

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

RENATA DE ALMEIDA ZIEGER

**ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GÊNICAS E DESENVOLVIMENTO DE
MUCOSITE BUCAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM OSTEOSSARCOMA
EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Porto Alegre

2021

RENATA DE ALMEIDA ZIEGER

**ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GÊNICAS E DESENVOLVIMENTO DE
MUCOSITE BUCAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM OSTEOSSARCOMA
EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica odontológica/estomatologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Manoela Domingues Martins

Coorientadora: Prof^a. Dra. Marina Siebert

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Zieger, Renata de Almeida
ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GÊNICAS E DESENVOLVIMENTO
DE MUCOSITE BUCAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
OSTEOSSARCOMA EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO / Renata de
Almeida Zieger. -- 2021.
94 f.
Orientadora: Manoela Domingues Martins.

Coorientadora: Marina Siebert.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa
de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2021.

1. Mucosite bucal. 2. Farmacogenética. 3.
Polimorfismos. 4. Variantes Gênicas. 5. Osteossarcoma.
I. Martins, Manoela Domingues, orient. II. Siebert,
Marina, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pela dádiva da oportunidade de cada dia no qual acordamos.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e investirem na minha educação desde muito cedo, por todas as remissas, por todo amor e toda dedicação. Eu nunca serei capaz de pôr em palavras todo o amor e gratidão que tenho por eles.

À minha família, meus avós que não estão mais aqui, mas que sempre vibraram com as minhas conquistas, que sempre apoiaram e acreditaram, minhas tias, tios e dindos, que servem como exemplo de dedicação e determinação, por vezes acreditarem em mim quando me faltou a fé, meus primos pelo exemplo de caráter, entusiasmo e amizade.

À minha orientadora, Manoela Domingues Martins, pela dedicação de incansável e por sempre estar disponível para de fato orientar, mostrar caminhos, estar presente. Em absolutamente todos os momentos em que eu encontrei dificuldades eu nunca estive sozinha, isso vai muito além de orientação, amizade, carinho e respeito, sou eternamente grata por tudo que tu representas na minha vida, tu és um exemplo e uma inspiração pra mim e pra tantos outros que te rodeiam, muito obrigada.

Ao Marco Antônio Trevizani Martins por ter me apresentado a Estomatologia lá nos rounds de Clínica II, por sempre ter sido tão solícito e ter me dado tantas oportunidades, e não somente na estomatologia, mas por toda amizade construída nesse caminho.

À Stéfanie Thieme e Luisa Comerlato Jardim pelo apoio durante a realização desse trabalho, e em tantos outros durante o percurso na UFRSG, pela amizade e força nos momentos difíceis, e pela disponibilidade em auxiliar.

À Mariana Rodrigues Bottom por me introduzir nesse mundo da Farmacogenética, por toda disponibilidade e paciência em ensinar, pelas reuniões, auxílios e explicações.

À minha co-orientadora Marina Siebert por aceitar o desafio da orientação, pelos conhecimentos compartilhados e troca de experiências.

Ao Luciano Guimarães por todo suporte e auxílio em toda análise estatística desse trabalho, pela disponibilidade e boa vontade.

À Marina Curra e Amanda de Farias Gabriel por toda atenção e cuidado com os pacientes oncológicos no Hospital de Clínicas, por toda troca de experiências e conhecimentos.

Aos “manoeletes”/WHOC grupo muito rico onde trocamos não somente experiências científicas, ideias e realização de trabalhos, mas também onde trocamos angústias e medos, além de comemorações.

Ao Guilherme Ferreira por toda paciência e suporte em todos os momentos, pelo cuidado e pelo acalento, por ser luz em dias escuros.

À Luna, minha companheira de quatro patas, que apesar de estar presente na minha vida a pouco tempo, é capaz de dar tanto amor, em meio a todos os olhares e carinho.

Aos meus amigos, aos que moram aqui e aos que moram longe, que compartilham os momentos de felicidade, trazendo luz e alegria para minha vida, assim como auxiliam nos momentos difíceis, dando força. Em especial à Amanda da Rosa Felix por ser meu porto seguro há 17 anos, por sempre acreditar em mim e me apoiar em absolutamente todos os momentos da minha vida.

À UFRGS e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia pela importante contribuição para a minha qualificação.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo financiamento e por proporcionar a realização dessa pesquisa e à CAPES pelo financiamento e bolsa.

Agradeço a todos que estiverem presentes de alguma forma, em especial a minha família e a minha orientadora, pelo apoio incondicional. Sozinha eu não teria conseguido. Nós trazemos conosco uma parte de todos que já passaram pelas nossas vidas, e todas essas pessoas ajudam a construir quem somos e quem queremos nos tornar.

Gratidão!

“Eu não sou o que me acontece.

Eu sou o que escolho me tornar.”

Carl Gustav Jung

RESUMO

ZIEGER, Renata de Almeida. 2012. **Associação de variantes gênicas e desenvolvimento de mucosite bucal em pacientes pediátricos com osteossarcoma em tratamento quimioterápico**. Dissertação (Pós Graduação em Odontologia - Clinicas Odontológicas - Estomatologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.

A mucosite bucal (MB) é um efeito adverso importante e frequente em pacientes pediátricos submetidos a protocolos de quimioterapia para tratamento de osteossarcoma (OS). Sua patobiologia é complexa e uma nova fronteira na predição de risco envolve o entendimento do impacto das variantes genéticas na tentativa de individualização do cuidado. O objetivo deste estudo foi analisar a associação entre variantes genéticas e a presença e gravidade de MB em pacientes pediátricos com OS em quimioterapia com utilização de metotrexato em altas doses (MTX-HD), doxorrubicina e cisplatina. Um estudo longitudinal observacional retrospectivo foi conduzido com pacientes de OS em tratamento quimioterápico. Os dados demográficos e as características do tratamento foram coletados. A MB foi avaliada diariamente pela escala da Organização Mundial da Saúde (OMS), do dia 1 ao dia 15. Amostras de sangue foram coletadas e o DNA foi extraído. As variantes genéticas foram avaliadas por sequenciamento de última geração (NGS) usando um painel de genes personalizado para análise de 20 genes e 61 variantes. A análise de enriquecimento das vias de ontologia gênica foi realizada usando GeneAnalytics™ e a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG). A análise estatística foi realizada no software SPSS, com valor de p de 0,05. Quatorze pacientes pediátricos submetidos a 161 ciclos de quimioterapia de quimioterapia foram avaliados. Os protocolos mais utilizados foram o MTX-HD (n=110; 66,7%), seguido de doxorrubicina + cisplatina (n=51; 30,9%). A MB foi detectada em 126 ciclos (78,2%), sendo a MB grau 1 observada em 32,5%; grau 2 em 49,2%; e grau 3 em 18,3%. A análise multivariada de ciclos MTX-HD mostrou que a presença de MB foi associada com *ABCA3* (rs13332514) (p <0,001) e *MTHFR* (rs1801133) (p=0,047) Em relação à gravidade da MB em geral, variantes dos genes da família ABC, especialmente *ABCC2* e *ABCC4* foram identificados em ambos os protocolos. A intersecção de

genes significativos associados à presença e severidade de MB aponta para o impacto de *ABCC2* e *ABCC6*. A análise do KEGG mostrou que *ABCC2* e *ABCC4* foram associados a diferentes vias ontogenéticas sendo que a via da resistência a antifolatos e da fosforilação mediada por CDK e a remoção das vias do Cdc6 parecem estar relacionadas à presença e gravidade da MO em ambos os protocolos de quimioterapia. Em conclusão, a variante *MTHFR* é importante para a presença de MO. A família do gene ABC, principalmente *ABCC2* e *ABCC4*, parece estar envolvida na presença e gravidade da MO em pacientes pediátricos com OS e em tratamento com MTX-HD, doxorubicina e cisplatina.

Palavras-chave: Mucosite. Farmacogenética. Polimorfismo Genético. Osteossarcoma. Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP.

ABSTRACT

ZIEGER, Renata de Almeida. 2012. **Association between genetic variants and development of oral mucositis in pediatric patients with osteosarcoma undergoing chemotherapy.** Dissertation (Postgraduate in Dentistry, Dental Clinics - Stomatology) – School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021

Oral mucositis (OM) is an important and frequent acute adverse effect in pediatric patients submitted to chemotherapy protocols to treat osteosarcoma (OS). Its pathobiology is complex and a new frontier in the risk prediction involves the understanding of the impact of genetic variants trying to personalize the medical care. The purpose of this study was to analyze the association between genetic variants and the presence and severity of OM in pediatric patients with OS undergoing chemotherapy with high-dose methotrexate (HDMTX), doxorubicin and cisplatin. A longitudinal observational retrospective study was conducted with OS patients undergoing chemotherapy. Demographic data and treatment characteristics were collected at baseline and follow-up visits. OM was daily graded by the World Health Organization (WHO) scale, from day 1 until day 15. Blood samples were collected, and DNA was extracted. Genetic variants were evaluated by next-generation sequencing (NGS) using a customized gene panel for analysis of 20 genes and 61 variants. Gene ontology pathways enrichment analysis were performed using GeneAnalytics™ and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Statistical analysis was performed using the SPSS software adopting a p-value of 0.05. Fourteen OS pediatric patients submitted to 161 chemotherapy cycles of chemotherapy were evaluated. The most used protocols were HDMTX (n = 110; 66.7%), followed by doxorubicin + cisplatin (n = 51; 30.9%). OM was diagnosed in 126 cycles (78.2%), being OM grade 1 observed in 32.5%; grade 2 in 49.2%; and grade 3 in 18.3%. Multivariate analysis of HDMTX cycles showed that OM presence was associated to *ABCA3* (rs13332514) (p<0.001) and *MTHFR* (rs1801133) (p=0.047). Regarding severity of OM in general, genetic variant of ABC family genes, specially *ABCC2* and *ABCC4* were identified in both protocols. The intersection of significant genes associated to presence and severity of OM appointed for the impact of *ABCC2* and *ABCC6*. The analysis of KEGG showed

that *ABCC2* and *ABCC4* were associated to different pathways. Antifolate resistance and CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6 pathways appears to be related to presence and severity of OM in both chemotherapy protocols. In conclusion, *MTHFR* variant is important for presence of OM. Interestingly, *ABC* gene family, mainly *ABCC2* and *ABCC4* seems to be involved in the presence and severity of OM in OS patients in treatment with HDMTX, doxorubicin and cisplatin.

Keywords: Mucositis. Pharmacogenetics. Polymorphism, Genetic. Osteosarcoma. ATP-Binding Cassette Transporters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Ilustrações da Introdução/Revisão de Literatura

Figura 1 – Aspecto clínico da MB de acordo com a classificação da OMS.....	27
Figura 2 – Esquema ilustrativa das 5 fases da patobiologia da mucosite bucal.....	28
Figura 3 – Mecanismo de ação do MTX. Transportadores e enzimas importantes no metabolismo do MTX e folato.....	34
Figura 4 – Esquema ilustrativo dos genes (e suas variantes) relacionados à toxicidade induzida pela quimioterapia no osteossarcoma.....	36

Lista de Ilustrações do Artigo

Figure 1 – Distribution of OM grades percentage according to the days of QT cycles. (A), QT cycles (B), in HDMTX cycles(C) and in doxorubicin+cisplatin QT cycles (D)...	50
Figure 2 – Venn diagram of the gene targets. Intersection of significant gene associated to OM presence and severity.....	52

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas da Introdução/Revisão de Literatura

Tabela 1 – Avaliação de mucosite bucal de acordo com sua severidade utilizando como base as escalas da OMS, NCI e RTOG.....	26
--	----

Lista de Tabelas do Artigo

Suppl Table 1 – Comparison between variants' genotypes and absence/presence of oral mucositis.....	53
Suppl Table 2 – Comparison between the genotype of genetic variants and the outcome oral mucositis severity.....	58
Table 1 – Analysis of the presence and severity of oral mucositis in osteosarcoma patients comparing the chemotherapy protocols (n=161 cycles)*.....	48
Table 2 – Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the outcome of presence of oral mucositis.....	65
Table 3 – Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the severity outcome of oral mucositis.....	64
Table 4 – Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the outcome of presence of oral mucositis, in HDMTX cycles.....	65
Table 5 – Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the severity of mucositis in HDMTX cycles.....	65
Table 6 – Gene ontogenic pathway enrichment analyses of gene association to presence and severity of OM in OS patients in HDMTX cycles.....	66
Table 7 – Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the severity of oral mucositis, in doxorubicin+cisplatin cycles.....	67
Table 8 – Gene ontogenic pathway enrichment analyses of gene association to presence and severity of OM in OS patients in doxorubicin + cisplatin cycles.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ABC</i>	<i>ATP-binding cassette</i>
<i>ABCA3</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 3</i>
<i>ABCB1</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1</i>
<i>ABCB4</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 4</i>
<i>ABCC1</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1</i>
<i>ABCC1-5</i>	<i>Multidrug Resistance Proteins 1–5</i>
<i>ABCC2</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2</i>
<i>ABCC3</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily C Member 3</i>
<i>ABCC4</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily C Member 4</i>
<i>ABCC5</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily C Member 5</i>
<i>ABCC6</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily C Member 6</i>
<i>ABCG2</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2</i>
<i>ALDH1A1</i>	<i>Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1</i>
<i>ALDH3A1</i>	<i>Aldehyde Dehydrogenase 3 Family Member A1</i>
<i>ALDHs</i>	<i>Aldeído desidrogenases</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosina trifosfato</i>
<i>BLM</i>	<i>RecQ Like Helicase</i>
<i>CAEE</i>	<i>Certificado de Apresentação de Apreciação Ética</i>
<i>CBR</i>	<i>Carbonyl Reductase</i>
<i>CPNPC</i>	<i>Câncer de pulmão de não pequenas células</i>
<i>CT</i>	<i>Chemotherapy</i>
<i>CTC</i>	<i>Critérios Comuns de Toxicidade</i>
<i>CYP</i>	<i>Citocromo P450</i>
<i>CYP2A6</i>	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily A Member 6</i>
<i>CYP2B6</i>	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily B Member 6</i>
<i>CYP2C19</i>	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 19</i>
<i>CYP2C8</i>	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 8</i>
<i>CYP2C9</i>	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 9</i>
<i>CYP3A4</i>	<i>Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4</i>
<i>CYP3A5</i>	<i>Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 5</i>
<i>DHFR</i>	<i>Dihidrofolatoredutase</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>ERCC2</i>	<i>Excision repair cross-complimentary group 2</i>
<i>FBM</i>	<i>Fotobiomodulação</i>
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>FPGS</i>	<i>Folypolyglutamate Synthase</i>
<i>GBTO</i>	<i>Grupo Brasileiro de Tratamento do Osteossarcoma</i>
<i>GCO</i>	<i>Global Cancer Observatory</i>
<i>GGO</i>	<i>Gamma-Glutamyl Hydrolase</i>
<i>GLATO</i>	<i>Grupo latinoamericano de tratamento de osteosarcoma</i>
<i>GLOBOCAN</i>	<i>Banco de dados Global Cancer Observatory</i>

GST	Glutathione S-transferase
GST	S-transferase
GSTA1	<i>Glutathione S-Transferase Alpha 1</i>
GSTM1	<i>Glutathione S-transferase M1</i>
GSTP1	<i>Glutathione S-Transferase Pi 1</i>
GSTT1	<i>Glutathione S-Transferase Theta 1</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
ISOO	<i>International Society for Oral Oncology</i>
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
MASCC	<i>Multinational Association of Supportive Care in Cancer</i>
MB	Mucosite bucal
miRNA	microRNA
MS	<i>Metionina Sintase</i>
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato reductase
MTHFD1	<i>Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase, Cyclohydrolase And Formyltetrahydrofolate Synthetase 1</i>
MTRR	<i>Metionina sintase redutase</i>
MTX	Metotrexato
HDMTX	<i>Metotrexato high dose</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF-K β	Fator nuclear kappa-B
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NC3C1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1</i>
OHIP	Programa de Educação e Prevenção em Saúde Bucal
OM	<i>Oral mucositis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBM	<i>Photobiomodulation</i>
PCFT	<i>Proton-coupled folate transporter</i>
PCR	Proteína c reativa
PET-CT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons
PGM	<i>Personal Genome Machine</i>
PR	<i>Prevalence ratios</i>
RARG	<i>Retinoic Acid Receptor Gamma</i>
RB	Proteína do retinoblastoma
RB1	<i>RB Transcriptional Corepressor 1</i>
RECQL2	<i>RecQ Like Helicase 2</i>
RECQL4	<i>RecQ Like Helicase 4</i>
RFC1	<i>Replication Factor C Subunit 1</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i>
SLC06A1	<i>Solute Carrier Family 6 Member 1</i>

SLC19A1	<i>Solute Carrier Family 19 Member 1</i>
SLC22A17	<i>Solute Carrier Family 22 Member 17</i>
SLC22A7	<i>Solute Carrier Family 22 Member 7</i>
SLC28A3	<i>Solute Carrier Family 28 Member 3</i>
SLC31A1	<i>Solute Carrier Family 31 Member 1</i>
SLC49A1	<i>Solute Carrier Family 49 Member 1</i>
SLCO1B1	<i>Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B1</i>
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SNVs	<i>Single nucleotide variants</i>
STROBE	<i>Reporting of Observational Studies in Epidemiology</i>
TCTH	<i>Transplante de células tronco hematopoiéticas</i>
TNF- α	<i>Fator de necrose tumoral α</i>
TS	<i>Thymidylate synthase</i>
TYMS	<i>Timidilato Sintetase</i>
UGT1A6	<i>UDP Glucuronosyltransferase Family 1 Member A6</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XRCC1	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 1</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
	2.1 OSTEOSSARCOMA.....	19
	2.2 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO	21
	2.3 MUCOSITE BUCAL	24
	2.4 FARMACOGENÉTICA.....	32
3. 3.	OBJETIVOS	39
	3.1 OBJETIVO GERAL	39
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	40
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXO I.....	88
	ANEXO II.....	92

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, em decorrência de sua magnitude social, econômica e epidemiológica (INCA, 2020; WHO, 2020). No Brasil, assim como nos países desenvolvidos, o câncer já representa a primeira causa de morte por doença entre crianças e adolescentes. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), a estimativa para o período de 2020 a 2022 no Brasil é de 8.460 novos casos de câncer por ano em crianças/adolescentes abaixo de 19 anos (INCA, 2020). De acordo com o levantamento de 2020 da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), estimou-se que 280 mil novos casos de câncer ocorreram no mundo na população de crianças e adolescentes (0-19 anos), sendo que, 108 mil mortes foram causadas pela doença antes dos 20 anos de idade (IARC, 2020). Dentre os tipos de tumores que mais afetam essa população estão: leucemias, neuroblastoma, tumor de Wilms, retinoblastoma, osteossarcoma e sarcomas (INCA, 2020; WHO, 2020).

O osteossarcoma é um câncer raro, porém é a neoplasia maligna óssea mais prevalente na população infantojuvenil, correspondendo de 3 a 5% de todas as neoplasias dessa faixa etária. A incidência mundial varia de 3 a 5 casos por milhão em homens e cerca de 2 a 4 casos por milhão em mulheres, totalizando cerca de 2% dos cânceres em crianças e menos de 1% em adultos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). É mais frequente no sexo masculino e costuma afetar com maior frequência os ossos longos em região de metáfise. A maioria dos casos se apresenta de forma localizada ao diagnóstico, porém, quando há metástase, o principal sítio afetado são os pulmões (WANG; GEBHARDT; RAINUSSO, 2017; INCA, 2018).

O tratamento do osteosarcoma geralmente envolve um esquema de quimioterapia neoadjuvante com as 3 drogas mais eficazes para esta doença (cisplatina, doxorrubicina e metotrexato (MTX)), associado à ressecção cirúrgica da lesão. Na sequência utilizam quimioterapia adjuvante utilizando as mesmas drogas (PAIXÃO *et al.*, 2016). O tratamento quimioterápico tem sido associado a vários efeitos adversos dentre os quais vômito, diarreia, toxicidade hepática, dermatites,

mielossupressão e mucosite bucal (MB) (BEZINELLI *et al.*, 2014; LIU, *et al.*, 2017; RUHLE *et al.*, 2018; SHOUVAL *et al.*, 2019; CURRA *et al.*, 2021).

A MB é uma reação inflamatória tóxica à terapia antineoplásica e se manifesta como eritema ou ulcerações em vários graus de intensidade, podendo ser exacerbadas por fatores locais, acompanhadas ou não de desconforto bucal (MAZHARI, SHIRAZI, SHABZENDEHDAR, 2018; HONG *et al.*, 2019; VILLA & SONIS, 2020). A prevalência de MB varia na literatura sendo reportados no grupo pediátrico valores que vão desde 20% a 80,4% (ÇAKMAK & NURAL, 2018; MAZHARI, SHIRAZI, SHABZENDEHDAR, 2018; de FARIAS GABRIEL *et al.*, 2021). A MB pode levar a modificações no tratamento, podendo inclusive levar a interrupção do tratamento quimioterápico, provocando um impacto negativo na sobrevida do paciente. Este fato também poderá elevar significativamente os custos de tratamento, levando a necessidade substancial da utilização de recursos financeiros, além de prolongar o tempo de internação dos pacientes (SHOUVAL *et al.*, 2019; RODRIGUES-OLIVEIRA, *et al.*, 2021, CURRA *et al.*, 2021).

Alguns fatores de risco para a ocorrência da MB já foram descritos na literatura, sendo eles: agentes quimioterápicos (como, por exemplo, o MTX em altas doses, ciclofosfamida, doxorubicina, cisplatina, daunorrubicina, citarabina e etoposide); doença de base e fatores individuais específicos (baixo peso corporal, nível de ansiedade, náusea/vômitos); parâmetros hematológicos e renais (neutropenia, contagem de células brancas $<9.500/\text{mm}^3$, baixa contagem de linfócitos em pacientes com tumores sólidos, alterações nos níveis de plaquetas, altos níveis de bilirrubina total e indireta e de creatinina); perfil genético e biomarcadores; e fatores da microbiota oral (vírus Herpes simplex positivo, cândida oral ssp e infecções bacterianas) (de FARIAS GABRIEL *et al.*, 2021). Mais recentemente, alguns autores têm associado à incidência de MB a presença de variação na expressão de genes relacionados ao metabolismo de fármacos (MARTINS; WAGNER; LINDEN, 2013; CAMPBELL *et al.*, 2016; OOSTEROM *et al.*, 2018; GONG *et al.*, 2021; VIANA-FILHO *et al.*, 2021). Foi evidenciado, em relação a inúmeros agentes citotóxicos utilizados no tratamento antineoplásico, que variantes em genes que codificam enzimas envolvidas em seu metabolismo estão associadas à superexposição sanguínea ao fármaco, elevando o risco de toxicidade. A genotipagem desses genes e variantes genéticas pode ser uma importante estratégia para prever a resposta individual à terapia medicamentosa,

prevenir efeitos colaterais e predizer a eficácia do tratamento (LUETKE et al., 2014; LIU et al., 2017; GUTIERREZ-CAMINO et al., 2018). Dessa forma, a farmacogenética desempenha um papel importante no tratamento do câncer através de estudos de eficácia e segurança dos quimioterápicos, podendo atuar de maneira individualizada no manejo medicamentoso. Porém, poucos estudos foram realizados analisando variantes gênicas e toxicidades, como a MB, especialmente em pacientes pediátricos com osteossarcoma.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura abrangerá os assuntos estudados nesta dissertação. Para maior compreensão e organização, a revisão da literatura foi dividida nos seguintes tópicos: osteossarcoma; tratamento quimioterápico em osteossarcomas; mucosite bucal e farmacogenética.

2.1 OSTEOSSARCOMA

O osteossarcoma é definido como um tumor maligno, de origem mesenquimal que produz tecido ósseo ou matriz osteoide e representa a neoplasia óssea maligna mais prevalente na população infantojuvenil, correspondendo de 3 a 5% de todas as neoplasias dessa faixa etária (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

O osteossarcoma possui uma distribuição etária bimodal, com um pico de incidência na segunda década de vida e outro em idosos. É mais frequente no sexo masculino, chegando a quase 2 homens acometidos para cada mulher com o tumor, e costuma afetar com maior frequência os ossos longos em região de metáfise, pois é o local de maior crescimento ósseo. Manifesta-se geralmente de forma localizada, porém, existem casos com metástases para pulmões e outros ossos (CASTRO, 2014; INCA, 2018; WANG; GEBHARDT; RAINUSSO, 2017).

A etiologia do osteossarcoma é complexa e não totalmente compreendida, estudos indicam que pode haver um componente genético associado a fatores ambientais desencadeantes, a presença de síndromes hereditárias de predisposição ao câncer, como síndrome de Li-Fraumeni (com inativação da p53, uma proteína importante da regulação da proliferação celular), síndrome do retinoblastoma hereditário (causado por mutações do gene *RB* e *RB1*, responsável pela regulação da fase S do ciclo celular), síndrome de Bloom (mutação no gene *BLM* que codifica a proteína DNA helicase), síndrome de Rothman-Thomas (defeito do gene *RECQL4*), síndrome de Werner (defeito do gene *RECQL2*) ou anormalidades na enzima DNA helicase têm sido considerados fatores de risco para a doença (LUETKE *et al.*, 2014; WANG; GEBHARDT; RAINUSSO, 2017). Em relação ao fator ambiental, frequentemente é associado a exposição à radiação ionizante, como acontece, por exemplo, no tratamento de pacientes com sarcoma de Ewing (BURNINGHAM *et al.*,

2012). Em relação à etnia, uma maior taxa de incidência do diagnóstico é registrada entre os jovens de origem africana, visto pelos resultados de pesquisas conduzidas na Nigéria, Uganda e Sudão, sugerindo predisposições raciais ao osteossarcoma (SADYKOVA, 2020).

O osteossarcoma pode ser classificado como primário ou secundário, sendo o secundário originado de um tumor pré-existente que sofre o processo de metástase para os ossos, um quadro mais frequente do que tumores ósseos primários. O diagnóstico é realizado preferencialmente por exames de imagem diante de um quadro sugestivo, sendo a radiografia o principal exame utilizado para indicação do diagnóstico. Outros exames de imagem devem ser solicitados após a radiografia sugestiva de osteossarcoma, sendo os mais utilizados a ressonância magnética, tomografia computadorizada, a cintilografia óssea e a Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET-CT), que auxiliam na investigação de metástases locais ou à distância (INCA, 2018; WANG; GEBHARDT; RAINUSSO, 2017).

Na microscopia, o osteossarcoma pode ser classificado entre os graus alto, intermediário e baixo de diferenciação. Esse grau de diferenciação indica o tipo de evolução esperada e como o tumor pode se comportar no que diz respeito à invasão dos tecidos vizinhos, além de auxiliar no estabelecimento do tipo de abordagem terapêutica a ser utilizada. No osteossarcoma de alto grau verifica-se um crescimento mais rápido e este é o subtipo normalmente encontrado nas crianças e jovens. Os osteosarcomas de grau intermediário são tumores incomuns, que ficam entre os tumores classificados como de alto e de baixo grau de diferenciação (UNNI; INWARDS *et al.*, 2010).

O estadiamento da doença se dá, principalmente, pela escala de Enneking, a qual analisa 3 variáveis: grau, extensão e presença de metástases. Os osteossarcomas de estágio I são considerados de baixo grau, com uma menor chance de metástase e um prognóstico melhor, enquanto o de estágio II encontram-se os tumores de alto grau. Quando a metástase é observada, o tumor é classificado como grau III, indicando um pior prognóstico (ENNEKING; SPANIER; GOODMAN, 1980; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Geralmente o osteossarcoma é assintomático, tendo a sua manifestação clínica associada com quadros mais avançados e agressivos. O sintoma mais

frequente é dor local, podendo estar associado a um aumento de volume. A progressão da doença pode estar acompanhada de perda de peso, dificuldade de locomoção, fraturas patológicas, febre e interrupção das atividades diárias (INCA, 2018).

O prognóstico depende de muitos fatores, como por exemplo, localização do tumor, idade do paciente e se há presença de metástase (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). Os principais fatores que pioram o prognóstico do paciente frente à doença são a presença de metástases e de grandes volumes de tumor (SMELAND, 2019).

2.2 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

O tratamento do osteossarcoma é composto por cirurgia e quimioterapia multimodal sistêmica neoadjuvante e adjuvante. A incorporação da quimioterapia adjuvante após a ressecção do tumor foi implementada na década de 1970 e melhorou a sobrevida geral em 10 anos de 30% para cerca de 50% devido ao controle das micrometástases (LUETKE, 2014; JAFFE, 2014; BERNER; JOHANNESSEN; BERNER, 2015). Em 1980, a incorporação de quimioterapia neoadjuvante, com o objetivo de alcançar uma melhor ressecção cirúrgica inclusive para procedimentos de salvamento de membro com melhor resultado funcional em longo prazo, se tornaram frequente nos cuidados dos pacientes com osteossarcoma (ROSEN *et al.*, 1982).

Os agentes quimioterápicos mais eficazes no tratamento do osteossarcoma são o MTX em altas doses, a doxorrubicina e a cisplatina (BISHOP; JANEWAY; GORLICK, 2016; CURRA *et al.*, 2021). De acordo com o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento do Osteossarcoma (GBTO) e do Grupo Latino-Americano de Tratamento de Osteossarcoma (GLATO) estas 3 drogas compreendem a 1ª linha de tratamento, tanto para doença localizada quanto metastática. Um aspecto que este grupo está avaliando é se o acréscimo de ciclofosfamida e MTX (ambos via oral) contribuirá para a melhora dos resultados. A 2ª linha de tratamento consiste no uso de ifosfamida associada ao etoposide. Essas terapias são eficazes para o osteossarcoma desde que associadas a ressecção cirúrgica da lesão (TA *et al.*, 2009; SAYLORS *et al.*, 2001; PAIXÃO *et al.*, 2016).

O mecanismo fundamental da quimioterapia é a inibição não-seletiva da proliferação celular, isto porque a maior parte dos alvos moleculares sobre os quais os quimioterápicos atuam estão também presentes em células não-tumorais, de forma que esses agentes apresentam baixa ou nenhuma seletividade (RUHLE *et al*, 2018). Esses fármacos exibem, em geral, estreitas janelas terapêuticas, o que significa que as diferenças entre as doses que produzem o efeito antitumoral e as que causam toxicidade são muito pequenas. Em virtude disso, a quimioterapia tem sido associada a uma série de efeitos adversos que podem levar à alteração ou interrupção do tratamento quimioterápico provocando redução da qualidade de vida e/ou da sobrevida do paciente, além de provocar um aumento no tempo de permanência do paciente em ambiente hospitalar. Estes efeitos adversos incluem vômito, diarreia, toxicidade hepática, dermatites, MB e mielossupressão. Por vezes, severa toxicidade é observada após o uso de doses necessárias para a obtenção dos efeitos terapêuticos (haLLI *et al.*, 2014; LIU, *et al.*, 2017; RUHLE *et al.*, 2018; SHOUVAL *et al.*, 2019; CURRA *et al.*, 2021).

O MTX é um antifolato clássico e um dos agentes citostáticos antimetabólitos mais estudados e utilizados. Ele foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1953 para ser utilizado no tratamento oncológico (JAFFÉ; KAUSHANSKY, 2008). O MTX é um potente inibidor da diidrofolato redutase (DHFR), que, por sua vez, irá converter o diidrofolato no composto ativo tetraidrofolato. Concomitantemente, as formas poliglutamadas metabolizadas do MTX irão inibir outras enzimas importantes do metabolismo do folato como, por exemplo, a timidilato sintetase (TYMS), acarretando como efeito final a inibição da síntese de RNA e de DNA (AUNG *et al.*, 2002). O MTX atua na fase S do ciclo celular, fase em que ocorre a duplicação do DNA e a síntese de histonas. Dessa forma, seu efeito imediato é a interrupção da síntese de DNA, resultando na morte celular das células que estejam nessa fase do ciclo (MARQUES, 2009).

O MTX possui uma ampla aplicação clínica, é utilizado no tratamento de osteossarcoma desde a década de 70, pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros fármacos (OTTAVIANI; JAFFE, 2009). O seu amplo uso terapêutico é obtido através da regulação da dose do medicamento conforme a doença em questão, sendo que este fármaco pode ser usado tanto em baixas como em altas doses. Apesar de sua comprovada eficácia terapêutica, o MTX está fortemente associado a efeitos

adversos, dentre os quais se destacam: MB, elevação das enzimas hepáticas, efeitos colaterais gastrointestinais, neurotoxicidade, toxicidade hematológica ou até óbito (FENG; XIE, 2016; GERVASINI; MOTA-ZAMORANO, 2019). Apesar da causa do aparecimento desses efeitos adversos não estar totalmente elucidada (STENZEL *et al.*, 2010), alterações na eliminação desse fármaco levam ao acúmulo de altas concentrações plasmáticas em tempos prolongados, o que pode ocasionar o agravamento do desenvolvimento de efeitos adversos (OOSTEROM *et al.*, 2018; EDELLIN-GARIBAY *et al.*, 2020). Alguns estudos buscam associar a relação de algumas variantes genéticas com a eficácia terapêutica e com os efeitos adversos do MTX, como por exemplo da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (YANG; HU; XU *et al.*, 2012).

A doxorrubicina é um agente antitumoral da família das Antraciclinas utilizado em mais da metade dos protocolos de tratamento do câncer infantil. Ela teve sua eficácia no tratamento do osteossarcoma comprovada ainda na década de 60. É um antibiótico que age por meio da inibição da enzima topoisomerase II, causando ruptura dos filamentos simples e duplos da fita de DNA. Consequentemente, haverá inibição da replicação, promovendo efeitos citotóxicos e gerando radicais livres (DENARD; LEE; YE *et al.*, 2012; JAFFE; PURI; GELDERBLOM, 2013). A doxorrubicina normalmente é utilizada na forma intravenosa em doses que variam de 60 a 90 mg/m² podendo ser administrada de forma isolada ou em combinação com outros fármacos (DÁVIDA *et al.* 2007; JAFFE; PURI; GELDERBLOM, 2013). Além dos efeitos antitumorais, ela potencializa a ação da radioterapia. Entretanto, esse medicamento também possui efeitos adversos, como náuseas, vômitos, perda capilar, disfunção hepática e cardiotoxicidade, podendo até causar falência cardíaca (JAFFE; PURI; GELDERBLOM, 2013). Esse medicamento é utilizado geralmente em combinação com outros fármacos devido à resistência dos tumores ao medicamento (OUYANG *et al.* 2013).

A cisplatina, ou cis-[diamindicloridoplatina-(II)], foi o primeiro complexo inorgânico utilizado na clínica no tratamento do câncer. É um agente antitumoral que interage com o DNA ativando vias de sinalização citoplasmáticas e nucleares envolvidas na regulação do ciclo celular, reparo do dano e morte celular programada. A cisplatina após administrada entra na célula por difusão passiva, sofre hidrólise e se liga ao DNA (CEPEDA *et al.*, 2007; PENG *et al.*, 2017). Começou a ser usada no

tratamento do osteossarcoma na década de 70, atuando através da platinação do DNA, impedindo que novas sínteses de cópias de DNA sejam feitas, causando assim, um bloqueio no processo de transcrição. Quanto as vias de administração podem ser via intravenosa, intra-arterial ou intraperitoneal (DÁVIDA, 2007; JAFFE; PURI; GELDERBLOM, 2013). Assim como as outras drogas, o uso da cisplatina acarreta efeitos adversos como: toxicidade renal, ototoxicidade, náuseas, vômitos e neuropatia periférica, além de supressão medular, levando ao desenvolvimento de anemia hemolítica, convulsões e anormalidades cardíacas em alguns pacientes (DÁVIDA, 2007).

Além dos fármacos mais utilizados, um dos medicamentos utilizados como complementares é a ciclofosfamida, que é mais utilizada no tratamento de linfomas, leucemia, neuroblastoma, retinoblastoma, mas também em tumores sólidos da infância, como osteossarcoma, sarcoma de Ewing, rabdomiossarcoma e meduloblastoma e requer ativação através de enzimas do citocromo P450 (CYP) para atuar como agente alquilante (ROY *et al.*, 1999; ELZAGALLAAI; CARLETON; RIEDER, 2021). É uma das drogas antineoplásicas mais antigas, que além dos efeitos antimetabólicos e anti-replicativos, a ciclofosfamida tem propriedades imunossupressoras e imunomoduladoras (AHLMANN; HEMPEL, 2016). Os efeitos colaterais mais importantes são leucopenia, trombocitopenia, anemia, toxicidade da bexiga e do coração, sendo todos esses efeitos adversos altamente dose-dependentes (AHLMANN; HEMPEL, 2016; CANDEIAS; GAIPPL, 2016).

2.3 MUCOSITE BUCAL

Dentre os eventos adversos que podem ocorrer em função do tratamento quimioterápico, a MB é um desfecho importante, pois causa grande impacto na qualidade de vida dos pacientes pediátricos (SHOUVAL *et al.*, 2019; CURRA *et al.*, 2021). Ela é caracterizada como uma reação inflamatória tóxica em resposta à terapia antineoplásica (quimioterapia e radioterapia em cabeça e pescoço). No caso da mucosite quimio-induzida, as lesões costumam aparecer de 3 a 7 dias depois do início do tratamento e duram por volta de 3 semanas (VILLA & SONIS, 2020).

Clinicamente, a MB se manifesta como eritema ou ulcerações em vários graus de intensidade, as quais podem ser exacerbadas por fatores locais. Essas lesões afetam toda a mucosa do trato gastrointestinal e são normalmente acompanhadas de intensa sintomatologia dolorosa. O local de maior acometimento da mucosite, na cavidade bucal, são as superfícies não ceratinizadas (mucosa jugal, palato mole, assoalho, ventre e bordas da língua) (MAZHARI, SHIRAZI, SHABZENDEHDAR, 2018; HONG *et al.*, 2019).

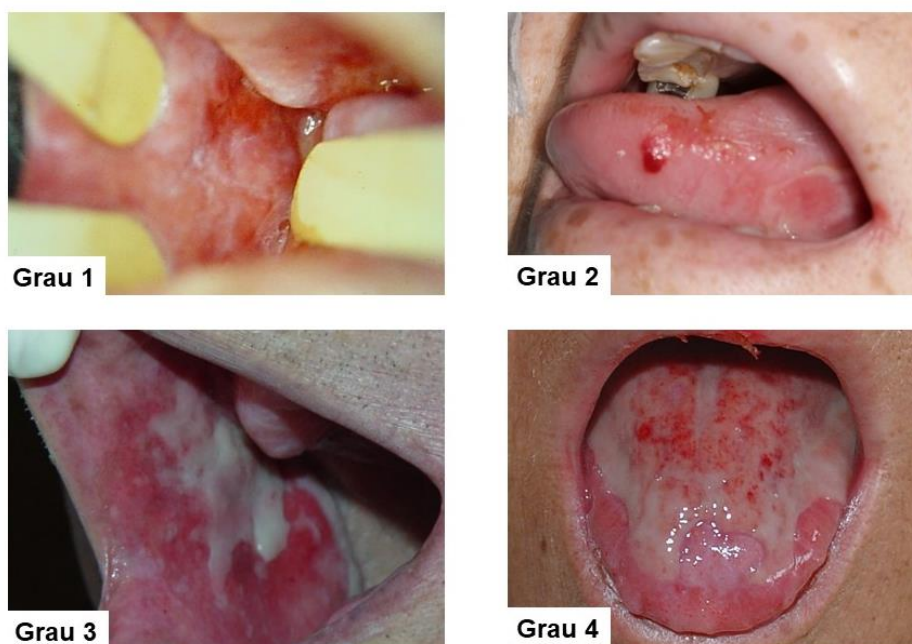
Na literatura estão disponíveis diversas escalas para avaliação das manifestações clínicas da MB, sendo as mais utilizadas as da Organização Mundial da Saúde (OMS), do *National Cancer Institute* (NCI) e do *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) (Tabela 1). O sistema de graduação mais utilizado para a avaliação clínica da MB é o critério de toxicidade aguda da OMS (do inglês, *WHO – World Health Organization*), o qual considera critérios objetivos e subjetivos envolvendo o estado físico e nutricional do paciente, assim como o aspecto clínico da boca (Figura 1) (PARULEKAR *et al.*, 1998). De acordo com esta classificação, a MB varia do grau 0 ao grau 4 conforme descrito a seguir: 0 – ausência de alterações na mucosa; 1 – inflamação e eritema; 2 – eritema e ulceração (o paciente consegue engolir sólidos); 3 – ulceração (o paciente pode apenas ingerir líquidos) e 4 – não é possível se alimentar pela boca (Tabela 2 e Figura 2).

A escala desenvolvida pelo NCI também considera aspectos clínicos e nutricionais dos pacientes. O NCI criou os critérios comuns de toxicidade (CTC, do inglês *Common Toxicity Criteria*) para ajudar no reconhecimento e na classificação da gravidade dos efeitos adversos causados pelos tratamentos quimioterápicos. Segundo essa escala, a MB é dividida do grau 0 a 5. Já o RTOG desenvolveu uma escala para avaliação de MB desenvolvida a partir do tratamento radioterápico. Esta classificação é baseada em alterações anatômicas (tamanho e características da ulceração) da mucosa bucal.

Tabela 1- Avaliação de mucosite bucal de acordo com sua severidade utilizando como base as escalas da OMS, NCI e RTOG.

Grau de mucosite	OMS	NCI	RTOG
0	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
1	Eritema, lesões assintomáticas	Úlceras assintomáticas, eritema, leve dor na ausência de lesões	Irritação, pode ter ligeira dor, não necessitando de analgésico
2	Eritema, úlceras, pode ingerir sólido	Eritema doloroso, edema ou úlceras, alimentação possível	Mucosite irregular, pode produzir secreção de serosa e sangue, dor moderada exigindo analgesia
3	Eritema, úlceras, só pode ingerir líquidos	Eritema doloroso, edema ou úlceras que requerem hidratação	Úlceras confluentes, mucosite fibrinosa, dor intensa que exige narcótico
4	Úlceras confluentes, alimentação não é possível	Ulceração grave ou com necessidade de suporte nutricional parenteral ou enteral ou intubação profilática	Ulceração, hemorragia e necrose
5	-	Morte relacionada à toxicidade	-

Figura 1. Aspecto clínico da MB de acordo com a classificação da OMS.



Fonte: Arquivo pessoal dos autores.

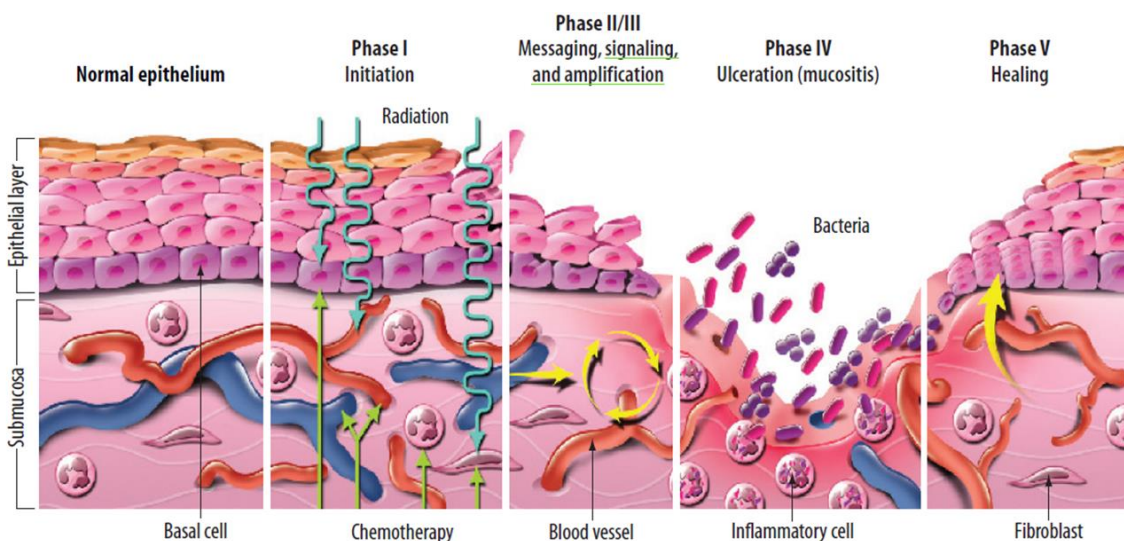
Os mecanismos exatos através dos quais as drogas quimioterápicas citotóxicas provocam a mucosite não foram completamente elucidados. Sonis e colaboradores (1998 e 2004) foram os primeiros a estudar a patobiologia da mucosite. A patobiologia da MB envolve um modelo composto por 5 fases dinâmicas: 1 – iniciação; 2 – resposta inicial ao dano primário; 3 – amplificação da sinalização; 4 – ulceração; 5 – cicatrização/cura (Figura 2). Nos casos de MB induzida por quimioterápicos, o processo de reparo usualmente ocorre entre o 14º e 21º dia após o início do tratamento. Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda estão sendo desvendados e, nas últimas décadas, novas contribuições incorporadas (SONIS, 2004; SONIS; VILLA, 2018; BOCKEL *et al.*, 2018).

O estágio de iniciação (fase 1) ocorre logo após a exposição à quimioterapia ou radioterapia, onde o dano causado pelos agentes antineoplásicos ao DNA das células gera um estresse oxidativo com a liberação de espécies reativas de oxigênio, desencadeando uma cascata de eventos biológicos e imunológicos que causa apoptose celular, além de danos ao tecido conjuntivo. (BOCKEL *et al.*, 2018; SONIS, 2004). Já na fase 2, há a resposta ao dano primário com ativação de fatores de

transcrição (NF- κ B) e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), que estimulam enzimas que irão desencadear a apoptose e bloquear o mecanismo de crescimento e diferenciação celular, por fim, resultando na morte de células epiteliais (SONIS, 2004).

Na fase 3 (amplificação de sinal), ocorre a ativação de fatores de transcrição que guiam a regulação ascendente dos genes e modulam a resposta ao dano. A produção de citocinas pró-inflamatórias ocorre nessa fase vindo a causar agressões adicionais ao que amplificam o dano iniciado pela radiação ou agente quimioterápico (SONIS, 2004; LOGAN, *et al.*, 2007). A fase ulcerativa, ou fase 4, é a mais significativa do ponto de vista clínico, pois a perda da integridade da mucosa resulta em lesões dolorosas e passíveis de colonização bacteriana. No caso de pacientes neutropênicos, essa ruptura da mucosa serve como porta de entrada para diversos microorganismos que podem levar a bacteremia e sepse. A fase de cura/cicatrização (fase 5) na maioria dos casos ocorre de forma espontânea e cerca de 2 a 3 semanas após o término da radioterapia ou por três semanas após administração de quimioterapia (SONIS, 2004; KWON, 2016).

Figura 2. Esquema ilustrativa das 5 fases da patobiologia da mucosite bucal.



Fonte: SONIS (2004)

A manifestação de todos os estágios não ocorre obrigatoriamente em todos os casos, sendo assim, uma mucosite branda com poucos danos à mucosa, que possua rápida recuperação e proliferação epitelial pode evitar a ocorrência da fase

ulcerativa, que é a mais sintomática e danosa (SONIS 1998 e 2004). A prevalência de MB varia de acordo com a literatura, podendo variar de 20% a 80,4% nos pacientes que fazem tratamento quimioterápico (ÇAKMAK & NURAL, 2018; MAZHARI, SHIRAZI, SHABZENDEHDAR, 2018; de FARIAS GABRIEL *et al.*, 2021).

A ocorrência da MB pode estar relacionada principalmente aos agentes quimioterápicos, mas também à doença de base, peso, parâmetros hematológicos e renais, perfil genético e biomarcadores, entre outros. (de FARIAS GABRIEL *et al.*, 2021). Os pacientes jovens estão em renovação celular constante, o que acarreta um maior risco para MB, embora essas lesões também cicatrizem com maior rapidez nestes pacientes (HARADA *et al.*, 2016).

Alguns autores têm associado a incidência de MB à variação na expressão de genes relacionados ao metabolismo de fármacos (MARTINS; WAGNER; LINDEN, 2013). Foi evidenciado, em relação a inúmeros agentes citotóxicos, utilizados no tratamento antineoplásico, que variantes em genes que codificam enzimas envolvidas em seu metabolismo estão associadas à superexposição sanguínea ao fármaco, elevando o risco de toxicidade. A genotipagem desses genes antes do tratamento é uma importante estratégia para prever a resposta individual à terapia medicamentosa e prevenir efeitos colaterais (BOUVET *et al.*, 2020). Alguns estudos vem sendo realizados buscando pesquisar esses biomarcadores e perfil genético, dentre as alterações encontradas pode-se salientar o gene *ABCB1* que codifica uma proteína responsável pelo fluxo de vários agentes quimioterápicos em neoplasias malignas, o gene *ABCC4*, gene transportador que codifica uma proteína associada à resistência a vários medicamentos e auxilia na eliminação de drogas quimioterápicas, como o MTX e o gene *XRCC1* que é responsável por reparar danos ao DNA causados por oxigênio ativo, ionização e agentes alquilantes, como fatores de risco a MB (de FARIAS GABRIEL *et al.*, 2021).

A MB pode levar a modificações no tratamento do paciente, podendo, inclusive, causar sua interrupção. A severidade de MB pode ocasionar desnutrição grave, fadiga, perda de massa muscular e função imunológica prejudicada (ARAÚJO *et al.*, 2015; HARADA *et al.*, 2016; SHOUVAL *et al.*, 2019; OTMANI; HATTAD, 2021). Além disso, a severidade da MB também está relacionada a onerar os custos de tratamento do paciente, devido ao aumento da necessidade de utilização de recursos

financeiros e ampliação do tempo de internação (SHOUVAL *et al.*, 2019; RODRIGUES-OLIVEIRA, *et al.*, 2021)

Otmani e Hattad (2021) avaliaram o impacto da MB na nutrição e desempenho de pacientes pediátricos em tratamento quimioterápico para neoplasias malignas e encontraram como resultados que mais de 80% dos pacientes tiveram grande perda de peso durante o período de mucosite em comparação com o período anterior à mucosite, além de outros sintomas como perda de apetite (60,7%), vômitos (28,3%) e diarreia (10,9%). Mudanças hematológicas estiveram presentes em 86,9% dos casos: anemia (84,8%), trombocitopenia (67,4%) e neutropenia (65,2%). Em relação à nutrição, o estudo mostrou que 71,7% das crianças com mucosite apresentaram desnutrição, sendo 47,8% desnutrição grave a moderada. O acompanhamento mostrou que os pacientes com MB precisavam de internação hospitalar em 84,8% dos casos, gerando um atraso no tratamento quimioterápico (71,7%), levando ao uso de opioides (34,8%) e de nutrição parenteral (26,1%) e em 10,9% dos casos ocasionando óbito.

A *Multinational Association of Supportive Care in Cancer* (MASCC) e a *International Society for Oral Oncology* (ISOO) desenvolveram um *guideline* para o manejo da MB secundária ao tratamento oncológico. Dentre as medidas, o protocolo reforça a importância da higiene bucal básica antes e durante o tratamento quimioterápico e, dentre outras medidas, recomenda a terapia de fotobiomodulação (FBM) intraoral em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas (TCPH) ou que recebem radioterapia de cabeça e pescoço com ou sem quimioterapia concomitante (ZADIK *et al.*, 2019; SHARON, *et al.*, 2020).

Em novembro de 2020, a MASCC publicou as diretrizes para gestão de MB em pacientes pediátricos. Foi constatado que há evidências limitadas ou conflitantes sobre as intervenções para o manejo de MB em pacientes pediátricos com câncer, exceto no que diz respeito à goma de mascar que foi ineficaz para a prevenção. Portanto, os dados de estudos com adultos até então disponíveis podem ser também utilizados para o manejo de pacientes pediátricos. A implementação de um protocolo básico de higiene bucal é recomendada em meio à falta de estudos de alto nível de evidência (MIRANDA-SILVA, *et al.*, 2021).

Outra medida utilizada durante o tratamento quimioterápico é a crioterapia, que, em sua tradução literal, significa “terapia pelo frio”, neste caso, consiste em entregar e pedir aos pacientes para chupar gelo na forma de cubos, chips ou picolés com sabor durante a infusão do quimioterápico. Os picolés tendem a ser mais palatáveis para pacientes pediátricos. Os horários de início e término ideais não são claros, mas uma estratégia razoável seria começar 5 min antes do início da infusão e continuar a crioterapia por 5 a 30 minutos após a conclusão da infusão. A crioterapia deve ser usada para pacientes pediátricos cooperativos, mais velhos, que irão receber infusões curtas de melphalan or 5-fluorouracil (PATEL *et al.*, 2021).

A FBM tem sido utilizada para prevenção e tratamento de MB com intuito de promover a reparação tecidual, redução de dor e controle da inflamação (PAGLIONI *et al.*, 2019). Alguns estudos têm sido realizados para avaliar o impacto da FBM na MB em pacientes oncológicos pediátricos e vêm mostrando resultados promissores (GOBBO *et al.*, 2018; NOIRRIT-ESCLASSAN *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2020; GUIMARAES *et al.*, 2021). Na revisão sistemática (com meta-análise) conduzida por He e colaboradores (2018), 8 ensaios clínicos controlados e randomizados, com um total de 373 pacientes pediátricos com qualquer câncer infantil ou em realização de TCTH foram incluídos. Para os pacientes que fizeram PBM profilática, a razão de chances para desenvolver MB foi significativamente menor em comparação com o placebo (OR = 0.50, 95% CI 0.29 to 0.87, P = 0.01), além disso, a razão de chances para o desenvolvimento de MB grau III ou IV foi estatisticamente significativamente menor em comparação com o placebo (OR = 0.30, 95% CI (0.10, 0.90), P = 0.03), e a gravidade da MB foi menor estatisticamente significativamente em comparação com o placebo (SMD = - 0.56, 95% CI (- 0.98, - 0.14), P = 0.009).. Para os pacientes que utilizaram PBM terapêutico a gravidade da MB foi significativamente reduzida em comparação com os cuidados de rotina (SMD = - 1.18, 95% CI (- 1.52, - 0.84), P < 0.00001). A dor oral também foi reduzida após PBM, comparada ao placebo, sobre cuidados de rotina (MD = - 0.73, 95% CI (- 1.36, - 0.11), P = 0.02).

Os mecanismos associados a este processo incluem a inibição seletiva de citocinas pró-inflamatórias, proliferação celular, aumento do suprimento sanguíneo aeróbio para a base da ferida, drenagem de exsudato inflamatório através da cadeia linfática e estimulação do sistema imunológico (HAHM; KULHARI; ARANY, 2012). Os benefícios da aplicação de FBM incluem sua natureza não invasiva, efeito não térmico

e não citotóxico sobre as células, além da capacidade de modular a respiração mitocondrial e de aumentar a produção de Adenosina trifosfato (ATP) nos tecidos-alvo (ZECHA *et al.*, 2016; PELLICOLI *et al.*, 2014; GEORGE; HAMBLIN; ABRAHAMSE, 2018).

2.4 FARMACOGENÉTICA

Apesar da grande melhora no prognóstico dos pacientes com osteossarcoma após a inclusão da quimioterapia nos anos 70, nos últimos anos a taxa de cura se manteve estagnada, sem alterações nos medicamentos utilizados desde então. Sendo assim, se vê a necessidade de novas abordagens adaptadas de acordo com as características biológicas de cada paciente, que possam melhorar os resultados clínicos, seja na resposta ao tratamento ou na prevenção de efeitos adversos. A farmacogenética é a ciência que permite identificar os fatores genéticos que explicam a variabilidade individual na resposta aos medicamentos, fornecendo informações úteis para melhorar a eficácia e reduzir o risco das toxicidades associadas à quimioterapia, como por exemplo a MB (RODEN, 2019).

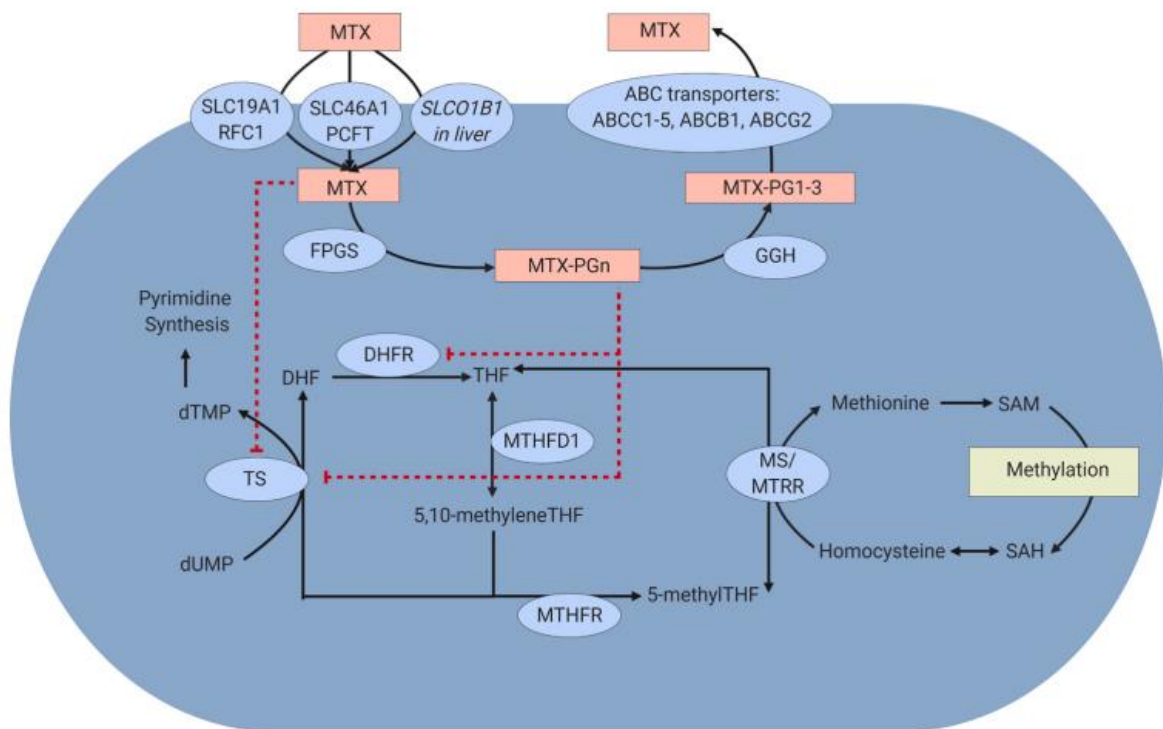
Estudos sobre farmacogenética em oncologia têm sido realizados buscando estudar a relação de variantes gênicas envolvidas no metabolismo dos quimioterápicos que são mais utilizados na prática clínica e que mostram maior quantidade e severidade de efeitos adversos (MARTINS, WAGNER, LINDEN, 2013). A presença de variantes nos genes que regulam os processos de metabolismo e transporte de fármacos estão sendo relatados como marcadores para prever a eficácia de tratamento (LIU *et al.*, 2017; GUTIERREZ-CAMINO *et al.*, 2018). Dessa forma, a farmacogenética desempenha um papel importante no tratamento do câncer através de estudos de eficácia e segurança dos quimioterápicos, podendo atuar de maneira individualizada no manejo medicamentoso. A falha do tratamento no câncer infantil devido a efeitos adversos graves que limitam a terapia ou à falha da dosagem convencional em induzir a remissão justifica o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (ELZAGALLAI; CARLETON; RIEDER, 2021). Estudos avaliando a associação entre variantes gênicas e as toxicidades do tratamento quimioterápico

buscam em sua maior parte avaliar as toxicidades hematológicas, hepáticas, renais e cardíacas.

Dentre os quimioterápicos mais utilizados está o MTX em altas doses, o qual é eficaz no tratamento de vários tipos de câncer, como leucemia, linfoma, osteossarcoma, bem como doenças autoimunes, como artrite reumatóide. O MTX apresenta uma ampla variabilidade interindividual em sua biodisponibilidade, necessitando não apenas ajustes contínuos de dose, mas também na frequente descontinuação do tratamento por toxicidade (FENG; XIE, 2016; GERVASINI; MOTA-ZAMORANO, 2019). O MTX é transportado para dentro da célula pelo SLC19A1/RFC1 e SLC49A1/PCFT). No fígado o MTX é transportado pelo SLCO1B1. Então o MTX é poliglutamatado pelo FPGS, inibindo o DHFR/TS, e após, despolutamado pelo GGH, em seguida, transportado para fora da célula pelo ABCC1–5, ABCB1 e ABCG2. O MTHFR, Metil enetetrahydrofolato desidrogenase, Ciclo hidrolase, MTHFD1, MS, MTRR são enzimas importantes no folato e ciclo de metabolismo de um carbono (MAAGDENBERG *et al.*, 2021).

Variantes do gene *MTHFR* que codifica a enzima metilenotetrahydrofolato redutase estão associadas a alterações nos níveis plasmáticos de MTX e à eficácia e toxicidade. Dentre estas, foram identificadas duas variantes (rs1801133) e (rs1801131) que reduzem a atividade enzimática de *MTHFR*. O risco de desenvolver toxicidade relacionada ao MTX, especialmente hepática, toxicidade gastrointestinal, leucopenia e neurotoxicidade foi significativamente associado à (rs1801133) (LAMBRECHT *et al.*, 2017; GERVASINI; MOTA-ZAMORANO, 2019; MAAGDENBERG *et al.*, 2021). Além disso, diversos estudos demonstraram que variantes genéticas em *SLCO1B1* estão associadas à depuração do MTX (TREVIÑO *et al.*, 2009; LOPEZ-LOPEZ *et al.*, 2011; RADTKE *et al.*, 2013; RAMSEY *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; CSORDAS *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017; MAAGDENBERG *et al.*, 2021). Várias proteínas de membrana, membros da família ABC, estão envolvidas no transporte do MTX para fora das células, dentre elas estão: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4* e *ABCG2* (GERVASINI; MOTA-ZAMORANO, 2019).

Figura 3. Mecanismo de ação do MTX. Transportadores e enzimas importantes no metabolismo do MTX e folato.



Fonte: MAAGDENBERG *et al.* (2021)

A doxorrubicina também está associada a diversos efeitos adversos, dentre os quais a cardiotoxicidade manifestada como disfunção cardíaca assintomática e insuficiência cardíaca congestiva. Os genes frequentemente relacionados a esse desfecho são: *RARG*, *SLC28A3*, *SLC22A17*, *SLC22A7*, *UGT1A6*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCB1*, *ABCB4* e *CBR* (AMINKENG *et al.*, 2015; ELZAGALLAI; CARLETON; RIEDER, 2021).

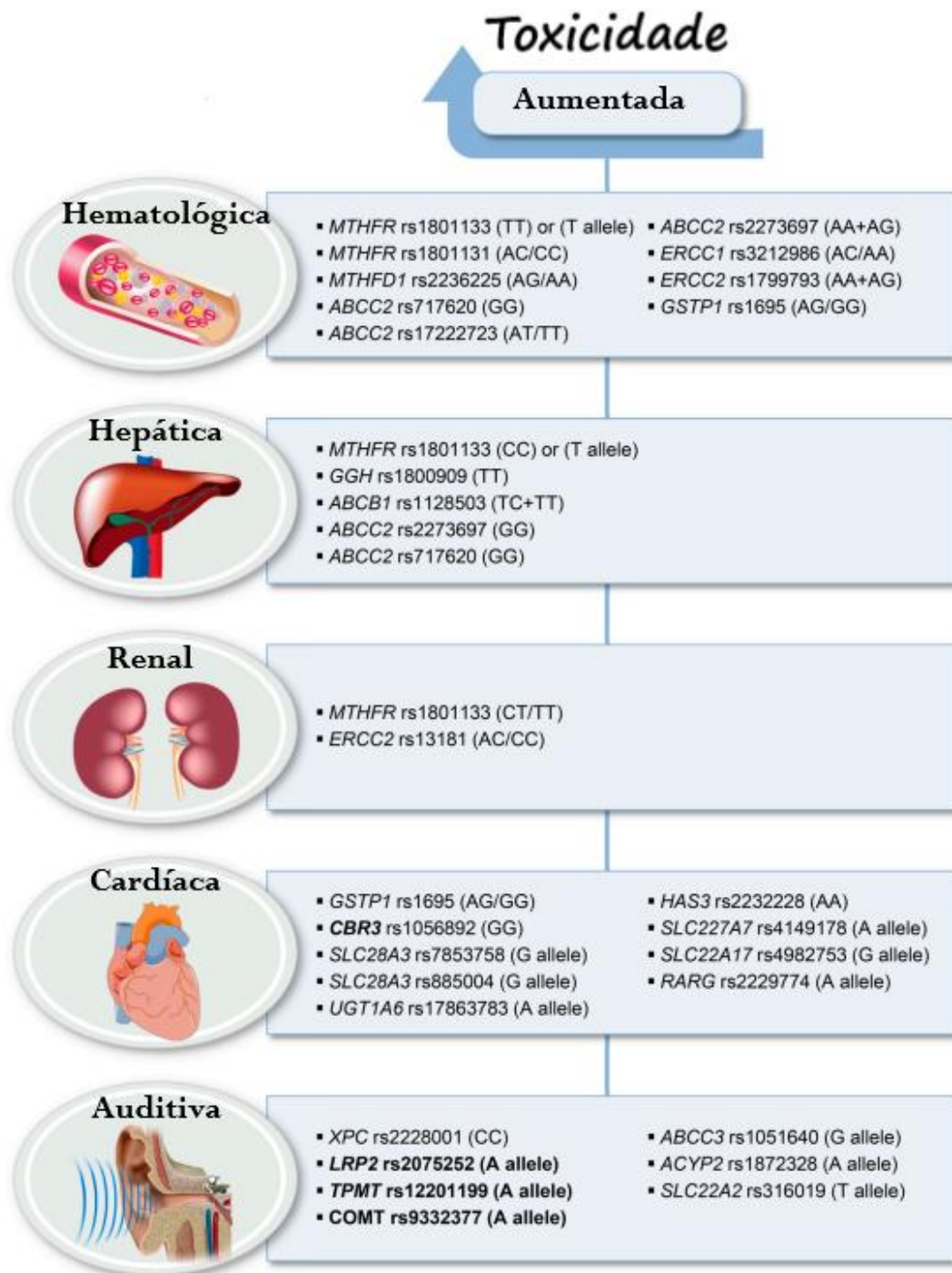
O *SLC31A1* é o principal transportador para a ingestão de drogas de platina (por exemplo, a cisplatina) e sua expressão correlaciona-se com a disposição e resposta ao medicamento. Sun e colaboradores (2018) investigaram a associação entre polimorfismos do *SLC31A1* e os desfechos clínicos em 1004 pacientes chineses com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) com quimioterapia à base de platina. O estudo obteve como resultado que os indivíduos heterozigotos para a variante rs10759637, localizada na posição 3'UTR do gene *SLC31A1*, estavam associados à presença de trombocitopenia grave e a uma sobrevida global mais curta.

Já homozigotos para a variante rs2233914, neste mesmo gene, foram correlacionados com sobrevida global mais longa, enquanto que haplótipo e diplótipo dessas variantes foram associados com toxicidades hematológicas. Em análises de estratificação, as variantes rs10759637 e rs2233914 consistentemente estavam correlacionadas com a sobrevida global em subgrupos específicos, como homens, fumantes e pacientes com mais de 58 anos, ou com carcinoma de células escamosas. A variante rs10759637 está significativamente correlacionada com baixa atividade da luciferase em ensaios clínicos e diminuiu a expressão de *SLC31A1* transcrito em tecidos tumorais. O estudo identificou um polimorfismo funcional no gene *SLC31A1* que modula a interação microRNA-3'UTR e a expressão gênica como potencial biomarcador farmacogenético para resultados clínicos da quimioterapia à base de platina em pacientes com em pacientes com CPNPC (SUN *et al.*, 2018).

Já em relação à ciclofosfamida, a desintoxicação de metabólitos reativos da ciclofosfamida é realizada através da oxidação de aldeído desidrogenases (ALDHs) ou por conjugação mediada pela glutathione S-transferase (GST). Portanto, variantes genéticas identificadas nos genes *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *GSTA1*, *GSTP1*, *ALDH1A1* e *ALDH3A1* podem interferir na farmacocinética da ciclofosfamida (ROY *et al.*, 1999; ELZAGALLAAI; CARLETON; RIEDER, 2021).

Em 2020 foi publicada uma revisão de literatura bem ampla sobre a farmacogenética e a farmacodinâmica do osteossarcoma, na qual os autores buscaram elucidar os biomarcadores associados ao resultado clínico em termos de resposta ao tratamento, probabilidade de sobrevivência e suscetibilidade a toxicidades relacionadas à quimioterapia. Os resultados referentes à toxicidade estão demonstrados na Figura 3.

Figura 4. Esquema ilustrativo dos genes (e suas variantes) relacionados à toxicidade induzida pela quimioterapia no osteossarcoma



Fonte: Adaptado de HATTINGER *et al.* (2020)

Embora os quadros de insuficiência renal sejam frequentes quando altas doses de MTX e cisplatina são administradas ao paciente, algumas variantes gênicas encontraram associação com essa toxicidade. O estudo de Park e Shin (2016) relatou

que os pacientes com os genótipos GA/AA da variante rs1051266 no gene *SLC19A1* apresentaram níveis plasmáticos de MTX significativamente mais baixos em 48 e 72 horas, enquanto aqueles portadores do genótipo GG estiveram associados com níveis plasmáticos mais elevados de MTX e presença de nefrotoxicidade. Evidência semelhante foi encontrada em estudo que avaliou 50 pacientes com osteossarcoma portadores dos genótipos CT/TT da variante rs1801133 no gene *MTHFR* e AC/CC da variante rs13181 no gene *ERCC2*. Além disso, os autores também identificaram a presença de associação de cardiotoxicidade com o gene *GSTP1* (rs1695) (WINDSOR *et al.* 2012).

O conhecimento sobre a relação destas variantes genéticas associadas ao desfecho de MB em pacientes pediátricos é bastante escasso e limitado. Ao se buscar a influência desses desfechos dentro do grupo de pacientes com osteossarcoma, a carência de estudos é ainda maior. Estudos que envolvam a análise de variantes genéticas e correlacionem a presença destas variantes com a MB podem auxiliar muito no tratamento desses pacientes, de forma a buscar alternativas para reduzir os efeitos colaterais que essas drogas ocasionam. Consequentemente, os impactos para os pacientes serão nítidos, de modo que o tratamento utilizado será mais efetivo, haverá uma significativa melhora na sobrevida, no prognóstico e na qualidade de vida desses pacientes.

O estudo de Viana Filho *et al.* (2021) investigou a relação entre variantes gênicas e o desenvolvimento de MB em pacientes pediátricos submetidos à quimioterapia com MTX e mostrou que o alelo A e o genótipo CA da variante rs2231142 no gene *ABCG2* foram mais frequentes em indivíduos com MB. Uma maior gravidade da doença foi observada principalmente em pacientes mais jovens. Pacientes com MB grave apresentaram menor contagem de leucócitos em relação aos pacientes com a forma leve/moderada. Os autores concluíram que a presença da variante rs2231142 aumenta a probabilidade de MB e que os pacientes mais jovens e com baixa contagem de leucócitos são mais propensos a desenvolver a forma grave.

O estudo de Campbell e colaboradores (2016) demonstrou associações significativas entre o alelo C677T (rs1801133) no gene *MTHFR* e a existência de toxicidade hepática, mielossupressão, MB, toxicidade gastrointestinal e toxicidade cutânea. Além de evidências limitadas sugerindo que a variante A1298C (rs1801131)

no gene *MTHFR* pode estar associado à diminuição do risco de toxicidade cutânea e leucopenia.

Gutierrez-Camino e colaboradores (2017) avaliaram genes de processamento de microRNAs (miRNAs) em um grupo de 117 pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) na infância e identificaram associação com a MB induzida por MTX. A análise univariada mostrou que o genótipo GG homozigoto da rs2114358 (miR-1206) foi associado significativamente com um aumento do risco de MB induzida por MTX.

Em relação ao desfecho de MB no grupo de pacientes pediátricos com osteossarcoma, o estudo de Gong e colaboradores (2021) investigou a relação entre variantes gênicas e a MB induzida pelo MTX. Com uma amostra de 80 pacientes pediátricos, as variantes rs1128503 e rs1045642 localizadas no gene *ABCB1* e rs1801133 localizada no gene *MTHFR* mostraram impactos marcantes sobre o risco de desenvolver mucosite em pacientes chineses com diagnóstico de LLA, linfoma ou osteossarcoma (GONG *et al.*, 2021).

Outras variantes gênicas foram associadas à presença de MB: o alelo T do gene *DHFR* (rs1650723) e o genótipo CT do gene *ABCG2* (rs2231135) (JABEEN *et al.*, 2015), o genótipo TT do gene *ERCC1* (rs1615) no ciclo de doxorrubicina+cisplatina, os genótipos CT/CC do gene *ABCB1* (rs1045642) após tratamento com MTX (WINDSOR *et al.*, 2012), e o genótipo GG do gene *SLC19A1* (rs1051266) sendo relacionado com presença e severidade de MB (PARK *et al.*, 2016).

3. 3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a relação entre variantes nos genes *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC6*, *ABCG2*, *CCND1*, *CYP2A6*, *CYP3A5*, *GSTA1*, *GSTM1* *GSTP1*, *HSP90AA1*, *MTHFR*, *NR3C1*, *SLC19A1*, *SLCO6A1* e *TPRA1* relacionados ao metabolismo e transporte dos antineoplásicos metotrexato, doxorrubicina, cisplatina e ciclofosfamida com o desenvolvimento e severidade de mucosite bucal nos pacientes pediátricos com osteossarcoma submetidos à quimioterapia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar a relação entre as variantes de sequência identificadas nos genes *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC6*, *ABCG2*, *CCND1*, *CYP2A6*, *CYP3A5*, *GSTA1*, *GSTM1* *GSTP1*, *HSP90AA1*, *MTHFR*, *NR3C1*, *SLC19A1*, *SLCO6A1* e *TPRA1* com o protocolo de quimioterapia e a ausência (grau 0) ou presença (graus 1, 2, 3 e 4) de mucosite bucal.

3.2.2 Avaliar a relação entre as variantes de sequência identificadas nos genes *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC6*, *ABCG2*, *CCND1*, *CYP2A6*, *CYP3A5*, *GSTA1*, *GSTM1* *GSTP1*, *HSP90AA1*, *MTHFR*, *NR3C1*, *SLC19A1*, *SLCO6A1* e *TPRA1* com o protocolo de quimioterapia e a severidade de mucosite bucal. (graus 0/1 e 2= leve e graus 3 e 4=severo).

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação serão apresentados em forma de artigo científico que será submetido para o periódico Oral Oncology. Impact Factor 5.33.

Genetic variants influence development and severity of oral mucositis in osteosarcoma treated with high-dose methotrexate and doxorubicin associated to cisplatin.

Renata de Almeida Zieger^{1#}, Mariana Rodrigues Botton^{2#}, Marina Curra^{1,3}, Amanda de Farias Gabriel¹, Stefanie Thieme¹, Luisa Comerlato Jardim¹, Marco Antonio Trevizani Martins^{1,4}, Ursula da Silveira Matte^{2,5}, André Tesainer Brunetto⁶, Lauro José Gregianin^{6,7}, Rafael Roesler⁸, Stephen T Sonis⁹, Marina Siebert², Manoela Domingues Martins^{1,4}

These authors contributed equally

1 Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Molecular and Protein Analysis Unit (UAMP), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

3 Department of Oral Pathology, University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Porto Alegre, Brazil.

4 Department of Oral Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

5 Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

6 Childhood Cancer Institute, Porto Alegre, Brazil.

7 Department of Pediatric Oncology, Porto Alegre Clínicas Hospital (HCPA/UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

8 Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Porto Alegre Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

9 Division of Oral Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

Corresponding author:

Dr. Manoela Domingues Martins

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia
Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503
Porto Alegre RS, Brazil, CEP: 90035-003
Phone: +55 (51) 3308-5011
manomartins@gmail.com

Acknowledgments

This study was supported by PRONON/Ministry of Health, Brazil (grant n.25000.056.976/2015-52); Postgraduate Research Group of Porto Alegre Clinics Hospital (GPPG/FIPE: 2016-0608 and 2021-0140), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq student scholarship and 302201/2015-7 grant), Children's Cancer Institute (student scholarship), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil(CAPES)-finance code 001. Ursula da Silveira Matte, Rafael Roesler and Manoela Domingues Martins are research fellow funded by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Conflicts of interest/Competing interests: The authors declare no competing interests.

Abstract

Background: Oral mucositis (OM) is an important and frequent acute adverse effect in pediatric patients submitted to chemotherapy protocols to treat osteosarcoma (OS) Its pathobiology is complex and a new frontier in the risk prediction involves the understanding of the impact of genetic variants trying to personalize the medical care.

Aim: Analyze the association between genetic variants and the presence and severity of OM in pediatric patients with OS undergoing chemotherapy with high-dose methotrexate (HDMTX), doxorubicin and cisplatin.

Methods: A longitudinal observational retrospective study was conducted with OS patients undergoing chemotherapy. Demographic data and treatment characteristics

were collected at baseline and follow-up visits. OM was daily graded by the World Health Organization (WHO) scale, from day 1 until day 15. Blood samples were collected, and DNA was extracted. Genetic variants were evaluated by next-generation sequencing (NGS) using a customized gene panel for analysis of 20 genes and 61 variants. Gene ontology pathways enrichment analysis were performed using GeneAnalytics™ and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Statistical analysis was performed using the SPSS software adopting a p-value of 0.05

Results: Fourteen OS pediatric patients submitted to 161 chemotherapy cycles of chemotherapy were evaluated. The most used protocols were HDMTX (n = 110; 66.7%), followed by doxorubicin + cisplatin (n = 51; 30.9%). OM was diagnosed in 126 cycles (78.2%), being OM grade 1 observed in 32.5%; grade 2 in 49.2%; and grade 3 in 18.3%. Multivariate analysis of HDMTX cycles showed that OM presence was associated to *ABCA3* (rs13332514) (p<0.001) and *MTHFR* (rs1801133) (p=0.047). Regarding severity of OM in general, genetic variant of ABC family genes, specially *ABCC2* and *ABCC4* were identified in both protocols. The intersection of significant genes associated to presence and severity of OM appointed for the impact of *ABCC2* and *ABCC6*. The analysis of KEGG showed that *ABCC2* and *ABCC4* were associated to different pathways. Antifolate resistance and CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6 pathways appears to be related to presence and severity of OM in both chemotherapy protocols.

Conclusion: *MTHFR* variant is important for presence of OM. *ABC* gene family, mainly *ABCC2* and *ABCC4* seems to be involved in the presence and severity of OM in OS patients in treatment with HDMTX, doxorubicin and cisplatin.

Introduction

Osteosarcoma (OS) is a rare cancer constituting 0.2% of all cancers. However, it is the commonest primary malignant bone tumor in children and young people corresponding to 3 to 5% of all neoplasms in this age group (INCA, 2018; STRAUSS et al., 2021). The current cornerstone treatment for OS is a triple-drug chemotherapy with a high-dose methotrexate (HDMTX) with leucovorin (5-formyltetrahydrofolic acid) rescue, doxorubicin and/or cisplatin associated to surgical resection (BERNER et al., 2015; LUETKE et al., 2014; SENERCHIA et al., 2017). This protocol is a prolonged

and intense chemotherapy regimen with necessity of extensive patient monitoring and management of individual toxicity. The most important challenge in OS treatment is the great interindividual variability in clinical response and wide spectrum of side effects that can lead to changes in, or interruption of chemotherapy treatment (JABEEN et al., 2015).

Among all the toxicities, oral mucositis (OM) is considered a commonly encountered acute adverse effect characterized by an inflammatory reaction in oral mucosa. In pediatric patients, its incidence varies from 20% to 80.4% (de FARIAS GABRIEL et al., 2021). Clinically, OM presents as erythema and ulcerations in the oral mucosa. These lesions can be extremely painful, increase the risk of infections, require the use of analgesic, cause a reduction or delay in subsequent courses of chemotherapy treatment, prolong hospitalization, affect the quality of patients' life and lead to a substantial need for the use of financial resources (SONIS, 2009; LALLA et al., 2014; HURRELL et al., 2019; SHOUVAL et al., 2019; VILLA & SONIS, 2020; RODRIGUES-OLIVEIRA, et al., 2021, CURRA et al., al., 2021).

The definition of the potential risk factors for the development of OM is important for early interventions in order to facilitate personalized support for the affected patients without compromising the anti-tumour effects (WARDILL et al., 2020, de FARIAS GABRIEL et al., 2021). Special attention has been given to the type of chemotherapeutic protocol used. Pediatric patients that received HDMTX; combination chemotherapy of HDMTX with doxorubicin or cyclophosphamide have a higher incidence of severe grades of OM (CURRA et al., 2021; de FARIAS GABRIEL et al., 2021). Recently the impact of pharmacogenetics brought new understanding about the impact of genetic variants/polymorphism (SNVs/SNPs) in drug absorption, metabolism, excretion, cellular transport and target pathways. Data on the genetic variants associated with the toxicity of MTX has been gathering, but it has not been clearly figured, which likewise justify further investigations among different cancers and populations (MAAGDENBERG et al., 2021). Few studies analyzed SNVs with OM (OZDEMIR et al., 2012; BEKTAŞ-KAYHAN et al., 2012; DEN HOED et al., 2015; GUITIERREZ-CAMINO et al., 2018; OSTEROM et al., 2018; GONG et al., 2021; VIANA-FILHO et al., 2021). However, there are no studies about OM and HDMTX, doxorubicin and /or cisplatin genetic variants in pediatric osteosarcoma patients.

The aim of the current study was to analyze the association between genetic variants in 21 genes and the development and severity of OM in pediatric patients with OS undergoing chemotherapy with HDMTX, doxorubicin and cisplatin. In addition, another intended was to understand the cumulative effects of numerous variants and visualize them at the pathway level trying to empower detection of genetic risk factors for this complex disease.

Materials and Methods

This longitudinal observational retrospective study was performed at the Pediatric Oncology Service on Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) at the city of Porto Alegre, Brazil. The study followed the guidelines of Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement guideline for reporting cohort studies and was approved by the Institutional Human Research Ethics Committee (HCPA protocol 2021.0140 and CAEE 46986321.3.0000.3527). The patients and/or their legal guardians signed an informed consent.

Study population

A total of 14 patients diagnosed with osteosarcoma admitted and evaluated in the Pediatric Oncology Service from January 2015 to October 2018 were included in the present study. They aged from 0 to 17 years, and had no restrictions about chemotherapy protocol. All included patients and families received oral hygiene instructions, involving the correct way to use a soft brush and chlorhexidine digluconate (0.12%) for rinsing prior to chemotherapy.

Procedures

Demographic data (age and gender) and treatment characteristics (chemotherapy protocol and dose) were collected at baseline and follow-up visits. The chemotherapy protocol for each patient was defined by the physician and patients were managed according to the institutional guidelines, following the Latin American Osteosarcoma Treatment Group Protocol, which consists of a neoadjuvant

chemotherapy regimen with the three most effective drugs for this disease (MTX, doxorubicin and cisplatin), associated with surgical resection of the lesion.

Patients were followed during each chemotherapy cycle from day 0 until day 15 independently of the duration of chemotherapy protocol. One cycle was characterized by the period extending from the first day of chemotherapy infusion until 15 days after the infusion. The protocols used in each course were grouped into 4 different types, based on the groups of drugs used (MTX-high dose (HD), doxorubicin + cisplatin, HDMTX + cyclophosphamide + doxorubicin, and cyclophosphamide predominant). The protocol's name was given based on the most stomatotoxic drug used.

All patients receiving MTX chemotherapy also received hyperhydration, bicarbonate to decrease renal MTX globule precipitation, and leucovorin rescue, with dose adjustments (according to the MTX concentration curve, estimated every 24h to reduce the development of adverse effects).

OM was evaluated daily, from day 1 (D1) until day 15 (D15) by two trained dentists. The World Health Organization (WHO) scale was used to grade from 0 = no mucositis; grade 1 = erythema without lesions; grade 2 = ulcers, but able to eat; grade 3 = painful ulcers, but able to consume liquid food with analgesia for support; grade 4 = requires parenteral or enteral support and continuous analgesia. Patients who presented OM received photobiomodulation (PBM) treatment following the protocol previously described by Weissheimer et al. (2017). For data analysis, it was used the worst grade of OM observed in each chemotherapy cycle for the presence and severity outcomes.

DNA extraction

Peripheral blood sample (3 mL) was collected from the central catheter in a vacutainer tube with EDTA K3 (Cral®, Reference GDO50EK) avoiding contamination with residual heparin from the center line. Next, 350 µL of blood were used for genomic DNA extraction using the iPrep™ PureLink™ gDNA Blood Kit (IS-10005; Invitrogen™, USA) in the iPrep™ Purification Instrument (Invitrogen™, USA) following the manufacturer's instructions. The sample's purity and concentration were evaluated through measurement in the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). DNA samples were stored at -20°C until usage in the following steps.

Analyses of genetic variants through NGS

We analyzed genetic variants in genes related to drug metabolism and transport through next-generation sequencing (NGS) using a customized gene panel designed with the Ion AmpliSeq Designer tool (www.ampliseq.com). This panel had specific primers for the coding and adjacent regions of the following genes: *ABCA3*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC6*, *ABCG2*, *CCND1*, *CYP2A6*, *CYP3A5*, *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *HSP90AA1*, *MTHFR*, *NR3C1*, *SLC19A1*, *SLCO6A1* and *TPRA1* (Supplementary Table 1 and 2). Those genes were chosen due to their involvement in the metabolism and transport of the MTX, doxorubicin, cisplatin and cyclophosphamide, which are the drugs used for treatment of our patient group. Also, potential genetic variants were selected according to the published literature.

Genomic DNA libraries were prepared using the Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies) and the customized gene panel. The resulting DNA libraries were purified using magnetic beads (AMPure beads). Afterwards, the DNA was amplified through emulsion PCR. The resulting particles were loaded onto a chip and then sequenced using the Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific) equipment. The analysis of raw information obtained in the sequencing was performed through bioinformatics tools, using GRCh38 as the genome reference. OTG-snp caller was applied for filtering the readings and GATK were used for variant calling.

The NGS results were validated through PCR followed by Sanger sequencing in the 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). For the validation step, we selected 15 different genetic variants to be evaluated in 10 randomly selected patient's samples.

Gene enrichment analysis

To additionally understand the underlying mechanisms of genetic variants for OM, the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,) were retrieved using the online tool GeneAnalytics™ (geneanalytics.genecards.org). The enrichment analysis was performed based on target genes identified in this study after statistical analyses.

Statistical analysis

The variants that had frequency $\geq 5\%$ in our sample were selected to be analyzed by statistical methods. Categorical variables were represented by absolute and relative frequency. The proportions of the studied variables (genetic variants) were compared between the categories of OM (presence and severity) using the chi-square test. For genetic variants with 3 categories (additive model) with significative results, the pair-by-pair comparison was performed by the Sidak test using Winpepi software version 11.65. For univariate analysis, genetic variants were selected based on significant results in chi-square test or have been previously report in the literature. The univariate Poisson regression model was used to estimate the crude prevalence ratios (PR) and their respective 95%CI. Statistical significance was assessed using the Wald test. Significant variables were included in the multivariate model and, for their permanence in the final model, the backward selection of variables with a significance level of 0.05 was adopted. This analysis was adjusted for the protocols used. The software used was SPSS version 25.

Results

Fourteen pediatric patients were included in this study, with a median age of 12.2 (± 4) of which 50% was male, being all these patients under in osteosarcoma treatment. The treatment of pediatric cancer patients involved different chemotherapy protocols throughout the chemotherapy (QT) cycles. The patients were submitted to a total of 165 chemotherapy cycles throughout their treatment, with an average of 13.2 QT cycles, ranging from 4 to 17 cycles. From the 165 cycles, the most used protocols were HDMTX (n = 110; 66.7%), followed by doxorubicin + cisplatin (n = 51; 30.9%). Only one patient used HDMTX + cyclophosphamide + doxorubicin in 3 cycles (1.8%) and cyclophosphamide predominant in 1 cycle (0.6%). So, we decided to remove this patient with their cycles and 161 cycles were considered for the further analyses (110 from HDMTX and 51 from doxorubicin + cisplatin) (Table 1). The follow-up time for patients was 3 to 23 months (average 8.29 months \pm 5.03).

Table 1. Analysis of the presence and severity of oral mucositis in osteosarcoma patients comparing the chemotherapy protocols (n=161 cycles)*.

		Oral mucositis		Mucositis severity	
		Presence	Absence	Presence (3 or 4)	Absence (0, 1 or 2)
Chemotherapy cycles	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Methotrexate high dose (HDMTX) (>1g/m ²)	110	83 (75.5)	27 (24.5)	15 (13.6)	95 (86.4)
Doxorubicin+cisplatin**	51	43 (84.3)	8 (15.7)	8 (15.7)	43 (84.3)
Total	161	126 (78.2)	35 (21.8)	23 (14.3)	138 (85.7)
P***		0.23		0.81	

* MTX in osteosarcomas, the dose used was 12 g/m²/cycle.

**Doxorubicin dose used was 75 mg/m²/cycle or 60 mg/m²/cycle. Cisplatin dose used was 120 mg/m²/cycle or 90 mg/m²/cycle.

***Fischer's exact test

OM is highly incident in pediatric patients receiving chemotherapy for osteosarcoma independently of chemotherapy protocol used

Evaluating the total number of 161 QT cycles, OM was diagnosed in 126 cycles (78.2%), being OM grade 1 observed in 41 (32.5%) cycles; grade 2 in 62 (49.2%) cycles; and grades 3 in 23 (18.3%) cycles. OM grade 4 was not observed. Patients who presented grade 3 in any cycle spent an average of 5.9 days with this condition.

The analysis per patient revealed that all of them (100%) presented OM at least in one cycle of QT. Five (35.7%) patients developed only OM grade 2 and 9 (64.3%) grade 3. Of these last, 4 patients presented OM grade 3 in four cycles, 2 patients in two cycles and 3 in one cycle.

Analyzing the type of QT protocol, OM was diagnosed in 75.5% chemotherapy cycles using HDMTX, and 84.3% chemotherapy cycles using doxorubicin + cisplatin. We did not observe any association between presence (p=0.23) or severity (p=0.81) of OM and chemotherapy protocol (Table 1).

The patients were evaluated during 15 days in each QT cycle. The distribution of OM grades according to days (1 to 15 days) in the cycles is shown in Figure 1A. Over the days of a cycle, an increase in the degree of OM was observed, with a peak between days 8 and 14. The evaluation of OM grades per QT cycle is demonstrated in Figure 1 B. There was no linearity among cycles, which demonstrated that neither the toxicity nor the effect of cycles is cumulative. Figures 1C and 1D show the

evaluation of OM grades per QT cycle according to the protocol used, being HDMTX (1C) and doxorubicin + cisplatin (1D). There is no difference between the chemotherapy protocol related to the presence and severity. Both protocols are equally cytotoxic to the patients.

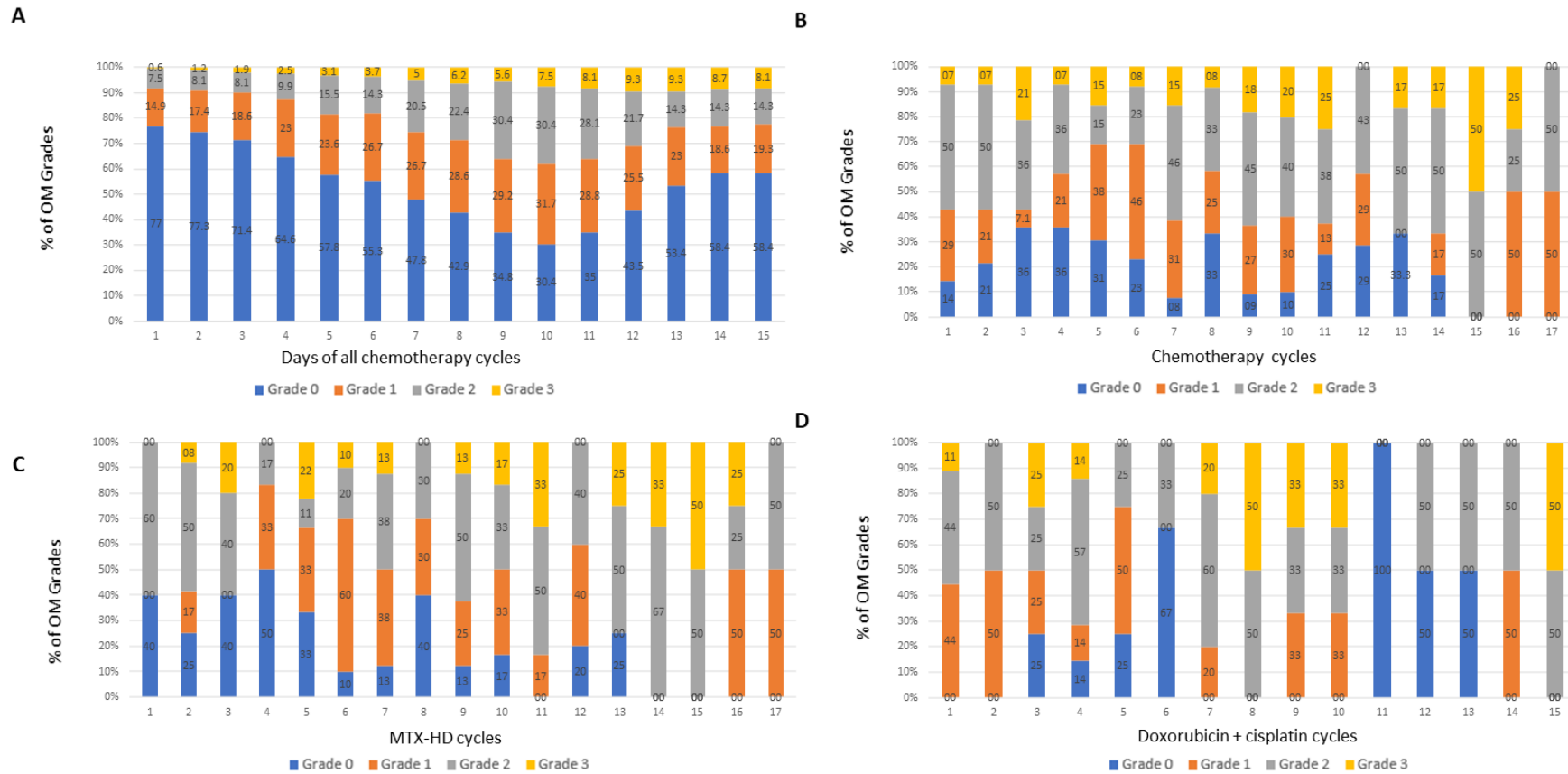


Figure 1. Distribution of OM grades percentage according to the days of QT cycles (A), QT cycles (B), in HDMTX QT cycles (C) and in doxorubicin+cisplatin QT cycles (D).

Genetic variants impact the occurrence and severity of oral mucositis

All the variants were in accordance with the Hardy-Weinberg Equilibrium, except for rs899494 in *ABCC4* ($P=0.031$), rs8058694 ($P=0.038$) and rs8058696 ($P=0.038$) in *ABCC6* and chr3:127579846 A>G ($P=0.038$) in *TPRA1* gene. These results may be related to the fact that our sample is composed by patients with osteosarcoma, which can be influenced by genetic alterations in these genes.

The analysis results of genetic variants by their genotypes considering different models (additive, recessive and dominant) and their relationship with the presence and severity of OM were demonstrated at Suppl Tables 1 and 2, respectively. From the 20 genes and 61 variants evaluated we selected only one model (additive, recessive or dominant) for each variant – the model with the greatest biological plausibility for each variant and that showed statistical significance through the chi-square – to be evaluated through the subsequent statistical analysis.

After the first analysis, the results showed that regarding the presence of OM, 12 genes and 21 variants demonstrated statistically significant data (Suppl Table 1). For severity of OM, 6 genes and 13 genetic variants showed significant relationship (Suppl Table 2).

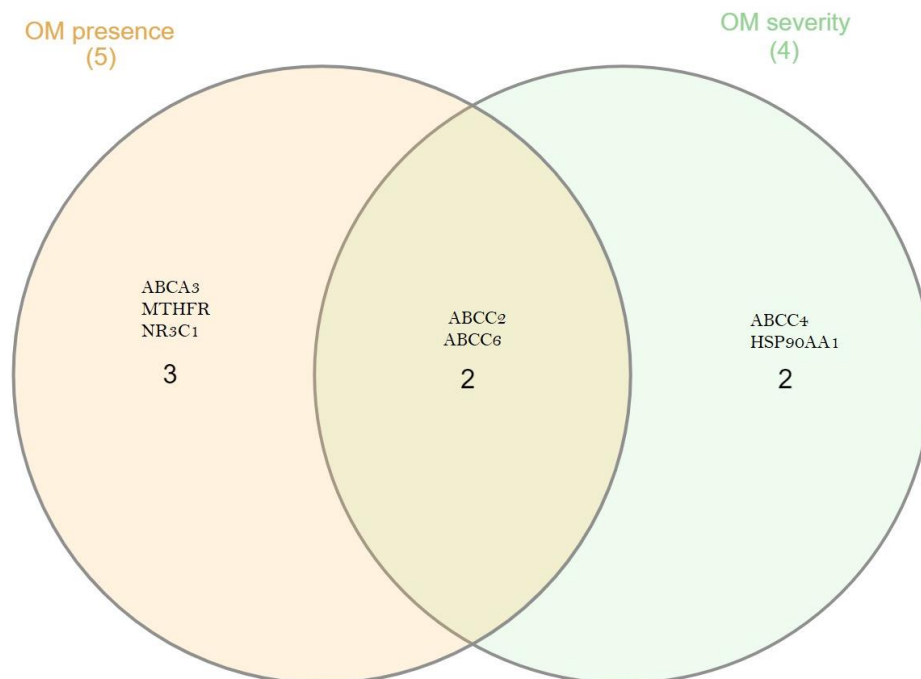
The univariable regression analysis was performed with significative variants or the variants which were related in literature to mucositis. Considering the presence of OM outcome and genetic variants, showed association with 11 variants: one in *ABCA3* (rs13332514), five in *ABCC2* (rs1137968, rs17222723, rs3740066, rs8187707 and rs8187710), two in *ABCC6* gene (rs9924755 and rs2238472), one in *MTHFR* (rs1801133), and one in *NR3C1* (rs6196).

In the multivariate analysis of presence of OM, only three genetic variants showed significance for the presence of OM, being the rs13332514 in *ABCA3* ($p<0.001$), rs3740066 in *ABCC2* ($p=0.009$) and rs1801133 in *MTHFR* ($p=0.041$) (Table 2). In relation to the rs13332514 variant in *ABCA3*, the AA or AG genotype showed 27.2% higher risk to develop OM compared to GG. About variant in *ABCC2* (rs3740066), the TT or TC genotype had 38.3% higher risk to present OM compared to CC genotype, and on the variant rs1801133 in *MTHFR* gene, the genotype TT presents 16.4% more risk to develop OM.

In relation to severity of OM, only univariable regression is presented because the multivariate regression did not show significant results with more than one variant (Table 3). Nine genetic variants were associated with the severity of OM: rs2273697 in *ABCC2*; rs2274405 and rs2274406 in *ABCC4*; rs8058694, rs8058696 and rs2856585 in *ABCC6* and rs8005905, rs4947 and rs10873531 in *HSP90AA1*.

The intersection of significant genes associated to presence and severity of OM are illustrated in Figure 2. Two genes were founded *ABCC2* and *ABCC6*.

Figure 2. Venn diagram of the gene targets. Intersection of significant gene associated to OM presence and severity.



Suppl Table 1. Comparison between variants' genotypes and absence/presence of oral mucositis.

Gene	Variant	Genotype	Aditive model		P	Recessive model				P	Dominant model		P		
			Abscence of oral mucositis	Presence of oral mucositis		Abscence of oral mucositis	Presence of oral mucositis		Abscence of oral mucositis	Presence of oral mucositis					
			(grade 0) (n=35)	(grade 1,2,3 e 4) (n=126)		(grade 0) (n=35)	(grade 1,2,3 e 4) (n=126)		(grade 0) (n=35)	(grade 1,2,3 e 4) (n=126)					
			n (%)	n (%)	Genotype	n (%)	n (%)		Genotype	n (%)	n (%)				
ABCA3	rs149532 [#]	GG	26 (19.7)	106 (80.3)	0.214	-	-	-	-	-	-	-			
		GA	9 (31)	20 (69)		-	-	-	-	-	-	-			
	rs13332514	GG	32 (28.8)	79 (71.2)a	0.002	GG or AG	33 (22.9)	111 (77.1)	0.369	GG	32 (28.8)	79 (71.2)	0.001*		
		AG	1 (3)	32 (97)b		AA	2 (11.8)	15 (88.2)		AG or AA	3 (6)	47 (94)			
		AA	2 (11.8)	15 (88.2)ab											
ABCB1	rs1045642	TT	6 (54.5)	5 (45.5)a	0.036	TT	6 (54.5)	5 (45.5)	0.014*	TT or CT	29 (22.1)	102 (77.9)	>0.999		
		CT	23 (19.2)	97 (80.8)b			CT or CC	29 (19.3)		121 (80.7)		CC		6 (20)	24 (80)
		CC	6 (20)	24 (80)ab											
	rs2032582	AA	6 (54.5)	5 (45.5)a	0.034	AA	6 (54.5)	5 (45.5)	0.014*	AA or CA	27 (22.3)	94 (77.7)	0.828		
		CA	21 (19.1)	89 (80.9)b			CA or CC	29 (19.3)		121 (80.7)		CC		8 (20)	32 (80)
		CC	8 (20)	32 (80)ab											
	rs1128503	TT	6 (54.5)	5 (45.5)a	0.034	TT	6 (54.5)	5 (45.5)	0.014*	TT or CT	27 (22.3)	94 (77.7)	0.828		
		CT	21 (19.1)	89 (80.9)b			CT or CC	29 (19.3)		121 (80.7)		CC		8 (20)	32 (80)
		CC	8 (20)	32 (80)ab											
	rs9282564 [#]	TT	34 (21.7)	123 (78.3)	>0.999	-	-	-		-	-	-			
		CT	1 (25)	3 (75)			-	-	-		-	-	-		
ABCC1	rs2230669 [#]	GG	34 (22.5)	117 (77.5)	0.692	-	-	-		-	-	-			
		AG	1 (10)	9 (90)		-	-	-		-	-	-			
	rs35587	TT	23 (28.4)	58 (71.6)	0.074	TT or CT	34 (23.6)	110 (76.4)	0.124	TT	23 (28.4)	58 (71.6)	0.055		
		CT	11 (17.5)	52 (82.5)		CC	1 (5.9)	16 (94.1)		CT or CC	12 (15)	68 (85)			
		CC	1 (5.9)	16 (94.1)											
	rs35605	CC	21 (24.7)	64 (75.3)	0.548	CC or CT	33 (22.9)	111 (77.1)	0.369	CC	21 (24.7)	64 (75.3)	0.347		
		CT	12 (20.3)	47 (79.7)		TT	2 (11.8)	15 (88.2)		CT or TT	14 (18.4)	62 (81.6)			

ABCC1 (cont.)	rs8187858 [#]	TT	2 (11.8)	15 (88.2)	0.013*	-	-	-	-										
		CC	27 (18.8)	117 (81.3)															
		TC	8 (47.1)	9 (52.9)															
	rs2230671	GG	17 (19.1)	72 (80.9)	0.311	GG or AG	33 (22.8)	112 (77.2)	0.526	GG	17 (19.1)	72 (80.9)	0.443						
		AG	16 (28.6)	40 (71.4)	AA	2 (12.5)	14 (87.5)	AG or AA	18 (25)	54 (75)									
		AA	2 (12.5)	14 (87.5)															
ABCC2	rs2273697	GG	21 (24.4)	65 (75.6)	0.683	GG or GA	33 (21.9)	118 (78.1)	1.000	GG	21 (24.4)	65 (75.6)	0.445						
		GA	12 (18.5)	53 (81.5)	AA	2 (20)	8 (80)	GA or AA	14 (18.7)	61 (81.3)									
		AA	2 (20)	8 (80)															
	rs17222723 [#]	TT	22 (17.5)	104 (82.5)	0.019*	-	-	-		-	-	-							
		AT	13 (37.1)	22 (62.9)										-	-	-	-	-	
	rs3740066	CC	17 (39.5)	26 (60.5)a	0.001	CC or TC	32 (21.1)	120 (78.9)	0.410	CC	17 (39.5)	100 (84.7)	0.002*						
		TC	15 (13.8)	94 (86.2)b										TT	3 (33.3)	6 (66.7)	TC or TT	18 (15.3)	
		TT	3 (33.3)	6 (66.7)ab															
	rs1137968 [#]	GG	22 (17.5)	104 (82.5)	0.019*	-	-	-		-	-	-							
		TG	13 (37.1)	22 (62.9)										-	-	-	-	-	
	rs8187707 [#]	CC	22 (17.5)	104 (82.5)	0.019*	-	-	-		-	-	-							
		TC	13 (37.1)	22 (62.9)										-	-	-	-	-	
rs8187710 [#]	GG	22 (17.5)	104 (82.5)	0.019*	-	-	-		-	-	-								
	AG	13 (37.1)	22 (62.9)										-	-	-	-	-		
ABCC3	rs4148416 [#]	CC	29 (22.1)	102 (77.9)	>0.999	-	-	-		-	-	-							
		TC	6 (20)	24 (80)										-	-	-	-	-	
	rs2277624	CC	22 (21.8)	79 (78.2)ab	0.018	CC or TC	30 (19.6)	123 (80.4)	0.013*	CC	22 (21.8)	79 (78.2)	>0.999						
		TC	8 (15.4)	44 (84.6)a										TT	5 (62.5)	3 (37.5)	TC or TT	13 (21.7)	47 (78.3)
		TT	5 (62.5)	3 (37.5)b															
	rs1051640 [#]	AA	28 (21.4)	103 (78.6)	0.809	-	-	-		-	-	-							
GA		7 (23.3)	23 (76.7)	-										-	-	-	-		
ABCC4	rs1751034	TT	17 (26.2)	48 (73.8)ab	0.006	TT or TC	30 (19.6)	123 (80.4)	0.013	TT	17 (26.2)	48 (73.8)	0.331						
		TC	13 (14.8)	75 (85.2)a										CC	5 (62.5)	3 (37.5)	TC or CC	18 (18.8)	78 (81.3)
		CC	5 (62.5)	3 (37.5)b															
	chr13:951644 12 [#]	AA	24 (24.5)	74 (75.5)	0.332	-	-	-		-	-	-							
		AG	11 (17.5)	52 (82.5)										-	-	-	-	-	

ABCC6	rs2274405	TT	6 (22.2)	21 (77.8)	0.715	TT	6 (22.2)	21 (77.8)	>0.999	TT or CT	20 (19.8)	81 (80.2)	0.438
		CT	14 (18.9)	60 (81.1)		CT or CC	29 (21.6)	105 (78.4)		CC	15 (25)	45 (75)	
		CC	15 (25)	45 (75)									
	rs2274406	TT	11 (31.4)	24 (68.6)	0.310	TT	11 (31.4)	24 (68.6)	0.163	TT or CT	25 (22.9)	84 (77.1)	0.685
		CT	14 (18.9)	60 (81.1)		CT or CC	24 (19)	102 (81)		CC	10 (19.2)	42 (80.8)	
		CC	10 (19.2)	42 (80.8)									
	rs2274407 [#]	CC	33 (23.7)	106 (76.3)	0.166								
		AC	2 (9.1)	20 (90.9)									
	rs899494	CC	26 (24.8)	79 (75.2)	0.250	CC or CT	29 (21.6)	105 (78.4)	>0.999	CC	26 (24.8)	79 (75.2)	0.233
		CT	3 (10.3)	26 (89.7)		TT	6 (22.2)	21 (77.8)		CT or TT	9 (16.1)	47 (83.9)	
		TT	6 (22.2)	21 (77.8)									
	rs2238472	CC	17 (16.2)	88 (83.8)a	0.008	CC or TC	33 (22.8)	112 (77.2)	0.526	CC	17 (16.2)	88 (83.8)	0.027*
		TC	16 (40)	24 (60)b		TT	2 (12.5)	14 (87.5)		TC or TT	18 (32.1)	38 (67.9)	
		TT	2 (12.5)	14 (87.5)ab									
	rs2856585	GG	28 (23.5)	91 (76.5)	0.667	GG or AG	33 (21.9)	118 (78.1)	>0.999	GG	28 (23.5)	91 (76.5)	0.394
		AG	5 (15.6)	27 (84.4)		AA	2 (20)	8 (80)		AG or AA	7 (16.7)	35 (83.3)	
		AA	2 (20)	8 (80)									
	rs9924755 [#]	GG	31 (26.3)	87 (73.7)	0.029*	-	-	-		-	-	-	
		AG	4 (9.3)	39 (90.7)		-	-	-		-	-	-	
	rs8058694 [#]	GG	10 (20.8)	38 (79.2)	>0.999	-	-	-		-	-	-	
		TG	25 (22.1)	88 (77.9)		-	-	-		-	-	-	
	rs8058696 [#]	GG	10 (20.8)	38 (79.2)	>0.999	-	-	-		-	-	-	
		CG	25 (22.1)	88 (77.9)		-	-	-		-	-	-	
	rs12931472	AA	10 (24.4)	31 (75.6)ab	0.015	AA or GA	30 (19.6)	123 (80.4)	0.013	AA	10 (24.4)	31 (75.6)	0.664
		GA	20 (17.9)	92 (82.1)a		GG	5 (62.5)	3 (37.5)		GA or GG	25 (20.8)	95 (79.2)	
		GG	5 (62.5)	3 (37.5)b									
	rs9940825 [#]	CC	20 (29.9)	47 (70.1)	0.052	-	-	-		-	-	-	
		TC	15 (16)	79 (84)		-	-	-		-	-	-	
	rs9930886 [#]	AA	20 (29.9)	47 (70.1)	0.052	-	-	-		-	-	-	
		GA	15 (16)	79 (84)		-	-	-		-	-	-	
	rs72657698 [#]	TT	27 (19.6)	111 (80.4)	0.109	-	-	-		-	-	-	
		CT	8 (34.8)	15 (65.2)		-	-	-		-	-	-	

ABCG2	rs2231142 [#]	GG	34 (23.4)	111 (76.6)	0.198	-	-	-	-	-	-	-	-
		TG	1 (6.3)	15 (93.8)		-	-	-	-	-	-	-	-
	rs2231137 [#]	CC	32 (23.5)	104 (76.5)	0.292	-	-	-	-	-	-	-	-
		TC	3 (12)	22 (88)		-	-	-	-	-	-	-	-
CCND1	rs1181031465 [#]	GG	25 (21.4)	92 (78.6)	0.833	-	-	-	-	-	-	-	-
		GA	10 (22.7)	34 (77.3)		-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2A6	chr19:40848742 [#]	TT	29 (19.5)	120 (80.5)	0.024*	-	-	-	-	-	-	-	-
		TC T	6 (50)	6 (50)		-	-	-	-	-	-	-	-
	rs1137115 [#]	CC	25 (21.2)	93 (78.8)	0.830	-	-	-	-	-	-	-	-
		CT	10 (23.3)	33 (76.7)		-	-	-	-	-	-	-	-
CYP3A5	rs6977165 [#]	TT	30 (19.9)	121 (80.1)	0.040*	-	-	-	-	-	-	-	-
		CT	5 (50)	5 (50)		-	-	-	-	-	-	-	-
GSTA1	rs1051775	TT	16 (23.5)	52 (76.5)	0.537	TT or CT	31 (20.9)	117 (79.1)	0.482	TT	16 (23.5)	52 (76.5)	0.700
		CT	15 (18.8)	65 (81.3)		CC	4 (30.8)	9 (69.2)		CT or CC	19 (20.4)	74 (79.6)	
		CC	4 (30.8)	9 (69.2)									
GSTM1	rs147668562 [#]	AA	17 (27.4)	45 (72.6)	0.175	-	-	-	-	-	-	-	-
		AG	18 (18.2)	81 (81.8)		-	-	-	-	-	-	-	-
	rs1065411 [#]	GG	19 (26.8)	52 (73.2)	0.183	-	-	-	-	-	-	-	-
		GC	16 (17.8)	74 (82.2)		-	-	-	-	-	-	-	-
	rs1056806	CC	9 (23.7)	29 (76.3)	0.696	CC or CT	25 (20.7)	96 (79.3)	0.659	CC	9 (23.7)	29 (76.3)	0.822
		CT	16 (19.3)	67 (80.7)		TT	10 (25)	30 (75)		CT or TT	26 (21.1)	97 (78.9)	
		TT	10 (25)	30 (75)									
GSTP1	rs1695	AA	21 (22.8)	71 (77.2)	0.865	AA or GA	29 (21.5)	106 (78.5)	0.801	AA	21 (22.8)	71 (77.2)	0.847
		GA	8 (18.6)	35 (81.4)		GG	6 (23.1)	20 (76.9)		GA or GG	14 (20.3)	55 (79.7)	
		GG	6 (23.1)	20 (76.9)									
	rs4891	TT	21 (22.8)	71 (77.2)	0.865	TT or CT	29 (21.5)	106 (78.5)	0.801	TT	21 (22.8)	71 (77.2)	0.847
		CT	8 (18.6)	35 (81.4)		CC	6 (23.1)	20 (76.9)		CT or CC	14 (20.3)	55 (79.7)	
		CC	6 (23.1)	20 (76.9)									
HSP90A A1	rs4947	AA	25 (24.3)	78 (75.7)	0.594	AA or AG	33 (21.9)	118 (78.1)	>0.999	AA	25 (24.3)	78 (75.7)	0.327
		AG	8 (16.7)	40 (83.3)		GG	2 (20)	8 (80)		AG or GG	10 (17.2)	48 (82.8)	
		GG	2 (20)	8 (80)									
	rs10873531	AA	25 (22.7)	85 (77.3)	0.944	AA or AG	33 (21.9)	118 (78.1)	>0.999	AA	25 (22.7)	85 (77.3)	0.838
		AG	8 (19.5)	33 (80.5)		GG	2 (20)	8 (80)		AG or GG	10 (19.6)	41 (80.4)	

		GG	2 (20)	8 (80)										
	rs8005905 [#]	AA	25 (22.7)	85 (77.3)	0.838	-	-	-	-	-	-	-	-	
		AT	10 (19.6)	41 (80.4)		-	-	-	-	-	-	-	-	
MTHFR	rs4846051 [#]	AA	28 (19.6)	115 (80.4)	0.073	-	-	-	-	-	-	-	-	
		AG	7 (38.9)	11 (61.1)		-	-	-	-	-	-	-	-	
	rs2066462 [#]	CC	29 (19.3)	121 (80.7)	0.014*	-	-	-	-	-	-	-	-	
		TC	6 (54.5)	5 (45.5)		-	-	-	-	-	-	-	-	
	rs1801133 ^{**}	CC	8 (23.5)	26 (76.5)	0.152	CC or TC	31 (25.2)	92 (74.8)	0.071	CC	8 (23.5)	26 (76.5)	0.816	
		TC	23 (25.8)	66 (74.2)		TT	4 (10.5)	34 (89.5)		TC or TT	27 (21.3)	100 (78.7)		
		TT	4 (10.5)	34 (89.5)										
	rs2066470 [#]	CC	29 (19.3)	121 (80.7)	0.014*	-	-	-	-	-	-	-	-	
		TC	6 (54.5)	5 (45.5)		-	-	-	-	-	-	-	-	
	NR3C1	rs6196 [#]	AA	18 (16.4)	92 (83.6)	0.023*	-	-	-	-	-	-	-	-
			GA	17 (33.3)	34 (66.7)		-	-	-	-	-	-	-	-
SLC19A1	rs79091853 [#]	CC	32 (21.1)	120 (78.9)	0.410	-	-	-	-	-	-	-	-	
		TC	3 (33.3)	6 (66.7)		-	-	-	-	-	-	-	-	
	rs12659	AA	5 (15.2)	28 (84.8)	0.163	AA	5 (15.2)	28 (84.8)	0.354	AA or GA	19 (17.4)	90 (82.6)	0.067	
		GA	14 (18.4)	62 (81.6)		GA or GG	30 (23.4)	98 (76.6)		GG	16 (30.8)	36 (69.2)		
		GG	16 (30.8)	36 (69.2)										
	rs1051266	AA	5 (11.1)	40 (88.9)	0.098	AA	5 (11.1)	40 (88.9)	0.054	AA or GA	24 (19.5)	99 (80.5)	0.261	
		GA	19 (24.4)	59 (75.6)		GA or GG	30 (25.9)	86 (74.1)		GG	11 (28.9)	27 (71.1)		
		GG	11 (28.9)	27 (71.1)										
SLC6A1	rs10055840 [#]	GG	18 (19.4)	75 (80.6)	0.441	-	-	-	-	-	-	-	-	
		CG	17 (25)	51 (75)		-	-	-	-	-	-	-	-	
	rs6884141	GG	15 (17.2)	72 (82.8)	0.053	GG or AG	30 (19.9)	121 (80.1)	0.040*	GG	15 (17.2)	72 (82.8)	0.179	
		AG	15 (23.4)	49 (76.6)		AA	5 (50)	5 (50)		AG or AA	20 (27)	54 (73)		
		AA	5 (50)	5 (50)										
TPRA1	chr3:127579846 [#]	AA	11 (20.4)	43 (79.6)	0.841	-	-	-	-	-	-	-	-	
		AG	24 (22.4)	83 (77.6)		-	-	-	-	-	-	-	-	

The Chi-square statistic is significant at the .05 level.

In comparisons with 3 categories, when significant, the letter system was used - different letters represent statistically different proportions.

*. Variants (and model) that went to further analysis. ** Variant selected for univariable analysis based on previously report in literature

#. For this variant no homozygote for the alternative allele was found.

Suppl Table 2. Comparison between the genotype of genetic variants and the outcome oral mucositis severity.

Gene	Variant	Genotype	Aditive model			Recessive model				Dominant model			
			Absence of oral mucositis or mild mucositis	Severe mucositis	P	Absence of oral mucositis or mild mucositis	Severe mucositis	P	Absence of oral mucositis or mild mucositis	Severe mucositis	P		
			(grades 0, 1 and 2) (n=138)	(grades 3 and 4) (n=23)		(grades 0, 1 and 2) (n=138)	(grades 3 and 4) (n=23)		(grades 0, 1 and 2) (n=138)	(grades 3 and 4) (n=23)			
			n (%)	n (%)		Genotype	n (%)		n (%)	Genotype		n (%)	n (%)
ABCA3	rs149532 [#]	GG	114 (86.4)	18 (13.6)	0.569	-	-	-	-	-	-	-	-
		GA	24 (82.8)	5 (17.2)		-	-	-	-	-	-		
	rs13332514	GG	94 (84.7)	17 (15.3)	0.246	GG or AG	125 (86.8)	19 (13.2)	0.270	GG	94 (84.7)	17 (15.3)	0.636
		AG	31 (93.9)	2 (6.1)		AA	13 (76.5)	4 (23.5)		AG or AA	44 (88)	6 (12)	
		AA	13 (76.5)	4 (23.5)									
ABCB1	rs1045642	TT	10 (90.9)	1 (9.1)ab	0.013	TT	1 (9.1)	10 (90.9)	>0.999	TT or CT	108 (82.4)	23 (17.6)	0.008
		CT	98 (81.7)	22 (18.3)a		CT or CC	22 (14.7)	128 (85.3)		CC	30 (100)	0 (0)	
		CC	30 (100)	0 (0)b									
	rs2032582	AA	10 (90.9)	1 (9.1)	0.685	AA	10 (90.9)	1 (9.1)	>0.999	AA or CA	102 (84.3)	19 (15.7)	0.445
		CA	92 (83.6)	18 (16.4)		CA or CC	128 (85.3)	22 (14.7)		CC	36 (90)	4 (10)	
		CC	36 (90)	4 (10)									
	rs1128503	AA	10 (90.9)	1 (9.1)	0.685	AA	10 (90.9)	1 (9.1)	>0.999	AA or GA	102 (84.3)	19 (15.7)	0.445
		GA	92 (83.6)	18 (16.4)		GA or GG	128 (85.3)	22 (14.7)		GG	36 (90)	4 (10)	
		GG	36 (90)	4 (10)									
	rs9282564 [#]	TT	135 (86)	22 (14)	0.464	-	-	-	-	-	-	-	-
		CT	3 (75)	1 (25)		-	-	-	-	-	-	-	
ABCC1	rs2230669 [#]	GG	128 (84.8)	23 (15.2)	0.360	-	-	-	-	-	-	-	-
		AG	10 (100)	0 (0)		-	-	-	-	-	-	-	
	rs35587	TT	69 (85.2)	12 (14.8)	0.685	TT or CT	122 (84.7)	22 (15.3)	0.471	TT	69 (85.2)	12 (14.8)	>0.999
		CT	53 (84.1)	10 (15.9)		CC	16 (94.1)	1 (5.9)		CT or CC	69 (86.3)	11 (13.8)	
		CC	16 (94.1)	1 (5.9)									

ABCC1 (cont.)	rs35605	CC	73 (85.9)	12 (14.1)	0.437	CC or CT	125 (86.8)	19 (13.2)	0.270	CC	73 (85.9)	12 (14.1)	>0.999
		CT	52 (88.1)	7 (11.9)		TT	13 (76.5)	4 (23.5)		CT or TT	65 (85.5)	11 (14.5)	
		TT	13 (76.5)	4 (23.5)									
	rs8187858 [#]	CC	122 (84.7)	22 (15.3)	0.471	-	-		-	-	-		
		TC	16 (94.1)	1 (5.9)		-	-			-	-		
	rs2230671	GG	75 (84.3)	14 (15.7)	0.892	GG or AG	124 (85.5)	21 (14.5)	>0.999	GG	75 (84.3)	14 (15.7)	0.653
AG		49 (87.5)	7 (12.5)	AA		14 (87.5)	2 (12.5)	AG or AA		63 (87.5)	9 (12.5)		
AA		14 (87.5)	2 (12.5)										
ABCC2	rs2273697	GG	78 (90.7)	8 (9.3)a	0.025*	GG or GA	132 (87.4)	19 (12.6)	0.037	GG	78 (90.7)	8 (9.3)	0.071
		GA	54 (83.1)	11 (16.9)ab		AA	6 (60)	4 (40)		GA or AA	60 (80)	15 (20)	
		AA	6 (60)	4 (40)b									
	rs17222723 [#]	TT	106 (84.1)	20 (15.9)	0.413	-	-		-	-	-		
		AT	32 (91.4)	3 (8.6)		-	-			-	-		
	rs3740066	CC	38 (88.4)	5 (11.6)	0.857	CC or TC	130 (85.5)	22 (14.5)	1.000	CC	38 (88.4)	5 (11.6)	0.799
		TC	92 (84.4)	17 (15.6)		TT	8 (88.9)	1 (11.1)		TC or TT	100 (84.7)	18 (15.3)	
		TT	8 (88.9)	1 (11.1)									
	rs1137968 [#]	GG	106 (84.1)	20 (15.9)	0.413	-	-		-	-	-		
		TG	32 (91.4)	3 (8.6)		-	-			-	-		
	rs8187707 [#]	CC	106 (84.1)	20 (15.9)	0.413	-	-		-	-	-		
		TC	32 (91.4)	3 (8.6)		-	-			-	-		
	rs8187710 [#]	GG	106 (84.1)	20 (15.9)	0.413	-	-		-	-	-		
		AG	32 (91.4)	3 (8.6)		-	-			-	-		
ABCC3	rs4148416 [#]	CC	114 (87)	17 (13)	0.384	-	-		-	-	-		
		TC	24 (80)	6 (20)		-	-			-	-		
	rs2277624	CC	88 (87.1)	13 (12.9)	0.347	CC or TC	130 (85)	23 (15)	0.603	CC	88 (87.1)	13 (12.9)	0.496
		TC	42 (80.8)	10 (19.2)		TT	8 (100)	0 (0)		TC or TT	50 (83.3)	10 (16.7)	
		TT	8 (100)	0 (0)									
	rs1051640 [#]	AA	112 (85.5)	19 (14.5)	>0.999		-	-		-	-		
GA		26 (86.7)	4 (13.3)			-	-	-		-			
ABCC4	rs1751034	TT	55 (84.6)	10 (15.4)	0.746	TT or TC	130 (85)	23 (15)	0.603	TT	55 (84.6)	10 (15.4)	0.820
		TC	75 (85.2)	13 (14.8)		CC	8 (100)	0 (0)		TC or CC	83 (86.5)	13 (13.5)	
		CC	8 (100)	0 (0)									

ABCC6	chr13:9516441 2#	AA	84 (85.7)	14 (14.3)	>0.999		-	-	-	-	-	-		
		AG	54 (85.7)	9 (14.3)			-	-	-	-	-	-		
	rs2274405	TT	25 (92.6)	2 (7.4)	0.053	TT	25 (92.6)	2 (7.4)	0.372	TT or CT	92 (91.1)	9 (8.9)	0.018*	
		CT	67 (90.5)	7 (9.5)		CT or CC	113 (84.3)	21 (15.7)		CC	46 (76.7)	14 (23.3)		
		CC	46 (76.7)	14 (23.3)										
	rs2274406	TT	33 (94.3)	2 (5.7)a	0.011	TT	33 (94.3)	2 (5.7)	0.169	TT or CT	100 (91.7)	9 (8.3)	0.003*	
		CT	67 (90.5)	7 (9.5)b		CT or CC	105 (83.3)	21 (16.7)		CC	38 (73.1)	14 (26.9)		
		CC	38 (73.1)	14 (26.9)b										
	rs2274407#	CC	120 (86.3)	19 (13.7)	0.524		-	-		-		-		
		AC	18 (81.8)	4 (18.2)			-	-		-		-		
	rs899494	GG	88 (83.8)	17 (16.2)	0.635	GG or GA	113 (84.3)	21 (15.7)	0.372	GG	88 (83.8)	17 (16.2)	0.479	
		GA	25 (86.2)	4 (13.8)		AA	25 (92.6)	2 (7.4)		GA or AA	50 (89.3)	6 (10.7)		
		AA	25 (92.6)	2 (7.4)										
		rs2238472	CC	90 (85.7)	15 (14.3)	>0.999	CC or TC	124 (85.5)	21 (14.5)	>0.999	CC	90 (85.7)	15 (14.3)	>0.999
			TC	34 (85)	6 (15)		TT	14 (87.5)	2 (12.5)		TC or TT	48 (85.7)	8 (14.3)	
TT			14 (87.5)	2 (12.5)										
rs2856585		GG	104 (87.4)	15 (12.6)	0.069	GG or AG	132 (87.4)	19 (12.6)	0.037*	GG	104 (87.4)	15 (12.6)	0.313	
		AG	28 (87.5)	4 (12.5)		AA	6 (60)	4 (40)		AG or AA	34 (81)	8 (19)		
		AA	6 (60)	4 (40)										
rs9924755#		GG	100 (84.7)	18 (15.3)	0.799	-	-		-	-	-	-		
		AG	38 (88.4)	5 (11.6)		-	-		-	-	-	-		
rs8058694#		GG	35 (72.9)	13 (27.1)	0.005*	-	-		-	-	-	-		
		TG	103 (91.2)	10 (8.8)		-	-		-	-	-	-		
rs8058696#		GG	35 (72.9)	13 (27.1)	0.005*	-	-		-	-	-	-		
		CG	103 (91.2)	10 (8.8)		-	-		-	-	-	-		
rs12931472		AA	29 (70.7)	12 (29.3)a	0.008*	AA or GA	130 (85)	23 (15)	0.603	AA	29 (70.7)	12 (29.3)	0.003	
		GA	101 (90.2)	11 (9.8)b		GG	8 (100)	0 (0)		GA or GG	109 (90.8)	11 (9.2)		
	GG	8 (100)	0 (0)ab											
rs9940825#	CC	53 (79.1)	14 (20.9)	0.066	-	-		-	-	-	-			
	TC	85 (90.4)	9 (9.6)		-	-		-	-	-	-			
rs9930886#	AA	53 (79.1)	14 (20.9)	0.066*	-	-		-	-	-	-			
	GA	85 (90.4)	9 (9.6)		-	-		-	-	-	-			

ABCG2	rs72657698 [#]	TT	120 (87)	18 (13)	0.331	-	-	-	-	-	-		
		CT	18 (78.3)	5 (21.7)		-	-	-	-	-	-		
	rs2231142 [#]	GG	123 (84.8)	22 (15.2)	0.472	-	-	-	-	-	-		
		TG	15 (93.8)	1 (6.3)		-	-	-	-	-	-		
CCND1	rs2231137 [#]	CC	115 (84.6)	21 (15.4)	0.534	-	-	-	-	-	-		
		TC	23 (92)	2 (8)		-	-	-	-	-	-		
	rs1181031465 [#]	GG	102 (87.2)	15 (12.8)	0.449	-	-	-	-	-	-		
		GA	36 (81.8)	8 (18.2)		-	-	-	-	-	-		
rs1137115 [#]		CC	99 (83.9)	19 (16.1)	0.321	-	-	-	-	-	-		
		CT	39 (90.7)	4 (9.3)		-	-	-	-	-	-		
CYP3A5	rs6977165 [#]	TT	128 (84.8)	23 (15.2)	0.360	-	-	-	-	-	-		
		CT	10 (100)	0 (0)		-	-	-	-	-	-		
GSTA1	rs1051775	TT	61 (89.7)	7 (10.3)	0.452	TT or CT	127 (85.8)	21 (14.2)	>0.999	TT	61 (89.7)	7 (10.3)	0.259
		CT	66 (82.5)	14 (17.5)		CC	11 (84.6)	2 (15.4)		CT or CC	77 (82.8)	16 (17.2)	
		CC	11 (84.6)	2 (15.4)									
GSTM1	rs147668562 [#]	AA	50 (80.6)	12 (19.4)	0.169	-	-	-	-	-	-	-	
		AG	88 (88.9)	11 (11.1)		-	-	-	-	-	-	-	
	rs1065411 [#]	GG	58 (81.7)	13 (18.3)	0.257	-	-	-	-	-	-	-	
		GC	80 (88.9)	10 (11.1)		-	-	-	-	-	-	-	
	rs1056806	CC	33 (86.8)	5 (13.2)	0.235	CC or CT	107 (88.4)	14 (11.6)	0.116	CC	33 (86.8)	5 (13.2)	>0.999
		CT	74 (89.2)	9 (10.8)		TT	31 (77.5)	9 (22.5)		CT or TT	105 (85.4)	18 (14.6)	
TT		31 (77.5)	9 (22.5)										
GSTP1	rs1695	AA	79 (85.9)	13 (14.1)	0.703	AA or GA	117 (86.7)	18 (13.3)	0.539	AA	79 (85.9)	13 (14.1)	>0.999
		GA	38 (88.4)	5 (11.6)		GG	21 (80.8)	5 (19.2)		GA or GG	59 (85.5)	10 (14.5)	
		GG	21 (80.8)	5 (19.2)									
	rs4891	TT	79 (85.9)	13 (14.1)	0.703	TT or CT	117 (86.7)	18 (13.3)	0.539	TT	79 (85.9)	13 (14.1)	>0.999
		CT	38 (88.4)	5 (11.6)		CC	21 (80.8)	5 (19.2)		CT or CC	59 (85.5)	10 (14.5)	
		CC	21 (80.8)	5 (19.2)									
HSP90AA1	rs4947	AA	93 (90.3)	10 (9.7)a	0.024	AA or AG	132 (87.4)	19 (12.6)	0.037	AA	93 (90.3)	10 (9.7)	0.035
		AG	39 (81.3)	9 (18.8)ab		GG	6 (60)	4 (40)		AG or GG	45 (77.6)	13 (22.4)	
		GG	6 (60)	4 (40)b									
	rs10873531	AA	99 (90)	11 (10)a	0.024	AA or AG	132 (87.4)	19 (12.6)	0.037	AA	99 (90)	11 (10)	0.030

<i>MTHFR</i>	rs8005905 [#]	AG	33 (80.5)	8 (19.5)ab		GG	6 (60)	4 (40)		AG or GG	39 (76.5)	12 (23.5)	
		GG	6 (60)	4 (40)b									
		AA	99 (90)	11 (10)	0.030*	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs4846051 [#]	AT	39 (76.5)	12 (23.5)		-	-	-	-	-	-	-	-
		AA	124 (86.7)	19 (13.3)	0.294	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs2066462 ^{***}	AG	14 (77.8)	4 (22.2)		-	-	-	-	-	-	-	-
		CC	128 (85.3)	22 (14.7)	>0.999	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs1801133 ^{**}	TC	10 (90.9)	1 (9.1)		-	-	-	-	-	-	-	-
		CC	27 (79.4)	7 (20.6)	0.129	CC or TC	102 (82.9)	21 (17.1)	0.108	CC	27 (79.4)	7 (20.6)	0.271
		TC	75 (84.3)	14 (15.7)		TT	36 (94.7)	2 (5.3)		TC or TT	111 (87.4)	16 (12.6)	
<i>NR3C1</i>	rs2066470 ^{***}	TT	36 (94.7)	2 (5.3)									
		CC	128 (85.3)	22 (14.7)	>0.999	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs6196	TC	10 (90.9)	1 (9.1)		-	-	-	-	-	-	-	-
		AA	97 (88.2)	13 (11.8)	0.227	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs79091853	GA	41 (80.4)	10 (19.6)		-	-	-	-	-	-	-	-
		CC	130 (85.5)	22 (14.5)	>0.999	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs12659	TC	8 (88.9)	1 (11.1)		-	-	-	-	-	-	-	-
		AA	31 (93.9)	2 (6.1)	0.266	AA	31 (93.9)	2 (6.1)	0.168	AA or GA	96 (88.1)	13 (11.9)	0.234
		GA	65 (85.5)	11 (14.5)		GA or GG	107 (83.6)	21 (16.4)		GG	42 (80.8)	10 (19.2)	
<i>SLC19A1</i>	rs1051266	GG	42 (80.8)	10 (19.2)									
		TT	43 (95.6)	2 (4.4)	0.061	TT	43 (95.6)	2 (4.4)	0.025*	TT or CT	106 (86.2)	17 (13.8)	0.793
		CT	63 (80.8)	15 (19.2)		CT or CC	95 (81.9)	21 (18.1)		CC	32 (84.2)	6 (15.8)	
	rs10055840 [#]	CC	32 (84.2)	6 (15.8)									
		GG	81 (87.1)	12 (12.9)	0.650	-	-	-	-	-	-	-	-
	rs6884141	CG	57 (83.8)	11 (16.2)		-	-	-	-	-	-	-	-
		GG	72 (82.8)	15 (17.2)	0.381	GG or AG	128 (84.8)	23 (15.2)	0.360	GG	72 (82.8)	15 (17.2)	0.268
		AG	56 (87.5)	8 (12.5)		AA	10 (100)	0 (0)		AG or AA	66 (89.2)	8 (10.8)	
	chr3:12757984 6 [#]	AA	10 (100)	0 (0)									
		AG	46 (85.2)	8 (14.8)	>0.999	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>TPRA1</i>	6 [#]	AG	92 (86)	15 (14)		-	-	-	-	-	-	-	-

The Chi-square statistic is significant at the ,05 level. In comparisons with 3 categories, when significant, the letter system was used - different letters represent statistically different proportions. *. Variants (and model) that went to further analysis. ** Variant selected for univariable analysis based on previously report in literature

#. For this variant no homozygote for the alternative allele was found.

Table 2. Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the outcome of presence of oral mucositis.

Gene	SNV marker	Genotype	Univariate regression		Multivariate Poisson regression	
			PR [CI95%]	P	PR [CI95%]	P
<i>ABCA3</i>	rs13332514	AA or AG	1.321 [1.151; 1.516]	<0.001*	1,272 [1,116; 1,450]	<0,001*
<i>ABCB1</i>	rs1045642	TT	1.775 [0.925; 3.407]	0.085		
<i>ABCB1</i>	rs2032582	AA	1.775 [0.925; 3.407]	0.085		
<i>ABCB1</i>	rs1128503	TT	1.775 [0.925; 3.407]	0.085		
<i>ABCC1</i>	rs8187858 [#]	CC	1.535 [0.974; 2.419]	0.065		
<i>ABCC2</i>	rs17222723 [#]	TT	1.313 [1.005; 1.715]	0.046*		
<i>ABCC2</i>	rs3740066	TT or TC	1.402 [1.088; 1.806]	0.009*	1,383 [1,085; 1,762]	0,009*
<i>ABCC2</i>	rs1137968 [#]	GG	1.313 [1.005; 1.715]	0.046*		
<i>ABCC2</i>	rs8187707 [#]	CC	1.313 [1.005; 1.715]	0.046*		
<i>ABCC2</i>	rs8187710 [#]	GG	1.313 [1.005; 1.715]	0.046*		
<i>ABCC3</i>	rs2277624	CC or TC	2.144 [0.873; 5.262]	0.096		
<i>ABCC4</i>	rs1751034	TT or TC	2,144 [0,873; 5,262]	0.096		
<i>ABCC6</i>	rs2238472	CC	1.235 [1.012; 1.507]	0.037*		
<i>ABCC6</i>	rs9924755 [#]	GG	1.230 [1.065; 1.421]	0.005*		
<i>ABCC6</i>	rs12931472	AA or GA	2,144 [0,873; 5,262]	0.096		
<i>CYP3A5</i>	rs6977165	TT	1.603 [0.858; 2.994]	0.139		
<i>MTHFR</i>	rs2066462	CC	1.775 [0.925; 3.407]	0.085		
<i>MTHFR</i>	rs2066470 [#]	CC	1.775 [0.925; 3.407]	0.085		
<i>MTHFR</i>	rs1801133	TT	1.196 [1.030; 1.389]	0.019*	1,164 [1,006; 1,347]	0,041*
<i>NR3C1</i>	rs6196 [#]	AA	1.255 [1.016; 1.549]	0.035*		
<i>SLCO6A1</i>	rs6884141	GG or AG	1.603 [0.858; 2.994]	0.139		

[#] For this variant no homozygote for the alternative allele was found

P Poisson regression

* P<0.05

Table 3. Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the severity outcome of oral mucositis

Gene	SNV marker	Genotype	Univariate regression	
			PR [CI95%]	P
<i>ABCC2</i>	rs2273697	AA	4.300 [1.573; 11.757]	0.004*
<i>ABCC4</i>	rs2274405	TT or CT	2.619 [1.208; 5.678]	0.015*
<i>ABCC4</i>	rs2274406	TT or CT	3.261 [1.511; 7.039]	0.003*
<i>ABCC6</i>	rs2856585	AA	3.179 [1,335; 7.571]	0.009*
<i>ABCC6</i>	rs8058694 [#]	GG	3.060 [1.443; 6.492]	0.004*
<i>ABCC6</i>	rs8058696 [#]	GG	3.060 [1.443; 6.492]	0.004*
<i>HSP90AA1</i>	rs4947	GG	3,179 [1,335; 7,571]	0.009*
<i>HSP90AA1</i>	rs10873531	GG	3,179 [1,335; 7,571]	0.009*
<i>HSP90AA1</i>	rs8005905	AT or TT	2.353 [1.114; 4.970]	0.025*
<i>SLC19A1</i>	rs1051266	CT or CC	4.073 [0.995; 16.667]	0.051

[#] For this variant no homozygote for the alternative allele was found

P Poisson regression

* P<0.05

Impact of genetic variants in the occurrence and severity of oral mucositis related to HDMTX

Considering HDMTX cycles (n=110), 5 genetic variants showed association with the presence of OM in the univariable regression: one in *ABCA3* (rs13332514), two in *ABCC6* (rs9924755 and rs2238472), one in *MTHFR* (rs1801133), one in *NR3C1* (rs6196), as shown in Table 4.

In the multivariate analysis, two genetic variants showed association with the presence of OM, being the rs13332514 in *ABCA3* (p<0.001) and the rs1801133 in *MTHFR* (p=0.047). Regarding rs13332514, the AG or AA genotype group of patients had 40.2% higher risk to develop OM compared to GG, and about the rs1801133 variant, the TT genotype group of patients had 20.5% higher risk to develop OM compared to CT or CC.

The evaluation of OM severity demonstrated two variants with statistically significant results, rs2273697 in *ABCC2* and rs2274406 in *ABCC4*.

The gene ontogenic pathway and KEGG pathway enrichment analyses were carried out on GeneAnalytics™. The main pathways associated to the presence and severity of OM in HDMTX cycles are describe in table 6. Antifolate resistance and CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6 appears as important pathways for both.

Table 4. Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the outcome of presence of oral mucositis, in HDMTX cycles.

Gene	SNV marker	Genotype	Univariate regression		Multivariate Poisson regression	
			PR [CI95%]	P	PR [CI95%]	P
<i>ABCA3</i>	rs13332514	AG or AA	1.426 [1.190; 1.709]	<0.001*	1,402 [1,172; 1,676]	<0,001*
<i>ABCC6</i>	rs2238472	CC	1.377 [1.044; 1.816]	0.024*		
<i>ABCC6</i>	rs9924755#	AG	1.369 [1.147; 1.632]	<0.001*		
<i>MTHFR</i>	rs2066462	CC	1.812 [0.766; 4.290]	0.176		
<i>MTHFR</i>	rs2066470#	CC	1.812 [0.766; 4.290]	0.176		
<i>MTHFR</i>	rs1801133	TT	1.250 [1.033; 1.514]	0.022*	1,205 [1,003; 1,447]	0,047*
<i>NR3C1</i>	rs6196#	AA	1.444 [1.059; 1.968]	0.020*		

For this variant no homozygote for the alternative allele was found

P Poisson regression

* P<0.05

Table 5. Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the severity of mucositis in HDMTX cycles

Gene	SNV marker	Genotype	Univariate regression	
			PR [CI95%]	P
<i>ABCC2</i>	rs2273697	GA	3.333 [1.117; 9.946]	0.031*
<i>ABCC4</i>	rs2274406	TT or CT	2.786 [1.102; 7.041]	0.030*
<i>SLC19A1</i>	rs1051266	CT or CC	6.263 [0.858; 45.729]	0.070

For this variant no homozygote for the alternative allele was found

P Poisson regression

* P<0.05

Table 6. Gene ontogenic pathway enrichment analyses of gene association to presence and severity of OM in OS patients in HDMTX cycles.

OM	Genetic Ontogenic Pathway	Matched Genes	Total genes	Score
Presence	Antifolate resistance	1 (MTHFR)	31	7.47
	CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6	2 (ABCA3, ABCC6)	836	6.91
	One Carbon Pool by Folate	1 (MTHFR)	53	6.70
Severity	Antifolate resistance	2 (ABCC2, ABCC4)	31	18.93
	Bile secretion	2 (ABCC2, ABCC4)	89	15.89
	CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6	2 (ABCC2, ABCC4)	836	9.42
	Platinum drug resistance	1 (ABCC2)	73	7.23
	CAMP signaling pathway	1 (ABCC4)	219	5.65

Genetic variants impact the occurrence and severity of oral mucositis related to Doxorubicin + cisplatin

A total of 51 cycles of doxorubicin + cisplatin was analyzed using univariable analysis. Significant results involving only 1 genetic variant and presence of OM were found: rs3740066 in *ABCC2*. TC or TT genotype was related to higher presence of OM (PR [CI95%] – 1.574 [1.033; 2.397]; P= 0.035).

The analysis of OM severity was related to 8 genetic variants: rs2273697 in *ABCC2*, rs2274406 in *ABCC4*, rs2856585, rs8058696, rs8058694, rs12931472 in *ABCC6*, rs4947 and rs10873531 in *HSP90AA1* (table 7).

The gene ontogenic pathway and KEGG pathway enrichment analyses were carried out on GeneAnalytics™. The main pathways associated to presence and severity of OM in doxorubicin cycles are describe in table 8. Antifolate resistance and CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6 appears as important pathways for both.

Table 7. Comparison between the proportions and prevalence ratio of each genetic variant by their genotype model and the severity of oral mucositis, in doxorubicin+cisplatin cycles.

Gene	SNV marker	Genotype	Univariate regression	
			PR [CI95%]	P
ABCC2	rs2273697	AA	3.900 [1.234; 12.329]	0.020*
ABCC4	rs2274405	TT or CT	3.955 [0.881; 17.746]	0.073
ABCC4	rs2274406	TT or CT	4.650 [1.039; 20.805]	0.044*
ABCC6	rs2856585	AA	5.520 [1.848; 16.485]	0.002*
ABCC6	rs8058694 [#]	GG	10.850 [1.442; 81.666]	0.021*
ABCC6	rs8058696 [#]	GG	10.850 [1.442; 81.666]	0.021*
ABCC6	rs12931472	GA	0.177 [0.040; 0.784]	0.023*
HSP90AA1	rs4947	GG	5.520 [1.848; 16.485]	0.002*
HSP90AA1	rs10873531	GG	5.520 [1.848; 16.485]	0.002*

[#] For this variant no homozygote for the alternative allele was found

P Poisson regression

* P<0.05

Table 8. Gene ontogenic pathway enrichment analyses of gene association to presence and severity of OM in OS patients in doxorubicin + cisplatin cycles.

OM	Genetic Ontogenic Pathway	Matched Genes	Total genes	Score
Presence	Antifolate resistance	1 (ABCC2)	31	9.46
	Platinum drug resistance	1 (ABCC2)	73	8.23
	Bile secretion	1 (ABCC2)	89	7.94
	CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6	1 (ABCC2)	836	4.71
Severity	CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6	4 (ABCC6, ABCC2, ABCC4, HSP90AA1)	836	18.84
	Antifolate resistance	2 (ABCC2, ABCC4)	31	16.35
	Bile secretion	2 (ABCC2, ABCC4)	89	13.31

Discussion

OM is one of the most common and important acute toxicity related to the chemotherapy regimens in pediatric oncological patients. Several risk factors have been reported (de FARIAS GABRIEL et al., 2021; ELAD et al., 2021) however, scarce studies evaluated the gene variants associated with its development and severity (VIANA-FILHO et al., 2021; GONG et al., 2021; OOSTEROM et al., 2018; GUTIERREZ-CAMINO et al., 2017). Pharmacogenetics approaches is the ultimate goal applied to understand how genetic variability influences drug treatment outcomes which may provide useful information to improve the effectiveness and safety of currently used treatment protocols (HATTINGER et al 2020). To our best knowledge, the current study was seemed to be the first study that analyzed 20 genes and 61 genetic variants related to the metabolism and transport of the antineoplastic' methotrexate, doxorubicin, cisplatin and cyclophosphamide with the development and severity of OM in pediatric patients with osteosarcoma. Our results demonstrated that OM is highly incident in pediatric patients independently of chemotherapy protocol used. Regarding the genetic variants we demonstrated that some variants have impact in the presence and severity of OM's being some of them related to HDMTX, others to Doxorubicin + cisplatin and other were associated to both drugs protocols. Also, we brought the main gene ontogenic pathway analysis which identified the most important biological processes involved in pathobiology of OM in these patients.

In the present study, 14 patients with osteosarcoma submitted to 161 CT cycles were evaluated. All patients presented OM at least in one cycle of CT. OM was diagnosed in 79.5% of CT cycles. The OM graduation ranged from 1 to 3 according to WHO scale with the peak of severity observed between days 8 and 14 after the CT infusion. All patients with OS presented OM at least in one cycle of QT treatment being OM grade 1 observed in 41 (32.5%) cycles; grade 2 in 62 (49.2%) cycles; and grades 3 in 23 (18.3%) cycles. In addition, our results appointed that toxicity of the treatment is not cumulative along the treatment. In general, these results agree with the previous literature that described an incidence of OM varying from 18 to 80% among those who were treated for solid and hematologic cancers (ELAD et al., 2021; CURRA et al., 2021; VALER et al.,

2020; de FARIAS GABRIEL et al., 2021; MCTIERNAN et al., 2012). High incidence of OM was expected since patients with OS received protocol of HDMTX and it has been reported severe grades of OM in pediatric patients using HDMTX; combination chemotherapy of HDMTX with doxorubicin or cyclophosphamide (CURRA et al., 2021; VALER et al., 2020; de FARIAS GABRIEL et al., 2021). Nonetheless, one curious result was that doxorubicin+ cisplatin was so aggressive as HDMTX regarding presence or severity of OM. Additional interesting result was that despite of 64.3% of 14 evaluated patients presented OM grade 3, it was detected only in 18.3% of the 110 cycles. In addition, none of the patients was diagnosed with OM grade 4. These could be related to a combination of factors such as protocol of MTX rescue, preventive measures, and treatment with photobiomodulation since the identification of first sign of OM. Our institution has been using combined protocol of oral basic care and PBM as supportive care for oncological patients (WEISSHEIMER et al., 2017). PBM as preventive or treatment protocol for OM reduce the severity of manifestation because accelerate stimulate cellular metabolisms and stimulate the tissue healing and maintenance in stress challenge (ZADICK et al., 2019; MAZHARI; SHIRAZI; SHABZENDEHDAR, 2018; NUNES et al., 2020).

OM pathobiology is a complex and multifactorial process (ELAD et al., 2021; SONIS, 2004). Several risk factors have been described mainly in adults such as type of protocol, age, performance status, comorbidities, smoking status, and systemic condition. In pediatric group, the type of chemotherapeutic protocol used is of primary importance for the development and severity of OM (CURRA et al., 2021; de FARIAS GABRIEL et al., 2021). In addition, some genetic factors associated with increased risk for oral mucositis were described in a systematic review led by the Multinational Association for Supportive Care in Cancer/International Society for Oral Oncology (MASCC/ISOO) Mucositis Study Group (WARDILL et al., 2020). The mainly genetic factors associated with increased OM risk was some genes involved in drug-metabolizing and inflammatory/immune pathways, and cellular growth and DNA repair mechanisms (WARDILL et al., 2020). However, the investigation of the significance of genetic factors influencing MTX, doxorubicin and cisplatin in pediatric patients specially with OS still in the initial phases. In this context our

study is pioneer and brought new insights of some candidate gene that are involved in these chemotherapy agents and their relationship with the development and severity of OM.

MTX is a folic acid antagonist frequently used to treat osteosarcoma. Monitoring of MTX plasma level have been consistently used in clinical practice for evaluate renal toxicity but maybe a limited predictor of other side effects. Genetic variants of enzymes involved in the metabolism of MTX have been pointed out as contributor to different responses and levels of toxicities to MTX in pediatric osteosarcoma patients. In the present study, we evaluated the association of variants of different genes involved in the metabolism of HDMTX with presence and severity of OM. Regarding the presence of OM, after univariable analysis, significant genetic variants in *ABCA3*, *ABCC6*, *MTHFR*, *NR3C1* genes were identified. In multivariable analysis only *ABCA3* and *MTHFR* was found. In the *ABCA3* (rs13332514), the AG or AA genotype group of patients had 40.2% higher risk to develop OM compared to GG. In the *MTHFR* (rs1801133) the TT genotype group of patients had 20.5% higher risk to develop OM compared to CT or CC. In literature, *MTHFR* 677C>T (rs1801133) variant has been extensively studied worldwide as a risk factor for OM and other toxicities. However, data still conflicting. Some studies confirmed our findings and showed that mutation in rs1801133 can result in higher risk of developing mucositis after HDMTX administration (MAAGDENBERG et al., 2021; CAMPBELL et al., 2016). Ramírez-Pacheco et al. (2016) evaluated LLA patients and observed that individuals with CC genotype in *MTHFR* (rs1801133) have more risk to develop OM. Gemmati et al. (2007) demonstrated that patients with TT genotype in *MTHFR* (rs1801133) has more prevalence of OM compared to the other genotypes (CT and CG). However, in some studies, evaluating patients with osteosarcoma (XIE et al., 2018; PARK; SHIN, 2016) and LLA (FRIKHA et al., 2019; HUANG et al., 2008) the authors did not find differences in OM scores with different genotypes and variants of *MTHFR*. Further research is clearly warrant, especially in pediatric oncologic patients, for better establish of the relationship of *MTHFR* variants with OM and possible future use of genotyping of this gene to personalize medicine.

Among the main and more interestingly results of the present study was the association of genetic variants of *ABC* family genes with the presence of mucositis in pediatric patients undergoing the doxorubicin + cisplatin protocol and severe grade of OM in both chemotherapeutic protocols. *ABC* family genes encodes transmembrane proteins (ATP-binding cassette) that are responsible for pumping out MTX from the cell (drug efflux). The impact of these genes in pharmacokinetics and toxicities related to these drugs are poorly described in the literature (HEGYI et al., 2017). Genetic variants of *ABCC2* and *ABCG2* have been associated with loss of function of these transport proteins resulting in several toxicities, including in the oral mucosa (LIU et al., 2014). Viana-Filho et al. (2021) evaluated the genetic variants of *MTHFR* (rs1801133), *DNMT3B* (rs2424913), *ABCC2* (rs717620), *ABCG2* (rs2231137) and *ABCG2* (rs2231142) in oncological patients treated with MTX, and only found association in the *ABCG2* gene (rs2231142). Regarding doxorubicin, in the present study, the rs3740066 and rs2273697 in *ABCC2* gene were associated with the presence and severity OM, respectively. In addition, rs2273697 was also associated with the OM severity during MTX use. In our sample, patients with rs3740066 (p. Ile1324) TC or TT genotype had 1.5-fold higher presence of OM. Previous studies do not explain this result, since the T allele was related to higher *ABCC2* expression levels (EDAVANA et al., 2015). However, this variant has been related to severe neutropenia and nausea risk during the use of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide (TECZA et al., 2018). Additionally, this variant was associated to the increase of the irinotecan AUC in patients with solid tumors (ROSNER et al., 2008). Although this is a silent variant, it could be related to alternative splicing regulation. In relation to the rs2273697 variant, the A allele is related to the decrease of the transport activity (MEGARAJ et al., 2011; WEN; JOY; ALEKSUNES, 2017), what could be related to higher drug plasma concentrations. We found in our sample that individuals who present the AA genotype have almost 4-fold higher prevalence of severe OM (grade 3) when compared to GA + GG patients, which can be explained by the possible drug accumulation caused by this variant. Also, we found association of rs2274406 in *ABCC4* gene and rs2856585, rs8058694, rs8058696, and rs12931472 in *ABCC6* gene to severity OM during use of doxorubicin. More studies are needed to further evaluate how these variants impact the *ABCC4* and *ABCC6* proteins, but we

hypothesize that they might alter the transport activity, changing the drug plasma concentration leading to the toxicity. As far as we know, this is the first study to report the association of these variants with the risk of OM during use of doxorubicin and MTX in pediatric patients with osteosarcoma. In general, our results pointed that variant of ABC family genes should be more investigated in pediatric patients.

In relation to *HSP90AA1* gene, it encodes a protein that acts as an important regulator of autophagy and is described as a key factor in the osteosarcoma chemoresistance (XIAO et al., 2018). In our sample, we found that it is also involved in the OM severity during doxorubicin use. Both rs4947 GG and rs10873531 GG genotypes were associated to higher prevalence of severe OM in patients using this drug

Although the identification of a single genetic variant has been reported and associated with some significant clinical outcomes and toxicities it is important to recognize that the pathway of the metabolism of MTX, doxorubicin and cisplatin are very complex and of polygenic nature. Therefore, to properly understand the role of genetic variation would be better to analyze from pathway-based approaches. A pathway analysis is a powerful method for data assessment because it allows the interpretation of variants with respect to the biological processes supporting the idea of interaction of different genes. (CIRILLO; PARNELL; EVELO, 2017). In this sense, our results are innovative and promising because we analyzed 20 genes and 61 genetic variants. The intersection of significant genes associated *ABCC2* and *ABCC6* variants to presence and severity of OM. In addition, we used the KEGG pathway enrichment analysis, which permit the understanding of high-level functions and utilities of the biological system. In our sample, the main genetic ontogenic pathway related to OM in patients that received HDMTX and doxorubicin+cisplatin was antifolate resistance and CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6. Cdc6 plays is a key function in the DNA replication regulation, which is directly associated to the tumorigenesis. The overexpression of Cdc6 leads to the increased tumor proliferation (LIM; TOWNSEND, 2020). *HSP90AA1* and *ABC* family genes were related to this ontogenic pathway in our analysis, which can suggest that these genes could also play a role in the patient's clinical outcome.

The current study brought new aspects of the impact of genetic variants in the OM in pediatric patients with OS. Our results indicated that some genetic variants especially linked to *ABC* gene family should be more investigated. Our main limitation is the sample size that is relatively small, which may restrict some result interpretation. A large prospective study examining should be conducted in the future.

Conclusion

Genetic variant impact the occurrence and severity of OM in OS patients in treatment with HDMTX, doxorubicin and cisplatin. *MTHFR* variant was important for presence of OM and *ABC* gene family, mainly *ABCC2* and *ABCC4* seems to be involved in the presence and severity of this toxicity.

Referências

- BEKTAŞ K. K *et al.* Is the MDR1 C3435T polymorphism responsible for oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia? **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 13 n. 10, p. 5251-5, 2012
- BERNER, K *et al.* Time-trends on incidence and survival in a nationwide and unselected cohort of patients with skeletal osteosarcoma. **Acta Oncologica**, v. 54, n. 1, p. 25-33, 2015.
- CAMPBELL, J. M *et al.* Methotrexate-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.78, n.1, p.27-39, 2016.
- CIRILLO E, PARNELL L. D, EVELO C. T. A Review of Pathway-Based Analysis Tools That Visualize Genetic Variants. **Front Genet.** v. 7 n. 8 p. 174, 2017
- CURRA, M. *et al.* Incidence and risk factors for oral mucositis in pediatric patients receiving chemotherapy. **Supportive Care in Cancer**, p. 1-9, 2021.
- DE FARIAS GABRIEL, A. *et al.* Risk factors associated with the development of oral mucositis in pediatric oncology patients: Systematic review and meta-analysis. **Oral Diseases**, 2021.
- DEN HOED M. A. H *et al.* Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pharmacogenomics J.** v. 15 n. 3 p. 248-54, 2015
- EDAVANA V. K *et al.* Effect of MRP2 and MRP3 Polymorphisms on Anastrozole Glucuronidation and MRP2 and MRP3 Gene Expression in Normal Liver Samples. **Int J Cancer Res Mol Mech.** v. 1 n. 3, 2015
- ELAD S *et al.* The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. **CA Cancer J Clin**, 2021
- FRIKHA R *et al.* Comprehensive analysis of Methylenetetrahydrofolate reductase C677T in younger acute lymphoblastic leukemia patients: A single-center experience. **J Oncol Pharm Pract.** v. 25 n. 5 p. 1182-1186, 2019
- GEMMATI D *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non-Hodgkin's lymphoma patients: association with toxicity and survival. **Haematologica.** v. 92 n. 4 p. 478-85, 2007
- GONG, Y., *et al.* Association of MTHFR and ABCB1 polymorphisms with MTX-induced mucositis in Chinese paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia, lymphoma or osteosarcoma-A retrospective cohort study. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.46, n.6, p.1557-1563, 2021.
- GUTIERREZ-CAMINO, Á. *et al.* Involvement of miRNA polymorphism in mucositis development in childhood acute lymphoblastic leukemia treatment. **Pharmacogenomics**, v. 19, n. 18, p. 1403-1412, 2018.
- HATTINGER C. M *et al.* Candidate germline polymorphisms of genes belonging to the pathways of four drugs used in osteosarcoma standard chemotherapy

- associated with risk, survival and toxicity in non-metastatic high-grade osteosarcoma. **Oncotarget**. v. 20 n. 7 p. 61970-61987, 2016
- HEGYI M *et al.* Pharmacogenetic analysis of high-dose methotrexate treatment in children with osteosarcoma. **Oncotarget**. v. 7 n. 6 p. 9388-9398, 2017.
- HUANG L *et al.* Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. v. 22 n. 9 p. 1798-800, 2008
- HURRELL L *et al.* The Management of Pediatric Oncology Inpatients With Oral Mucositis. **J Pediatr Hematol Oncol**. v. 41 n. 8 p. 510-516, 2019
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Osteossarcoma: versão para Profissionais de Saúde**. 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-infantojuvenil/osteossarcoma/profissional-de-saude>. Acesso em: 05 de maio de 2021.
- JABEEN, S *et al.* Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 15 n. 5 p. 385–390, 2015
- Lalla R.V *et al.* Mucositis Guidelines Leadership Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**. v. 120 n. 10 p. 1453-61, 2014
- LIM N.; TOWNSEND P. A. Cdc6 as a novel target in cancer: Oncogenic potential, senescence and subcellular localisation. **Int J Cancer**. v. 15 n. 6 p. 1528-1534, 2020
- LIU *et al.* Association of ABCC2 -24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. **PLoS One**. v. 9 n. 1 p. 82681, 2014
- LUETKE, A. *et al.* Osteosarcoma treatment—where do we stand? A state of the art review. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 4, p. 523-532, 2014.
- MAAGDENBERG, H. *et al.* Genetic variants associated with methotrexate-induced mucositis in cancer treatment: A systematic review and meta-analysis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Epub 2021.
- MAZHARI, F.; SHIRAZI, A.S.; SHABZENDEHDAR, M. Management of oral mucositis in pediatric patients receiving cancer therapy: A systematic review and meta-analysis. **Pediatric blood & cancer**, v. 66, n. 3, p. e27403, 2018.
- MCTIERNAN A *et al.* Presence of chemotherapy-induced toxicity predicts improved survival in patients with localised extremity osteosarcoma treated with doxorubicin and cisplatin: a report from the European Osteosarcoma Intergroup. **Eur J Cancer**. v. 48 n. 5 p. 703-12, 2012
- MEGARAJ V *et al.* Functional analysis of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2). **Pharmacogenet Genomics**. v. 21 n. 8 p. 506-15, 2011

NUNES L.F.M., *et al.* Prophylactic photobiomodulation therapy using 660 nm diode laser for oral mucositis in paediatric patients under chemotherapy: 5-year experience from a Brazilian referral service. **Lasers in Medical Science**, v.35, n.8, p.1875-1886, 2020.

OOSTEROM, N. *et al.* The role of genetic polymorphisms in the thymidylate synthase (TYMS) gene in methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 28, n. 10, p. 223-229, 2018.

PARK, J.A.; SHIN, H.Y. Influence of genetic polymorphisms in the folate pathway on toxicity after high-dose methotrexate treatment in pediatric osteosarcoma. **Blood Research**, v.51, n.1, p.50-57, 2016.

RAMÍREZ-PACHECO A *et al.* Mexican Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Pilot Study of the MDR1 and MTHFR Gene Polymorphisms and Their Associations with Clinical Outcomes. **Genet Test Mol Biomarkers**. v. 20 n. 10 p. 597-602, 2016

RODRIGUES-OLIVEIRA, L. *et al.* Direct costs associated with the management of mucositis: A systematic review. **Oral Oncology**, v. 118, p. 105296, 2021.

ROSNER G. L *et al.* Pharmacogenetic pathway analysis of irinotecan. **Clin Pharmacol Ther**. v. 84 n. 3 p. 393-402, 2008

SENERCHIA A. A *et al.* Results of a randomized, prospective clinical trial evaluating metronomic chemotherapy in nonmetastatic patients with high-grade, operable osteosarcomas of the extremities: A report from the Latin American Group of Osteosarcoma. **Treatment.Cancer**. v. 15 n. 6 p. 1003-1010, 2017

SHOUVAL, R. *et al.* Risk factors and implications of oral mucositis in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **European journal of haematology**, v. 103, n. 4, p. 402-409, 2019.

Sonis S. T. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral Oncol**. v. 45 n. 12 p. 1015-20, 2009

SONIS, S.T. Pathobiology of mucositis. **Semin Oncol Nurs**, v. 20, p. 11-15, 2004.

STRAUSS S. J *et al.* ESMO Guidelines Committee, EURACAN, GENTURIS and ERN PaedCan. Bone sarcomas: ESMO-EURACAN-GENTURIS-ERN PaedCan Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**. v. 32 n. 12 p. 1520-1536, 2021

Tecza K *et al.* Pharmacogenetics of toxicity of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients. **Oncotarget**. v. 9 n. 10 p. 9114-9136, 2018

VALER J. B *et al.* Oral mucositis in childhood cancer patients receiving high-dose methotrexate: Prevalence, relationship with other toxicities and methotrexate elimination. **Int J Paediatr Dent**. v. 31 n. 2 p. 238-246, 2021

VIANA FILHO, J.M.C. *et al.* ABCG2 polymorphism, age and leukocyte count may contribute to oral mucositis in oncopediatric patients. **Brazilian Dental Journal**, v.32, n.2, p.14-26, 2021.

VILLA, A.; SONIS, S.T. An update on pharmacotherapies in active development for the management of cancer regimen-associated oral mucositis. **Expert Opinion in Pharmacotherapy**, v.21, n.5, p.541-548, 2020.

WARDILL, H. R. Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Prediction of mucositis risk secondary to cancer therapy: A systematic review of current evidence and call to action. **Supportive Care in Cancer**. v. 28 n.11 p. 5059-5073, 2020

WEISSHEIMER, C. *et al.* New photobiomodulation protocol prevents oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation recipients—a retrospective study. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 9, p. 2013-2021, 2017.

WEN X; JOY M. S; ALEKSUNES L. M. In Vitro Transport Activity and Trafficking of MRP2/ABCC2 Polymorphic Variants. **Pharm Res**. v. 34 n. 8 p. 1637-1647, 2017

XIAO X *et al.* HSP90AA1-mediated autophagy promotes drug resistance in osteosarcoma. **J Exp Clin Cancer Res**. v. 28 n. 1 p. 201, 2018

XIE L *et al.* More severe toxicity of genetic polymorphisms on MTHFR activity in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. **Oncotarget**. v. 14 n. 9 p. 11465-11476, 2017

ZADIK, Y. *et al.* Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. **Supportive Care in Cancer**, v.27, n.10, p.3969-3983, 2019.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A MB é um efeito adverso agudo importante e debilitante que acomete os pacientes pediátricos submetidos à tratamento antineoplásico. É um evento comum, que acarreta em grande impacto na qualidade de vida do paciente. A severidade da MB está diretamente relacionada aos fármacos utilizados no esquema de tratamento quimioterápico e afeta negativamente o prognóstico do paciente, ocasionando interrupções do tratamento ou reduções de dose dos quimioterápicos, além de provocar um aumento no uso de recursos financeiros devido à hospitalização prolongada ou de uso de medicamentos extras. Devido ao impacto negativo que a MB acarreta na qualidade de vida e no tratamento dos pacientes oncológicos, mais investigações acerca dos fatores que aumentam o risco de prevalência ou severidade da MB precisam ser estudados.

As variantes gênicas podem apresentar um papel determinante na variabilidade da resposta aos fármacos, influenciando a resposta ao tratamento quimioterápico. Dessa forma, a farmacogenética pode fornecer informações relevantes para melhorar a eficácia e a segurança dos protocolos de tratamento utilizados atualmente, trazendo à tona a medicina personalizada. O tratamento individualizado parece ser um caminho promissor pela capacidade de redução de efeitos adversos por toxicidade.

O presente trabalho trouxe uma grande análise genética, com estudo de 61 variantes gênicas na prevalência e severidade de MB, em pacientes pediátricos com osteossarcoma, reafirmando algumas associações descritas na literatura e trazendo outras novas associações, ainda não estudadas. Nossos resultados principais trouxeram a relação do *MTHFR* na presença de MB, e genes da família *ABC*, principalmente *ABCC2* e *ABCC4* na presença e severidade da MB, relacionados aos principais quimioterápicos utilizados: MTX em altas doses e doxorrubicina+cisplatina. Mais estudos são necessários para investigar essas associações com grupos maiores de pacientes.

REFERÊNCIAS

- AHLMANN, M; HEMPEL, G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 78, n. 4, p. 661-671, 2016.
- AMADORI, F. *et al.* Low-level laser therapy for treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in childhood: a randomized double-blind controlled study. **Lasers in medical science**, v. 31, n. 6, p. 1231-1236, 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Key statistics for osteosarcoma. Atlanta: American Cancer Society. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/osteosarcoma/about/key-statistics.html> Access em Maio de 2021.
- AMINKENG, F. *et al.* Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Childhood Cancer. **Nature Genetics**, v.47, n.9, p. 1079–1084, 2015.
- ARAÚJO, S. N. *et al.* O paciente oncológico com mucosite bucal: desafios para o cuidado de enfermagem. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 2, p. 267-274, mar./abr. 2015.
- AUNG, LeLe *et al.* Second malignant neoplasms in long-term survivors of osteosarcoma: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. **Cancer**, v. 95, n. 8, p. 1728-1734, 2002.
- BARABAS, K. *et al.* Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. **Veterinary and comparative oncology**, v. 6, n. 1, p. 1-18, 2008.
- BAXTER, G.D. *et al.* Low level laser therapy (Photobiomodulation therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2017.
- BERNER, K. *et al.* Time-trends on incidence and survival in a nationwide and unselected cohort of patients with skeletal osteosarcoma. **Acta Oncologica**, v. 54, n. 1, p. 25-33, 2015.
- BEZINELLI, L.M., *et al.* Costeffectiveness of the introduction of specialized oral care with laser therapy in hematopoietic stem cell transplantation. **Hematological Oncology**, v.32, n.1, p.31–39, 2014.
- BISHOP, M.W.; JANEWAY, K.A.; GORLICK, R. Future directions in the treatment of osteosarcoma. **Current opinion in pediatrics**, v. 28, n. 1, p. 26, 2016.
- BOCKEL, S., *et al.* Pharmacological modulation of radiation-induced oral mucosal complications. **Cancer Radiotherapy**, v.22, n.5, p.429-437, 2018.
- BOUVET, R. *et al.* PharmFrag: An Easy and Fast Multiplex Pharmacogenetics Assay to Simultaneously Analyze 9 Genetic Polymorphisms Involved in Response Variability of Anticancer Drugs. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 24, p. 9650, 2020.

BRAY, F. *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The lancet oncology**, v. 13, n. 8, p. 790-801, 2012.

BURNINGHAM, Z.; HASHIBE, M.; SPECTOR, L.; SCHIFFMAN, J.D. The epidemiology of sarcoma. **Clinical Sarcoma Research**, v.4, n.1, p.14, 2012.

ÇAKMAK, S.; NURAL, N. Incidence of and risk factors for development of oral mucositis in outpatients undergoing cancer chemotherapy. **International Journal of Nursing Practice**, v.25, n.1, 2019.

CAMPBELL, J. M *et al.* Methotrexate-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.78, n.1, p.27-39, 2016.

CANDEIAS, S.M.; GAIPL, U.S. The immune system in cancer prevention, development and therapy. **Anticancer Agents in Medical Chemistry**, v.16, p.101–107, 2016.

CASTRO, J.R.L. *et al.* Características clínicas e epidemiológicas do paciente adolescente portador de osteossarcoma. **Acta fisiátrica**, v. 21, n. 3, p. 117-20

CEPEDA, V., *et al.* Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 3–18, 2007.

CHERMETZ, M. *et al.* Class IV laser therapy as treatment for chemotherapy-induced oral mucositis in onco-haematological paediatric patients: a prospective study. **International journal of paediatric dentistry**, v. 24, n. 6, p. 441-449, 2014.

CRONSHAW, M. *et al.* Photobiomodulation and Oral Mucositis: a systematic review. **Dentistry journal**, v. 8, n. 3, p. 87, 2020.

CSORDAS, K. *et al.* Associations of novel genetic variations in the folate-related and ARID5B genes with the pharmacokinetics and toxicity of high-dose methotrexate in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v.166, n.3, p. 410–420, 2014.

CURRA, M. Análise de fatores de risco associados à mucosite bucal em pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas e em pacientes oncológicos pediátricos. 2016. 53 f. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de concentração Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

CURRA, M. *et al.* Incidence and risk factors for oral mucositis in pediatric patients receiving chemotherapy. **Supportive Care in Cancer**, p. 1-9, 2021.

DÁVIDA, D. S. Osteossarcoma: tratamento quimioterápico. 2007. 68 f. TCC (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2007.

DE ARRUDA, J.A.A. *et al.* A multicenter study of malignant oral and maxillofacial lesions in children and adolescents. **Oral oncology**, v. 75, p. 39-45, 2017.

DE FARIAS GABRIEL, A. *et al.* Risk factors associated with the development of oral mucositis in pediatric oncology patients: Systematic review and meta-analysis. **Oral Diseases**, 2021.

DE PAULI PAGLIONI, M. *et al.* Is photobiomodulation therapy effective in reducing pain caused by toxicities related to head and neck cancer treatment? A systematic review. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, n. 11, p. 4043-4054, 2019.

DE PAULI PAGLIONI, M. *et al.* Tumor safety and side effects of photobiomodulation therapy used for prevention and management of cancer treatment toxicities. A systematic review. **Oral oncology**, v. 93, p. 21-28, 2019.

DENARD, B; LEE, C; YE, J. Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. **Elife**, v. 1, p. e00090, 2012.

EDUARDO, F.de P. *et al.* Severity of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation and an oral laser phototherapy protocol: a survey of 30 patients. **Photomedicine and laser surgery**, v. 27, n. 1, p. 137-144, 2009.

ELAD, S. *et al.* MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 126, n. 19, p. 4423-4431, 2020.

ELZAGALLAAI, A. A.; CARLETON, B. C.; RIEDER, M. J. Pharmacogenomics in Pediatric Oncology: Mitigating Adverse Drug Reactions While Preserving Efficacy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.61, n.1, p.1–21, 2021.

ENNEKING, W. F.; SPANIER, S.S.; GOODMAN, M.A. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.153, p.106-120, 1980.

FALI-DICKSON, J. M. *et al.* Oral mucositis-related oropharyngeal pain and correlative tumor necrosis factor- α expression in adult oncology patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. **Clinical therapeutics**, v. 29, n. 11, p. 2547-2561, 2007.

FENG, X; XIE, HG (Ed.). **Applying pharmacogenomics in therapeutics**. CRC Press, 2016.

FERLAY, J. *et al.* Global cancer observatory: cancer today. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon. 2020.

FUCHS, B; PRITCHARD, D.J. Etiology of osteosarcoma. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 397, p. 40-52, 2002.

GEORGE, S.; HAMBLIN, M.R.; ABRAHAMSE, H. Effect of red light and near infrared laser on the generation of reactive oxygen species in primary dermal fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 188, p. 60-68, 2018.

GERVASINI, G; MOTA-ZAMORANO, S. Clinical implications of methotrexate pharmacogenetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Current drug metabolism**, v. 20, n. 4, p. 313-330, 2019.

GOBBO, M., *et al.* Multicenter randomized, double-blind controlled trial to evaluate the efficacy of laser therapy for the treatment of severe oral mucositis induced by chemotherapy in children: laMPO RCT. **Pediatric Blood Cancer**, v.65, n.8, p.e27098, 2018.

GONG, Y., *et al.* Association of MTHFR and ABCB1 polymorphisms with MTX-induced mucositis in Chinese paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia, lymphoma or osteosarcoma-A retrospective cohort study. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.46, n.6, p.1557-1563, 2021.

GUIMARAES, D.M., *et al.* Low-level laser or LED photobiomodulation on oral mucositis in pediatric patients under high doses of methotrexate: prospective, randomized, controlled trial. **Supportive Care in Cancer**, v.29, n.11, p.6441-6447, 2021.

GUTIERREZ-CAMINO, Á. *et al.* Involvement of miRNA polymorphism in mucositis development in childhood acute lymphoblastic leukemia treatment. **Pharmacogenomics**, v. 19, n. 18, p. 1403-1412, 2018.

GUTIERREZ-CAMINO, A., *et al.* The miR-1206 microRNA variant is associated with methotrexate-induced oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pharmacogenetic Genomics**, v.27, n.8, p.303-306, 2017.

HAHM, E.; KULHARI, S.; ARANY, P.R. Targeting the pain, inflammation and immune (PII) axis: plausible rationale for LLLT: Schmerz, Entzündung und Immunantwort: Eine plausible Begründung für die LLLT. **Photonics & Lasers in Medicine**, v.1, n.4, p.241-254, 2012.

HARADA, K. *et al.* Efficacy of elemental diet on prevention for chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with oral squamous cell carcinoma. **Supportive Care in Cancer**, v. 24, n. 2, p. 953-959, 2016.

HE, M; ZHANG, B.; SHEN, N.; WU, N.; SUN, J. A systematic review and meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) on chemotherapy-induced oral mucositis in pediatric and young patients. **European Journal Pediatrics**, v.177, n.1, p.7-17, 2018.

HONG, C.H.L. *et al.* Systematic review of basic oral care for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, n. 10, p. 3949-3967, 2019.

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer. **CANCER TODAY: Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020.** 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home> <https://infogram.com/15-feb-international-childhood-cancer-day-1h1749vwqg1xl6z?live>. Acesso em: 15 de setembro de 2021.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Osteossarcoma: versão para Profissionais de Saúde.** 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-infantojuvenil/osteossarcoma/profissional-de-saude>. Acesso em: 05 de maio de 2021.

INCA. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer.** 6. eded. Rio de Janeiro: INCA: [s. n.], 2020.

JABEEN, S *et al.* Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 15 n. 5 p. 385–390, 2015

JAFFÉ, E.R.; KAUSHANSKY, K. The American Society of Hematology: a success at age 50. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 111, n. 1, p. 11-15, 2008.

JAFFE, N. Historical perspective on the introduction and use of chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. **Current Advances in Osteosarcoma**, p. 1-30, 2014.

JAFFE, N. Osteosarcoma: review of the past, impact on the future. The American experience. **Pediatric and adolescent osteosarcoma**, p. 239-262, 2009.

JAFFE, N., PURI, A., GELDERBLOM, H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms. **Sarcoma**, v. 2013, 2013.

KAUARK-FONTES, E. *et al.* Cost-effectiveness of photobiomodulation therapy for the prevention and management of cancer treatment toxicities: a systematic review. **Supportive Care in Cancer**, p. 1-10, 2021.

LAMBRECHT, L. *et al.* The role of the MTHFR C677T polymorphism in methotrexate-induced toxicity in pediatric osteosarcoma patients. **Pharmacogenomics**, v.18, n.8, 2017.

LIU, S.G. *et al.* Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 37761, 2017.

LOPEZ-LOPEZ, E., *et al.* Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood Cancer**, v.57, n.4, p.612-619, 2011.

LUETKE, A. *et al.* Osteosarcoma treatment—where do we stand? A state of the art review. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 4, p. 523-532, 2014.

MAAGDENBERG, H. *et al.* Genetic variants associated with methotrexate-induced mucositis in cancer treatment: A systematic review and meta-analysis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Epub 2021.

Marques SA. Consenso brasileiro de psoríase 2009: guias de avaliação e tratamento. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Disponível em: http://www.sausedireta.com.br/docsupload/1340065364Arquivos_Pdfs_Capitulo8.pdf. Acesso em 22 de junho de 2019.

MARTINS, C.M.; WAGNER, S.C.; LINDEN, R. Individualização Farmacocinética das Doses de 5- Fluoruracil no Câncer Colorretal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.59, n.2, 271-280, 2013.

MAZHARI, F.; SHIRAZI, A.S.; SHABZENDEHDAR, M. Management of oral mucositis in pediatric patients receiving cancer therapy: A systematic review and meta-analysis. **Pediatric blood & cancer**, v. 66, n. 3, p. e27403, 2018.

MEDELLIN-GARIBAY, S.E. *et al.* Population pharmacokinetics of methotrexate in Mexican pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 21-31, 2020.

MIRABELLO, L. *et al.* Germline TP53 variants and susceptibility to osteosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, p. djv101, 2015.

MIRABELLO, L.; TROISI, R.J.; SAVAGE, S.A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. **International journal of cancer**, v. 125, n. 1, p. 229-234, 2009.

MIRANDA-SILVA, W. *et al.* MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis: sub-analysis of current interventions for the management of oral mucositis in pediatric cancer patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 29, n. 7, p. 3539-3562, 2021.

MIRANDA-SILVA, W. *et al.* Oral mucositis in paediatric cancer patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation preventively treated with professional dental care and photobiomodulation: Incidence and risk factors. **International Journal in Paediatric Dentistry**, Epub ahead of print 2021.

NOIRRI-ESCLASSAN, E. *et al.* Photobiomodulation with a combination of two wavelengths in the treatment of oral mucositis in children: The PEDIALASE feasibility study. **Archives Pediatric**, v.26, n.5, p.268-274, 2019.

NUNES L.F.M., *et al.* Prophylactic photobiomodulation therapy using 660 nm diode laser for oral mucositis in paediatric patients under chemotherapy: 5-year experience from a Brazilian referral service. **Lasers in Medical Science**, v.35, n.8, p.1875-1866, 2020.

OOSTEROM, N. *et al.* The role of genetic polymorphisms in the thymidylate synthase (TYMS) gene in methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 28, n. 10, p. 223-229, 2018.

OTMANI, N.; HATTAD, S. Clinical Outcome in Children with Chemotherapy-Induced Mucositis. In: **Seminars in Oncology Nursing**. WB Saunders, 2021. p. 151-160.

OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The epidemiology of osteosarcoma. **Cancer Treatment Research**, v.152, p.3-13, 2009.

OUYANG, Z.; LI, X. Inhibitory effects of tamoxifen and doxorubicin, alone and in combination, on the proliferation of the MG63 human osteosarcoma cell line. **Oncology letters**, v. 6, n. 4, p. 970-976, 2013.

PAIXÃO A. C. F. S. S. *et al.* Protocolo Estadual de quimioterapia antineoplásica – Onco-pediatria 3. Diretoria de atenção Integral à Saúde. Aracaju: Secretaria de Estado da Saúde de Sergipe/ FUNESA, 2016.

PARK, J.A.; SHIN, H.Y. Influence of genetic polymorphisms in the folate pathway on toxicity after high-dose methotrexate treatment in pediatric osteosarcoma. **Blood Research**, v.51, n.1, p.50-57, 2016.

PARULEKAR, W. *et al.* Scoring oral mucositis. **Oral oncology**, v. 34, n. 1, p. 63-71, 1998.

PATEL, P. *et al.* Clinical practice guideline for the prevention of oral and oropharyngeal mucositis in pediatric cancer and hematopoietic stem cell transplant patients: 2021 update. **European Journal of Cancer**, v. 154, p. 92-101, 2021.

PELLICIOLI, A.C. A. *et al.* Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. **Journal of biomedical optics**, v. 19, n. 2, p. 028002, 2014.

PENG, H., *et al.* Enhanced antitumor efficacy of cisplatin for treating ovarian cancer in vitro and in vivo via transferrin binding. **Oncotarget**, v.8, n.28, p.45597-45611, 2017.

PILLAI, R.K.; JAYASREE, K. Rare cancers: challenges & issues. The Indian journal of medical research, v. 145, n. 1, p. 17, 2017.

RADTKE, S., *et al.* Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.121, n.6, p.5145-5143, 2013.

RAMSEY, L.B., *et al.* Genome-wide study of methotrexate clearance replicates SLCO1B1. **Blood**, v.121, n.6, p.898-904, 2013.

RODEN, D. M.; *et al.* Pharmacogenomics. **Lancet**, v. 394, p. 521–532, 2019.

RODRIGUES-OLIVEIRA, L. *et al.* Direct costs associated with the management of mucositis: A systematic review. **Oral Oncology**, v. 118, p. 105296, 2021.

ROSEN, G. *et al.* Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. **Cancer**, v. 49, n. 6, p. 1221-1230, 1982.

ROY, P.; YU, L.J.; CRESPI, C.L.; WAXMAN, D.J. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metabolism e Disposition*, v.27, n.6, p.655-666, 1999.

RÜHLE, A. *et al.* The current understanding of mesenchymal stem cells as potential attenuators of chemotherapy-induced toxicity. **International journal of cancer**, v. 143, n. 11, p. 2628-2639, 2018.

SADYKOVA, L.R. *et al.* Epidemiology and risk factors of osteosarcoma. *Cancer investigation*, v. 38, n. 5, p. 259-269, 2020.

SANTOS, P.S.S. *et al.* Mucosite bucal: perspectivas atuais na prevenção e tratamento. *RGO, Porto Alegre*, v. 57, n. 3, p. 339-344, jul./set. 2009.

SAYLORS III, R.L. *et al.* Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group phase II study. **Journal of clinical oncology**, v. 19, n. 15, p. 3463-3469, 2001.

SHOUVAL, R. *et al.* Risk factors and implications of oral mucositis in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **European journal of haematology**, v. 103, n. 4, p. 402-409, 2019.

SILVA, L.C. *et al.* The impact of low-level laser therapy on oral mucositis and quality of life in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation using the oral health impact profile and the functional assessment of cancer therapy-bone marrow transplantation questionnaires. **Photomedicine and laser surgery**, v. 33, n. 7, p. 357-363, 2015.

SMELAND, S. *et al.* Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort. **European Journal of Cancer**, v. 109, p. 36-50, 2019.

SONIS, S.T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncology**, v. 34, p. 39-43, 1998

SONIS, S.T. Pathobiology of mucositis. **Semin Oncol Nurs**, v. 20, p. 11-15, 2004.

SONIS, S.T.; VILLA, A. Phase II investigational oral drugs for the treatment of radio/chemotherapy induced oral mucositis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.27, n.2, p.147-154, 2018.

STENZEL, S.L. *et al.* Oxidative stress and neurobehavioral problems in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients undergoing chemotherapy. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 32, n. 2, p. 113, 2010.

SUN, C., *et al.* Genetic polymorphism of *SLC31A1* is associated with clinical outcomes of platinum-based chemotherapy in non-small-cell lung cancer patients through modulating microRNA-mediated regulation. **Oncotarget**, v.9, n.35, p.23860-23877, 2018.

TA, H.T. *et al.* Osteosarcoma treatment: state of the art. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1, p. 247-263, 2009.

TREVINO, L.R., *et al.* Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. **Journal of Clinical Oncology**, v.27, n.35, p.5972–5978, 2009.

UNNI, K.K., *et al.* Dahlin's Bone Tumors: General aspects and data on 10.165 cases. 6th ed. Philadelphia, PA 19013 USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.

VIANA FILHO, J.M.C. *et al.* ABCG2 polymorphism, age and leukocyte count may contribute to oral mucositis in oncopediatric patients. **Brazilian Dental Journal**, v.32, n.2, p.14-26, 2021.

VILLA, A.; SONIS, S.T. An update on pharmacotherapies in active development for the management of cancer regimen-associated oral mucositis. **Expert Opinion in Pharmacotherapy**, v.21, n.5, p.541-548, 2020.

WANG, L.L.; CHINTAGUMPALA, M; GEBHARDT, M.C. Osteosarcoma: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and histology. In: *UpToDate*. Retrieved May, v. 1, n. 0, p. 2007.

WANG, L.L.; GEBHARDT, M.C.; RAINUSSO, N. Osteosarcoma: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and histology In: **UpToDate**. 2017. Available in: https://www.uptodate.com/contents/osteosarcoma-epidemiology-pathogenesis-clinical-presentation-diagnosis-and-histology?search=osteosarcoma&source=search_result&selectedTitle=1~82&usage_type=default&display_rank=1.

WEISSHEIMER, C. *et al.* New photobiomodulation protocol prevents oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation recipients—a retrospective study. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 9, p. 2013-2021, 2017.

WINDSOR, R.E.; STRAUSS, S.J.; KALLIS, C.; WOOD, N.E.; WHELAN, J.S. Germline genetic polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma: a pilot study. **Cancer**, v.118, n.7, p.1856-1867, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **WHO handbook for reporting results of cancer treatment**. World Health Organization, 1979. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/37200>. Accessed 13 February 2021.

YANG, L; HU, X; XU, L. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 33, n. 5, p. 1445-1454, 2012.

ZADIK, Y. *et al.* Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. **Supportive Care in Cancer**, v.27, n.10, p.3969-3983, 2019.

ZECHA, J.A.E.M. *et al.* Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. **Supportive Care in Cancer**, v. 24, n. 6, p. 2781-2792, 2016.

ZHANG, H.N. *et al.* Impact of SLCO1B1 521T>C Variant on Leucovorin Rescue and Risk of Relapse in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With High-Dose Methotrexate. **Pediatric blood & cancer**, v.61, p.2203–2207, 2014.

ANEXO I

APROVAÇÃO ÉTICA

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS À FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA COM A TOXICIDADE E SOBREVIVÊNCIA DOS TRATAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS

Pesquisador: Manoela Domingues Martins

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 46986321.3.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.862.871

Apresentação do Projeto:

O câncer é a principal causa de morte entre crianças e adolescentes em todo o mundo. Dentre os tipos mais comuns de cânceres infantis estão as leucemias, linfomas e o osteossarcoma. Embora possa exibir severos efeitos adversos imediatos e tardios, a quimioterapia ainda é um dos principais tratamentos para essas neoplasias e atua tanto em células tumorais como nas células normais. De modo geral, esses fármacos exibem estreitas janelas terapêuticas e, portanto, as diferenças entre as doses que produzem um efeito terapêutico e que causam toxicidade são limítrofes. Além disso, a resposta frente ao tratamento varia entre os indivíduos submetidos ao mesmo protocolo quimioterápico e a manifestação dos diferentes efeitos adversos pode ser modulada pelo estado de saúde do indivíduo, influências ambientais e por características genéticas. A farmacogenética estuda como a variabilidade genética individual pode estar relacionada à maior suscetibilidade a doenças, bem como influenciar na resposta ao tratamento farmacológico. Assim sendo, sabemos que o conhecimento de genes e suas variantes são essenciais para predizermos se estas drogas acarretarão toxicidade para determinado paciente. Desse modo, visando o manejo mais eficaz e seguro de drogas quimioterápicas, o presente estudo

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.862.871

tem como objetivo investigar a relação entre variantes genéticas associadas à farmacocinética e farmacodinâmica dos antineoplásicos metotrexato (MTX), doxorrubicina e ciclofosfamida na eficácia e no desenvolvimento de reação adversa em pacientes pediátricos com Osteossarcoma, Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Linfoma. Trata-se de um estudo observacional retrospectivo com a coleta de dados de prontuário e análise molecular de amostras já coletadas em estudo prévio de 82 pacientes oncológicos pediátricos atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre de 2015 a 2018. Serão coletadas informações sobre eventos de toxicidade hematológica, hepática, renal, gastrointestinal - com enfoque na mucosite oral (MO) - e cardíaca frente aos protocolos quimioterápicos envolvendo MTX, Doxorrubicina e Ciclofosfamida de acordo com os Critérios de Terminologia Comuns para Eventos Adversos (CTCAE) versão 5.0 do National Cancer Institute (NCI) e a MO será classificada de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS). As variantes genéticas identificadas em estudo prévio através de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) com equipamento Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) serão investigadas quanto a sua relação ou não com eventos de toxicidade. Análises complementares serão realizadas por PCR em tempo real e sequenciamento de Sanger.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a relação entre variantes genéticas associados à farmacocinética e farmacodinâmica dos antineoplásicos MTX, doxorrubicina e ciclofosfamida na eficácia e no desenvolvimento de reação adversa em pacientes pediátricos com Osteossarcoma, LLA, Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Linfoma.

Objetivo Secundários:

- Avaliar a relação entre variantes genéticas e a toxicidade hematológica em pacientes pediátricos com Osteossarcoma, LLA, LMA e Linfoma frente ao tratamento antineoplásico utilizando protocolos com MTX, doxorrubicina e ciclofosfamida.
- Avaliar a relação entre variantes genéticas e a toxicidade hepática em pacientes pediátricos com Osteossarcoma, LLA, LMA e Linfoma frente ao tratamento antineoplásico utilizando protocolos com MTX, doxorrubicina e ciclofosfamida.
- Avaliar a relação entre variantes genéticas e a toxicidade renal em pacientes pediátricos com Osteossarcoma, LLA, LMA e Linfoma frente ao tratamento antineoplásico utilizando protocolos com MTX, doxorrubicina e ciclofosfamida.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.862.871

- Avaliar a relação entre variantes genéticas e desordens gastrointestinais (com enfoque principal no desfecho de MO) em pacientes pediátricos com Osteossarcoma, LLA, LMA e Linfoma frente ao tratamento antineoplásico utilizando protocolos com MTX, doxorrubicina e ciclofosfamida.
- Avaliar a relação entre variantes genéticas e desordens cardíacas em pacientes pediátricos com Osteossarcoma, LLA, LMA e Linfoma frente ao tratamento antineoplásico utilizando protocolos com doxorrubicina.
- Avaliar a relação entre variantes genéticas e os desfechos de eficácia clínica (remissão, remissão completa, sobrevida e óbito) em pacientes pediátricos com Osteossarcoma, LLA, LMA e Linfoma frente ao tratamento antineoplásico utilizando protocolos com MTX, doxorrubicina e ciclofosfamida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são relativos aos dados, ou seja, invasão de privacidade e divulgação de dados confidenciais. Com o objetivo de minimizar esses riscos, as seguintes medidas serão tomadas: buscando a proteção dos dados, os pesquisadores envolvidos se comprometem a manter as informações em sigilo através da assinatura de termos de confidencialidade descritos no início da seção 3.7 do projeto completo e será realizada codificação das informações.

Benefícios:

A participação na pesquisa poderá contribuir para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes. Além disso, todos os participantes receberão um laudo de farmacogenética que poderá ser utilizado no futuro para guiar outros tratamentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto utilizará banco de dados anonimizado do projeto anterior 20140581 (CAAE 40921215600005327).

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS**



Continuação do Parecer: 4.862.871

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver conclusões ou pendências e lista de inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer N.º 4.768.353 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 10/07/2021. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (projeto versão e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para revisão de registros de 82 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto está cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa (20210140) para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.
- d) Deverão ser adicionados relatórios semestrais e um relatório final do projeto no cadastro do mesmo, no Sistema AGHUse Pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1299309.pdf	10/07/2021 21:13:28		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	AnexoIII_solicitacao_dispenza_TCLE_versao_2.pdf	10/07/2021 20:49:17	Stéfanie Thieme Perotto	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEPHCPA.pdf	10/07/2021 20:44:11	Stéfanie Thieme Perotto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_completo_versao_2.pdf	10/07/2021 20:38:54	Stéfanie Thieme Perotto	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

ANEXO II

APROVAÇÃO DA COMPESQ

UFRGS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Equipe Externa:

Nome: STÉFANIE THIEME PEROTTO
Ensino: doutorado - Início: 05/08/2021 Previsão de término: 31/12/2022

Nome: Mariana Rodrigues Botton
Pós-doutorado - Início: 01/09/2021 Previsão de término: 30/06/2022

Avaliações:

Comissão de Pesquisa de Odontologia - Aprovado em 16/08/2021 [Clique aqui para visualizar o parecer](#)

Anexos:

Projeto Completo Data de Envio: 05/08/2021
Documento de Aprovação Data de Envio: 05/08/2021
Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Data de Envio: 05/08/2021

Processos - Colaborador Convocado:

Projeto associado ao processo de colaborador do tipo Pós-Doutorado de Mariana Rodrigues Botton no período 01/09/2021 a 30/06/2022

O projeto de pesquisa em análise é coordenado pela Profa Manoela Domingues Martins e conta com a participação de pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Instituto do Câncer Infantil. O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, RS), conforme parecer anexado pela pesquisadora responsável. Em revisão de literatura, os pesquisadores discutem aspectos relacionados ao câncer infantil, com ênfase nos efeitos adversos imediatos e tardios dos fármacos quimioterápicos. Salientou-se que a resposta frente ao tratamento varia entre os indivíduos submetidos ao mesmo protocolo quimioterápico e a manifestação dos diferentes efeitos adversos pode ser modulada pelo estado de saúde do indivíduo, influências ambientais e por características genéticas. Abordou-se então a importância da área da farmacogenética, que estuda como a variabilidade genética individual pode estar relacionada à maior suscetibilidade a doenças, bem como influenciar na resposta ao tratamento farmacológico. Desse modo, visando o manejo mais eficaz e seguro de drogas quimioterápicas, o presente estudo tem como objetivo investigar a relação entre variantes genéticas associadas à farmacocinética e farmacodinâmica dos antineoplásicos metotrexato (MTX), doxorrubicina e ciclofosfamida na eficácia e no desenvolvimento de reação adversa em pacientes pediátricos com Osteossarcoma, Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Linfoma. Trata-se de um estudo observacional retrospectivo com a coleta de dados e análise molecular de amostras já realizadas em estudo prévio de 82 pacientes oncológicos pediátricos atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre de 2015 a 2018. Serão coletadas informações sobre eventos de toxicidade hematológica, hepática, renal, gastrointestinal, cardíaca e sobrevida frente aos protocolos quimioterápicos envolvendo MTX, Doxorrubicina e Ciclofosfamida de acordo com os Critérios de Terminologia Comuns para Eventos Adversos (CTCAE) versão 5.0 do National Cancer Institute (NCI) e a MO será classificada de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS). As variantes genéticas identificadas em estudo prévio através de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) com equipamento Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) serão investigadas quanto a sua relação ou não com eventos de toxicidade. Análises complementares serão realizadas por PCR em tempo real e sequenciamento de Sanger. As estratégias de análise de dados foram apresentadas. O projeto encontra-se em condições de aprovação quanto ao mérito por essa COMPESQ, que emite ciência quanto à sua

realização. Conforme mencionado anteriormente, o projeto foi aprovado pelo CEP-HCPA sob o número CAAE 46986321.3.0000.5327 e número de parecer 4.862.871.