

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**O EFEITO DO POLIMORFISMO IVS14+1G→A NO GENE DA
DIIDROPIRIMIDINA DESIDROGENASE NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA
DO CÂNCER USANDO O 5-FLUOROURACIL**

LORRAINE LEMES NASCIMENTO

LUÍZ RICARDO GOULART FILHO

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Setembro – 2002

i

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**O EFEITO DO POLIMORFISMO IVS14+1G→A NO GENE DA
DIIDROPIRIMIDINA DESIDROGENASE NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA DO
CÂNCER USANDO O 5-FLUOROURACIL**

LORRAINE LEMES NASCIMENTO

Aprovado Pela Banca Examinadora em 06/09/02 Nota 100

Prof. Dr. Luíz Ricardo Goulart Filho

Dr. Rogério Agenor Araújo

Mestranda Mércia Pandolfo

Uberlândia, 06 de Setembro de 2002

“Não existem erros.

**Os acontecimentos que atraímos para nós,
por mais desagradáveis que sejam,
são necessários para aprender
o que necessitamos aprender;
todos os passos que damos
são necessários para chegar
ao ponto que escolhemos”**

(“A ponte para o sempre” Richard Bach)

Aos meus pais, minha homenagem,
Que sempre me disseram:
"Grandes realizações são possíveis
quando se dá atenção aos pequenos
começos."

Às pessoas especiais que fazem parte da minha vida, ofereço.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida e pelas oportunidades concebidas.
- Aos meus pais, Lincoln e Nair, pelo carinho, apoio e paciência em todos os momentos.
- Ao meu irmãos, Bruno e Katiucy, pelo companheirismo e compreensão.
- Ao Professor Luiz Ricardo pela confiança e oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.
- Aos amigos de sala e do Laboratório (Juliana Franco, Fausto, Daniela Valéria, Cristiane, Lígia, Mércia, Paula Souza, Vanessa, Teresa, Narcisa, Luciana, Juliana Meola, Elisângela, Renata, Fred, Paula Cristina, Maurício, Guilherme, Elaine, Rossana, Luciana, Marcolino, Ana Cândida, Carlos, Giovana, Nádia, Adriana, Alexandra, Cícero, Jaqueline, Waldesse) pelo carinho, compreensão, paciência e toda ajuda disponibilizada.
- À equipe do Hospital do Câncer, que contribuiu de forma marcante para realização desse trabalho (Dr Rogério, Maria Ivanice, Gustavo, Kiko, Vanessa e outros).
- A professora Cecília, pelo conhecimento que contribuiu para a elaboração do meu trabalho.
- Ao meu namorado Anderson, pela ajuda, carinho, dedicação e toda paciência.
- À Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio e oportunidade.
- Aos demais, que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIÇÕES

μ l	Microlitro (s)
1p22	Cromossomo 1 braço curto posição 22
5-FU	5-Fluorouracil
A	adenina
C	citosina
dATP	5'- desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'- desoxicitosina trifosfato
dGTP	5'- desoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
DPD	Diidropirimidina Desidrogenase (enzima)
DPYD	Diidropirimidina Desidrogenase (gene)
dTTP	5'- desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
Fase G2	Fase Gap 2 (intervalo 2)
Fase M	Fase de mitose
Fase S	Fase de síntese
FBAL	α -fluoro β -alanina
FdUMP	5 fluoro 2' desoxiuridina 5' monofosfato
FdUTP	5 fluoro 2' desoxiuridina 5' trifosfato
FUH ₂	5-6 Diidrofluorouracil
FUTP	5 fluoridina 5' trifosfato
G	guanina
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodaltons
LIS-SSCP	Conformação polimórfica de fita simples em baixa concentração iônica
M	molar
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

ml
mM
n
N
ng
nm
°C
OD
p
pb
PCR
pmoles
Q
RFLP
RNA
rpm
ssDNA
T
Taq DNA polimerase
TBE
U
UV
x

Mililitro (s)
milimolar
Número de indivíduos de cada classe genotípica
Número total de indivíduos
Nanograma (s)
nanômetros
Graus Celsius
Densidade óptica
Frequência do alelo normal
Pares de base
Reação em Cadeia da Polimerase
picomoles
Frequência do alelo mutado
Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
Ácido ribonucléico
Rotações por minuto
DNA de fita simples
Timina
Enzima produzida pela bactéria *Thermus aquaticus*
Tris-borato-EDTA
unidades
Ultra-violeta
vezes

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um fármaco amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos. É um análogo da pirimidina e a dose é degradada em três passos metabólicos, inicialmente catalisados pela enzima Diidropirimidina Desidrogenase (*DPD*). A deficiência na atividade da *DPD* causa em pacientes em tratamento diarreias severas, neutropenia e em alguns casos neurotoxicidade. O objetivo desse trabalho foi identificar a mutação no gene da *DPYD* pelas técnicas RFLP e LIS-SSCP, determinar as freqüências gênicas e alélicas da mutação na população de abrangência do Hospital do Câncer e correlacionar o efeito da administração do 5-FU com a mutação identificada. As amostras foram analisadas por PCR-RFLP e LIS-SSCP. Dos 140 indivíduos estudados 98,6% são homozigotos normais, 1,4% são heterozigotos, sendo 99,3% a freqüência do alelo normal e 0,7% a freqüência do alelo mutante. A análise dos prontuários dos pacientes heterozigotos revelou que apenas 1 deles apresentou reação adversa tais como náuseas, indisposição e diarreias e dentre os 68 pacientes homozigotos normais, 3 apresentaram reações adversas, indicando que variantes do mesmo gene ou ainda outros genes podem estar influenciando na resposta terapêutica.

Palavras-chave: 5-Fluorouracil, Diidropirimidina Desidrogenase e Quimioterapia.

ÍNDICE

1) INTRODUÇÃO	
1.1) Quimioterapia do Câncer	01
1.2) Farmacogenética do Câncer	01
1.3) 5 – Fluorouracil	05
1.4) Diidropirimidina Desidrogenase	07
1.5) Reação em Cadeia da Polimerase	08
1.6) PCR – RFLP	12
1.7) Enzimas de Restrição	13
1.8) LIS – SSCP	14
2) OBJETIVOS	14
3) MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1) Pacientes	16
3.1.1) Pacientes Portadores de Neoplasias	16
3.1.2) Grupo Controle	16
3.2) Amostras	16
3.2.1) Amostras dos Pacientes	17
3.2.2) Amostras do Banco de Dados	17
3.3) Extração de DNA	17
3.4) Quantificação do DNA	17
3.5) Amplificação do DNA – PCR	18
3.6) Eletroforese dos Produtos Amplificados	18
3.7) LIS – SSPC	19
3.8) Coloração do Gel de Poliacrilamida por Nitrato de Prata	19
3.9) Restrição Enzimática	20
3.10) Análise Estatística	20
3.11) Análise de Prontuários	21
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5) CONCLUSÃO	22
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
7) ANEXO	29
	33

1) INTRODUÇÃO

1.1) Quimioterapia do Câncer

A quimioterapia é o método que utiliza compostos químicos chamados quimioterápicos que quando aplicada ao câncer, é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antilástica.

Os agentes utilizados no tratamento do câncer afetam tanto as células normais como as neoplásicas, porém eles acarretam maior dano às células malignas do que às dos tecidos normais, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares.

O DNA age como modelador na produção de formas específicas de RNA transportador, RNA ribossômico e RNA mensageiro e, deste modo, determina qual enzima irá ser sintetizada pela célula. As enzimas são responsáveis pela maioria das funções celulares, e a interferência nesses processos irá afetar a função e a proliferação tanto das células normais como das neoplásicas. A maioria das drogas utilizadas na quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo nesse mecanismo celular, e a melhor compreensão do ciclo celular normal levou

à definição clara dos mecanismos de ação da maioria das drogas. Foi a partir dessa definição que Bruce e colaboradores em 1969 classificaram os quimioterápicos conforme a sua atuação sobre o ciclo celular em:

- Ciclo-inespecíficos - Aqueles que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo, como, por exemplo, a mostarda nitrogenada e o 5-Fluorouracil.
- Ciclo-específicos - Os quimioterápicos que atuam somente nas células que se encontram em proliferação, como é o caso da ciclofosfamida.
- Fase-específicos - Aqueles que atuam em determinadas fases do ciclo celular, como, por exemplo, o metotrexato (fase S), o etoposídeo (fase G2) e a vincristina (fase M).

A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. O uso de drogas isoladas (monoquimioterapia) mostrou-se ineficaz em induzir respostas completas ou parciais significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito. A poliquimioterapia é de eficácia comprovada e tem como objetivos atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular, utilizar a ação sinérgica das drogas, diminuir o desenvolvimento de resistência às drogas e promover maior resposta por dose administrada. A quimioterapia pode ser utilizada em combinação com a cirurgia e a radioterapia. De acordo com as suas finalidades, a quimioterapia é classificada em:

- Curativa - quando é usada com o objetivo de se conseguir o controle completo do tumor, como nos casos de doença de Hodgkin, leucemias agudas, carcinomas de testículo, coriocarcinoma gestacional e outros tumores.
- Adjuvante - quando se segue à cirurgia curativa, tendo o objetivo de esterilizar células residuais locais ou circulantes, diminuindo a incidência de metástases à distância. Exemplo: quimioterapia adjuvante aplicada em caso de câncer de mama.
- Neoadjuvante ou prévia - quando indicada para se obter a redução parcial do tumor, visando a permitir uma complementação terapêutica com a cirurgia e/ou radioterapia.

Exemplo: quimioterapia pré-operatória aplicada em caso de sarcomas de partes moles e ósseas.

- Paliativa - não tem finalidade curativa. Usada com a finalidade de melhorar a qualidade da sobrevivência do paciente com tumores avançados. É o caso da quimioterapia indicada para carcinoma indiferenciado de pequenas células do pulmão.

Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos e outros. Novas drogas estão sendo permanentemente isoladas e aplicadas experimentalmente em modelos animais antes de serem usadas nos homens.

Os alquilantes são compostos capazes de substituir em outra molécula um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Eles se ligam ao DNA de modo a impedir a separação dos dois filamentos do DNA na dupla hélice, fenômeno este indispensável para a replicação. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico. Apesar de efetivos como agentes isolados para inúmeras formas de câncer, eles raramente produzem efeito clínico ótimo sem a combinação com outros agentes fase-específicos do ciclo celular.

As principais drogas empregadas dessa categoria incluem a mostarda nitrogenada, a ciclofosfamida, as nitrosuréias, a cisplatina, etc.

Os antimetabólitos são compostos que afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA. Deste modo, impedem a multiplicação e função normais da célula. Esta inibição da biossíntese pode ser dirigida às purinas (como é a ação dos quimioterápicos 6-mercaptopurina e 6-tioguanina), à produção de ácido timidílico (5-fluorouracil e metotrexato) e a outras etapas da síntese de ácidos nucleicos (citosina-arabinosídeo C). Os antimetabólitos são particularmente ativos contra células que se encontram na fase de síntese do ciclo celular (fase S)

Os antibióticos são um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora

interajam com o DNA e inibam a síntese deste ácido ou de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular. Apesar de apresentarem tal variação, possuem em comum anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a conseqüente produção de radicais livres reativos. Podem apresentar outro grupo funcional que lhes acrescenta novos mecanismos de ação, como alquilação (mitomicina C), inibição enzimática (actinomicina D e mitramicina) ou inibição da função do DNA por intercalação (bleomicina, daunorrubicina, actinomicina D e adriamicina e seus análogos mitroxantona e epirrubicina).

Os inibidores mitóticos podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso mitótico, pelo qual migram os cromossomos. Deste modo, os cromossomos, durante a metáfase, ficam impedidos de migrar, ocorrendo a interrupção da divisão celular. Esta função tem sido útil na "sincronização" das células quando os inibidores mitóticos são combinados com agentes específicos da fase S do ciclo. Devido ao seu modo de ação específico, os inibidores mitóticos devem ser associados a outros agentes para maior efetividade da quimioterapia. Neste grupo de drogas estão incluídos os alcalóides da vinca rósea (vincristina, vimblastina e vindesina) e os derivados da podofilotoxina (o VP-16, etoposídeo; e o VM-26, teniposídeo). Algumas drogas não podem ser agrupadas em uma determinada classe de ação farmacológica. Entre elas, destacam-se a dacarbazina, indicada no tratamento do melanoma avançado, sarcomas de partes moles e linfomas; a procarbazina, cujo mecanismo de ação não foi ainda completamente explicado, e que é utilizada no tratamento da doença de Hodgkin; a L-asparaginase, que hidrolisa a L-asparagina e impede a síntese protéica, utilizada no tratamento da leucemia linfocítica aguda (INCA, 1999).

1.2) Farmacogenética do Câncer

Câncer é um termo genérico para uma variedade de neoplasmas malignos que podem resultar em efeitos deletérios ao hospedeiro devido ao seu caráter invasivo e metastático. As células tumorais podem surgir a qualquer fase da vida, em qualquer tecido, pode apresentar a característica de invadir tecidos vizinhos por extensão direta ou disseminar-se através do organismo por vasos linfáticos ou sanguíneos (BRASIL, 1997).

O Brasil apresenta em seu quadro sanitário a ocorrência de doenças ligadas a pobreza, típicas dos países em desenvolvimento, e ocorrências de doenças crônico-degenerativas, características dos países mais ricos. Analisando-se as taxas de mortalidade das macro-regiões brasileiras, o câncer ocupa diferentes posições, porém, sempre entre as principais causas de morte. Atualmente o câncer ocupa a segunda posição entre as causas de morte, por doença, no Brasil (BRASIL, 1997).

Em um paciente com câncer, o tratamento é um ponto crítico. Na medicina, há poucas situações onde o procedimento terapêutico seja tão decisivo para a cura ou a morte do paciente. A responsabilidade é grande e a tomada de decisão tem que ser criteriosa.

Um dos maiores problemas na farmacologia do câncer é a previsão dos resultados do tratamento em termos de toxicidade e resposta do tumor. Saber porque alguns pacientes apresentam elevada toxicidade a uma dose padrão, porque alguns respondem a quimioterapia enquanto outros não, se as mesmas drogas e dosagens são usadas, é uma questão que vem intrigando. A causa da variabilidade na resposta à quimioterapia pode ser classificada em duas classes, as relacionadas ao hospedeiro e as relacionadas ao tumor (CANAL *et al.*, 1998).

Com relação ao tumor, muitos fatores podem influenciar a quimioterapia, por exemplo: tipo do tumor, localização, volume, agressividade, estágio de disseminação, tratamentos anteriores

(resistência), níveis de marcadores moleculares biológicos e fenótipo farmacogenético (CANAL *et al.*, 1998).

O sucesso na cura de alguns cânceres foi possível quando as drogas foram seletivamente mais tóxicas para as células do tumor de que para as células do hospedeiro. Seletividade tóxica destas drogas não são tão simples como as observadas na quimioterapia anti-infecciosa, como as células do tumor tiveram origem nas células normais, as diferenças entre células normais e tumorais são muito sutis (CANAL *et al.*, 1998).

Com relação ao hospedeiro, parâmetros fisiopatológicos podem influenciar os resultados do tratamento, por exemplo: idade, sexo, tratamentos concomitantes e a farmacogenética (CANAL *et al.*, 1998).

A aplicabilidade da farmacogenética na quimioterapia antineoplásica é crítica pelas seguintes razões:

1. Os agentes antineoplásicos possuem estreita margem de segurança,
2. Muitos destes agentes são pró-drogas e para exercerem sua ação necessitam da biotransformação, que é realizada por enzimas que podem exibir polimorfismo genético,
3. Formas ativas são associadas, freqüentemente, a toxicidade,
4. Certos agentes antineoplásicos necessitam de biotransformação por um sistema de enzimas polimórficas, para serem excretados,
5. A maioria das drogas usada na quimioterapia exibe significativa variabilidade interindividual.

Os polimorfismos genéticos de algumas classes de enzimas envolvidas na farmacocinética e na farmacodinâmica de alguns agentes antineoplásicos já foram descritos, como é o caso da Diidropirimidina Desidrogenase.

1.3) 5 - Fluorouracil

O 5-Fluorouracil (5-FU) é antagonista da pirimidina, é uma pró-droga, sujeita ao catabolismo e anabolismo (DIASIO & HARRIS, 1989) (Figura 1)

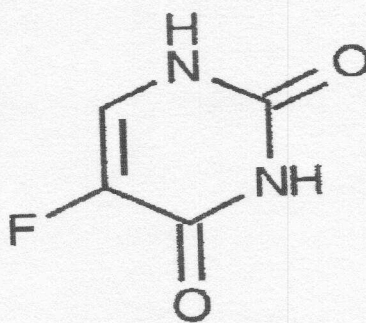


Figura 1: Estrutura Química do 5-FU

Mais de 80% da dose entra no processo catabólico e é inativada no fígado, sendo alguma parte (cerca de 15%) excretado na urina. A atividade citotóxica do 5-FU depende do seu anabolismo nos nucleotídeos das células em proliferação, e sua biodisponibilidade é determinada pela extensão do processo catabólico. Durante o anabolismo, uma série de reações fosforilativas permitem a formação da 5 fluoro 2' desoxiuridina 5' monofosfato (FdUMP), 5 fluoro 2' desoxiuridina 5' trifosfato (FdUTP) e 5 fluoridina 5' trifosfato (FUTP), sendo estes os metabólitos ativos do 5-FU. Os efeitos citotóxicos são resultados da ação do 5-FdUMP sobre a Timidilato Sintetase, enzima necessária à formação do DNA, ao qual bloqueia sua ação, levando a inibição da síntese de DNA e conseqüente apoptose. O 5-FUTP é incorporado do RNA resultando em um processamento anormal dessa molécula, enquanto o 5-FdUTP é incorporado ao DNA causando quebra das suas fitas (DAHER *et al.*, 1990). A primeira enzima no catabolismo do 5-FU é a Diidropirimidina Desidrogenase (DPD), ao qual permite a conversão da droga em 5-6 Diidrofluorouracil (FUH₂) e conseqüentemente em α -fluoro β -alanina (FBAL), inativando-o. Casos individuais de deficiência genética da DPD

levam a uma alteração na farmacocinética do 5-FU, causando toxicidade relativa a droga (ETIENNE, *et al.*, 1995) (DANENBERG, *et al.*, 1998) (Figura 2)

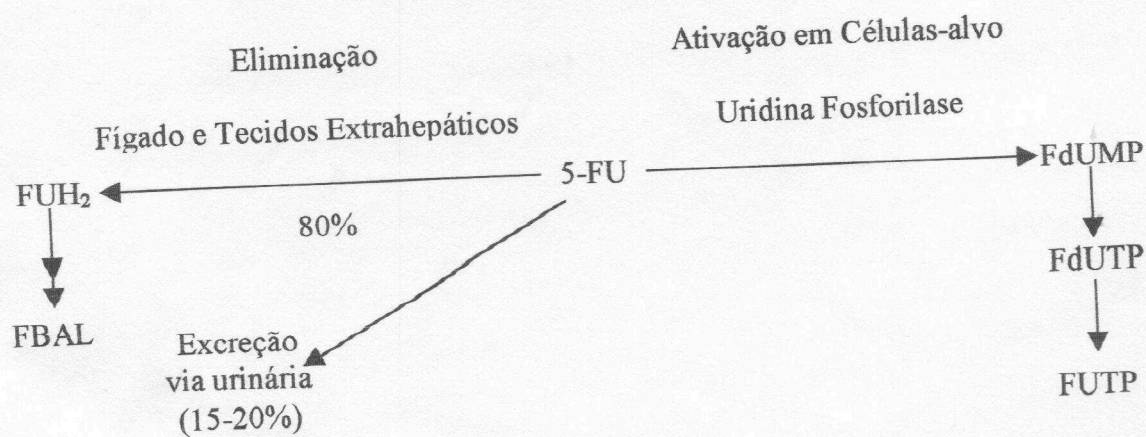


Figura 2: Rota metabólica do 5-Fluorouracil em humanos (DIASIO & HARRIS, 1989)

O 5-FU, por não ter especificidade de ação quanto à fase do ciclo celular em que atua, é classificado como inespecífico, isto é, age em qualquer fase do ciclo celular, ou em todas as fases, ou na maioria delas (INCA, 1999).

1.4) Diidropirimidina Desidrogenase

No fígado dos mamíferos, o caminho para o catabolismo do uracil e da timina consiste em três passos consecutivos. A Diidropirimidina Desidrogenase (DPD) é a enzima inicial responsável pelo catabolismo das bases pirimídicas em um processo que envolve a redução do uracil e da timina em 5.6 diidrouacil e 5.6 diidrotimina respectivamente. O segundo passo envolve uma reação hidrolítica que é catalisada pela diidropirimidinase. Finalmente o ácido β -ureidopropionico e o ácido β -ureidoisobutílico são convertidos a β -alanina e ácido β -

aminoisobutírico, amônia e CO_2 pela enzima β - ureidopropionase (Figura 3) (VAN KUILENBURG *et al.*, 1999).

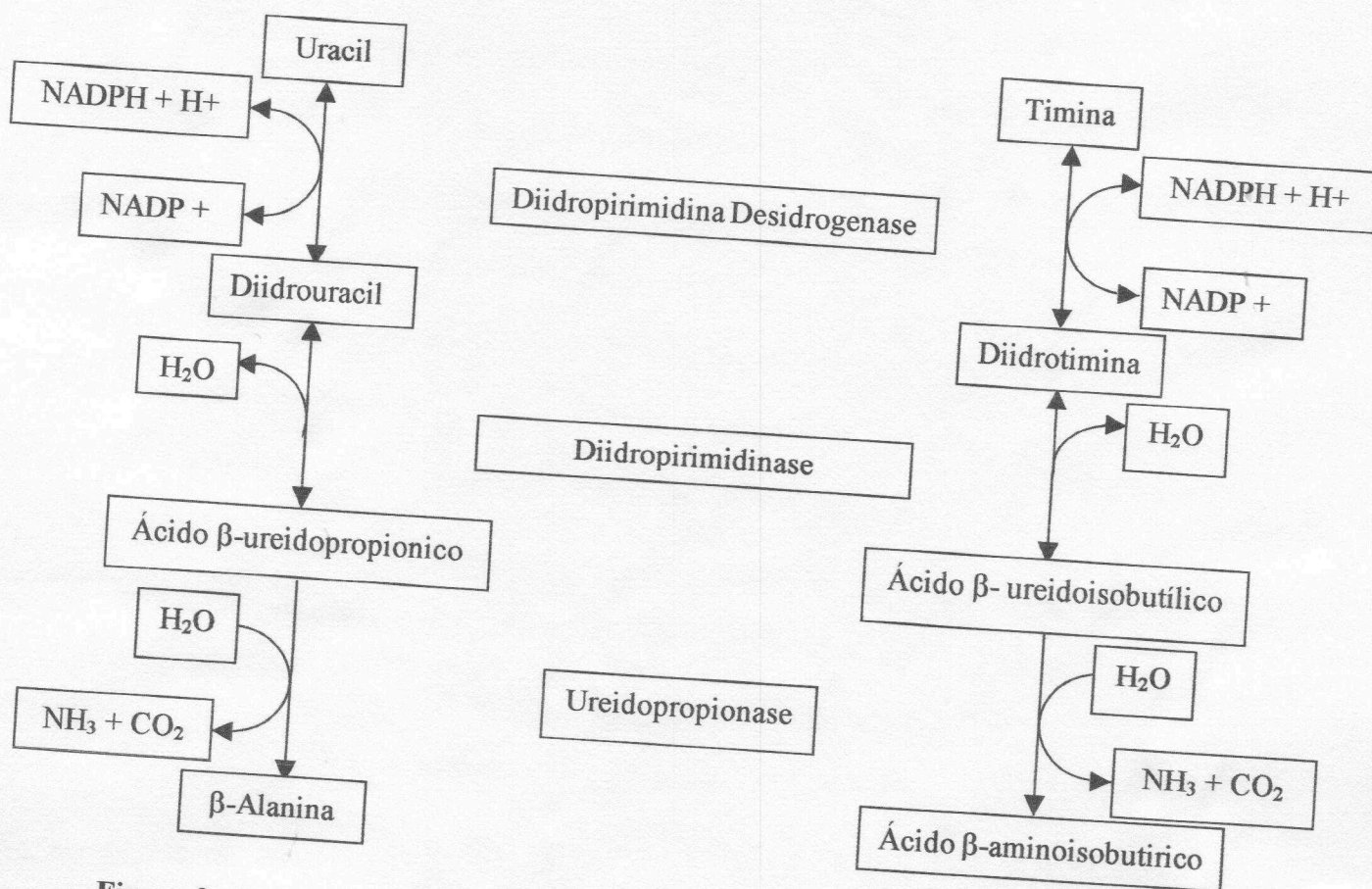


Figura 3: Catabolismo das bases pirimídicas, mostrando as enzimas envolvidas no processo, dentre elas a Diidropirimidina Desidrogenase (VAN KUILENBURG *et al.*, 1999).

A deficiência da DPD foi inicialmente descrita em pacientes pediátricos exibindo timina-uracilúria associado a uma variedade de sintomas neurológicos. Nesses pacientes, uma grande acumulação de uracil e timina foram detectados na urina, sangue e fluido cérebro-espinhal e, no entanto nenhuma atividade da DPD foi detectada em fibroblastos e células mononucleadas. (BAKKEREN *et al.*, 1984, VAN GENNIP *et al.*, 1993). BERGER *et al.*, (1984) descreveu o caso de três crianças que apresentavam quadro de disfunção cerebral e eliminação urinária persistente de grandes quantidades de uracil e timina. O padrão de excreção sugeriu a

deficiência de DPD. Ao se verificar que os pais destas crianças eram primos primeiros pode se comprovar que se tratava de herança autossomal recessiva.

A DPD é também responsável pelo metabolismo do anti-neoplásico 5-FU, onde cataboliza cerca de 80% da dose administrada. (HEGGIE *et al.*, 1987). A deficiência na atividade da DPD tem mostrado estar associada a efeitos tóxicos após o tratamento com 5-FU (PIPER *et al.*, 1980). TUCHMAN *et al.*, (1985) descreveu uma reação incomum e severa em uma mulher, após administração de dose usual em esquema semanal de tratamento quimioterápico. Os sintomas incluíram estomatite, leucopenia, trombocitopenia, alopecia, febre, diarreia, significativa perda de peso, ataxia cerebelar e sintomas neurotóxicos, progredindo para semi-coma. Elevados níveis de uracil foram encontrados na urina da paciente e em um dos irmãos, ambos apresentaram elevadas concentrações plasmáticas e urinárias de bases pirimídicas. Os autores sugeriram que o defeito possa estar na atividade da DPD que está envolvida na degradação das pirimidinas. O defeito não seria percebido clinicamente até o uso de análogos da pirimidina, no caso o 5-FU.

O gene codificador da DPD, possui 23 éxons, 4230 pares de bases no seu DNA e esta localizado no cromossomo 1 p22, codificando uma enzima contendo 1025 aminoácidos, com peso molecular de 111 kDa. (MILANO & ETIENNE, 1996).

Treze mutações diferentes no gene DPYD já foram descritas causando algum tipo de alteração na atividade da DPD (COLLIE-DUGUID, *et al.*, 2000) (Tabela 1). Em estudos populacionais, VAN KUILENBURG *et al.*, 1999, descreveu a mutação mais freqüente no gene codificador da DPD (23 de 44 sendo 52% dos alelos mutados), sendo ela uma mutação de ponto no primeiro nucleotídeo do sítio doador de splicing do íntron 14 (G→A), levando a conseqüente deleção do éxon 14 contendo 165 pares de bases (variante IVS14G→A) (Figura 4).

De 53 casos de deficiência de DPD associado com toxicidade relacionada a 5-FU estudados por MILANO *et al.*, (1999), 19 casos tiveram moderada ou marcada deficiência de DPD. A

maioria dos casos ocorreu em mulheres (15 de 19). A toxicidade foi marcadamente maior nos pacientes com baixa atividade DPD. A neurotoxicidade é a manifestação predominante quando a deficiência da DPD é marcante, sintomas de cardiotoxicidade foram observados em somente 1 dos casos.

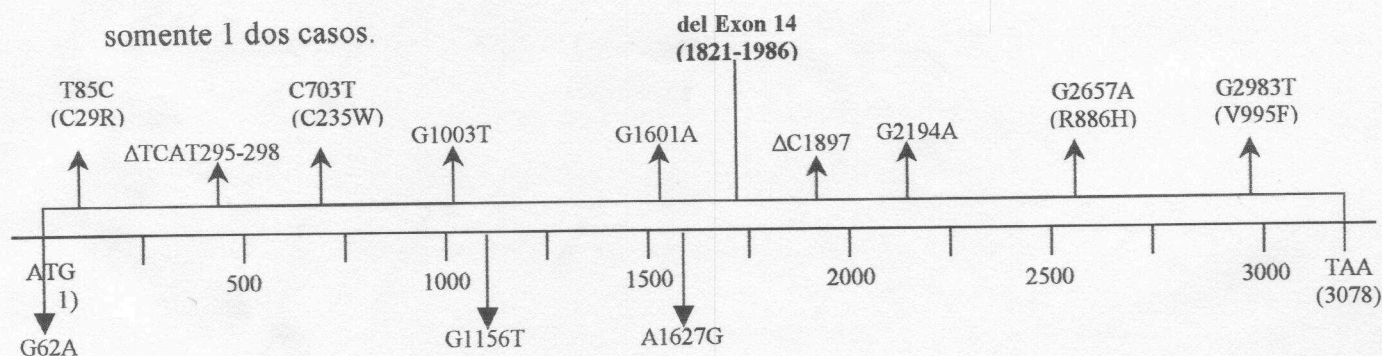


Figura 4: Estrutura molecular do gene da DPYD que codifica a enzima DPD com as mutações já descritas. O nucleotídeo selvagem é indicado primeiro seguido de sua localização e o nucleotídeo variante. A deleção de nucleotídeos esta indicada por Δ , seguido pela localização do nucleotídeo.

Tabela 1: Mutações descritas e seus efeitos na atividade da DPD

MUTAÇÃO	ATIVIDADE
G 62 A (éxon 2)	Não ocorre perda
T 85 C (C 29 R)	Perda total
Δ TCAT 295-298	Não determinado
C 703 T (R235 W)	Perda total
G 1003 T (éxon 10)	Perde 85%
G 1156 T (éxon 11)	Perda total
G 1601 A	Não determinado
A 1627 G	Não ocorre perda
IVS14+1G-A	Perda total
Δ C 1897	Não determinado
G 2194 A	Não ocorre perda
G 2657 A (R 886 H)	Perda de 75%
G 2983 T (V 995 F)	Perda total

Tabela 1: Correlação entre as mutações descritas no gene da Diidropirimidina Desidrogenase os efeitos sobre a atividade enzimática.

1.5) Reação em Cadeia da Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Polimerase Chain Reaction) é uma técnica usada para amplificação de seqüências específicas de DNA através da extensão simultânea de pequenas moléculas de DNA de fita simples denominadas iniciadores ou *primers*. Este método foi desenvolvido por Kary Mullis na década de 80 embora o princípio foi descrito em detalhes na década seguinte por Khorana e colaboradores (INNIS & GELFAND, 1990). É um método *in vitro* que pode ser utilizado para identificar com alta sensibilidade doenças causadas por vírus e/ou bactérias, doenças genéticas em exames pré-natais, sequenciamento, clonagem e outros (WILLIAMS, 1989).

A PCR parte do mesmo princípio *in vivo* das DNAs polimerases que são encarregadas da síntese da fita complementar de DNA no sentido 5' → 3' mas utilizando dos *primers* que são artificialmente produzidos e que acabam por limitar o tamanho do fragmento a ser amplificado. A PCR é constituída por ciclos e cada ciclo envolve três passos: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla de DNA é aquecida aproximadamente a 90 - 95° C causando sua desnaturação e tornando cada fita acessível aos *primers*. A temperatura é reduzida à aproximadamente 35 - 60° C o que faz as duas fitas se unirem novamente, mas pelo grande excesso de *primers* na mistura em relação a quantidade de DNA, as fitas se unirão aos *primers*. Novamente a temperatura é elevada atingindo cerca de 72° C que é a temperatura ótima para atividade da enzima Taq DNA polimerase que coordena a extensão dos primers a partir da sua porção terminal 3' em sentidos opostos utilizando dos 4 dexoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). Vários ciclos são repetidos permitindo a amplificação de uma região particular do DNA (SAIKI & GELFAND, 1989). As condições iniciais para amplificação, tais como concentração de MgCl₂, Taq e de *primers* e a

temperatura de anelamento, devem ser definidas para cada par de *primers* (PASSAGLIA & ZAHA, 1996).

1.6) PCR-RFLP

Na década de 80, foram descobertas as primeiras variações neutras de DNA que podiam ser usadas como marcadores no mapeamento. Esses marcadores eram os polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs). Os marcadores RFLPs podem ter várias causas no nível do DNA mas freqüentemente são originados pela presença ou ausência de um sítio-alvo de uma enzima de restrição, onde até mesmo uma diferença em um único par de bases pode ser responsável (GRIFFITHS *et al.*, 1998)

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo. Diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos podem também resultar de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alteram a distância entre pares de sítios de restrição. Ao ser submetido à clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

1.7) Enzimas De Restrição

As enzimas de restrição são produzidas pelas bactérias como um mecanismo de defesa contra bacteriófagos. As enzimas atuam como tesouras cortando o DNA do fago e, portanto inativando-o. Entretanto as enzimas de restrição não cortam aleatoriamente mas sim em seqüências alvo específicas, e esta é uma das principais características que as tornam adequadas para manipulação do DNA. Qualquer molécula de DNA, desde vírus até humanos, contém sítios-alvo para enzimas de restrição puramente ao acaso, e, portanto pode ser cortada em fragmentos de tamanhos definidos (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

1.8) LIS-SSCP

O SSCP (Conformação Polimórfica de Fita Simples), método alternativo para identificar mutações, foi desenvolvido por Orita *et al.* (1989) e baseia-se no fato de que a mobilidade eletroforética dos ácidos nucléicos de fita simples em gel de poliacrilamida não desnaturante não depende somente do seu tamanho, mas também de sua seqüência. Usa-se aquecimento na presença de formamida para desnaturar o DNA formando ssDNA (fitas simples de DNA). MARUYA *et al.*, (1996) ao observarem a instabilidade dos ssDNA em solução de formamida, desenvolveram o LIS-SSCP (Conformação Polimórfica de Fita Simples em Baixa Concentração Iônica), uma adaptação da técnica SSCP, onde a solução de formamida é substituída por uma solução de baixa força iônica (LIS) capaz de garantir maior estabilidade das fitas simples.

A vantagem da genotipagem por essa técnica reside na rapidez e diminuição de custos, pois evita o emprego de enzimas de restrição (SILVA, 1998). Assim este método detecta polimorfismo no DNA, incluindo mutações de ponto em uma variedade de posições.

2) OBJETIVOS

Este trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- Otimizar a amplificação do gene da DPD através da técnica Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).
- Padronizar metodologia para a identificação do polimorfismo do gene DPYD pela técnica de LIS-SSCP e PCR-RFLP.
- Verificar eficiência na técnica de LIS-SSCP como método alternativo ao uso de enzimas de restrição na detecção do polimorfismo do gene da DPD.
- Calcular as frequências gênicas e alélicas da população estudada para o gene DPYD.
- Determinar as possíveis implicações do polimorfismo identificados nas respostas ao tratamento quimioterápico antineoplásico, através da análise de prontuários dos pacientes.

3) MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Genética Molecular (LABGEN), integrado ao Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.1- PACIENTES

3.1.1- Pacientes Portadores de Neoplasias

Setenta pacientes portadores de neoplasias mamárias e gastrointestinais assistidos pelo serviço ambulatorial do Hospital do Câncer da Universidade Federal de Uberlândia foram investigados quanto à presença de polimorfismo genético para a enzima DPD. O estudo incluiu pacientes em diferentes estágios e diagnósticos, que recebem a droga 5-FU, substrato da DPD. Participaram os paciente que após as informações sobre o estudo, assinaram o termo de consentimento em anexo.

3.1.2- Grupo Controle

Setenta pacientes representantes da população em geral foram investigados quanto ao polimorfismo genético para a enzima DPD. Amostras de DNA foram cedidas pelo Banco de

Dados do Laboratório BioGenetics em forma de códigos para evitar o reconhecimento do paciente.

3.2- AMOSTRAS

3.2.1- Amostras dos pacientes

As amostras foram obtidas a partir de sangue periférico pelo sistema *Vacutainer* contendo EDTA. Foram coletados 5 ml de sangue, minutos antes do início da quimioterapia.

3.2.2- Amostras do Banco de Dados

Coletou-se 10 µl de material genético que foram estocados para uso posterior.

3.3- EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi obtida retirando-se uma alíquota de 500 µl de camada de leucócitos de cada amostra, que foi transferida para um “*ependorf*” de 1,5 ml acrescentando-se 1 ml de Tampão de Lise Celular (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM e EDTA 1mM) e agitando-o por 10 segundos para ressuspensão das células. As amostras foram centrifugadas à 5.000 rpm por 5 minutos para peletar os núcleos e o sobrenadante foi então descartado. Adicionou-se novamente 1 ml de Tampão de Lise Celular repetindo a centrifugação até o *pellet* ficar de cor branca. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 400 µl do Master Mix a cada tubo pipetando “up and down” até o *pellet* se desfazer. Foi adicionado 20 µl de Proteinase K (10 mg/ml) em cada tubo e as amostras foram incubadas a 65° C em banho-maria por 2 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min. e o sobrenadante recolhido em um “*ependorf*” limpo, onde foi adicionado 200 µl de Cloreto de Lítio 7,5 M. As amostras foram agitadas por 5 seg. e colocadas em gelo por 10 min., após esse intervalo de

tempo foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min. para precipitar proteínas e outros contaminantes, transferindo o sobrenadante para um “eppendorf” limpo e adicionando etanol absoluto. As amostras foram misturadas por inversão até o aparecimento dos flocos de DNA. Centrifugou-se por 10 min. a 13.000 rpm para precipitar o DNA, descartando-se o etanol residual e ressuspendendo a amostra em 200 µl de água.

3.4- QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Uma alíquota de 5 µl de cada amostra de DNA foi diluída em 995 µl de água deionizada para quantificação em espectrofotômetro por leitura de absorvância a 260 nm, através da fórmula: $C = OD(260 \text{ nm}) \times F \times 50$ (µg/ml); onde C= concentração (µg/ml) de DNA, OD= densidade ótica de DNA obtida na absorvância de 260 nm, F= fator de diluição da amostra e 50 µg/ml equivale ao valor de concentração de DNA contida em uma unidade de OD.

3.5- AMPLIFICAÇÃO DO DNA – PCR

Após a extração do DNA, foi amplificado o fragmento do gene de interesse através do uso dos *primers* DPDdelF1 (forward) 5' TGCAAATATGTGAGGAGGGACC 3' e DPDdelR1 (reverse) 5' CAGCAAAGCAACTGGCAGATTC 3'. Na reação de PCR foram utilizados: 10 pmoles de cada *primer*, 100 mM de dNTPs, 2U de Taq DNA Polimerase, 2,5 µl do tampão da enzima 10x (Tris-HCl 100 mM; KCl 500 mM; MgCl₂ 1,5 mM), 500 ng de DNA, completando a reação de 50 µl com água.

As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-150 MiniCycler™, com programa otimizado para 95° C por 5 minutos de desnaturação inicial, 35 ciclos de 95°C por 30 seg. de

desnaturação, 63°C por 40 seg. de anelamento e 72°C por 40 seg. de extensão e finalmente, 72°C por 5 min. de extensão final

3.6- ELETROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Após amplificação, a detecção das amplificações foi feita em gel de agarose 1,5% e tampão 0,5X Tris-Borato EDTA (TBE), conforme SAMBROOK *et al.* (1989) e corado com brometo de etídio diluído a uma concentração de aproximadamente 0,5 µg/ml de gel. Foram aplicados 5 µl de cada amostra com 2 µl de load (3,61M azul de bromofenol, 4,64M xileno cianol, 1,17M sacarose e 0,1M EDTA pH 8,0), e uma aplicação contendo somente o marcador para contagem do número de pares de bases das bandas amplificadas. O gel correu por 1 hora a 100 Volts. As amostras contidas no gel foram visualizadas por Transiluminador UV e fotografadas por VDS Image System (Pharmacia Biosciences)

3.7- LIS-SSCP

Do produto amplificado pela PCR foram adicionados 2 µl em 20 µl de solução de LIS (10% sacarose, 0,01% azul de bromofenol e 0,01% xileno cianol) e homogeneizado. A mistura foi incubada por 10 minutos a 98° C e posteriormente colocada no gelo, sendo que 5 µl da solução foram aplicados no gel 8% poliacrilamida não desnaturante (acrilamida/bis acrilamida = 49:1). A eletroforese foi realizada por 5 horas a 300 Volts em 1x TBE (Tris-Borato EDTA) a temperatura de 4°C.

3.8- COLORAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA POR NITRATO DE PRATA

Após eletroforese o gel foi retirado e fixado em solução de ácido acético 10% por 30 minutos e lavados 2 vezes por 2 minutos com água destilada. Logo após, foi colocada a solução de nitrato de prata (200mg), formaldeído (150 μ l) e água (100ml) e incubada por 20 minutos no escuro. Lavou-se 2 vezes com água por 30 seg. colocando a solução reveladora gelada de carbonato de cálcio (3g), formaldeído (150 μ l), tiosulfato de sódio (50 μ l) e água (100ml) até o aparecimento das bandas. A solução foi finalizada após adição da solução fixadora por cerca de 10 minutos.

3.9- RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

Após a amplificação do fragmento de interesse, foi feita a restrição enzimática, de 50 amostras de pacientes portadores de neoplasias utilizando a enzima *HpyCH₄ IV*, que reconhece o sítio onde se encontram a sequência de nucleotídeos do indivíduo normal, cortando em fragmentos de 278 e 131 pares de bases, não reconhecendo então o ponto de mutação mantendo intacto o DNA de 409 pares de bases do indivíduo portador da mutação (Figura 5). A reação foi feita utilizando: 3U da enzima *HpyCH₄ IV*, 2,5 μ l do tampão da enzima, 10 μ l do produto amplificado e água para completar a reação de 20 μ l. A amostra foi incubada em banho-maria a 37° C por *HpyCH₄*

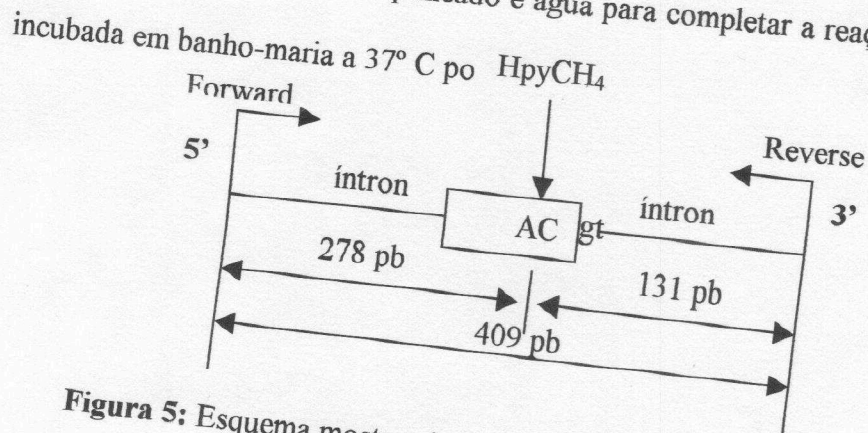


Figura 5: Esquema mostrando o sítio de ação da enzima *HpyCH₄ IV*.

3.10) ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência genotípica foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: $n/N \times 100\%$, onde n representa o número de indivíduos de cada classe genotípica e N o número total de indivíduos estudados.

A frequência alélica foi calculada através da fórmula $p+q=1$, onde p = frequência do alelo normal e q = frequência do alelo mutado, sendo que $p= 2x$ número de homozigotos normais + $\frac{1}{2}$ do número de heterozigotos/ $N \times 100\%$ e $q= 2x$ número de homozigotos recessivos + $\frac{1}{2}$ do número de heterozigotos/ $N \times 100\%$.

3.11) ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS

A correlação entre a mutação detectada e as respostas ao tratamento quimioterápico antineoplásico, foi feita através da análise dos prontuários de todos os pacientes envolvidos na pesquisa. Foram observados os sintomas, queixas e regimes de drogas utilizadas pelos pacientes durante o tratamento.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas otimizadas neste trabalho são muito importantes para realização de uma triagem farmacogenética em pacientes que irão começar o tratamento quimioterápico a fim de auxiliar o médico na otimização de um regime de drogas a serem utilizadas no tratamento do mesmo.

A extração de DNA foi de ótima qualidade, obtendo-se cerca de 500 ng/ μ l na maioria das amostras. Durante a otimização da PCR apareceram muitos fragmentos inespecíficos ao se usar quantidades de DNA abaixo de 500 ng e acima de 600 ng e Taq DNA Polimerase acima de 2U. Essa situação foi revertida quando se utilizou exatamente 500 ng de DNA e 2 U de Taq DNA Polimerase, obtendo assim o fragmento de 409 pb, como foi previsto (Figura 6)

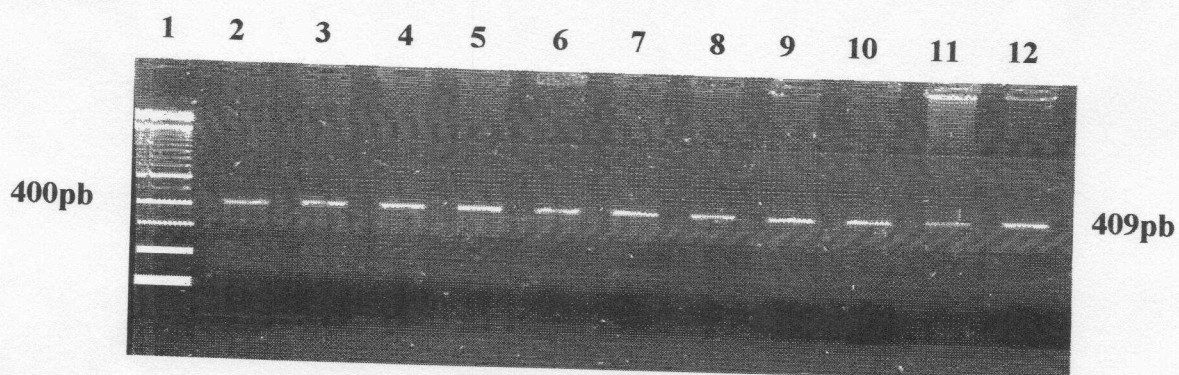


Figura 6: Produto Amplificado em Gel de Agarose 1,5%. Na coluna 1, marcador de 100 pb, colunas 2 a 6 pacientes portadores de neoplasias e 7 a 11 pacientes do Grupo Controle.

A amplificação pela PCR foi de boa qualidade, com bandas suficientemente fortes para serem detectadas em gel de agarose.

Do fragmento de 409 pb realizou-se a técnica da restrição enzimática, utilizando-se amostras de 50 pacientes portadores de neoplasias. Foram encontrados apenas dois genótipos: um em indivíduos normais, detectando-se 2 bandas cortadas pela enzima, com 278 pb e 131 pb, e outro genótipo de indivíduo heterozigoto, com 3 bandas de 409 pb, 278 pb e 131 pb (Figura 7)

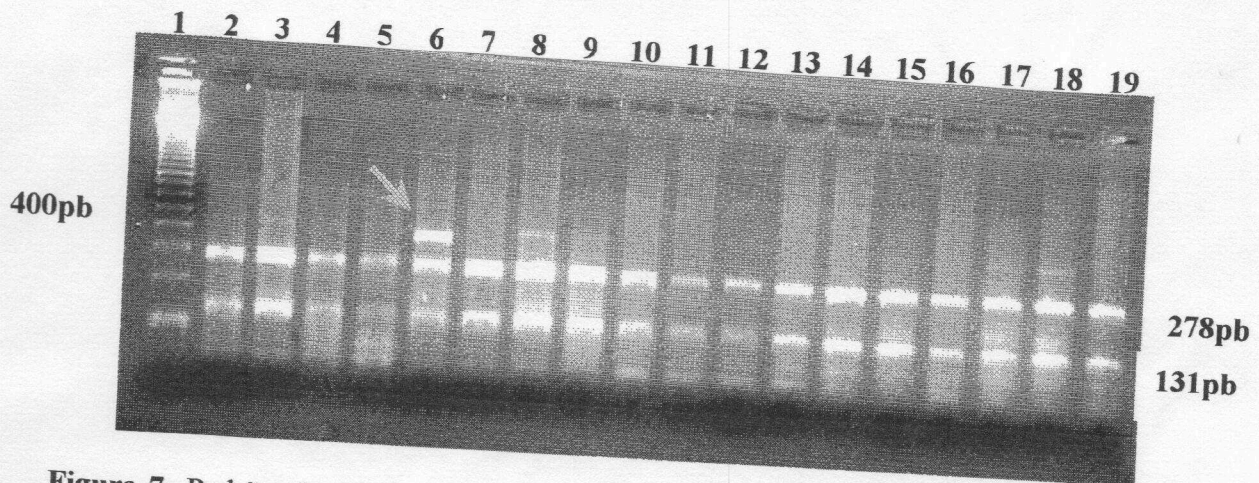


Figura 7: Padrão eletroforético de restrição enzimática com *HpyCH₄ IV*, em gel de agarose 1,5%. Na coluna 1, marcador de 100 pb. Nas colunas 2 a 5 e 7 a 19 padrão de indivíduos normais para a mutação, com bandas de 131 e 278 pb. Na coluna 6 padrão polimórfico de indivíduo heterozigoto. A seta aponta a banda contendo o alelo mutado.

Utilizando-se a técnica de restrição enzimática foram detectados 2 indivíduos heterozigotos e 48 normais, ambos pertencentes ao grupo dos portadores de neoplasias. Dos produtos amplificados dos mesmos pacientes foi realizado o LIS-SSCP, com objetivo de se obter os padrões normais e heterozigotos com essa técnica. No entanto a técnica de LIS-SSCP não mostrou resultados satisfatórios ao se correr o gel de poliacrilamida em temperatura ambiente, não ocorrendo separação precisa das bandas, não podendo dessa forma detectar a mutação (Figura 8)

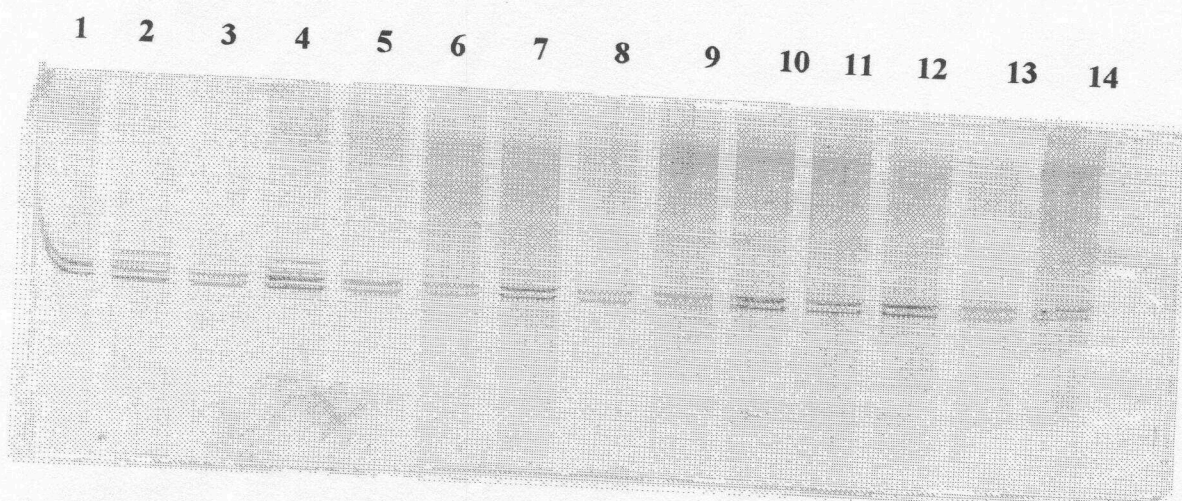


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando padrão de bandas no LIS-SSCP à temperatura ambiente.

Ao realizar o LIS-SSCP à temperatura de 4°C, houve uma separação melhor das bandas detectando-se assim, o padrão polimórfico do paciente heterozigoto detectado anteriormente por restrição enzimática (Figura 9).

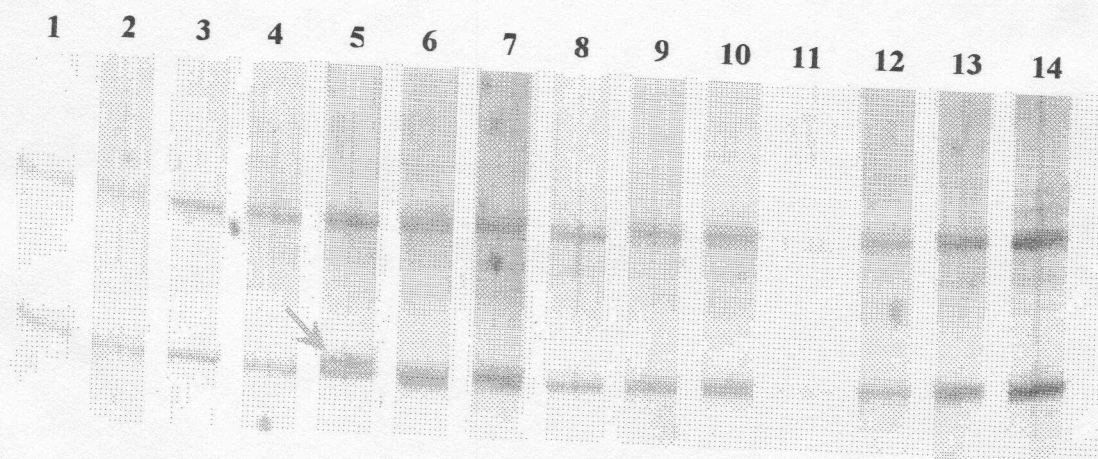


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% mostrando padrão polimórfico por LIS-SSCP. Nas colunas 1 a 4 e 6 a 14 são pacientes normais e na coluna 5 está o paciente heterozigoto, detectado anteriormente por restrição enzimática. A seta aponta a diferença encontrada entre as bandas dos normais e do heterozigoto.

As 20 amostras do grupo dos portadores de neoplasia que não foram submetidos à restrição enzimática, foram analisados por LIS-SSCP. Nesse grupo, dos 70 pacientes estudados foram encontrados 2 heterozigotos e 68 normais para a mutação estudada.

Com 70 amostras de pacientes do grupo controle, realizou-se somente o LIS-SSCP. Não foram encontrados indivíduos nem homozigotos nem heterozigotos para a mutação estudada.

Dentre essas amostras do grupo controle foi detectado no LIS-SSCP um padrão diferente de mutação, não correspondendo ao mesmo padrão confirmado pela restrição enzimática.

Provavelmente trata-se de outra mutação encontrada na região amplificada (Figura 10)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, mostrando padrão polimórfico detectado por LIS-SSCP. Nota-se que o padrão apontado pela seta não corresponde ao padrão detectado por LIS-SSCP e confirmado pela restrição enzimática, anteriormente.

Para confirmar que não se tratava da mesma mutação foi realizada a restrição enzimática, com objetivo de se confirmar essa hipótese. O padrão encontrado correspondia ao indivíduo normal para a mutação estudada (Figura 11)

Ao revisar artigos na literatura para que fosse possível identificar a mutação encontrada, não fora descrito ainda outra mutação além da estudada (IVS14G→A) no fragmento amplificado.

Torna-se necessário o sequenciamento do fragmento para que essa identificação seja realizada e posteriormente relacionada a deficiência da atividade a DPD.

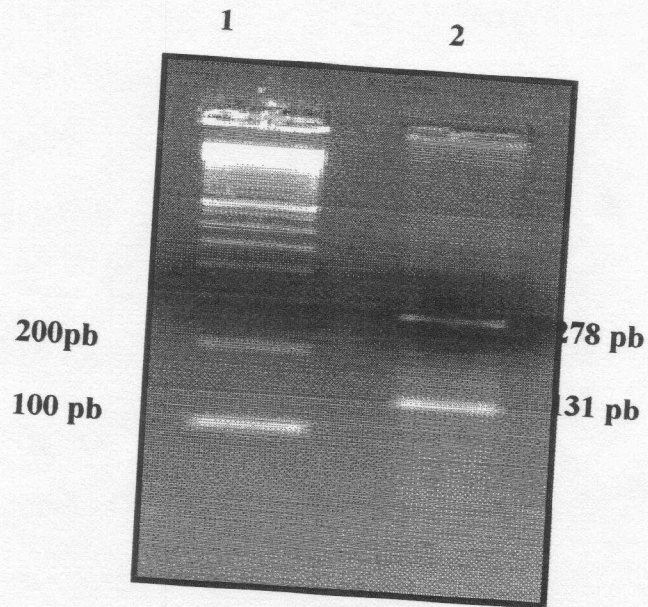


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1,5%, mostrando amostra submetida à restrição enzimática, com *Hpy* CH₄ IV. Na coluna 1, marcador de 100 pb, na coluna 2 a banda foi cortada em fragmentos de 131 e 278 pb, provando que se tratava de indivíduo normal para a mutação estudada.

Dos 140 indivíduos estudados, 138 (98,6%) são homozigotos normais, 02 (1,4%) são heterozigotos, sendo 99,3% a frequência do alelo normal e 0,7% a frequência do alelo mutante. A proporção encontrada está de acordo com estudos prévios feitos com a população holandesa, onde 1,8% dos indivíduos são heterozigotos.

Considerando a frequência do alelo mutante 0,7%, foi estimado o número de homozigotos recessivos na população, sendo 1/20.000. Comparando a frequência de doenças metabólicas como a fenilcetonúria (1/20.000), pode-se inferir que a prevalência da mutação IVS14+1G→A é alta. Considerando o uso comum do 5-FU na quimioterapia do câncer, torna-se de extrema importância o *screening* genético para verificar a presença da mutação em

pacientes antes do início do tratamento, dessa forma sintomas de toxicidade séria e fatal em pacientes homozigotos e heterozigotos podem ser prevenidas.

A análise dos prontuários dos 2 pacientes heterozigotos revelou em somente 1 deles sintomas de toxicidade relativa ao uso do 5-FU tais como náuseas, indisposição e diarréias. Esse fato pode ser explicado pelas diferenças nas doses recebidas entre os pacientes, assim como a falta de informações contidas nos prontuários. O que foi pesquisado foram somente os relatos dos pacientes anotados por médicos ou enfermeiros, não foram acessados exames de sangue para que fossem verificadas as taxas de células sanguíneas, ótimas indicadoras de deficiência da DPD.

Na análise dos 68 prontuários dos indivíduos que não apresentaram a mutação, três pacientes (4,4%) apresentaram sintomas adversos durante a quimioterapia. Isto prova que alelos diferentes do mesmo gene ou alelos de outros genes podem estar envolvidos com as reações farmacológicas sofridas pelos pacientes.

5) CONCLUSÕES

- Os primers DPDdelF1 e DPDdelR1 foram eficientes na amplificação do fragmento do gene da DPD pela PCR.
- A enzima de restrição *Hpy*CH₄ IV, substituiu de forma eficiente a enzima MaeII, sendo uma forma mais barata de genotipagem.
- O LIS-SSCP proporciona resultados eficazes quando feito à temperatura de -4°C, separando as bandas e facilitando a visualização da mutação.
- Uma nova mutação foi encontrada com base no LIS-SSCP e o sequenciamento do material genético do paciente onde foi encontrado este novo padrão de mutação, deve ser realizado com objetivo de definir qual o tipo de mutação e em que local se encontra para que, posteriormente, sejam feitas novas pesquisas afim de mostrar quais os efeitos dessa mutação.
- A técnica LIS-SSCP, por ser uma técnica rápida e de baixo custo, deve ser aplicada com objetivo de diagnosticar a mutação em pacientes com câncer antes do início da quimioterapia para que possa ser feito um regime de drogas ideal àqueles pacientes de maneira a evitar transtornos durante o tratamento.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKKEREN, J.A.; DE ABREU, R.A.; SENGERS, R.C.; GABREELS, F.J.; MAAS, J.M. e RENIER, W.O. (1984) Elevated urine, blood and cerebrospinal fluid levels of uracil and thymine in a child with Dihydrothymine Dehydrogenase deficiency. **Clin. Chim. Acta**, 140:270-256.
- BERGER, R.; STOCKER, D.E.; VRIES, A.S.; WADMAN, S.K.; DURAN, M.; BEEMER, F.A; BREE, P.K.; WEITS-BINNERTS, J.J.; PENDERS, T.J. e WOUDE, J.K. (1984) Dihidropirimidine dehydrogenase deficiency leading to thymine-uraciluria: an inborn error of pyrimidine metabolism. **Clin. Chim. Acta**; vol.141; pp.227-234.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER-INCa, COORDENADORIA DE PROGRAMAS DE CONTROLE DE CÂNCER (1997) **O Problema do Câncer no Brasil**. 4ª edição. Rio de Janeiro, INCa/ Pro-Onco. 59p.
- CANAL, P.; CHATELUT, E. e GUICHARD, S. (1998) Practical Treatment Guide for Dose Individualisation in Câncer Chemotherapy. **Drugs, Massachusetts,USA**; vol.56; n.6; pp.1019-1038.

- COLLIE-DUGUID, E.S.; ETIENNE, M.C.; MILANO, G. e McLEOAD, H.L. (2000). Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. **Pharmacogenetics**, 3: 217-223.
- DAHER, G.C.; HARRIS, B.E. e DIASIO, R.B. (1990) Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides. **Pharmacol. Ther.**, vol 48, pp 189-222.
- DANENBERG, K.; SALONGA, D. e PARK, J.M. (1998) Dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidilate synthase gene expressions identify a high percentage of colorectal tumors responding to 5-Fluorouracil. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol**, vol 17, pp 258.
- DIASIO, R.B. e HARRIS, B.E. (1989) Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. **Clin. Pharmacokinet**, vol 16, pp215-237.
- ETIENE, M.C.; CHERADAME, S. e FISCHER J.L. (1995) Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the rol of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. **J Clin Oncol**, vol 13, pp 1963-1970.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. (1998). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3^a ed., Brasília, EMBRAPA-CENARGEM. pp 24, 37 e 38.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R. C. e GELBART W.M. (1998) **Introdução à genética**. 6^a Edição, Edit. Guanabara Koogan. pp 400-401, 499.
- HEGGIE, G.D.; SOMMADOSSI, J-P.; CROSS, D.S.; HUSTER, W.J. e DIASIO, R.B. (1987) Clinical pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and its metabolism in plasma, urine and bile. **Cancer Res.**, 47:2203-2206.
- INNIS, M. A. & GELFAND, D. H. (1990). Optimization of PCR. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, Inc., San Diego, California 92101. Academic Press Limiteded, 24-28. pp 3-12.

- MARUYA, E.; SAJI, H. e YOKOYAMA, S. (1996) PCR-LIS-SSCP- A simple method for high-resolution Allele Typing of HLA-DRB1, and DQB1. **Genome Research**, 6 pp51-57.
- MILANO, G. & ETIENNE, M.C. (1996) Individualising Therapy With 5-Fluorouracil Related Do Dyidropirimidine Deydrogenase: Theory And Limits. **The Drug Monit.** 18. pp 335-340.
- MILANO, G.; ETIENNE, M. C.; PIERREFITE, V.; BARBERI-HEYOB, M.; DEPORTEFETY, R. e RENEE, N. (1999) Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. **Brit. J. Cancer**; vol.79; pp. 627-630.
- ORITA, M.; IWAHAANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K. e SEKIYA, T. (1989). Detection of polymorphism of humam DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86, pp 2766-2770.
- PASSAGLIA, L. M. P. & ZAHA, A. (1996). Técnicas de DNA Recombinante. **Biologia Molecular Básica**. Mercado Aberto Ltda. Porto alegre, R.S., p324.
- PIPER, A.A.; TATTERSALL, M.H.N. e FOX, R.M. (1980) The activities of thymine metabolizing enzymes during the cell cycle of a human lymphocyte cell line LA7-007 synchronizes by centrifugal elutriation. **Biochim, Biophys, Acta.** 633:400-409.
- INCA (Instituto Nacional do Câncer). Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-Serviço. 3^a ed. rev. Rio de Janeiro : INCA 1999. 304 p.
- RAMALHO, M., SANTOS, J.B., PINTO, C.B. (1994). **Genética na agropecuária**. 3^a Ed. Globo, São Paulo, p.233-241.
- SAIKI, R.K. & GELFAND, D.H. (1989). **Introducing ampliTaQ DNA polymerase**. Amplification. pp 4-6.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS. (1989). **Molecular Cloning: A Laboratorial Manual**. 2nd ed., vol.1, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring. New York, EUA

SILVA, E.R. (1998). **Análise da correlação genética entre o fator V de Leiden e o infarto do miocárdio**. Monografia. Universidade Federal de Uberlândia. 30p.

TUCHMAN, M.; STOECKELER, J.S.; KEANG, D.T.; ODEA, R.F.; RAMNARAINÉ, M.L. e MIRKIN, B.L (1985) Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. **New Eng. J. Med.**; vol.313; pp.245-249.

VAN GENNIP, A.H.; BUSCH, S.; ELZINGA, L.; STROOMER, A.E.M.; VAN CRUCHTEN, A.; SCHOLTEN, E.G. e ABELING, N.G.G.M. (1993). Application of simple chromatographic methods for the diagnosis of defects in pyrimidine degradation. **Clin. Chem.**, 39:380-385.

VAN KUILENBURG, A.B.P.; VREKEN, P. e ABELING, N.G.G.M. (1999) Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. **Hum. Genet.**; vol.104, pp.1-9.

WILLIAMS, J.F. (1989) Optimization strategies for the polymerase chain reaction. **Biotechniques**. Vol 7, pp 762-769.

ANEXO

Termo de Consentimento

O projeto farmacogenômica sobre drogas utilizadas na quimioterapia do câncer se realizará no Hospital do Câncer da Universidade Federal de Uberlândia e no Laboratório de Genética Molecular / Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

A equipe de desenvolvimento do projeto é composta pelo coordenador Dr. Luiz Ricardo Goulart - biólogo, Phd em Genética Molecular, Professor na UFU, Dr Rogério Agenor de Araújo, médico oncologista e professor na UFU, Mércia Pandolfo, farmacêutica, mestranda em Genética e Bioquímica na UFU, Lorraine Lemes Nascimento, graduanda em biologia na UFU.

Uma triagem farmacogenômica para drogas utilizadas no tratamento do câncer pode levar a identificação de uma população específica predisposta à toxicidade ou resposta deficiente à droga. Esta pesquisa tem como objetivo estudar o polimorfismo genético e expressão para enzimas diidropirimidina desidrogenase (DPYD) e a proteína P-glicoproteína (PGP), envolvidas na terapia do câncer.

Para isto serão colhidas amostras de pacientes com diagnóstico positivo para neoplasia que iniciarão quimioterapia e voluntários da comunidade em geral. As amostras serão obtidas a partir de sangue periférico com o sistema *vacutainer* no momento da punção de amostras sanguíneas do paciente para realização de seus exames periódico de controle, e então, serão feitas alíquotas para investigação, sem portanto, causar nenhum desconforto adicional ao paciente.

O material será enviado para o Laboratório de Genética Molecular para análise do DNA e o nível de expressão gênica.

O paciente terá direito de acessar os resultados dos exames realizados.

Os benefícios de um estudo farmacogenômico para o paciente consistem em fornecer, ao médico assistente, no momento da instalação da terapêutica, dados para tomada de decisão, que assegurem que somente o paciente com resposta favorável receba determinada terapia medicamentosa, conduzindo a uma melhor eficácia e aderência ao tratamento, minimizando os efeitos adversos e reduzindo os custos de gerenciamento da doença.

Os pacientes e voluntários que concordarem em participar desta pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelo presente termo apresentado por este documento, eu _____ concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos

Uberlândia, _____