

NATÁLIA BOAVENTURA SALGUEIRO

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DA DIHIDROPIRIMIDINA  
DESIDROGENASE EM DOENTES COM CARCINOMA COLO-RECTAL:  
IMPLICAÇÕES NO TRATAMENTO COM 5-FLUOROURACILO**

**MESTRADO EM ONCOLOGIA**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR E THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY**



2002

**NATÁLIA BOAVENTURA SALGUEIRO**

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DA DIHIDROPIRIMIDINA  
DESIDROGENASE EM DOENTES COM CARCINOMA COLO-RECTAL:  
IMPLICAÇÕES NO TRATAMENTO COM 5-FLUOROURACILO**

**PORTO**

**2002**

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE  
MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR E A THOMAS  
*JEFFERSON UNIVERSITY.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Ricardo da Luz, Director do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil-Centro Regional do Norte e ao Dr. Vítor Veloso, pelo apoio concedido ao mestrado de Oncologia.

Ao Professor Doutor Sérgio Castedo, responsável pela orientação desta dissertação, toda a disponibilidade, rigor científico e compreensão demonstrados em todos os momentos.

Ao Doutor Manuel Teixeira, Director do Serviço de Genética, constante no seu apoio e sabedoria, todas as facilidades concedidas para a elaboração desta tese.

À Dra. Isabel Veiga, todo o seu apoio desde a minha entrada no serviço de Genética, quer pessoalmente quer na formação técnica. Por isso tudo, o meu sincero obrigado.

À Dra. Maria Fragoso e à Dra. Olga Sousa, a incansável ajuda no levantamento e interpretação dos dados clínicos, sem o qual não seria possível a elaboração deste trabalho. A ambas o meu sincero obrigado.

A todos os colegas do Serviço de Genética, em especial à Dra. Bárbara Mesquita o apoio constante e à Dra. Ana Peixoto a amizade e compreensão demonstrada durante este extenso período.

Aos docentes do Mestrado, a qualidade e empenho demonstrados.

Ao Dr. Guimarães dos Santos, todo o apoio concedido durante a realização do Mestrado.

À D. Maria do Céu, toda a amabilidade e disponibilidade.

À Liga Portuguesa Contra o Cancro, o apoio financeiro prestado.

Ao IPO-Porto onde foi realizado o trabalho conducente a esta tese.

A todos os meus amigos a inestimável ajuda e constante presença nos bons e nos maus momentos, em particular à Carla e à Susana pela amizade, apoio moral e solidariedade constante.

Ao meu irmão, agradeço o encorajamento, a amizade e a inesgotável paciência demonstrados nos momentos mais atribulados deste trabalho.

Aos meus Pais

Ao Rui

## **ÍNDICE**

ABREVIATURAS	7
INTRODUÇÃO	10
OBJECTIVOS	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	48
ESTUDOS FUTUROS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

## **ABREVIATURAS**

## **ABREVIATURAS**

CCR -	carcinoma colo-rectal
PAFC -	polipose adenomatosa familiar do colon
CCHSP -	carcinoma colo-rectal hereditário sem polipose
5-FU -	5-Fluorouracilo
FdUMP -	5-fluorodesoxiuridina monofosfato
FdUDP -	5-fluorodesoxiuridina difosfato
FdUTP -	5-fluorodesoxiuridina trifosfato
FUMP -	fluorouridina monofosfato
FUDP -	fluorouridina difosfato
FUTP -	fluorouridina trifosfato
DUMP -	desoxiuridina monofosfato
DTMP -	desoxitimidina monofosfato
dTTP -	desoxitimidina trifosfato
dTDP -	desoxitimidina difosfato
TS -	timidilato sintetase
DNA -	ácido desoxirribonucleico
RNA -	ácido ribonucleico
mRNA -	ácido ribonucleico mensageiro
NCCTG -	north central cancer treatment group
DPD -	dihidropirimidina desidrogenase
DHFU -	dihidrofluorouracilo

FUPA -	ácido- $\alpha$ -fluoroureidopropiónico
FBAL -	$\alpha$ -fluor- $\beta$ alanina
CO <sub>2</sub> -	dióxido de carbono
<i>DPYD</i> -	gene que codifica a DPD
NADP <sup>+</sup> -	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH -	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
FAD -	flavina adenina dinucleótido
FMN -	flavina mononucleótido
bp -	pares de bases
dNTPs -	desoxinucleósidos
EDTA -	ácido etilenodiaminotetraacético
NH <sub>4</sub> CL -	cloreto de amónia
KHCO <sub>3</sub> -	hidrogenocarbonato de potássio
PBS -	tampão fosfato salino
NaCl -	cloreto de sódio
Tris HCL -	hidrocloreto tris (hidroximetil)aminometano
KCl -	cloreto de potássio
PCR -	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
TSR -	<i>Template Supression Reagent</i>
RFLP -	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

## **INTRODUÇÃO**

## 1 - EPIDEMIOLOGIA DO CANCRO COLO-RECTAL

O carcinoma colo-rectal (CCR) é uma doença típica dos países economicamente desenvolvidos. A taxa de incidência mais alta encontra-se entre a população dos EUA com um valor de 33.2/100 000 (taxa padronizada para a idade). Em países em vias de desenvolvimento de África, Ásia e América Latina, as taxas de incidência do cancro colo-rectal são mais baixas (Índia, 1-3/100 000)(Bento, 1999; Skibber *et al*, 2000). No Ocidente é a terceira neoplasia mais frequente e a segunda causa de morte por cancro, a seguir ao cancro da mama na mulher e do pulmão no homem. O pico de incidência localiza-se nos 70 anos e a sua distribuição é semelhante em ambos os sexos. O risco de desenvolver cancro colo-rectal ao longo da vida nos países economicamente desenvolvidos é cerca de 4,6% nos homens e 3,2% nas mulheres (Skibber *et al*, 2000).

Em Portugal, em 1996 ocorreram 1811 óbitos por cancro do cólon. A mortalidade por sexos foi de 840 mulheres e 971 homens, correspondendo, respectivamente, à 3ª e 4ª causa de morte por cancro (Bento, 1999). Em relação ao cancro do recto, em 1996 ocorreram 805 óbitos. A mortalidade por sexos foi de 326 mulheres e 479 homens, correspondendo, respectivamente, à 7ª e 5ª causa de morte por cancro (Bento, 1999). A análise da evolução da taxa de mortalidade por cancro do cólon e do recto de 1981 a 1996, demonstrou que os valores praticamente duplicaram neste período de tempo (Bento, 1999).

Apesar de existir uma ampla variação na incidência do CCR a nível mundial, é sabido que as populações migrantes têm tendência para assumir o risco relativo das regiões para onde se deslocam. Este facto sugere que os factores ambientais têm um papel muito importante no desenvolvimento do CCR. Numerosos estudos epidemiológicos

exploraram a relação entre a dieta e o risco de desenvolver CCR (Trichopoulos *et al*, 1997; Ilyas *et al*, 1999; Skibber *et al*, 2000). Embora não inteiramente conclusivos, estes estudos permitiram verificar que as dietas ricas em carne vermelha, gordura animal e/ou proteínas e pobres em vegetais, frutas e fibras aumentam o risco de CCR. Verificaram ainda que elevados consumos de álcool e consumos excessivos de comida em geral podem aumentar o risco de desenvolver CCR, tendo-se encontrado uma ligeira associação entre a obesidade e o risco de CCR. Os referidos estudos apontam ainda para um efeito protector por parte dos anti-oxidantes, folatos, cálcio e vitaminas.

A existência de história familiar de CCR é também um factor importante no desenvolvimento desta neoplasia. É sabido que a maioria dos CCR ocorrem esporadicamente e que apenas 15% do total dos CCR ocorrem em situações hereditárias, predominantemente no âmbito da polipose adenomatosa familiar do cólon (PAFC) e do carcinoma colo-rectal hereditário sem polipose (CCHSP) (Aaltonen *et al*, 1998; Lynch *et al*, 1998). Existem ainda alguns casos de agregações familiares de CCR, mas que não seguem um padrão de transmissão tipicamente mendeliano.

Os indivíduos com história familiar de CCR, apresentam um risco aumentado de desenvolver a doença. Os indivíduos com PAFC, doença autossómica dominante com elevada penetrância, apresentam um risco cumulativo aos 40 anos de aproximadamente 100% de desenvolver CCR. Em indivíduos portadores de mutações responsáveis pelo CCHSP, o risco aos 60 anos é aproximadamente de 80% (Trichopoulos *et al*, 1997; Aaltonen *et al*, 1998; Lynch *et al*, 1998). Por outro lado, existe ainda um risco acrescido de desenvolvimento de CCR nos indivíduos com doença inflamatória crónica do cólon, como é o caso da colite ulcerosa e da doença de Crohn (Trichopoulos *et al*, 1997; Skibber *et al*, 2000).

## **2 - TRATAMENTO**

A principal abordagem terapêutica no tratamento do CCR é a cirurgia. No entanto, as taxas de recorrência local após cirurgia potencialmente curativa, podem variar entre 5 e 50%. Esta variação entre várias séries depende da própria definição de falência local, selecção dos doentes, rotinas de *follow up*, definição de radicalidade, experiência do cirurgião e/ou técnica cirúrgica utilizada (Sousa, 1999). No carcinoma do cólon a terapêutica sistémica com agentes antineoplásicos representa um avanço importante no tratamento, particularmente porque a cirurgia isolada não é curativa na maioria das situações (Vincent *et al*, 1999; Rougier, 2001). A radioterapia, e mais recentemente a radioquimioterapia, assumem um papel muito importante como terapias adjuvantes principalmente no carcinoma do recto (Skibber *et al*, 2000; Glimelius, 2001).

### **2.1 - Cirurgia**

A cirurgia constitui o principal tratamento curativo dos doentes com CCR e as características da cirurgia vão ser determinadas pela extensão da doença. A abordagem cirúrgica inicial é essencial para o correcto estadiamento da doença e para a máxima remoção possível de massa tumoral (Skibber *et al*, 2000). Nos casos de carcinoma colo-rectal metastático, a cirurgia pode ser utilizada como terapia paliativa, tendo como objectivo minimizar os sintomas causadas pelo tumor primário (tal como a hemorragia ou obstrução). Sempre que possível deverá realizar-se a exérese das metástases, podendo a cirurgia assumir, nestes casos, um papel curativo (Vincent *et al*, 1999; Skibber *et al*, 2000; Hoehenberg, 2001).

## **2.2 - Radioterapia**

O papel da radioterapia como terapia adjuvante no carcinoma do cólon é muito restrito, sendo, no entanto, de grande importância no carcinoma do recto. Nos últimos 20 anos, a radioterapia e, mais recentemente, a radioquimioterapia, têm vindo a ser usadas conjuntamente com a cirurgia no tratamento primário dos doentes com carcinoma do recto (Skibber *et al*, 2000; Glimelius , 2001). Embora a eficácia da radioterapia pós-operatória na diminuição das taxas de recorrência local após cirurgia, tenha sido demonstrada por estudos randomizados, a verdade é que os mesmos estudos não demonstraram qualquer aumento da sobrevida global dos doentes (Glimelius *et al*, 1999). Recentemente, foi demonstrado que a radioquimioterapia pós-operatória é mais eficiente no tratamento do carcinoma do recto, do que a cirurgia isolada ou cirurgia seguida de radioterapia, contribuindo não só para uma diminuição das taxas de recorrência local, mas também para um aumento significativo da sobrevida global dos doentes (Tveit *et al*, 1997; Glimelius, 2001).

Devido à eficácia demonstrada no controlo local com o tratamento adjuvante de radioquimioterapia e na tentativa de aumentar as taxas de cirurgia com preservação do esfíncter, tem-se verificado actualmente uma utilização crescente da associação da quimioterapia à radioterapia pré-operatória, com esquemas baseados no 5-Fluorouracilo (5-FU) (Swedish Rectal Cancer Trial, 1997; Camma *et al*, 2000).

## **2.3 - Quimioterapia**

É sabido que cerca de 25% dos doentes com CCR apresentam metástases na altura do diagnóstico e que 50% dos doentes com diagnóstico “*de novo*” de CCR acabarão por

morrer de doença metastática (Skibber *et al*, 2000; Rougier, 2001). A presença de metástases nos gânglios linfáticos e o estadiamento TNM são os factores de prognóstico mais importantes, pretendendo a quimioterapia adjuvante aumentar a sobrevida global dos doentes após a cirurgia. O fígado é o órgão onde mais frequentemente ocorrem metástases à distância, sendo a ressecção cirúrgica das metástases hepáticas possível em apenas 10% dos casos. Nestas situações, a quimioterapia tem também um papel muito importante como terapia paliativa ou como tentativa de tornar exequível a exérese cirúrgica das metástases. (Skibber *et al*, 2000; Rougier, 2001).

### **5-Fluorouracilo**

O 5-FU foi introduzido na prática clínica por Heidelberger e colaboradores em 1957 e desde essa altura tem sido considerado o agente quimioterápico mais activo no tratamento sistémico dos doentes com CCR (Heidelberger *et al*, 1957). Durante os últimos anos, tem sido objecto de intensos estudos no intuito de otimizar a sua utilização (Skibber *et al*, 2000).

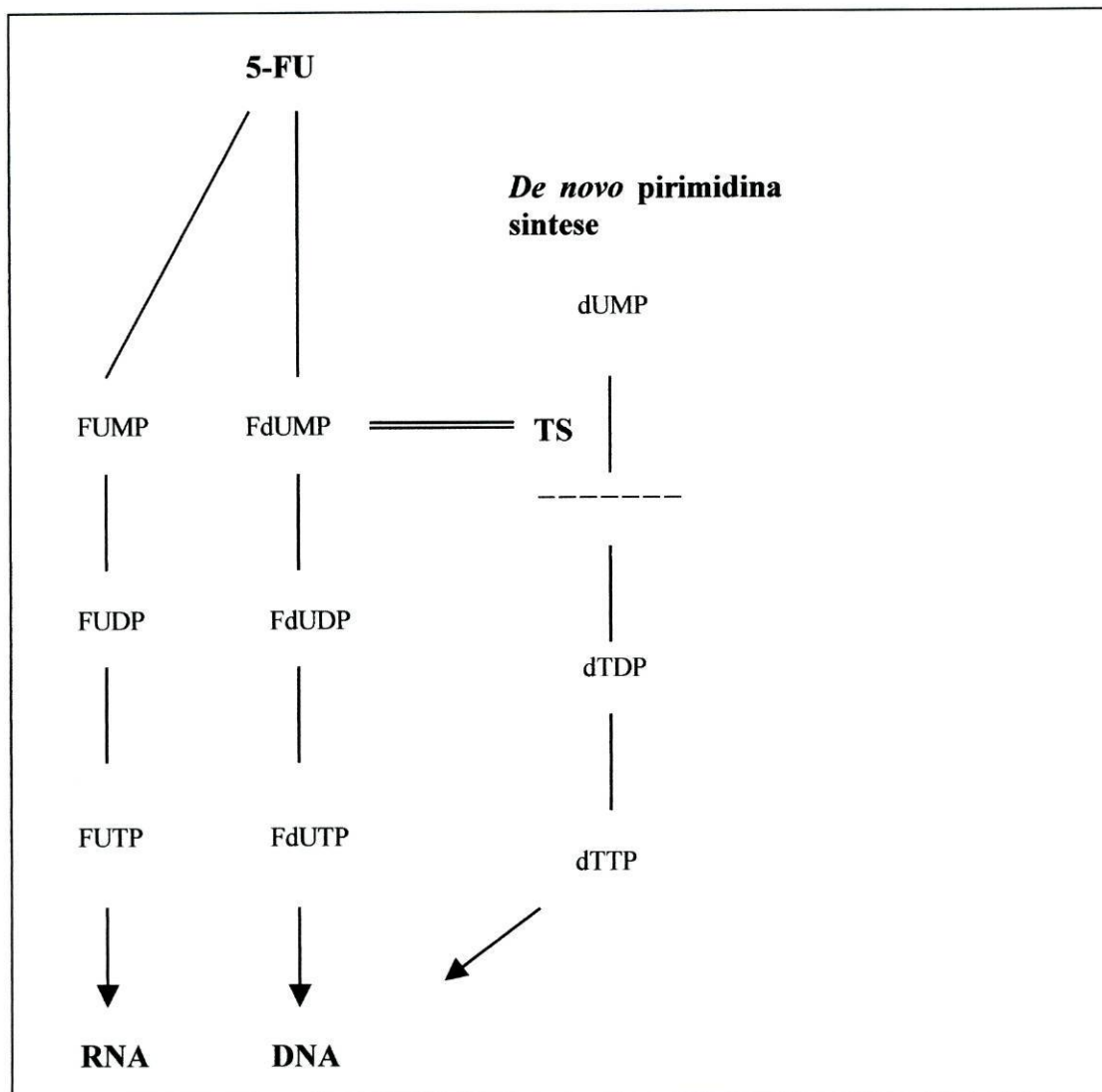
O 5-FU é um análogo das pirimidinas e não possui actividade biológica como droga citotóxica pelo que tem de ser activado no compartimento intracelular para exercer a sua actividade. Após a sua entrada no compartimento intracelular, a molécula de 5-FU é convertida em diferentes metabolitos citotóxicos, por diversas vias metabólicas, que vão actuar de formas distintas na célula.

Numa das vias metabólicas, a molécula de 5-FU é metabolizada em 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP) por acção da timidina fosforilase e da timidina cinase. Na presença de um co-factor folato, o N5-N10-metilenotetraidrofolato,

o FdUMP liga-se covalentemente ao enzima timidilato sintetase (TS), formando um complexo ternário estável. A TS, é o enzima que catalisa a formação de desoxitimidina monofosfato (dTMP) a partir da desoxiuridina monofosfato (dUMP). A dTMP é subsequentemente convertida em desoxitimidina trifosfato (dTTP), um constituinte essencial à síntese e reparação do DNA. A inibição da TS leva à depleção de TTP, interferindo com a síntese e reparação do DNA. A inibição da TS pelo FdUMP é um dos principais mecanismos de acção do 5-FU.

O 5-FU pode também ser metabolizado em fluorouridina monofosfato (FUMP) por acção da uridina fosforilase e da uridina cinase. Este metabolito é posteriormente convertido em fluorouridina difosfato (FUDP) e em seguida em fluorouridina trifosfato (FUTP), o qual é incorporado no RNA. A incorporação do FUTP no RNA é outro mecanismo de actuação do 5-FU e interfere com o processamento e função normal do RNA das células.

A inibição da TS não provoca apenas uma depleção do dTTP, mas também uma acumulação de dUMP. O FdUMP e o dUMP podem subsequentemente ser convertidos nas suas respectivas formas trifosfato. Posteriormente, o FdUTP e dUTP podem incorporar-se directamente no DNA, inibindo a sua síntese e função normal, o que representa outro mecanismo de citotoxicidade do 5-FU (Figura 1) (Chabner *et al* 1996; Vincent *et al*, 1999)



**Figura 1** - Anabolismo do 5-FU. FdUMP:5-fluorodesoxiuridina monofosfato; FdUDP:5-fluorodesoxiuridina difosfato; FdUTP:5-fluorodesoxiuridina trifosfato; FUMP:fluorouridina monofosfato; FUDP:fluorouridina difosfato; FUTP:fluorouridina trifosfato; dUMP:desoxiuridina monofosfato; dTMP:desoxitimidina monofosfato; dTT:desoxitimidina trifosfato; dTDP:desoxitimidina difosfato; TS:Timidilato sintetase.

A resistência às drogas é, frequentemente, um processo multifactorial. Relativamente ao 5-FU, são vários os seus alvos celulares (TS, DNA e RNA) e diversos os mecanismos de resistência já identificados, nomeadamente: a) perda ou diminuição da actividade dos enzimas intervenientes na via de activação do 5-FU; b) diminuição da expressão da pirimidina monofosfato cinase (que diminui a incorporação no RNA); c) amplificação génica da timidilato sintetase e/ou alteração da timidilato sintetase tornando-a insensível à inibição pelo FdUMP (Chabner *et al*, 1996 ; Leichman *et al*, 1997; Leccia *et al*, 1997; Metzger *et al*, 1998; Yamachika *et al*, 1998; Aschele *et al*, 1999; Cascinu *et al*, 1999).

### ***5-FU como agente isolado***

Os primeiros ensaios de quimioterapia sistémica com 5-FU para o tratamento do CCR obtiveram taxas de resposta que não ultrapassaram os 20% e não mostraram qualquer vantagem para a sobrevida global dos doentes (Higgins *et al*, 1976; Zaniboni *et al*, 1997). Estes resultados pouco animadores, levaram vários cientistas a explorar o uso de agentes que pudessem modular a actividade do 5-FU, no sentido de aumentar a sua eficácia como agente citotóxico. Vários moduladores foram estudados, dos quais se destacam o levamisol e o leucovorin (ácido folínico) (Zaniboni, 1997; Skibber *et al*, 2000).

### ***5-FU-Levamisol***

Em 1989, um ensaio clínico randomizado do NCCTG (North Central Cancer Treatment Group) demonstra claros benefícios no uso do levamisol, quer isolado, quer em combinação com o 5-FU como terapia adjuvante no tratamento dos CCR em estádios II e III (Laurie *et al*, 1989).

O levamisol é um agente anti-helmíntico amplamente usado nos humanos e animais domésticos, cujos efeitos colaterais são mínimos. A sua potente actividade imunomoduladora forneceu o impulso para o seu uso como agente terapêutico contra o cancro (Skibber *et al*, 2000).

Um estudo realizado posteriormente, por Moertel *et al* (1990), em 1296 doentes com CCR em estágio III, verificou que a terapia adjuvante com combinação de 5-FU e levamisol reduz o risco de recorrência da doença em 41% e aumenta a sobrevida global dos doentes em 33%, em comparação com o uso de levamisol isolado ou com cirurgia isolada (isto é, sem terapia adjuvante). Assim, este estudo conclui que a quimioterapia adjuvante com 5-FU-Levamisol deveria constituir o esquema *standard* de tratamento dos CCR em estágio III (Moertel *et al*, 1990).

### ***5-FU-Leucoverin (ácido folínico)***

Vários estudos experimentais, a partir de uma variedade de modelos tumorais, estabeleceram as potencialidades do ácido folínico para aumentar a citotoxicidade do 5-FU (Keyomarsi *et al*, 1986; O'Connell *et al*, 1997). Os primeiros ensaios clínicos realizados com quimioterapia adjuvante com 5-FU em combinação com ácido folínico, revelaram um aumento das taxas de resposta quando comparados com a quimioterapia adjuvante com 5-FU isolado em doentes com CCR metastático (Petrelli *et al*, 1987).

Estes resultados preliminares levaram vários grupos de investigadores a explorar aprofundadamente a combinação 5-FU-ácido folínico em diferentes grupos de doentes. Assim, a terapia adjuvante 5-FU-ácido folínico foi testada em numerosos ensaios clínicos randomizados, ficando demonstrado que esta terapia aumenta

significativamente a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global dos doentes com CCR em estágio II e III (IMPACT, 1995; O'Connell *et al*, 1997; Zaniboni *et al*, 1997).

Estudos posteriores, comparando a terapia adjuvante 5-FU-levamisol com a terapia adjuvante 5-FU-ácido folínico em doentes com CCR em estágio III, revelaram que a combinação 5-FU-ácido folínico era superior ao anteriormente considerado *standard* 5-FU-levamisol (Wolmark *et al*, 1999; QUASAR, 2000). Após estes estudos, a terapia adjuvante 5-FU-ácido folínico passou a ser considerada o novo tratamento *standard* dos CCR em estágio III.

#### ***5-FU bolus versus 5-FU infusão contínua***

Diversos estudos compararam a eficácia do 5-FU administrado em bolus versus 5-FU administrado em infusão contínua. Segundo esses estudos, o 5-FU em infusão contínua é superior ao 5-FU em bolus em termos de taxas de resposta (44% vs 22%). A vantagem do 5-FU em infusão contínua em relação ao 5-FU em bolus é reforçada pelo facto das toxicidades hematológicas de grau 3 e 4 serem menos frequentes nos doentes que recebem 5-FU em infusão contínua (Piedbois, 1998).

Uma possível explicação para os melhores resultados obtidos pelo regime de infusão contínua em relação ao regime de bolus, pode ser o facto da dose cumulativa de 5-FU que é administrada em infusão contínua ser três vezes superior. Além disso, o tempo de exposição das células tumorais ao fármaco é maior no regime de infusão contínua do que no regime de bolus (Piedbois, 1998; Skibber *et al*, 2000).

A administração do 5-FU por infusão contínua altera o tipo de toxicidade mais frequente, deixando de ser a mielossupressão para passar a ser a estomatite e síndrome de mão-pé. Esta alteração de perfil de toxicidade deve-se ao facto de haver uma maior concentração de 5-FU na medula óssea após uma infusão em bolus do que após uma infusão contínua (Piedbois, 1998; Skibber *et al*, 2000).

### ***Novas drogas para tratamento do CCR***

O futuro da terapia baseada no 5-FU passa pela sua combinação com novas drogas com diferentes mecanismos de acção. Diversas drogas têm demonstrado eficácia similar ao 5-FU como segundas linhas de tratamento nos doentes com recidivas de CCR ou com CCR resistente ao tratamento *standard* com 5-FU. Estes agentes incluem o CPT-11 e a oxaliplatina (Raymond *et al*, 1998; Rougier *et al*, 1998).

O CPT-11 é um potente inibidor da topoisomerase I e exerce a sua citotoxicidade por inibição da replicação do DNA. Alguns ensaios de fase II/III demonstraram uma actividade antitumoral objectiva muito consistente por parte do CPT-11, como segunda linha de tratamento nos doentes que apresentaram resistência ao 5-FU, com taxas de resposta de 11 a 23% e um aumento significativo da sobrevida global (Rougier *et al*, 1998). Assim, o CPT-11 confere um claro benefício clínico aos doentes que não respondem ao tratamento *standard* com 5-FU. O CPT-11 demonstrou ainda ser eficaz como primeira linha de tratamento, quer isolado quer em combinação com o 5-FU, nos doentes com CCR metastático (Pitot *et al*, 1997).

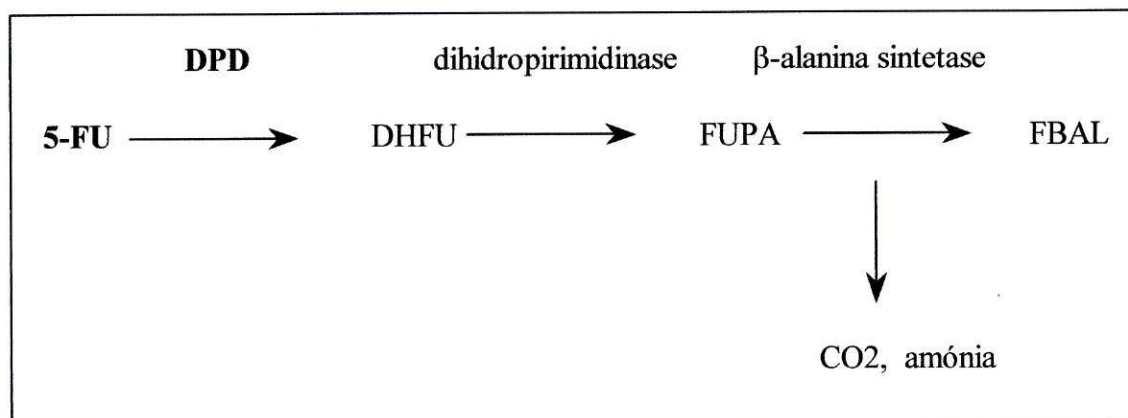
A oxaliplatina é um componente platinum de 3ª geração. Quando usado como agente isolado, a oxaliplatina obtém taxas de resposta que não ultrapassam os 10% nos doentes

com CCR metastático (Machover *et al*, 1996). Um ensaio clínico internacional, realizado em doentes resistentes à terapia com 5-FU-ácido folínico (5-FU-FA), demonstrou que a oxaliplatina em combinação com 5-FU-FA (FOLFOX), apresenta taxas de resposta objectivas de 11%, o que torna este regime uma boa alternativa neste grupo de doentes (Rougier, 2001).

Actualmente, encontram-se em curso alguns ensaios clínicos que investigam a combinação do CPT-11 com a oxaliplatina como segunda linha de tratamento nos doentes com CCR metastático. Os resultados desta combinação têm-se revelado animadores em termos de taxas de resposta e tempo de progressão da doença (Rougier, 2001).

### **3 - Via de catabolismo do 5-FU**

Cerca de 80 a 90 % da dose de 5-FU que é administrada é degradada pela dihidropirimidina desidrogenase (DPD), o primeiro enzima da via de catabolismo do 5-FU (Figura 2) (Heggie *et al*, 1987; Diasio *et al*, 1988). O 5-FU é convertido em dihidrofluorouracilo (DHFU) pela DPD, posteriormente a dihidropirimidinase converte o DHFU em ácido  $\alpha$ -fluoroureidopropiónico (FUPA), que dá origem à  $\alpha$ -fluoro- $\beta$  alanina pela acção da  $\beta$ -alanina sintetase com libertação de amónia e dióxido de carbono (Figura 2). Apenas 10% do 5-FU administrado é excretado na urina (Chu *et al*, 2000; Milano *et al*, 2000).



**Figura 2** - Catabolismo do 5-FU. DHFU:dihidrofluorouracilo; FUPA:ácido- $\alpha$ -fluoroureidopropiónico; FBAL:  $\alpha$ -fluor- $\beta$  alanina; CO<sub>2</sub>:dióxido de carbono.

#### 4 - Toxicidade ao 5-FU

A DPD exerce a sua actividade na maioria dos tecidos humanos, no entanto os seus níveis mais elevados ocorrem no fígado e nas células mononucleadas do sangue (Lu *et al*, 1993; Diasio *et al*, 1994; Milano *et al*, 2000). Alguns estudos sobre a actividade enzimática da DPD verificaram a existência de uma correlação entre a actividade da DPD no fígado e nos linfócitos, pelo que estes são geralmente utilizados para monitorização clínica da actividade da DPD (Lu *et al*, 1993; Chazal *et al*, 1996).

Um estudo realizado por Fleming e seus colaboradores (1992), verificou a existência de uma correlação linear entre a actividade da DPD nos linfócitos e a remoção do 5-FU do plasma. Este estudo verificou ainda que os indivíduos com níveis de actividade da DPD muito baixos, podem apresentar toxicidades graves quando submetidos ao tratamento com 5-FU (Fleming *et al*, 1992). Consequentemente, estes estudos tornaram imperativo a quantificação da actividade enzimática da DPD nos linfócitos dos doentes, antes de iniciarem a quimioterapia com 5-FU.

No entanto, estudos posteriores verificaram que existia uma ampla variação na actividade da DPD entre os indivíduos de uma mesma população, facto que gerou alguma controvérsia na comunidade científica (Etienne *et al*, 1994) e que tornou difícil o estabelecimento de um valor (*cut-off*) de actividade da DPD abaixo do qual um indivíduo correria um risco elevado de desenvolver toxicidade grave ao 5-FU. Alguns estudos sugeriam o valor de  $100 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína como *cut-off* (Etienne *et al*, 1994), enquanto outros estudos sugeriam que apenas os indivíduos com actividade da DPD abaixo dos  $60 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína apresentariam risco de desenvolver toxicidade grave ao 5-FU (Ridge *et al*, 1998). Alguns estudos de farmacocinética verificaram que factores como a idade, a concentração de fosfatase alcalina no plasma, a duração de uma infusão e a quantidade de células mononucleadas em circulação, podiam influenciar a taxa de remoção do 5-FU do plasma (Etienne *et al*, 1998). Todos estes factos, introduziram alguma ambiguidade na interpretação dos testes de quantificação da actividade enzimática da DPD.

Segundo alguns estudos populacionais, a ausência total de actividade da DPD é rara, mas estima-se que cerca de 3 a 5% da população apresenta a actividade deste enzima muito reduzida. Estes indivíduos apresentam um risco elevado de desenvolver toxicidade grave quando submetidos ao tratamento com 5-FU (Lu *et al*, 1993; Etienne *et al*, 1994). Um estudo recente de Van Kuilenburg e colaboradores (2000) verificou que 55% dos doentes com a actividade da DPD diminuída desenvolvem neutropenia de grau 4, enquanto apenas 13% dos doentes com actividade da DPD normal apresentam o mesmo tipo de toxicidade.

## 5 - Estudos moleculares

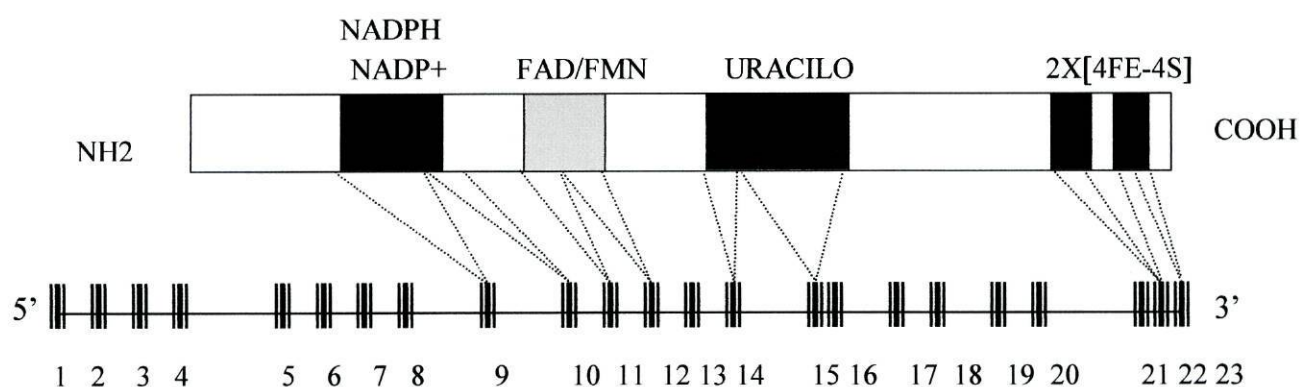
Nos últimos anos, diversos grupos de investigação centraram-se na pesquisa de mutações no gene que codifica a DPD (*DPYD*), na tentativa de relacionar alterações a nível molecular com determinados quadros de toxicidade encontrados em doentes tratados com 5-FU, tais como diarreias, vômitos, náuseas, neutropenias graves, neurotoxicidade e, em casos extremos, morte (Vreken *et al*, 1997a, 1997b; Van Kuilenburg *et al*, 1997, 1999, 2000; Kouwaki *et al*, 1998; Ridge *et al*, 1998; Johnson *et al*, 1999).

A clonagem e sequenciação do gene *DPYD* foram fundamentais para estabelecer a relação entre a estrutura do gene e a função da proteína e para posteriormente identificar mutações responsáveis pela perda de actividade da mesma (Yokota *et al*, 1994; Johnson *et al*, 1997; Wei *et al*, 1998).

O gene *DPYD* está localizado em 1p22 e é constituído por 23 exões, sendo o exão 15 o mais pequeno com 65 bp e o exão 23 o maior com 961 bp. Este gene codifica uma proteína de 1025 aminoácidos com um peso molecular de 111 kDa (Figura 3). Esta apresenta 4 domínios funcionais: o domínio de ligação ao NADPH; o domínio de ligação ao FAD; o domínio de ligação ao uracilo e os *Clusters* [4FE-4S]. Os domínios de ligação do NADPH e do FAD estão localizados, respectivamente, na região N-terminal e na região média da proteína. O domínio de ligação ao NADPH é codificado pelo exões 9 e 10, enquanto que o domínio de ligação ao FAD é codificado pelos exões 11 e 12 do gene. Na região C-terminal, entre os aminoácidos 953 e 964 e os aminoácidos 986 e 997, encontram-se os *Clusters* [4FE-4S], que são codificados pelo exão 22 do gene. O domínio de ligação ao uracilo está localizado entre os aminoácidos

661 e 678 e é codificado pelo exões 14 e 15. Este último domínio tem sido alvo de inúmeros estudos, dado que se trata da zona de ligação ao substrato (Figura 3) (Johnson *et al*, 1997; Wei *et al*, 1998).

A caracterização completa do gene permitiu a identificação de mutações e polimorfismos, demonstrando que cerca de 57% dos doentes com diminuição ou ausência de actividade deste enzima apresentam uma base molecular para o seu fenótipo (Van Kuilenburg *et al*, 2000).



**Figura 3** - Diagrama do gene *DPYD* e dos domínios funcionais da proteína DPD . A correspondência entre os domínios funcionais da proteína e os exões do gene está representado a tracejado (Wei *et al*, 1998).

### ***Mutações no gene DPYD***

Foram identificadas, até ao momento, pelo menos 17 alterações genéticas diferentes no gene que codifica a DPD, tendo a maioria destas sido identificadas em indivíduos com deficiências totais ou parciais na actividade deste enzima (Raida *et al*, 2001; Van Kuilenburg *et al*, 2001).

A análise da prevalência das várias mutações identificadas nos doentes com deficiências na actividade da DPD demonstrou que a mutação *splice-site* IVS14+1G→A é a mais prevalente. Os estudos efectuados têm sugerido que esta mutação tem uma frequência de 43% a 52%, dependendo das séries, nos indivíduos com deficiências na actividade da DPD (Van Kuilenburg *et al*, 1999, 2000). Esta mutação consiste na substituição G→A no *splice donor site* do exão 14 e provoca a deleção de um fragmento de 165bp do mRNA que corresponde à totalidade do exão 14. A deleção deste exão traduz-se na perda de 55 aminoácidos da proteína, tornando-a não funcional. Os indivíduos heterozigóticos para esta mutação apresentam a actividade da DPD diminuída e os indivíduos homozigóticos apresentam geralmente uma ausência total de actividade da DPD (Van Kuilenburg *et al*, 1999, 2000).

Um estudo de Van Kuilenburg e colaboradores (2001) realizado em 1357 indivíduos de raça Caucasiana verificou que 24 indivíduos eram heterozigóticos para a mutação IVS14+1G→A, o que corresponde a uma frequência de heterozigóticos de 1,8% e uma frequência alélica de aproximadamente 0,9%. Posteriormente Raida e colaboradores (2001), num grupo de 851 indivíduos de raça Caucasiana, verificaram que a mutação IVS14+1G→A apresentava uma frequência de cerca de 0,94%. Além disso, este estudo verificou que num grupo de 25 doentes tratados com 5-FU e que apresentaram toxicidades de grau 3 ou 4, cinco eram heterozigóticos e um era homozigótico para a referida mutação, o que corresponde a 24% dos indivíduos com toxicidade ao 5-FU (Raida *et al*, 2001). Segundo estes autores, o facto de 24% dos doentes com toxicidade de grau 3 ou 4 serem portadores da mutação IVS14+1G→A e da referida mutação apresentar uma frequência de aproximadamente 1% na população Caucasiana, justifica

a pesquisa desta alteração genética nos doentes oncológicos antes de iniciarem a quimioterapia com 5-FU (Raida *et al*, 2001).

Como foi referido anteriormente, apenas 57% dos casos de toxicidade ao 5-FU são devidos a alterações moleculares no gene *DPYD*, a maioria das quais no exão 14, embora estejam também descritas mutações noutras regiões do gene (mutações *missense* e *frameshift*) que, ainda que raras, podem ser responsáveis pela perda de função da DPD (Vreken *et al*, 1997a, 1997b; Kouwaki *et al*, 1998; Van Kuilenburg *et al*, 1999, 2000, 2001). Recentemente, um grupo de investigadores levantou a hipótese de alguns doentes com deficiências na actividade da DPD poderem apresentar mutações na região promotora do gene, o que poderá explicar a ausência de mutações na zona codificante do gene *DPYD* em alguns doentes com deficiências na actividade da DPD (Collie-Duguid *et al*, 2000). No entanto, é importante realçar que a toxicidade ao 5-FU pode ser devida a outros factores, como por exemplo, um aumento da expressão das enzimas da via de anabolismo do 5-FU.

Uma vez que o 5-FU constitui o tratamento adjuvante de primeira linha nos doentes do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil - Centro Regional do Porto (IPO-Porto) com CCR, a confirmação da associação entre as mutações da DPD e a toxicidade ao referido tratamento, permitiria definir grupos de doentes com um risco mais elevado de toxicidade antes de se iniciar a terapêutica. Deste modo, a administração da droga nestes doentes poderia ser feita em doses menos elevadas ou, em casos extremos, esta poderia ser substituída por protocolos quimioterápicos alternativos.

## **OBJECTIVOS**

Foram objectivos deste estudo:

- 1- Avaliar a frequência de mutações no exão 14 do gene *DPYD* num grupo de doentes com CCR, tratados no IPO-Porto.
  
- 2- Avaliar a toxicidade do tratamento com 5-FU em relação à presença e tipo de mutação encontrada.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## I - MATERIAL BIOLÓGICO

Para este estudo foram seleccionados 73 doentes com CCR do IPO-Porto, dos quais foi obtida uma amostra de sangue periférico. A mediana de idades dos doentes estudados foi de 59 anos (mínimo: 31; máximo: 85). Nesta série 47% dos indivíduos eram do sexo masculino e 53% do sexo feminino. De acordo com o sistema de estadiamento TNM, dos 73 doentes seleccionados, 2 apresentavam doença em estágio I, 27 em estágio II, 36 em estágio III e 8 em estágio IV. Quanto à localização, as neoplasias distribuíam-se da seguinte forma: 5 no cólon direito, 2 no cólon transversal, 5 no cólon esquerdo, 10 no cólon sigmóide e 51 no recto.

Os doentes seleccionados foram tratados com cirurgia curativa e terapêutica adjuvante de radioquimioterapia e/ou quimioterapia com 5-FU em diferentes esquemas (Tabela 1). Relativamente ao modo de administração do 5-FU, 44 doentes foram submetidos ao regime de bolus, 25 ao regime de infusão contínua (IC) e 4 realizaram os dois tipos de regimes (Tabela 1).

A toxicidade do tratamento foi avaliada de acordo com os critérios de toxicidade do *National Cancer Institute*. Foram definidos os graus de toxicidade hematológica, nomeadamente de neutropenia, anemia e trombocitopenia, de toxicidade gastrointestinal, mucosite, toxicidade dermatológica e neurotoxicidade para cada doente, uma vez que são resultantes directas da toxicidade ao 5-FU e têm implicações potenciais na sobrevivência do doente ao tratamento.

A avaliação da toxicidade ao tratamento foi realizada com base nos registos clínicos e nos resultados analíticos para cada doente. Todos os indicadores de toxicidade ao

tratamento foram revistos por duas médicas oncologistas do IPO-Porto. Os dados clínicos foram recolhidos após a avaliação dos estudos moleculares e sem conhecimento prévio dos resultados dos mesmos, de modo a garantir objectividade na interpretação dos resultados obtidos.

Doente (nº)		Doente (nº)		Doente (nº)		Doente (nº)		
Tratamento	Regime	Tratamento	Regime	Tratamento	Regime	Tratamento	Regime	
1	5-FU-LV	Bolus	26	5-FU-LV	Bolus	50	5-FU-FA-CPT 11	IC
2	5-FU-FA	Bolus	27	5-FU-FA-CPT11	IC	51	5-FU-Hep	Bolus
3	5-FU-LV	Bolus	28	5-FU-FA-CPT11	IC	52	5-FU-RT	IC
4	5-FU-FA	Bolus	29	5-FU-FA	Bolus	53	5-FU-FA-RT	IC
5	5-FU-FA	Bolus	30	5-FU-FA/5-FU-FA-CPT11	Bolus/IC	54	5-FU-FA	Bolus
6	5-FU-FA	Bolus	31	5-FU-FA	Bolus	55	5-FU-FA-RT	Bolus
7	5-FU-FA	Bolus	32	5-FU-FA	Bolus	56	5-FU-FA-RT	IC
8	5-FU-LV	Bolus	33	5-FU-FA/5-FU/5-FU-FA-CPT11/ 5-FU-CPT11-Oxal	Bolus/Bolus/IC	57	5-FU-RT pré	IC
9	5-FU-LV	Bolus	34	5-FU-FA	Bolus	58	5-FU-FA	Bolus
10	5-FU-FA	Bolus	35	5-FU-FA	Bolus	59	5-FU-RT	IC
11	5-FU-FA	Bolus	36	5-FU-FA/5-FU-CCNU-Oncovim	Bolus	60	5-FU-RT	IC
12	5-FU-FA	Bolus	37	5-FU-FA	Bolus	61	5-FU-FA	IC
13	5-FU-FA	Bolus	38	5-FU-RT/5-FU-FA/5-FU-FA-CPT11	Bolus/Bolus/IC	62	5-FU-RT/5-FU-FA	IC
14	5-FU-LV	Bolus	39	5-FU-RT	Bolus	63	5-FU-FA	IC
15	5-FU-LV	Bolus	40	5-FU-RT	IC	64	5-FU-RT/5-FU-FA	IC
16	5-FU-FA	Bolus	41	5-FU-FA	Bolus	65	5-FU-RT	IC
17	5-FU-LV	Bolus	42	5-FU-FA/5-FU-FA-CPT11	Bolus/IC	66	5-FU-RT	Bolus
18	5-FU-FA	Bolus	43	5-FU-FA	Bolus	67	5-FU-RT	IC
19	5-FU-FA	Bolus	44	5-FU-FA/5-FU-FA-CPT11	IC/IC	68	5-FU-FA-Oxal	IC
20	5-FU-LV	Bolus	45	5-FU-RT	IC	69	5-FU-FA	IC
21	5-FU-FA	Bolus	46	5-FU-FA	Bolus	70	5-FU-RT	IC
22	5-FU-RT/5-FU-FA	Bolus	47	5-FU-RT	IC	71	5-FU-RT/5-FU-FA	IC/IC
23	5-FU-FA	Bolus	48	5-FU-FA	IC	72	5-FU-FA	Bolus
24	5-FU-FA	Bolus	49	5-FU-RT/5-FU-FA	IC	73	5-FU-Hep	Bolus
25	5-FU-FA	Bolus						

**Tabela 1 - Esquemas de radioquimioterapia / quimioterapia com 5-FU e regimes de administração realizados pelos 73 doentes. 5-FU-FA:5-FU-ácido folínico; 5-FU-LV:5-FU-levamisol; 5-FU-RT:Radioquimioterapia com 5-FU pós-operatória; 5-FU-RT pré:Radioquimioterapia com 5-FU pré-operatória; 5-FU-FA-RT:5-FU-ácido folínico-radioterapia; 5-FU-FA-CPT11:5-FU-ácido folínico-CPT11; 5-FU-CPT11-Oxal:5-FU-CPT11-Oxaliplatina; 5-FU-FA-Oxal:5-FU-ácido folínico-oxaliplatina; 5-FU-Hep:5-FU-heparina; 5-FU-CCNU-Oncovim:5-FU-lomustina-ovcovim; IC:Infusão contínua.**

## II. MÉTODOS

### *Processamento das amostras de sangue periférico*

As amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos esterilizados, contendo anticoagulante (EDTA) e processadas de imediato. A lise dos eritrócitos foi obtida pela adição de uma solução hipotónica (AKE:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [Merck 1.01145] 155 mM;  $\text{KHCO}_3$  [Merck 48540] 10 mM; EDTA 0,1 mM; pH=7,4) a 3-5 mL de sangue numa proporção de 9 a 10 vezes esse volume, seguida de incubação a 4°C durante 30 min. Centrifugou-se a 4°C (2000 rpm, 10 min). Desprezou-se o sobrenadante e este processo foi repetido tantas vezes quantas as necessárias até ao desaparecimento da hemoglobina do sedimento e do sobrenadante. O sedimento nuclear resultante foi ressuscitado em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) [Sigma cat.no.1000-3] e transferido para um tubo *ependorf* de 1,5 mL, seguindo-se uma nova centrifugação a 4°C (14000 rpm, 5 min) [microcentrifuga eppendorf-5417R].

### *Extracção de DNA*

Para extracção do DNA genómico, adicionou-se, ao precipitado de células nucleadas, 500 µL de tampão SE (  $\text{NaCl}$  [Merck 106404,1000] 75 mM, EDTA [Merck 1.08418.1000] 25 mM), 25 µL SDS [Gibco Brl 15525.025] (10%) e 40 µL de proteinase-K [Gibco Brl P2308] (10 mg/ml). Misturou-se suavemente e incubou-se a 55°C durante a noite. Adicionou-se 500µL de  $\text{NaCl}$  6 M e voltou-se a incubar a 55°C durante 10 min. Adicionou-se um volume de clorofórmio [Merck 1.02445.2500] e colocou-se a agitar durante 30 min. Em seguida, centrifugou-se a 4°C (14000 rpm; 10 min). O sobrenadante foi recolhido e precipitado

com isopropanol [Merck 1.09634.2511]. O DNA obtido foi lavado 2 vezes com etanol [Pronalab 64-17-5] a 70% (v/v) e no final diluído em água destilada [Nuclease Free Water Promega P119C].

A concentração do DNA extraído de cada amostra foi determinada por leitura espectrofotométrica [espectrofótopmetro Pharmacia Biotect-Ultospec®2000] a 260 nm, de forma a que a fórmula -  $Abs_{260nm} \times 50 \times \text{factor de diluição}$  - permitisse calcular a concentração do DNA em  $\mu\text{g/mL}$ , tendo como referência que 1 unidade de densidade óptica a 260 nm corresponde aproximadamente a 50  $\mu\text{g/mL}$  de DNA de cadeia dupla. Simultaneamente verificou-se o grau de contaminação proteica, calculando o valor da razão  $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}$ , sendo os valores localizados no intervalo 1,65-2,00 considerados aceitáveis.

A análise da qualidade do DNA foi efectuada por electroforese em géis de agarose [Gibco BI 15510-027] a 0,8% (p/v), corados com brometo de etídeo [Sigma E7637] (Figura 4). O DNA de boa qualidade migra como uma única banda de elevado peso molecular, enquanto que DNA degradado migra mais rapidamente provocando o aparecimento de uma mancha ou *smear*. Nas experiências apenas foi utilizado o DNA de qualidade razoável.

O armazenamento das amostras foi efectuada a 4°C ou a -30°C, dependendo do tempo de armazenamento (maior tempo de armazenamento, mais baixa a temperatura).

### ***Pesquisa de mutações no gene da DPD***

#### *Reacção em cadeia da polimerase*

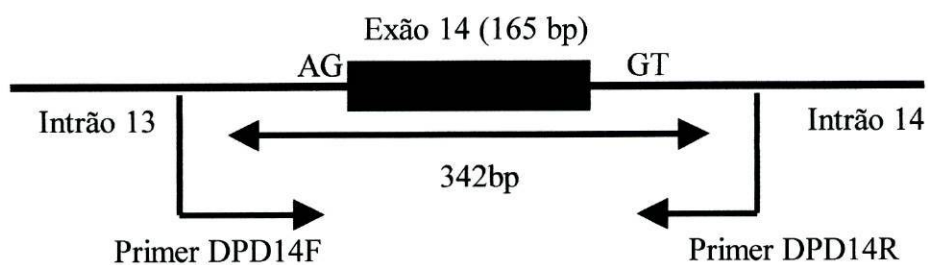
Para a reacção em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) usaram-se oligonucleótidos iniciadores de síntese (*primers*) [Amersham Pharmacia Biotech] descritos por

Johnson *et al* (1999) específicos para o exão 14 do gene da DPD, denominados DPD14F e DPD14R (Tabela 2).

Exão	Primer	Sequência	Fragmento (bp)
14	DPD14F	5'-GTAAGAAGGACCTCATAAAATATTGTC-3'	342
	DPD14R	5'-GAATTGGATGTTTAAATAAACATTCACCAAC-3'	

**Tabela 2** – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do exão 14 do gene *DPYD*.

Os *primers* DPD14F e DPD14R estão localizados, respectivamente, na extremidade 3' do intrão 13 e na extremidade 5' do intrão 14. Estes *primers* amplificam um fragmento de 342 bp que contém a totalidade do exão 14, as zonas de splicing 3' e 5' do respectivo exão e parte do intrão 13 e 14 (Figura 4).



**Fig 4** - Esquema da região amplificada pelos *primers* DPD14F e DPD14R

A reacção de amplificação foi efectuada num volume total de 25  $\mu$ L de uma solução contendo: 2,5  $\mu$ L de *buffer* 10x [Perkin-Elmer 55603-11/95] (10 mM Tris-HCl, 50mM KCl), 2,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> [Perkin-Elmer 55611-1/93] (1,5 mM), 1,2  $\mu$ L de dNTP's [Perkin-Elmer no-36227510017] (250  $\mu$ M dTTP, 250  $\mu$ M dATP, 250  $\mu$ M dGTP, 250  $\mu$ M dCTP), 2 $\mu$ L de cada *primer*

[Amersham Pharmacia Biotech] (0,5  $\mu$ M), 0,1  $\mu$ L de *Taq DNA polimerase* [Perkin-Elmer part.no.N808-0101] (0,2 U), 30 a 50 ng de DNA genómico e 16,2  $\mu$ L de água destilada.

Num termocilador Perkin-Elmer *Gene-Amp PCR System 9700*, as amostras foram desnaturadas a 95°C durante 2 minutos, sujeitas a 35 ciclos de desnaturação a 95°C, durante 1 minuto, emparelhamento (*annealing*) a 55°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto e, por fim, um ciclo de extensão final a 72°C durante 10 minutos. A presença de produto de PCR foi verificada através de electroforese em gel de agarose a 2%(p/v) corado com brometo de etídio.

### ***Purificação e quantificação dos produtos de PCR***

Os produtos de PCR foram purificados com o kit “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” [Amersham Pharmacia Biotech 27-9602-01] com o intuito de remover sais, enzimas, nucleótidos e *primers* não incorporados. As amostras foram purificadas de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante e eluídas com água destilada. Para a quantificação, os produtos purificados foram sujeitos a electroforese em gel de agarose a 0,8%(p/v) corado com brometo de etídio.

### ***Sequenciação automática***

Os produtos purificados foram sequenciados num sequenciador automático ABI PRISM 310<sup>TM</sup> *Genetic Analyser*. Esta técnica baseia-se no método de Sanger ou método *dideoxi* (Sanger *et al*, 1977). Para a reacção de marcação das cadeias de DNA usaram-se 30 a 90 ng de DNA, 8  $\mu$ L de *Terminator Reaction Mix* [Perkin-Elmer part.no.4303152], 0,7  $\mu$ L de *primer* e água destilada até perfazer o volume de 20 $\mu$ L. A reacção foi realizada num

termociclador Perkin-Elmer, *Gene-Amp PCR System 9700* e, consistiu em 25 ciclos de desnaturação a 94°C durante 10 segundos, *annealing* a 52°C durante 5 segundos e extensão a 60°C durante 4 minutos.

Com o objectivo de retirar o excesso de deoxinucleótidos não marcados, dideoxinucleótidos marcados e *primers* não incorporados, num tubo de microcentrífuga adicionou-se 50 µL de etanol 95% (v/v), 2 µL de acetato de sódio [Merck 1.06267] 3M e todo o produto de PCR. Agitaram-se os tubos num vórtex, após o que permaneceram 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida as amostras foram centrifugadas a 14000rpm durante 30 minutos a 4°C, após o que foi desprezado o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 250 µL de etanol e deixou-se secar à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o precipitado com *Template Supression Reagent (TSR)* [Perkin-Elmer part.no.401674] e colocaram-se as amostras no sequenciador automático. As sequências obtidas foram comparadas com a sequência do gene da DPD (nº de acesso ao GenBank U09178).

### ***Análise estatística***

Para a análise estatística foi usado o teste exacto de Fisher. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## 1 - FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NO EXÃO 14 DO GENE *DPYD*

Foi pesquisada a presença de mutações no exão 14 do gene *DPYD* em 73 indivíduos com CCR. Destes, 2 apresentavam mutação no exão 14 do gene *DPYD*, o que corresponde a uma frequência de mutações de 2,7% (tabela 3). Os restantes 71 indivíduos não apresentavam mutações no exão 14 do gene *DPYD*.

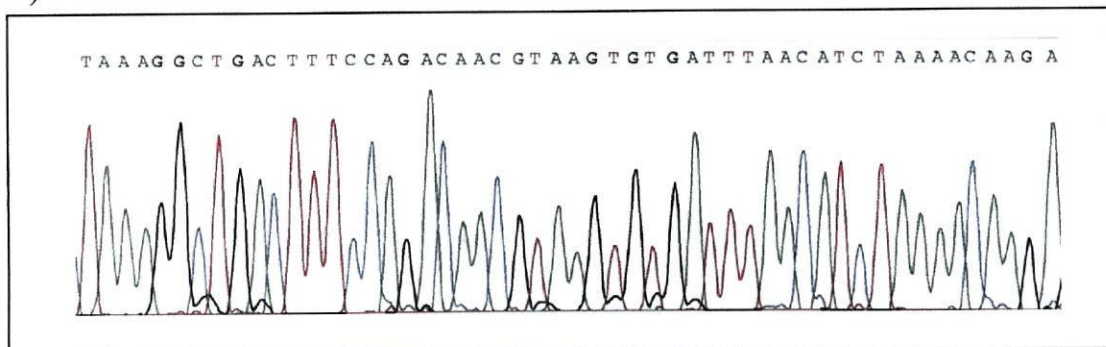
Doente Nº( sexo, idade)	Genótipo	Efeito <sup>a</sup>	Localização
22 (F,37)	1845G→T	E615D	Exão14
69 (M,68)	IVS14+1G→A	Del(exão 14)	IVS14

**Tabela 3** -Doentes com mutação no gene *DPYD*  
<sup>a</sup> efeito da mutação na proteína

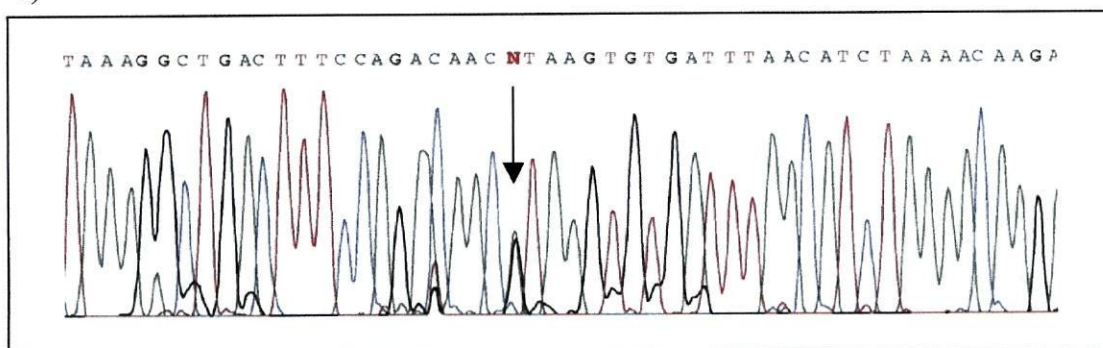
A análise do exão 14 do gene *DPYD* no doente 69, revelou a presença da mutação *splice-site* IVS14+1G→A (Figura 5), que consiste na transição G→A no *splice donor site* do exão 14. Esta mutação pontual provoca a deleção da totalidade do exão 14 do mRNA, que se traduz na eliminação de 55 aminoácidos na proteína, resultando na perda de função da mesma. O doente com esta mutação era heterozigótico, o que traduz uma frequência de heterozigóticos de 1,4% e uma frequência alélica de 0,7% para a mutação IVS14+1G→A na população estudada.

Foi detectada uma mutação missense 1845G→T no doente 22 (Figura 6). Esta mutação, consiste na transversão G→T no nucleótido 1845, que resulta, a nível proteico, na troca de um ácido glutâmico por um ácido aspártico (E615D). Esta alteração genética foi detectada em 1 dos indivíduos analisados, o que traduz uma frequência de heterozigóticos de 1,4% e uma frequência alélica de 0,7% para a mutação 1845G→T.

a)

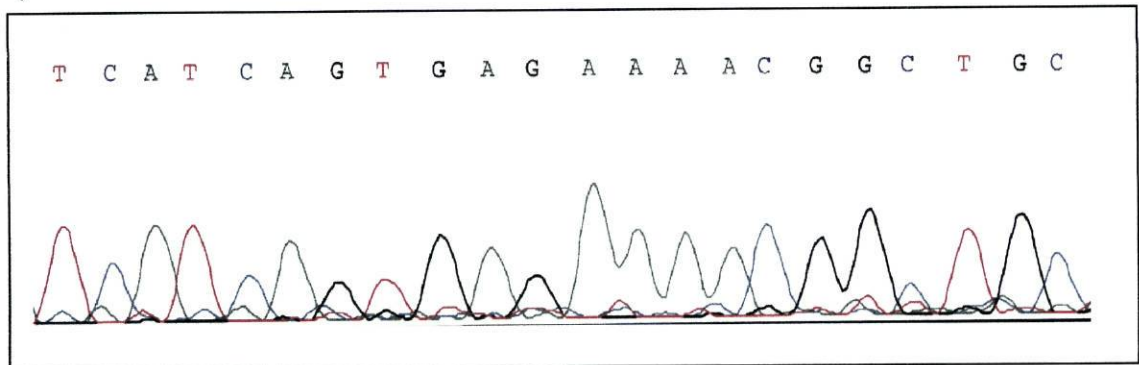


b)

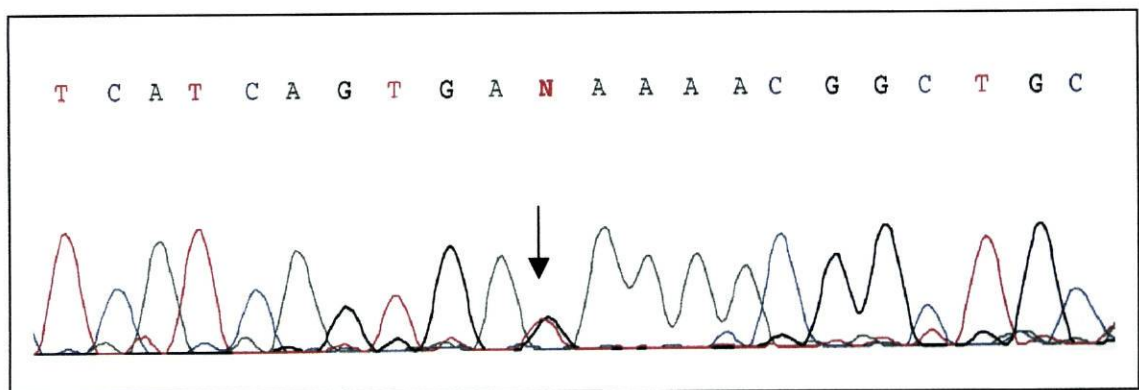


**Figura 5-** Electroforogramas de sequenciação automática de parte do exão 14 do gene *DPYD*. a) Indivíduo homocigótico para o alelo normal; b) Doente 69, heterocigótico para a mutação splice-site IVS14+1G→A.

a)



b)



**Figura 6** – Electroforogramas de sequenciação automática de parte do exão14 do gene *DPYD*. a) Indivíduo homocigótico para o alelo normal; b) Doente 22, heterocigótico para a mutação missense 1845G→T.

## 2 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TRATAMENTO COM 5-FU

Foram avaliadas as toxicidades hematológica, gastrointestinal, dermatológica e neurológica dos 73 doentes submetidos a terapêutica adjuvante de radioquimioterapia e/ou quimioterapia com 5-FU. Dos 73 doentes estudados, 64 apresentavam um grau de toxicidade 0, 1 ou 2. Os restantes 9 doentes apresentavam toxicidades de grau 3 ou 4, com implicações mais relevantes em termos de morbilidade e mortalidade dos doentes. Dos 9 doentes com toxicidades de grau 3 ou 4, foi excluído o doente 41 por ter desenvolvido uma neutropenia febril de grau 4 devido a um erro no cálculo da dose de 5-FU a ser administrada, tendo recuperado deste quadro clínico em 48 horas. Assim, foram 8 os doentes considerados com toxicidades de alto grau (grau 3 ou 4) ao tratamento com 5-FU, o que corresponde a aproximadamente 11% (8/73) da totalidade dos doentes submetidos ao tratamento (tabela 4).

Ambos os doentes (22 e 69) nos quais foram detectadas mutações no gene *DPYD*, apresentavam toxicidades de grau 3 ou 4 (Tabela 4).

O doente 22, portador heterozigótico da mutação missense 1845G→T (E615D), apresentou uma pancitopenia (neutropenia, anemia e trombocitopenia) de grau 4, mucosite de grau 3, toxicidade gastrointestinal (diarreia e vômitos) de grau 2, tendo desenvolvido um quadro de sepsis por infecção (grau 4) com *pneumocistis carinii* com insuficiência respiratória (grau 4) que determinou necessidade de suporte ventilatório. Durante este quadro clínico, foi interrompido o tratamento de quimioterapia, não tendo sido reiniciado o mesmo após recuperação (Tabela 4).

O doente 69, portador heterozigótico da mutação splice-site IVS14+1G→A, realizou o 1º ciclo de quimioterapia com normalidade. Ao segundo ciclo apresentou uma neutropenia de grau 4, uma toxicidade gastrointestinal de grau 2, tendo desenvolvido um quadro de infecção (grau 2) com febre (grau 3). Ao 4º tratamento do segundo ciclo o doente recusou continuar o tratamento de quimioterapia (tabela 4).

Doente nº(sexo, idade)	Tumor Primário	Tratamento	Regime	Toxicidade ao tratamento	Hematológica			Digestiva			Outras		
					Neutropenia	Trombocitopenia	Anemia	Náuseas/ Vômitos	Diarreia	Mucosite (Grau)	Dermatológica (Grau)	Neurológica (Grau)	Outras (Grau)
14 (M,68)	Cólon esquerdo	5-FU-FA	Bolus	1	0	1	2	4	0	0	0	0	0
22 (F,37)	Recto	5-FU-RT/ 5-FU-FA	Bolus	4	4	4	2	2	3	1	0	0	Infecção-G4 Pulmonar-G4
26 (M,49)	Cólon esquerdo	5-FU-LV	Bolus	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42 (F,69)	Recto	5-FU-FA/ 5-FU-FA-CPT11	Bolus IC	3	0	2	1	2	1	0	0	0	Toxicidade hepática-G 1
55 (F,48)	Recto	5-FU-FA-RT	Bolus	4	0	1	1	1	0	0	0	0	0
58 (F,50)	Recto	5-FU-FA	Bolus	4	0	1	1	1	1	0	0	0	0
68 (M,72) ##	Cólon sigmóide	5-FU-FA-Oxal	IC	0	1	0	0	0	3	2	0	0	Toxicidade ocular-G2
69 (M,68)	Recto	5-FU-FA	IC	4	0	2	0	2	0	0	0	0	Febre- G3 Infecção-G2

**Tabela 4** - Características dos doentes com toxicidades de Grau 3 ou 4. M:Masculino; F:feminino; 5-FU-FA:5-FU-ácido folínico;5-FU-LV:5-FU-levamisol; 5-FU-RT: Radioquimioterapia com 5-FU pós-operatória; 5-FU-FA-RT:5-FU-ácido folínico-radioterapia; 5-FU-FA-CPT11:5-FU-ácido folínico-CPT11; 5-FU-FA-Oxal:5-FU-ácido folínico-oxaliplatina; IC:Infusão contínua.

# - diarreia que determinou necessidade de internamento para hidratação.

## - doente que realizou um mês de tratamento e interrompeu por vontade própria.

---

### **3 - FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NO EXÃO 14 DO GENE *DPYD* NO GRUPO DE DOENTES COM TOXICIDADES DE GRAU 3 OU 4**

A análise do exão 14 do gene *DPYD* nos doentes que apresentaram toxicidades de grau 3 ou 4 demonstrou que 2 em 8 (25%) doentes apresentavam mutações nesta região do gene, um a mutação IVS14+1G→A e outro a mutação 1845G→T (E615D). Nos restantes 6 doentes (75%) com toxicidades de grau 3 ou 4 não foi detectada qualquer mutação no exão 14 do gene *DPYD*.

## **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

Diversos estudos populacionais demonstraram que a ausência de actividade da DPD é excepcional, mas que cerca de 3% a 5% da população apresenta actividade reduzida deste enzima, apresentando assim um risco potencial mais elevado de desenvolver toxicidade ao tratamento com 5-FU (Lu *et al*, 1993; Etienne *et al*, 1994). Posteriormente, alguns estudos moleculares relacionaram deficiências de actividade da DPD com a presença de mutações no gene *DPYD* (Wei *et al*, 1996; Vreken *et al*, 1997a, 1997b; Van Kuilenburg *et al*, 1997; Lu *et al*, 1998; Kouwaki *et al*, 1998; Ridge *et al*, 1998; Johnson *et al*, 1999).

Embora existam vários estudos sobre mutações no gene *DPYD* em doentes com deficiências na actividade da DPD (Wei *et al*, 1996; Vreken *et al*, 1997a, 1997b; Van Kuilenburg *et al*, 1997, 1999, 2000; Kouwaki *et al*, 1998; Johnson *et al*, 1999), a informação relativamente à frequência de mutações no gene *DPYD* em doentes oncológicos é escassa. Ridge e colaboradores (1998) detectaram, num grupo de doentes com CCR tratados com quimioterapia com 5-FU, uma frequência de mutações no gene *DPYD* de 4% (3/75). No presente trabalho, a frequência de mutações detectadas foi semelhante (2,7%).

Foram identificadas, até à data, 17 alterações genéticas (mutações e polimorfismos) diferentes no gene *DPYD*, tendo a maioria sido detectada em indivíduos com deficiências totais ou parciais na actividade deste enzima (Raida *et al*, 2001; Van Kuilenburg *et al*, 2001). Na série aqui apresentada foram identificadas 2 mutações: uma mutação na zona de *splicing* do exão 14 (IVS14+1G→A), já descrita na literatura, e uma mutação *missense* no exão 14 (1845G→T) não descrita previamente.

A mutação IVS14+1G→A tem sido descrita como a mais prevalente nos indivíduos com deficiências na actividade da DPD (Van Kuilenburg *et al*, 1999, 2000). No presente trabalho a referida mutação foi identificada num doente com toxicidade grave ao 5-FU, o que corrobora os resultados obtidos em estudos anteriores (Wei *et al*, 1996; Van Kuilenburg *et al*, 1997, 1999, 2000, 2001; Johnson *et al*, 1998; Ridge *et al*, 1998).

Dada a prevalência da mutação IVS14+1G→A em indivíduos com deficiências na actividade da DPD, alguns investigadores estudaram a frequência desta mutação em populações de doentes com CCR e em populações normais (Ridge *et al*, 1998; Van Kuilenburg *et al*, 2001; Raida *et al*, 2001). Um estudo de Ridge e colaboradores (1998), realizado em 75 doentes com CCR, revelou que a mutação IVS14+1G→A apresentava uma frequência alélica de 0,7%. Na nossa série, a mutação IVS14+1G→A apresentou uma frequência idêntica (0,7%).

Relativamente aos estudos realizados em populações normais, Van Kuilenburg e colaboradores (2001), numa série de 1357 indivíduos de raça Caucasiana, verificaram que a frequência alélica da mutação IVS14+1G→A era de 0,9%, valores semelhantes aos descritos por Raida e colaboradores (2001) (0,94% em 851 indivíduos). A comparação entre os nossos resultados e os obtidos nestes estudos, não revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p=1$ ), sendo de registar no entanto o tamanho reduzido da nossa amostra. A existência de uma frequência alélica idêntica para a mutação IVS14+1G→A nas populações normal e com CCR (Ridge *et al*, 1998; Van Kuilenburg *et al*, 2001; Raida *et al*, 2001), sugere que a alteração genética em causa não está associada ao desenvolvimento do CCR. Assim, os resultados aqui obtidos conjuntamente com os da literatura, sugerem que o grupo de doentes com CCR por nós

estudado poderá ser representativo da população portuguesa em geral, no que concerne à frequência desta mutação.

Nesta série foi também identificada uma nova mutação *missense* no exão 14 do gene *DPYD* (1845G→T). Embora se desconheça o efeito desta mutação ao nível da actividade enzimática da DPD, o quadro de toxicidade apresentado pelo doente portador da mutação sugere que se trata de uma alteração patogénica. Por outro lado, a baixa frequência desta mutação (0,7%), torna improvável que a mesma represente um polimorfismo. No entanto, serão necessários estudos adicionais para a confirmação da patogenidade desta mutação, tais como a quantificação da actividade enzimática da DPD em portadores.

Segundo Raida e colaboradores (2001), 24% dos doentes com toxicidades de grau 3 ou 4 são portadores da mutação *splice-site* IVS14+1G→A. No nosso estudo, verificou-se que 1 em 8 (12,5%) doentes com toxicidade de grau 3 ou 4 eram portadores da referida mutação. Esta diferença não é estatisticamente significativa ( $p=1$ ) o que não surpreende dado o baixo número de doentes com toxicidade de grau 3 ou 4 na nossa série. A frequência total de mutações nesta região do gene *DPYD* no presente grupo de doentes com toxicidade grau 3 ou 4 foi, no entanto, de 25% (um doente portador da mutação IVS14+1G→A e outro da mutação 1845G→T). A detecção da nova mutação foi possível por ter sido utilizada a metodologia de sequenciação automática e não a técnica de RFLP direccionada para a mutação mais prevalente. Assim, parece-nos ser mais adequada a utilização da primeira metodologia para a pesquisa de mutações no exão 14 do gene *DPYD*.

Este estudo verificou ainda que 6 em 8 (75%) doentes com toxicidades de grau 3 ou 4 não apresentavam mutações no exão 14 do gene *DPYD*. Nestes casos, no entanto, não podemos excluir a hipótese dos respectivos doentes apresentarem mutações noutras regiões do gene, incluindo a região promotora, que possam ser responsáveis pela perda de função da DPD. Além disso, existem outros factores que podem ser responsáveis pela toxicidade ao 5-FU, como por exemplo o aumento de expressão dos enzimas da via de anabolismo do 5-FU (Collie-Duguid *et al*, 2000; Van Kuilenburg *et al*, 2000, 2001).

O 5-FU é um dos agentes quimioterápicos mais frequentemente prescrito nos doentes oncológicos, constituindo o tratamento de primeira linha dos doentes com CCR. Pelo facto de cerca de 11% dos doentes submetidos a tratamentos com 5-FU apresentarem toxicidades grau 3 ou 4 e de 25% destes serem portadores de mutação no exão 14 do gene *DPYD*, pensamos que haveria vantagem em considerar a inclusão deste teste genético na avaliação inicial dos casos de CCR com indicação para quimioterapia com 5-FU. Com efeito, a identificação dos indivíduos com um risco acrescido de toxicidade ao 5-FU, antes do início da terapêutica, permitiria ao clínico a adopção de medidas preventivas tais como a administração do referido fármaco em doses menos elevadas, a utilização de antibioterapias profiláticas, ou a opção por protocolos quimioterápicos alternativos. Desta forma seria possível prevenir alguns quadros de toxicidade grave ao 5-FU, contribuindo de forma significativa para uma melhoria da qualidade de vida dos doentes oncológicos.

**ESTUDOS FUTUROS**

Dados os resultados obtidos neste estudo, propomos os seguintes estudos:

- Pesquisar mutações no exão 14 do gene *DPYD* num maior número de indivíduos com CCR, particularmente nos doentes com toxicidades marcadas ao 5-FU.
- Pesquisar mutações noutras regiões do gene *DPYD* nos doentes com toxicidades de grau 3 ou 4 que não apresentaram mutações no exão 14, de forma a explicar os quadros de toxicidade encontrados nestes doentes.
- Quantificar a actividade enzimática da DPD nos doentes com toxicidades de grau 3 ou 4, de forma a estabelecer uma relação entre a actividade da DPD e as mutações detectadas nestes indivíduos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, *et al.* Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998, **338**: 1481-1487.
- Aschele C, Debernardis D, Casazza S, *et al.* Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to Fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999, **17**: 1760-1770.
- Bento M.J. Epidemiologia do cancro colo-rectal. In Manual de Procedimentos do cancro colo-rectal. *Edição do Departamento de Oncologia cirúrgica I*, 1999.
- Camma C, Giunta M, Fiorica E, *et al.* Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA* 2000, **284**: 1008-1015.
- Cascinu S, Aschele C, Barni S, *et al.* Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999, **5**: 1996-1999.
- Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, *et al.* Quimioterapia das doenças neoplásicas. In As bases farmacológicas da terapêutica, *9ª Edição*, ed. Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's, Rio de Janeiro, 1996.
- Chazal M, Etienne MC, Renée N, *et al.* Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. *Clin Cancer Res* 1996, **2**: 507-510.
- Chu E, Mota AC, Fogarasi M. Antimetabolitos. In: Cancer: Principle and practice of oncology, *6ª Edition*, ed. DeVita Jr. VT, Helman S, Rosenberg SA, 2000 Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Collie-Duguid ESR, Jonhston SJ, Powrie RH, *et al.* Cloning and initial characterization of the human *DPYD* gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **271**: 28-35.
- Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. *J Clin Invest* 1988, **81**: 47-51.
- Diasio RB, LU Z. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil chemotherapy (editorial). *J Clin Oncol* 1994, **12**: 2239-2242.
- Etienne MC, Lagrande JL, Dassonville O, *et al.* Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994, **12**: 2248-2253.
- Etienne MC, Chatelut E, Pivot X, *et al.* Co-variables influencing 5-Fluorouracil clearance during continuous venous infusion. A NONMEM analysis. *Eur J Cancer* 1998, **34**: 92-97.
- Fleming RA, Milano G, Thyss A, *et al.* Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res* 1992, **52**: 2899-2902.

- Glimelius B, Pahlman L. Perioperative radiotherapy in rectal cancer. *Acta Oncol* 1999, **38**: 23-32.
- Glimelius B. The role of radiotherapy in rectal cancer. *Eur J Cancer* 2001, **37**: 203-212.
- Harris BE, Carpenter JH, Diasio R. Severe 5-Fluorouracil toxicity secondary to dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. A potentially more common pharmacogenetic syndrome. *Cancer* 1991, **68**: 499-501.
- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Dannenberg P, *et al.* Fluorinated pyrimidine: A new class of tumor inhibitory compounds. *Nature* 1957, **179**: 663-666.
- Heggie GD, Somadsossi JP, Cross DS, *et al.* Clinical pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and its metabolism in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 1987, **47**: 2203-2206.
- Higgins G, Humphrey E, Juler G, *et al.* Adjuvant chemotherapy in the surgical treatment of large bowel cancer. *Cancer* 1976, **38**: 1461-1467.
- Hohenberger P. Colorectal Cancer-what is standard surgery? *Eur J Cancer* 2001, **37**: 173-187.
- Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, *et al.* Genetics pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 1999, **35**: 335-351.
- Internacional Multicentre Pooled Analysis of Colon cancer Trials (IMPACT) investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *Lancet*. 1995, **345**: 939-944.
- Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, *et al.* Structural organization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Cancer Res* 1997, **57**: 1660-1663.
- Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, *et al.* Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-Fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999, **5**: 2006-2011.
- Keyomarsi K, Moran RG. Folinic acid augmentation of the effects of fluoropyrimidines on murine and humans leukemic cells. *Cancer Res* 1986, **46**: 5229-5235.
- Kouwaki M, Hamajima N, Sumi S, *et al.* Identification of a novel mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a japanese patient with 5-Fluorouracil toxicity. *Clin Cancer Res* 1998, **4**: 2999-3004.
- Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, *et al.* Surgical adjuvant therapy of large bowel carcinoma :on evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil: the North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol* 1989, **7**: 1447-1456.

- Leccia JR, Milano G, Formento P, *et al.* A Clinically applicable assay for tumoral thymidylate synthase combining reverse transcriptase-PCR and high-performance liquid chromatography. *Eur J Cancer* 1997, **34**: 182-187.
- Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, *et al.* Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protected- infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 1997, **15**: 3223-3229.
- Lu Z, Zhang R, Diasio R. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-Fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res* 1993, **53**: 5433-5438.
- Lu Z, Zhang R, Carpenter JT, *et al.* Decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity in a population of patients with breast cancer: implication for 5-Fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1998, **4**: 325-329.
- Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet* 1998, **93**: 84-99.
- Machover D, Diaz-Rubio E, De Gramont A, *et al.* Two consecutive phase II studies of oxaliplatin for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann Oncol* 1996, **7**: 95-98.
- Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, *et al.* High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-Fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1998, **4**: 2371-2376.
- Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, *et al.* Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer* 1999, **79**: 627-630.
- Milano G, Mcleod H.L. Can dihydropyrimidine dehydrogenase impact 5-fluorouracil-based treatment? *Eur J Cancer* 2000, **36**: 37-42.
- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, *et al.* Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990, **8**: 352-358.
- O'Connell M, Mailliard JA, Kahn MJ, *et al.* Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 1997, **15**: 246-250.
- Petrelli N, Herrera L, Rustum Y, *et al.* A prospective randomized trial of 5-fluorouracil and high dose leucovorin versus 5-fluorouracil and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 1987, **5**: 1559-1565.
- Piedbois P. The meta-analysis Group in Cancer : Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 1998, **16**: 301-308.

Pitot HC, Wender DB, O'Connell MJ, *et al.* Phase II trial of irinotecan in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 1997, **15**: 2910-2919.

Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, *et al.* Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 1989, **7**: 1407-1418.

Quasar Collaborative Group. Comparison fluorouracil with additional levamisole, higher-dose folinic acid, or both, as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: a randomised trial. *Lancet* 2000, **355**: 1588-1596.

Raida M, Schwabe W, Hausler P, *et al.* Prevalence of a common point mutation in the *dihydropyrimidine dehydrogenase* (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)- related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001, **7**: 2832-2839.

Raymond E, Chaney S, Taama A, *et al.* Preclinical and clinical studies of oxaliplatin. *Ann Oncol* 1998, **9**: 1053-1071.

Rougier P, Van Cutsem E, Bajetta E, *et al.* Phase II trial of irinotecan versus infusional fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer after fluorouracil failure. *Lancet* 1998, **352**: 1407-1412

Rougier P. Palliative and adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2001, **37**: 189-202.

Ridge SA, Sludden J, Wei X, *et al.* Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998, **77**: 497-500.

Sanger F, Air GM, Barrel BG, *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174. *Nature* 1977, **265**: 678-695.

Sanches E. Tratamento Adjuvante do adenocarcinoma do cólon e recto. In Manual de procedimentos do cancro colo-rectal. *Edição do Departamento de Oncologia cirúrgica I*, 1999.

Sousa O. Papel da radioterapia no tratamento do cancro do recto. In Manual de procedimentos do cancro colo-rectal. *Edição do Departamento de Oncologia cirúrgica I*, 1999.

Skibber JM, Minsky BD, Hoff PM. Cancer of the Colon. In: Cancer: Principle and practice of oncology, *6<sup>a</sup> Edition*, ed. DeVita Jr. VT, Helman S, Rosenberg SA, 2000 Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Swedish Rectal Cancer Trial. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 1997, **336**: 980-987.

- Trichopoulos D, Lipworth L, Petridou E, *et al.* Epidemiology of Cancer. In Cancer: Principle and practice of oncology, *Fifth Edition*, ed. DeVita Jr., Samuel Helman, Steven A. Rosenberg. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.
- Tveit KM, Guldvog I, Hagen S, *et al.* Randomized controlled trial of postoperative radiotherapy and short-term time scheduled 5-fluorouracil against surgery alone in the treatment of Dukes B and C rectal cancer. *Br J Surg* 1997, **84**: 1130-1135.
- Van Kuilenburg ABP, Vreken P, Beex LVAM, *et al.* Heterozigosity for a point mutation in a invariant splice donor site of dihydropyrimidine dehydrogenase and severe 5-Fluorouracil related toxicity. *Eur J Cancer* 1997, **13**: 2258-2264.
- Van Kuilenburg ABP, Vreken P, Abeling NGGM, *et al.* Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 1999, **104**: 1-9.
- Van Kuilenburg. ABP, Haasjes J, Richel DJ, *et al.* Clinical Implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-Fluorouracil-associated toxicity: Identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res* 2000, **6**: 4705-4712.
- Van Kuilenburg ABP, Muller EW, Haasjes J, *et al.* Lethal Outcome of patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G >A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 2001, **7**: 1149-1153.
- Vincent M, Labianca R, Harper P. Which 5-Fluorouracil regimen? - the great debate. *Anti-Cancer Drugs* 1999, **10**: 337-354.
- Vreken P, Van Kuilenburg ABP, Meinsma R, *et al.* Identification of a four-base deletion (delTCAT 296-299) in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene with variable clinical expression. *Hum Genet* 1997a, **100**: 263-265.
- Vreken P, Van Kuilenburg ABP, Meinsma R, *et al.* Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency: identification and expression of missense mutations C29R, R886H, R235W. *Hum Genet* 1997b, **101**: 333-338.
- Wei X, Mcleod HL, McMurrough J, *et al.* Molecular Basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-Fluorouracil toxicity. *J Clin Invest* 1996, **98**: 610-615.
- Wei X, Elizondo G, Sapone A, *et al.* Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics* 1998, **51**: 391-400.
- Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, *et al.* Clinical trial to asses the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, levamisole in patient with Dukes' B e C carcinoma of the colon: results from the national surgical adjuvant breast and bowel project C-04. *J Clin Oncol* 1999, **17**: 3553-3559.

Zaniboni A. Adjuvant chemotherapy in colorectal cancer with high-dose leucovorin and fluorouracil: Impact on disease-free survival and overall survival. *J Clin Oncol* 1997, **15**: 2432-2441.

Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, *et al.* A new prognostic factor for colorectal carcinoma, thymidylate synthase, and its therapeutic significance. *Cancer* 1998, **82**: 70-77.

Yokota H, Fernandez- Salguero P, Furuya H, *et al.* cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, an enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J Biol Chem* 1994, **296**: 23192-23196.