal celular das vias de transdução (Zhang *et al.*, 2015).

Nossos resultados demonstraram uma forte influência do polimorfismo rs4148551 no gene ABCC4 para resistência a terapia com uso de Fluoropirimidinas ($p= 0,0056$). Estudos recentes evidenciaram que a expressão do gene ABCC4 está intimamente associada com a ocorrência de tumores malignos e resistência a fármacos. Este gene participa da farmacocinética do 5-FU removendo a molécula do fármaco para o exterior celular, dessa forma tem sido associado na literatura com a resistência a esta terapia (Zhang *et al.*, 2015).

Zhang *et al.* demonstrou que o gene ABCC4 é altamente expresso em células tumorais de câncer gástrico humano resistentes a fármacos. Neste estudo foi descrito que a baixa expressão de ABCC4, na presença de 5-FU, possibilitou o aumento de apoptose e parada do ciclo celular no câncer gástrico humano (Zhang *et al.*, 2015).

Diferentes trabalhos na literatura confirmaram que a expressão reduzida de ABCC4 é encontrada em gliomas, neuroblastomas, retinoblastomas e melanomas, bem como câncer colorrectal e gástrico. Além disso, a expressão de ABCC4 está correlacionada diretamente com a resistência a fármacos em células leucêmicas e de câncer no ovário (Zhang *et al.*, 2015).

Poucos estudos investigaram polimorfismos no gene ABCC4 em associação ao tratamento com 5-FU (McLeod *et al.*, 2008; Islam *et al.*, 2015). Neste estudo, o polimorfismo (rs4148551) demonstrou ser um importante biomarcador preditivo de resposta à quimioterapia com 5-FU.

Em conclusão, devido ao elevado grau de miscigenação da população brasileira, e particularmente do Norte do Brasil, os dados gerados de

farmacogenômica do 5-FU são particularmente únicos se comparados com as populações homogêneas investigadas até o presente. Os genes ABCC4, FPGS e SLC29A1 demonstraram ser importantes biomarcadores preditivos para a medicina personalizada da terapia com uso de 5-FU.

CAPÍTULO V. CONCLUSÃO

As taxas de toxicidades severas foram relevantes no grupo estudado apesar de concordarem com o valor já estimado para as incidências mundiais.

Os valores encontrados para óbitos causados por toxicidade entre os pacientes tratados com 5-FU foram superiores a média mundial, este fato deve ser avaliado com cautela para se identificar fatores agravantes nesta elevada incidência.

A ancestralidade genômica não foi influente para as variáveis clínicas avaliadas em associação com os polimorfismos farmacogenéticos.

De todos os 33 biomarcadores incluídos no painel de investigação, apenas 22 foram efetivamente incluídos nas análises do estudo, pois atenderam aos critérios do controle de qualidade dos marcadores.

O gene FPGS (rs4451422) mostrou-se significativo com os dois critérios de descrição para toxicidade: toxicidade geral e com eventos de toxicidades.

O gene SLC29A1 (rs760370) demonstrou efeito significativo, com um risco aumentado em quatro vezes para o desenvolvimento de toxicidades de grau 3 e 4.

O gene ABCC4 (rs148551) apresentou associação significativa para a resposta clínica, com fator de proteção.

Os genes ABCC4, FPGS e SLC29A1 demonstraram ser importantes biomarcadores preditivos para a medicina personalizada da terapia com uso de 5-FU.

Devido ao elevado grau de miscigenação da população brasileira, e particularmente do Norte do Brasil, os dados gerados de farmacogenômica do 5-FU são particularmente únicos se comparados com as populações homogêneas investigadas até o presente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S., Zhou, Z., Zhou, J., & Chen, S.Q. (2016). *Pharmacogenomics of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters: Relevance to Precision Medicine. Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(5), 298-313.
- Ajani JA, Faust J, Ikeda K, et al. (2005) Phase I pharmacokinetic study of S-1 plus cisplatin in patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol* (28):6957–6965.
- Assumpção., P.P. e Burbano., R.R.(2005) Genética e câncer gástrico. *In: Linhares E, Laércio L, Takeshi S* (editores). *Atualização em Câncer-Gástrico*. 1º ed. São Paulo, Tecmed Editora: 95-106.
- Balaresque PL, Ballereau SJ, Jobling MA (2007) Challenges in human genetic diversity:demographic history and adaptation. *Hum Mol Genet* 16 (2): 134-139.
- Balboa, E., Duran, G., Lamas, M.J., Gomez-Caamano, A., Munoz, C.C., Lopez, R. Carracedo, A., Barros, F. (2010) *Pharmacogenomics*, 11(6), 747-761.
- Balboa-Beltran, E., Cruz R., Carracedo A., Barros F. (2015) Delimiting allelic imbalance of TYMS by Allele-specific analysis. *Medicine(Baltimore)*: 94(27):e1091.
- Burstein HJ, Harris LN, Marcom PK, Lambert-Falls R, Havlin K, Overmoyer B, et al. (2003) Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol* 21:2889- 95.
- Stephenson, M. D. (2016). Fluoropyrimidine and platinum toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Pharmacogenomics*, 17(4), 435-451.
- Carvalho, D. C., Wanderley, A. V., Amador, M. A., Fernandes, M. R., Cavalcante, G. C., Pantoja, K. B., & Santos, S. (2015). Amerindian genetic ancestry and INDEL polymorphisms associated with susceptibility of childhood B-cell Leukemia in an admixed population from the Brazilian Amazon. *Leukemia research*, 39(11), 1239-1245.
- Caudle, K. E., Thorn, C. F., Klein, T. E., Swen, J. J., McLeod, H. L., Diasio, R. B., & Schwab, M. (2013). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94(6), 640-645.
- Chansky K, Benedetti J, Macdonald JS (2005) Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer* 103(6):1165-71.
- Chuah B., Goh B.C., Lee S.C., Soong R., Lau F., Mulay M., Dinolfo M., et al. (2011) Comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of S-1 between Caucasian and East Asian patients. *Cancer science*, 102(2), 478–83.
- Daar SA and Singer PA (2005) Pharmacogenetics and geographical ancestry:

- implications for drug development and global health. *Nature reviews* 6: 241.
- den Boer, E., de Rotte, M. C., Pluijm, S. M., Heil, S. G., Hazes, J. M., & de Jonge, R. (2014). Determinants of erythrocyte methotrexate polyglutamate levels in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 41(11), 2167-2178.
- Di Francia, R., De Lucia, L., Di Paolo, M., Di Martino, S., Del Pup, L., De Monaco, A., & Berretta, M. (2015). Rational selection of predictive pharmacogenomics test for the Fluoropyrimidine/Oxaliplatin based therapy. *European review for medical and pharmacological sciences*, 19(22), 4443-4454.
- Eichelbaum M, Sundberg MI, Evans WE (2006) Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu. Rev. Med* 57: 119-137.
- Fernandes MR, de Carvalho DC, dos Santos ÂK, dos Santos SE, de Assumpção PP, Burbano RM, dos Santos NP (2013) Association of slow acetylation profile of *NAT2* with breast and gastric cancer risk in Brazil. *Anticancer Res*. 33(9): 3683-9.
- Fernandez-Rozadilla, C., Cazier, J. B., Moreno, V., Crous-Bou, M., Guino, E., Duran, G., & Paré, L. (2013). Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX administration. *The pharmacogenomics journal*, 13(3), 209-217.
- Fujita K (2006) Cytochrome P450 and anticancer drugs. *Curr Drug Metab* 7: 23-37.
- Gimenes D.L. e Costa A.A.B.A. (2013) Princípios de terapia sistêmica. *In* Lopes A, Chammas R, Iyeyasu. *Oncologia para a graduação*. 3ª edição. Lemar editora. capítulo 27: 229-233.
- Gonzalez, J.R., Armengol, L., Sole, X., Guino, E., Mercader, J.M., Estivill, X., et al. (2007) SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*, 23: 644e5.
- Hanahan D e Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74.
- Hoff PM, Saad ED, Ajani JA, et al. (2003) Phase I study with pharmacokinetics of S-1 on an oral daily schedule for 28 days in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 9: 134-142.
- Ikeda K, Yoshisue K, Matsushima E, Nagayama S, Kobayashi K, Tyson Ca, Chiba K, Kawaguchi Y.(2000) Bioactivation of tegafur to 5-fluorouracil is catalyzed by cytochrome P-450 2A6 in human liver microsomes in vitro. *Clin Cancer Res* 6:4409–4415.
- Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva – INCA/ Ministério da Saúde (2015) Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 126p.
- Islam M. S., Parvin, S., Ahmed, M. U., Sayeed, M. S. B., Uddin, M. M. N., et al. (2015) Effect of GSTP1 and ABCC4 gene polymorphisms on response and toxicity of cyclophosphamide-epirubicin-5-fluorouracil-based chemotherapy in Bangladeshi breast cancer patients. *Tumor Biology*, 36(7), 5451-5457.
- Jobling MH, Mathew, Tyler-Smith C (2004) *Human Evolutionay Genetics: Origins, Peoples and Disease*. Garland Science.

- Kheloufi F. et al.(2016) Estimated glomerular filtration rate but not solute carrier polymorphisms influences anemia in HIV-hepatitis C virus coinfecting patients treated with boceprevir or telaprevir-based therapy. *AIDS*, V 30(13), 2085–2090.
- Koizumi W, Narahara H, Hara T, Takagane A, Akiya T, Takagi M, Miyashita K, Nishizaki T, Kobayashi O, Takiyama W, Toh Y, Nagaie T, Takagi S, Yamamura Y, Yanaoka K, Orita H, Takeuchi M. S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. *Lancet Oncol*; 9(3): 215-21. 2008
- Kunicka, T., Prochazka, P., Krus, I., Bendova, P., Protivova, M., Susova, S., & Pitule, P. (2016) Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma. *BMC cancer*, 16(1), 795.
- Loh M, & Soong R (2011) Challenges and pitfalls in the introduction of pharmacogenetics for cancer. *Annals of the Academy of Medicine Singapore* 40(8): 369–74.
- Lamas, M. J., Duran, G., Balboa, E., Bernardez, B., Touris, M., Vidal, Y., & Barros, F. (2011). Use of a comprehensive panel of biomarkers to predict response to a fluorouracil-oxaliplatin regimen in patients with metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics*, 12(3), 433-442.
- Lauwers GY., Carneiro F., Graham DY., et al. (2010). Gastric Carcinoma. In: Bosman FT., Carneiro F., Hruban RH., Theise ND., eds. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th ed. Lyon: IARC. pp. 48-58.
- Liou SY, Stephens JM, Carpiuc KT, Feng W, Botteman MF, Hay JW (2007). Economic burden of haematological adverse effects in cancer patients: A systematic review. *Clin Drug Investig.* 27:381-96.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature reviews. Cancer* 3(5): 330–8.
- Mandola MV¹, Stoehmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, Lenz HJ, Ladner RD.(2004) A 6p polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 14(5):319-27.
- Matusaka, S., & Lenz, H. J. (2015). Pharmacogenomics of fluorouracil-based chemotherapy toxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 11(5), 811-821.
- McLeod, H. L., Owzar, K., Kroetz, D., Innocenti, F., Das, S., Friedman, P., & Ratain, M. J. (2008). Cellular transporter pharmacogenetics in metastatic colorectal cancer: initial analysis of C80203. *Journal of Clinical Oncology*, V 26 (15) p 3513.
- Meulendijks, D., Cats, A., Beijnen, J.H., Schellens, J.H. (2016). Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity - Ready for clinical practice?. *Cancer Treat Rev.*, 50:23-34.
- Milazzo, L., Peri, A. M., Mazzali, C., Magni, C., Calvi, E., De Nicolò, A., & Falvella, F. S. (2015) SLC29A1 polymorphism and prediction of anaemia severity in

- patients with chronic hepatitis C receiving triple therapy with telaprevir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 519.
- Mohelnikova-Duchonova, B., Melichar, B., & Soucek, P. (2014) FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(30), 10316.
- Nishiyama, M., e Eguchi, H (2009) Pharmacokinetics and pharmacogenomics in gastric cancer chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, 61(5), 402–7.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ (2003). Color and genomic ancestry in Brazilians. *Genet* 100: 177-182.
- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 6(2):17063.
- Phua, L. C., Mal, M., Koh, P. K., Cheah, P. Y., Chan, E. C. Y., & Ho, H. K. (2013) Investigating the role of nucleoside transporters in the resistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 71(3), 817-823.
- Ramos, B.R.A., Mendes, N.D., Tanikawa, A.A., Amador, M.A.T., Santos, N.P.C., Santos, S.E.B., Castelli, E.C., Witkin, S.S., Silva, M.G.(2016) Ancestry informative markers and selected single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes on preterm labor and preterm premature rupture of membranes: a case control study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 16: 30.
- Reis M (2006) Farmacogenética aplicada ao câncer. *Quimioterapia Individualizada e especificidade molecular. Simpósio: Farmacogenética*, 39: 577-586.
- Rosmarin, D., Palles, C., Pagnamenta, A., Kaur, K., Pita, G., Martin, M., Johnstone, E. (2015) A candidate gene study of capecitabine-related toxicity in colorectal cancer identifies new toxicity variants at DPYD and a putative role for ENOSF1 rather than TYMS. *Gut*, 64(1), 111-120.
- Sakamoto, E., Tsukioka, S., Oie, S., Kobunai, T., Tsujimoto, H., Sakamoto, K., et al. (2008) Folyl-polyglutamate synthase and γ -glutamyl hydrolase regulate leucovorin-enhanced 5-fluorouracil anticancer activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 365(4), 801-807.
- Sala-Icardo, L., Lamana, A., Ortiz, A. M., García, L. E., Moreno, F. P., García-Vicuña, R., & González-Álvaro, I. (2016) Impact of genetic variants of ATP binding cassette B1, AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase, folyl-polyglutamatesynthetase, and methylenetetrahydrofolatereductase on methotrexate toxicity. *Reumatologia clinica*.
- Santos, N.P.C., Ribeiro-Rodrigues, E. M., Ribeiro-dos-Santos, Â.K., Pereira, R., Gusmão, L., Amorim, A., e Santos, S.E. (2010) Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48–insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human mutation*, 31(2), 184-190.
- Savva-bordalo J, Ramalho-carvalho J, Pinheiro M, Costa VL, Rodrigues Â, Dias PC, Veiga I, et al. (2010) Promoter methylation and large intragenic

- rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. *BMC Cancer* 10: 420.
- Scartozzi, M., Bittoni, A., Pistelli, M., Galizia, E., Berardi, R., Giampieri, R., & Cascinu, S. (2009). Toward molecularly selected chemotherapy for advanced gastric cancer: state of the art and future perspectives. *Cancer treatment reviews*, 35(5), 451-462.
- Shimamoto, Y., Nukatsuka, M., Takechi, T., & Fukushima, M. (2016). Association between mRNA expression of chemotherapy-related genes and clinicopathological features in colorectal cancer: A large-scale population analysis. *International journal of molecular medicine*, 37(2), 319-328.
- Shimoyama, S. (2009). Pharmacogenetics of fluoropyrimidine and cisplatin. A future application to gastric cancer treatment. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(6), 970-981.
- Shirasaka T, Shimamoto Y And Fukushima M.(1993) Inhibition by oxonic acid of gastrointestinal toxicity of 5-fluorouracil without loss of its antitumor activity in rats. *Cancer Res* 53: 4004-4009.
- Sohn, K. J., Smirnakis, F., Moskovitz, D. N., Novakovic, P., Yates, Z., Lucock, M., & Kim, Y. I. (2004) Effects of folylpolyglutamate synthetase modulation on chemosensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *Gut*, 53(12), 1825-1831.
- Soo, R. A., Syn, N., Lee, S. C., Wang, L., Lim, X. Y., Loh, M., & Chan, D. (2016). Pharmacogenetics-guided Phase I study of capecitabine on an intermittent schedule in patients with advanced or metastatic solid tumours. *Scientific reports*, 6.
- Stewart, B. W., e Wild, C. P. (2014). World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. *World Health Organization*, 505.
- Suarez-Kurtz, G. (2010). Pharmacogenetics in the Brazilian population. *Frontiers in Pharmacology*, 1(118), 1 – 10.
- Suarez-Kurtz, G., Paula, D.P., Struchiner, C.J. (2014) Pharmacogenomic implications of population admixture: Brazil as a model case. *Pharmacogenomics*, 15(2): 209-19.
- Thorn, C. F., Marsh, S., Carrillo, M. W., McLeod, H. L., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011) PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(4), 237.
- Tsukioka, S., Sakamoto, E., Tsujimoto, H., Nakagawa, F., Saito, H., Uchida, J., & Fukushima, M. (2011). In vivo evidence for a significant role of folylpolyglutamate synthase in combined chemotherapy with oral fluoropyrimidine, UFT or S-1, and leucovorin. *Oncology reports*, 25(5), 1407-1412.
- Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD.(2000) Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*: 9(12):1381-5.
- Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV (2007) Adjuvant

- trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 7:153.
- Vieira, P. C. M., Burbano, R. M. R., Fernandes, D. C. R. O., Montenegro, R. C., Santos, S. E. B., Sortica, V. A., & Santos, N. P. C. (2015). Population stratification effect on cancer susceptibility in an admixed population from Brazilian Amazon. *Anticancer research*, 35(4), 2009-2014.
- Wang L, Mcleod HL, Weinshilboum RM (2011) Genomics and drug response. *N Engl J Med*. 364: 1144-1153.
- Wang W, Yang Y, Zhao Y, Zhang T, Liao Q, Shu H (2014) Recent studies of 5-fluorouracil resistance in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 20(42):15682-15690.
- Yanagimachi, M., Naruto, T., Hara, T., Kikuchi, M., Hara, R., Miyamae, T., & Goto, H. (2011). Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *British journal of clinical pharmacology*, 71(2), 237-243.
- Yasuda, S. U., Zhang, L., & Huang, S. M. (2008). The role of ethnicity in variability in response to drugs: focus on clinical pharmacology studies. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 84(3), 417-423.
- Young, J. D., Yao, S. Y., Baldwin, J. M., Cass, C. E., & Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Molecular aspects of medicine*, 34(2), 529-547.
- Zhang, G., Wang, Z., Qian, F., Zhao, C., & Sun, C. (2015) Silencing of the ABCC4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. *Oncology reports*, 33(3), 1147-1154.

REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

NCI (National Cancer Institute)

Disponível em: <https://www.cancer.gov/>

PharmGKB (The Pharmacogenomics Knowledgebase)

Disponível em: <https://www.pharmgkb.org/>

PubMed/Medline-NCBI (The National Center for Biotechnology Information)

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

PubChem-NCBI (The National Center for Biotechnology Information)

Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

dbSNP Short Genetic Variations-NCBI (The National Center for Biotechnology Information)

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

FDA (U.S Food and drug administration)

Disponível em: <http://www.fda.gov/>

FDA (Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling)

Disponível em:

<http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>

ANEXOS- Artigos publicados pelo discente no período do doutorado.

ANEXO I - ASSOCIATION OF SLOW ACETYLATION PROFILE OF NAT2 WITH BREAST AND GASTRIC CANCER RISK IN BRAZIL.

ANEXO II- AMERINDIAN GENETIC ANCESTRY AND INDEL POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY OF CHILDHOOD B-CELL LEUKEMIA IN AN ADMIXED POPULATION FROM THE BRAZILIAN AMAZON.

Association of Slow Acetylation Profile of *NAT2* with Breast and Gastric Cancer Risk in Brazil

MARIANNE RODRIGUES FERNANDES^{1,2}, DARLEN CARDOSO DE CARVALHO^{1,2},
ÂNDREA KELLY CAMPOS RIBEIRO DOS SANTOS^{1,2},
SIDNEY EMANUEL BATISTA DOS SANTOS^{1,2}, PAULO PIMENTEL DE ASSUMPÇÃO^{1,3},
ROMMEL MARIO RODRIGUEZ BURBANO^{1,4} and NEY PEREIRA CARNEIRO DOS SANTOS^{1,2}

¹Research Center of Oncology, Federal University of Pará, Belém, Brazil;

²Laboratory of Human and Medical Genetics, Institute of Biological Sciences;

³João de Barros Barreto University Hospital, Federal University of Pará, Belém, Brazil and

⁴Laboratory of Human Cytogenetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil

Abstract. *Background:* The *N*-acetyltransferase 2 (*NAT2*) gene is a marker for the study of interindividual susceptibility to developing neoplasias. The purpose of this study was to verify a possible association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *NAT2* and the susceptibility to gastric cancer (GC) and breast cancer (BC) in patients from the North region of Brazil. *Materials and Methods:* Five SNPs of the *NAT2* gene were investigated by direct sequencing. Ancestry was estimated by analysis of a panel with 48 ancestry-informative markers (AIM). *Results:* Individuals with slow acetylation profile had an increased risk of developing neoplasias up to three times when compared to controls. *Conclusion:* In this study, slow acetylation profile was found to strongly influence susceptibility to GC and BC.

Gastric cancer (GC) is the fourth most common type of neoplasias worldwide (1, 2) and breast cancer (BC) has the highest incidence and is the leading cause of female death (2). In Brazil, GC represents the fifth most common type of tumor among the male population and BC is the second most common among the female population (3). Studies of genetic susceptibility to cancer using single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the genes that encode the enzymes responsible for the biotransformation of carcinogenic agents may identify the at-risk population and help to clarify the etiology of a given

tumor type (4-6). *N*-acetyltransferase 2 gene is a marker for the study of interindividual susceptibility to develop neoplasias; the enzyme *NAT2* takes part in the metabolism of carcinogenic agents and SNPs of its gene produce enzymes with different activities, leading to slow or fast acetylation of xenobiotics, such as aromatic and heterocyclic amines (7-9). The purpose of this study was to verify a possible association between SNPs of *NAT2* gene and the susceptibility to GC and BC in patients from the North region of Brazil. An ancestry genomic assay of case and control samples was carried out to estimate the individual inter-ethnic admixture for the volunteers taking part in this study.

Materials and Methods

Study population. The investigated participants were chosen according to a case control study. The sample cohort consisted of 63 patients from João de Barros Barreto University Hospital, all of them were diagnosed with gastric adenocarcinoma, and 70 patients from Ophir Loyola Hospital, diagnosed with invasive ductal breast carcinoma, both hospitals located in the city of Belém, Brazil. For both groups, risk factors related to the development of neoplasias were established, such as advanced age and gender. For the case group, we also collected other risk factors for the development of neoplasia, such as alcoholism and tobaccoism. The study control population was composed of 89 participants without cancer, living in the North region of Brazil. The protocol used in this study was approved by the Committee of Research Ethics from the João de Barros Barreto University Hospital (protocol number 3505/2004) for gastric cancer samples and by the Committee of Research Ethics from the Tropical Medicine Center of Federal University of Pará (protocol number 043/2008) for breast cancer samples. All patients recruited for this study provided written informed consent to their participation.

Genomic DNA extraction. From each participant, 5 ml of peripheral blood was collected by using EDTA as anticoagulant. DNA extraction was carried out according to the method described by Sambrook *et al.* (10), with modifications. The concentration of DNA was estimated by

This article is freely accessible online.

Correspondence to: Marianne Rodrigues Fernandes, Research Center of Oncology, Federal University of Pará, Belém, Brazil. E-mail: fernandesmr@yahoo.com.br

Key Words: *NAT2*, cancer susceptibility, SNP, IAM, breast cancer, gastric cancer.

the use of a GeneQuant RNA/DNA spectrophotometer (Amersham, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK).

Genotyping of NAT2 gene. Five polymorphisms of great importance for the definition of NAT2 profile (C282T, T341C, C481T, A803G and G857A) were investigated by direct sequencing of 986 base pairs, amplified in two reactions, with the following primers: NAT2-1F (5'-TTA ATT CTC ATC TCC TGC CAA AGA-3'), NAT2-1R (5'-TCA CTC TGC TTC CCA AGA TAA TCA-3'); NAT2-2F (5'-ATG GAG TTG GGC TTA GAG GCT AT-3'), NAT2-2R (5'-CTT TGG CAG GAG ATG AGA ATT AAG A-3'). The choice of the primers was made by using the software Primer 3 (11). An amplification was carried out in an ABI Verity thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The standard protocol used: 20 pmol of each oligonucleotide, 2.5 mM MgCl₂, 0.25 mM each dNTP, 3 U Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 100 ng of genomic DNA in a 25 µl reaction volume. Samples were incubated at 95°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 2 min, 60°C for 1 min and 70°C for 2 min, with a final extension at 70°C for 30 min. Amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gels. PCR products were purified with Purelink kit (Invitrogen Life Technologies). Sequencing was carried out on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The obtained sequences were analyzed for the identification of SNP by alignment with the reference sequence (GenBank accession X14672). The nomenclature of NAT2 genotype is given in accordance with that described in 'The Consensus Gene Nomenclature of Human NAT2 Alleles' (12).

Estimates of individual inter-ethnic admixture. The population from the North region of Brazil, the target of this study, is composed of an inter-ethnic admixture of three ancestry populations: African, European and Native American (13). In order to avoid spurious interpretations resulting from the population substructure, we used a panel with 48 AIMs (13). In this way, we estimated the individual inter-ethnic admixture and checked the ancestry for the study's case and control samples.

Statistical analysis. Allele frequencies at individual loci were estimated by the Hardy-Weinberg equilibrium exact test was performed using the GENEPOP software (14). Linkage disequilibrium estimates (D and D') and the maximum likelihood estimate of haplotype frequencies were calculated with the software PHASE v.2.1 (15). Estimates of Individual inter-ethnic admixture were carried out by using the software Structure v.2.2 (16). All other statistical analyses were performed by using the statistical software SPSS v.12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Group comparisons for categorical variables were carried out using the χ^2 test, while Student's *t*-test was used for the analysis of continuous variables. Odds ratios (OR) and confidence intervals (95% CIs) were also calculated. Multiple logistic regression analyses were carried out using the backward model. The comparison of ancestry index among the samples was carried out by using the Mann Whitney test. All statistical tests were based on a two-tailed probability, and a *p*-value ≤ 0.05 was considered significant.

Results

Inter-ethnic admixture estimates in cancer patients and controls. Figure 1 shows the individual parental ethnic contribution of case and control groups estimated through 48

AIMs. Table I lists the average of ancestries between the investigated groups. Based on individual ancestry estimates, it was possible to estimate the averages of such ancestries among the investigated groups, additionally to testing for differences. We found statistical differences for African and European parental contribution when compared between the cancer and control groups; a higher African contribution was detected in the study group with cancer and, in the control group, a higher European contribution was detected ($p < 0.001$). The Amerindian parental group was not statistically different when compared to ancestral groups. In order to control the substructure effects, we made use of the individual inter-ethnic admixture estimates as interference factors in statistical analyses of association between genetic markers and two investigated tumor types.

NAT2 gene SNPs frequencies associated with cancer susceptibility. Table II describes the frequencies of the five polymorphisms and their respective haplotypes associated with the acetylation profile in the group of patients with cancer. The most frequent allele was 481T, present in 38% of patient samples, while the least frequent was 857A (10%). All polymorphisms of NAT2 gene showed a linkage disequilibrium ($D' > 0.80$; $p \leq 0.05$). Thirteen (13) haplotypes derived from the five investigated polymorphisms were obtained (Table II). The most frequent haplotype found in association with fast acetylation profile was NAT2*4 (26%), followed by NAT2*13 (20%), NAT2*12 (4%) and NAT2*11 (3%). As for xenobiotic slow acetylation haplotypes, the most frequent ones found were: NAT2*5 (37%) and NAT2*7 (10%). The results of the haplotypes generated show a frequency of 53% for the alleles associated with the fast acetylation profile, while 47% were described as slow acetylation profile. Genotypic ratios found were in accordance with those expected by the Hardy Weinberg equilibrium, in all groups analyzed. Estimate relative risks in the groups with cancer (made up by combining GC and BC) were computed in relation to the control group. The results for separately-investigated polymorphisms showed a significant effect for SNP C282T only. Genotypes from the dominant polymorphism C282T (TT+CT) had a significant association ($p < 0.001$; OR=3.076; 95%CI=1.664-5.687) with susceptibility to the different forms of cancer investigated. Separate analysis of the polymorphisms in NAT2 gene showed that four SNPs (C481T, A803G, G857A and T341C) were not important in the association with the susceptibility to cancer.

NAT2 genotype associated with cancer susceptibility. Table III shows the distribution of participants according to the characteristics of the haplotypes and their acetylation profiles. For classification purpose, three genotype groups were defined: i) fast genotype, including these with two fast acetylation alleles; ii) intermediate genotype, with one fast

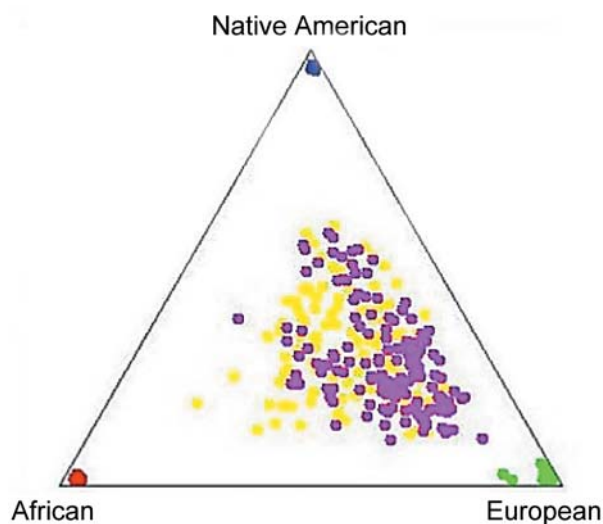


Figure 1. Individual estimate of inter-ethnic admixture between case and control groups. European, African and Native American ancestries were estimated with the genotyping of the panel of 48 ancestry-informative markers in the groups of patients with cancer (magenta) and controls (yellow). The admixture is estimated by a comparison with subjects from the parental populations: European (green), African (red) and Native American (blue).

acetylation allele and one slow acetylation allele; iii) slow genotype, with two slow acetylation alleles. Genotype *NAT2* *5/*5 was the most predominant (58%) among genotypes for slow acetylation identified in the study group with cancer. A significant association of slow and fast acetylation profile with the susceptibility to develop neoplasias investigated was detected ($p=0.010$; $OR=3.054$; $95\%CI=1.303-7.159$) and ($p=0.041$; $OR=0.527$; $95\%CI=0.280-0.973$). We showed that individuals with a slow acetylator profile have increased odds of developing neoplasias, up to three times when compared to controls. In this context, we also established that individuals who are homozygotes for fast acetylation have 53% protection against the development of a tumor (GC and BC) compared to those with other genotypes.

Discussion

The Brazilian population is one of the most heterogeneous population worldwide, with a contribution from three parental groups: Amerindians, Europeans and Africans (13, 17). Therefore, in studies of genetic association to diseases, the addition of a population structure estimate is of great importance aiming at identifying and correcting possible effects of the population substructure (13). In order to avoid spurious interpretations resulting from the population substructure, we used a panel with 48 AIMs (13). This panel has already been used in other studies of genetic association with diseases (18-21). A higher African contribution was

Table I. Ancestry statistics for patients with cancer and controls.

Ancestry	Control (n=89)	Cancer (n=133)	p-Value ^b
Native American	0.28±0.11	0.30±0.12	0.171
European	0.52±0.12	0.44±0.14	<0.001
African	0.20±0.01	0.26±0.11	<0.001

Data are means±standard deviation for quantitative data. ^aPatients with two different forms of neoplasia: gastric and breast cancer. ^bMann Whitney test.

detected in the study group with cancer. Kittles *et al.* found a similar population substructure among African Americans for prostate cancer (22). The genomic control by ancestry is able to correct distortions in the analysis of association as evidenced in other work (23, 24). The important role of control genomic ancestry in association studies is clear especially in populations with a high degree of mixing between ethnic groups, such as the Brazilian population. Our results on the association of the *NAT2* gene SNPs with the risk of different forms of cancer investigated suffered no distortion with the use of genomic ancestry. Several studies have revealed the role of genomic ancestry as a risk factor associated with different types of cancer (25-26). A meta-analysis published by Ali *et al.* found strong evidence that specific types of tumors are more prevalent in certain ethnic groups (27). In these studies, five different SNPs were identified through the sequencing of *NAT2* gene (T341C, C481T, A803G, C282T, G857A), which are some of the most important polymorphisms for determining the enzyme's acetylation speed (28, 29). Our study found similar results to association of diseases in the Brazilian population and in the Northern part of the country, which also investigated the *NAT2* gene which found a high frequency of C481T polymorphism (35% and 38%) and low frequency of G857A (4% and 9%) (28,30). The most frequent haplotype found in association with the fast acetylation profile was *NAT2**4 (26%), followed by *NAT2**13(20%), *NAT2**12 (4%) and *NAT2**11 (3%). This higher frequency for the fast acetylation haplotype *NAT2**4 is similar to with another study developed within the same population (19%) (30). In our study, for slow acetylation haplotypes, the most frequent SNP was *NAT2**5 (37%). A study which investigated a Brazilian population found a frequency of 33% for *NAT2**5 and in that study, the authors suggest an association of this haplotype's high incidence with the influence from European and African ancestral groups in the ethnic composition of the Brazilian population, considering the high incidence of *NAT2**5 in these two parental populations (17, 29). In that study, the isolated analysis of the polymorphisms in *NAT2* gene showed that only the SNP C282T was important in the association with the susceptibility to cancer. There is no consensus in the literature concerning the individual contribution of C282T

Table II. Single-nucleotide polymorphisms of *N-acetyltransferase 2* gene and haplotypes in patients with cancer from the North region of Brazil.

Nucleotide	282 T	481 T	803 G	857 A	341 C		
Amino acid	None	None	K268R	G286E	I114T		
Frequency	0.30	0.38	0.27	0.10	0.37		
Haplotype	C282T	C481T	A803G	G857A	T341C	Frequency	Phenotype
NAT2*4	C	C	A	G	T	0.2556	Fast
NAT2*5A	.	T	.	.	C	0.1278	Slow
NAT2*5B	.	T	G	.	C	0.2181	Slow
NAT2*5C	.	.	G	.	C	0.0113	Slow
NAT2*5D	C	0.0113	Slow
NAT2*7A	.	.	.	A	.	0.0113	Slow
NAT2*7B	T	.	.	A	.	0.0865	Slow
NAT2*7C	T	.	G	A	.	0.0037	Slow
NAT2*11A	.	T	.	.	.	0.0301	Fast
NAT2*12A	.	.	G	.	.	0.0263	Fast
NAT2*12B	T	.	G	.	.	0.0113	Fast
NAT2*12C	.	T	G	.	.	0.0037	Fast
NAT2*13A	T	0.2030	Fast

^aPatients with two different forms of neoplasia: gastric and breast cancer.

polymorphism to the genetic susceptibility to cancer; however, this is the most important SNP in the definition of haplotype NAT2*13, which characterizes the fast acetylation profile and which, in turn, is well-described in the literature to be associated with risk for cancer (31-33). Major SNPs used in the definition of the acetylation profile have already been described with high frequencies in different ethnic groups. Within the Brazilian population the C282T SNP was found at a significantly higher frequency in European descendants (17), and haplotype NAT2*13 was associated with higher contribution from African ancestry (29,34). These parental populations were particularly significant in our study of comparing the groups of cancer patients and controls.

Different studies involving susceptibility to BC obtained similar results, with greater predominance of fast acetylators (29%) in patients (35). On the other hand, another study with BC found higher frequency of slow acetylators 57% (36). The genotype NAT2*5/5 was the most predominant (58%) among genotypes for slow acetylation identified in the study group with cancer; in the literature, similar results were found concerning slow acetylation profile (17, 29, 30). We showed that individuals with a slow acetylator profile have probability of developing neoplasia (GC and BC) increased to up to three times when compared to controls ($p=0.010$; $OR=3.054$). The findings of several authors were similar to ours for the association of a slow acetylator profile with the risk of developing GC (37, 38) and BC (39-41), separately.

NAT2 is predominantly expressed in the liver, gastrointestinal tract and colon; although mRNA is detected in several other tissues at basal levels (8, 42). The metabolic profile of the enzyme can be associated with the susceptibility

to several tumors types in different organs, depending on the expression variation of the enzyme in such organ (43). Hein *et al.* published a review mentioning molecular studies of NAT2 gene in association with different forms of neoplasia (43). In their work, the influence of the acetylation profile variation on the increase of the risk of developing several types of tumor is clear. Moore *et al.* carried out a global meta-analysis and showed the great influence of a slow acetylation profile on bladder cancer (44).

Our findings strengthen studies which associate the slow acetylation profile with susceptibility to different forms of cancers lung (45), breast (40, 41), bladder (46, 47), cervical (48), gastric (37, 38), head and neck (43) and prostate (43). In the literature, much is discussed about the role of NAT acetylator profile in carcinogenesis. The metabolic role of the enzyme, such as N- and O-acetylation, can be modulated by SNPs, mainly, which will change the speed of metabolism of potentially carcinogenic agents (32, 49, 50). Another predominant and modulating factor of the risk of developing cancer is the type of exposure of individuals or populations, such as to heterocyclic and aromatic amines, resulting from several lifestyle habits, mainly including cigarette smoking, ingestion of well-done meat and alcohol (50-52). In this study, it was not possible to collect data concerning exposure to carcinogenic agents for the control group. The use of a panel of 48 AIMs allowed us to estimate the individual and global ratios of ancestral population contributions in the case and control samples. Ancestry genomic control was effectively important for this investigation once significant differences were found concerning ethnicity among those with and without neoplasias; based on such estimates, it was possible

Table III. Characterization of *N*-acetyltransferase 2 genotype and preliminary definition of the acetylation profile of patients with cancer^a and controls.

Genotype NAT2	Total (n=222) (%)	Controls (n=89) (%)	Cancer ^a (n=133) (%)	<i>p</i> -Value ^b	OR (95% IC) ^b		
No allele for slow acetylation	76 (34.2)	38 (41.6)	38 (28.6)	0.041	0.527 (0.280-0.973)		
*4/*4	18 (23.7)	9 (23.7)	9 (23.7)				
*11/*4	3 (4.0)	0	3 (7.9)				
*11/*11	1 (1.3)	1 (2.6)	0				
*11/*12	1 (1.3)	0	1 (2.6)				
*11/*13	2 (2.6)	0	2 (5.3)				
*12/*12	5 (6.6)	5 (13.2)	0				
*12/*4	9 (11.8)	5 (13.2)	4 (10.5)				
*12/*13	2 (2.6)	0	2 (5.3)				
*13/*13	8 (10.6)	6 (15.8)	2 (5.3)				
*13/*4	27 (35.5)	12 (31.5)	15 (39.4)				
One allele for slow acetylation	106 (47.8)	42 (48.3)	64 (48.1)			0.922	0.971 (0.540-1.747)
*4/*5	46 (43.4)	25 (59.4)	21 (32.8)				
*4/*7	7 (6.6)	2 (4.8)	5 (7.8)				
*5/*11	3 (2.8)	1 (2.4)	2 (3.1)				
*5/*12	4 (3.8)	2 (4.8)	2 (3.1)				
*5/*13	33 (31.1)	8 (19.0)	25 (39.1)				
*7/*12	4 (3.8)	2 (4.8)	2 (3.1)				
*7/*13	9 (8.5)	2 (4.8)	7 (11.0)				
Two alleles for slow acetylation	40 (18.0)	9 (10.1)	31 (23.3)	0.010	3.054 (1.303 -7.159)		
*5/*5	24 (60.0)	6 (66.7)	18 (58.1)				
*5/*7	15 (37.5)	3 (33.3)	12 (38.7)				
*7/*7	1 (2.5)	0	1 (3.2)				

^aPatients with two different forms of neoplasia: gastric and breast cancer. ^b*p* value and odds ratio (OR) adjusted by ancestry.

to control the ancestry effect on the association of *NAT2* gene with susceptibility to cancer. This is the first study to be carried out in the North region of Brazil, which examined the effect of population substructure associated with the susceptibility to neoplasia. Only the C282T polymorphism was importantly associated with the neoplasias studied. In this study, the strong influence of a slow acetylation profile on the susceptibility to GC and BC was clearly shown.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação Amazônia Paraense do Estado do Pará (FAPESPA); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará. We would like to thank Dayse Oliveira de Alencar for her technical help.

References

- Parkin DM: Cancers attributable to dietary factors in the UK in 2010. *IV Salt. Brit J Cancer* 105: S73-S76, 2011.
- World Health Organization (WHO): World Cancer Report 2008. Lyon, France, 2009.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA): Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.
- Boccia S, Sayed-Tabatabaei FA, Persiani R, Gianfagna F, Rausei S, Arzani D, La Greca A, D'Ugo D, La Torre G, Van Duijn CM and Ricciardi G: Polymorphisms in metabolic genes, their combination and interaction with tobacco smoke and alcohol consumption and risk of gastric cancer: A case-control study in an Italian population. *BMC Cancer* 7: 206, 2007.
- Vineis P: The relationship between polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Toxicology* 181-182: 457-462, 2002.
- Taioli E: Gene-environment interaction in tobacco-related cancers. *Carcinogenesis* 29: 1467-1474, 2008.
- Zhang J, Qiu LX, Wang ZH, Wang JL, He SS and Hu XC: *NAT2* polymorphisms combining with smoking associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 123: 877-883, 2010.
- Hein DW: *N*-Acetyltransferase single nucleotide polymorphisms: Emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5: 353-366, 2009.
- Eichholzer M, Rohrmann S, Barbir A, Hermann S, Teucher B, Kaaks R and Linseisen J: Polymorphisms in heterocyclic aromatic amines metabolism-related genes are associated with colorectal adenoma risk. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3: 96-106, 2012.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1626, 1989.

- 11 Rozen S and Skaletsky HJ: Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *In: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Krawetz S and Misener (eds.). Totowa. Humana Press, pp. 365-386, 2000.
- 12 The Consensus Gene Nomenclature of Human *NAT2* Alleles [http://louisville.edu/medschool/pharmacology/consensus-human-arylamine-N-acetyltransferase-gene-nomenclature/nat_pdf_files/Human_NAT2_alleles.pdf].
- 13 Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-santos AKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH and Santos SE: Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48 insertion-deletion (INSEL) ancestry informative markers (AIM) panel. *Hum Mutat* 31: 184-190, 2009.
- 14 Rousset F: Genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8: 103-106, 2008.
- 15 Stephens M, Smith NJ and Donnelly P: A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68: 978-989, 2001.
- 16 Software for Genetic Analysis Structure v. 2.2 [<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/>].
- 17 Teixeira RLF, Miranda AB, Pacheco AG, Lopes MQ, Fonseca-Costa J, Rabahi MF, Melo HM, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN and Santos AR: Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. *Mutat Res* 62: 31-30, 2007.
- 18 Bakos RM, Besch R, Zoratto GG, Godinho JM, Mazzotti NG, Ruzicka T, Bakos L, Santos SE, Ashton-Prolla P, Berking C and Giugliani R: The *CDKN2A* p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. *Exp Dermatol* 20: 890-893, 2011.
- 19 Tarazona-Santos E, Castilho L, Amaral DRT, Costa DC, Furlani NG, Zuccherato LW, Machado M, Reid ME, Zalis MG, Rossit AR, Santos SEB, Machado RL and Lustigman S: Population genetics of GYPB and association study between GYPB*S/s polymorphism and susceptibility to *P.falciparum* infection in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE* 6: 16123, 2011.
- 20 Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, Barbosa CM, Chies JA, Veit TD, Lima CP, Oliveira LF, Henderson BL, Castro AP, Maia MH, Barbosa FB, Santos SE, Guerreiro JF, Sena L and Santos EJ: Systemic lupus erythematosus: Association with *KIR* and *SLC11A1* polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. *Lupus* 20: 265-273, 2011.
- 21 Friedrich DC, Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos AKC and Hutz MH: Several different lactase persistence associated alleles and high diversity of the lactase gene in the admixed Brazilian population. *PLoS ONE* 7: 46520, 2012.
- 22 Kittles RA, Chen W, Panguluri RK, Ahaghotu C, Jackson A, Adebamowo CA, Griffin R, Williams T, Ukoli F, Adams-Campbell L, Kwagyan J, Isaacs W, Freeman V and Dunston GM: *CYP3A4-V* and prostate cancer in African Americans: Causal or confounding association because of population stratification? *Hum Genet* 110: 553-560, 2002.
- 23 Wang X, Zhu X, Qin H, Cooper RS, Ewens WJ, Li C and Li M: Adjustment for local ancestry in genetic association analysis of admixed populations. *Bioinformatics* 27: 670-677, 2011.
- 24 Shriner D, Adeyemo A, Ramos E, Chen G and Rotimi CN: Mapping of disease associated variants in admixed populations. *Genome Biol* 12: 223, 2011.
- 25 Pereira L, Zamudio R, Soares-Souza G, Herrera P, Cabrera L, Hooper CC, Cok J, Combe JM, Vargas G, Prado WA, Schneider S, Kehdy F, Rodrigues MR, Chanock SJ, Berg DE, Gilman RH and Tarazona-Santos E: Socioeconomic and nutritional factors account for the association of gastric cancer with Amerindian ancestry in a Latin American admixed population. *PLoS One* 7: 41200, 2012.
- 26 Kupfer SS, Anderson JR, Hooker S, Skol A, Kittles RA, Keku TO, Sandler RS and Ellis NA: Genetic heterogeneity in colorectal cancer associations between African and European Americans. *Gastroenterology* 139: 1677-1685, 2010.
- 27 Ali R, Barnes I, Cairns BJ, Finlayson AE, Bhala N, Mallath M and Beral V: Incidence of gastrointestinal cancers by ethnic group in England, 2001-2007. *Gut* [Epub ahead of print], 2012.
- 28 Teixeira RL, Silva FP Jr, Silveira AR, Cabello PH, Mendonça-Lima L, Rabahi MF, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, de Miranda AB and Santos AR: Sequence analysis of *NAT2* gene in Brazilians: identification of undescribed single nucleotide polymorphisms and molecular modeling of the N-acetyltransferase 2 protein structure. *Mutat Res* 683: 43-49, 2010.
- 29 Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gerard N, Krishnamoorthy R and Poloni ES: Worldwide distribution of *NAT2* diversity: Implications for *NAT2* evolutionary history. *BMC Genet* 9: 21, 2008.
- 30 Santos NP, Jacques SM, Santos AK, Silva CA, Vallinoto AC, Fernandes DC, Carvalho DC, Santos, SE and Hutz MH: N-Acetyl transferase 2 and cytochrome *P450 2E1* genes and isoniazid-induced hepatotoxicity in Brazilian patients. *Tuberc Lung Dis* 17: 499-504, 2013.
- 31 He LJ, Yu YM, Qiao F, Liu JS, Sun XF and Jiang LL: Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 2 and colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol* 11: 4268-4271, 2005.
- 32 Hong SH, Kim JW, Kim HG, Park IK, Ryoo JW, Lee CH, Sohn YK and Lee JY: Glutathione S-transferase (*GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*) and N-acetyltransferase 2 polymorphisms and the risk of gastric cancer. *J Prev Med Public Health* 39: 135-140, 2006.
- 33 Marques CFS, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, Brennan P and Hatagima A: Influence of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM3* and *NAT2* genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: Results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncol* 42: 632-637, 2006.
- 34 Sabbagh A, Darlu P, Crouau-Roy B and Poloni ES: Arylamine N-Acetyltransferase 2 (*NAT2*) genetic diversity and traditional subsistence: A Worldwide population survey. *PLoS ONE* 6: 18507, 2011.
- 35 Ochs-balcom HM, Wiesner G and Elston RC: A meta-analysis of the association of N-acetyltransferase 2 gene (*NAT2*) variants with breast cancer. *Am J Epidemiol* 166: 246-254, 2007.
- 36 Sillanpaa P, Hirvonen A, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Uusitupa M, Vainio H and Mitrunen K: *NAT2* slow acetylator genotype as an important modifier of breast cancer risk. *Int J Cancer* 114: 579-584, 2005.
- 37 Malik MA, Upadhyay R, Modi DR, Zargar SA and Mittal B: Association of *NAT2* gene polymorphisms with susceptibility to esophageal and gastric cancers in the Kashmir Valley. *Arch Med Res* 40: 416-23, 2009.

- 38 Zhang YW, Eom SY, Kim YD, Song YJ, Yun HY, Park JS, Youn SJ, Kim BS, Kim H and Hein DW: Effects of dietary factors and the *NAT2* Acetyltransferase status on gastric cancer in Koreans. *Int J Cancer* 125: 139-145, 2009.
- 39 Khedhaier A, Hassen A, Bouaouina N, Gabbouj S, Ahmed SB and Chouchane L: Implication of xenobiotic metabolizing enzyme gene (*CYP2E1*, *CYP2C19*, *mEH* and *NAT2*) polymorphisms in breast carcinoma. *BMC Cancer* 8: 109, 2008.
- 40 Baumgartner KB, Schlierf TJ, Yang D, Doll MA and Hein DW: *N*-Acetyltransferase 2 genotype modification of active cigarette smoking on breast cancer Risk among hispanic and non-hispanic white women. *Toxicol Sci* 112: 211-220, 2009.
- 41 Conlon MSC, Johnson KC, Bewick MA, Lafrenie RM and Donner A: Smoking (active and passive), *N*-acetyltransferase 2, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol* 34: 142-149, 2010.
- 42 Daly A, Cholerton S, Armstrong M and Idle JR: Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ Health Perspect* 102: 55-61, 1994.
- 43 Hein DW, Doll MA and Fretland AJ: Molecular genetics and epidemiology of the *NAT1* and *NAT2* Acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 29-42, 2000.
- 44 Moore LE, Baris DR, Figueroa JD, Garcia-Closas M, Karagas MR, Schwenn MR, Johnson AT, Lubin JH, Hein DW, Dagnall CL, Colt JS, Kida M, Jones MA, Schned AR, Cherala SS, Chanock SJ, Cantor KP, Silverman DT and Rothman N: *GSTM1* null and *NAT2* slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: results from the New England bladder cancer study and *NAT2* meta-analysis. *Carcinogenesis* 32: 182-189, 2010.
- 45 Lee M, Su L and Christiani DC: Synergistic effects of *NAT2* slow and *GSTM1* null genotypes on carcinogen DNA Damage in the lung. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 1492-1497, 2010.
- 46 Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cardon LR and Peters U: Genetic susceptibility to cancer. The role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA* 299: 2423-2434, 2008.
- 47 García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castaño-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Torà M, Fernández F, Real FX and Rothman N: *NAT2* slow acetylation, *GSTM1* null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 366: 649-59, 2005.
- 48 Costa S, Medeiros R, Vasconcelos A, Pinto D and Lopes C: A slow acetyltransferase genotype associated with an increased risk of advanced cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 678-82, 2002.
- 49 Hein DW, Leff MA, Ishibe N, Sinha R, Frazier HA, Doll MA, Xiao GH, Weinrich MC and Caporaso NE: Association of prostate cancer with rapid *N*-acetyltransferase 1 (*NAT1*10*) in combination with slow *N*-acetyltransferase 2 acetyltransferase genotypes in a pilot case-control study. *Environ Mol Mutagen* 40: 161-167, 2002.
- 50 Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC and Hein DW: Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human *N*-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis* 8: 1665-1671, 2007.
- 51 Costa S, Pinto D, Morais A, Vasconcelos A, Oliveira J, Lopes C and Medeiros R: Acetylation genotype and the genetic susceptibility to prostate cancer in a Southern European population. *Prostate* 64: 246-252, 2005.
- 52 Weber BL and Nathanson KL: Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *Eur J Cancer* 36: 1193-1199, 2000.

Received July 4, 2013

Revised July 19, 2013

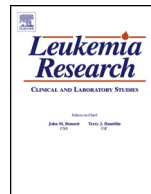
Accepted July 22, 2013



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres



Amerindian genetic ancestry and INDEL polymorphisms associated with susceptibility of childhood B-cell Leukemia in an admixed population from the Brazilian Amazon

Darlen C. Carvalho^{a,b}, Alayde V. Wanderley^{a,c}, Marcos A.T. Amador^b, Marianne R. Fernandes^{a,b}, Giovanna C. Cavalcante^{a,b}, Karla B.C.C. Pantoja^{a,b}, Fernando A.R. Mello^a, Paulo P. de Assumpção^{a,d}, André S. Khayat^a, Ândrea Ribeiro-dos-Santos^{a,b}, Sidney Santos^{a,b}, Ney P.C. dos Santos^{a,b,*}

^a Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, PA, Brazil

^b Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, Pará, PA, Brazil

^c Hospital Ophir Loyola, Departamento de Pediatria, Belém, Pará, PA, Brazil

^d Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2015

Received in revised form 14 July 2015

Accepted 15 August 2015

Available online xxx

Keywords:

B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-cell ALL)

Amerindian genetic ancestry

CASP8

CYP19A1

XRCC1

Cancer susceptibility

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant tumor common in children. Studies of genetic susceptibility to cancer using biallelic insertion/deletion (INDEL) type polymorphisms associated with cancer development pathways may help to clarify etymology of ALL. In this study, we investigate the role of eight functional INDEL polymorphisms and influence of genetic ancestry to B-cell ALL susceptibility in children of Brazilian Amazon population, which has a high degree of inter-ethnic admixture. Ancestry analysis was estimated using a panel of 48 autosomal ancestry informative markers. 130 B-cell ALL patients and 125 healthy controls were included in this study. The odds ratios and 95% confidence intervals were adjusted for confounders. The results indicated an association between the investigated INDEL polymorphisms in *CASP8* (rs3834129), *CYP19A1* (rs11575899) e *XRCC1* (rs3213239) genes in the development of B-cell ALL. The carriers of Insertion/Insertion (Ins/Ins) genotype of the polymorphism in *CASP8* gene presented reduced chances of developing B-cell ALL ($P=0.001$; OR = 0.353; 95% CI = 0.192–0.651). The Deletion/Deletion (Del/Del) genotype of the polymorphism in *CYP19A1* gene was associated to a lower chance of developing B-cell ALL ($P=3.35 \times 10^{-6}$; OR = 0.121; 95% CI = 0.050–0.295), while Del/Del genotype of the polymorphism in *XRCC1* gene was associated to a higher chance of developing B-cell ALL ($P=2.01 \times 10^{-4}$; OR = 6.559; 95% CI = 2.433–17.681). We also found that Amerindian ancestry correlates with the risk of B-cell ALL. For each increase of 10% in the Amerindian ancestry results in 1.4-fold chances of developing B-cell ALL (OR = 1.406; 95% IC = 1.123–1.761), while each increase of 10% in the European ancestry presents a protection effect in the development of B-cell ALL (OR = 0.666; 95% IC = 0.536–0.827). The results suggest that genetic factors influence leukemogenesis and might be explored in the stratification of B-cell ALL risk in admixed populations.

© 2015 Z. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; B-Cell ALL, B-cell acute lymphoblastic leukemia; AIMS, ancestry informative markers; INDEL, insertion/deletion.

* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Humana e Médica, Cidade Universitária Prof. José da Silveira Netto, Rua Augusto Corrêa, 01, BOX: 8615; CEP: 66.075-970 Belém, PA, Brazil. Fax: +55 913201-7843.

E-mail addresses: darlen.c.carvalho@gmail.com (D.C. Carvalho), alaydevieira@yahoo.com.br (A.V. Wanderley), marcosmata52@yahoo.com.br

(M.A.T. Amador), fernandesmr@yahoo.com.br (M.R. Fernandes), giovannacavalcante@gmail.com (G.C. Cavalcante), karlacereja.ufpa@gmail.com (K.B.C.C. Pantoja), fernando.mellojr@hotmail.com (F.A.R. Mello), assumpcaopp@gmail.com (P.P. de Assumpção), khayatas@gmail.com (A.S. Khayat), akely@ufpa.br (Â. Ribeiro-dos-Santos), sidneysantos@ufpa.br (S. Santos), npcsantos@yahoo.com.br (N.P.C. dos Santos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2015.08.008>

0145-2126/© 2015 Z. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: D.C. Carvalho, et al., Amerindian genetic ancestry and INDEL polymorphisms associated with susceptibility of childhood B-cell Leukemia in an admixed population from the Brazilian Amazon, *Leuk Res* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2015.08.008>

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant tumor common in children that accounts for more than 30% of all pediatric cancers [1]. Despite many studies, ALL etiology is not well defined. Various studies have suggested that an interaction between exposure to certain environmental agents and genetic susceptibility has an important mechanistic role in the development of this childhood leukemia [2–4]. In this context, studies of genetic susceptibility to cancer using biallelic insertion/deletion (INDEL)-type polymorphisms associated with cancer development pathways may help to clarify the etiology of a certain tumor [5–7]. Polymorphisms of the INDEL type have been related to susceptibility to different cancers, including gastric [8,9], breast [10–12], colorectal [13–15] and others [16,17]. However, studies linking INDEL type polymorphisms and susceptibility to ALL are scarce [18].

To provide a more complete view of ALL etiology, we selected eight polymorphisms in genes (*CYP2E1*, *CYP19A1*, *TYMS*, *XRCC1*, *TP53*, *CASP8*, *NFKB1* and *IL-1 α*) involved in pathways associated to the carcinogenesis of different types of cancer, including B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-cell ALL) [19]. These genes encode enzymes of the carcinogens metabolism [20–22], enzymes of the folate metabolism [23–25] and proteins of DNA repair [26–28], apoptosis and immune response [29–31].

Furthermore, it is well reported in the literature that ethnic differences influence in ALL incidence [32–35]. Children with admixed ancestry, such as Hispanic, tend to have a greater risk of developing B-cell ALL in comparison to children from other ethnic groups [35]. This higher incidence in Hispanic children is, at least partially, attributable to genomic variations that are characteristic of Native American genetic ancestry [36]. Therefore, it is conceivable that genomic variations related to ancestry may contribute to ethnic disparities in ALL incidence. This is especially important in admixed populations, such as the Brazilian, which is known for being one of the most heterogeneous populations worldwide, with the main contribution of three parental groups: Amerindian, European and African [37,38]. However, there are no works exploring the influence of genetic ancestry in the risk of developing ALL in Brazilian children.

The goal of this work was to investigate the role of eight functional INDEL polymorphisms and the influence of genetic ancestry in B-cell acute lymphoblastic leukemia susceptibility in children from an Amazon region with high degree of inter-ethnic admixture.

2. Materials and methods

2.1. Cases and controls

The research participants were chosen based on a case-control study design. The case group was composed of B-cell acute lymphoblastic leukemia patients ($n = 130$) in treatment for childhood cancer in the clinics of the Hospital Ophir Loyola (Pará, Brazil) between the years of 2006 and 2012. Samples from 125 non-related cancer-free individuals from the same geographic area were used as controls.

All patients included in the study were confirmed to have acute lymphoblastic leukemia based on the criteria of the French-American-British (FAB) rating systems. Samples of bone marrow or peripheral blood were obtained at the time of diagnosis. Immunophenotype was determined for ALL cases using flow cytometry profiles, as previously described [39].

2.2. Ethical aspects

The protocol used in this study was approved by the Committee for Research Ethics of the Universidade Federal do Pará (UFPA; approval no. 119.649). Consent forms were obtained from all patients and control participants in the study.

2.3. DNA extraction and quantification

Genomic DNA was extracted using a commercial kit for DNA extraction (Roche Applied Science DNA Isolation Kit, Penzberg, Germany) and quantified with a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop 1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

2.4. Analysis of polymorphisms

Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used to allow the simultaneous amplification of eight investigated markers (Supplemental material, Table A).

Amplification of the markers was performed on an ABI Verity thermocycler (Life Technologies, Foster City, CA, USA). The PCR-based genotyping assay used a QIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN, Germany) with the following reaction conditions: 5.0 μ L of QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 1.0 μ L of Q-solution, 1.0 μ L of Primer Mix, 2.0 μ L of water, and 1.0 μ L of DNA. The samples were incubated at 95 °C for 15 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 45 s, 60 °C for 90 s and 72 °C for 1 min, with a final extension at 70 °C for 30 min. For fragment analysis using capillary electrophoresis, 1.0 μ L of PCR product was added to 8.5 μ L of HI-DI deionized formamide (Life Technologies) and 0.5 μ L of GeneScan 500 LIZ pattern size standard (Life Technologies). DNA fragments were separated using the ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Life Technologies) and analyzed using the GeneMapper ID v.3.2 software (Life Technologies).

2.5. Analysis of ancestral populations

The INDEL polymorphisms here investigated that presented genotypic distribution significantly different between cases and controls were investigated in a sample of 703 individuals from different continents, including: 270 European individuals (mainly Portuguese individuals), 211 Sub-Saharan Africans (individuals from Angola, Mozambique, Zaire, Cameroon and the Ivory Coast) and 222 Native American individuals (from indigenous tribes of the Brazilian Amazon region). Details about these populations can be found in [37].

2.6. Analysis of genetic ancestry

Ancestry analysis was performed according to Santos et al. [37] using 48 autosomal ancestry informative markers (AIMs). Three multiplex PCR reactions with 16 markers each were performed, and the PCR amplicons were analyzed by electrophoresis using the ABI Prism 3130 sequencer and GeneMapper ID v.3.2 software. The individual proportions of European, African and Amerindian genetic ancestries were estimated using STRUCTURE v.2.3.3 software, assuming three parental populations (European, African and Amerindian).

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS v.20.0 Statistical Program (SPSS, Chicago, IL, USA). Group comparisons for the categorical variables (gender) were tested in pairs by Pearson's Chi-squared test, while Student's *t*-test was used for the analysis of

Table 1
Demographic variables for patients with B-cell ALL and the control group.

Variable	Case	Control	P-value
No.	130	125	
Age, years ^a	5.16 ± 2.79	23.09 ± 4.62	0.006
Gender (male/female)	85/45	55/70	0.001
Genetic ancestry ^b			
European ancestry	0.443 ± 0.115	0.505 ± 0.131	2.42 × 10 ⁻⁵
African ancestry	0.218 ± 0.904	0.204 ± 0.790	0.291
Amerindian ancestry	0.339 ± 0.116	0.294 ± 0.119	2.92 × 10 ⁻⁴

^aValues are as expressed as mean (±SD = standard deviation). Significance determined by Student's *t*-test.

^bValues are as expressed as mean ± SD. Significance determined by Mann–Whitney test.

Table 2
Categorical distribution of Amerindian and European ancestry in patients with B-cell ALL in the comparison with the control group.

Genetic Ancestry (%)	Case no. (%)	Control no. (%)
Amerindian ancestry		
[5–10]	1 (1)	3 (2)
[10–20]	18 (14)	25 (20)
[20–30]	30 (23)	47 (38)
[30–40]	44 (34)	30 (24)
[40–50]	22 (17)	10 (8)
[50–60]	12 (9)	10 (8)
>60	3 (2)	0
P-value	0.010	
European ancestry		
[5–10]	1 (1)	3 (2)
[10–20]	3 (2)	2 (1)
[20–30]	13 (10)	7 (6)
[30–40]	30 (23)	17 (14)
[40–50]	45 (35)	27 (22)
[50–60]	26 (20)	38 (30)
>60	12 (9)	31 (25)
P-value	0.001	

quantitative variables (age). For the comparison of ancestry index among the samples, we used Mann–Whitney test. Multiple logistic regression analyses were carried out to estimate odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs). In these analyses, covariates considered as potential confounders (age, gender and genetic ancestry) were analyzed. All statistical tests were based on a two-tailed probability and *P*-value <0.05 was considered significant. *P*-values were adjusted by Bonferroni correction for multiple testing.

3. Results

3.1. Demographic

We analyzed 130 patients with B-cell ALL and 125 healthy individuals. Table 1 shows the demographic features of these groups. The case group was predominately male, while the control group had a higher proportion of females. The results showed statistically significant differences between the cases and controls in the following variables: age (*P* = 0.006), gender (*P* = 0.001), European ancestry (*P* = 2.42 × 10⁻⁵) and Amerindian ancestry (*P* = 2.92 × 10⁻⁴).

Regarding genomic ancestry, the ethnic composition of the case group was 44% European, 22% African and 34% Amerindian, while the control group was 50% European, 20% African and 30% Amerindian. The results revealed an increased Amerindian ancestry and a reduced European ancestry in B-cell ALL patients compared with the control group.

Using 10% increments, we compared the categorical distribution of the estimated Amerindian and European ancestries in the studied population (Table 2), and we found different distributions

of these ancestries between the case and control groups. To determine the influence of ancestry in the susceptibility to B-cell ALL, we performed a logistic regression (Table 3). According to the adopted model, for each increase of 10% in the Amerindian ancestry there are 1.4-times higher chances of developing B-cell ALL (OR = 1.406; 95% CI = 1.123–1.761), while each increase of 10% in the European ancestry results in reduced chances of developing B-cell ALL (OR = 0.666; 95% CI = 0.536–0.827).

3.2. Distribution of genotypes associated with susceptibility to ALL

The genotypic distributions of *CYP2E1*, *CYP19A1*, *TYMS*, *XRCC1*, *TP53*, *CASP8*, *NFKβ1* and *IL-1α* markers in the case group compared with the control group are described in Table 4. Analyses were performed multivariate regression (adjusted for age, gender and for European and Amerindian ethnicities). Through Bonferroni correction, *P*-values were corrected for eight INDEL, which was the number of performed tests (*P*_{limit} = 0.00625).

The polymorphisms in *TP53*, *NFKβ1*, *TYMS*, *CYP2E1* and *IL-1α* genes had no significant effect in the analysis after adjustment using multiple logistic regression.

In relation to the polymorphism in *CASP8* (rs3834129) gene, the carriers of Insertion/Insertion (Ins/Ins) genotype present diminished chances (*P* = 0.001; OR = 0.353; 95% CI = 0.192–0.651) in the development of B-cell ALL. Analyses also revealed reduced chances of developing B-cell ALL for the carriers of deletion/deletion (Del/Del) genotype in *CYP19A1* (rs11575899) gene (*P* = 3.35 × 10⁻⁶; OR = 0.121; 95% CI = 0.050–0.295).

In the *XRCC1* gene, a significant risk association was found for the Del/Del genotype (rs3213239) (*P* = 2.01 × 10⁻⁴; OR = 6.559; 95% CI = 2.433–17.681). Therefore, individuals homozygous for this deletion in the *XRCC1* gene have an approximately 7-fold increased risk of ALL development over those with other genotypes.

4. Discussion

B-cell ALL is the most common neoplasm in children [1]. The association of the investigated polymorphisms with the risk of developing this type of leukemia was studied, and demographic factors such as gender and ancestry were used to control for possible confounding effects. ALL incidence is approximately 20% higher in males than in females [40]. Similarly, males were predominant among the B-cell ALL patients studied herein.

Our results show that genetic ancestry influences the risk of developing B-cell ALL. Amerindian ancestry correlated with the risk of developing B-cell ALL, while European ancestry had a protective effect on the development of this childhood leukemia in the studied population (Table 3).

Our study found genetic ancestry differences in the incidence of ALL [36,41–44]. Our results corroborate with those of Walsh et al. [36], in which Native American ancestry is associated with an increased risk of B-cell ALL in Hispanic children. In that work, each 20% increase in the proportion of an individual's genome that is of Native American origin conferred a 1.20-fold increased risk of B-cell ALL. Whereas Hispanics are an admixed population between European, African and Native American ancestries, the authors suggested that the observed high incidence of B-cell ALL in Hispanic children might be partially attributed to genetic risk factors associated with Amerindian ancestry [36]. We employed a statistical approach similar to the work of Walsh et al. [36] and found that an increment of 10% in the Amerindian ancestry corresponds to an increment of 1.4-times the risk of developing B-cell ALL in the investigated Brazilian population. Therefore, our results are promising because they can help to clarify leukemogenesis and

Table 3
Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CIs) of logistic regression model of Amerindian and European ethnicity.

Genetic ancestry	Case mean	Control mean	OR ^a	95% CI ^a	P-value ^a
Amerindian ancestry	0.339 ± 0.116	0.294 ± 0.119	1.406	1.123–1.761	0.003
European ancestry	0.443 ± 0.115	0.505 ± 0.131	0.666	0.536–0.827	2 × 10 ⁻⁴

Logistic regression adjusted for confounders.

^a Odds-ratio of 10% ethnicity increase.**Table 4**
Genotype distribution of the investigated polymorphisms in patients with B-cell ALL in comparison with the control group.

Genotype	No. (%) Case	No. (%) Control	P-value ^a	OR (95% IC) ^a
CASP8	130	125		
INS/INS	23 (17.7)	47 (37.6)	0.001	INS/INS vs. others: 0.353 (0.192–0.651)
INS/DEL	81 (62.3)	53 (42.4)		
DEL/DEL	26 (20)	25 (20)		
Allele INS	0.488	0.588		
Allele DEL	0.512	0.412		
TYMS	130	125		
INS/INS	33 (25.4)	53 (42.4)	0.005	INS/INS vs. others: 0.438 (0.247–0.775)
INS/DEL	84 (64.6)	56 (44.8)		
DEL/DEL	13 (10)	16 (12.8)		
Allele INS	0.577	0.648		
Allele DEL	0.423	0.352		
CYP19A1	130	121		
INS/INS	41 (31.5)	25 (20.7)	3.35 × 10⁻⁶	DEL/DEL vs. others: 0.121 (0.050–0.295)
INS/DEL	82 (63.1)	56 (46.3)		
DEL/DEL	7 (5.4)	40 (33)		
Allele INS	0.631	0.438		
Allele DEL	0.369	0.562		
TP53	130	125		
INS/INS	2 (1.5)	6 (4.8)	0.097	DEL/DEL vs. others: 0.630 (0.364–1.088)
INS/DEL	54 (41.5)	33 (26.4)		
DEL/DEL	74 (57)	86 (68.8)		
Allele INS	0.223	0.180		
Allele DEL	0.777	0.820		
NFKβ1	130	123		
INS/INS	17 (13.1)	28 (22.8)	0.202	DEL/DEL vs. others: 0.692 (0.394–1.218)
INS/DEL	74 (56.9)	49 (39.8)		
DEL/DEL	39 (30)	46 (37.4)		
Allele INS	0.415	0.427		
Allele DEL	0.585	0.573		
XRCC1	122	123		
INS/INS	64 (52.4)	65 (52.8)	2.01 × 10⁻⁴	DEL/DEL vs. others: 6.559 (2.433–17.681)
INS/DEL	34 (27.9)	51 (41.5)		
DEL/DEL	24 (19.7)	7 (5.7)		
Allele INS	0.664	0.736		
Allele DEL	0.336	0.264		
CYP2E1	105	123		
INS/INS	4 (3.8)	2 (1.6)	0.681	DEL/DEL vs. others: 1.204 (0.496–2.921)
INS/DEL	8 (7.6)	12 (9.8)		
DEL/DEL	93 (88.6)	109 (88.6)		
Allele INS	0.076	0.065		
Allele DEL	0.924	0.935		
IL-1α	130	125		
INS/INS	46 (35.4)	45 (36)	0.05	DEL/DEL vs. others: 0.478 (0.229–0.995)
INS/DEL	69 (53.1)	55 (44)		
DEL/DEL	15 (11.5)	25 (20)		
Allele INS	0.619	0.580		
Allele DEL	0.381	0.420		

^a Logistic regression adjusted for confounders

to find biomarkers that might be of interest in the stratification of B-cell ALL risk in admixed populations.

In the present work, we found significant associations between three investigated INDEL polymorphisms and the development of B-cell ALL. Data suggest that Ins/Ins genotype of the polymorphism in *CASP8* (rs3834129) gene and Del/Del genotype of the polymorphism in *CYP19A1* (rs11575899) gene are associated to a lower chance of developing B-cell ALL, while Del/Del genotype of the poly-

morphism in *XRCC1* (rs3213239) gene is associated to a higher risk of developing B-cell ALL.

CASP8 is a key-regulator of apoptosis, which is a defense mechanism that is fundamental against tumor development [5]. The deletion of 6 bp (CTTACT), at -652 in promoter region of *CASP8* gene (rs3834129) suppresses linkage site Sp1, which acts as a transcription factor of the gene. Notably, this polymorphism has been associated with the development of many types of cancer, includ-

Table 5Genotype distribution of the polymorphisms in the *CASP8*, *CYP19A1* and *XRCC1* genes in patients with B-cell ALL compared with the control group and parental populations (European, Amerindian and African).

Genotype	No. (%)				
	Case	Control	European	African	Amerindian
<i>CASP8</i> (rs3834129)	130	125	268	211	222
INS/INS	23 (17.7)	47 (37.6)	81 (30)	49 (18.1)	142 (52.6)
INS/DEL	81 (62.3)	53 (42.4)	123 (45.6)	113 (41.9)	59 (21.9)
DEL/DEL	26 (20)	25 (20)	64 (23.7)	49 (18.1)	21 (7.8)
Allele INS	0.488	0.588	0.532	0.5	0.773
Allele DEL	0.512	0.412	0.468	0.5	0.227
<i>CYP19A1</i> (rs11575899)	130	121	270	211	222
INS/INS	41 (31.5)	25 (20.7)	85 (31.5)	95 (45)	92 (41.44)
INS/DEL	82 (63.1)	56 (46.3)	145 (53.7)	97 (46)	98 (44.14)
DEL/DEL	7 (5.4)	40 (33)	40 (14.8)	19 (9)	32 (14.4)
Allele INS	0.631	0.438	0.5833	0.6801	0.6351
Allele DEL	0.369	0.562	0.4167	0.3199	0.3649
<i>XRCC1</i> (rs3213239)	122	123	261	211	222
INS/INS	64 (52.4)	65 (52.8)	117 (44.8)	85 (40.3)	215 (96.8)
INS/DEL	34 (27.9)	51 (41.5)	116 (44.4)	95 (45)	5 (2.3)
DEL/DEL	24 (19.7)	7 (5.7)	28 (10.7)	31 (14.7)	2 (0.9)
Allele INS	0.664	0.736	0.6705	0.628	0.9797
Allele DEL	0.336	0.264	0.3295	0.372	0.0203

ing in lung, breast, stomach, colon/rectum, pancreas, among others [5,17]. However, there is no information over the influence of this polymorphism to the risk of developing childhood B-cell ALL.

The *CYP19A1* gene encodes the aromatase enzyme, which is responsible for the final phase of estrogen biosynthesis. Thus, mutations in this gene may affect the levels of aromatase enzyme activity as well as cellular differentiation and growth [45]. Polymorphisms in this gene have been associated with an increased risk of breast cancer [10,46] and gastric cancer [47]. However, little is known about the relationship between *CYP19A1* variants and B-cell ALL susceptibility.

The *XRCC1* protein is one of the most important proteins for base excision repair (BER) [26–28]. This pathway is also important to repair DNA damages caused by oxidation and alkylation [28]. Polymorphic alterations in this gene have been associated with ALL risk in infants [48–50].

We seek to interpret the observed allelic differences for these three INDEL polymorphisms based on their frequencies in parental populations and on the ethnic contribution of the group of patients and control. Whereas the ethnic contribution of Amerindian in the group of patients higher than in the group of controls, such alleles could be differentially represented both in Amerindian ancestral group as in the group of patients in the admixed population, independent of the allele effect on the development of B-cell ALL. Data of the analyses of ancestral populations (European, African and Amerindian) presented in Table 5 do not favor this interpretation. On the contrary, they indicate that the observed differences between cases and controls, regarding polymorphisms in *CASP8* (rs3834129), *CYP19A1* (rs11575899) and *XRCC1* (rs3213239) genes, cannot be explained based on differences in contribution between the two ethnic groups.

For the polymorphism in *CASP8* (rs3834129) gene, Ins/Ins genotype is underrepresented among the patients in comparison to the controls and it was associated as a protection factor for B-cell ALL. In the investigated sample of Amerindian individuals, the frequency of Ins allele (0.77) was higher than in European (0.53) and African (0.50) individuals.

For the polymorphism in *CYP19A1* (rs11575899) gene, Del allele was underrepresented in the sample of patients in comparison to the controls and it was associated as a protection factor for B-cell ALL. In the investigated sample of Amerindian individuals, the fre-

quency of this allele (0.36) is intermediate to European (0.42) and African (0.32) individuals.

For the polymorphism in *XRCC1* (rs3213239) gene, Del/Del genotype is overrepresented in the group of patients. However, the frequency of Del allele is greatly reduced among Amerindian (0.02) in comparison to African (0.37) and European (0.33).

5. Conclusions

In conclusion, these data demonstrate that the investigated INDEL polymorphisms in the *CASP8* (rs3834129), *CYP19A1* (rs11575899), and *XRCC1* (rs3213239) genes, as well as Amerindian genetic ancestry, are significantly important for B-cell ALL susceptibility in Brazilian Amazon children. To the best of our knowledge, this is the first study to describe the influence of these INDEL polymorphisms to B-cell ALL development and to associate Amerindian genetic ancestry with the development childhood B-cell ALL in an admixed Brazilian population.

Conflict of interest

The authors have no competing financial interests to declare.

Acknowledgements

We thank the patients and their families and clinical staff for their skilled assistance. We also thank Dayse Oliveira de Alencar, André Maurício Ribeiro dos Santos and Pablo Diego do Carmo Pinto for technical assistance. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pró-Reitoria de Pesquisa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará (PROPESP/UFPA) and Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa (FADESP).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2015.08.008>.

References

- [1] M. Onciu, Acute lymphoblastic leukemia, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 23 (2009) 655–674.
- [2] X.O. Shu, J.A. Ross, T.W. Pendergrass, G.H. Reaman, B. Lampkin, L.L. Robison, Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: a Childrens Cancer Group study, *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 24–31.
- [3] P.A. Buffler, M.L. Kwan, P. Reynolds, K.Y. Urayama, Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence, *Cancer Invest.* 23 (2005) 60–75.
- [4] J. Vijayakrishnan, R.S. Houlston, Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis, *Haematologica* 95 (2010) 1405–1414.
- [5] F. Zhang, Y. Yang, C. Guo, Y. Wang, CASP8-652 6N del polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 30 case-control studies in 50, 112 subjects, *Mutagenesis* 27 (2012) 559–566.
- [6] C. Sagne, V. Marcel, A. Amadou, P. Hainaut, M. Olivier, J. Hall, A meta-analysis of cancer risk associated with the TP53 intron 3 duplication polymorphism (rs17878362): geographic and tumor-specific effects, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e492.
- [7] L. Xu, S. Huang, W. Chen, Z. Song, S. Cai, NFKB1-94 insertion/deletion polymorphism and cancer risk: a meta-analysis, *Tumour Biol.* 35 (2014) 5181–5187.
- [8] X.F. Zeng, J. Li, S.B. Li, A functional polymorphism in IL-1A gene is associated with a reduced risk of gastric cancer, *Tumour Biol.* 35 (2014) 265–268.
- [9] W. Zhuo, L. Zhang, Y. Wang, J. Ling, B. Zhu, Z. Chen, CYP2E1 RsaI/PstI polymorphism and gastric cancer susceptibility: meta-analyses based on 24 case-control studies, *PLoS One* 7 (2012) e48265.
- [10] X. Ma, X. Qi, C. Chen, H. Lin, H. Xiong, Y. Li, J. Jiang, Association between CYP19 polymorphisms and breast cancer risk: results from 10,592 cases and 11,720 controls, *Breast Cancer Res. Treat.* 122 (2010) 495–501.
- [11] X. Guan, H. Liu, J. Ju, Y. Li, P. Li, L.E. Wang, et al., Genetic variant rs16430 6bp >0 bp at the microRNA-binding site in TYMS and risk of sporadic breast cancer risk in non-hispanic white women aged 55 years, *Mol. Carcinog.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1002/mc.22097>.
- [12] T. Bu, L. Liu, Y. Sun, L. Zhao, Y. Peng, S. Zhou, L. Li, S. Chen, Y. Gao, XRCC1 Arg399Gln polymorphism confers risk of breast cancer in American population: a meta-analysis of 10846 cases and 11723 controls, *PLoS One* 28 (2014) e86086.
- [13] M.S. Mohd Suzairi, S.C. Tan, A.A. Ahmad Aizat, M. Mohd Aminudin, M.S. Siti Nurfatimah, Z.D. Andee, et al., The functional -94 insertion/deletion ATTCG polymorphism in the promoter region of NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer, *Cancer Epidemiol.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2013.05.007>.
- [14] V. Polakova, B. Pardini, A. Naccarati, S. Landi, J. Slysokova, J. Novotny, et al., Genotype and haplotype analysis of cell cycle genes in sporadic colorectal cancer in the Czech Republic, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 661–668.
- [15] M. Morita, S. Tabata, O. Tajima, G. Yin, H. Abe, S. Kono, Genetic polymorphisms of CYP2E1 and risk of colorectal adenomas in the Self Defense Forces Health Study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17 (2008) 1800–1807.
- [16] S.C. Sak, J.H. Barrett, A.B. Paul, D.T. Bishop, A.E. Kiltie, DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk, *BMC Genet.* 8 (2007) 13.
- [17] M. Yin, J. Yan, S. Wei, Q. Wei, CASP8 polymorphisms contribute to cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis of 23 publications with 55 individual studies, *Carcinogenesis* 31 (2010) 850–857.
- [18] D. Gemmati, M. De, M. attei, L. Catozzi, P. Della, M. orta, M.L. Serino, C. Ambrosio, A. Cuneo, S. Friso, M. Krampera, E. Orioli, G. Zerri, A. Ongaro, DHFR 19-bp insertion/deletion polymorphism and MTHFR C677T in adult acute lymphoblastic leukaemia: is the risk reduction due to intracellular folate unbalancing? *Am. J. Hematol.* 84 (2009) 526–529.
- [19] J. Vijayakrishnan, R.S. Houlston, Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis, *Haematologica* 95 (2010) 1405–1414.
- [20] M. Aydin-Sayitoglu, O. Hatirnaz, N. Erensoy, U. Ozbek, Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias, *Am. J. Hematol.* 81 (March 3) (2006) 162–170.
- [21] G. Ulusoy, O. Adali, T.B. Tumer, G. Sahin, S. Gozdasoglu, E. Arinc, Significance of genetic polymorphisms at multiple loci of CYP2E1 in the risk of development of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Oncology* 72 (2007) 125–131.
- [22] A. Bonaventure, S. Goujon-Bellec, J. Rudant, L. Orsi, G. Leverger, A. Baruchel, Y. Bertrand, B. Nelken, M. Pasquet, G. Michel, N. Sirvent, P. Bordigoni, S. Ducassou, X. Rialland, D. Zelenika, D. Hémon, J. Clavel, Maternal smoking during pregnancy, genetic polymorphisms of metabolic enzymes, and childhood acute leukemia: the ESCALE study (SFCE), *Cancer Causes Control* 23 (2012) 329–345.
- [23] I.J. Koppen, F.J. Hermans, G.J. Kaspers, Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Br J. Haematol.* 148 (2010) 3–14.
- [24] C. Metayer, G. Scélo, A.P. Chokkalingam, L.F. Barcellos, M.C. Aldrich, J.S. Chang, N. Guha, K.Y. Urayama, H.M. Hansen, G. Block, V. Kiley, J.K. Wiencke, J.L. Wiemels, P.A. Buffler, Genetic variants in the folate pathway and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Causes Control* 22 (2011) 1243–1258.
- [25] O. Lautner-Csorba, A. Gézsi, D.J. Erdélyi, G. Hullám, P. Antal, Á.F. Semsei, N. Kutszegi, G. Kovács, A. Falus, C. Szalai, Roles of genetic polymorphisms in the folate pathway in childhood acute lymphoblastic leukemia evaluated by Bayesian relevance and effect size analysis, *PLoS One* 8 (2013) e69843.
- [26] B. Batar, M. Güven, S. Bariş, T. Celkan, I. Yildiz, DNA repair gene XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukocyte Res.* 33 (2009) 759–763.
- [27] T.B. Tumer, G. Sahin, E. Arinc, Association between polymorphisms of EPHX1 and XRCC1 genes and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Arch. Toxicol.* 86 (2012) 431–439.
- [28] J. Du, C. Lu, G. Cui, Y. Chen, J. He, DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis, *Chin. J. Cancer Res.* 25 (2013) 405–415.
- [29] T.N. Do, E. Ucisik-Akkaya, C.F. Davis, B.A. Morrison, M.T. Dorak, TP53 R72P and MDM2 SNP309 polymorphisms in modification of childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility, *Cancer Genet. Cytogenet.* 195 (2009) 31–36.
- [30] L. de, P. ourdes, A. erim, R.L. Guembarovski, J.M. Oda, L.F. Lopes, C.B. Ariza, M.K. Amarante, M.H. Fungaro, O. de, K.B. liveira, M.A. Watanabe, CXCL12 and TP53 genetic polymorphisms as markers of susceptibility in a Brazilian children population with acute lymphoblastic leukemia (ALL), *Mol. Biol. Rep.* 40 (2013) 4591–4596.
- [31] J. Chen, B. Zhu, J. Chen, Y. Li, Genetic variations in MDM2 and P53 genes confer risk for adult acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population, *DNA Cell Biol.* 32 (2013) 414–419.
- [32] D.E. McNeil, T.R. Coté, L. Clegg, A. Mauer, SEER update of incidence and trends in pediatric malignancies: acute lymphoblastic leukemia, *Med. Pediatr. Oncol.* 39 (2002) 554–557.
- [33] J. Li, T.D. Thompson, J.W. Miller, L.A. Pollack, S.L. Stewart, Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001–2003, *Pediatrics* 121 (2008) e1470–e1477.
- [34] E.J. Chow, S.E. Puumala, B.A. Mueller, S.E. Carozza, E.E. Fox, S. Horel, et al., Childhood cancer in relation to parental race and ethnicity: a 5-state pooled analysis, *Cancer* 116 (2010) 3045–3053.
- [35] J.F. Yamamoto, M.T. Goodman, Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997–2002, *Cancer Causes Control* 19 (2008) 379–390.
- [36] K.M. Walsh, A.P. Chokkalingam, L.I. Hsu, C. Metayer, A.J. de Smith, D.I. Jacobs, et al., Associations between genome-wide Native American ancestry, known risk alleles and B-cell ALL risk in Hispanic children, *Leukemia* 27 (2013) 2416–2419.
- [37] N.P. Santos, E.M. Ribeiro-Rodrigues, A.K. Ribeiro-Dos-Santos, R. Pereira, L. Gusmão, A. Amorim, J.F. Guerreiro, et al., Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel, *Hum. Mutat.* 31 (2010) 184–190.
- [38] S.D. Pena, P. Di, G. ietro, M. Fuchshuber-Moraes, J.P. Genro, M.H. Hutz, F. Kehdy, S. de, et al., The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected, *PLoS One* 6 (2011) e17063.
- [39] M.R. Ikoma, A.F. Sandes, L.S. Thiago, J. Cavalcanti, G.B. unior, I.G. Lorand-Metze, E.S. Costa, et al., First proposed panels on acute leukemia for four-color immunophenotyping by flow cytometry from the Brazilian group of flow cytometry-GBCFLUX, *Cytometry B Clin. Cytom.* 88 (2015) 194–203.
- [40] B. Meissner, T. Bartram, C. Eckert, J. Trka, R. Panzer-Grümayer, I. Hermanova, et al., Frequent and sex-biased deletion of SLX4IP by illegitimate V(D)J-mediated recombination in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Hum. Mol. Genet.* (2013), PubMed PMID: 24045615.
- [41] W. Yang, L.R. Treviño, J.J. Yang, P. Scheet, C.H. Pui, W.E. Evans, M.V. Relling, ARID5B SNP rs1082193is associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in blacks and contributes to racial differences in leukemia incidence, *Leukemia* 24 (2010) 894–896.
- [42] H. Xu, C. Cheng, M. Devidas, D. Pei, Y. Fan, W. Yang, G. Neale, P. Scheet, E.G. Burchard, D.G. Torgerson, C. Eng, M. Dean, F. Antillon, N.J. Winick, P.L. Martin, C.L. Willman, B.M. Camitta, G.H. Reaman, W.L. Carroll, M. Loh, W.E. Evans, C.H. Pui, S.P. Hunger, M.V. Relling, J.J. Yang, ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia, *J. Clin. Oncol.* 30 (2012) 751–757.
- [43] H. Xu, W. Yang, V. Perez-Andreu, M. Devidas, Y. Fan, C. Cheng, et al., Novel susceptibility variants at 10p12. 31-12. 2 for childhood acute lymphoblastic leukemia in ethnically diverse populations, *J. Natl. Cancer Inst.* 105 (2013) 733–742.
- [44] K.M. Walsh, S. de, A.J. mith, T.C. Welch, I. Smirnov, M.J. Cunningham, X. Ma, et al., Genomic ancestry and somatic alterations correlate with age at diagnosis in Hispanic children with B-cell acute lymphoblastic leukemia, *Am. J. Hematol.* 89 (2014) 721–725.
- [45] N. Harada, H. Ogawa, M. Shozu, K. Yamada, Genetic studies to characterize the origin of the mutation in placental aromatase deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 51 (1992) 666–672.
- [46] N. Siegelmann-Danieli, K.H. Buetow, Constitutional genetic variation at the human aromatase gene (Cyp19) and breast cancer risk, *Br. J. Cancer* 79 (1999) 456–463.

- [47] L.Y. Cho, J.J. Yang, K.P. Ko, S.H. Ma, A. Shin, B.Y. Choi, et al., Genetic susceptibility factors on genes involved in the steroid hormone biosynthesis pathway and progesterone receptor for gastric cancer risk, *PLoS One* 7 (10) (2012) e47603.
- [48] T.B. Tumer, D. Yilmaz, C. Tanrikut, G. Sahin, G. Ulusoy, E. Arinç, DNA repair XRCC1 Arg399Gln polymorphism alone, and in combination with CYP2E1 polymorphisms significantly contribute to the risk of development of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leuk. Res.* 34 (2010) 1275–1281.
- [49] L. Wang, F. Yin, X. Xu, X. Hu, D. Zhao, X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) genetic polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis, *PLoS One* 7 (2012) e34897.
- [50] R. Wang, X. Hu, Y. Zhou, Q. Feng, L. Su, J. Long, et al., XRCC1 Arg399Gln and Arg194Trp polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis, *Leuk. Lymphoma* 54 (2013) 153–159.