UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO

LUÍSA COMERLATO JARDIM

ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS E O DESENVOLVIMENTO DE MUCOSITE ORAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA E LINFOMA EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Porto Alegre

2022

LUÍSA COMERLATO JARDIM

ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS E O DESENVOLVIMENTO DE MUCOSITE ORAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA E LINFOMA EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Odontologia, na área de Clínicas Odontológicas/Estomatologia.

**Orientadora:** Profª. Dra. Manoela Domingues Martins

**Coorientadora:** Dra. Marina Siebert

Porto Alegre

2022

**RESUMO**

Embora seja raro, o câncer infantil é uma importante causa de morbidade e mortalidade neste grupo de indivíduos. Dentre os principais tipos de câncer que afetam este grupo são reportados as leucemias e os linfomas. Existe uma interação complexa entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos, apesar de como esta interação ocorre ainda não ser completamente compreendida. A quimioterapia (QT) é a principal forma de tratamento para o câncer infantil, o qual se baseia na inibição não-seletiva da proliferação celular. Os quimioterápicos metotrexato (MTX), ciclofosfamida e doxorrubicina são amplamente utilizados no tratamento de doenças malignas da infância. Embora eficazes, estes medicamentos desencadeiam vários efeitos adversos, dentre os quais a mucosite oral (MO). A MO pode causar grande impacto na qualidade de vida dos pacientes pediátricos, além de impactar negativamente nos custos do tratamento. Os sintomas associados à MO em crianças e adolescentes submetidos à QT incluem dor, dificuldade para falar e se alimentar. Atualmente, diferentes variantes de sequência em genes que regulam os processos de metabolismo e transporte de fármacos estão sendo descritos como marcadores para predizer a eficácia de tratamento e os efeitos adversos. Em relação à MO, poucos estudos relacionaram variantes na sequência de genes com maior prevalência de manifestação de efeitos colaterais. Dessa forma, o objetivo principal do presente estudo é investigar a relação entre variantes de sequência em genes relacionados ao metabolismo e ao transporte dos antineoplásicos MTX, ciclofosfamida e doxorrubicina com a presença, ulceração e severidade de MO em pacientes pediátricos com leucemia ou linfoma submetidos à QT. Este será um estudo observacional, retrospectivo, a partir dos dados e amostras de sangue coletados em um estudo prévio (GPPG 2014-0581). As informações quanto à neoplasia e ao condicionamento serão coletadas a partir dos prontuários médicos. Nos casos de ocorrência do diagnóstico de MO, ela foi graduada e todos os pacientes receberam fotobiomodulação (FBM) como tratamento. As variantes genéticas serão analisadas através de sequenciamento de nova geração (NGS) com equipamento Ion Torrent *Personal Genome Machine* (PGM) utilizando um painel de genes customizado e serão investigadas quanto a associação dessas variantes genéticas com MO, desfecho que será avaliado em relação ao desenvolvimento e severidade de MO.

**Palavras-chave:** Leucemia, linfoma, mucosite oral, farmacogenética.

**SUMÁRIO**

**[1 INTRODUÇÃO 7](#_Toc81230805)**

**[2 OBJETIVOS 17](#_Toc81230806)**

[2.1 OBJETIVO GERAL 17](#_Toc81230807)

[2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17](#_Toc81230808)

**[3 METODOLOGIA 17](#_Toc81230809)**

[3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO 17](#_Toc81230810)

[3.2 ETAPA REALIZADA NO ESTUDO ANTERIOR 18](#_Toc81230811)

**[3.2.1 Protocolo para coleta de dados do paciente 18](#_Toc81230812)**

**[3.2.2 Critérios de eligibilidade 20](#_Toc81230813)**

**[3.2.3 Protocolos quimioterápicos 21](#_Toc81230814)**

**[3.2.4 Avaliação da mucosite oral 22](#_Toc81230815)**

**[3.2.5 Coleta e processamento de amostras de sangue 23](#_Toc81230816)**

[3.3 ETAPA A SER REALIZADA NO PESENTE ESTUDO 23](#_Toc81230817)

**[3.3.1 Análise molecular dos genes 23](#_Toc81230818)**

[3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 25](#_Toc81230819)

[3.5 ASPECTOS ÉTICOS 25](#_Toc81230820)

**[3.5.1 Proteção de dados 26](#_Toc81230821)**

**[3.5.2 Gerenciamento de riscos 26](#_Toc81230822)**

**[3.5.3 Benefícios para os pacientes 27](#_Toc81230823)**

[4 ORÇAMENTO 27](#_Toc81230824)

[5 CRONOGRAMA 27](#_Toc81230825)

**[REFERÊNCIAS 29](#_Toc81230826)**

**[ANEXO](#_Toc81230827)** [I - Termo de Autorização para Uso de dados de Pesquisa Prévia 36](#_Toc81230827)

**[ANEXO](#_Toc81230828)** [II – PARECER COMITÊ DE ÉTICA 37](#_Toc81230828)

**[ANEXO](#_Toc81230829)** [III - Solicitação de Dispensa do TCLE 42](#_Toc81230829)

**[ANEXO](#_Toc81230830)** [IV - Declaração de Cumprimento da Lei Geral de Proteção de Dados 43](#_Toc81230830)

**[ANEXO](#_Toc81230831)** [V - Orçamento 44](#_Toc81230831)

**Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.Erro! A referência de hiperlink não é válida.**

1 INTRODUÇÃO

O câncer infantil é raro, correspondendo a 2-3% dos cânceres. No geral, crianças nos primeiros 15 anos de vida têm um risco cumulativo de ser diagnosticado com câncer de 1 em 412 para meninos e 1 em 472 para meninas, com maior incidência ocorrendo em menores de 5 anos (PUBLIC HEALTH ENGLAND (PHE), 2018). No Brasil, o número de casos novos de câncer infantojuvenis esperados, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 4.310 casos novos no sexo masculino e de 4.150 para o sexo feminino. Esses valores correspondem a um risco estimado de 137,87 casos novos por milhão no sexo masculino e de 139,04 por milhão para o sexo feminino. O câncer é a doença que mais mata crianças e adolescentes no Brasil e a segunda causa de óbito neste grupo etário, sendo superada somente pelos acidentes e mortes violentas, o que significa que nenhuma outra doença leva a tantos óbitos infantis quanto o câncer. Entre 2009 e 2013, o câncer motivou cerca de 12% dos óbitos na faixa de 1 a 14 anos, e 8% de 1 a 19 anos. Houve 2.724 mortes por câncer infantojuvenil no Brasil em 2014 (INCA, 2020). Nas crianças, as células neoplásicas têm origem de células embrionárias primitivas que crescem e se multiplicam rapidamente sendo os tipos mais comuns leucemias, seguidos de tumores do sistema nervoso central, linfomas, tumores sólidos abdominais (Tumor de Wilms e neuroblastoma), osteossarcoma e rabdomiossarcoma (RUHLE *et al.*, 2018).

A leucemia é um tipo de câncer derivado das células formadoras de sangue da medula óssea, mais comumente aquelas relacionadas as células brancas do sangue (NICE, 2016). É o câncer mais diagnosticado em crianças, sendo responsável por 1/3 dos diagnósticos na infância (PHE, 2018). Em relação aos fatores de risco, sabe-se que há uma interação complexa entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos que ainda não estão completamente entendidos. Os tipos mais comuns de leucemia infantil são a leucemia linfoblástica aguda (LLA) e a leucemia mieloide aguda (LMA), além da leucemia mielóide crônica que é a menos prevalente (HOFFBRAND, MOSS, 2015; WARD *et al*., 2019). A classificação das leucemias é feita através das características histológicas e genéticas da linhagem celular da qual é derivada, como dos linfócitos em LLA e dos decorrentes de células mieloides precursoras das células vermelhas, plaquetas e outros glóbulos brancos definida como LMA (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019a).

Os sintomas iniciais das leucemias são de difícil diagnóstico, uma vez que podem ser confundidos com diagnósticos menos graves na infância. Entretanto, sintomas persistentes como sangramentos e hematomas facilmente presentes devem ser sinal de atenção. Não raramente, os sintomas se sobrepõem com plaquetas, glóbulos brancos e vermelhos disfuncionais ou em baixos níveis. Características específicas a cada subtipo de câncer podem ser encontradas como hipertrofia gengival, infiltrações em pele, fraqueza e fadiga em pacientes com LMA (ELGARTEN, APLENC, 2020). Nos pacientes

com LLA, a linfoadenopatia é o sintoma mais comumente presente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019b).

Os linfomas podem ser classificados como linfoma de Hodgkin (LH) e linfoma não-Hodgkin (LNH) (IYER, 2013). Os LNHs da infância incluem linfoma de células B maduras de alto grau, linfoma de Burkitt (LB), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), linfoma mediastinal primário de grandes células B (LMPGCB), linfoma anaplásico de grandes células (ALCL) e linfoma linfoblástico (LL). De um modo geral, o prognóstico para crianças com LNH é excelente, embora existam alguns subtipos de maior risco. A este respeito, LMPGCB está geralmente associado a um resultado pior do que LB ou LDGCB em estágio comparável. A sobrevida livre de eventos a longo prazo para crianças com ALCL é de aproximadamente 70% (SANDLUND, 2015). O LH é um dos cânceres pediátricos e adultos com maior porcentagem de cura, chegando até 95% em crianças após 5 anos do diagnóstico. É caracterizado pela presença de células gigantes multinucleadas (células de Hodgkin / Reed-Sternberg) ou variantes de células mononucleares grandes (células linfocíticas e histiocíticas), com taxas de sobrevida a longo prazo superior a 90% após o tratamento com quimioterapia (QT) isolada ou combinada com radioterapia (RT).  A alta eficácia do tratamento é alcançada com QT de alta dose. O refinamento e a redução da RT foram implementados com base nos resultados de estudos de grupos colaborativos, de modo que a radiação foi completamente eliminada para certos subgrupos de pacientes (MAUZ-KÖRHOLZ *et al.*, 2015).

Os sinais e sintomas variam conforme a localização na qual o tumor se desenvolve. Nos casos em que o tumor se desenvolve em linfonodos do pescoço, axilas e virilha, formam-se ínguas, as quais geralmente são indolores. Em situações de doença na região do tórax, a presença de tosse é percebida, assim como falta de ar e dor abdominal. Ao se desenvolver na pelve ou no abdômen, os sintomas manifestados envolvem desconforto e distensão abdominal. Além destes, os pacientes podem apresentar febre, cansaço, fadiga, suor noturno, perda de peso sem causa aparente e coceira generalizada (KELLY, 2015).

Com o advento da terapia direcionada, a sobrevivência de até 5 anos após o diagnóstico de linfoma ou de leucemia dos pacientes pediátricos, nos seus primeiros 15 anos de vida, melhorou para 70-80% e aproximadamente 90% dos casos, respectivamente. Dessa forma, o diagnóstico precoce contendo tanto a completa imunohistoquímica como o perfil molecular do tumor são de extrema importância para o tratamento (BRAYLEY *et al.*, 2019; GATTA *et al.*, 2005). O manejo inicial dos sintomas se concentra no tratamento de quaisquer complicações causadas pela malignidade do tumor e na estabilização da criança antes de iniciar a terapia específica. A QT é o principal elemento do tratamento para o câncer infantil. Este tratamento tem como mecanismo fundamental 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).

Os fármacos utilizados na QT para o paciente oncopediátrico exibem, de modo geral, estreitas janelas terapêuticas e, portanto, as diferenças entre as doses que produzem o efeito antitumoral e as que causam toxicidade são bastante pequenas. Por este motivo, a QT tem sido associada a uma série de efeitos adversos que podem levar à modificação ou interrupção do tratamento quimioterápico resultando na redução da qualidade de vida e/ou da sobrevida do paciente. Estes efeitos adversos incluem vômito, diarreia, toxicidade hepática e renal, alopecia, dermatites, mucosite oral (MO) e mielossupressão. Por vezes, grave toxicidade é observada após o uso de doses necessárias para a obtenção dos efeitos terapêuticos. O aprimoramento da QT está relacionado ao aumento da distância entre as curvas ‘dose x resposta’ e ‘dose x toxicidade’. Além da toxicidade, outro problema que ocorre frente ao tratamento quimioterápico convencional é a resistência às drogas, que ocorre mesmo com o uso da poliquimioterapia, que tem por objetivo atingir diferentes alvos moleculares e vias intracelulares justamente para reduzir a probabilidade de isso ocorrer (LIU *et al.*, 2017; RUHLE *et al.*, 2018). Dentre os diversos quimioterápicos comercialmente disponíveis, o metotrexato (MTX), a ciclofosfamida e a doxorrubicina são de relevância no presente estudo, uma vez que são amplamente utilizados no tratamento de doenças malignas da infância e desencadeiam efeitos adversos bastante importantes dentre os quais destaca-se a MO (CINASEURO *et al*., 2017; LIU *et al.*, 2017).

O MTX é um agente antimetabólito, análogo do folato, sendo uma estratégia de QT intravenosa em altas doses (HD-MTX) para o tratamento de LLA (ASSELIN *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2017). A farmacocinética do MTX apresenta uma ampla variabilidade interindividual. No entanto, é amplamente divulgado que tanto a eficácia quanto a toxicidade estão diretamente relacionadas à exposição ao fármaco (SCHMIEGELOW, 2009). Por isso, é fundamental que sejam mantidas as concentrações plasmáticas de MTX dentro da faixa citotóxica para células leucêmicas, mas abaixo daquelas associadas à toxicidade. Alterações na eliminação desse fármaco se traduzem em altas concentrações plasmáticas em tempos prolongados, o que pode agravar o desenvolvimento de efeitos adversos como danos funcionais e estruturais ao trato gastrointestinal (MEDELLIN *et al.*, 2020; OOSTEROM *et al.*, 2018).

A ciclofosfamida é uma das drogas anticâncer mais antigas e se caracteriza como um agente alquilante. Além dos efeitos antimitóticos e anti-replicativos, a ciclofosfamida tem propriedades imunossupressoras e imunomoduladoras. A ação da ciclofosfamida ocorre independentemente do ciclo celular, embora as células de proliferação rápida sejam mais sensíveis à sua ação. Os efeitos colaterais mais importantes são leucopenia e trombocitopenia, anemia, toxicidade da bexiga e do coração, sendo todos esses efeitos adversos altamente dose-dependentes (AHLMANN, HEMPEL, 2016; CANDEIAS, GAIPL, 2016).

A doxorrubicina é uma antraciclina derivada de bactérias pertencentes ao gênero Streptomyces, sendo considerada um agente eficaz comumente utilizado para tratar diversos tipos de cânceres (KHASRAW, BELL, 2012). O mecanismo de ação deste fármaco nas células tumorais se dá a partir da inibição da topoisomerase II, intercalação de DNA e geração de radicais livres ([DENARD](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919307708?via=ihub" \l "bib11) *[et al](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919307708?via=ihub" \l "bib11)*[., 2012](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919307708?via=ihub" \l "bib11) ). Ainda que a doxorrubicina seja eficaz em destruir as células cancerosas, ela também exerce efeitos citotóxicos em células normais em vários órgãos, incluindo o coração, o cérebro e os rins, sendo que a cardiotoxicidade mostrou ser o principal efeito adverso em pacientes com câncer tratados com este medicamento ([CHEN, AI, 2016](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919307708?via=ihub" \l "bib8); [LONGHI](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919307708?via=ihub" \l "bib36) *[et al](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919307708?via=ihub" \l "bib36)*[., 2007](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919307708?via=ihub" \l "bib36) ).

Como já citado, a MO é um efeito adversos importante, e se caracteriza como uma reação inflamatória aguda em resposta a numerosos agentes quimioterápicos e radioterapia em cabeça e o pescoço e que causa um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes. Clinicamente, MO se apresenta como eritema e ulcerações em vários graus de intensidade podendo afetar o estado nutricional do paciente, pode ser extremamente dolorosa, requererendo o uso de analgésico e aumentando o risco de infecções. Além disso, as evidências científicas mostram que a MO pode levar a redução na intensidade da dose de quimioterapia, atrasar o tratamento, aumentar do uso de recursos adicionais, de consultas, hospitalizações, hospitalizações prolongadas e afetar a qualidade de vida (KAUARK-FONTES *et al*., 2021; MARTINS *et al*., 2020; RODRIGUES-OLIVEIRA *et al.,* 2021*)*.

A MO pode ser classificada considerando o estado físico e nutricional do paciente, assim como o aspecto clínico da boca (PARULEKAR *et al.*, 1998). De acordo com esta classificação, a MO varia do grau 0 ao grau 4. O 0 (zero) significa ausência de anormalidade detectada, já quando há presença de eritema sem tratamento necessário caracteriza a pontuação 1, na pontuação 2 há quadro sintomático doloroso sem necessidade de analgésicos, já comprometendo a alimentação, no caso de pontuação 3, há presença de ulceração dolorosa exigindo o uso analgésicos e impossibilitando a alimentação, finalmente no grau 4 ocorre a presença de necrose com necessidade de nutrição parenteral (WHO, 1979). Outra forma de classificação é pelo *National Cancer Institute* (NCI), que considera grau 0 ausência de MO, grau 1 quando há presença de úlceras sem sintomatologia dolorosa ou dor leve associada à eritema, grau 2 na presença de eritema doloroso, edema ou úlceras mas mantendo a alimentação por via oral, grau 3 na presença de eritema doloroso, edema ou úlceras e indicação de nutrição parenteral, grau 4 o individuo apresenta ulceração grave com necessidade de nutrição parenteral ou entubação profilática e, por fim, grau 5 em caso de morte associada à toxicidade (SONIS *et al*., 1999).

A mucosa labial, jugal, língua, assoalho de boca e palato mole são mais afetados pela MO do que os tecidos queratinizados, como o palato duro. Os agentes quimioterápicos parecem ser os principais fatores para o desenvolvimento de MO em pacientes pediátricos, sendo as altas doses de MTX fortemente relacionadas ao desfecho (CURRA *et al*., 2021; RIBEIRO *et al*., 2019; VALER *et al*., 2020). Outros fatores de risco para o desenvolvimento da MO relatados são parâmetros hematológicos, hepáticos e renais, doença de base, microbiota oral, perfil genético e biomarcadores (de FARIAS GABRIEL *et al*., 2021).

A incidência e gravidade da MO em pacientes oncológicos adultos são bem conhecidos e dependem do tipo de protocolo usado em relação a agentes específicos e esquemas de dosagem, no entanto, poucos estudos em oncologia pediátrica foram conduzidos (CHENG *et al*., 2011; SHOUVAL *et al*., 2019). De acordo com a revisão sistemática realizada por Gabriel *et al* (2021) a MO apresenta uma incidência variável em paciente oncopediátricos, variando de 20 à 80% em paciente submetidos à QT. Curra *et al* (2021) avaliaram a incidência e os fatores de risco para OM em pacientes com câncer infantil em quimioterapia e demonstraram que alguns protocolos de QT foram associados a uma maior incidência de graus severos de MO. Além disso, demonstraram que outras toxicidades como hematológicas, hepáticas e renais ocorreram em associação com a gravidade da OM. Neste estudo os autores avaliaram 112 pacientes oncológicos pediátricos e um total de 829 ciclos de quimioterapia e observaram uma incidência geral de OM de 63,57% sendo que deste, 8,44% apresentaram graus severos de MO (graus 3 e 4). Em estudos semelhantes, a incidência de OM variou de 18 a 80% e de 14 a 18,6% para graus severos (ALLEN *et al*., 2018). Essas variações na incidência de MO podem ocorrer devido às diferenças em cada estudo em relação metodologia, tipos de tumor, combinações de quimioterapia, tipo de profilaxia usada e histórico genético. Outro fator que pode afetar essa incidência é que muitos estudos não ofereceram nenhum protocolo preventivo para MO.

Fatores associados com desenvolvimento de MO tem sido descritos na literatura, incluindo tipo de drogas quimioterápicas, doses dos agentes quimioterápicos, idade, estado nutricional e polimorfismos genéticos que codificam enzimas responsáveis ​​pelo metabolismo, transporte, e excreção de drogas quimioterápicas. Crianças com malignidades hematológicas apresentam MO com mais frequência do que aqueles com tumores sólidos (de FARIAS GABRIEL *et al*., 2021).

Os sintomas associados à MO em crianças e adolescentes submetidos a QT incluem problemas ao engolir, falar e ao se alimentar, maior uso de analgésicos além do aumento dos níveis de estresse psicológico nesses pacientes (CHENG *et al*., 2012; CIDON, 2018; MAZHARI *et al*., 2018). Além disso, a MO pode aumentar a mortalidade em até 40% em casos graves (MILLER *et al.*, 2012). Apesar de diversos estudos avaliarem o manejo do paciente pediátrico com MO, as evidências ainda não são concretas, o *guideline* proposto pela Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer e da Sociedade Internacional de Oncologia Oral (MASCC/ISOO) (MIRANDA-SILVA *et al*., 2021) publicou orientações sobre o uso de fotobiomodulação, reforçando os cuidados bucais combinados com diversos agentes, assim como sugerindo a crioterapia e o uso de morfina 0,2% tópica em casos específicos. Dessa forma, a prevenção, avaliação e tratamento destas complicações no tratamento do paciente pediátrico com câncer e seu impacto na qualidade de vida se faz necessária.

A manifestação dos diferentes efeitos adversos, dentre eles a MO, assim como, a resposta frente ao tratamento varia entre os indivíduos submetidos ao mesmo protocolo quimioterápico. Tanto os efeitos adversos como a resposta à terapia podem ser moduladas pelo estado de saúde do indivíduo, influências ambientais e características genéticas. A farmacogenética é a ciência que estuda como a variabilidade genética influencia na resposta individual ao tratamento farmacológico convencional. Tem sido demonstrado que variações genéticas alteram a suscetibilidade de grupos de pessoas a vários medicamentos (BASILE *et al*., 2019; LIU *et al.,* 2017). 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, ou seja, uma determinada terapia pode ser eficaz e causar eventos adversos graves em um subgrupo de pacientes, ao mesmo tempo que não oferece resposta em termos de toxicidade ou efeito terapêutico em outros (CAI; WANG, 2020). Evidências crescentes demonstram que a composição genética de um indivíduo é um fator importante neste resultado diferencial, sendo responsável por cerca de 20% à 95% da variabilidade na disposição e efeitos dos medicamentos (CREWS *et al.*, 2012).

A farmacogenética estuda como a variabilidade da expressão gênica individual pode estar relacionada à maior suscetibilidade a doenças, bem como influenciar na resposta ao tratamento farmacológico em nível celular, ou seja, busca a causa genética para variações na resposta individual. Já a farmacogenômica é a análise genômica desses determinantes genéticos, embora usualmente os dois termos sejam utilizados como sinônimos (ELZAGALLAAI; CARLETON; RIEDER, 2021). Utilizar a farmacogenética como movimento para a medicina individualizada ou personalizada vem crescendo. As variações em um gene podem afetar a farmacocinética ou a farmacodinâmica de um medicamento, o que, por sua vez, afeta os resultados clínicos. A farmacocinética é o processo pelo qual uma droga é absorvida, distribuída, metabolizada e excretada pelo corpo; farmacodinâmica é o efeito de uma droga no corpo. Esses fatores podem determinar potencialmente a eficácia ou toxicidade de um medicamento; por exemplo, uma variante genética pode levar ao aumento das concentrações plasmáticas do medicamento, o que, por sua vez, se traduz em aumento da eficácia do medicamento ou efeitos adversos (FENG; XIE, 2016; WANG, 2010).

Em farmacogenética, variantes genéticas e mutações são conceitos importantes que devem ser destacados. Costuma-se definir variante genética como uma variante da sequência de DNA presente em mais de 1% da população geral; se uma variante estiver em menos de 1% da população, ela é considerada uma mutação. No entanto, com o aumento no número de genes nas bases de dados, sabe-se que esta distinção não é assim tão linear e ambas são consideradas variantes genéticas (MALSAGOVA *et al.*, 2020; WAKE *et al.*, 2019). As variantes genéticas mais estudadas e que ocorrem mais frequentemente são chamadas de *single nucleotide polymorphisms* (SNP) e consiste na substituição de uma única base (ZHOU, 2020). Estudos sobre farmacogenética em oncologia têm focado na análise de variantes de sequência em genes envolvidos no metabolismo dos quimioterápicos mais utilizados na prática clínica e que estão relacionados à maior número e gravidade de efeitos adversos (MARTINS, *et al.*, 2013). A presença de alterações na sequência de regiões promotoras pode ocasionar alterações na transcrição do gene-alvo e até mesmo modificar a sequência da proteína e sua função biológica. Diferentes variantes em genes que regulam os processos de metabolismo e transporte de fármacos estão sendo relatados como marcadores para predizer a eficácia de tratamento e os efeitos adversos (GUTIERREZ-CAMINO *et al*., 2018; LIU *et al*., 2017).

Em relação a vários agentes citotóxicos utilizados na terapia antineoplásica, foi evidenciado que variantes em genes que codificam enzimas envolvidas em seu metabolismo estão associadas à superexposição sanguínea ao fármaco, levando a maior risco de toxicidade. A genotipagem desses genes antes do tratamento é uma estratégia valiosa para prevenir efeitos colaterais e predizer a resposta individual à terapia medicamentosa (BOUVET *et al.*, 2020). Diversas variantes em genes que regulam os processos de metabolismo e transporte de fármacos estão sendo relatados como marcadores para predizer a eficácia de tratamento (TOHKIN, 2010). Os genes da família CYP (citocromo P450) e ABC (*ATP binding-cassete*) apresentam variantes que influenciam na resposta terapêutica e toxicidade do tratamento quimioterápico. O gene *CYP2C9* codifica enzimas hepáticas consideradas metabolizadoras de primeira fase de quimioterápicos como o MTX, ciclofosfamida e doxorrubicina. Variantes desse gene alteram a expressão e atividade dessas enzimas e consequentemente a toxicidade das drogas (GERVASINI, VAGACE, 2012; TULSYAN, *et al*., 2014). O gene *ABCC2* codifica enzimas relacionadas ao transporte e eliminação de quimioterápicos. Variantes deste gene têm sido associadas a menor sobrevida em pacientes submetidos a quimioterapia e aumento da toxicidade (CARONIA *et al*., 2011; LIU, *et al*., 2014).

O MTX é um quimioterápico que atua por meio da inibição competitiva de enzimas que utilizam folato (isoladamente ou em combinação com outros agentes antineoplásicos; em baixas ou altas doses). É eficaz no tratamento de vários tipos de câncer, como leucemia, linfoma, osteossarcoma, bem como doenças autoimunes, como artrite reumatoide. Apresenta uma ampla variabilidade interindividual em sua biodisponibilidade, resultando não apenas em ajustes contínuos de dose, mas também na frequente descontinuação do tratamento por toxicidade. Os eventos adversos comuns incluem efeitos colaterais gastrointestinais, MO, elevação das enzimas hepáticas, neurotoxicidade, toxicidade hematológica ou até morte (FENG; XIE, 2016; GERVASINI; MOTA-ZAMORANO, 2019). Variantes do gene *MTHFR* que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase estão associadas a alterações nos níveis plasmáticos de MTX e à eficácia e toxicidade. Entre estes, foram identificadas duas variantes, c.677C> T (Ala222Val) rs1801133 e c.1298A> C (Glu429Ala) rs1801131 que reduzem a atividade enzimática de *MTHFR*. O risco de desenvolver toxicidade relacionada ao MTX, especialmente hepática, toxicidade gastrointestinal, leucopenia, neurotoxicidade, foi significativamente associado a c.677C> T (GERVASINI; MOTA-ZAMORANO, 2019; LAMBRECHT *et al.*, 2017). Além disso, diversos estudos demonstraram que variantes genéticas em *SLCO1B1* estão associadas à depuração do MTX (CSORDAS *et al.*, 2014; LIU, S. G. *et al.*, 2017; LOPEZ-LOPEZ *et al.*, 2011; RADTKE *et al.*, 2013; RAMSEY *et al.*, 2013; TREVIÑO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2014). Várias proteínas de membrana, membros da família *ABC*, estão envolvidas no transporte do MTX para fora das células, sendo de particular interesse seu estudo na Leucemia Linfoide Aguda (LLA) na infância, dentre elas estão: *ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4 e ABCG2* (GERVASINI; MOTA-ZAMORANO, 2019).

A doxorrubicina é um agente antitumoral da família das Antraciclinas utilizado em mais da metade dos protocolos de tratamento do câncer infantil. Seu uso está associado à cardiotoxicidade manifestada como disfunção cardíaca assintomática e insuficiência cardíaca congestiva e os genes frequentemente relacionados a esse desfecho são: *RARG, SLC28A3, SLC22A17, SLC22A7, UGT1A6, ABCC1, ABCC2, ABCC5, ABCB1, ABCB4* e *CBR* (AMINKENG *et al.*, 2015; ELZAGALLAAI; CARLETON; RIEDER, 2021; VON HOFF *et al.*, 1979).

A ciclofosfamida é um agente antineoplásico e imunossupressor do grupo dos *Agentes Alquilantes do tipo Mostarda Nitrogenada*. É comumente usada no tratamento de linfomas; leucemia; neuroblastoma; retinoblastoma; e tumores sólidos da infância, como osteossarcoma, sarcoma de Ewing, rabdomiossarcoma e meduloblastoma e requer ativação através de enzimas *CYP* para atuar como agente alquilante (ELZAGALLAAI; CARLETON; RIEDER, 2021; ROY *et al.*, 1999). A desintoxicação de metabólitos reativos da ciclofosfamida é realizada através de oxidação de aldeído desidrogenases (ALDHs) ou por conjugação mediada pela glutationa S-transferase (*GST*). Portanto, variantes genéticas de *CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1* e *ALDH3A1* podem interferir na farmacocinética da ciclofosfamida.

Em relação à MO, estudos preliminares sugerem associação da variante C3435T (rs1045642) no gene *MDR-1* com o desenvolvimento de MO (BEKTAŞ-KAYHAN *et al*., 2012). A alteração G80A no gene *SLC19A1* (rs1051266), que codifica o transportador RFC1, está associada às concentrações plasmáticas de MTX, presença de MO e recidiva em pacientes pediátricos com LLA (SUTHANDIRAM *et al*., 2014). Existem evidências de que a variante C677T (rs1801133) no gene que codifica a enzima MTHFR está associado à presença de concentrações plasmáticas tóxicas de MTX, aumentando a probabilidade de o paciente desenvolver efeitos adversos durante o tratamento oncológico (MEI *et al*., 2015). Da mesma forma, um estudo identificou três alterações em genes que codificam microRNAs (miR-4268, miR4751 e miR-3117) e as associou a uma maior prevalência de MO, diarreia e vômito em crianças na fase de indução da terapia para LLA (GUTIERREZ-CAMINO *et al*., 2018). No entanto, a publicação de Li e colaboradores (2017) demonstrou que existe um maior risco de efeitos colaterais durante a terapia com HD-MTX em crianças em tratamento para LLA portadoras da alteração C677T no gene *MTHFR*. A literatura também traz que um alelo polimórfico do *MTHFR* foi associado à MO em 81,3% dos casos de pacientes pediátricos com LLA (TANTAWY *et al*., 2010). O gene *ABCB1* está relacionado ao transporte de drogas citotóxicas. No entanto, as evidências encontradas demonstram que o mesmo gene desempenha apenas um pequeno papel no transporte da ciclofosfamida (ZHANG *et al*., 2005). A presença da alteração Arg399Gln na sequência do gene *XRCC1* parece estar associada a um aumento do risco de desenvolvimento de MO grave, enquanto variante Arg194Trp neste mesmo gene mostrou um efeito protetor para o aparecimento desta condição (OZDEMIR *et al*., 2012). Por fim, também foi encontrada evidência que sugere a associação de variantes na sequência do gene *ABCC4* e uma maior incidência de MO (DEN HOED *et al*., 2015).

Dessa forma, após a revisão da literatura, pode-se perceber que as evidências são ainda bastante vagas na identificação de alterações de variantes genéticas que possam estar associados ao desenvolvimento de MO em pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemia ou linfoma, justificando o desenvolvimento do presente estudo.

1. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a relação entre as variantes de sequência em genes relacionados com o metabolismo e transporte dos antineoplásicos MTX, ciclofosfamida e doxorrubicina com o desenvolvimento e severidade de MO em pacientes pediátricos com leucemia ou linfoma submetidos à QT.

* 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a relação entre as variantes de sequência identificadas nos genes *ABCA3, ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCG2, ABCC6, BCL1, GR, HSP90AA1, SLC31A1, SLCO6A1, SLC19A1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, MTHFR*, e algumas regiões específicas dos genes *CYP3A4, CYP3A5 e CYP2C1* com o protocolo de quimioterapia e a ausência (grau 0) ou presença (graus 1,2,3 e 4) de MO.

2.2.2 Avaliar a relação entre as variantes de sequência identificadas nos genes *ABCA3, ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCG2, ABCC6, BCL1, GR, HSP90AA1, SLC31A1, SLCO6A1, SLC19A1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, MTHFR*, e algumas regiões específicas dos genes *CYP3A4, CYP3A5 e CYP2C1*, com o protocolo de quimioterapia e a severidade de MO (graus 0/1 e 2= leve e graus 3 e 4=severos).

2.2.3 Avaliar a relação entre as variantes de sequência identificadas nos genes *ABCA3, ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCG2, ABCC6, BCL1, GR, HSP90AA1, SLC31A1, SLCO6A1, SLC19A1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, MTHFR* e algumas regiões específicas dos genes *CYP3A4, CYP3A5 e CYP2C1*, com protocolo de quimioterapia e ausência (graus 0 e 1) e presença (graus 2,3 e 4) de forma ulceradas de MO.

1. METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente estudo utilizou as informações previamente coletadas, dados de prontuário e amostras de sangue armazenadas de 68 pacientes participantes do projeto de pesquisa (ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS CYP2C9 (\*2rs1799853 E \*3rs1057910) E ABCC2 (\*Rs717620) COM A SEVERIDADE DE MUCOSITE BUCAL E EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS) coordenado pela Profa. Dra. Manoela Domingues Martins. O referido projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA sob protocolo 2014-0581 e o pesquisador responsável autoriza sua utilização conforme termo em anexo (ANEXO I). Todos os pesquisadores envolvidos neste novo estudo assinaram declaração de cumprimento da Lei Geral de Proteção de Dados como consta na seção 3.9 (aspectos éticos) desse projeto.

A Figura 1 ilustra o resumo da metodologia do presente estudo que teve 2 etapas principais sendo que a primeira foi realizada no estudo anterior (atendimento e coleta de dados dos pacientes, critérios de eligibilidade, organização dos protocolos quimioterápicos, avaliação da mucosite oral, coleta e processamento de amostras de sangue). A segunda etapa foi realizada no presente estudo e compreende a análise molecular dos genes e análises estatísticas.

* 1. ETAPA REALIZADA NO ESTUDO ANTERIOR

3.2.1 Protocolo para coleta de dados do paciente

Foram incluídos todos os pacientes de 0-18 anos de idade com diagnóstico de LLA, LMA e linfoma, configurando uma amostra de conveniência. Os pacientes foram casos novos, e não recidivas da doença. Eles receberam tratamento quimioterápico de alto risco para o desenvolvimento da mucosite bucal: MTX, ou ciclofosfamida e/ou doxorrubicina no Serviço de Oncologia Pediátrica (SOP) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Amostra de conveniência.

Todos os pacientes incluídos neste projeto receberam adequação bucal prévia ao tratamento quimioterápico: os pacientes e familiares receberam orientações de higiene bucal no início do tratamento que incluíam aconselhamento sobre escovação dentária com

Figura 1: Fluxograma das coletas e análises

escovas macias e enxágue com digluconato de clorexidina (0,12%). Os pacientes foram encaminhados ao departamento de odontologia quando indicado antes do início da QT.

Nessa avaliação também foram coletados os seguintes dados acerca do paciente: idade; gênero (masculino ou feminino); grupo étnico (branco, hispânico, negro, asiático). Quanto à neoplasia e ao condicionamento, foram coletados e analisados os itens a seguir: diagnóstico anátomo-patológico; localização do tumor primário (tumores sólidos); estadiamento clínico; resposta objetiva; tratamento quimioterápico a que será submetido (droga, dose e frequência do tratamento). Os dados acerca da neoplasia e do tratamento do paciente foram coletados dos prontuários médicos.

No dia em que iniciaram o tratamento quimioterápico (dia 0 – D0), foram coletados 3 mL de sangue do paciente para análise dos polimorfismos genéticos através de Sequenciamento de nova geração (NGS). Nos períodos D0, D+5 (inicio da neutropenia), D+10 (pico de imunossupressão) e em D+15 foram realizadas avaliações clínicas. Em todas essas datas foram coletadas informações sobre o quadro clínico do paciente dentre elas: escore clínico de mucosite, experiência de dor em boca, análise da mastigação, deglutição, ingestão de líquido e alteração do paladar, quadro hematológico do paciente, efeitos adversos ao quimioterápico, incluindo níveis séricos de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), transaminase glautâmico oxalacética (TGO) e bilirrubinas. Todos os dados foram anotados em ficha clínica própria confeccionada apenas para essa pesquisa. A evolução clínica do paciente e a ocorrência de reações adversas entre uma consulta e outra, foram acompanhadas por contato direto com o médico oncologista ou através de anotações deste ou de outros profissionais no prontuário médico. Para acompanhamento após o último ciclo de tratamento o paciente foi entrevistado após a consulta médica ou na vinda ao hospital para algum exame, ou ainda por telefone, quando não houve possibilidade da presença do paciente.

Nos casos de ocorrência do diagnóstico de MO, a mesma foi graduada e todos os pacientes que concordaram receberam tratamento com laser de baixa potência (LBP). Esta terapia tem sido considerada um excelente recurso para tratamento de mucosite (EDUARDO *et al*., 2009). Foi utilizado laser de diodo (InGaAlP; MM Optics, São Carlos, SP, Brazil), 660nm (vermelho-visível), tamanho do spot de 0,04cm², irradiância de 1W/cm², potência de saída de 100mW, densidade de energia de 6J/cm² e tempo de exposição de 2,4 segundos por ponto. O que resultou em uma energia radiante total de 0,24J por ponto. Se foi diagnosticada alguma outra alteração estomatológica ou observada a necessidade de tratamento dentário, os pacientes e responsáveis foram orientados quanto à prevenção e controle das respectivas doenças, assim como encaminhados à equipe de Estomatologia ou Odontologia do HCPA .

* + 1. **Critérios de eligibilidade**

3.2.2.1 Inclusão

- Pacientes de ambos os gêneros em tratamento quimioterápico no SOP do HCPA que estivessem recebendo protocolos de alto risco para mucosite bucal (MTX em doses > 5 g/m2, ciclofosfamida ou doxorrubicina).

- Pacientes com diagnóstico de LLA, LMA ou Linfoma pela primeira vez, não se configurando recidiva da doença.

- Pacientes de 0-18 anos cujos responsáveis permitiram a sua participação no estudo através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

- Pacientes de 0-18 anos que consintam com a participação no estudo através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o paciente (TCLE).

3.2.2.2 Exclusão

- Não comparecimento a um dos quatro dias de avaliação clínica.

3.2.3 Protocolos quimioterápicos

O Serviço de Oncologia pediátrica do HCPA/UFRGS realiza o tratamento do câncer pediátrico baseado no diagnóstico. Para as leucemias, o serviço utiliza o protocolo desenvolvido pelo grupo europeu denominado BFM 2009 (AZIZ *et al.,* 1997). É um protocolo assistencial, possivelmente o mais utilizado pelas instituições que tratam leucemia infantojuvenil no mundo, visto que apresenta resultados superiores aos protocolos anteriores. O protocolo utiliza de diversas drogas combinadas que possivelmente oferecem a maior eficácia contra a leucemia que são combinadas e aplicadas em esquemas de "blocos", sendo que os primeiros 6 meses com uma intensidade de QT mais intensa seguido de um período de aproximadamente 1 ano e meio de QT de manutenção, totalizando aproximadamente 2 anos de tratamento.

Nos casos de linfomas, os pacientes são tratados utilizando protocolos desenvolvidos pelo grupo americano COG (*Children's Oncology Group, 2021*), que recomenda intensidade de tratamento de acordo com o grupo de risco, sendo classificado em baixo, intermediário e alto risco. São utilizadas drogas como vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina, prednisona e MTX.

Tendo em vista o objetivo de avaliar a relação das variante gênicas e MO, pacientes que receberam um ou mais ciclos com MTX, Doxorrubicina e Ciclofosfamida foram incluídos e os protocolos utilizados foram revisados e reorganizados dentre 7 protocolos quimioterápicos envolvendo MTX, Doxorrubicina e Ciclofosfamida: (1) altas doses de MTX (MTX HD); (2) predomínio de Doxorrubicina; (3) MTX HD, Ciclofosfamida e Doxorrubicina; (4) baixas doses de MTX; (5) MTX HD e Ciclofosfamida; (6) predomínio de Ciclofosfamida; (7) Ciclofosfamida e Doxorrubicina. Esses protocolos foram organizados pelos pesquisadores do projeto 14-0581 de acordo com os quimioterápicos predominantes em cada ciclo e com maiores doses, com a finalidade de padronização, já publicados em estudo clínico (CURRA, *et al*., 2021). No entanto, alguns subgrupos receberam pequenas doses de cisplatina, etoposite, vicristina. citarabina e ifosfamida. Na tabela 1 estão descritos os sete protocolos com as respectivas doses médias administradas para cada neoplasia.

Tabela 1 - Relação dos protocolos quimioterápicos e doses

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Protocolo | Agente Quimioterápico | Dose |
| 1 | **MTX HD** | >1 g/m²  Osteossarcoma - 12 g/m²/ciclo  Leucemia - 5 a 8 g/m²/ciclo |
| 2 | **Doxorrubicina** | Osteossarcoma - 75 mg/m²/ciclo  Leucemia - 30 mg/m²/ciclo |
| 3 | **MTX HD**  +  **Ciclofosfamida**  +  **Doxorrubicina** | MTX HD - >1 g/m²  Ciclofosfamida - 1 g/m²/ciclo  Doxorrubicina - 25 mg/m²/ciclo |
| 4 | **MTX baixas doses** | < 1 g/m²/ciclo |
| 5 | **MTX HD**  +  **Ciclofosfamida** | MTX HD - >1 g/m²  Ciclofosfamida - 1 g/m²/ciclo |
| 6 | **Ciclofosfamida** | 1 g/m²/ciclo |
| 7 | **Ciclofosfamida**  +  **Doxorrubicina** | Ciclofosfamida - 1,2 g/m²/ciclo  Doxorrubicina - 70 mg/m²/ciclo |

3.2.4 Avaliação da mucosite oral

Para a avaliação clínica da MO foi utilizado o critério de toxicidade aguda da Organização Mundial de Saúde – OMS (*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 (PARULEKAR *et al.*, 1998). De acordo com esta classificação a mucosite 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).

Tabela 2 –Graduação da mucosite bucal segundo os critérios WHO



3.2.5 Coleta e processamento de amostras de sangue

De acordo com o protocolo de Fall-Dickson *et al*. (2007), com o auxílio do corpo clínico de enfermagem foi coletado 3ml de sangue do cateter central em um tubo à vácuo com EDTA K3 com capacidade de 5ml (Cral®, Referência GDO50EK), e evitando a contaminação com a heparina residual proveniente da linha central. O sangue foi alíquotado em *eppendorfes* de polipropileno com capacidade de 2ml com tampa rosqueável (*screw tube*; Axygen), e esses tubos armazenados no ultra-freezer -80ºC.

Os exames laboratoriais para determinação das enzimas hepáticas e os exames hematológicos já foram coletados na rotina da assistência, não sendo realizados especificamente para este Projeto.

* 1. ETAPA A SER REALIZADA NO PESENTE ESTUDO

3.3.1 Análise molecular dos genes

Foi analisada a relação dos genes presentes na Tabela 3 relacionados aos quimioterápicos MTX, doxorrubicina e ciclofosfamida.

Tabela 3– Genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica de quimioterápicos.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Gene | MTX | Doxorrubicina | Ciclofosfamida |
| *ABCA3* | x | x | - |
| *ABCB1* | x | x | x |
| *ABCC1* | x | x | - |
| *ABCC2* | x | x | x |
| *ABCC3* | x | - | x |
| *ABCC4* | x | x | x |
| *ABCC6* | - | x | - |
| *ABCG2* | x | x | x |
| *CCND1* | x | - | - |
| *SLC19A1* | x | - | - |
| *SLC31A1\** | - | - | - |
| *SLCO6A1* | - | x | - |
| *CYP2A6* | - | - | x |
| *CYP2B6* | - | x | x |
| *CYP2C8* | - | - | x |
| *CYP2C9* | - | - | x |
| *CYP2C19* | - | x | x |
| *CYP3A4* | - | x | x |
| *CYP3A5* | - | x | - |
| *GSTA1* | - | x | x |
| *GSTM1* | - | x | - |
| *GSTP1* | x | x | x |
| *GSTT1* | - | x | - |
| *NR3C1* | x | x | - |
| *HSP90AA1* | x | x | - |
| *MTHFR* | x | - | - |

\* Um subgrupo dos pacientes com diagnóstico de Osteossarcoma receberam, além do MTX e Doxorrubicina, a Cisplatina durante os ciclos de quimioterapia, justificando a inclusão do gene SLC31A1 envolvido no metabolismo de drogas contendo platina.

Para a identificação das variantes genéticas foram utilizados dados gerados previamente através de sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando um painel customizado (desenhado na ferramenta disponível em www.ampliseq.com) contendo *primers* específicos para as regiões codificantes e adjacentes dos genes listados na Tabela 2. Para a realização do NGS foi utilizado o equipamento Ion Torrent *Personal Genome Machine* (PGM; Thermo Fisher Scientific); as ferramentas de bioinformática OTG-snpcaller e GATK foram utilizadas para filtragem das leituras e realização da chamada de variantes, respectivamente. Para complementar a análise, foram avaliados os alelos *CYP2C19\*17, CYP3A4\*1B* e *CYP3A5\*3* uma vez que estão localizados em regiões que não foram contempladas no NGS. Os alelos *CYP3A4\*1B* e *CYP3A5\*3* foram analisados através de PCR em tempo real (valores incluídos no orçamento e pleiteados por verba FIPE) e o *CYP2C19\*17* por PCR seguido de sequenciamento de Sanger utilizando primers específicos fornecidos pelo pesquisador responsável (primers já adquiridos). Ainda, para fazer a validação do painel de NGS, foram selecionadas em torno de 20 regiões do DNA que tiveram a sequência confirmada através de sequenciamento de Sanger para 20 amostras selecionadas de forma aleatória.

* 1. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram realizadas no software SPSS for Windows, v.18. As análises estatísticas serão adequadas ao estudo de acordo com as variáveis de interesse. Serão incluídas as variantes genéticas que tiverem prevalência maior ou igual que 5% na população estudada. Para determinar um resultado estatisticamente significativo será considerado o valor de p < 0,05. Serão feitas análises univariadas e multivariadas para calcular as medidas de efeito entre exposição e desfecho.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto faz parte de um projeto maior, chamado “Relação de variantes genéticas associadas à farmacocinética e farmacodinâmica com a toxicidade e sobrevida dos tratamentos antineoplásicos em pacientes pediátricos” que foi registrado no sistema AGHUse para apreciação das áreas envolvidas e então cadastrado na Plataforma Brasil, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) do HCPA como CEP principal (n. 46986321.3.0000.5327) (ANEXO II). Posteriormente foi encaminhado para Comissão de Pesquisa (COMPESQ) da FO-UFRGS.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Declaração Universal dos Direitos Humanos, a Declaração de Helsinque, as Diretrizes Internacionais para Pesquisa em Seres Humanos e as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 466/2012 e 441/2011. A participação foi voluntária mediante consentimento por meio do TCLE assinado por pacientes ou responsáveis no momento da realização do estudo 14-0581. Desse modo, foi dada a dispensa do TCLE para o presente projeto (ANEXO III).

Os membros da equipe de pesquisa estão cientes de suas funções, conforme consta na folha de rosto desse projeto e os aspectos logísticos foram cadastrados no sistema AGHUse. Os pesquisadores se comprometem a preservar a privacidade dos participantes do estudo cujos dados serão coletados em base de dados. Concordam igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto e que os resultados serão divulgados sem a identificação dos participantes assinando declaração de cumprimento da Lei Geral de Proteção de Dados (ANEXO IV), Lei No 13.709, de 14 de agosto de 2018. Quanto ao financiamento, será solicitada verba ao FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos) junto ao HCPA. O início do estudo ocorreu imediatamente após sua aprovação nos referidos comitês.

3.5.1 Proteção de dados

Todos os dados que identificam diretamente o paciente (nome, data de nascimento, endereço etc.) foram substituídos por um código (pseudonimizados). Essa codificação exclui a identificação dos pacientes por pessoas não autorizadas e estarão disponíveis apenas para fins de pesquisa neste formato.

As informações para identificação direta permanecerão sob responsabilidade do pesquisador responsável no HCPA e serão armazenados separadamente dos dados médicos. Os dados não poderão, portanto, ser atribuídos à pessoa sem o envolvimento deste dispositivo. Não ocorrerá a transferência dessa identificação para pesquisadores ou terceiros não autorizados.

* + 1. Gerenciamento de 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 3.9 e será realizada codificação das informações.

3.5.3 Benefícios para os pacientes

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.

4 ORÇAMENTO

O presente estudo por fazer parte de um projeto guarda-chuva (ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS CYP2C9 (\*2rs1799853 E \*3rs1057910) E ABCC2 (\*Rs717620) COM A SEVERIDADE DE MUCOSITE BUCAL E EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS), já teve seu orçamento previamente aprovado (ANEXO V).

5 RESULTADOS



6 DISCUSSÃO

REFERÊNCIAS

AHLMANN, M.; HEMPEL, G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.78, n.4, p.661-71, 2016.

ALLEN, G.; LOGAN, R.; REVESZ, T.; KEEFE, D.; GUE, S. The prevalence and investigation of risk factors of oral mucositis in a pediatric oncology inpatient population; a rospective study. **J Pediatr Hematol Oncol,** v.40, n.1, p.15–21, 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Childhood leukaemia subtypes. 2019a. https:// tinyurl.com/y3d6669e (accessed 13 february 2021)

AMERICAN CANCER SOCIETY. Signs and symptoms of childhood leukaemia. 2019b. https://tinyurl.com/yyt95z3o (accessed 13 february 2021)

AMINKENG, F. *et al.* Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Childhood Cancer. **Nat Genet.**, v. 47, n. 9, p. 1079–1084, 2015.

ASSELIN, B.L. *et al*. Effectiveness of high-dose metotrexate in T-cell lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic: a randomizado study by the grupo de oncologia infantil (POG 9404). **Blood**, v.118, n.4, p.874–883, 2011.

AZIZ, Z et al. Modified BFM protocol for childhood acute lymphoblastic leukemia: a retrospective analysis. **Medical and pediatric oncology**, v.28, n.1, p.48-53, 1997.

BASILE, D. *et al*. Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. **Cancers**, v.11, p.857, 2019.

BEKTAŞ-KAYHAN, K. *et al*.H. 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.5251-5255. 2012.

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.1–12, 2020.

BRAYLEY, J.; STANTON, L.K.; JENNER, L.; PAUL, S.P. Recognition and management of leukaemia in children. **Br J Nurs**, v.28, n.15, p.985-992, 2019.

CAI, W.; WANG, Z. Introduction and Principles of Pharmacogenomics in Precision Medicine. *In*: SPRINGER NATURE SINGAPORE PTE LTD (org.). **Pharmacogenomics in Precision Medicine**. Singapore: Springer, Singapore, 2020. p. 1–19.

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

CARONIA, D. *et al*. Effect of ABCB1 and ABCC3 polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy: a pharmacogenetic study. **PLoS One**, v.6, n.10, e26091, 2011.

CHANG, Y.H. *et al*. Effectiveness of parenteral glutamine

on methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic

leukemia. **Nutr Cancer,** v.69, p.746–751, 2017.

CHEN, Z.I.; AI, D.I. Cardiotoxicity associated with targeted cancer therapies. **Mol Clin Oncol**, v.4, p. 675-681, 2016.

CHENG, K.K.; LEE, V.; LI, C.H.; YUEN, H.L.; EPSTEIN, J.B. Oral mucositis in pediatric and adolescent patients undergoing chemotherapy: the impact of symptoms on

quality of life. **Support Care Cancer**, v.20, p.2335-2342, 2012.

CHENG, K.K. *et al*. Incidence and risk factors of oral mucositis in paediatric and adolescent patients undergoing chemotherapy. **Oral Oncol**, v.47, n.3, p.153–162, 2011.

CIDON, E.U. Chemotherapy induced oral mucositis: prevention is possible.

**Chin Clin Oncol**, v.7, p.6, 2018.

CINAUSERO, M. *et al*.New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. **Frontiers in pharmacology, v.**8, n.354, 2017 .

COG. Children’s Oncology Group. Disponível em: <https://www.childrensoncologygroup.org/>. Acesso em: 30 de Agosto de 2021.

CREWS, K. R. *et al.* Pharmacogenomics and individualized medicine: Translating science into practice. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 92, n. 4, p. 467–475, 2012.

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. *et al*. Incidence and risk factors for oral mucositis in pediatric patients receiving chemotherapy. **Support Care Cancer**. [*S. l.: s. n.*], 2021.

DEN HOED, M.A. *et al*. Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pharmacogenomics J**, v.15, p.248-54, 2015.

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

EDUARDO, P.F. Severity of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation and an oral laser phototherapy protocol: a survey of 30 patients. **Photomed Laser Surg**, v.27, p.137-144, 2009.

ELGARTEN, C.W.; APLENC, R. Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy. **Curr Opin Pediatr,** v.32, n.1, p.57-66, 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.

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 Dis.** [*S. l.: s. n.*], 2021

FENG, X.; XIE, H. G. **Applying pharmacogenomics in therapeutics**. [*S. l.: s. n.*], 2016.

GATTA, G. *et al*. Childhood cancer survival trends in Europe: A EUROCARE Working Group study**. J Clin Oncol**, 23:3742–51, 2005.

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.

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.

HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. Hoffbrand’s essential haematology. 7th edn. Oxford: Wiley-Blackwell; 2015.

INCA. National Cancer Institute. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 30 de Agosto de 2021.

IYER, V.K. Pediatric lymphoma diagnosis: role of FNAC, biopsy, immunohistochemistry and molecular diagnostics. **Indian J Pediatr,** v.80, n.9, p.756-63, 2013.

KAUARK-FONTES, E. *et al*. Cost-effectiveness of photobiomodulation therapy for the prevention and management of cancer treatment toxicities: a systematic review. **Support Care Cancer**, v.7, 2021.

KHASRA, W.M.; BELL, R.; DANG, C. Epirubicin: is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. **Breast**, v.21, n.2, p. 142 – 149, 2012.

KELLY, K.M. Hodgkin lymphoma in children and adolescents: improving the therapeutic index. **Blood,** v.126, n.22, p.2452-2458, 2015.

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.

LI, F.; YIN, D.D.; ZHOU, X.L.; MA, J.M.; GUO, H.M.; MENG, L. Effect of GSTP1 and MTHFR Gene Polymorphism on Side Effects of HD-MTX in ALL Children. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v.25, n.3, p.723-728, 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.37761-37772, 2017.

LIU, Y. *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. 1–7, 2014.

LONGHI, A.; FERRARI, S.; BACCI, G.; SPECCHIA, S. Long-term follow-up of patients with doxorubicin-induced cardiac toxicity after chemotherapy for osteosarcoma. **Anti Canccer Drugs**, v.18, p.737-744, 2007.

LOPEZ-LOPEZ, E. *et al.* Polymorphisms of the *SLCO1B1* Gene Predict Methotrexate-Related Toxicity in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric blood & cancer**, v. 57, p. 612–619, 2011.

MALSAGOVA, K. A. *et al.* Pharmacogenetic Testing : A Tool for Personalized Drug Therapy Optimization. p. 1–23, 2020.

MARTINS, A.F.L. *et al*. Photobiomodulation reduces the impact of radiotherapy on oral health-related quality of life due to mucositis-related symptoms in head and neck cancer patients. **Lasers Med Sci,** v.28, 2020.

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 metaanalysis. **Pediatr Blood Cancer**, v.66, n.3, e27403, 2019.

MAUZ-KÖRHOLZ, C. *et al*. Pediatric Hodgkin Lymphoma. **J Clin Oncol,** v.33, n.27, p.2975-85, 2015.

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

MEI, L.; ONTIVEROS, E.P.; GRIFFITHS, E.A.; THOMPSON, J.E.; WANG, E.S.; WETZLER, M. Pharmacogenetics preditivo de resposta e toxicidade na terapia de leucemia linfoblástica aguda. **Blood Ver,** v.29, n.4, p.243–249, 2015.

MILLER, M.M.; DONALD, D.V.; HAGEMANN, T.M. Prevention and treatment of oral mucositis in children with cancer. **J Pediatr Pharmacol Ther,** v.17, p.340–350, 2012.

MIRANDA-SILVA W, *et al*. Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer / International Society for Oral Oncology (MASCC/ISOO). 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. **Support Care Cancer**, v.29, n.7, p.3539-3562, 2021.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. Suspected cancer: recognition and referral**. NICE guideline NG12**. 2017 (updated from 2015). https://www.nice.org.uk/guidance/ng12 (accessed 13 February 2021).

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. **Pharmacogenet Genomics**, v.28, n.10, p.223-229, 2018.

OZDEMIR, N.; CELKAN, T.; BARIŞ, S.; BATAR, B.; GÜVEN, M. DNA repair gene

XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of febrile neutropenia and mucositis in children with leukemia and lymphoma. **Leuk Res,** v.36, p.5659, 2012.

PARULEKAR, W.; MACKENZIE, R.; BJARNASON, G.; JORDAN, R.C. Scoring oral mucositis. **Oral Oncol**, v.34, n.1,p.63-71, 1998.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. Childhood cancer statistics, England annual report. London: PHE Publications; 2018.

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. 26, p. 5145–5153, 2013.

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

RIBEIRO, I.; DE ANDRADE LIMA NETO, E.; VALENÇA, A.M. Chemotherapy in Pediatric Oncology Patients and the Occurrence of Oral Mucositis. **Int J Clin Pediatr Dent**, v.12, n.4, p.261-267, 2019.

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

ROY, P. *et al.* 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 and Disposition**, v. 27, n. 6, p. 655 LP – 666, 1999.

RUHLE, A.; HUBER, P.E.; SAFFRICH, R.; LOPEZ PEREZ, R.; NICOLAY, N.H. The current understanding of mesenchymal stem cells as potential attenuators of chemotherapy induced toxicity. **Int J Cancer,** v.143, n.11, p.2628‐ 2639, 2018

SANDLUND, J.T. Non-Hodgkin Lymphoma in Children. **Curr Hematol Malig Rep***,* v.10, p.237–243, 2015.

SCHMIEGELOW, K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. **Br J Haematol,** v.146, n.5, p.489–503, 2009.

SHOUVAL R, *et al*. Risk factors and implications of oral mucositis in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Eur J Haematol, v.**4, n.103, p.402–409, 2019.

SONIS, S.T. *et al*. Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. **Am Cancer Soc**. v.85, p.2103–13, 1999.

SUTHANDIRAM, S. *et al*. Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. **Pharmacogenomics,** v.15, n.11, p.1479–1494, 2014.

TANTAWY, A.A. *et al.*. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.21, n.1, p.28-34, 2010.

TOHKIN, M.; ISHIGURO, A.; KANIWA, N.; SAITO, Y.; KUROSE, K.; HASEGAWA, R. Prediction of severe adverse drug reactions using pharmacogenetic biomarkers. Drug Metab Pharmacokinet, v.25, n.2, p.122-133, 2010.

TREVIÑO, 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.

TULSYAN, S.; AGARWAL, G.; LAL, P.; MITTAL, B. Significant role of CYP450 genetic variants in cyclophosphamide based breast cancer treatment outcomes: a multi-analytical strategy. **Clin Chim Acta**. v.1, n.434, p.21-28, 2014.

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 of paediatr dent***.* v. 31, n.2, 238-246, 2021.

VON HOFF, D. D. *et al.* Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. **Annals of Internal Medicine**, v. 91, n. 5, p. 710–717, 1979.

WAKE, D. T. *et al.* Pharmacogenomics: Prescribing Precisely. **Medical Clinics of North America**, v. 103, n. 6, p. 977–990, 2019.

WANG, L. Pharmacogenomics : a systems approach. v. 2, n. 1, p. 3–22, 2010.

WARD, Z.J.; YEH, J.M.; BHAKTA, N.; FRAZIER, A.L.; ATUN, R. Estimating the total incidence of global childhood cancer: a simulation-based analysis. **The Lancet. Oncology**, v.20, n.4, p.483–493, 2019.

World Health Organization. WHO handbook for reporting results of

cancer treatment. Geneva: World Health Organization. 1979. [http://www.who.int/iris/handle/10665/37200. Accessed 13 February 2021](http://www.who.int/iris/handle/10665/37200.%20Accessed%2013%20February%202021).

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.

ZHANG, J. *et al*. Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. **Drug Metab Rev**. v.37, p.611–703, 2005.

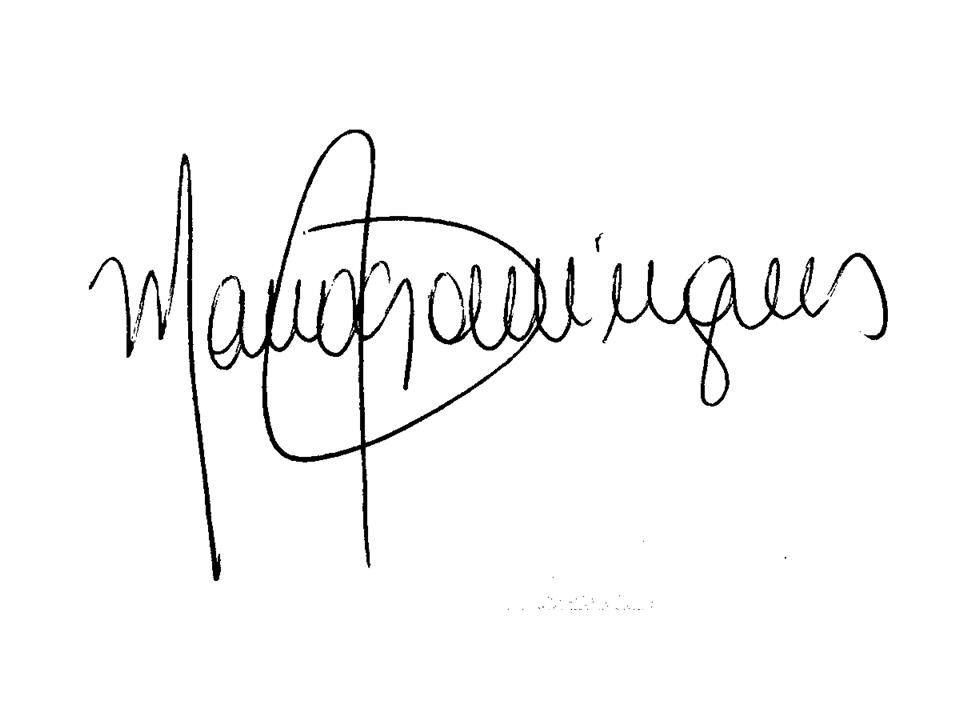
ZHOU, Z. **Pharmacogenomics in precision medicine**. [*S. l.: s. n.*], 2020. v. 5

# **ANEXOS**

ANEXO I - Termo de Autorização para Uso de dados de Pesquisa Prévia

Porto Alegre, 09 de março de 2021

Eu, Manoela Domingues Martins, pesquisadora responsável pelo projeto “ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS CYP2C9 (\*2rs1799853 e \*3rs1057910) e ABCC2 (\*rs717620) COM A SEVERIDADE DE MUCOSITE BUCAL E EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS” aprovado sob protocolo número 14-0581 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, declaro que autorizo a utilização dos dados e das amostras coletadas no referido projeto em um novo estudo intitulado “ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES DE SEQUÊNCIA E O DESENVOLVIMENTO DE MUCOSITE ORAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA E LINFOMA EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO”.



\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Manoela Domingues Martins

ANEXO II – PARECER COMITÊ DE ÉTICA

**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 SOBREVIDA 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 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 Linfoide 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.
* 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)

# 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:

1. 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.
2. 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.
3. Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.
4. 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 | PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_P | 10/07/2021 |  | Aceito |
| do Projeto | ROJETO\_1299309.pdf | 21:13:28 |  |
| TCLE / Termos de | AnexoIII\_solicitacao\_dispensa\_TCLE\_ve | 10/07/2021 | Stéfanie Thieme | Aceito |
| Assentimento / | rsao\_2.pdf | 20:49:17 | Perotto |  |
| Justificativa de |  |  |  |  |
| Ausência |  |  |  |  |
| Outros | Carta\_resposta\_CEPHCPA.pdf | 10/07/2021 | Stéfanie Thieme | Aceito |
|  |  | 20:44:11 | Perotto |  |
| Projeto Detalhado / | Projeto\_completo\_versao\_2.pdf | 10/07/2021 | Stéfanie Thieme | Aceito |
| Brochura |  | 20:38:54 | Perotto |  |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Investigador | Projeto\_completo\_versao\_2.pdf | 10/07/2021  20:38:54 | Stéfanie Thieme  Perotto | Aceito |
| Outros | FR\_assinada\_HCPA\_20210140.pdf | 19/05/2021  09:57:16 | Eva Mônica Dias  Gonçalves | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaDeRosto.pdf | 14/05/2021  14:10:41 | Stéfanie Thieme  Perotto | Aceito |
| Outros | Parecer\_Financeiro\_GPPG.pdf | 13/05/2021  21:20:57 | Stéfanie Thieme  Perotto | Aceito |
| Outros | Parecer\_UAMP.pdf | 13/05/2021  21:20:43 | Stéfanie Thieme  Perotto | Aceito |
| Declaração de  Pesquisadores | AnexoIV\_Declaracao\_de\_cumprimento\_  da\_LGPD.pdf | 13/05/2021  21:20:00 | Stéfanie Thieme  Perotto | Aceito |
| Outros | AnexoII\_TCLE\_projeto\_140581.pdf | 13/05/2021  21:19:21 | Stéfanie Thieme  Perotto | Aceito |
| Declaração de  concordância | AnexoI\_Autorizacao\_pesquisador\_respo  nsavel.pdf | 13/05/2021  21:18:58 | Stéfanie Thieme  Perotto | Aceito |
| Orçamento | Orcamento.pdf | 13/05/2021  21:18:17 | Stéfanie Thieme  Perotto | Aceito |
| Cronograma | Cronograma.pdf | 13/05/2021  21:18:07 | Stéfanie Thieme  Perotto | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

# Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 22 de Julho de 2021

Assinado por: Têmis Maria Félix (Coordenador(a))

ANEXO III - Solicitação de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Porto Alegre, 10 de julho de 2021

Eu, Manoela Domingues Martins, pesquisadora responsável pelo projeto intitulado “RELAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS À FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA COM A TOXICIDADE E SOBREVIDA DOS TRATAMENTOS

ANTINEOPLÁSICOS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS” solicito perante este Comitê de Ética em Pesquisa a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A dispensa se pauta nas seguintes justificativas:

* trata-se de um estudo observacional retrospectivo com utilização de dados e material biológico coletados em pesquisa prévia aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob número de protocolo 14- 0581;
* o banco de dados de responsabilidade do pesquisador do estudo prévio será disponibilizado em Excel (formato xlsx), codificado, sem informações como nome do paciente e data de nascimento;
* a participação foi voluntária mediante consentimento por meio do TCLE assinado por pacientes ou responsáveis no momento da realização do estudo 14-0581.

Declaro que o acesso à base de dados terá apenas fins científicos e será realizado somente após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética. Os pesquisadores se comprometem em manter o sigilo das informações levantadas através da assinatura de Termo de Compromisso de Uso de Dados e Termo de Compromisso de Uso de Material Biológico. Nestes termos, me comprometo a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução CNS n° 466/12 e suas complementares.

Manoela Domingues Martins



Manoela Domingues Martins

ANEXO IV - Declaração de Cumprimento da Lei Geral de Proteção de Dados

**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

**GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HCPA**

**DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO E CUMPRIMENTO DA LEI GERAL DE PROTEÇÃO DE DADOS PARA PESQUISAS AVALIADAS PELO CEP HCPA**

**Título do projeto: ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS E O DESENVOLVIMENTO DE MUCOSITE ORAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA E LINFOMA EM TRATAMENTO**

Os pesquisadores declaram conhecer e cumprir os requisitos da Lei Geral de Proteção de Dados ([Lei Nº 13.709, de 14 de agosto de 2018)](http://legislacao.planalto.gov.br/legisla/legislacao.nsf/Viw_Identificacao/lei%2013.709-2018?OpenDocument) quanto ao tratamento de dados pessoais e dados pessoais sensíveis que serão utilizados para a execução do presente projeto de pesquisa.

Declaram estar cientes que o acesso e o tratamento dos dados deverão ocorrer de acordo com o descrito na versão do projeto aprovada pelo CEP HCPA.

Nome Assinatura

Amanda de Farias Gabriel

Andre Tesainer Brunetto

Lauro José Gregianin

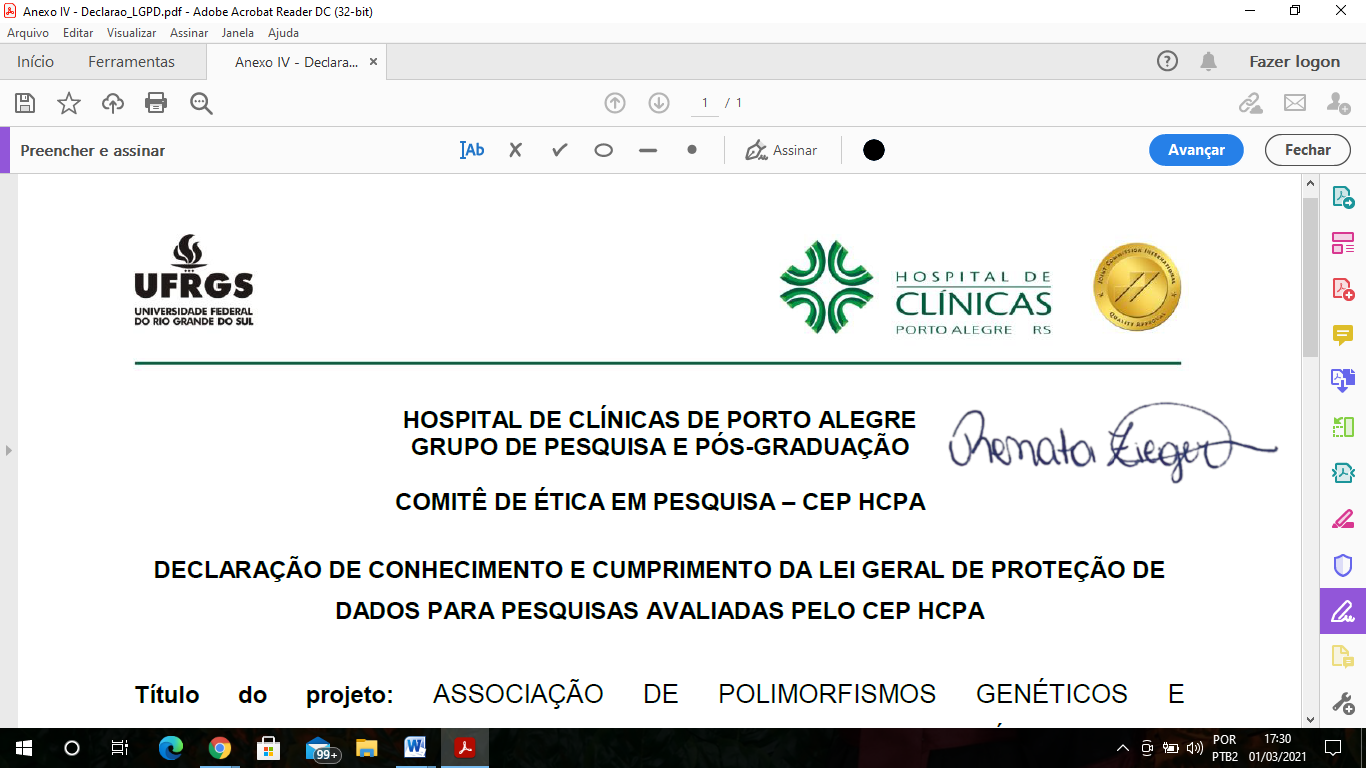
Luísa Comerlato Jardim

Manoela Domingues Martins

Marco Antonio Trevizani Martins

Mariana Rodrigues Botton

Marina Curra

Marina Siebert

Renata de Almeida Zieger

Ursula da Silveira Matte

Data 09 / 03 / 2021

ANEXO V - Orçamento

