

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JEANINE MARIE NARDIN

**FATORES FARMACOGENÉTICOS E AMBIENTAIS RELACIONADOS AO
METABOLISMO DO TAMOXIFENO: UM ESTUDO PROSPECTIVO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

CURITIBA

2019

JEANINE MARIE NARDIN

**FATORES FARMACOGENÉTICOS E AMBIENTAIS RELACIONADOS AO
METABOLISMO DO TAMOXIFENO: UM ESTUDO PROSPECTIVO EM
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Flávio Pecoits Filho

Co-orientador: Prof. Dr. José Cláudio Casali da Rocha.

CURITIBA

2019

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB – 9/1118

N224f
2019

Nardin, Jeanine Marie

Fatores farmacogenéticos e ambientais relacionados ao metabolismo do tamoxifeno : um estudo prospectivo em mulheres com câncer de mama / Jeanine Marie Nardin ; orientador: Roberto Flávio Pecoits Filho ; co-orientador: José Cláudio Casali da Rocha. – 2019.
113 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2019
Bibliografia: f. 79-80

1. Mama – Câncer. 2. Tamoxifeno. 3. Adesão à medicação. 4. Citocromo P-450 CYP2D6. I. Pecoits Filho, Roberto Flávio. II. Rocha, José Cláudio Casali da. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 22. ed. – 616.99449



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos seis dias do mês de agosto de 2018 às 08hs e 00min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese “**FATORES FARMACOGENÉTICOS E AMBIENTAIS RELACIONADOS AO METABOLISMO DO TAMOXIFENO: UM ESTUDO PROSPECTIVO EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**” apresentado por **JEANINE MARIE NARDIN** para obtenção do título de Doutora; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits – Presidente – (PUCPR)	
Prof. Dr. Vinicius Milani Budel – (UFPR)	
Profa. Dra. Audrey Tieko Tsunoda – (Hosp. Erasto Gaetner)	
Profa. Dra. Lucia de Noronha – (PUCPR)	
Profª. Drª. Vanessa Santos Sotomaior - (PUCPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits Conceito Aprovado
Prof. Dr. Vinicius Milani Budel Conceito Aprovado
Profa. Dra. Audrey Tieko Tsunoda Conceito Aprovado
Profa. Dra. Lucia de Noronha Conceito Aprovado
Profª. Drª. Vanessa Santos Sotomaior Conceito APROVADA
Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Roberto Flávio Silva Pecoits
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

NOTA BIOGRÁFICA

A autora possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Paraná - UFPR (2002), habilitação em Bioquímica também pela UFPR (2003), Especialização em Ciências Farmacêuticas pela UFPR (2004), treinamento em Biologia Molecular pela Universidade de Leipzig, Alemanha (2004) e Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela UFPR (2006). É especialista em Farmácia Oncológica pela Sociedade Brasileira de Farmacêuticos em Oncologia (2008). Atualmente é assessora científica e coordenadora de estudos clínicos da Liga Paranaense de Combate ao Câncer, mantenedora do Hospital Erasto Gaertner, professora das disciplinas de Hematologia e Onco-hematologia no Centro Universitário Unibrasil e bolsista pela CAPES. Tem experiência em farmácia hospitalar, com ênfase em farmacologia e manipulação de medicamentos antineoplásicos; biologia celular e molecular do câncer; coordenação de estudos clínicos multicêntricos de fase I, II e III na área de oncologia, e estudos farmacogenéticos. Também atua como coordenadora do Programa de Residência Multiprofissional em Cancerologia do Hospital Erasto Gaertner.

*Dedico este trabalho ao meu paciente e
amoroso marido Andrea e às minhas
pitoquinhas Giulia e Catarina.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido **Andrea Petruzziello**, meus pais **Ovaldir** e **Lelis Nardin**, meu irmão **Leonardo**, minha irmã e cunhado **Joyce** e **Gean**, e meus sobrinhos **Lucca** e **Isabella**, pelo incansável apoio, paciência, estímulo e amor em todos os momentos.

Às minhas filhas **Giulia** e **Catarina** (ainda na barriga), pelos incríveis momentos de eterna alegria.

Agradeço aos meus orientadores **Dr. José Cláudio Casali da Rocha** pela dedicação, entusiasmo, bons conselhos, ensinamentos e, especialmente, pela amizade, e **Prof. Roberto Flávio Pecoits Filho** pelo acompanhamento, exemplo acadêmico de inteligência e perseverança.

À minha orientadora na Alemanha **Dra Hiltrud Brauch** e aos seus colaboradores **Werner Schroth** e **Thomas Mürdter**, pela gentileza em me receber em seus laboratórios, seu conhecimento, bem como por realizar parte das análises, sem as quais a realização deste estudo seria impossível.

A minha estimada amiga **Dra Thais Abreu de Almeida**, pela influência e participação em minha formação acadêmica e por ter possibilitado a avaliação clínica das pacientes.

Às amigas **Lisangela** e **Adriana** e colegas da pós-graduação **Cláudia** e **Nilton**, pelas contribuições e amizade.

Às residentes do programa de Residência em Farmácia Oncológica do Hospital Erasto Gaertner, **Solane**, **Evelyn** e **Crislayne**, e às minhas alunas **Jenifer**, **Diandra**, **Silvia**, **Fernanda**, **Rafalea**, **Andreia** e **Beatriz**, pela inestimável ajuda em meus experimentos e nas entrevistas com as pacientes.

Às minhas colegas e amigas do Centro de Projeto de Ensino e Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, **Priscila**, **Tais** e **Mariana**, e às farmacêuticas **Anabel** e **Marcela**, pela amizade e auxílio, fortalecendo meu aprendizado crítico.

À minha ex-coordenadora **Sueli** que, de certo modo, possibilitou este trabalho devido à sua experiência e dedicação à saúde humana, auxiliando e orientando meu crescimento pessoal e profissional nestes últimos anos.

A todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

E, finalmente, à **todas as pacientes** que, ao aceitarem participar deste trabalho, permitiram não só aperfeiçoar minha formação mas, principalmente, consolidar novos processos e projetos que visam melhorar o tratamento dos pacientes com câncer tratados em nossa instituição.

“Combater o câncer com humanismo, ciência e afeto.”

Missão do Hospital Erasto Gaertner

PREFÁCIO

O presente trabalho trata-se de uma subanálise do projeto principal “*Determinação do genótipo das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 para metabolização de tamoxifeno e correlação fenotípica*” realizado no hospital oncológico de Curitiba, Hospital Erasto Gaertner, mantido pela Liga Paranaense de Combate ao Câncer. O projeto principal tem o intuito de avaliar a frequência dos genótipos das citadas enzimas, pertencentes ao complexo enzimático do citocromo P450, em uma população de mulheres com câncer de mama do referido hospital oncológico, bem como determinar se tais genótipos poderiam atuar como fatores prognósticos para o câncer de mama e fatores preditivos de resposta em mulheres com câncer de mama positivas para receptores hormonais.

Enquanto o projeto principal avaliou o genótipo das 363 mulheres com câncer de mama, casos novos em qualquer estágio ou tipo histológico ou molecular, esta tese dedicou-se exclusivamente à análise de pacientes com câncer de mama com histologia positiva para receptores hormonais e que realizaram tratamento antineoplásico hormonal com o medicamento tamoxifeno.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é o câncer mais frequente entre as mulheres e, apesar dos esforços para identificar subgrupos de pacientes com objetivo de direcionar o tratamento, diferentes padrões de resposta são observados. No Brasil, o câncer de mama permanece entre as principais causas de óbitos por câncer em mulheres e a variabilidade biológica e ambiental frente ao tratamento proposto levanta questões sobre quais fatores podem ser relevantes. As razões para respostas diferenciadas são multifatoriais, como interações medicamentosas, resistência tumoral, adesão ao tratamento, ou fatores genéticos. A terapia endócrina com tamoxifeno para tratamento do câncer de mama positivo para receptores hormonais reduz as taxas de recorrência e mortalidade. Contudo, a baixa adesão ao tratamento e polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizam o tamoxifeno podem estar relacionadas a piores desfechos clínicos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar qual destes fatores apresenta maior impacto nas concentrações plasmáticas de metabólitos ativos do tamoxifeno, os polimorfismos farmacogenéticos das enzimas metabolizadoras do tamoxifeno, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 ou CYP3A5, ou o comportamento de adesão do paciente. **Métodos:** Foi realizado um estudo de campo, prospectivo, descritivo e quantitativo, realizado entre abril de 2014 a junho de 2017. Inicialmente, 362 mulheres consecutivas, recém diagnosticadas com câncer de mama, foram pré-selecionadas e genotipadas para os principais polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *CYP3A5* por ensaios MALDI-TOF / MS e TaqMan. Em seguida, as 225 pacientes que iniciaram tratamento com 20mg/diários de tamoxifeno, conforme rotina institucional, tiveram a determinação dos níveis plasmáticos de tamoxifeno e seus metabólitos realizada por espectrometria de massa em tandem com cromatografia líquida. As dosagens foram realizadas em três momentos distintos, aos três, seis e 12 meses após início do tratamento. A adesão à terapia com tamoxifeno foi determinada pela Escala de Adesão à Medicação de Morisky de quatro itens. **Resultados:** Para todos os momentos testados, as análises de regressão linear múltipla mostraram que os principais fatores para prever as concentrações dos metabólitos do tamoxifeno, principalmente para o (Z)-endoxifeno, são os polimorfismos de *CYP2D6* e adesão ao tratamento (testes F $P < 0,001$ para três, seis e 12 meses, com r^2 variando de 0,32 a 0,40, para (Z)-endoxifeno). Os pacientes classificados como metabolizadores extensivos para *CYP2D6* e com baixa adesão ao tratamento apresentaram maior risco em não atingir a concentração de (Z)-endoxifeno necessária para inibição de 90% dos receptor de estrogênio (RR 3,19; 95IC 1,44-7,05) do que os metabolizadores intermediários com alta adesão (RR 0,43; 95IC 0,17-1,05). **Conclusões:** Tanto a adesão ao tratamento quanto os polimorfismos de *CYP2D6* tem associação com os níveis plasmáticos do metabólito mais ativo do tamoxifeno, o (Z)-endoxifeno, bem como de outros metabólitos ativos. Após um ano de tratamento, a baixa adesão ao tratamento com tamoxifeno mostrou ter o mesmo impacto de um alelo de atividade nula do gene *CYP2D6*, ou mesmo maior interferência nos níveis dos seus metabólitos ativos.

Palavras-chave: câncer de mama, tamoxifeno, (Z)-endoxifeno, CYP2D6, adesão.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the most common cancer among women, and despite efforts to identify subgroups of patients to target treatment, different patterns of response are observed. In Brazil, breast cancer remains among the leading causes of cancer deaths in women, and biological and environmental variability in relation to the proposed treatment raise questions about which factors may be relevant. The reasons for variable responses are multifactorial, such as drug interactions, tumor resistance, adherence to treatment, or genetic factors. Endocrine therapy with tamoxifen for treatment of hormonal-receptor positive breast cancer reduces rates of recurrence and mortality. However, poor adherence to treatment and genetic polymorphisms of enzymes that metabolize tamoxifen may be related to worse clinical outcomes. The aim of this study was to evaluate which of these factors has the greatest impact on the plasma concentrations of active metabolites of tamoxifen, the pharmacogenetic polymorphisms of tamoxifen metabolizing enzymes, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 or CYP3A5, or patient compliance behavior. **Methods:** A prospective, descriptive and quantitative study was carried out between April 2014 and June 2017. Initially, 362 consecutive women newly diagnosed with breast cancer were pre-selected and genotyped for the major polymorphisms of the *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* and *CYP3A5* genes by MALDI-TOF / MS and TaqMan assays. The 225 women who have started adjuvant 20mg/day of tamoxifen had their plasma levels of tamoxifen and its metabolites determined by tandem mass spectrometry with liquid chromatography. The dosages were performed at three different time-points, at 3, 6 and 12 months of treatment. Adherence to tamoxifen therapy was determined by the Morisky's four-item medication adherence scale. **Results:** For all tested time-points, multiple linear regressions showed that the main factors that predict the concentrations of tamoxifen metabolites, mainly for (Z)-endoxifen, are *CYP2D6* polymorphisms and treatment adherence (F tests $P < 0.001$ for 3, 6 and 12 months, with r^2 varying from 0.32 to 0.40, for (Z)-endoxifen). Patients classified as extensive metabolizers for *CYP2D6* and with low adherence to treatment had a higher risk of not achieving the concentration of (Z)-endoxifen required for 90% inhibition of estrogen receptor (RR 3.19; 95CI 1.44-7, 05) than the intermediates metabolizers with high adhesion (RR 0.43, 95 CI 0.17-1.05). **Conclusions:** Adherence to treatment or *CYP2D6* polymorphisms are associated with plasma levels of the most active tamoxifen metabolite, (Z)-endoxifen, as well as other active metabolites. After one year of treatment, low adhesion to tamoxifen treatment has shown to have the same impact of one *CYP2D6* allele of null activity, or even higher interference in its metabolites levels.

Keywords: breast cancer, tamoxifen, (Z)-endoxifen, CYP2D6, adherence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(Z)-4-OH-Tam	(Z)-4-hidroxitamoxifeno
(Z)-endoxifeno	(Z)-4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno
ABCSG	Grupo Austríaco de Estudos do Câncer da Mama e Colorretal
AKT	Proteína serina-treonina quinase
ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica
CI	<i>Confidence interval</i> (intervalo de confiança)
CK14	Citoqueratina 14
CK17	Citoqueratina 17
CK5/6	Citoqueratinas de padrão basal
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CYP	<i>CYtochrome P450</i> (enzimas do citocromo P450)
CYP2C19	Isoenzima do citocromo P450 família 2 subfamília C membro 19
CYP2C9	Isoenzima do citocromo P450 família 2 subfamília C membro 9
CYP2D6	Isoenzima do citocromo P450 família 2 subfamília D membro 6
CYP3A4	Isoenzima do citocromo P450 família 3 subfamília A membro 4
CYP3A5	Isoenzima do citocromo P450 família 3 subfamília A membro 5
Da	Dalton
DDM-Tam	N,N-didesmetiltamoxifeno
ddNTP	Di-desoxirribonucleotídeo fosforilado
DME	<i>Drug metabolizer enzyme</i> (enzima metabolizadora de fármacos)
DM-Tam	N-desmetiltamoxifeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosforilado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epitelial
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EM	<i>Extensive metabolizer</i> (metabolizador extensivo)
ERE	Elementos de resposta ao estrogênio
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
HEG	Hospital Erasto Gaertner
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

hME	<i>Mass EXTEND</i> ® homogêneo
HR	<i>Hazard ratio</i> (razão de risco)
IC90	Concentração de droga necessária para 90% de inibição do alvo
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
IHQ	Imuno-histoquímica
IKP	Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituto de Farmacologia Clínica
IM	<i>Intermediate metabolizer</i> (metabolizador intermediário)
ISRS	Inibidores seletivos de receptação de serotonina
Ki67	Antígeno nuclear 67 expresso durante o ciclo celular
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
MALDI-TOF/MS	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser auxiliada por matriz por tempo de voo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MMAS-4	Escala de adesão à medicação de Morisky de 4-itens
MSRE	Moduladores seletivos do receptor de estrogênio
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
PAM50	<i>Prediction Analysis Microarray 50</i> (microarranjo de análise)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEX	Reação de extensão do iniciador
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PM	<i>Poor metabolizer</i> (metabolizador fraco)
RE	Receptor de estrogênio
RM	Razão metabólica
RP	Receptor de progesterona
RR	Risco relativo
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (fosfatase alcalina)
Tam	Tamoxifeno
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento β
UM	<i>Ultra-rapid metabolizer</i> (metabolizador ultrarrápido)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CÂNCER DE MAMA.....	14
1.2 TAMOXIFENO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	17
1.2.1 <i>Fatores Genéticos Relacionados ao Hospedeiro</i>	21
1.2.2 <i>Fatores Não-genéticos Ambientais Relacionados ao Hospedeiro</i>	33
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	39
4 MÉTODOS	40
4.1 DESENHO GERAL DO ESTUDO	40
4.2 CASUÍSTICA.....	40
4.3 ENSAIOS ANALÍTICOS	43
4.3.1 <i>Genotipagem das pacientes</i>	43
4.3.2 <i>Dosagem plasmática do tamoxifeno e seus metabólitos</i>	51
4.4 SEGUIMENTO CLÍNICO E FARMACOTERAPÊUTICO	52
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5 RESULTADOS	56
5.1 ARTIGO	57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	91
APÊNDICE II – QUESTIONÁRIO 1	93
APÊNDICE III – QUESTIONÁRIO 2	95
APÊNDICE IV – QUESTIONÁRIO 3	100
APÊNDICE V – QUESTIONÁRIO 4	103
APÊNDICE VI – QUESTIONÁRIO 5	105
ANEXO I – APROVAÇÕES CEP/CONEP	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo. A cada ano, 25% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil, as estimativas para o ano de 2018 apontam para mais de 59 mil novos casos de câncer de mama, sendo o câncer mais incidente entre as mulheres (INCA, 2017).

Apesar de ser considerada uma neoplasia relativamente de bom prognóstico quando diagnosticada e tratada precocemente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil (13 óbitos em cada 100 mil mulheres), muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população de países desenvolvidos a sobrevida média após cinco anos vem apresentando um discreto aumento em relação a anos anteriores, sendo atualmente de aproximadamente 85%. Entretanto, em países em desenvolvimento, a sobrevida ainda é baixa, em torno de 60% (INCA, 2017).

Entre 70-80% dos cânceres de mama diagnosticados ocorrem em mulheres na pós-menopausa, das quais mais de dois terços são diagnosticados com status positivo para os receptores hormonais (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, 2005). As chances de cura do câncer de mama aumentam com melhores procedimentos de triagem e detecção precoce. Mas outros fatores que afetam diretamente as taxas de sobrevida incluem o tamanho do tumor e a presença de metástases aos diagnóstico. O mais robusto preditor de resposta à terapia antineoplásica para o câncer de mama é a expressão de receptor de estrogênio (RE) no tumor mamário. Outras medidas de resposta ao tratamento com utilidade preditiva incluem a expressão do receptor de progesterona (PR) e do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (SLAMON; GODOLPHIN; JONES; HOLT *et al.*, 1989). ER, PR e HER2 são considerados os três mais importantes marcadores de classificação tumoral que fornecem estratégias terapêuticas direcionadas contra o câncer de mama.

A prática atual para o tratamento do câncer de mama considera a classificação imuno-histoquímica do tumor de mama e, mais importante, o status dos receptores hormonais. Atualmente, as mulheres classificadas com status positivo para o RE ou

RP, têm uma chance maior de sobrevida devido à sua elegibilidade para o tratamento endócrino ou terapia hormonal. As mulheres que superexpressam HER2 podem ser tratadas com anticorpos ou inibidores de quinases direcionados contra o receptor HER2. Por fim, pacientes negativos para todos os três receptores têm pior prognóstico em comparação com os outros subtipos. Eles geralmente são tratados com vários esquemas de quimioterapia, mas atualmente não têm opções para terapias direcionadas padrão.

Recentemente, a classificação do câncer de mama se expandiu para incluir cinco subtipos distintos baseados na expressão de mRNA de genes alvo selecionados em tumores de mama (VALLEJOS; GOMEZ; CRUZ; PINTO *et al.*, 2010). Os subtipos são denominados como luminal A, luminal B, HER2 enriquecido (ou superexpressor), basaloide e *normal like* (SORLIE; TIBSHIRANI; PARKER; HASTIE *et al.*, 2003).

Os luminais A tem origem em células epiteliais diferenciadas dos lúmens ducto-lobulares, tipicamente com presença de RE e RP, e ausência de HER-2. Corresponde a cerca de 30% a 40% dos casos. A avaliação de Ki 67 evidencia baixa taxa de proliferação (<14%). Os luminais B também se originam em células epiteliais luminais ricas em RE. O RP pode estar presente tanto em alta como em baixa proporção de células. O HER2 pode ser detectado e os níveis de Ki 67 são mais elevados (>14%). O subtipo luminal B corresponde a cerca de 20% a 30% dos carcinomas de mama. Os tumores com hiperexpressão de HER2 são negativos para os receptores hormonais, correspondem 15% a 20% dos casos e o oncogene *HER-2* está hiperexpresso por amplificação gênica. Tumores basaloide são lesões pouco diferenciadas ou indiferenciadas com alta taxa de proliferação, e também representam de 15% a 20% dos tumores. São usualmente tumores triplo-negativos por reação imuno-histoquímica, com negatividade de RE, RP e HER2; entretanto, os termos basaloide e triplo-negativo não são sinônimos: o primeiro é definido por expressão gênica em microarranjo de DNA, e o segundo, por critério imuno-histoquímico. O painel de marcadores proposto para a classificação do tipo basal seria a ausência de expressão de RE, RP e HER2, expressão de citoqueratinas de alto peso molecular/basais, CK5/6, 14 ou 17, e expressão de EGFR (HER1). Quanto ao subtipo *normal-like*, estes representam cerca de 5% a 10% de todos os carcinomas da mama. Eles são pouco caracterizados e foram agrupados na classificação de subtipos intrínsecos com fibroadenomas e amostras de mama normais. Eles expressam

características de genes do tecido adiposo apresentando um prognóstico intermediário entre os cânceres luminal e basal e, geralmente, não respondem à quimioterapia neoadjuvante. Como não possuem a expressão de ER, PR e HER2, esses tumores também podem ser classificados como triplo-negativos, mas não são considerados como basaloides, já que são negativos para CK5 e EGFR. A existência do subtipo normal-like é controversa. O termo foi utilizado porque os genes nele expressos são normalmente compartilhados com o tecido epitelial normal; todavia, não está claro se existe mesmo este subtipo, ou se simplesmente a sua determinação deveu-se à contaminação com amostras de tecido normal (PEROU; SORLIE; EISEN; VAN DE RIJN *et al.*, 2000; YERSAL; BARUTCA, 2014)

Esta classificação de subtipos foi desenvolvida em ensaio baseado em expressão gênica, chamado de *Prediction Analysis Microarray 50* (PAM50) e atualmente é realizada por plataformas de microarranjos como o *MamaPrint* e *Oncotype*, este último sendo recomendado pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica e pelo NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) para escolha da terapia adjuvante (YERSAL; BARUTCA, 2014).

Nos últimos 20 anos, avanços na compreensão das múltiplas etapas da carcinogênese e de alterações genéticas influenciaram tanto o diagnóstico, como o tratamento e a prevenção do câncer de mama. O conhecimento dos fatores de risco relacionados à doença é um dos primeiros passos para o entendimento desta patologia. Dentre os fatores associados ao aumento do risco de câncer de mama estão a idade, história familiar, exposição a hormônios reprodutivos femininos (tanto endógeno como exógeno), fatores dietéticos, doença benigna da mama e fatores ambientais e genéticos (BRAUCH; SCHWAB, 2013).

A exposição prolongada a níveis elevados de estrogênio é um dos principais fatores de risco conhecidos para o câncer de mama, devido à atividade mitótica deste hormônio nas células mamárias e à produção de metabólitos carcinogênicos (ALTHUIS; FERGENBAUM; GARCIA-CLOSAS; BRINTON *et al.*, 2004; KOBIELA; STEFANIAK; KRAJEWSKI; KALINSKA-BLACH *et al.*, 2007; LORD; BERNSTEIN; JOHNSON; MALONE *et al.*, 2008; YAGER, 2000; YANG; CHANG-CLAUDE; GOODE; COUCH *et al.*, 2011). Deste modo, estratégias antineoplásicas que visam bloquear ação hormonal sobre a célula mamária se tornaram as principais alternativas terapêuticas para tais pacientes e, o princípio de bloquear os receptores de estrogênio

para parar o crescimento de células neoplásicas, representa o primeiro tratamento direcionado em oncologia.

1.2 TAMOXIFENO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Dentre os fatores de bom prognóstico no câncer de mama está a expressão de receptores de estrogênio e de progesterona no tecido tumoral. Cerca de dois terços dos cânceres de mama são RE e RP positivos, sendo importantes fatores preditivos de resposta à hormonioterapia. O tratamento hormonal para este grupo de pacientes baseia-se no uso de moduladores seletivos do receptor de estrogênio (MSRE), de inibidores da enzima aromatase e dos análogos do hormônio liberador do hormônio luteinizante (ALLRED; BRYANT; LAND; PAIK, 2002).

O tamoxifeno é o mais antigo fármaco utilizado na hormonioterapia adjuvante e paliativa para o câncer de mama, pertence a classe dos MSRE e seu mecanismo de ação se deve à inibição competitiva do receptor de estrogênio. É o agente mais estudado como terapia endócrina adjuvante no câncer de mama tanto para mulheres em pré como pós menopausa. Usado clinicamente por mais de quatro décadas em mais de 120 países, o tamoxifeno é atualmente aprovado para todos os estágios do câncer de mama (LEXICOMP, 2018).

O mecanismo de ação do tamoxifeno é complexo. Seu principal mecanismo de ação é decorrente de sua ligação ao receptor de estrogênio e pelo bloqueio das ações proliferativas do estrogênio no epitélio mamário. No ser humano são encontrados dois tipos de receptores de estrogênio, o RE α e o RE β , que apresentam diferentes distribuições teciduais e que podem sofrer homo e heterodimerização. A ligação do tamoxifeno pode ocorrer em ambos receptores, desencadeando mudanças na conformação do RE, que leva a sua dissociação das proteínas de choque térmico e inibição da dimerização. O processo de dimerização é essencial para que os elementos de resposta ao estrogênio (ERE), vizinhos aos genes regulados pelo estrogênio, sejam ativados. Pelo menos 50 fatores de ativação da transcrição traduzem e modulam os efeitos do estrogênio sobre os genes alvo. Quando ligado ao RE, o tamoxifeno induz uma alteração na forma tridimensional do receptor, inibindo sua ligação ao ERE no DNA. As diferenças na distribuição tecidual dos dois subtipos de RE, proteínas correguladoras e os diversos fatores de ativação da transcrição podem, em parte, explicar a variabilidade da resposta ao tamoxifeno no câncer de

mama e suas atividades agonistas e antagonistas em tecidos não neoplásicos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Outro mecanismo sugerido para sua ação antiproliferativa é a indução da síntese do fator de crescimento β (TGF- β), citocina que atua como uma molécula reguladora autócrina negativa nas células tumorais mamárias. O tamoxifeno também pode reduzir os níveis circulantes do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) em pacientes com câncer de mama, um potente mitógeno para células tumorais (PERRY; KANG; GREAVES, 1995).

No tratamento de câncer de mama primário, o uso adjuvante de tamoxifeno diminuiu significativamente as taxas de recorrência e mortalidade para pacientes em pré e pós menopausa (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, 2005). Em pacientes em pós menopausa com doença endócrina (receptores hormonais positivos), o tamoxifeno é uma opção válida, assim como os inibidores de aromatase, e é considerado o padrão de tratamento para a prevenção de câncer de mama invasivo para mulheres em pré-menopausa de alto risco, incluindo aquelas com carcinoma ductal *in situ* (FISHER; COSTANTINO; WICKERHAM; CECCHINI *et al.*, 2005).

Dados do grupo *The Early Breast Cancer Trialists' Group* (2005, p.1687-1717), que teve um seguimento de 15 anos e incluiu mais de 80.000 mulheres, demonstraram que o tamoxifeno administrado por cinco anos resulta em redução de 41% na taxa anual de recorrência por câncer de mama (HR 0,59) e 34% de redução no risco de morte anual (HR 0,66) para mulheres RE positivo (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, 2005). O ganho associado ao uso de tamoxifeno é atingido independente da idade da paciente, do *status* menopausal, ou do tratamento com ou sem quimioterapia adjuvante, e contribui com o aumento da sobrevida observado nos 15 anos de seguimento. A duração ótima da terapia hormonal com o tamoxifeno tem sido de no mínimo cinco anos (BRYANT; FISHER; DIGNAM, 2001) e, dados mais recentes, já indicam o uso do medicamento por pelo menos 10 anos (DAVIES; PAN; GODWIN; GRAY *et al.*, 2013).

Apesar do evidente benefício clínico da terapia com tamoxifeno, nas últimas 3 décadas mais de 40% das pacientes que receberam o tamoxifeno como terapia adjuvante progrediram ou morreram pela resistência tumoral ao tratamento ou por

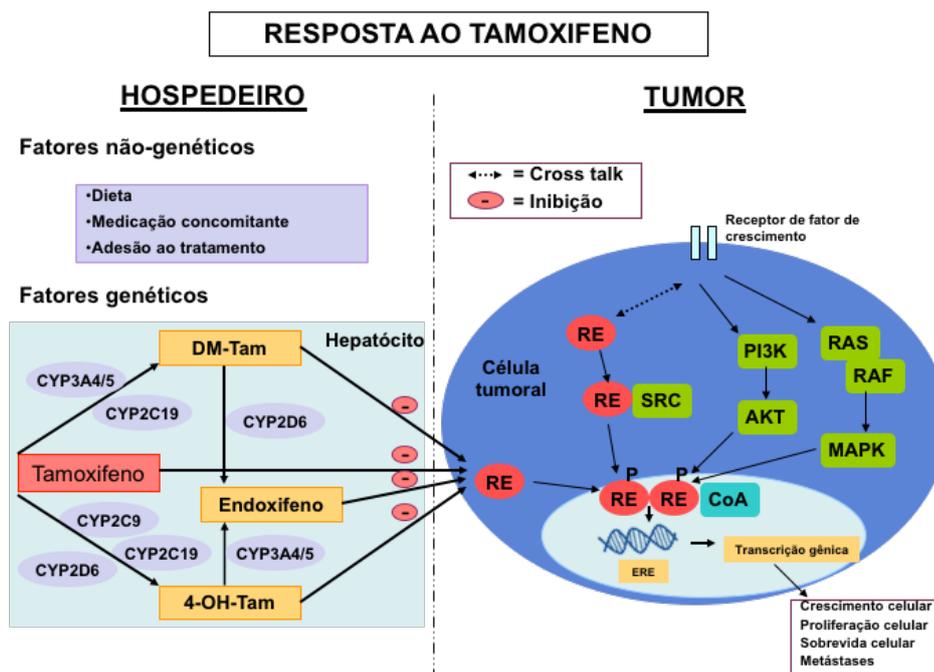
fatores associados ao genoma do hospedeiro (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009).

A resposta clínica ao tamoxifeno varia entre as pacientes e aproximadamente de 30% a 50% daquelas com câncer de mama RE positivo, independente do estágio da doença, não responderão ao tratamento com tamoxifeno (SCHROTH; ANTONIADOU; FRITZ; SCHWAB *et al.*, 2007). As razões para respostas diferenciadas são multifatoriais, como interações medicamentosas, resistência tumoral, adesão ao tratamento, ou fatores genéticos (HOSKINS; CAREY; MCLEOD, 2009).

Inúmeros mecanismos de resistência ao tamoxifeno são conhecidos, tais como: sinalização por fatores de crescimento; resistência adquirida decorrente do uso contínuo do tamoxifeno; perda do RE devido envolvimento com o microambiente tumoral; e resistência metabólica decorrente de alterações enzimáticas que afetam a formação do seu metabólito ativo (HOPPE; ACHINGER-KAWECKA; WINTER; FRITZ *et al.*, 2013).

Vários fatores têm sido atribuídos a estes mecanismos de resistência. A Figura 1 exibe um esquema simplificado que classifica esses fatores em dois grupos principais: fatores do hospedeiro (genéticos e não-genéticos) e do tumor.

FIGURA 1: Fatores do Hospedeiro e do Tumor relacionados a resposta individual ao Tamoxifeno.



NOTA: Sensibilidade e resistência ao tratamento com tamoxifeno podem ser determinados por fatores do hospedeiro, incluindo variantes genéticas das enzimas metabolizadoras do tamoxifeno na célula hepática, e fatores não-genéticos, relacionados ao estilo de vida do indivíduo, como uso de medicação concomitante e adesão ao tratamento. Também podem ser determinados por fatores associados ao tumor, como a amplificação do gene *HER2* ou outros receptores tirosina quinase, que na célula tumoral pode resultar em aumento de proliferação e indução a metástases. DM-Tam: N-desmetiltamoxifeno; 4-OH-Tam: 4-hidroxitamoxifeno; CYP: Citocromo P450; SRC: coativador do receptor de esteroide; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos; ERE: elemento de resposta ao estrogênio. **FONTE:** Adaptado de (BARDIA; STEARNS, 2010).

Dos fatores conhecidos do hospedeiro que podem conferir menor sensibilidade ao tamoxifeno, as variações nos genes que codificam enzimas que metabolizam medicamentos, como as enzimas do citocromo P (CYP) 450, responsáveis pela conversão do tamoxifeno em seus metabólitos ativos, são atualmente amplamente discutidas. O estilo de vida ou fatores não genéticos ambientais relacionados ao hospedeiro incluem dieta, uso de medicação concomitante e a adesão à terapia.

Já os fatores associados ao tumor resultam de características das células tumorais que influenciam a resposta ao tamoxifeno. Alguns exemplos incluem a expressão desregulada de receptores de fatores de crescimento que resultam na amplificação da sinalização das vias MAPK / ERK ou PI3K / AKT (GIULIANO; SCHIFF; OSBORNE; TRIVEDI, 2011), e a disponibilidade de moléculas co-reguladores na célula tumoral, que influenciam as ações tecido-específicas do complexo tamoxifeno-RE (JORDAN; O'MALLEY, 2007). Coletivamente, a interação de todos esses fatores (hospedeiro e tumor) afeta a resposta do indivíduo à terapia com tamoxifeno.

Os fatores demonstrados na Figura 1, não só afetam a resistência ao tamoxifeno, como também a sensibilidade ao mesmo, podendo algumas pacientes apresentarem eventos adversos mais intensos decorrentes de fatores relacionados ao hospedeiro (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009). O tamoxifeno é geralmente bem tolerado e sintomas semelhantes aos da menopausa, tais como ondas de calor (fogachos), irregularidades menstruais, e ainda náuseas e vômitos, são os efeitos colaterais mais comuns.

Apesar da ação antiestrogênica do tamoxifeno na mama, é a sua propriedade estrogênica que é responsável pelos efeitos colaterais adversos em outros órgãos e tecidos. Tecidos que sofrem os efeitos agonistas do tamoxifeno incluem o endométrio uterino (hipertrofia endometrial e sangramento vaginal), o sistema de coagulação, metabolismo ósseo (aumento da densidade mineral óssea) e o fígado (alterações no perfil lipídico). Mesmo sendo considerados efeitos raros, mulheres recebendo tamoxifeno apresentam maiores riscos de desenvolver câncer de endométrio, toxicidade na retina, e predisposição ao desenvolvimento de fenômenos tromboembólicos (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, 2005). E, para pacientes predispostas geneticamente a intensificarem a metabolização do fármaco ou ainda possuírem hábitos de vida que interferiam na sua metabolização, tais efeitos poderão estar exacerbados.

1.2.1 Fatores Genéticos Relacionados ao Hospedeiro

O tamoxifeno é um pró-fármaco que em si apresenta uma baixa afinidade aos receptores de estrogênio e são seus metabólitos que exercem a atividade antiestrogênica desejada na terapia hormonal do câncer de mama. Ao ser absorvido, o tamoxifeno passa por uma extensa metabolização hepática tanto de fase I quanto de fase II. A biotransformação do tamoxifeno em seus metabólitos ativos envolvem reações de N-oxidação, N-desmetilação e hidroxilação. A via de metabolização do tamoxifeno é catalisada por várias enzimas da família do citocromo P450 (CYP – *CYtochrome P450*), monooxigenases contendo o grupo heme no seu sítio funcional (DESTA; WARD; SOUKHOVA; FLOCKHART, 2004).

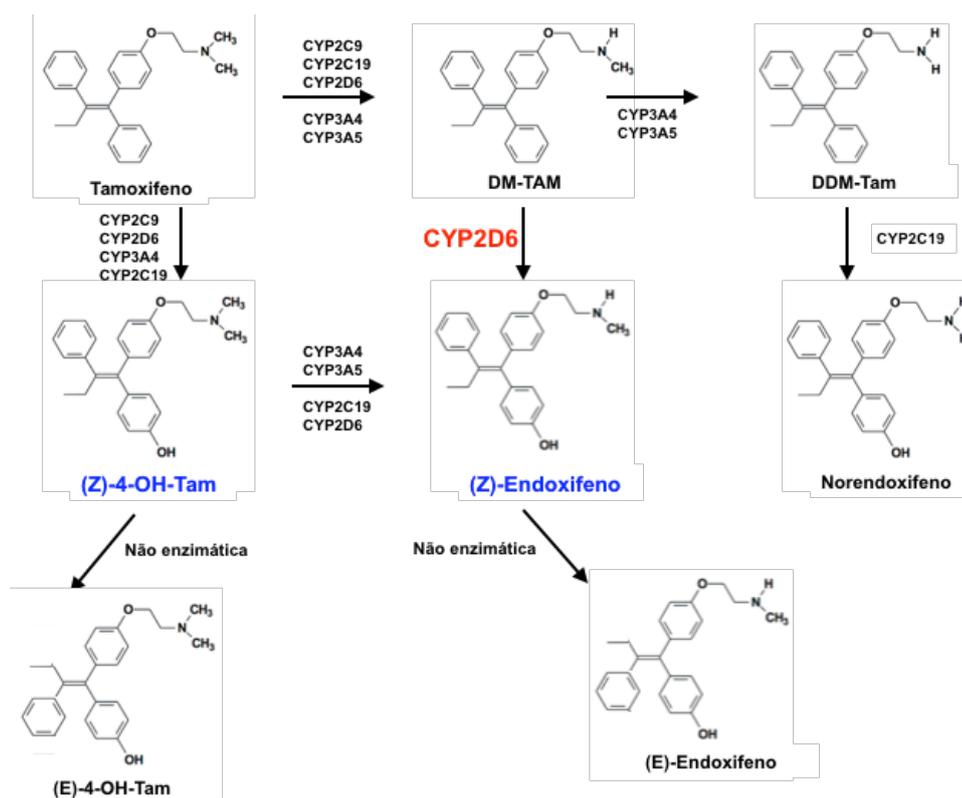
O N-desmetiltamoxifeno (DM-Tam), o metabólito mais abundante, é primariamente produzido pela biotransformação do tamoxifeno pelas enzimas CYP3A4 e CYP3A5 e, com menor contribuição, também pelas enzimas CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19. A concentração de DM-Tam no estado estacionário, após a

ingestão de 20mg diários de tamoxifeno (dose usual no tratamento do câncer de mama) por aproximadamente 3 meses, é cerca de 2 vezes maior do que a do fármaco original.

Tal fato apresenta relevância por ser uma reação de hidroxilação neste composto em alta concentração (DM-Tam) que dará origem ao (Z)-4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno, mais conhecido como *trans* ou (Z)-endoxifeno, metabólito ativo mais abundante e com maior potencial antiestrogênico quando comparado ao tamoxifeno. A biotransformação do DM-Tam a (Z)-endoxifeno é catalisada exclusivamente pela enzima CYP2D6 (Figura 2). (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009; DESTA; WARD; SOUKHOVA; FLOCKHART, 2004; STEARNS; JOHNSON; RAE; MOROCHO *et al.*, 2003).

Outro metabólito que também apresenta relevância clínica devido sua ação antiestrogênica é o (Z)-4-hidroxitamoxifeno ((Z)-4-OH-Tam). Este é formado por uma reação de 4-hidroxilação na posição *para* do radical fenil do tamoxifeno. Esta biotransformação é catalisada por inúmeras CYPs, incluindo CYP2D6, CYP3A4, CYP2C9 e CYP2C19 (Figura 2). Comparado com os níveis plasmáticos em estado estacionários do (Z)-endoxifeno, os níveis de (Z)-4-OH-Tam são menores. Com exceção destes dois últimos, nenhum outro metabólito com atividade relevante é conhecido. (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009; CREWE; ELLIS; LENNARD; TUCKER, 1997; CREWE; NOTLEY; WUNSCH; LENNARD *et al.*, 2002). Embora alguns estudos cite o norendoxifeno com potencial atividade antiestrogênica, este apresenta concentrações muito baixas após uso diário de 20mg de tamoxifeno, não apresentando atividade significativa na célula tumoral (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009; MURDTER; SCHROTH; BACCHUS-GERYBADZE; WINTER *et al.*, 2011).

FIGURA 2: Visão Parcial da via metabólica de biotransformação do Tamoxifeno.



NOTA: Inúmeras enzimas CYP450 (preto) estão envolvidas na metabolização do tamoxifeno, entretanto a CYP2D6 (vermelho) exerce o principal papel nos passos metabólicos iniciais e é a principal enzima envolvida na biotransformação do DM-Tam ao metabolito ativo (Z)-endoxifeno. Embora o DM-Tam também seja convertido em DDM-Tam e Norendoxifeno. A formação de norendoxifeno também é obtida através da desmetilação do endoxifeno. Outra via de obtenção, em menor intensidade, de (Z)-endoxifeno é através da biotransformação do (Z)-4-OH-Tam, este último também com atividade antiestrogênica. DM-Tam: N-desmetiltamoxifeno, (Z)-4-OH-Tam: (Z)-4-hidroxitamoxifeno; DDM-Tam, N,N-didesmetiltamoxifeno. **FONTE:** Adaptado de (MURDTER; SCHROTH; BACCHUS-GERYBADZE; WINTER *et al.*, 2011).

Os metabólitos 4-hidroxilados do tamoxifeno na conformação *trans* (Z) podem passar por isomerização química e passarem para suas isoformas *cis* (E), que apresentam uma fraca ação antagonista sobre o RE (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009; KATZENELLENBOGEN; CARLSON; KATZENELLENBOGEN, 1985). É interessante ressaltar que foi observado em células tumorais um acúmulo de metabólitos 4-hidroxilados na isoforma *cis* em pacientes resistentes à terapia com tamoxifeno (OSBORNE; WIEBE; MCGUIRE; CIOCCA *et al.*, 1992).

Contudo, devido dificuldade técnica de análises isoladas dos isômeros *cis* e *trans* nos estudos farmacocinéticos do tamoxifeno, com dados esparsos sobre as concentrações plasmáticas destas isoformas distintas, a correlação da isoforma *cis* com resistência tumoral ao tamoxifeno deve ser observada com parcimônia

(BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009).

A família do citocromo P450 desempenha importante função no metabolismo do estrogênio, de medicamentos e de carcinógenos ambientais. O genoma humano contém genes de 57 CYPs (e aproximadamente o mesmo número de pseudogenes), agrupados em 18 famílias e 44 subfamílias de acordo com a similaridade das sequências de bases. Os genes das CYPs são altamente polimórficos, compostos por diferentes alelos que se traduzem em fenótipos com capacidades enzimáticas distintas (MCDONNELL; DANG, 2013).

Particularmente, estes fenótipos distintos também podem alterar a forma com a qual cada organismo metaboliza os diferentes fármacos utilizados no tratamento do câncer (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009). As questões referentes ao polimorfismo das enzimas metabolizadoras do tamoxifeno têm sido um dos principais temas debatidos nos últimos anos (BERRY, 2013; BERRY, 2014; GOETZ; BRAUCH; RATAIN; COX *et al.*, 2014; GOETZ; RAE; SUMAN; SAFGREN *et al.*, 2005; RAE; LEYLAND-JONES; REGAN, 2014; RAE; REGAN; THIBERT; GERSCH *et al.*, 2013).

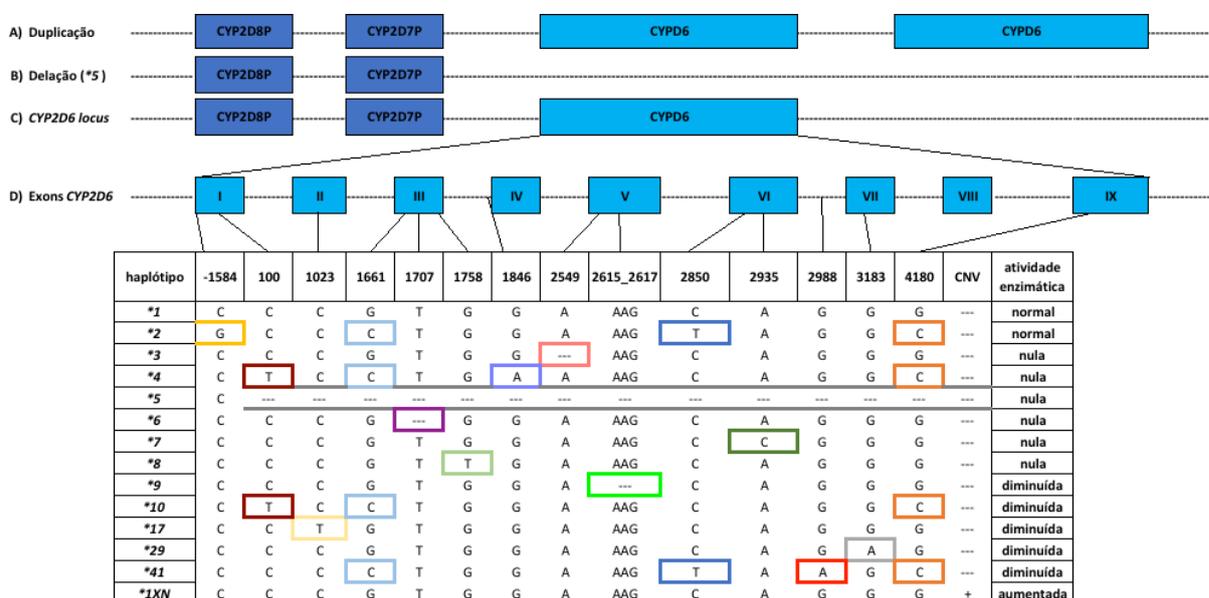
A enzima CYP2D6, membro da família 2 do citocromo P450 e principal enzima de metabolização do tamoxifeno, é produto de um gene altamente polimórfico com mais de 100 alelos variantes conhecidos, muitos dos quais resultam em atividades enzimáticas diferenciadas (JIN; DESTA; STEARNS; WARD *et al.*, 2005; STEARNS; JOHNSON; RAE; MOROCHO *et al.*, 2003).

Pelo menos 15 desses alelos codificam produtos não-funcionais causados por *splicing* aberrantes, códons *nonsense*, mutações de bases únicas, pequenas inserções ou deleções, deleções cromossômicas de todo o gene *CYP2D6*, genes *CYP2D6/CYP2D7* híbridos, mutações que causam a falta de incorporação do grupo heme na proteína ou outra forma de proteína não-funcional (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009). O *locus* do gene *CYP2D6* no cromossomo 22 inclui o gene *CYP2D6* e os pseudogenes *CYP2D7P* e *CYP2D8P*. O gene *CYP2D6* consiste de 8 introns e 9 exons, dos quais todos podem apresentar polimorfismos (Figura 3) (ZANGER, 2008).

Enquanto os alelos mais prevalentes são os *CYP2D6*1* e **2* (ambos denominados selvagens ou *wild-type*), os quais produzem enzimas com atividade normal, existem outras variantes alélicas que ocasionam enzimas com atividade

reduzida ou ausente (Figura 3) (BEVERAGE; SISSUNG; SION; DANESI *et al.*, 2007). A atividade reduzida da enzima CYP2D6 foi avaliada em vários estudos farmacocinéticos e está associada a baixos níveis plasmáticos dos metabólitos ativos do tamoxifeno, influenciando a eficácia do tratamento de mulheres com câncer de mama metastático (BRAUCH; SCHROTH; GOETZ; MURDTER *et al.*, 2013; LIM; JU LEE; SEOK LEE; SOOK LEE *et al.*, 2007).

FIGURA 3: Distribuição dos polimorfismos no gene *CYP2D6* investigados neste estudo



NOTA: Alelos nomeados segundo a regra do Consórcio de Variação de Farmacogenes (PHARMVAR, 2018). A figura indica a variação no número de cópias do gene *CYP2D6*, com duplicação (A), deleção (B) ou cópia única no genoma haploide (C). O item D indica as bases polimórficas, selecionadas para este estudo, distribuídas ao longo dos 9 éxons do gene *CYP2D6*. **FONTE:** Adaptado de (PRADO, 2009).

Com base em estudos *in vitro* e *in vivo*, os alelos variantes do *CYP2D6* podem ser diferenciados em 4 subgrupos de acordo com a atividade enzimática: alelos de atividade aumentada, alelos funcionantes normais, alelos de atividade reduzida ou alelos sem atividade (PHARMVAR, 2018). E, conforme a combinação dos diferentes alelos 4 fenótipos de metabolização podem ser definidos: metabolizadores ultrarrápidos (UM – *ultra-rapid metabolizer*), extensivos (EM – *extensive metabolizer*), intermediários (IM – *intermediate metabolizer*) e fracos (PM – *poor metabolizer*) (GOETZ; KNOX; SUMAN; RAE *et al.*, 2007).

Indivíduos com dois alelos nulos são classificados como metabolizadores fracos ou pobres (PM), com ocorrência em 5% a 10% dos caucasianos (SACHSE; BROCKMOLLER; BAUER; ROOTS, 1997). Até hoje, mais de 20 variantes alélicas foram identificadas como não funcionais ou nulas, sendo os alelos *3, *4, *5, *6, *7 e *8 responsáveis por aproximadamente 95% dos PMs caucasianos (KIYOTANI; MUSHIRODA; SASA; BANDO *et al.*, 2008). Pacientes classificados como PMs apresentam baixos níveis plasmáticos de (Z)-endoxifeno e resultados clínicos piores quando tratados com tamoxifeno (GOETZ; KNOX; SUMAN; RAE *et al.*, 2007; GOETZ; RAE; SUMAN; SAFGREN *et al.*, 2005).

A prevalência dos alelos de *CYP2D6* associados ao fenótipo PM, definida tanto pela função metabólica como pela detecção de dois alelos não-funcionantes, foi descrita em várias populações. Sua prevalência é de 7% a 10% em caucasianos do Norte Europeu, 1,9% a 7,3% em afro-americanos e menos de 1% na maior parte da população asiática. O fenótipo PM em brancos ocorre principalmente devido às variantes não-funcionais *3 e *4. Nos afro-americanos e nos asiáticos a variante não-funcionante é o alelo *5, presente em pelo menos 6% da população (BERNARD; NEVILLE; NGUYEN; FLOCKHART, 2006). No Brasil, a prevalência do fenótipo PM varia de 2,6% a 4,1%, sendo o alelo associado ao fenótipo PM de maior frequência o alelo *4 (ANTUNES; LINDEN; SANTOS; WALLEMACQ *et al.*, 2012; FRIEDRICH; GENRO; SORTICA; SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2014).

Indivíduos com fenótipo EM herdam dois alelos funcionais que se traduzem em atividade enzimática normal. Já a classificação do fenótipo IM, no entanto, é menos distinguível. Originalmente indivíduos IM foram determinado por dois alelos IM ou alelos IM/PM combinados (ZANGER; RAIMUNDO; EICHELBAUM, 2004). Embora seja caracterizado fenotipicamente como tendo atividade catalítica reduzida, seu genótipo pode depender de uma combinação de alelos EM com alelos PM ou IM. Considerando um efeito gene-dose-dependente, um genótipo EM/PM heterozigótico resulta em 50% de função enzimática, enquanto a contribuição de um alelo IM resultaria em algo entre 0% e 50%. De fato, o fenótipo IM está em uma posição intermediária entre um status de PM e EM, uma designação que pode ser bastante complicada e abrangente, dependendo da substrato fenotipado. Indivíduos caucasianos com fenótipo IM representam de 10% a 45% da população e os alelos

com atividade reduzida que mais contribuem para este fenótipo são os alelos *9, *10 e *41.

Em indivíduos afrodescendentes, os alelos *17 e *29 aparecem com maior destaque (SISTONEN; SAJANTILA; LAO; CORANDER *et al.*, 2007). Embora a frequência de alelos nulos em asiáticos seja muito pequena (<1%), a presença do alelo *10, foi observada em uma frequência de 40-50% nesta população (KIYOTANI; MUSHIRODA; SASA; BANDO *et al.*, 2008).

Na população brasileira estudos de genotipagem da CYP2D6 demonstram que 9,5-18% da população apresenta o fenótipo IM, e os alelos *17 e *29 parecem contribuir para esta maior proporção de indivíduos IM em relação a outras populações estudadas (ANTUNES; LINDEN; SANTOS; WALLEMACQ *et al.*, 2012; FRIEDRICH; GENRO; SORTICA; SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2014).

Existem diferenças étnicas significativas quanto às frequências de PM, IM e UM e, assim, a possibilidade de que diferentes grupos étnicos variem com respeito aos desfechos clínicos da terapia medicamentosa com substratos da CYP2D6.

Com intuito de facilitar a análise do fenótipo de indivíduos portadores de alelos de atividade reduzida um escore de atividade para a enzima CYP2D6 foi proposto. Para tal, níveis de redução de atividade foram estabelecidos com base em estudos *in vivo* e *in vitro* de metabolização de fármacos substratos da CYP2D6 (GAEDIGK; SIMON; PEARCE; BRADFORD *et al.*, 2008). Os alelos EM e PM receberam valores de "1" e "0" respectivamente, enquanto os alelos IM, dependendo de sua atividade conhecida, receberam valores de "0,5" ou "0,75". Os valores foram atribuídos conforme as concentrações observadas dos metabólitos resultantes da ação enzimática. No outro extremo do espectro metabólico encontra-se o fenótipo da UM que pode ser inferido a partir de uma duplicação ou amplificação do gene CYP2D6 ativo, resultando no aumento da função enzimática. No modelo de escore de atividade, a duplicação recebeu um valor de "3" devido à presença de 3 ou mais cópias de genes funcionais (GAEDIGK; SIMON; PEARCE; BRADFORD *et al.*, 2008).

De modo geral, o conhecimento por parte da equipe clínica quanto a relação genótipo-fenótipo da CYP2D6, pode influenciar as decisões de tratamento quando se trata de medicamentos substratos deste enzima, particularmente nos casos em que uma alternativa farmacológica eficaz está disponível. É o caso da codeína de uso oral, em que 10% dos caucasianos, por serem indivíduos do fenótipo PM, não são capazes

de biotransformar eficientemente a codeína à morfina e, portanto, terão pouco efeito analgésico, sendo oferecido para estas outras possibilidades terapêuticas (CREWS; GAEDIGK; DUNNENBERGER; LEEDER *et al.*, 2014).

Alguns estudos trouxeram à luz evidências de que pacientes com câncer de mama cuja relação genótipo-fenótipo resultem em fenótipos PM ou IM também não se beneficiam do efeito antiestrogênico do tamoxifeno, devido a insuficiente produção de seus metabolitos ativos (GOETZ; RAE; SUMAN; SAFGREN *et al.*, 2005; KIYOTANI; MUSHIRODA; IMAMURA; HOSONO *et al.*, 2010; REGAN; LEYLAND-JONES; BOUZYK; PAGANI *et al.*, 2012; SALADORES; MURDTER; ECCLES; CHOWBAY *et al.*, 2015; SALADORES; PRECHT; SCHROTH; BRAUCH *et al.*, 2013; SCHROTH; ANTONIADOU; FRITZ; SCHWAB *et al.*, 2007).

Com relação aos pacientes UMs, assim como para a codeína, em que os pacientes desenvolvem sérios efeitos adversos decorrente da rápida e elevada taxa de formação de morfina, há a possibilidade de que pacientes com câncer de mama UMs sejam mais suscetíveis aos efeitos adversos típicos da terapia com tamoxifeno, como o aumento de fogachos (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009).

O maior grupo de pacientes com câncer de mama elegíveis para terapia adjuvante com tamoxifeno é o grupo de mulheres pós-menopausadas, das quais dois terços possuem tumores com receptores hormonais positivos e cujo o declínio da função ovariana resulta em baixos níveis plasmáticos de estrogênio. A associação farmacogenética entre o *CYP2D6* e o desfecho clínico da terapia adjuvante com tamoxifeno em mulheres pós-menopausadas foi descrita em vários estudos (GOETZ; RAE; SUMAN; SAFGREN *et al.*, 2005; KIYOTANI; MUSHIRODA; IMAMURA; HOSONO *et al.*, 2010; SCHROTH; ANTONIADOU; FRITZ; SCHWAB *et al.*, 2007).

Um grande estudo retrospectivo anglo-germânico com 1325 mulheres pós-menopausadas com câncer de mama ER-positivo e que receberam monoterapia com tamoxifeno adjuvante, relatou uma correlação significativa entre *CYP2D6* e o desfecho clínico (SCHROTH; GOETZ; HAMANN; FASCHING *et al.*, 2009). Neste estudo, pacientes com pelo menos uma cópia de um alelo PM ou IM foram associados com piores taxas de sobrevida livre de eventos (HR: 1,33; IC95%: 1,06-1,68) e sobrevida livre de doença (HR: 1,29; IC95%: 1,03-1,61) quando comparados com pacientes EM (SCHROTH; GOETZ; HAMANN; FASCHING *et al.*, 2009). Este foi

considerado um dos relatos mais significativos sobre o assunto até o momento (NCCN, 2018; RATAIN; NAKAMURA; COX, 2013).

Outro estudo, uma análise secundária do Grupo Austríaco de Estudos do Câncer da Mama e Colorretal (ABCSCG) de mulheres pós-menopausadas revelou que o genótipo *CYP2D6* estava significativamente associado ao risco de recorrência ou morte (GOETZ; SUMAN; HOSKIN; GNANT *et al.*, 2013). E, uma meta-análise dos dados globalmente disponíveis até 2013, sobre os resultados do tamoxifeno para o tratamento do câncer de mama em mulheres ER-positivo pós-menopausa, realizado pelo Consórcio Internacional de Farmacogenética do Tamoxifeno, confirmou que os alelos deficientes do gene *CYP2D6* estão associados a um maior risco de recorrência (PROVINCE; GOETZ; BRAUCH; FLOCKHART *et al.*, 2014).

Em 2015 Saladore e colaboradores (2015, p.84-94), indicaram que a formação de endoxifeno também em mulheres na pré-menopausa depende do *CYP2D6*, independentemente da etnia. E, a baixa concentração e taxa de formação do endoxifeno, bem como a diminuição da atividade do *CYP2D6* predizem taxas de sobrevida livre de recorrências mais curtas (SALADORES; MURDTER; ECCLES; CHOWBAY *et al.*, 2015).

De modo contrário, alguns estudos não mostraram uma associação dependente do *CYP2D6* com o desfecho clínico (NOWELL; AHN; RAE; SCHEYS *et al.*, 2005; RAE; DRURY; HAYES; STEARNS *et al.*, 2012; WEGMAN; ELINGARAMI; CARSTENSEN; STAL *et al.*, 2007). Algumas das razões que contribuem para os resultados inconsistentes incluem a ausência do reporte do uso de medicações concomitantes inibidoras da enzima *CYP2D6*, falta de uma genotipagem abrangente do *CYP2D6* e questões técnicas, como fontes inadequadas de material para genotipagem, diferentes definições clínicas para desfechos ou tempos variados de seguimento (HERTZ; MCLEOD; IRVIN, 2012; RATAIN; NAKAMURA; COX, 2013; STANTON, 2012).

Os questionamentos sobre o papel dos polimorfismos do gene da *CYP2D6* no desfecho do tratamento com tamoxifeno para pacientes com câncer de mama em pré e pós menopausa tem sido alvo de inúmeros debates. Os dados publicados em 2012 referentes aos resultados de genotipagem das pacientes participantes dos estudos BIG 1-98 (*Breast International Group*) e ATAC (*Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination*) mostraram não haver valor clínico na genotipagem prévia da *CYP2D6*

destes pacientes em relação ao desfecho do tratamento com o tamoxifeno (RAE; DRURY; HAYES; STEARNS *et al.*, 2012; REGAN; LEYLAND-JONES; BOUZYK; PAGANI *et al.*, 2012). Na época os autores sugeriram encerrar as discussões referentes ao tema.

Contudo, *experts* em farmacogenética refutaram tal hipótese solicitando que os autores dos estudos BIG 1-98 e ATAC se retratassem frente a comunidade científica com base na violação de importantes princípios em genética, tais como a regra de equilíbrio de Hardy-Weinberg, violada em tais estudos. A explicação à violação pode estar relacionada ao viés resultante do material utilizado para a genotipagem das pacientes (GOETZ; BRAUCH; RATAIN; COX *et al.*, 2014).

Tais estudos utilizaram o genoma tumoral e não genoma de linhagem germinativa das pacientes para a genotipagem do *CYP2D6*, assim como de outras enzimas do complexo P450. Ainda, uma alta frequência na distorção dos genótipos pode estar relacionada ao desequilíbrio alélico associado a perda de heterozigose em tecidos tumorais da mama. E até mesmo a presença de pseudogenes próximos ao *locus* do *CYP2D6* podem ter impactado nos resultados destes estudos (BRAUCH; SCHROTH; GOETZ; MURDTER *et al.*, 2013; NAKAMURA; RATAIN; COX; MCLEOD *et al.*, 2012).

Porém, até o momento, as diretrizes internacionais para o tratamento precoce do câncer de mama não recomendam o teste farmacogenético do *CYP2D6* para prescrição de tamoxifeno devido a dados conflitantes quanto a relação do *CYP2D6* com o desfecho clínico propriamente dito (NCCN, 2018).

Assim, a influência da ação metabólica dos polimorfismos da *CYP2D6* na eficácia terapêutica do tamoxifeno ainda tem sido alvo de pesquisas atuais. Dados robustos mostram que a concentração plasmática de metabólitos como o endoxifeno esta associada ao genótipo da *CYP2D6* bem como ao polimorfismos de outras enzimas relacionadas ao metabolismo do tamoxifeno, como a *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e o *CYP3A5* (JIN; DESTA; STEARNS; WARD *et al.*, 2005; STEARNS; JOHNSON; RAE; MOROCHO *et al.*, 2003). Mas, poucos estudos examinaram a associação entre as concentrações plasmáticas de endoxifeno e o desfecho clínico. O estudo que combinou esses dois aspectos revelou que pacientes dentro do quintil mais baixo de concentrações de endoxifeno tinham um risco aumentado de

recorrência ou desenvolvimento de outro câncer de mama (MADLENSKY; NATARAJAN; TCHU; PU *et al.*, 2011).

Como citado, mais enzimas do complexo do citocromo P450 também estão envolvidas no metabolismo do tamoxifeno (Figura 2). Outras isoenzimas CYP da família 2 que também estão envolvidos na biotransformação do tamoxifeno são a CYP2C9 e a CYP2C19; estas enzimas também caracterizam-se por serem polimórficas (COLLER; KREBSFAENGER; KLEIN; ENDRIZZI *et al.*, 2002; DESTA; WARD; SOUKHOVA; FLOCKHART, 2004). Dos 30 alelos variantes do gene *CYP2C9* os alelos *2 e *3 estão associados com reduções significativas, mas altamente variáveis, de atividade enzimática, dependendo do substrato (LEE; GOLDSTEIN; PIEPER, 2002).

Os produtos da expressão genica do alelo *3 parecem apresentar redução de atividade mais intensas quando comparados com os produtos do alelo *2, com uma redução em atividade enzimática de até 90% para alguns substratos específicos (KING; KHAN; AITHAL; KAMALI *et al.*, 2004). Ambos os alelos estão presentes em aproximadamente 35% dos caucasianos, mas são menos prevalentes em negros e populações asiáticas (ZANGER; TURPEINEN; KLEIN; SCHWAB, 2008). Cerca de 2% e 24% dos indivíduos na população caucasiana são homozigotos e heterozigotos para estas variantes, respectivamente (XIE; KIM; WOOD; STEIN, 2001).

Para o gene *CYP2C19* os alelos nulos conhecidos (*2, *3, *4, *5, *6, *7 e *8) codificam produtos sem atividade enzimática da CYP2C19 (PM); o alelo *2 é mais prevalente em caucasianos e é resultado de um *splicing* defeituoso. De acordo com estudos de genotipagem e resultados de fenotipagem e, em analogia ao gene *CYP2D6*, a distribuição de PMs mostra ampla diferença interétnica.

Nos europeus caucasianos, a frequência média de indivíduos PM é de 3%, enquanto as frequências de PMs para populações asiáticas podem chegar a 23% (DESTA; ZHAO; SHIN; FLOCKHART, 2002). Indivíduos heterozigotos constituem 32% dos caucasianos porém, uma variante alélica mais recentemente identificada, *17, mostrou estar associado ao aumento da atividade *in vivo* da enzima CYP2C19, sendo tais indivíduos caracterizados como UM (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009).

Outra subfamília importante no metabolismo do tamoxifeno são as isoenzimas CYPs das subfamília 3A, CYP3A4 e CYP3A5, que participam do metabolismo de mais

de 40% dos medicamentos atualmente prescritos (ZANGER; TURPEINEN; KLEIN; SCHWAB, 2008). Quanto à enzima CYP3A4 há poucos indícios de uma contribuição relevante de alterações da sua expressão gênica e conseqüentemente na sua função enzimática, embora algumas enzimas defeituosa resultantes de genes mutantes podem ser responsáveis pela toxicidade de alguns tratamentos em raros casos (WESTLIND-JOHNSSON; HERMANN; HUENNEMEYER; HAUNS *et al.*, 2006).

Em contraste, os polimorfismos genéticos definem grande parte da variabilidade da expressão do gene *CYP3A5*. A maior incidência do alelo inativos *3 em caucasianos (85% a 95%) quando comparada com afroamericanos (30% a 50%) é a causa dos reduzidos índices de atividade enzimática da *CYP3A5* em caucasianos quando comparados com afroamericanos (30% vs 50%) (ANGLICHEAU; LEGENDRE; BEAUNE; THERVET, 2007).

É difícil delinear as contribuições relativas de cada um dos genes *CYP3A4* e *CYP3A5* porque as suas estruturas proteicas, funções, e substratos são muito semelhantes. De fato, uma dessas enzimas pode compensar funcionalmente a falta da outra. E, justamente por esta razão, a interpretação do fenótipo destas duas enzima é realizado em combinação (BRAUCH; MURDTER; EICHELBAUM; SCHWAB, 2009; KITZMILLER; LUZUM; BALDASSARRE; KRAUSS *et al.*, 2014).

Embora a *CYP2D6* seja a enzima com maior impacto nas concentrações de (Z)-endoxifeno, as enzimas acima citadas também são responsáveis pelo metabolismo do tamoxifeno (DESTA; WARD; SOUKHOVA; FLOCKHART, 2004). Uma pequena proporção de pacientes PM para a *CYP2D6* apresenta concentrações relativamente altas de endoxifeno, que podem ser atribuídas à via alternativa de formação de (Z)-endoxifeno: a desmetilação de (Z)-4-OH-Tam em (Z)-endoxifeno mediada principalmente pelas CYPs 3A4 e 3A5 (Figura 2) (MADLENSKY; NATARAJAN; TCHU; PU *et al.*, 2011; MURDTER; SCHROTH; BACCHUS-GERYBADZE; WINTER *et al.*, 2011).

Além disso, concentrações menores de endoxifeno em pacientes têm sido associadas com variantes de função reduzida da enzima *CYP2C9*, o que é plausível, pois esta contribui significativamente para a formação do outro metabólito primário, (Z)-4-OH-Tam, uma fonte alternativa para a formação de endoxifeno (COLLER; KREBSFAENGER; KLEIN; ENDRIZZI *et al.*, 2002; MURDTER; SCHROTH; BACCHUS-GERYBADZE; WINTER *et al.*, 2011).

Também, variações das CYPs 3A4 e 3A5 têm sido associada aos níveis plasmáticos tanto do principal metabólito primário do tamoxifeno, o DM-Tam, quanto do próprio (Z)-endoxifeno (JIN; DESTA; STEARNS; WARD *et al.*, 2005) (TEFT; GONG; DINGLE; POTVIN *et al.*, 2013). E, variantes do *CYP2C19* foram associadas a desfechos clínico diferenciados em pacientes tratadas com tamoxifeno (SCHROTH; ANTONIADOU; FRITZ; SCHWAB *et al.*, 2007).

1.2.2 Fatores Não-genéticos Ambientais Relacionados ao Hospedeiro

Como já citado, inúmeros fatores podem contribuir para a falta de resposta à terapia com tamoxifeno. Dentre eles, além de fatores genéticos, fatores ambientais relacionados ao hospedeiro, como uso de medicamentos concomitantes a terapia antineoplásicas e a adesão a este tratamento podem ter relação direta com a falta de sucesso terapêutico.

O uso de medicamentos concomitantes como os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS), podem apresentar efeitos sobre os níveis dos metabólitos do tamoxifeno biodisponíveis para a célula tumoral. Alguns dos ISRSs são conhecidamente inibidores da *CYP2D6* e, frequentemente, são prescritos para o tratamento dos eventos de fogacho, resultantes do tratamento com tamoxifeno, ou mesmo da depressão, muitas vezes relacionada ao diagnóstico de câncer de mama e do tratamento em si (BORGES; DESTA; LI; SKAAR *et al.*, 2006; JIN; DESTA; STEARNS; WARD *et al.*, 2005; STEARNS; JOHNSON; RAE; MOROCHO *et al.*, 2003).

Evidências farmacocinéticas destacam diminuições subsequentes nas concentrações de endoxifeno em pacientes *CYP2D6*-EMs devido à co-administração de potentes inibidores da *CYP2D6*, tais como paroxetina e fluoxetina (STEARNS; JOHNSON; RAE; MOROCHO *et al.*, 2003). Como resultado, as atuais recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) aconselham cautela quanto ao uso concomitante de conhecidos inibidores da *CYP2D6*, uma vez da possibilidade de ocorrência de interações medicamentosas (BURSTEIN; PRESTRUD; SEIDENFELD; ANDERSON *et al.*, 2010).

A adesão ao tratamento é outro fator não-genético relacionado ao hospedeiro que pode ter impacto não só na terapia com o tamoxifeno, mas de qualquer terapia farmacológica. Na área da saúde, a adesão ao um tratamento pode ser descrita como

o grau em que um paciente segue corretamente as orientações recebidas da equipe clínica (WORLDHEALTHORGANIZATION, 2003). O que inclui o início do tratamento, a implementação do regime prescrito e a descontinuação da farmacoterapia (VRIJENS; DE GEEST; HUGHES; PRZEMYSŁAW *et al.*, 2012).

Atualmente adesão é um dos principais problemas no fornecimento efetivo de cuidados de saúde. A complexidade dos regimes de tratamento, a falta de “conhecimento” na área da saúde e falta de compreensão dos benefícios do tratamento, a ocorrência de reações adversas, o custo dos medicamentos, a comunicação com a equipe de saúde ou falta de confiança estão entre os fatores mais importantes influenciando negativamente a adesão ao tratamento, especialmente em doenças crônicas (WORLDHEALTHORGANIZATION, 2003). A não adesão pode resultar em pior prognóstico, hospitalizações mais frequentes, e custos de saúde significativamente maiores (BROWN; BUSSELL, 2011).

Tal como acontece com a maioria dos tratamentos medicamentosos a longo prazo, a falta de adesão à terapia adjuvante hormonal é um problema a ser considerado. Apenas metade dos pacientes com câncer de mama submetidos à terapia endócrina aderem à duração total do tratamento recomendado, que atualmente varia de 5 a 10, com o uso diário da medicação, no caso do tamoxifeno (HERSHMAN; SHAO; KUSHI; BUONO *et al.*, 2011; MCCOWAN; WANG; THOMPSON; MAKUBATE *et al.*, 2013).

Hershman e colaboradores (2011, p.529-537) observaram em um estudo retrospectivo com 8769 mulheres que a sobrevida global em 10 anos foi de 81,7 e 77,8% em mulheres que aderiram e não aderiram, respectivamente, ao tratamento ($P < 0,001$) (HERSHMAN; SHAO; KUSHI; BUONO *et al.*, 2011). No estudo de McCowan e colaboradores 38% das pacientes apresentaram baixa adesão ao tratamento com tamoxifeno, o que foi associado com uma redução de 52% ($P < 0,001$) no tempo de recorrência da doença (MCCOWAN; WANG; THOMPSON; MAKUBATE *et al.*, 2013). Razões para o não cumprimento podem ser atribuídas a efeitos colaterais adversos do tamoxifeno; cujos sintomas mais comuns incluem fogachos e depressão, ou, em casos raros, maior risco de acidente vascular cerebral, eventos tromboembólicos ou câncer de endométrio (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, 2005).

A adesão a um tratamento farmacológico pode ser classificada, segundo

alguns autores, como adesão primária ou secundária, e ambas teriam o mesmo impacto sobre os desfechos clínicos do paciente. A não adesão primária trata-se da frequência com que os pacientes falham em seguir as prescrições não só quando novos medicamentos são prescritos, mas também quando é necessário nova prescrição para continuidade da terapia farmacológica já em andamento.

Na adesão primária pode incluir desde a não retirada em farmácias (ou compra) da medicação prescrita até a mesma falta da mesma na unidade de dispensação (FISCHER; STEDMAN; LII; VOGELI *et al.*, 2010). A não adesão secundária é definida como a medicação que não é tomada conforme prescrito mesmo quando a medicação está disponível e em posse do paciente. Ambas afetam não apenas o resultado clínico, mas também o resultado financeiro do sistema de saúde (SOLOMON; MAJUMDAR, 2010).

A adesão pode ser mensurada de forma direta ou indireta, sendo que não existe nenhum método considerado padrão ouro para a avaliação de adesão (OSTERBERG; BLASCHKE, 2005).

O método direto é realizado pela medida de concentração em plasma ou urina de um medicamento e/ ou seus metabólitos, com maior custo na sua realização. Os métodos indiretos correlacionam o comportamento de adesão do paciente com informações fornecidas pelo próprio paciente ou outras estimativas indiretas e incluem questionários estruturados, contagem manual de comprimidos, registro de retirada de medicamentos em farmácia, uso de equipamentos eletrônicos de monitoramento, diário de medicação, verificação de resposta clínica e medida de marcadores fisiológicos (p. ex. sinais vitais). Estes métodos têm custo mais acessível, porém com maior possibilidade de interferência do paciente (LAM; FRESCO, 2015; OSTERBERG; BLASCHKE, 2005).

Dentre um dos métodos mais utilizados para estudo de adesão em determinada população, cita-se a Escala de Adesão à Medicação de Morisky de 4 itens (MMAS-4), um questionário estruturado que avalia a adesão auto-referida pelo paciente. O teste de Moriski, validado nos Estados Unidos em pacientes hipertensos, apresenta sensibilidade de 81% e especificidade de 44% (MORISKY; GREEN; LEVINE, 1986). A baixa especificidade indica um menor poder em verificar os fatores relacionados à baixa adesão ao tratamento.

No entanto, além da boa sensibilidade em detectar a não adesão, este questionário tem como vantagem ser de fácil entendimento para o paciente, além de rápida aplicação. Também já foram realizados estudos validando seu uso na avaliação de adesão em pacientes oncológicos em tratamento com antineoplásicos orais, incluindo a terapia hormonal para o câncer de mama (BERRY; BLONQUIST; HONG; HALPENNY *et al.*, 2015; KESMODEL; GOLOUBEVA; ROSENBLATT; HEISS *et al.*, 2018; SPOELSTRA; RITTENBERG, 2015).

Os estudos que avaliaram a adesão ao tamoxifeno, em sua maioria, tratam-se de estudos retrospectivos em que a adesão foi avaliada através do registro de retirada do medicamento na farmácia institucional (DEZENTJE; VAN BLIJDERVEEN; GELDERBLOM; PUTTER *et al.*, 2010; HERSHMAN; SHAO; KUSHI; BUONO *et al.*, 2011; MCCOWAN; WANG; THOMPSON; MAKUBATE *et al.*, 2013; THOMPSON; JOHNSON; QUINLAN; HILLMAN *et al.*, 2011). Este método é bastante útil para obter dados de grandes populações, sendo facilitado atualmente pelo uso de sistemas informatizados que facilitam a interpretação da periodicidade de retirada da medicação. Porém, a retirada do medicamento não implica necessariamente no uso deste conforme o regime terapêutico prescrito, além de não excluir a possibilidade de o paciente adquirir o medicamento em farmácias externas.

As taxas de adesão ao tratamento com tamoxifeno observadas nos estudos citados foram de aproximadamente 87% a 81% para o primeiro ano diminuindo para 75% a 50% no quinto ano de tratamento (HERSHMAN; SHAO; KUSHI; BUONO *et al.*, 2011; MCCOWAN; WANG; THOMPSON; MAKUBATE *et al.*, 2013; PARTRIDGE; WANG; WINER; AVORN, 2003). Um estudo realizado no Brasil obteve índices de adesão de 73,6% para hormonioterapia em mulheres com câncer de mama (BRITO; PORTELA; DE VASCONCELLOS, 2014).

Cabe ressaltar que as variações nestes valores podem estar relacionadas à metodologia de análise. No estudo realizado por Font e colaboradores (2012), que comparou a adesão observada em relato médico em prontuário, questionário estruturado por telefone e registro de dispensação em farmácia, foram encontrados valores para adesão ao tamoxifeno de 93,4%, 88,8% e 68,6% respectivamente, sem concordância estatística entre os métodos utilizados (FONT; ESPINAS; GIL-GIL; BARNADAS *et al.*, 2012).

Medir a adesão é importante para pesquisadores e clínicos. Porém, estimativas

imprecisas da adesão ou interpretação inadequada dos métodos propostos para avaliação da adesão, conforme o perfil da população analisada, pode levar a conclusões potencialmente dispendiosas e perigosas na área clínica. Tratamentos eficazes podem ser julgados como ineficazes, procedimentos diagnósticos caros podem ser solicitados e a terapia pode ser desnecessária e perigosamente intensificada. Além disso, os resultados dos estudos clínicos não podem ser realisticamente interpretados sem informações de adesão. A eficácia do tratamento e as relações dose-resposta são mal calculadas em estudos em que os pacientes apresentam baixa adesão (FARMER, 1999). Sendo assim, estimativas precisas de adesão à medicação fornecem melhores evidências sobre as consequências, fatores preditores / fatores de risco e estratégias para melhorar a adesão à medicação (LAM; FRESCO, 2015).

A falta de adesão ao tratamento tem causas multifatoriais que precisam ser compreendidas antes que intervenções possam ser planejadas para melhorar a adesão à medicação (BROWN; BUSSELL, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), há múltiplos fatores que levam a uma má adesão à medicação: fatores socioeconômicos, fatores relacionados à terapia, fatores relacionados aos pacientes, fatores relacionados à equipe ou sistema de saúde (WORLDHEALTHORGANIZATION, 2003).

A compreensão de se a falta de adesão é primária (início da farmacoterapia) ou secundária (implementação do regime prescrito) e quais fatores levaram a ela, permite uma intervenção apropriada, que pode ser adaptada individualmente para melhorar o comportamento de uso da medicação de cada paciente. A estratégia terapêutica decidida pela equipe clínica e pelo paciente permitirá uma forma mais eficaz de intervenção.

2 JUSTIFICATIVA

As frequências alélicas de *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *CYP3A5* em pacientes com câncer de mama ainda são pouco conhecidas no Brasil. Os dados brasileiros disponíveis não avaliam um panorama completo do polimorfismo das principais enzimas metabolizadoras do tamoxifeno (ANTUNES; LINDEN; SANTOS; WALLEMACQ *et al.*, 2012; DE AMEIDA MELO; DE VASCONCELOS-VALENCA; NETO; BORGES *et al.*, 2016; JARDIM; CALABRICH; KATZ, 2010; MARTINS; VIDAL; SOUZA; BRUSACA *et al.*, 2014). Tais dados também não confrontam as análises polimórficas deste conjunto de enzimas com dados fenotípicos do uso da medicação, tais como níveis plasmáticos do medicamento e seus metabólitos ativos ou dados de seguimento farmacoterapêutico (adesão terapêutica e perfil de efeitos adversos).

Fora do país, apesar do número de estudos que relatam o impacto dos polimorfismos do gene *CYP2D6* e outras enzimas nos níveis de endoxifeno e outros metabólitos, poucos deles controlam o viés de adesão. A grande maioria dos estudos controla a adesão pela taxa de dispensação da medicação, ou ainda, simplesmente por pontos de corte (valores limítrofes) de níveis plasmáticos de determinado composto, ignorando os polimorfismos genéticos de enzimas que estão diretamente relacionadas a sua concentração plasmática.

Nos estudos que avaliam a adesão pela taxa de dispensação presume-se que a retirada da medicação na farmácia seja correspondente ao comportamento de tomada de medicação do paciente e que a medicação é tomada exatamente como prescrita. Tal modelo, porém, é incapaz de identificar adesão parcial, ou mesmo o fato de os pacientes não tomarem medicação mesmo em posse do mesmo, por qualquer motivo (LAM; FRESCO, 2015).

Portanto, o objetivo principal deste estudo foi medir a contribuição da farmacogenética das enzimas metabolizadoras do tamoxifeno e do comportamento de adesão da paciente sobre as concentrações plasmáticas dos metabólitos do tamoxifeno, em uma população de câncer de mama. Este é o primeiro estudo prospectivo conduzido para avaliar simultaneamente tais efeitos nesta população.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os fatores farmacogenéticos e ambientais relacionados ao hospedeiro que interferem no metabolismo do tamoxifeno em uma população de mulheres com câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a frequência dos diferentes alelos polimórficos das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 em pacientes com câncer de mama;
- Determinar os escore de atividade e o fenótipo previsto de cada paciente (metabolizadores ultrarrápidos - UM, rápidos - EM, intermediários - IM e fracos - PM) de acordo com o genótipo de cada enzima;
- Determinar o fenótipo de metabolização do tamoxifeno conforme os seus níveis plasmáticos em pacientes em uso da medicação, bem como de seus metabólitos;
- Realizar o seguimento farmacoterapêutico das pacientes em uso do tamoxifeno para determinar o índice de adesão ao tratamento e o perfil de reações adversas reportadas pelas pacientes;
- Correlacionar os níveis de tamoxifeno e seus metabólitos em plasma com a frequência dos diferentes alelos polimórficos das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5, e o seguimento farmacoterapêutico.

4 MÉTODOS

4.1 DESENHO GERAL DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de campo prospectivo, descritivo e quantitativo, realizado entre abril de 2014 a junho de 2017.

O desfecho primário do estudo foi estimar fatores genéticos e ambientais do hospedeiro que interferem nos níveis plasmáticos de tamoxifeno e seus principais metabólitos, em mulheres com câncer de mama tratadas na principal instituição oncológica de Curitiba-PR. Para tal foi estimado as frequências dos genótipos das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5, determinado os níveis plasmáticos de tamoxifeno e seus metabólitos, bem como realizado o seguimento farmacoterapêutico das mesmas para definição do perfil de adesão ao tratamento com tamoxifeno.

Pacientes do Hospital Erasto Gaertner, portadoras de câncer de mama e recém diagnosticadas, foram genotipadas quanto aos alelos das enzimas de metabolização do tamoxifeno. As pacientes com RE positivo e que iniciaram uso da medicação tamoxifeno foram convidadas a realizar a determinação dos níveis plasmáticos de tamoxifeno e seus metabólitos, bem como o seguimento farmacoterapêutico. Para estas pacientes, o fármaco e seus metabólitos passaram a ser monitorados quanto a sua concentração plasmática durante o primeiro ano de tratamento. Os dados de metabolização do fármaco foram correlacionados com o perfil genotípico e o perfil de adesão ao tratamento de cada indivíduo.

4.2 CASUÍSTICA

Foram inicialmente triadas 404 pacientes e pré-selecionadas 363 mulheres portadoras de câncer de mama em qualquer estadió e recém diagnosticadas durante o ano de 2014 e 2105, que foram atendidas pelos Serviços de Ginecologia e Mama e de Oncologia Clínica do Hospital Erasto Gaertner. As pacientes foram abordadas pela equipe clínica do estudo durante seu atendimento nos respectivos serviços, sendo então esclarecidas sobre os objetivos do estudo e convidadas a participar do mesmo.

Das pacientes pré-selecionadas, 225 pacientes com perfil imuno-histoquímico positivo para o receptor de estrogênio ou progesterona e que tinham indicação de uso

de tamoxifeno na ocasião, foram classificadas de acordo com o fenótipo metabolizador definido pelo genótipo das enzimas em estudo (UM, EM, IM e PM), e realizaram a determinação dos níveis plasmáticos e seguimento farmacoterapêutico.

A seguir estão listados os critérios de inclusão e exclusão do estudo:

Critérios de inclusão:

- Pacientes que aceitassem participar do estudo a partir da assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE);
- Portadores de câncer de mama em qualquer estadio, recém diagnosticados;
- Indivíduos do sexo feminino, com mais de 18 anos, em pré ou pós menopausa;
- Pacientes com qualquer subtipo histológico, cujo status hormonal seja positivo para RE e que tenham indicação de tratamento com tamoxifeno.

Critérios de exclusão:

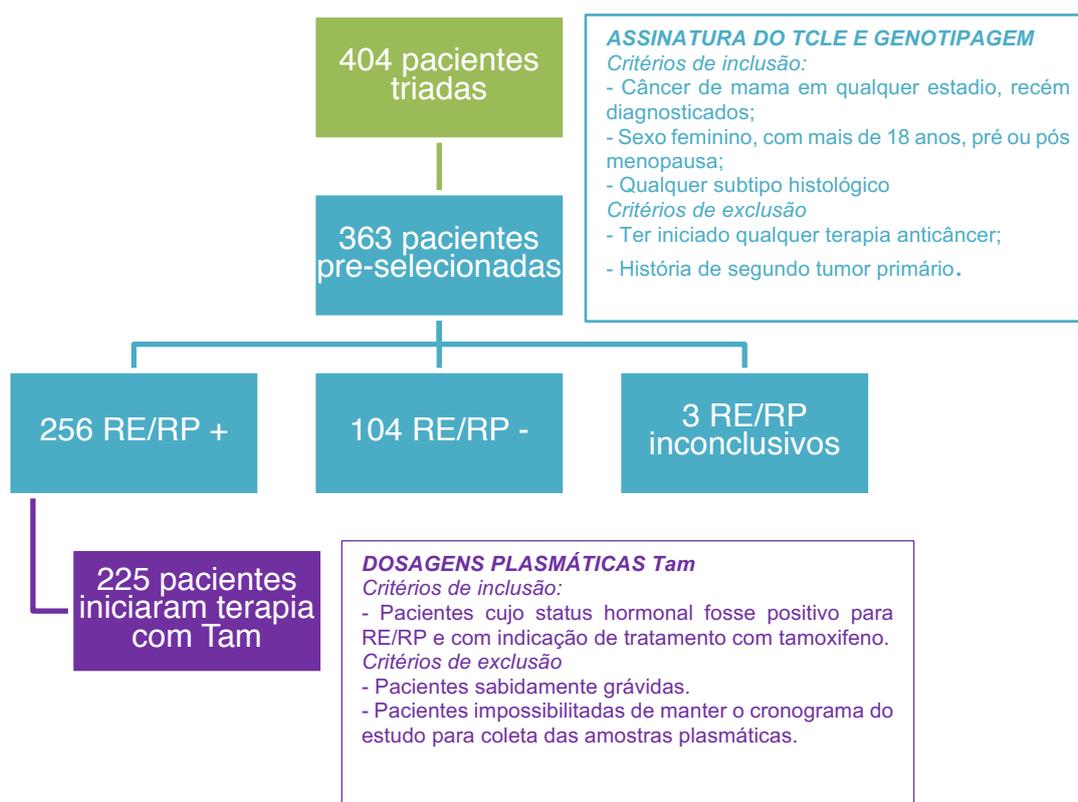
- Pacientes que já tivessem iniciado qualquer terapia anticâncer de caráter farmacológico ou sistêmico;
- Pacientes que desenvolvam ou possuam história de segundo tumor primário;
- Pacientes sabidamente grávidas;
- Pacientes impossibilitadas de manter o cronograma do estudo para coleta das amostras plasmáticas.

O projeto atendeu à resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, de modo que os sujeitos que participaram da pesquisa tiveram de concordar de sua participação assinando o TCLE (Apêndice 1). O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Paranaense de Combate e do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, bem como da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sendo aprovado em todos os comitês sob pareceres 812.732, 1.007.990 e 894.864 respectivamente (Anexo 1).

Todas as pacientes pré-selecionadas assinaram o TCLE. Uma vez que desenho do estudo previa a genotipagem das pacientes antes do início de qualquer terapia sistêmica, logo após a confirmação patológica da doença a paciente foi convidada a participar do estudo mesmo sem a confirmação das características imuno-histoquímicas da doença. Estas pacientes, após assinatura do TCLE, forneceram uma alíquota de sangue para extração do DNA e realização da

genotipagem. Os dados clínicos, epidemiológicos e sociodemográficos de cada paciente foram obtidos através do prontuário médico e entrevistas com as próprias pacientes (apêndices 2, 3, 4, 5 e 6). As variáveis exploradas foram: 1 - dados clínicos (tipo histológico do tumor, estadiamento, imuno-histoquímica para definição do status do receptor hormonal, status HER2, Ki67, status de menopausa, uso de anticoncepcional, reposição hormonal, terapia antineoplásica proposta, medicamentos concomitantes, indutores e inibidores da enzima CYP2D6, adesão ao tratamento e reações adversas ao tamoxifeno), 2 – dados epidemiológicos e sociodemográficos (idade, etnia/raça e escolaridade). A figura 4 ilustra o processo de inclusão das pacientes no estudo.

FIGURA 4: Processo de inclusão das pacientes no estudo



NOTA: TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, IHQ – imuno-histoquímica, RE – receptor de estrogênio, RP – receptor de progesterona, Tam – tamoxifeno.

4.3 ENSAIOS ANALÍTICOS

A extração do DNA das amostras foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Erasto Gaertner. As análises genéticas e as dosagens plasmáticas foram realizadas no Instituto de Farmacologia Clínica Dr. Margarete Fischer-Bosch, em Stuttgart na Alemanha, conforme parceria com o Hospital Erasto Gaertner e a Profa. Dra. Hiltrud Brauch, bem como no Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUC-PR. O acompanhamento clínico foi realizado no Hospital Erasto Gaertner.

4.3.1 Genotipagem das pacientes

De cada paciente com câncer de mama que aceitou participar do estudo foi coletada alíquota de 4mL de sangue em EDTA. O DNA de sangue periférico foi extraído do creme leucocitário de sangue total conforme especificações do kit QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) (QIAGEN, 2012). Tanto a determinação da pureza como a quantificação do material extraído foram realizadas por meio de espectrofotometria a 260nm (NanoDrop 1000 – *ThermoFisher*). A pureza do DNA foi determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} e a integridade das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e fotodocumentado em sistema de captura de imagem.

A escolha dos alelos avaliados para as enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 foi baseada na seleção dos alelos com repercussões funcionais e também naquelas mais frequentes em diferentes populações, segundo revisão de literatura (MURDTER; SCHROTH; BACCHUS-GERYBADZE; WINTER *et al.*, 2011; SALADORES; PRECHT; SCHROTH; BRAUCH *et al.*, 2013; SCHAEFFELER; SCHWAB; EICHELBAUM; ZANGER, 2003; SCHROTH; GOETZ; HAMANN; FASCHING *et al.*, 2009). As definições e nomenclaturas dos alelos estão de acordo com o Consórcio de Variação de Farmacogenes (PHARMVAR, 2018).

Os alelos investigados para o gene *CYP2D6* foram: alelos *3, *4, *5, *6, *7 e *8 associados à atividade enzimática nula (PM); e alelos *9, *10, *17, *29 e *41, associados à atividade reduzida (IM) (Quadro 4.1). Também foi investigada a duplicação do gene, associada à atividade ultra-rápida (UM) da enzima (SCHAEFFELER; SCHWAB; EICHELBAUM; ZANGER, 2003; SCHROTH; GOETZ;

HAMANN; FASCHING *et al.*, 2009). A ausência de alelos variantes ou duplicação do gene foram considerados como atividade enzimática normal ou metabolizadores extensivos (EM), relacionada ao alelo *1 (SALADORES; PRECHT; SCHROTH; BRAUCH *et al.*, 2013).

Para a interpretação do genótipo da enzima CYP2D6, foi aplicado o escore de atividade da enzima CYP2D6 com objetivo de prever os fenótipos PM, IM, EM e UM: PM/PM (0,00), PM/IM (0,50), IM/IM (0,75), PM/EM (1,00), IM/EM (1,50), EM/EM (2,00), e EM/UM (3,00) (ZINEH; BEITELSHEES; GAEDIGK; WALKER *et al.*, 2004). O fenótipo CYP2D6 foi classificado de acordo com o score de atividade: 0,0 como PMs; 0,5-1,5 como IMs; 2,0 como EM; e 3.0 como UM (SCHROTH; GOETZ; HAMANN; FASCHING *et al.*, 2009).

Para as demais enzimas conhecidamente envolvidas no metabolismo do tamoxifeno os alelos investigados foram: gene *CYP2C9* - os alelos *2 e *3, ambos relacionados com atividade enzimática reduzida; gene *CYP2C19* - o alelo *2, relacionado à atividade nula e o alelo *17, com atividade aumentada; gene *CYP3A4* - o alelo *22, relacionado a atividade reduzida; e gene *CYP3A5* - o alelo *3, também relacionado a atividade reduzida (Quadro 1).

Os fenótipos CYP2C9 foram classificados como EM (ausência dos alelos *2 ou *3), hetEM (portadores de *2 ou *3) e PM (homozigoto para *2 ou *3). Os fenótipos CYP2C19 e os escores de atividade preditos pelo genótipo foram classificados como UM (homozigoto para *17), EM/UM (ausência do alelo *2 e um alelo *17), EM/EM (ausência dos alelos *2 ou *17), EM/PM (um alelo *2), PM (homozigoto *2) (SCHROTH; GOETZ; HAMANN; FASCHING *et al.*, 2009). Os fenótipos CYP3A4 e CYP3A5 foram classificados pela associação CYP3A4/5: EM para CYP3A4 *1/*1 e CYP3A5 *1/*1 ou CYP3A5 *1/*3; IM eram CYP3A4 *1/*1 e CYP3A5 *3/*3 ou CYP3A4 *1/*22 e o CYP3A5 *1/*1 ou CYP3A5 *1/*3 e PM para CYP3A4 *1/*22 e CYP3A5 *3/*3 (KITZMILLER; LUZUM; BALDASSARRE; KRAUSS *et al.*, 2014).

Os polimorfismos selecionados para este estudo, para cada gene, estão citados em negrito no Quadro 1.

QUADRO 1: Polimorfismos selecionados nos Genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* E *CYP3A5*, Alelos a que fazem parte e atividade enzimática relacionada.

Alelos	Ref SNP ID	Polimorfismos associados	Atividade
CYP2D6*3	rs35742686	1749A>G; 2549A del	Nula
CYP2D6*4	rs3892097	100C>T; 974C>A; 984A>G; 997C>G; 1661G>C; 1846G>A ; 3877G>C; 4180G>C	Nula
CYP2D6*5	-----	deleção do gene	Nula
CYP2D6*6	rs5030655	1707T del; 1976G>A; 4180G>C	Nula
CYP2D6*7	rs5030867	2935A>C	Nula
CYP2D6*8	rs5030865	1661G>C; 1758G>T ; 2850C>T; 4180G>C	Nula
CYP2D6*9	rs5030656	2615AAG>del	Reduzida
CYP2D6*10	rs1065852	100C>T ; 1661G>C; 4180G>C	Reduzida
CYP2D6*17	rs28371706	1023C>T ; 1661G>C; 2850C>T; 4180G>C	Reduzida
CYP2D6*29	rs59421388	1659G>A; 1661G>C; 2850C>T; 3183G>A ; 4180G>C	Reduzida
CYP2D6*41	rs28371725	-1235A>G; -740C>T; -678G>A; 1661G>C; 2850C>T; 2988G>A ; 4180G>C	Reduzida
CYP2C9*2	rs1799853	430C>T	Reduzida
CYP2C9*3	rs1057910	1075A>C	Reduzida
CYP2C19*2	rs4244285	99C>T; 276G>C; 681G>A ; 990C>T; 991A>G	Nula
CYP2C19*17	rs12248560	3402C>T; 806C>T ; 99C>T; 80161A>G	Aumentada
CYP3A5*3	rs776746	3705C>T; 3709_3710insG; 6986A>G ; 31611C>T	Reduzida
CYP3A4*22	rs35599367	15389C>T	Reduzida

NOTA: Os polimorfismos selecionados para este estudo, para cada gene, estão citados em negrito.

FONTE: Adaptado de (PHARMVAR, 2018).

A genotipagem do DNA extraído de sangue periférico para todos os alelos selecionados (exceto *CYP2D6**5, *17 e *29) foi realizada através de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser auxiliada por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF/MS, *Sequenom*), técnica baseada na extensão de iniciadores e análise do produto de extensão detectado por espectrometria de massa (EHRICH; CORRELL; BOOM, 2004).

Esta técnica permite a realização da genotipagem por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex na qual vários polimorfismos (2 a 36) podem ser investigados simultaneamente. Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para anelar adjacente ao polimorfismo desejado, que é então alongado

utilizando-se um nucleotídeo terminador. Os iniciadores de amplificação utilizados estão listados no Quadro 2.

Para a realização das PCRs a escolha preliminar de oligonucleotídeos delimitantes, para amplificação das sequências-alvo que identificam os polimorfismos que compõem cada alelo, foi determinado segundo o Comitê de Nomenclatura dos Alelos do Citocromo P450 (CYP) Humano, atualmente disponibilizado pelo Consórcio de Variação de Farmacogenes (PHARMVAR, 2018).

QUADRO 2: Iniciadores de amplificação dos Genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* E *CYP3A5* para as reações Multiplex MALDI-TOF/MS

Gene / Reação	SNP	Iniciador	Direção	Sequencia (5'--> 3')
<i>CYP2D6</i> Multiplex oliva	*4_1846G>A *8_1758G>T	TAG_2D6_*4_8-Fw	Forward	ACGTTGGATGCGCCTTCGCCAACCACT
		TAG_2D6_*4_8-Rv	Reverse	ACGTTGGATGTGCTCACGGCTTTGTCCAA
	*41_2988G>A	TAG_2D6_*41-Fw	Forward	ACGTTGGATGCGTGAGCCCATCTGGGAAA
		TAG_2D6_*41-Rv	Reverse	ACGTTGGATGCTGACACTCCTTCTGCCTCCTA
<i>CYP2D6</i> Multiplex amarelo	*3_2549A del *9_2615AAG>del	TAG-2D6_*3_9-Fw2	Forward	ACGTTGGATCTGGCAAGGTCTACGCTT
		TAG-2D6_*3_9-Rv	Reverse	ACGTTGGATCGAGAGCATACTCGGGAC
	*6_1707T del *8_1758G>T	TAG-2D6_*6_8-Fw2	Forward	ACGTTGGATGTGGTGGATGGTGGGGCTAAT
		TAG-2D6_*6_8-Rv	Reverse	ACGTTGGATGCGCCTTCCCAGTCCCCTT
<i>CYP2D6</i> Multiplex azul	*7_2935A>C	TAG-2D6_*7-Fw	Forward	ACGTTGGATGTGGTGGCTGACCTGTTCTC
		TAG-2D6_*7-Rv	Reverse	ACGTTGGATGACACTCCTTCTGCCTCCTA
	*10_100C>T	TAG-2D6_*10-Fw	Forward	ACGTTGGATGTTTGGTAGTGAGGCAGGT
		TAG-2D6_*10-Rv	Reverse	ACGTTGGATGCCTGTGGTTTACCACCAC
<i>CYP2C9</i> Multiplex verde	*2_430C>T	PI_2C9_*2-Fw2	Forward	ACGTTGGATGAATTTGGGATGGGGAAGAG
		PI_2C9_*2-Rv	Reverse	ACGTTGGATGAAGGTCAAGTATGAGTAGGG
	*3_1075A>C	PI_2C9_*3-Fw	Forward	ACGTTGGATGCAGGAAGAGATTGAACGTGTGA
		PI_2C9_*3-Rv	Reverse	ACGTTGGATGCTGGTGGGAGAAGGTCA
<i>CYP2C19</i> Multiplex verde	*2_681G>A	PI_2C19_*2-Fw	Forward	ACGTTGGATGTCTTAGATATGCAATAATTTCCCA
		PI_2C19_*2-Rv	Reverse	ACGTTGGATGCTTTCTCCAAATATCACTTTCCA
	*17-806C>T	PI_2C19_*17-Fw	Forward	ACGTTGGATGAATGTTTGGAAAGTTGTTTTG
		PI_2C19_*17-Rv	Reverse	ACGTTGGATGTCTGATGCCCATCGTGGCGC
<i>CYP3A5</i> Multiplex rosa	*3_6986A>G	TAG-3A5_*3-Fw	Forward	ATGGAGAGTGGCATAGGAGATACC
		TAG-3A5_*3-Rv	Reverse	TGGTCCAAACAGGGAAGAGAT
<i>CYP3A4</i> Multiplex rosa	*22_15389C>T	TAG-3A4_*22-Fw	Forward	CTCCTTGATCTCAGAGGTAG
		TAG-3A4_*22-Rv	Reverse	CAGAAGGTGTTATCAGGTGC

NOTA: As colorações (oliva, amarelo, azul, verde e rosa) indicam os grupos alélicos determinados em cada reação multiplex. **FONTE:** O autor.

Cada reação de PCR multiplex foi padronizada com a seguinte mistura inicial: 0,2 μ M de cada iniciador (100 pmol/ μ L), 0,5mM de MgCl₂, 2,5 μ L de 2x QIAGEN HotStart Master Mix e H₂O q.s.p. 5 μ L. Cada reação foi realizada com 1ng de amostra de DNA em termociclador Veriti 384 poços (Applied Biosystems). A termociclagem utilizada foi específica para cada ensaio multiplex para qual as temperaturas de anelamento e alongamento dependia de cada iniciador utilizado (Quadro 3).

Para controle de qualidade, alguns produtos das reações, incluindo controles negativos, foram analisados em gel de agarose a 2% e fotodocumentados em sistema de captura de imagem.

QUADRO 3: Condições de Termociclagem para cada ensaio Multiplex de ampliações dos Genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* E *CYP3A5*

Ensaio	Estágios:	1	2			3	FINAL
Multiplex oliva	n° de ciclos	1x	3x*	5x	45x	1x	----
	Temperatura e Duração	95 °C - 15'	95 °C - 20" 67 °C - 60"	95 °C - 20" 65 °C - 30" 72 °C - 60"	95 °C - 20" 63 °C - 30" 72 °C - 60"	72 °C - 10'	4°C - ∞
Multiplex amarelo	n° de ciclos	1x	5x		45x	1x	----
	Temperatura e Duração	95 °C - 15'	95 °C - 20" 65 °C - 30" 72 °C - 60"		95 °C - 20" 60 °C - 30" 72 °C - 60"	72 °C - 10'	4°C - ∞
Multiplex azul	n° de ciclos	1x	5x		45x	1x	----
	Temperatura e Duração	95 °C - 15'	95 °C - 20" 65 °C - 30" 72 °C - 60"		95 °C - 20" 60 °C - 30" 72 °C - 60"	72 °C - 10'	4°C - ∞
Multiplex verde	n° de ciclos	1x	3x*	5x	40x	1x	----
	Temperatura e Duração	95 °C - 15'	95 °C - 20" 65 °C - 60" 72 °C - 60"	95 °C - 20" 63 °C - 30" 72 °C - 60"	95 °C - 20" 60 °C - 30" 72 °C - 60"	72 °C - 10'	4°C - ∞
Multiplex rosa	n° de ciclos	1x	3x*	5x	45x	1x	----
	Temperatura e Duração	95 °C - 15'	95 °C - 20" 67 °C - 60" 72 °C - 60"	95 °C - 20" 65 °C - 30" 72 °C - 60"	95 °C - 20" 62 °C - 30" 72 °C - 60"	72 °C - 10'	4°C - ∞

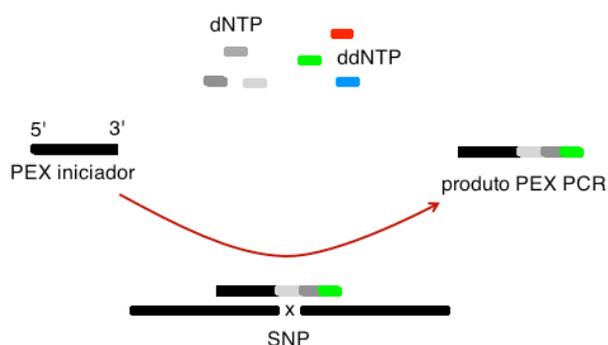
NOTA: Estágios: 1- desnaturação; 2- desnaturação, anelamento e amplificação/alongamento; 3- alongamento final. * Etapa extra no estágio 2 para aumentar a especificidade devido alta semelhança da região amplificada com os pseudogenes *CYP2D7* e *CYP2D8*. **FONTE:** O autor.

Após as reações de amplificação os produtos das PCRs foram tratados com fosfatase alcalina (SAP - *Shrimp Alkaline Phosphatase*) para desfosforilar desoxirribonucleotídeos fosforilados (dNTPs) não incorporados no produto de cada amplificação, de modo a evitar a alongamento inespecífico durante a reação de

extensão do iniciador (PEX - *primer extension reaction*). A mistura SAP consistiu em 0,17 μ L do tampão da enzima (10x), 1U da enzima SAP (0,3 μ L) e H₂O q.s.p. 2 μ L, adicionados em cada produto da PCR. Após centrifugação a placa foi termociclada (Veriti 384 poços - Applied Biosystems) a 37 °C por 30 min, 86 °C por 10 min e armazenada em 12 °C até remoção do aparelho.

Com os produtos de PCR tratados com a SAP foi realizada a reação de extensão do iniciador (PEX). A extremidade 3' do iniciador de extensão é adjacente ao SNP no qual dNTPs são incorporados para alongamento da cadeia enquanto di-desoxirribonucleotídeos fosforilados (ddNTPs) geram produtos de extensão específicos para cada alelo, cujos oligonucleotídeos resultantes possuem massas específicas para cada produto (Figura 5). O ensaio PEX realizado neste estudo foi o *Mass EXTEND*[®] homogêneo (hME). Este método, considerado modelo clássico de genotipagem, incorpora um dNTP ao local do SNP e em adição na sequência da cadeia insere um ddNTP, interrompendo o alongamento da molécula (BEAULIEU; HONG, 2004).

FIGURA 5: Ensaio PEX do tipo *Mass Extend*[®] Homogêneo (hME)



FONTE: Adaptado de (BEAULIEU; HONG, 2004)

A mistura para as reações PEX continham 0,2 μ M de cada dNTP e ddNTP (10mM), 1 μ L de MgCl₂ 100mM, 1 μ L do tampão PEX 10X, 9 pmol do iniciador PEX, 0,2 μ L da enzima Thermosequenase (6,4 unidades por reação) e H₂O q.s.p. 6 μ L. Os dNTPs, ddNTPs e iniciadores PEX utilizados dependiam do desenho do ensaio. O Quadro 4 traz os iniciadores PEX, dNTPs e ddNTPs usados, bem como a massa em daltons prevista para os produtos das reações.

QUADRO 4: Iniciadores dos Genes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* e *CYP3A5* para as reações PEX e massa dos produtos da reação MALDI-TOF/MS

SNP	Iniciador	Sequencia (5'--> 3')	Ext1	Ext2	Massa 1 Daltons	Massa 2 Daltons
*4_1846G>A	PEX_2D6_*4	CCGCATCTCCCACCCCA	GGddA	ddA	6241,07	5582,65
*41_2988G>A	PEX_2D6_*41	GGCCCCGCCTGTACCCTT	TddC	ddC	5964,87	5660,68
*3_2549Adel	PEX-2D6_*3	CTGGGTCCCAGGTCATCC	TddG	ddG	6068,95	5764,75
*9_2615AAG>del	PEX-2D6_*9	CGTGGCAGCCACTCTCACCT	TddC	ddC	6591,29	6287,09
*6_1707Tdel	PEX-2D6_*6	GCCTCCTCGGTCACCC	AddC	ddC	5340,48	5027,27
*8_1758G>T	PEX-2D6_*8	TGCCCTTCTGCCATCACCCAC	AddG	ddC	7153,66	6800,42
*7_2935A>C	PEX-2D6_*7	GGCCTCCTGCTCATGATCCTAC	CddT	ddA	7199,68	6919,51
*10_100C>T	PEX-2D6_*10	GTGGCAGGGGGCCTGGTG	GGddT	ddA	5949,86	6599,27
*2_430C>T	PEX-2C9_*2	AGAGGAGCATTGAGGAC	CddG	ddT	5910,87	5596,67
*3_1075A>C	PEX-2C9_*3	CACGAGGTCCAGAGATAC	CddT	ddA	6094,99	5814,82
*2_681G>A	PEX-2C19_*2	TTAAGTAATTTGTTATGGGTTCC	CddG	ddT	7677,01	7362,81
*17-806C>T	PEX-2C19_*17	TGTCTTCTGTTCTCAAAG	CddA	ddT	6041,95	5743,76
*3_6986A>G	PEX-3A5_*3	AGAGCTCTTTTGTCTTTCA	GddT	ddA	6377,40	6057,20
*22_15389C>T	PEX-3A4_*22	GTGATGCAGCTGGCCCTAC	CddG	ddT	6512,66	6191,44

NOTA: dNTP: A - deoxiadenilato, C – deoxicidilato, G-deoxiguanilato, T-deoxitimidilato; ddNTP: ddA - di-deoxiadenilato, ddC - di-deoxicidilato, ddG - di-deoxiguanilato, ddT - di-deoxitimidilato. **FONTE:** O autor.

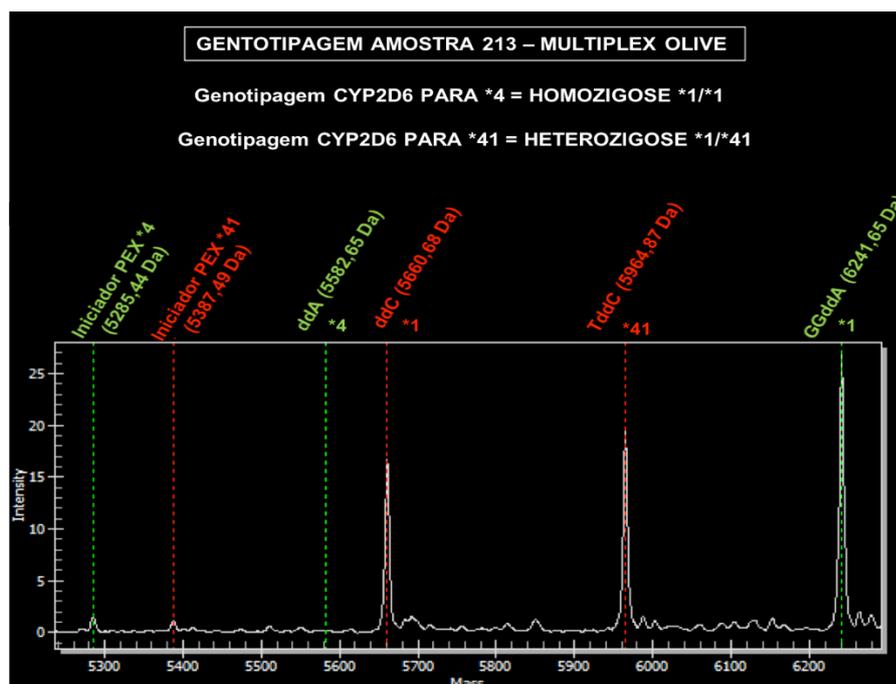
Uma vez seladas as placas com 384 poços, as mesmas foram centrifugadas por 5 min a 160rpm e em seguida colocadas em termociclador (Applied Biosystems). As temperaturas de anelamento e alongamento para cada ensaio hME dependiam do iniciador utilizado. O protocolo padrão para cada reação foi: 94°C por 2 min; 94°C por 10 seg, 50°C a 54°C por 15 seg, 65°C a 72°C por 15 seg, 55 ciclos; armazenada a 4°C.

Os produtos das reações de extensão PEX foram dessalinados com a resina SpectroCLEAN™ (Sequenom), uma resina trocadora de cátions, com o objetivo de remover qualquer cátion que pudesse interferir com a análises MALDI-TOF/MS. A resina foi colocada em uma placa perfurada com capacidade para 3 mg, após alguns minutos para secagem, a resina foi transferida para uma placa de 384 poços e 16 µL de H₂O livre de nucleases foi adicionada. Após selada, a placa ficou sob rotação por 20 min e em seguida centrifugada por mais 20min a 3000 rpm.

Terminada a centrifugação, 15 nL dos produtos de extensão foram dispensados pelo sistema robótico MassARRAY™ Nanodispenser (Sequenom) na plataforma de bioarranjo de 384 unidades SpectroCHIP® (Sequenom). O SpectroCHIP foi inserido no MassARRAY™ Analyzer e a massa de cada produto de extensão foi analisada, revelando o genótipo das amostras pelo software SpectroTYPER™ RT (Sequenom).

A Figura 6 exemplifica a genotipagem dos alelo *CYP2D6**4 e *41 no ensaio multiplex oliva, para uma única paciente. Na figura é apresentado o espectro de homozigose *1/*1 no teste para *4 e heterozigose *1/*41 no teste para *41.

FIGURA 6: Espectros de homozigose e heterozigose obtido por ensaio Pex do tipo Mass EXTEND® homogêneo (hME) para os Alelos *4 e *41 do Gene *CYP2D6*



NOTA: A imagem demonstra o espectro obtido no ensaio multiplex para os alelos *4 e *41 do gene *CYP2D6*. O iniciador PEX para o alelo *4 apresenta peso molecular de 5285,44 Da e para o alelo *41 pelo molecular de 5387,49 Da. A ausência de pico em 5582,65 Da indica ausência do alelo *4, sendo considerado homozigose para *1 (pico único em 6241,65 Da). A presença de dois picos, um em 5660,68Da e outro em 5964,87 Da indica presença de um alelo *1 e um alelo *41, respectivamente, considerado heterozigose *1/*41. Da: dalton. **FONTE:** O autor.

A determinação do número de cópias dos genes analisados e a deleção do gene *CYP2D6* (alelo *5) bem como a determinação dos alelos *17 e *29 do gene *CYP2D6*, foram realizados pelos ensaios de número de cópias (*TaqMan™ Copy*

Number Assay) e discriminação alélica (*TaqMan™ Drug Metabolism Genotyping Assay*), respectivamente, segundo a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) pela plataforma *TaqMan™* (*Applied Biosystems*). Os ensaios de PCR em tempo real pela plataforma *TaqMan™* foram realizados no aparelho *7900HT Fast Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*). Indivíduos com genotipagem ambígua foram confirmados pelo teste com o *AmpliChip P450* (*Roche Molecular Diagnostics*). Todas as reações realizadas por ensaios comerciais foram realizadas segundo protocolos dos fabricantes (APPLIEDBIOSYSTEMS, 2014; ROCHEDIAGNOSTICS, 2008).

4.3.2 Dosagem plasmática do tamoxifeno e seus metabólitos

Para a determinação dos níveis plasmáticos do tamoxifeno e seus metabólitos, apenas o subgrupo de pacientes que iniciaram o uso de tamoxifeno (conforme indicação clínica) tiveram o perfil de metabolização do medicamento avaliado. Alíquotas de plasma de sangue obtido com heparina (4mL) foram coletadas durante o primeiro ano de tratamento com tamoxifeno em 3 momentos: três, seis e dose meses após início do uso da medicação, em seguida as amostras foram congeladas a -80° C.

A determinação dos níveis plasmáticos do tamoxifeno e seus metabólitos em estado estacionário (12 semanas após o início do tratamento) foi determinada em amostras coletadas de pacientes tratadas com tamoxifeno na dose 20mg/dia (conforme padrão clínico da instituição). O tamoxifeno e seus metabólitos N-desmetiltamoxifeno (DM-Tam), (Z)-4-hidroxitamoxifeno (4-OH-Tam), (Z)-endoxifeno, N,N-didesmetiltamoxifeno (DDM-Tam) e (Z)-norendoxifeno foram avaliados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)(MURDTER; SCHROTH; BACCHUS-GERYBADZE; WINTER *et al.*, 2011).

Os isômeros *trans* (Z) foram selecionados uma vez que estes são os isômeros com atividade antiestrogênica ativa e, por essa razão, as análises por LC-MS foram realizadas gentilmente pelo Dr Thomas Murdter no Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituto de Farmacologia Clínica (IKP), Stuttgart (Alemanha). O tamoxifeno e seus metabólitos foram medidos por LC-MS no modo de monitoramento de múltiplas reações em um espectrômetro de massas triplo quádruplo 6460 (Agilent Technologies).

Para todas as análises plasmáticas as pacientes deveriam permanecer em jejum por 4 horas e não ingerir bebida alcoólica nas 48 horas anteriores à coleta. A coleta referente aos meses 3, 6 e 12 foram realizadas em um período de 5 a 16 horas após a administração do tamoxifeno.

4.4 SEGUIMENTO CLÍNICO E FARMACOTERAPÊUTICO

Todas as pacientes ao serem incluídas no estudo foram acompanhadas semestralmente pela equipe clínica do estudo e aquelas que fizeram uso do medicamento tamoxifeno foram também acompanhadas trimestralmente pelo Serviço de Farmácia Clínica da instituição.

Durante as consultas as pacientes foram avaliadas segundo rotina institucional e as pacientes em uso do tamoxifeno tiveram o perfil de segurança do medicamento (toxicidades e efeitos adversos) determinado por auto-reporte das pacientes. Durante tais avaliações relatos de eventos tromboembólicos, retinopatia, alterações vaginais e o aparecimento de outras neoplasias foram registrados, sendo as pacientes encaminhadas ao Serviço de Oncologia Clínica da instituição. Ainda, para tais pacientes, durante as visitas trimestrais, também foram realizados exames laboratoriais para dosagens de bilirrubinas totais, albumina e perfil lipídico, exames estes realizados como rotina laboratorial da instituição.

Como rotina institucional a dose prescrita de tamoxifeno é de 20mg/diários, sendo esta medicação dispensada pela farmácia ambulatorial local.

Para cada paciente, no momento da primeira visita clínica após confirmação do diagnóstico, foram preenchidos os questionários 1, 2 e 3 (apêndices 2, 3 e 4). O questionário 2 foi preenchido nesta visita até o item V. Nas visitas subsequentes foi preenchido o questionário 4 (apêndice 5).

Para o seguimento farmacoterapêutico as pacientes que iniciaram uso de tamoxifeno realizaram uma entrevista farmacêutica no momento da primeira dispensação do medicamento, rotina comum para todos pacientes em uso de medicamentos antineoplásicos orais dispensados na instituição. Durante tal entrevista o histórico medicamentoso do paciente foi obtido e as orientações gerais de uso e armazenamento foram informadas ao paciente. Nesta entrevista foi preenchido o item VI do questionário 2 (apêndice 3).

Para a análise de adesão ao tratamento com tamoxifeno a Escala de Adesão à Medicação de Morisky de 4 itens (MMAS-4) foi utilizada (apêndice 6) (MORISKY; GREEN; LEVINE, 1986). O instrumento desenvolvido por Morisky é uma ferramenta de coleta de dados de fácil aplicação e entendimento por parte dos pacientes sendo validado em pacientes com baixo nível de alfabetização.

O MMAS-4 contém quatro perguntas com respostas Sim (1 ponto) ou Não (0 ponto) e o questionário foi elaborado para obter uma pontuação global por paciente (MORISKY; GREEN; LEVINE, 1986). Os pacientes responderam o questionário nos mesmos momentos das coletas de sangue para avaliação plasmática do tamoxifeno: três, seis e doze meses após o início do tamoxifeno. Quatro farmacêuticos treinados realizaram as entrevistas com os pacientes.

Neste questionário, a atitude do paciente em relação ao uso de medicamentos é avaliada em quatro questões:

(1) Você alguma vez esquece de tomar o medicamento?

(2) Você, às vezes, é descuidado quanto ao horário de tomar o seu medicamento?

(3) Quando você se sente bem, alguma vez, você deixou de tomar seu medicamento?

(4) Quando você se sente mal com o medicamento, deixa de tomá-lo?

As pontuações dos itens foram somadas para definir três níveis de adesão: 0 (alta adesão), 1–2 (média adesão) e 3-4 (baixa adesão).

O MMAS-4 foi selecionado por ser o questionário de adesão mais rápido para administrar e pontuar e validado em uma série de doenças crônicas, incluindo câncer.

O questionário foi aplicado no momento da dispensação do medicamento. Nestas entrevistas foram coletadas as queixas e dificuldades da paciente em relação ao uso do medicamento. O uso de medicamentos concomitantes também foi questionado para investigação de potenciais interações medicamentosas incluindo a identificação de medicamentos inibidores da CYP2D6.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados na forma de estatística descritiva simples para as variáveis: tipo histológico, estadiamento, status do receptor hormonal, status HER2, Ki67, status de menopausa, terapia antineoplásica, medicamentos

concomitantes, indutores e inibidores da enzima CYP2D6, adesão ao tratamento, reações adversas, idade, etnia/raça, escolaridade, genótipo e frequência alélica das enzimas selecionadas, níveis plasmáticos do tamoxifeno e seus metabólitos e razão metabólica (RM). A razão metabólica é calculada pela razão da concentração do substrato enzimático pela concentração de seu produto direto. A RM de substratos enzimáticos reflete a atividade e o genótipo da enzima. Variáveis categóricas foram apresentadas em percentagens e variáveis contínuas explorando cálculo da média, mediana, desvio padrão e intervalo de confiança.

As variáveis etnia/raça, nível de instrução, reações adversas e medicação concomitante foram obtidas por auto-reporte das pacientes. As categorias utilizadas para etnia/raça seguiram a classificação utilizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: branco, preto, pardo, amarelo e indígena. O status de menopausa seguiu os critérios definidos pelo *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN, 2018).

As frequências alélicas observadas para variantes enzimáticas estudadas foram testadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) pelo teste do qui-quadrado com 2 graus de liberdade. A consistência interna para o questionário MMAS-4 foi testada pelo coeficiente alfa de Cronbach. Tanto as concentrações plasmáticas como as RMs do tamoxifeno e seus metabólitos foram apresentados como *boxplots* destacando mediana (linha horizontal dentro da caixa) e percentis 25 e 75 abrangendo a faixa interquartílica.

As características clínicas e sociodemográficas, os genótipos das enzimas avaliadas e o nível de adesão foram comparados pelos testes de qui-quadrado ou exato de Fisher. Os coeficientes de correlações de Pearson (dados normais) ou de Spearman (dados não normais) foram calculados entre a idade e os níveis plasmáticos e a RM de todos os compostos testados. Testes F e T (dados normais), Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (dados não normais), foram aplicados para determinar se as concentrações plasmáticas e RMs do tamoxifeno e seus metabólitos estavam associados com genótipos, comportamento de adesão e etnia.

A contribuição dos vários genótipos, perfil de adesão e outros fatores na variabilidade das concentrações plasmáticas do tamoxifeno, (Z)-endoxifeno, DM-Tam e (Z)-4-OH-Tam, e suas respectivas RMs, foi determinada por modelo linear (regressão linear múltipla). Para tal, transformações Box-Cox foram aplicadas para satisfazer a hipótese de distribuição normal. A normalidade dos dados transformados

foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, com correção de Lillefors, e Shapiro-Wilk. Com este propósito, os valores das concentrações plasmáticas foram log transformadas e RMs foram transformadas em raiz quadrada.

Para aplicação do modelo de regressão linear múltipla, além de distribuição normal, as variáveis precisavam respeitar os pré-requisitos listados a seguir:

- relação linear entre variável dependente e independente: determinado pela significância em regressão linear simples;
- ausência de auto-correlação entre os resíduos (resíduos independentes): teste de Durbin-Watson próximo a 2 (1,5 a 2,5);
- apresentar variância constante de erros experimentais (homocedasticidade): verificado graficamente. Se existir homocedasticidade espera-se que o diagrama (scatterplot) dos resíduos apresente formato retangular;
- distribuição normal dos valores dos resíduos,
- ausência de valores discrepantes: valor de desvio padrão de valores previstos e resíduos devem estar entre valores de -3 a +3;
- ausência de multicolinearidade (ausência de correlação entre as múltiplas variáveis independentes testadas no modelo): no diagnóstico de colinearidade do teste o valor de r deve ser inferior a 0,7, os valores de tolerância $>0,1$ e VIF (fator de inflação da variância) <10 .

A relevância dos genótipos das enzimas e o nível de adesão explicada pelo modelo foi definida através dos valores correspondentes dos coeficientes de determinação beta padronizados ajustados destas variáveis no modelo linear aplicado.

Para uma melhor estimativa do tamanho do efeito dos fenótipos da CYP2D6 e da adesão ao tratamento sobre os os níveis de (Z)-endoxifeno, calculou-se o risco relativo (RR) e respectivo intervalo de confiança de 95% (IC95%) aos 12 meses de tratamento das pacientes não atingirem a concentração de (Z)-endoxifeno necessária para 90% de inibição do RE (IC90). O IC90 esperado para o (Z)-endoxifeno é de 13nM (MURDTER; SCHROTH; BACCHUS-GERYBADZE; WINTER *et al.*, 2011).

Os seguintes programas de software foram utilizados para análises estatísticas: Microsoft Office Excel (v.16.11.1, Office 365) e SPSS (versão 24). Todos os testes estatísticos foram de 2 lados e significância foi definida como $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Das 404 pacientes triadas para o estudo, 363 foram pré-selecionadas e encaminhadas para genotipagem por ainda não termos o resultado imuno-histoquímico das pacientes. Das pacientes triadas cinco foram excluídas devido biópsias negativas para neoplasia mamária, sete não aceitaram participar da pesquisa e vinte e nove iniciaram tratamento farmacológico anti-câncer antes de iniciarmos os procedimentos do estudo. Das 363 pacientes pré-selecionadas 225 pacientes confirmaram por imuno-histoquímica positividade de expressão dos receptores hormonais e fizeram uso do medicamento tamoxifeno. Os dados demográficos e as características tumorais ao diagnóstico são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1: Análise dos Perfis Epidemiológicos e Clínico-Patológico das pacientes participantes incluídas no estudo. (continua)

Características	n=225
Etnia/raça, No (%)	
Branco	163 (72,4)
Preto	11 (4,9)
Pardo/mulato	45 (20,0)
Asiático/amarelo	2 (0,9)
Indígena	4 (1,8)
Escolaridade / Ensino (%)	
Sem instrução / básico incompleto	80 (35,6)
Básico completo / médio incompleto	59 (26,2)
Médio completo / superior incompleto	60 (26,7)
Superior completo	26 (11,6)
Idade ao diagnóstico, mediana (variação), anos	52 (24-89)
Estatus menopausal, No. (%)	
Pré-menopausa	149 (66,2)
Pós-menopausa	76 (33,8)
Performance Status, No. (%)	
0 ou 1	217 (96,5)
2, 3 ou 4	8 (3,6)
Estadiamento clínico, No. (%)	
0 (<i>in situ</i>)	3 (1,3)
IA/IB	65 (28,9)
IIA/IIB	106 (47,1)
IIIA/IIIB/IIIC	40 (17,8)
IV	11 (4,9)
Grau, No.(%)	
G1	24 (10,7)

G2	132 (58,7)
G3	21 (9,3)
Indeterminado	48 (21,3)
Histologia	
carcinoma ductal <i>in situ</i>	3 (1,3)
carcinoma infiltrante ductal	189 (84,0)
carcinoma infiltrante lobular	13 (5,8)
carcinoma infiltrante ducto-lobular	8 (3,6)
carcinoma infiltrante tubular	2 (0,9)
carcinoma infiltrante mucinoso	5 (2,2)
carcinoma infiltrante medular	0 (0,0)
carcinoma infiltrante papilar	4 (1,8)
outros	1 (0,4)
Receptor estrogênio/progesterona, No. (%)	
positivo	225 (100,0)
negativo	0 (0)
HER2, No. (%) [‡]	
positivo	24 (10,8)
negativo	199 (89,2)
Tripla Negativo, No. (%)	
sim	0 (0)
não	223 (100,0)
Ki67 [‡]	
≤ 14	88 (39,6)
> 14	134 (60,4)
Proposta de tratamento ao diagnóstico	
neoadjuvante	76 (33,8)
adjuvante	138 (61,3)
paliativo	11 (4,9)

NOTA: [‡]Três pacientes apresentaram resultados de imuno-histoquímica para HER2 (incluindo FISH) e de Ki67 inconclusivos. **FONTE:** O autor.

5.1 ARTIGO

Os resultados do estudo são apresentados no artigo a seguir para 192 das 225 pacientes. Para 33 pacientes as análises farmacocinéticas não foram realizadas devido extravio das amostras no aeroporto de Guarulhos.

O artigo foi publicado na revista *Clinical and Translational Science*, fator de impacto 4.689, ISSN impresso 1752-8062, DOI <https://doi.org/10.1111/cts.12707>. Publicação em 01/10/2019. O objetivo do artigo foi verificar qual variável teria mais impacto sobre os níveis plasmáticos de tamoxifeno e seus metabólitos ativos durante o primeiro ano de tratamento (perfil farmacogenético das enzimas metabolizadoras do tamoxifeno ou o comportamento de adesão ao tratamento farmacológico).



ARTICLE

The Influences of Adherence to Tamoxifen and *CYP2D6* Pharmacogenetics on Plasma Concentrations of the Active Metabolite (Z)-Endoxifen in Breast Cancer

Jeanine Marie Nardin^{1,2,3} , Werner Schroth^{4,5}, Thais Abreu Almeida⁶, Thomas Mürdter^{4,5}, Solane Picolotto⁷, Evelyn Castillo Lima Vendramini⁷ , Reiner Hoppe^{4,5}, Jenifer Primon Kogin² , Diandra Miqueleto² , Silvia Dark Robaskiewicz de Moraes², Matthias Schwab^{4,8,9,10}, Roberto Flavio Pecoits-Filho³ , Hiltrud Brauch^{4,5,9,10,†} and José Claudio Casali-da-Rocha^{3,11,*†}

Tamoxifen efficacy in breast cancer is suspected to depend on adherence and intact drug metabolism. We evaluated the role of adherence behavior and pharmacogenetics on the formation rate of (Z)-endoxifen. In 192 Brazilian patients, we assessed plasma levels of tamoxifen and its metabolites at 3, 6, and 12 months of treatment (liquid-chromatography tandem mass spectrometry), adherence behavior (Morisky, Green, and Levine medication adherence scale), and cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) and other pharmacogene polymorphisms (matrix-assisted laser-desorption-ionization time of flight) mass spectrometry, real-time polymerase chain reaction). Adherence explained 47% of the variability of tamoxifen plasma concentrations ($P < 0.001$). Although *CYP2D6* alone explained 26.4%, the combination with adherence explained 40% of (Z)-endoxifen variability at 12 months ($P < 0.001$). The influence of low adherence to not achieving relevant (Z)-endoxifen levels was highest in patients with noncompromised *CYP2D6* function (relative risk 3.65; 95% confidence interval 1.48–8.99). As a proof-of-concept, we demonstrated that (Z)-endoxifen levels are influenced both by patient adherence to tamoxifen and *CYP2D6*, which is particularly relevant for patients with full *CYP2D6* function.

Study Highlights

WHAT IS THE CURRENT KNOWLEDGE ON THE TOPIC?

Poor patient adherence to tamoxifen is associated with reduced clinical efficacy. cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) is a key factor of tamoxifen metabolism, however, genetic variants only partially explain the variability of plasma concentrations of the active metabolite (Z)-endoxifen.

WHAT QUESTION DID THIS STUDY ADDRESS?

We studied the influence of patient adherence behavior and *CYP2D6* phenotype (and other pharmacogenes) on plasma metabolite concentrations. We investigated whether (Z)-endoxifen concentrations depended on either factor alone or in combination.

WHAT DOES THIS STUDY ADD TO OUR KNOWLEDGE?

Adherence and *CYP2D6* status are independent determinants of tamoxifen and (Z)-endoxifen plasma levels. Their combined influence is particularly relevant for patients with full *CYP2D6* function.

HOW MIGHT THIS CHANGE CLINICAL PHARMACOLOGY OR TRANSLATIONAL SCIENCE?

The dual monitoring of tamoxifen (surrogate for adherence) and (Z)-endoxifen (surrogate for clinical response) plasma levels could be a strategy to improve tamoxifen outcome in the future.

One-third of patients with early breast cancer with estrogen receptor (ER)-positive tumors treated with the selective estrogen receptor modulator tamoxifen either relapse or die from the disease in the following decade.^{1,2} Improvement of tamoxifen efficacy requires a better knowledge of factors determining outcome of which the medication-

taking behavior (i.e., adherence), is a strong suspect.^{3,4} Discontinuation and nonadherence to tamoxifen are frequent and result in increased mortality.^{5–9} A large study using automated pharmacy records showed that 31% of patients discontinued therapy, and among those who continued, only 70% adhered at 4.5 years with only 50% being

†These authors contributed equally to this work.

¹Clinical Research Department, Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Brazil; ²School of Health Science, UniBrasil, Curitiba, Brazil; ³Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil; ⁴Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany; ⁵University of Tuebingen, Tuebingen, Germany; ⁶Clinical Oncology Department, Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Brazil; ⁷Pharmacy Department, Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Brazil; ⁸Departments of Clinical Pharmacology, Pharmacy and Biochemistry, University of Tuebingen, Tuebingen, Germany; ⁹German Cancer Consortium (DKTK), German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany; ¹⁰iFIT Cluster of Excellence, University of Tuebingen, Tuebingen, Germany; ¹¹Department of Oncogenetics, Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Brazil. *Correspondence: José Claudio Casali-da-Rocha (casalidarocha@gmail.com)

Received: August 19, 2019; accepted: August 20, 2019. doi:10.1111/cts.12707

fully adherent.¹⁰ Nonadherence gradually evolves over time from 10% in the first year to > 50% in the fifth year^{6,8,10,11} being most pronounced in young women being below 40 years of age and women older than 75 years.¹⁰ Ten-year survival rates significantly differed between patients who continued treatment (82%) compared with patients who did not adhere (78%).¹¹ Recently, the BIG I-98 trial reported a considerably reduced disease-free survival (hazard ratio 1.45; 95% confidence interval (CI) 1.09–1.93) for patients who ceased protocol-assigned endocrine treatment.¹²

To assess drug adherence, commonly used prescription-refill patterns infer that the medication is taken exactly as prescribed, yet, partial adherence or actual use of the medication cannot be controlled.¹³ In contrast, an objective surrogate of tamoxifen adherence is the monitoring of drug concentrations, including the parent drug and its active metabolite (Z)-endoxifen. (Z)-endoxifen can be easily measured in the patients' plasma, however, individual concentrations depend on pharmacogene polymorphisms, particularly those of the liver enzyme cytochrome P450 2D6 (CYP2D6).¹⁴ Polymorphisms are responsible for different phenotypes, which aside from individuals with normal CYP2D6 function (extensive metabolizer (EM)), comprise individuals with absent (poor metabolizer (PM)), reduced (intermediate metabolizer (IM)), and increased (ultrarapid metabolizer (UM)) CYP2D6 activity. Among Europeans, the frequency of PM and IM individuals is 9% and 40%, respectively. In Brazil, the observed PM frequency is 2.5% with an increased 4% frequency in patients with ER-positive breast cancer.^{15,16}

For patients receiving tamoxifen therapy, CYP2D6 genotyping allows the prediction of (Z)-endoxifen plasma concentrations.^{17–19} A putative threshold of 5.9 ng/mL has been proposed in the Women's Healthy Eating and Living (WHEL) study suggesting that a minimal concentration threshold is required above which (Z)-endoxifen is more effective against the recurrence of breast cancer and below which patients are at higher risk for recurrence,²⁰ likely due to incomplete inhibition of ER-dependent growth signaling.²¹ Although several outcome studies demonstrated the importance of CYP2D6 genotyping for the prediction of the risk-to-relapse in adjuvant and metastatic settings,^{22–25} other studies did not confirm this association,^{26–29} the reason why current clinical guidelines do not support the use of CYP2D6 genotypes for predicting tamoxifen response.³⁰ Therefore, it is important to identify confounders that may mask the tamoxifen CYP2D6 association, with tamoxifen adherence being a prime candidate.¹³ The combined analysis of adherence behavior and tamoxifen metabolism may shed new light on this important issue, particularly because first evidence has been reported of an increased effect of CYP2D6 genotype on patient outcome when adjusted for adherence to tamoxifen therapy.³¹ Here, we present a prospective study of mainly patients with early breast cancer from Brazil, in which interview-informed tamoxifen adherence together with CYP2D6 metabolizer status have been measured in order to evaluate their combined contribution to the lowering of the patients' plasma (Z)-endoxifen concentrations to potentially subtherapeutic levels. The study demonstrates how patients with breast cancer of underserved patient populations can contribute

valuable pharmacokinetic and pharmacogenetic information in the field of breast cancer biomarker research.

MATERIALS AND METHODS

Patients and study design

Patients were consecutively recruited at the Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Southern Brazil, a national reference center for oncology treatment. Between April 2014 and June 2017, 192 patients with ER-positive breast cancer treated with tamoxifen were included to investigate the relevance of drug adherence on the plasma levels of active tamoxifen metabolites. According to recommendations for tumor marker studies (REMARK),³² inclusion criteria were defined as women aged 18 years or older who were diagnosed with any stage, histologic, or molecular subtype of ER-positive breast cancer, and who started daily treatment with 20 mg tamoxifen for an intended 5 years of therapy. Exclusion criteria were age beyond 82 years and patients unable to complete the study schedule and questionnaire. Patients were followed during the first year of treatment at months 3, 6, and 12 for the assessment of adherence to tamoxifen intake based on interview, measurement of plasma levels of tamoxifen and its metabolites, and assessment of CYP2D6 metabolizer status (and other relevant drug metabolizing enzymes (DMEs)) based on genotypes. Ethical approval was obtained from the Brazilian National Commission of Ethical Research. All patients provided written informed consent. Study size calculation (99.9% power) revealed a minimum of 42 patients required to detect an association of (Z)-endoxifen variability with CYP2D6 polymorphism, based on the prevalence of IM and PM patients of 40% in Brazil³³ and an expected effect size of $R^2 = 0.4$.¹⁷

Assessment of adherence to tamoxifen therapy

Tamoxifen adherence was assessed using the Morisky, Green, and Levine Medication Adherence Scale questionnaire, a structured four-item self-reported adherence measure validated for a wide range of diseases, including cancer.³⁴ This questionnaire has been successfully used in patients with low literacy and its feasibility was previously confirmed in our hospital for inpatients and outpatients with cancer.³⁵ Four trained pharmacists performed the questionnaire-based interviews at 3, 6, and 12 months after starting tamoxifen therapy and included the following questions: (i) Do you ever forget to take your medicines?; (ii) Are you careless at times about taking your medicines?; (iii) When you feel better do you sometimes stop taking your medicine?; and (iv) Sometimes, if you feel worse when you take the medicine, do you stop taking it? For each patient and visit "yes" (1 point) or "no" (0 point) answers were documented and the four-item scores summed up to define three adherence levels: high (0), medium (1–2), and low adherence (3–4). Information on concomitant medication and self-reported adverse events during tamoxifen treatment were recorded during all visits.

Genotyping and quantification of tamoxifen and its active metabolites from plasma

Genomic DNA obtained from peripheral blood mononuclear cells was genotyped for CYP2D6 polymorphisms as

Table 1 Adherence behavior to tamoxifen treatment (20 mg daily) of Brazilian patients with breast cancer in relation to their demographic and clinical characteristics

Characteristic	Adherence at 3 months (n = 163)			Adherence at 6 months (n = 173)			Adherence at 12 months (n = 170)				
	Overall distribution (n = 192)	High, n (%)	Medium/Low, n (%)	OR	95% CI	P value	High, n (%)	Medium/Low, n (%)	OR	95% CI	P value
Ethnicity, ^a n (%)											
White	139 (72.4)	89 (74.8)	30 (25.2)	0.804 (0.37–1.73)		0.689	98 (79.7)	25 (20.3)	2.019 (0.97–4.20)		0.078
Black	11 (5.7)	31 (70.5)	13 (29.5)				33 (66.0)	17 (34.0)			
Pardo	37 (19.3)										
Asian/Indian	5 (2.6)										
Educational level, ^b n (%)											
None or incomplete basic	68 (35.4)	46 (76.7)	14 (23.3)	0.777 (0.37–1.62)		0.582	48 (77.4)	14 (22.6)	1.157 (0.56–2.41)		0.853
Basic	50 (26.0)	74 (71.8)	29 (28.2)				83 (74.8)	28 (25.2)			
Upper secondary	53 (27.6)										
University (Bachelor/Master/Doctoral)	21 (10.9)										
Age at diagnosis, median (range), years	51.5 (24–82)	54 (33–82)	47 (28–76)			< 0.001	54 (24–82)	49 (32–77)			0.007
< 65	145 (75.5)	87 (69.0)	39 (31.0)	0.270 (0.09–0.82)		0.018	94 (71.8)	37 (28.2)	2.913 (1.03–7.98)		0.038
65	47 (24.5)	33 (89.2)	4 (10.8)				37 (88.1)	5 (11.9)			
Menopausal status, n (%)											
Premenopausal	127 (66.1)	74 (66.7)	37 (33.3)	0.261 (0.10–0.67)		0.004	81 (70.4)	34 (29.6)	2.623 (1.13–6.12)		0.025
Postmenopausal	65 (33.9)	46 (88.5)	6 (11.5)				50 (86.2)	8 (13.8)			
ECOG performance status, n (%)											
0–1	187 (97.4)	116 (73.0)	43 (27.0)	1.371 (1.25–1.51)		0.574	126 (75.0)	42 (25.0)	1.333 (1.22–1.46)		0.337
2–4	5 (2.6)	4 (100.0)	0 (0.0)				5 (100.0)	0 (0.0)			
Clinical stage at diagnosis, ^c n (%)											
0 (in situ)	2 (1.0)	93 (72.1)	36 (27.9)	0.670 (0.27–1.67)		0.513	104 (75.4)	34 (24.6)	1.103 (0.46–2.66)		1.000
IA/IB	56 (29.2)										
IIA/IIIB	92 (47.9)										
IIIA/IIIB/IIIC	33 (17.2)	27 (79.4)	7 (20.6)				27 (77.1)	8 (22.9)			
IV	9 (4.7)										
Concomitant medications, ^d n (%)											
< 3 medications	122 (63.6)	92 (71.3)	37 (28.7)	1.877 (0.72–4.91)		0.274	107 (77.0)	32 (23.0)	1.383 (0.60–3.22)		0.504
3 or more medication	70 (36.5)	28 (82.4)	6 (17.6)				24 (70.6)	10 (29.4)			
Self-reported adverse events											
Yes	155 (80.7)	60 (69.8)	26 (30.2)	0.654 (0.32–1.33)		0.287	66 (70.2)	28 (29.8)	1.970 (0.95–4.08)		0.076
No	37 (19.3)	60 (77.9)	17 (22.1)				65 (82.3)	14 (17.7)			

CI, confidence interval; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; OR, odds ratio.

P: significance value for Fisher's exact test for qualitative variables and Mann-Whitney test for quantitative variable (age).

^aBlack, Pardo, and Asian/Indian were grouped to be tested against white. In Brazil, Pardo is an ethnic/skin color category used by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) in the Brazilian censuses. The term "pardo" is commonly used to refer to Brazilians of mixed ethnic ancestries. Pardo Brazilians represent a wide range of skin colors and backgrounds. They are typically a mixture of white Brazilian, Afro-Brazilian, and Native Brazilian. ^bBasic, upper secondary and university levels were grouped to be tested against no instruction. ^c(in situ), IA/IB and IIA/IIIB were grouped to be tested against IIIA/IIIB/IIIC and IV. ^dConcomitant medication in this analysis was assessed to evaluate the impact of polypharmacy in adherence behavior. The main prescribed pharmacologic classes were antihypertensive drugs (29.2%, 29.4%, and 26.3% for 3, 6, and 12 months, respectively) and nonopioid analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (13.2%, 16.0%, and 22.0% for 3, 6, and 12 months, respectively). Strong cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) inhibitors were near 1.0% of all concomitant medications for all time points (0.5%, 0.9%, and 1.2% for 3, 6, and 12 months, respectively).

previously described.²⁴ A CYP2D6 enzyme activity score (AS) was assigned to genotypes (diplotypes) based on allele scores of 0 (PM), 0.5 (IM), 1 (EM), and 2 (UM)^{36,37} and CYP2D6 phenotypes were deduced from AS: PM (0), IM (0.5 to 1.0), EM (1.5 to 2.0), and UM (3.0). Other DME gene polymorphisms included CYP2C9*2 and *3, CYP2C19*2 and *17, and CYP3A4*22 and CYP3A5*3 (**Supplemental Material**).

Heparinized plasma samples were obtained at months 3, 6, and 12 after the start of tamoxifen therapy. Plasma levels of tamoxifen and the inactive major metabolite DM-Tam as well as active metabolites (Z)-endoxifen and (Z)-4-OH-Tam were measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry as previously described.¹⁷

Statistical analysis

DME genotype frequencies were tested for Hardy–Weinberg Equilibrium. Parametric and nonparametric tests were applied to determine whether tamoxifen and its metabolite concentrations as well as metabolic ratios (MRs) differ between DME genotypes and adherence behavior. Multiple linear regression modeling was applied to evaluate the contribution of factors to the variability of plasma concentrations of tamoxifen, (Z)-endoxifen, DM-Tam, and (Z)-4-OH-Tam, as well as the respective MRs. Relative risk (RR) and 95% CIs were calculated at the 12-month time point to evaluate the risk of patients not achieving a previously proposed clinical threshold of 5.9 ng/mL (15.8 nM) (Z)-endoxifen.²⁰ All *P* values were two-sided, and values < 0.05 were considered statistically significant (details provided in **Supplemental Material**).

RESULTS

Patient adherence to treatment

Demographic and clinical characteristics together with adherence assessment at specific time points are given in **Table 1** and **Table S1**. Adherence was assessed for 163 patients at month 3 (85%), 173 patients at month 6 (90%), and 170 patients at month 12 (89%). Median age at diagnosis was 51.5 years (range 24–82 years); 127

patients (66%) were premenopausal. At 3 and 6 months, 74–76% of patients showed high adherence rates to tamoxifen treatment, which dropped to 63% at 12 months (**Figure 1a**). Low adherence was not observed during the first 3 months but increased to 10.6% at 12 months (**Figure 1a**; *P* < 0.05). High adherence at 12 months was more prevalent in patients without reported adverse events compared with those who reported adverse events (**Figure 1b**; *P* < 0.05). With the exception of age at diagnosis, menopausal status, and self-reported adverse events at 12 months, patient and tumor characteristics did not differ between adherence subgroups across time points (**Table 1**). Adverse events at 3, 6, and 12 months were reported for 53%, 54%, and 66% of patients, respectively (**Table 1**), with hot flashes being most frequent (62%, 65%, and 68%, respectively). Others included edema of the inferior members (17%, 25%, and 20%), fatigue (14%, 25%, and 30%), and nausea/vomiting (15%, 12%, and 12%) at 3, 6, and 12 months, respectively.

Genotype frequencies and enzyme AS

Genotypes met Hardy–Weinberg Equilibrium with the exception of CYP2D6*29 (**Table S2**). Although allele frequencies differed significantly between ethnic groups (*P* < 0.001; **Table S2**), ethnicity was not a prognostic factor for DME phenotypes or plasma concentration of tamoxifen and its major metabolites. DME phenotypes/AS predicted from 17 polymorphic loci tested in the 192 patients are summarized in **Figure S1**.

Association between treatment adherence and plasma concentrations of tamoxifen and its metabolites

At 3 months of treatment, patients with good adherence had 26% higher tamoxifen concentrations than patients with medium adherence (318 ± 97 nM vs. 236 ± 115 nM; *P* < .001; **Figure 2a**). Multiple linear regression analysis showed that 16–21% of the variability of tamoxifen levels at months 3 and 6 were explained by adherence to treatment and age at diagnosis (*P* < 0.001; **Table 2**). At

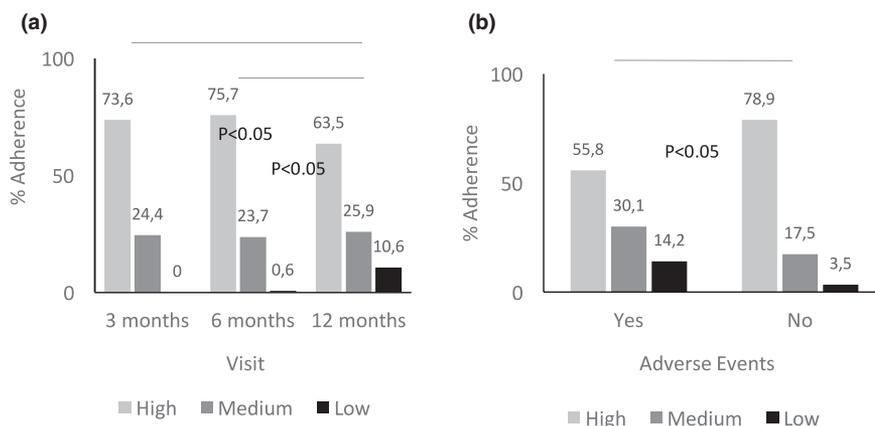


Figure 1 Adherence levels at consecutive time points after starting tamoxifen therapy of 20 mg daily. (a) 3 months (*n* = 163); 6 months (*n* = 173); and 12 months (*n* = 170). (b) 12 months, stratified by the occurrence of self-reported adverse events: presence of adverse events (Yes; *N* = 113); absence of adverse events (No; *N* = 57). Categories high (light grey), medium (dark grey), and low (black) are given as % for each group; *P* values refer to contingency Chi-square tests of a difference between visit **a** or grouping by adverse events **b**.

12 months, tamoxifen plasma levels strongly correlated with adherence ($r = 0.70$; $P < 0.001$) with tamoxifen levels being highest in patients with high adherence (389 ± 99 nM) compared with those with low or medium adherence (157 ± 67 nM and 258 ± 61 nM; $P < 0.001$; **Figure 2a**). In multivariate analyses, adherence was confirmed as the sole determinant that explained 47% of tamoxifen plasma concentration variability ($P < 0.001$; **Table 2**).

Similar associations with adherence were obtained for tamoxifen metabolite (Z)-endoxifen (**Figure 2b**). In subgroup analysis of patients with functional CYP2D6 (EM/EM) treatment adherence was significantly correlated with tamoxifen metabolites at all three time points (**Figure 2c**, data shown for months 3 and 12).

Association between genotypes of pharmacogenes and plasma concentrations of tamoxifen and its metabolites

Plasma concentrations of all tamoxifen metabolites were affected by CYP2D6 phenotype with a strongest effect for (Z)-endoxifen (**Table S3**). CYP2D6 AS demonstrated gene-dose effects on both (Z)-endoxifen and MR of *N*-desmethyltamoxifen (DM-Tam)/(Z)-endoxifen confirming the importance of CYP2D6 for the bioactivation of tamoxifen to (Z)-endoxifen via DM-Tam (**Figure S2**; $P < 0.001$). CYP2D6 deficient PM patients (PM/PM) had 4.5 to 5.5 times lower (Z)-endoxifen concentrations than EM patients with functional CYP2D6 (EM/EM). The mean concentrations of PM compared with EM patients at 3, 6, and 12 months were 6.5 ± 2.7 nM vs. 29.6 ± 12.9 nM; 7.2 ± 3.3 nM vs. 30.3 ± 14.5 nM; and

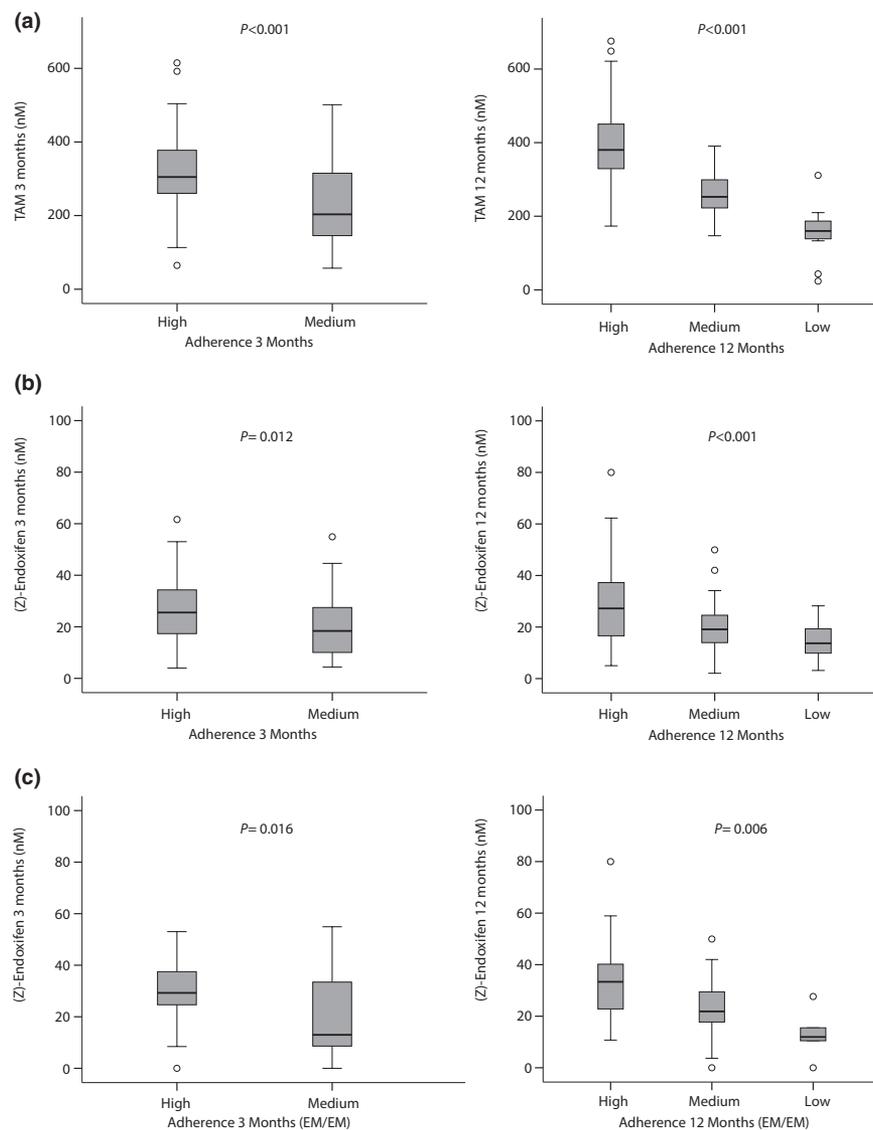


Figure 2 Influence of treatment adherence on tamoxifen and (Z)-endoxifen plasma concentration at 3 months ($n = 156$ patients) and 12 months ($n = 139$ patients). Plasma concentrations are presented as boxplots with boxes representing medians, 25% and 75% percentiles, and whiskers defined by the 5th and 95th percentiles and extreme values outside the whiskers. (a) TAM: Tamoxifen (parent drug). (b) (Z)-endoxifen. (c) (Z)-endoxifen for the subgroup of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Extensive metabolizer (EM/EM) patients at 3 months ($n = 67$) and 12 months ($n = 55$). P values refer to test for different plasma concentrations between adherence categories. Data at 6 months not shown.

Table 2 Summary of multiple linear regression models for tamoxifen and selected metabolites

Metabolite/time point	r ²	F	P value ^a	Parameters in the model
Tam 3 months	0.212	19.750	< 0.001	Medium adherence; age at diagnosis
Tam 6 months	0.161	9.520	< 0.001	Low and medium adherence; age at diagnosis
Tam 12 months	0.471	39.130	< 0.001	Low and medium adherence
DM-Tam 3 months	0.412	8.995	< 0.001	CYP2D6 PM/IM, IM/IM, EM/PM, EM/IM; medium adherence; age at diagnosis; Asian/Indian ethnicity
DM-Tam 6 months	0.217	4.384	< 0.001	CYP2D6 PM/PM, EM/PM; low and medium adherence; age at diagnosis
DM-Tam 12 months	0.427	10.451	< 0.001	CYP2D6 PM/IM, EM/PM, EM/IM; low and medium adherence; age at diagnosis
Z-Endo 3 months	0.345	7.370	< 0.001	CYP2D6 PM/PM, PM/IM, EM/PM; medium adherence; Asian/Indian ethnicity
Z-Endo 6 months	0.322	8.421	< 0.001	CYP2D6 PM/PM, PM/IM, EM/PM, IM/IM; medium adherence
Z-Endo 12 months	0.403	10.877	< 0.001	CYP2D6 PM/PM, PM/IM, EM/PM, IM/IM; low and medium adherence
Metabolic ratio				
DM-Tam/Z-Endo 3 months	0.556	30.002	< 0.001	CYP2D6 PM/IM, IM/IM, EM/PM, EM/IM
DM-Tam/Z-Endo 6 months	0.510	20.195	< 0.001	CYP2D6 PM/IM, IM/IM, EM/PM, EM/IM
DM-Tam/Z-Endo 12 months	0.575	15.540	< 0.001	CYP2D6 PM/IM, EM/PM, EM/IM; black ethnicity

Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) diplotypes PM/PM, two null alleles; DM-Tam, N-desmethyltamoxifen; EM/IM, one normal and one reduced activity allele; EM/PM, one normal and one null activity allele; EM/UM, patient with gene duplications of alleles with normal activity; F, F-test (ANOVA) for the model; IM/IM, two reduced activity alleles; PM/IM, one null activity and one reduced activity allele; r², model's coefficient of determination; Tam, tamoxifen; Z-Endo, (Z)-endoxifen.

^aSignificance value of F-test (analysis of variance) for the proposed model.

5.4 ± 1.1 nM vs. 30.3 ± 14.5 nM. In multivariate analyses, CYP2D6 phenotype was a significant predictor of tamoxifen metabolites and MRs across all time points (Table 2).

Due to the local prescription practice there were few patients with concurrent comedication of strong CYP2D6 inhibitors. Although three of the four patients taking a strong CYP2D6 inhibitor (fluoxetine) showed low levels of (Z)-endoxifen (6–15 nM), CYP2D6 inhibitor use was not significantly associated with tamoxifen metabolite concentrations. Among other covariates, age at diagnosis was positively associated with increased tamoxifen and DM-TAM concentrations, whereas DMEs other than CYP2D6 had little influence (Table S3).

Combined analysis of factors influencing (Z)-endoxifen concentrations

Adherence and CYP2D6 phenotype were jointly associated with (Z)-endoxifen concentrations across all time points (Table 2). The additive effect of adherence and CYP2D6 phenotype was most evident at 12 months. Although CYP2D6 as a single factor explained 26.4% of (Z)-endoxifen variability (P < 0.001), the explained variability increased to 40% when adherence was included in multivariate analysis (P < 0.001; Table 2). We next evaluated whether adherence or CYP2D6 polymorphisms had a stronger effect on (Z)-endoxifen concentrations based on standardized beta coefficients (Table 3). Across all time points, severe

Table 3 Evaluation of contributing variables based on linear regression coefficients for the prediction of (Z)-endoxifen plasma variability

Variable	3 Months		6 Months		12 Months			
	St beta coef. ^a	P value ^b	Variable	St beta coef. ^a	P value ^b	Variable	St beta coef. ^a	P value ^b
CYP2D6 PM/IM	-0.353	< 0.001	CYP2D6 PM/IM	-0.378	< 0.001	CYP2D6 PM/PM	-0.374	< 0.001
CYP2D6 PM/PM	-0.312	< 0.001	CYP2D6 PM/PM	-0.307	< 0.001	CYP2D6 PM/IM	-0.342	< 0.001
CYP2D6 EM/PM	-0.249	0.001	Adherence-medium	-0.266	< 0.001	Adherence-low	-0.337	< 0.001
Adherence-medium	-0.189	0.008	CYP2D6 EM/PM	-0.203	0.010	CYP2D6 EM/PM	-0.208	0.007
CYP2D6 IM/IM	-0.119	0.103	CYP2D6 IM/IM	-0.173	0.016	Adherence-medium	-0.206	0.004
CYP2D6 EM/IM	-0.146	0.055	CYP2D6 EM/IM	-0.134	0.083	CYP2D6 IM/IM	-0.136	0.050
Black	-0.092	0.206	Adherence-low	-0.110	0.114	CYP2D6 EM/IM	-0.137	0.069
Brown/mixed	-0.052	0.456	CYP2D6 EM/UM	-0.010	0.887	CYP2D6 EM/UM	0.140	0.051
Asian/Indian	0.144	0.042						
CYP2D6 EM/UM	0.102	0.156						

Black, Brown/Mixed, Asian/Indian refers to the non-European ethnicities included in the study cohort; cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) diplotypes EM/IM, one normal and one reduced activity allele; EM/PM, one normal and one null activity allele; EM/UM, patient with gene duplications of alleles with normal activity; IM/IM, two reduced activity alleles; PM/IM, one null activity and one reduced activity allele; PM/PM, two null alleles; St, standard.

^aVariables are listed according to their relevance in the model according to standardized beta coefficients. ^bOnly variables with P < 0.05 (t-test) are relevant in the model.

CYP2D6 impairment ($AS \leq 0.5$; PM/PM and PM/IM) was the strongest determinant of (Z)-endoxifen variability. The second strongest effect resulted from low or medium treatment adherence at 6 and 12 months with an effect size equal or greater to that resulting from a CYP2D6 $AS > 0.5$ (IM and EM; **Table 3**). As a putative surrogate predictor of clinical response, we used plasma concentrations of (Z) endoxifen and evaluated the relevance of adherence vs. CYP2D6 phenotype based on the RR of not achieving the threshold plasma concentration of 5.9 ng/mL (Z)-endoxifen (**Figure 3**). The risk to not achieve the threshold was highest in patients with CYP2D6 PM phenotype (RR 4.1; 95% CI 3.04–5.50), followed by patients with either CYP2D6 IM phenotype (RR 2.54; 95% CI 1.41–4.60) or low treatment adherence (RR 2.44; 95% CI 1.40–4.25). In subgroup analyses in patients with noncompromised CYP2D6 function (EM phenotype), low adherence showed to be a strong risk factor of not achieving clinical threshold concentrations (RR 3.65; 95% CI 1.48–8.99). This association was less pronounced in patients with reduced CYP2D6 activity (IM phenotype; RR 2.19; 95% CI 1.21–3.97).

DISCUSSION

We provide first evidence that the ability to achieve clinically relevant (Z)-endoxifen plasma concentrations during breast cancer tamoxifen treatment is cooperatively influenced by treatment adherence behavior, CYP2D6 genomic background, and pharmacokinetic capacity. Conjointly, this could improve the prediction of active tamoxifen metabolite levels (Z-endoxifen) and possibly clinical efficacy,^{17,20,38} a high priority goal in personalized endocrine treatment. Previous attempts to predict the variability of (Z)-endoxifen levels relied on pharmacokinetic and pharmacogenomic knowledge,^{17,38,39} which has been implemented into therapeutic recommendations based on CYP2D6 genotyping.¹⁴ Although a recent drug monitoring study showed that tamoxifen metabolites may be predictive of side effects, such as nausea and vaginal dryness,⁴⁰ clinical tamoxifen outcome studies as of yet provided controversial results possibly due to the influence of unidentified confounders.^{22–24,26–28} Because it is well known that women stop taking their medication before completing the standard 5-year regimen, we investigated patients' adherence behavior during the first year of tamoxifen treatment in relation to their metabolic capacity for achieving relevant (Z)-endoxifen concentrations. Our observed 12-month adherence rate is considerably lower than the 1-year tamoxifen adherence reported by Dezentje *et al.*⁴¹ (93%) based on prescription refill data. The latter assumed that prescription-refilling patterns correspond to patient medication-taking behavior and that the medication is taken exactly as prescribed independent of patients' beliefs or concerns about treatment. A 90% 1-year adherence rate was also reported by Makubate *et al.*⁴² in a retrospective cohort of endocrine-treated breast cancers that declined to 51% in the fifth year, and that demonstrated an association of low adherence (< 80%) with poor survival. Our prospective study used the Morisky, Green, and Levine Medication Adherence Scale questionnaire in a pharmacist-guided interview to assess adherence rates,

a tool previously used in an oncology setting in Brazil^{35,43} and which is considered reliable based on the validation of self-report questionnaires in relation to medication-monitoring devices.⁴⁴ Notably, Morisky's selected adherence scale is an easy to perform and fast questionnaire suitable for our prospective setting with 35% of patients with low-literacy.^{13,45} The questionnaire provided us with the benefit to retrieve valuable tamoxifen adherence behavior and pharmacokinetic information from a health disparity cancer population that otherwise would not be accessible. The high observed tamoxifen nonadherence rate within the first year may reflect the socioeconomic condition of this population and the high percentage of young women (two-thirds) known to be at increased risk to stop medication.¹⁰

We confirmed that CYP2D6 phenotype is a strong determinant of plasma (Z)-endoxifen levels in that increasing CYP2D6 allele activity correlated with increasing plasma metabolite concentrations. Our data are sound as the prevalence of reduced-function and null-function alleles compares with those reported from Brazil³³ and are in line with population admixture of Europeans, Native Americans, Africans, and Asians, with our institution serving as a national reference center for oncology treatment. (Z)-endoxifen plasma levels were in the range of those reported by others,^{15,17} and, as expected, CYP2D6 polymorphism only partially predicted its variability.¹⁹ Potential confounders, such as DME polymorphisms or strong CYP2D6 inhibitors, do not play a significant role as the former showed no effect and the latter were infrequently used by our patients given the low prescription rates at our hospital.

Of note, the observed effect of adherence behavior on active metabolite levels depended on CYP2D6 functionality. Although PM status was still the most important predictor of reduced (Z)-endoxifen concentrations, and the risk to not achieve sufficient concentration due to low-adherence was moderate across all patients (RR 2.44; 95% CI 1.40–4.25), low-adherence was a strong predictor in EM patients (RR 3.65; 95% CI 1.48–8.99). The latter clearly indicates an independent influence of low-adherence resulting in suboptimal concentrations of active tamoxifen metabolites. An immediate consequence from this finding is that EM and IM patients who are now in their ensuing year(s) of the 5-year treatment must be encouraged to adhere to tamoxifen, as the expected benefit will depend on their own authority. Known barriers to prevent tamoxifen adherence are manifold and include low recurrence risk perception, side effects, age extremes, medication cost, ethnicity, educational level, lack of social support, and suboptimal patient physician communication.^{3,4,13}

Importantly, we confirmed the relevance of age on tamoxifen adherence that patients at 65 years of age or older showed better adherence to tamoxifen than younger patients. Moreover, multivariate modeling identified age as an independent predictor of parent drug levels (i.e., tamoxifen). Previous findings by others showed that plasma concentrations of tamoxifen and its metabolites increase with age,⁴⁶ which, according to our findings, may be explained at least in part by patient adherence behavior. Given the strong predictive value of adherence for the variability of tamoxifen plasma concentrations we propose that drug monitoring is a powerful surrogate to assess tamoxifen adherence for which we identified a threshold concentration of 157 nM (± 67 nM) to stratify patients into low vs.

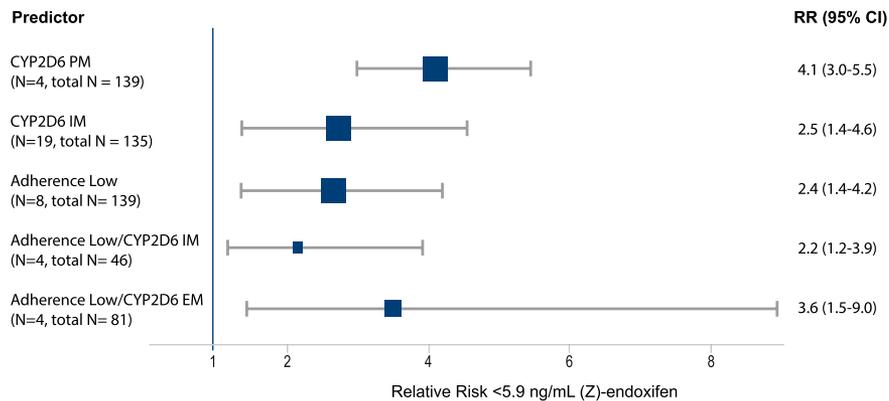


Figure 3 Forest plot for the relative risk of not achieving the clinical threshold of a (Z)-endoxifen concentration ≥ 5.9 ng/mL (15.8 nM) at 12 months. RR estimates are given as squared symbols with size weighted by the number of included patients. 95% CI, 95% confidence interval; EM, extensive metabolizer; IM, intermediate metabolizer; N, number of patients positive for predictor variable and in total analyses; PM, poor metabolizer; RR, relative risk.

medium/high tamoxifen adherent. This is particularly relevant to young patients, as their risk to discontinue tamoxifen is among the highest^{4,10} with tamoxifen currently being the sole standard-of-care treatment in this patient group.

Our study provides a first link between poor patient adherence to tamoxifen and the risk to not achieve relevant (Z)-endoxifen plasma concentrations. However, the study is not without limitations. We are aware that the Morisky, Green, and Levine Medication Adherence Scale scoring system does not quantitatively capture adherence, yet we consider this approach appropriate as it allowed us to assess tamoxifen adherence in this patient group with a high proportion of illiteracy. Moreover, the putative threshold of 5.9 ng/mL (Z)-endoxifen²⁰ has not been prospectively validated and controversies on the CYP2D6—endoxifen relationship for the prediction of tamoxifen efficacy have not been finally resolved, which currently limits the clinical utility of our findings.^{29,47–52}

In conclusion, our proof-of-concept study suggests that the dual monitoring of tamoxifen plasma levels as surrogate marker for adherence and (Z)-endoxifen formation as surrogate marker for clinical response could be a strategy to improve patients' chances to avoid recurrence and premature death in the future.

Supporting Information. Supplementary information accompanies this paper on the *Clinical and Translational Science* website (www.cts-journal.com).

Figure S1.

Figure S2.

Table S1.

Table S2.

Table S3.

Supplementary Material.

Funding. This work was conducted during a scholarship supported by the International Cooperation Program CAPES/STICAMSUD at the Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil and financed by CAPES – Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil. The work was also funded in part by the Robert Bosch Foundation, Stuttgart, the HORIZON

2020-PHC-2015 grant U-Px 668353, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy - EXC 2180 – 390900677, and DFG, SCHR 1323/2-1 and MU 1727/2-1), Interfaculty Center for Pharmacogenomics and Drug Research (ICEPHA) University of Tübingen, and The German Cancer Consortium (DKTK), partner site Tuebingen), Germany.

Conflict of Interest. The authors declared no competing interests for this work.

Authors Contributions. J.M.N., J.C.C.-d.-R., T.A.A., H.B., W.S., T.M., R.H., M.S., and R.F.P.-F. wrote the manuscript. J.C.C.-d.-R., J.M.N., T.A.A., and H.B. designed the research. J.M.N., T.A.A., E.C.L.V., J.P.K., S.P., D.M., S.D.R.d.M., R.F.P.-F., T.M., and W.S. performed the research. J.M.N., J.C.C.-d.-R., T.A.A., W.S., T.M., R.H., M.S., and H.B. analyzed the data.

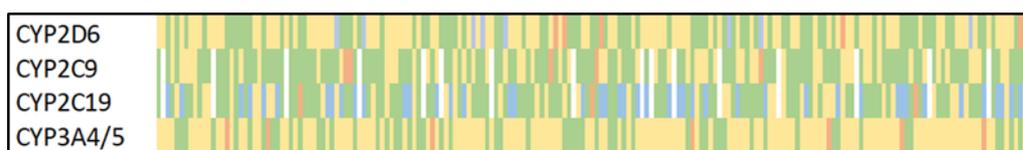
1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* **386**, 1341–1352 (2015).
2. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771–784 (2011).
3. World Health Organization. Adherence to Long-Term Therapies: Evidence for Action (World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2003).
4. Chlebowski, R.T., Kim, J. & Haque, R. Adherence to endocrine therapy in breast cancer adjuvant and prevention settings. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* **7**, 378–387 (2014).
5. Kimmick, G., Anderson, R., Camacho, F., Bhosle, M., Hwang, W. & Balkrishnan, R. Adjuvant hormonal therapy use among insured, low-income women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3445–3451 (2009).
6. McCowan, C., Wang, S., Thompson, A.M., Makubate, B. & Petrie, D.J. The value of high adherence to tamoxifen in women with breast cancer: a community-based cohort study. *Br. J. Cancer* **109**, 1172–1180 (2013).
7. Owusu, C. *et al.* Predictors of tamoxifen discontinuation among older women with estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 549–555 (2008).
8. Partridge, A.H., Wang, P.S., Winer, E.P. & Avorn, J. Nonadherence to adjuvant tamoxifen therapy in women with primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**, 602–606 (2003).
9. Silliman, R.A. *et al.* Adjuvant tamoxifen prescription in women 65 years and older with primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2680–2688 (2002).
10. Hershman, D.L. *et al.* Early discontinuation and nonadherence to adjuvant hormonal therapy in a cohort of 8,769 early-stage breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 4120–4128 (2010).
11. Hershman, D.L. *et al.* Early discontinuation and non-adherence to adjuvant hormonal therapy are associated with increased mortality in women with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **126**, 529–537 (2011).

12. Chirgwin, J.H. *et al.* Treatment adherence and its impact on disease-free survival in the Breast International Group 1–98 Trial of tamoxifen and letrozole, alone and in sequence. *J. Clin. Oncol.* **34**, 2452–2459 (2016).
13. Lam, W.Y. & Fresco, P. Medication adherence measures: an overview. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 217047 (2015).
14. Goetz, M.P. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 and tamoxifen therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **103**, 770–777 (2018).
15. Antunes, M.V. *et al.* Endoxifen levels and its association with CYP2D6 genotype and phenotype: evaluation of a southern Brazilian population under tamoxifen pharmacotherapy. *Ther. Drug Monit.* **34**, 422–431 (2012).
16. Friedrich, D.C. *et al.* Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. *PLoS One* **9**, e110691 (2014).
17. Murdter, T.E. *et al.* Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 708–717 (2011).
18. Stearns, V. *et al.* Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 1758–1764 (2003).
19. Schroth, W. *et al.* Improved prediction of endoxifen metabolism by CYP2D6 genotype in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Front. Pharmacol.* **8**, 582 (2017).
20. Madlensky, L. *et al.* Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 718–725 (2011).
21. Maximov, P.Y. *et al.* Simulation with cells in vitro of tamoxifen treatment in premenopausal breast cancer patients with different CYP2D6 genotypes. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 5624–5635 (2014).
22. Goetz, M.P. *et al.* CYP2D6 metabolism and patient outcome in the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group trial (ABCSG) 8. *Clin. Cancer Res.* **19**, 500–507 (2013).
23. Province, M.A. *et al.* CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin. Pharmacol. Ther.* **95**, 216–227 (2014).
24. Schroth, W. *et al.* Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* **302**, 1429–1436 (2009).
25. Karle, J. *et al.* Influence of CYP2D6-genotype on tamoxifen efficacy in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 553–560 (2013).
26. Rae, J.M. *et al.* CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 452–460 (2012).
27. Regan, M.M. *et al.* CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 441–451 (2012).
28. Wegman, P., Elingarami, S., Carstensen, J., Stal, O., Nordenskjold, B. & Wingren, S. Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res.* **9**, R7 (2007).
29. Sanchez-Spitman, A. *et al.* Tamoxifen pharmacogenetics and metabolism: results from the prospective CYPTAM study. *J. Clin. Oncol.* **37**, 636–646 (2019).
30. Harris, L.N. *et al.* Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Oncol.* **34**, 1134–1150 (2016).
31. Thompson, A.M. *et al.* Comprehensive CYP2D6 genotype and adherence affect outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen monotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **125**, 279–287 (2011).
32. McShane, L.M. *et al.* Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1180–1184 (2005).
33. Prado, C.M. Desenvolvimento de metodologia para determinação dos genótipos principais dos genes CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9: aplicação na Farmacogenética. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo (2009).
34. Morisky, D.E., Green, L.W. & Levine, D.M. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence. *Med. Care* **24**, 67–74 (1986).
35. Oliveira, A., Munhoz, E.C., Nardin, J.M. & Carneiro, M.B. Assessment of imatinib mesylate adherence of patients with chronic myeloid leukemia. *Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde* **4**, 6–12 (2013).
36. Zineh, I. *et al.* Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clin. Pharmacol. Ther.* **76**, 536–544 (2004).
37. Gaedigk, A., Simon, S.D., Pearce, R.E., Bradford, L.D., Kennedy, M.J. & Leeder, J.S. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 234–242 (2008).
38. Saladores, P. *et al.* Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J.* **15**, 84–94 (2015).
39. Desta, Z., Ward, B.A., Soukhova, N.V. & Flockhart, D.A. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**, 1062–1075 (2004).
40. Helland, T. *et al.* Drug monitoring of tamoxifen metabolites predicts vaginal dryness and verifies a low discontinuation rate from the Norwegian Prescription Database. *Breast Cancer Res. Treat.* **177**, 185–195 (2019).
41. Dezentje, V.O. *et al.* Effect of concomitant CYP2D6 inhibitor use and tamoxifen adherence on breast cancer recurrence in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2423–2429 (2010).
42. Makubate, B., Donnan, P.T., Dewar, J.A., Thompson, A.M. & McCowan, C. Cohort study of adherence to adjuvant endocrine therapy, breast cancer recurrence and mortality. *Br. J. Cancer* **108**, 1515–1524 (2013).
43. Oliveira, A.T. & Queiroz, A.P.A. Profile use of oral antineoplastic therapy: the importance of pharmaceutical guidance. *Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde* **3**, 24–29 (2012).
44. Shi, L., Liu, J., Koleva, Y., Fonseca, V., Kalsekar, A. & Pawaskar, M. Concordance of adherence measurement using self-reported adherence questionnaires and medication monitoring devices. *Pharmacoeconomics* **28**, 1097–1107 (2010).
45. Culig, J. & Leppe, M. From Morisky to Hill-bone; self-reports scales for measuring adherence to medication. *Coll. Antropol.* **38**, 55–62 (2014).
46. Lien, E.A. *et al.* Serum concentrations of tamoxifen and its metabolites increase with age during steady-state treatment. *Breast Cancer Res. Treat.* **141**, 243–248 (2013).
47. Brauch, H. & Schwab, M. Prediction of tamoxifen outcome by genetic variation of CYP2D6 in postmenopausal women with early breast cancer. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **77**, 695–703 (2014).
48. Goetz, M.P. & Ingle, J.N. CYP2D6 genotype and tamoxifen: considerations for proper nonprospective studies. *Clin. Pharmacol. Ther.* **96**, 141–144 (2014).
49. Rae, J.M. CYP2D6 genotype should not be used to determine endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **94**, 183–185 (2013).
50. Braal, C.L. *et al.* Relevance of endoxifen concentrations: absence of evidence is not evidence of absence. *J. Clin. Oncol.* **37**, 1980–1981 (2019).
51. Brauch, H., Schroth, W., Murdter, T. & Schwab, M. Tamoxifen pharmacogenetics and metabolism: the same is not the same. *J. Clin. Oncol.* **37**, 1981–1982 (2019).
52. Goetz, M.P., Suman, V.J., Nakamura, Y., Kiyotani, K., Jordan, V.C. & Ingle, J.N. Tamoxifen metabolism and breast cancer recurrence: a question unanswered by CYPTAM. *J. Clin. Oncol.* **37**, 1982–1983 (2019).

© 2019 The Authors. *Clinical and Translational Science* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Figure S1: A. Visualization of phenotypes predicted from 17 polymorphic loci genotyped in 5 tamoxifen DMEs genes (rows) among 192 patients with ER-positive breast cancer (columns). CYP3A4 and CYP3A5 phenotypes were classified as compound CYP3A4/5. Color code: UM (blue), EM (green), IM (yellow), and PM (red), CYP2C9 hetEM and CYP2C19 EM/PM (yellow). CYP2C19 EM/UM ((blue), missing genotypes (white). **B.** Frequencies of predicted DME phenotypes. Abbreviations: UM: ultrarapid metabolizer. EM: extensive metabolizer. hetEM: patient carrying at least one allele with normal function. IM: intermediate metabolizer. PM: poor metabolizer. CYP2C9 phenotypes were classified as EM (no *2 or *3 allele), hetEM (carriers of *2 or *3), or PM (homozygous for *2 or *3). CYP2C19 diplotypes were classified as UM/UM (homozygous *17), EM/UM (no *2 and one *17 allele), EM/EM (no *2 or *17 allele), EM/PM (one *2 allele), or PM/PM (homozygous *2). CYP3A4 and CYP3A5 phenotypes were classified as compound CYP3A4/5: EM were CYP3A4*1/*1 and either CYP3A5*1/*1 or CYP3A5*1/*3; IM were CYP3A4*1/*1 and CYP3A5*3/*3 or CYP3A4*1/*22 and either CYP3A5*1/*1 or CYP3A5*1/*3; and PM were CYP3A4*1/*22 and CYP3A5*3/*3

A.



B.

CYP2D6 (n= 192)		CYP2C9 (n=176)		CYP2C19 (n= 176)		CYP3A4/5 (n= 192)	
Diplotype (Phenotype)	%	Phenotype	%	Diplotype (Phenotype)	%	Phenotype	%
EM/EM-dup (UM)	4.2	EM	63.6	UM/UM (UM)	6.3	EM	29.2
EM/EM (EM)	41.7	hetEM	33.5	EM/UM (UM)	19.9	IM	67.2
EM/IM (EM)	17.2	PM	2.8	EM/EM (EM)	47.7	PM	3.6
EM/PM (IM)	24.0			PM/UM (IM)	4.5		
IM/IM (IM)	2.6			EM/PM (IM)	19.9		
IM/PM (IM)	7.8			PM/PM (PM)	1.7		
PM/PM (PM)	2.6						

Figure S2. Influence of *CYP2D6* polymorphism on the plasma concentration of the major tamoxifen metabolite at 3 months (n=156 patients) and 12 months (n=139 patients). **A.** (*Z*)-endoxifen, **B.** metabolic ratio *N*-desmethyltamoxifen (DM-Tam)/(*Z*)-endoxifen. Plasma concentrations are presented as boxplots with boxes representing medians, 25% and 75% percentiles, and whiskers defined by the 5th and 95th percentiles and extreme values outside the whiskers. Activity scores are assigned according to Gaedik et al. (2008), except for IM/IM which has been assigned a value between 0.5 and 1.0.

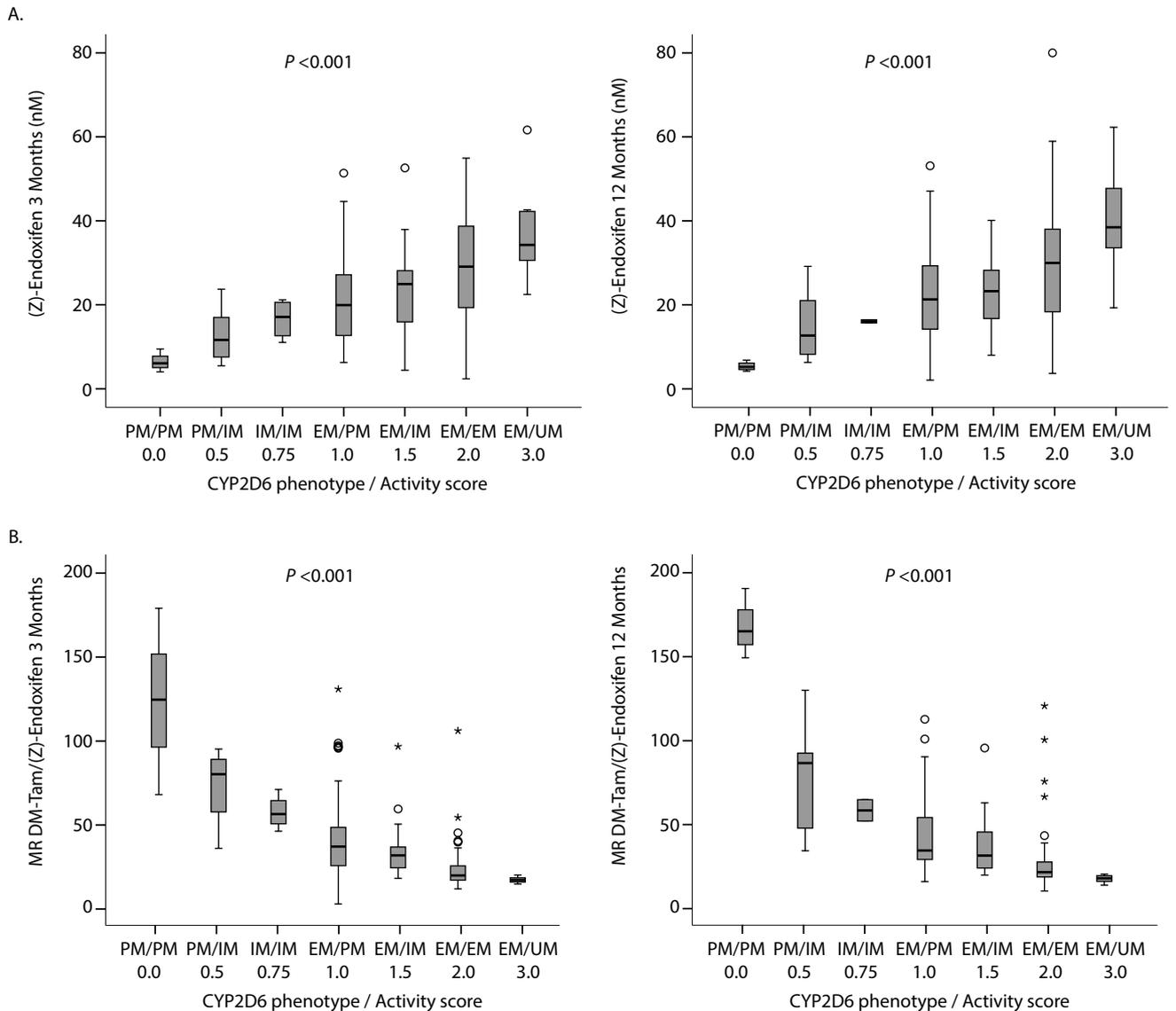


Table S1. Demographic and patient characteristics.

Characteristic	Overall distribution (n=192)		
		Invasive mucinous carcinoma	3 (1.6)
		Invasive papillary carcinoma	4 (2.1)
Age at diagnosis, median (range),	51.5 (24-82)	Histological grade (Nottingham)	
<65 years, n (%)	145 (75.5)	Gx	43 (22.4)
≥65 years, n (%)	47 (24.5)	G1	19 (9.9)
Ethnicity, n (%)		G2	114 (59.4)
White	139 (72.4)	G3	16 (8.3)
Black	11 (5.7)	Hormonal receptor status, n (%)	
Pardo ^a	37 (19.3)	Positive	192 (100.0)
Asian/Indian ^b	5 (2.6)	Negative	0 (0.0)
Educational level, n (%)		Estrogen receptor status, n (%)	
None or incomplete basic	68 (35.4)	Positive	189 (98.5)
Basic	50 (26.0)	Negative	2 (1.0)
Upper secondary	53 (27.6)	Unknown	1 (0.5)
University (Bachelor/Master/Doctoral)	21 (10.9)	Progesterone receptor status, n (%)	
Menopausal status, n (%)		Positive	161 (83.9)
Premenopausal	127 (66.1)	Negative	28 (14.6)
Postmenopausal	65 (33.9)	Unknown	3 (1.5)
ECOG Performance status, n (%)		HER2 status, n (%)	
0–1	187 (97.4)	Positive	22 (11.5)
2–4	5 (2.6)	Negative	169 (88.0)
Tumor size according to TNM, n (%)		Unknown	1 (0.5)
Tx (primary tumor cannot be assessed)	1 (0.5)	Ki67 status, n (%)	
T0 (no evidence of primary tumor)	1 (0.5)	≤ 14%	71 (37.0)
Tis (carcinoma in situ)	2 (1.0)	> 14%	120 (62.5)
T1 (tumor ≤ 20mm)	63 (32.8)	Unknown	1 (0.5)
T2 (tumor >20mm but ≤ 50mm)	80 (41.7)	Concomitant medications during tamoxifen treatment, n (%)	
T3 (tumor > 50mm)	25 (13.0)	Yes	140 (72.9)
T4 (tumor of any size with direct extension to the chest wall or skin)	20 (10.4)	No	52 (27.1)
Nodal status according to TNM, n (%)		Concomitant CYP2D6 inhibitors ^c , n (%)	
Nx	2 (1.0)	Yes	27 (14.1)
N0	115 (59.9)	Strong inhibitors	4 (2.1)
N1	62 (32.3)	Moderate inhibitors	3 (1.6)
N2	10 (5.2)	Weak inhibitors	14 (7.3)
N3	3 (1.6)	Self-reported adverse events, n (%)	
Distant metastasis according to TNM, n (%)		Yes	155 (80.7)
M0	183 (95.3)	No	37 (19.3)
M1	9 (4.7)		
Clinical stage at diagnosis, n (%)			
0 (<i>in situ</i>)	2 (1.0)		
IA/IB	56 (29.2)		
IIA/IIIB	92 (47.9)		
IIIA/IIIB/IIIC	33 (17.2)		
IV	9 (4.7)		
Histology			
Carcinoma in situ	3 (1.5)		
Invasive ductal carcinoma	162 (84.4)		
Invasive lobular carcinoma	12 (6.3)		
Invasive ductal and lobular carcinoma	6 (3.1)		
Invasive tubular carcinoma	2 (1.0)		

^a In Brazil, Pardo is an ethnic/skin color category used by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) in the Brazilian censuses. The term "pardo" is commonly used to refer to Brazilians of mixed ethnic ancestries. Pardo Brazilians represent a wide range of skin colors and backgrounds. They are typically a mixture of white Brazilian, Afro-Brazilian and Native Brazilian.

^b Indian refers to Native Brazilian.

^c Reported CYP2D6 inhibitors: strong– fluoxetine; moderate – duloxetine and sertraline; weak – amiodarone, buprenorphine, cinnarizine, citalopram, desvenlafaxine, dexchlorpheniramine, escitalopram, haloperidol, methadone, metoclopramide, risperidone and verapamil.

Table S2: Observed allele frequencies of *CYP2D6* and other DME gene variants in the Brazilian patient cohort and by ethnicity.

Gene/ Allele	No. of patients	Variant	Function	General AF	<i>P</i> *	White AF	Black AF	Brown/ Mixed race AF	Asian/ Indian AF	<i>P</i> †
<i>CYP2D6</i>										
2D6*3	192	2549AdeI	Null	0.013	0.983	0.018	0.000	0.000	0.000	<0.001
2D6*4	192	1846G>A	Null	0.143	0.999	0.158	0.045	0.108	0.200	<0.001
2D6*5	185	Gene deletion	Null	0.024	0.944	0.023	0.045	0.028	0.000	<0.001
2D6*6	192	1707TdeI	Null	0.008	0.994	0.001	0.000	0.014	0.000	<0.001
2D6*7	192	2935A>C	Null	0.000						
2D6*8	192	1758G>T	Null	0.000						
2D6*9	192	2615AAGdeI	Reduced	0.034	0.228	0.032	0.000	0.054	0.000	<0.001
2D6*10	191	100C>T	Reduced	0.021	0.957	0.022	0.000	0.014	0.100	<0.001
2D6*17	180	1023C>T	Reduced	0.019	0.965	0.000	0.100	0.069	0.000	<0.001
2D6*29	173	3183G>A	Reduced	0.014	<0.001	0.008	0.150	0.000	0.000	<0.001
2D6*41	192	2988G>A	Reduced	0.068	0.441	0.065	0.136	0.054	0.100	<0.001
<i>CYP2C9</i>										
2C9*2	176	430C>T	Reduced	0.125	0.483	0.138	0.150	0.063	0.125	<0.001
2C9*3	177	1075A>C	Reduced	0.071	0.600	0.081	0.050	0.030	0.125	<0.001
<i>CYP2C19</i>										
2C19*2	176	681G>A	Null	0.139	0.967	0.146	0.100	0.125	0.125	<0.001
2C19*17	177	806C>T	Increased	0.186	0.056	0.192	0.200	0.136	0.375	<0.001
<i>CYP3A5</i>										
3A5*3	192	6986A>G	Reduced	0.815	0.105	0.863	0.500	0.716	0.900	0.003
<i>CYP3A4</i>										
3A4*22	192	15389C>T	Reduced	0.029	0.920	0.029	0.091	0.014	0.000	<0.001

AF: allele frequency.

Note: The position of the nucleotide refers to the numbering from the ATG initiation codon.

*P**: significance value for chi-square test for Hardy–Weinberg equilibrium.*P*†: significance value for chi-square test between race/ethnicity group

Indian refers to native South American.

Table S3: Univariate analyses of variables influencing the plasma concentration of tamoxifen, its active metabolites and the metabolic ratio.

Metabolite/time point	Mean nM	± SD nM	Median (range) nM	<i>P</i> ^a	Ethnicity	Age ^b	CYP 2D6	CYP 2C9	CYP 2C19	CYP 3A4/5	Adherence	Educ. level	Albumin ^b	Conc. med. ^c	2D6 Inh. ^d	<i>P</i> (KS ^e)
Tam 3 M	301.2	110.1	300.7 (57.0 - 614.8)	0.003	0.108	<0.001	0.831	0.861	0.917	0.292	<0.001	0.245	0.869	0.642	-----	0.200
Tam 6 M	297.1	125.7	277.6 (42.3 - 726.1)		0.797	<0.001	0.672	0.789	0.146	0.508	0.001	0.246	0.012	0.701	-----	0.001
Tam 12 M	337.5	121.1	337.3 (23.8 - 675.8)		0.823	0.004	0.859	0.318	0.440	0.495	<0.001	0.908	0.062	0.135	-----	0.200
DM-Tam 3 M	663.1	247.4	668.3 (31.1 - 1567.1)	<0.001	0.003	<0.001	0.002	0.890	0.703	0.613	<0.001	-----	-----	-----	0.293	0.200
DM-Tam 6 M	643.3	271.9	599.9 (74.8 - 1491.1)		0.384	0.004	0.016	0.389	0.449	0.391	0.005	-----	-----	-----	0.199	0.001
DM-Tam 12 M	738.9	277.5	731.9 (73.8 - 1862.3)		0.142	0.016	0.039	0.776	0.698	0.779	<0.001	-----	-----	-----	0.682	0.200
Z-Endo 3 M	25.0	12.9	24.4 (4.0 - 61.6)	0.833	0.020	0.047	<0.001	0.302	0.740	0.613	0.012	0.464	-----	-----	0.395	0.060
Z-Endo 6 M	24.6	13.8	22.5 (4.3 - 82.6)		0.365	0.341	<0.001	0.387	0.088	0.607	<0.001	0.254	-----	-----	0.154	0.024
Z-Endo 12 M	25.4	13.8	23.3 (2.1 - 80.0)		0.097	0.268	<0.001	0.099	0.043	0.563	<0.001	0.823	-----	-----	0.331	0.035
Z-4-OH-Tam 3 M	4.4	2.0	4.0 (0.8 - 9.9)	0.329	0.012	0.273	0.016	0.235	0.790	0.541	0.026	0.186	-----	-----	0.518	0.011
Z-4-OH-Tam 6 M	4.1	2.1	3.9 (0.4 - 17.8)		0.459	0.095	0.014	0.179	0.268	0.422	<0.001	0.130	-----	-----	0.583	0.001
Z-4-OH-Tam 12 M	4.3	1.9	4.0 (0.3 - 11.3)		0.107	0.137	<0.001	0.594	0.838	0.810	<0.001	0.371	-----	-----	0.054	0.092
Metabolic ratio																
Tam/DM-Tam 3 M	0.5	0.1	0.4 (0.2 - 0.9)		0.584	0.067	<0.001	0.595	0.745	0.089	0.437	-----	0.097	0.975	0.703	<0.001
Tam/DM-Tam 6 M	0.5	0.1	0.5 (0.3 - 1.5)		0.735	0.906	<0.001	0.391	0.589	0.083	0.154	-----	0.554	0.568	0.036	<0.001
Tam/DM-Tam 12 M	0.5	0.1	0.5 (0.2 - 0.8)		0.207	0.747	<0.001	0.513	0.279	0.270	0.093	-----	0.439	0.120	0.878	0.200
DM-Tam/Z-Endo 3 M	32.4	20.9	24.7 (10.7 - 98.1)		0.430	0.872	<0.001	-----	-----	-----	0.535	-----	0.694	0.934	0.133	<0.001
DM-Tam/Z-Endo 6 M	31.9	20.7	24.8 (10.2 - 125.2)		0.057	0.499	<0.001	-----	-----	-----	0.050	-----	0.190	0.744	0.012	<0.001
DM-Tam/Z-Endo 12 M	35.8	23.6	27.1 (9.4 - 129.7)		0.034	0.475	<0.001	-----	-----	-----	0.906	-----	0.279	0.564	0.943	<0.001
Tam/Z-4-OH-Tam 3 M	77.5	29.6	70.9 (37.5 - 219.7)		0.119	0.558	<0.001	0.038	0.266	0.743	0.454	-----	0.519	0.226	0.107	<0.001
Tam/Z-4-OH-Tam 6 M	78.8	30.3	72.6 (33.0 - 204.7)		0.166	0.094	<0.001	0.210	0.816	0.542	0.316	-----	0.992	0.848	0.591	<0.001
Tam/Z-4-OH-Tam 12 M	86.0	32.9	76.6 (33.4 - 223.0)		0.181	0.449	<0.001	0.206	0.967	0.591	0.102	-----	0.474	0.458	0.263	<0.001
Z-4-OH-Tam/Z-Endo 3 M	0.19	0.1	0.2 (0.1 - 0.6)		0.788	0.145	<0.001	-----	0.366	0.072	0.213	-----	0.399	0.994	0.052	<0.001
Z-4-OH-Tam/Z-Endo 6 M	0.19	0.1	0.2 (0.1 - 0.5)		0.291	0.492	<0.001	-----	0.646	0.603	0.114	-----	0.965	0.071	0.057	<0.001
Z-4-OH-Tam/Z-Endo 12 M	0.19	0.1	0.2 (0.1 - 0.5)		0.599	0.571	<0.001	-----	0.788	0.146	0.269	-----	0.653	0.983	0.353	<0.001

P values for demographic, clinical and drug-metabolizing enzyme phenotypic data (numbers in bold represent statistically significant values).

^a Significance value for mean differences of each substance between time points 3 M, 6 M and 12 M.

^b Pearson test (normal data) and Spearman test (non-normal data) correlation significance. The *r* values for age: Tam 3 M, 0.418; Tam 6 M, 0.283; Tam 12 M, 0.223; DM-Tam 3 M, 0.343; DM-Tam 6 M, 0.224; DM-Tam 12 M, 0.206; and Z-Endo 3 M, 0.159. The *r* value for albumin: Tam 6 M, 0.200.

^c The main prescribed pharmacologic classes were antihypertensive drugs (29.2%, 29.4% and 26.3% for 3, 6 and 12 months respectively) and non-opioid analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (13.2%, 16.0% and 22.0% for 3, 6 and 12 months respectively). Strong CYP2D6 inhibitors were near 1.0% of all concomitant medications for all time points (0.5%, 0.9% and 1.2% for 3, 6 and 12 months respectively).

^d Reported CYP2D6 inhibitors: strong – fluoxetine; moderate – duloxetine and sertraline; weak – amiodarone, buprenorphine, cinnarizine, citalopram, desvenlafaxine, dexchlorpheniramine, escitalopram, haloperidol, methadone, metoclopramide, risperidone and verapamil.

^e Significance values for Kolmogorov–Smirnov test for normality; normal data were tested with ANOVA or T-test, and non-normal data were tested with Kruskal–Wallis or Mann–Whitney test. Abbreviations: 3 M: 3 months. 6 M: 6 months. 12 M: 12 months. Tam: tamoxifen. DM-Tam: *N*-desmethyltamoxifen. Z-Endo: (Z)-endoxifen. Z-4-OH-Tam: (Z)-4-hydroxytamoxifen. SD: standard deviation. Educ. level: educational level. Conc. med.: use of concomitant medication. 2D6 inh.: use of CYP2D6 inhibitor medication. KS: Kolmogorov–Smirnov test. ----- value not measured.

Supplementary Material Nardin et al.

The Influences of Adherence to Tamoxifen and *CYP2D6* Pharmacogenetics on Plasma Concentrations of the Active Metabolite (Z)-Endoxifen in Breast Cancer

Appendix S1. Methods**Patients and study design (Menopausal status and endpoints)**

The patients' adherence behavior to tamoxifen and their demographic and clinical characteristics are described in Table 1 and Supplementary Table 1, respectively. For those with missing menopausal data, menopausal status was inferred from age at diagnosis according to the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (1). Defined study endpoints at 3, 6, and 12 months were tamoxifen adherence scores based on interview, plasma levels of tamoxifen and its metabolites N-desmethyltamoxifen (DM-Tam), (Z)-4-hydroxytamoxifen ((Z)-4-OH-Tam) as well as (Z)-endoxifen, and the patients metabolizer status based on genotypes for *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, and *CYP3A5* (see section genotyping).

DNA isolation, genotyping and activity score

Genomic DNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells immediately after confirmation of the diagnosis of breast cancer and before the start of systemic treatment (chemotherapy, hormonal therapy or radiotherapy). DNA was extracted with a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) and stored at -20°C until use. Genotyping of *CYP2D6* polymorphisms was carried out at Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institute of Clinical Pharmacology (IKP), Stuttgart (Germany), and Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba (Brazil) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass

spectrometry (MALDI-TOF MS) and TaqMan® (Applied Biosystems) real-time quantification assays as previously described (2). *CYP2D6* alleles associated with null function (PM: *3, *4, *6, *7 and *8) and reduced function (IM: *9, *10 and *41) were genotyped by MALDI-TOF MS; *CYP2D6* gene duplication (UM), *5 deletion allele (PM), and alleles *17 and *29 (IM; reduced function) were determined using a TaqMan® Copy Number Assay and TaqMan® SNP Genotyping Assay, respectively (Thermo Fischer Scientific). For *CYP2D6* genotype–phenotype interpretation, a *CYP2D6* enzyme activity score (AS) was applied to predict PM, IM, EM and UM phenotypes: PM/PM (0.0), PM/IM (0.5), IM/IM (0.75), PM/EM (1.0), IM/EM (1.5), EM/EM (2.0) and EM/UM (3.0) (3, 4). *CYP2D6* phenotype was classified according to AS: 0.0 for PM; 0.5 to 1.0 for IM; 1.5 to 2.0 for EM; and 3.0 for UM (referring to gene duplications of functional alleles).

Other DME gene polymorphisms investigated by MALDI-TOF MS included *CYP2C9* *2 and *3 associated with reduced enzyme function, *CYP2C19* *2 and *17 associated with null and increased enzyme function, respectively, as well as *CYP3A4* *22 and *CYP3A5* *3, both associated with reduced enzyme function. Absence of variant alleles or gene duplications were assigned to normal enzyme function (*1) and phenotypes were deduced as described (5, 6). Allele definitions follow those of the CYP Allele Nomenclature Committee, provided by the Pharmacogene Variation Consortium (7).

Plasma samples and quantification of tamoxifen and its active metabolites

Heparinized plasma samples were obtained at 3, 6 and 12 months after the start of tamoxifen therapy. For all plasma analyses, patients were required to fast for 4 hours and not drink alcohol within 48 hours before sample collection, which was carried out within 5 to 16 hours after the oral administration of tamoxifen. Plasma levels of tamoxifen and the inactive major metabolite DM-Tam as well as the active metabolites (Z)-4-OH-Tam and (Z)-

endoxifen were measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS) at Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institute of Clinical Pharmacology (IKP), Stuttgart (Germany) as previously described (8). Measurements were made in the multiple reaction monitoring mode using a 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies). Assessment of plasma tamoxifen metabolite levels was performed using an isomer separation method that provides information on (E) and (Z)-isomers of hydroxylated metabolites (8). The hydroxylated (Z)-isomers (Z)-endoxifen and (Z)-4-OH-Tam are the main active tamoxifen metabolites known to bind with higher affinity to the ER than tamoxifen (9, 10). The method allowed the chromatographic separation of the anti-estrogenic (Z)-isomers from the inactive (E)-isomers. Serum albumin was monitored by bromocresol green albumin method (Ortho-Clinical Diagnostics). Plasma storage was at -80°C until use.

Statistical analysis

Internal consistency for the Morisky, Green and Levine medication adherence scale was tested using Cronbach's alpha. DME genotype/phenotype frequencies were calculated and genotype distributions were tested for Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) using chi-square test. Metabolic ratios (MR) of metabolites formation (amount of specific metabolite relative to original compound) were assessed as this measure may reflect the activity and/or genotype of a DME.

Clinical and demographic characteristics, DME genotypes, and adherence patterns were compared by chi-square tests. Pearson's (normal data) or Spearman's (non-normal data) rank correlation coefficients were calculated between age and plasma levels and the MR of all tested compounds. In addition, F-tests and T-tests (normal data) and Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests (non-normal data) were applied to determine whether tamoxifen and its metabolite concentrations and MRs differed significantly between DME genotypes and adherence behavior.

To evaluate individual contributions of treatment adherence, DME genotype/phenotype, or other factors to the total variability of the plasma concentrations of (Z)-endoxifen, DM-Tam, and (Z)-4-OH-Tam, as well as the respective MRs, multiple linear regression modeling was applied. For this purpose, the MRs were square-root transformed, and compound concentrations were log transformed. The variance explained by DME genotypes and level of adherence were defined by adjusted standardized beta coefficients of determination in the applied linear model.

Relative risk (RR) and 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated at the 12-months' time-point to evaluate the risk of patients not achieving the clinical threshold of 5.9 ng/mL (15.8nM) (Z)-endoxifen in the plasma, that was previously used to stratify clinical outcome in a large cohort of breast cancer patients treated with tamoxifen (11). All *P*-values were two-sided, and values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS version 24.0.

Appendix References

- (1) NCCN. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer, version 1.2018*. <<https://www.nccn.org/patients/guidelines/cancers.aspx#breast>> (2018). Accessed 22April2018.
- (2) Schroth, W. *et al.* Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **302**, 1429-36 (2009).
- (3) Gaedigk, A., Simon, S.D., Pearce, R.E., Bradford, L.D., Kennedy, M.J. & Leeder, J.S. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clinical pharmacology and therapeutics* **83**, 234-42 (2008).
- (4) Zineh, I. *et al.* Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clinical pharmacology and therapeutics* **76**, 536-44 (2004).
- (5) Kitzmiller, J.P., Luzum, J.A., Baldassarre, D., Krauss, R.M. & Medina, M.W. CYP3A4*22 and CYP3A5*3 are associated with increased levels of plasma simvastatin concentrations in the cholesterol and pharmacogenetics study cohort. *Pharmacogenetics and genomics* **24**, 486-91 (2014).

- (6) Saladores, P. *et al.* Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *The pharmacogenomics journal* **15**, 84-94 (2015).
- (7) PharmVar. *Pharmacogene Variation Consortium*. <<https://www.pharmvar.org/>> (2018). Accessed April 2018 2018.
- (8) Murdter, T.E. *et al.* Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clinical pharmacology and therapeutics* **89**, 708-17 (2011).
- (9) Johnson, M.D. *et al.* Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast cancer research and treatment* **85**, 151-9 (2004).
- (10) Lim, Y.C., Desta, Z., Flockhart, D.A. & Skaar, T.C. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **55**, 471-8 (2005).
- (11) Madlensky, L. *et al.* Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clinical pharmacology and therapeutics* **89**, 718-25 (2011).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A genotipagem do gene *CYP2D6* das 192 pacientes incluídas na publicação revelou frequências mais baixas de pacientes PM (2,6%) em comparação com uma população típica europeia (5,9%) e maior frequência de IM (51,6%) em comparação com os europeus (48,1%) ou outros estudos brasileiros (7,1 - 13,6%). Uma maior cobertura alélica e a inclusão de polimorfismo típicos de população negra podem ter contribuído para essa variabilidade. A associação farmacogenética entre o polimorfismo *CYP2D6* e as concentrações plasmáticas de (Z)-endoxifeno foi confirmada com as análises farmacocinéticas do tamoxifeno.

Embora a observação de que a *CYP2C19* (importante enzima na formação de metabólitos ativos de tamoxifeno) possa ter impacto na formação do (Z)-endoxifeno, não foi possível observar sua influência, bem como das demais enzimas *CYP2C9*, *CYP3A4* e *CYP3A5* sobre os níveis plasmáticos do (Z)-endoxifeno e dos demais metabólitos avaliados ao longo do período avaliado.

A observação de que fatores como idade ao diagnóstico, etnia e índice de massa corporal (não avaliada neste estudo) podem influenciar o metabolismo do tamoxifeno requer mais atenção. Neste estudo foi possível demonstrar que deve ser avaliado com especial atenção dados farmacoterapêuticos relacionados a adesão à terapia por parte das pacientes, bem como o uso de medicamentos concomitantes inibidores das enzimas relacionadas ao metabolismo do tamoxifeno.

Os dados de adesão do nosso estudo mostraram associação com a idade ao diagnóstico, e os pacientes mais velhos revelaram melhores padrões de adesão ao esquema de medicação, mesmo com a presença de eventos adversos. Outro fator relevante que mostrou relação com o perfil de adesão foi a ocorrência de eventos adversos, sobre tudo aos 12 meses de tratamento quando as taxas de adesão mostram-se piores do que ao início do tratamento.

A adesão poder ser influenciada por vários fatores relacionados ao paciente, como idade, sexo, etnia, nível educacional, crenças, necessidades e preocupações em relação ao tratamento e fatores relacionados aos serviços de saúde. Nosso estudo, porém, não foi desenhado para capturar esses fatores, e uma análise mais aprofundada com a população desta mesma coorte poderia prever quais fatores estão

influenciando seu comportamento de adesão. Com nossos dados não foi possível associar a adesão ao nível educacional, etnia ou algum aspecto da doença, possivelmente devido ao tamanho da amostra e ao método de avaliação de adesão utilizado neste estudo.

É possível concluir neste estudo que a adesão ao tratamento e os polimorfismos de *CYP2D6* tiveram impacto nos níveis dos metabólitos do tamoxifeno e, talvez, algumas estratégias clínicas possam ser aplicadas durante o primeiro ano de tratamento. É possível monitorar os níveis plasmáticos de tamoxifeno e seus metabólitos durante os primeiros meses, e os pacientes com concentração muito baixa desses compostos deveriam ser submetidos aos testes farmacogenéticos. Também, uma orientação permanente da equipe clínica deve ser fornecida ao paciente com câncer, especialmente aqueles que tomam medicação oral e estão sujeitos a alguma toxicidade desse tratamento.

A importância de intervenções que visem a adesão, como a orientação farmacêutica e psicológica, não pode ser ignorada, especialmente com a diminuição dos níveis de adesão, como observado aos 12 meses de tratamento. A não adesão ao tratamento resulta em níveis inadequados de metabólitos ativos e talvez possa impactar no desfecho clínico do tratamento, uma vez que é sabido que a descontinuidade precoce e a não adesão são preditores de mortalidade. Existe a necessidade da elaboração de novas intervenções para a população deste estudo, ainda em tratamento na instituição, visando melhores resultados de adesão e talvez resultados clínicos.

REFERÊNCIAS

ALLRED, D.; BRYANT, J.; LAND, S.; PAIK, S. Estrogen receptor expression as a predictive marker of the effectiveness of tamoxifen in treatment of DCIS: Findings from NSABP protocol B-24. **Breast Cancer Research and Treatment**, 76, n. 1, p. Supplement, 2002.

ALTHUIS, M. D.; FERGENBAUM, J. H.; GARCIA-CLOSAS, M.; BRINTON, L. A. *et al.* Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 13, n. 10, p. 1558-1568, Out 2004.

ANGLICHEAU, D.; LEGENDRE, C.; BEAUNE, P.; THERVET, E. Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. **Pharmacogenomics**, 8, n. 7, p. 835-849, Jul 2007.

ANTUNES, M. V.; LINDEN, R.; SANTOS, T. V.; WALLEMACQ, P. *et al.* Endoxifen levels and its association with CYP2D6 genotype and phenotype: evaluation of a southern Brazilian population under tamoxifen pharmacotherapy. **Ther Drug Monit**, 34, n. 4, p. 422-431, Ago 2012.

APPLIEDBIOSYSTEMS. TaqMan SNP Genotyping Assays. Foster City: Life Technologies 2014.

BARDIA, A.; STEARNS, V. Personalized tamoxifen: a step closer but miles to go. **Clin Cancer Res**, 16, n. 17, p. 4308-4310, Sep 1 2010.

BEAULIEU, M.; HONG, P. Multiplexing the Homogeneous MassEXTEND™ Assay. **Sequenom Application Note**, 2004.

BERNARD, S.; NEVILLE, K. A.; NGUYEN, A. T.; FLOCKHART, D. A. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population: clinical implications. **Oncologist**, 11, n. 2, p. 126-135, Fev 2006.

BERRY, D. CYP2D6 genotyping and the use of tamoxifen in breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, 105, n. 17, p. 1267-1269, Set 2013.

BERRY, D. A. Response. **J Natl Cancer Inst**, 106, n. 5, Mai 2014.

BERRY, D. L.; BLONQUIST, T. M.; HONG, F.; HALPENNY, B. *et al.* Self-reported adherence to oral cancer therapy: relationships with symptom distress, depression, and personal characteristics. **Patient Prefer Adherence**, 9, p. 1587-1592, 2015.

BEVERAGE, J. N.; SISSUNG, T. M.; SION, A. M.; DANESI, R. *et al.* CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. **J Pharm Sci**, 96, n. 9, p. 2224-2231, Set 2007.

BORGES, S.; DESTA, Z.; LI, L.; SKAAR, T. C. *et al.* Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. **Clin Pharmacol Ther**, 80, n. 1, p. 61-74, Jul 2006.

BRAUCH, H.; MURDTER, T. E.; EICHELBAUM, M.; SCHWAB, M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. **Clin Chem**, 55, n. 10, p. 1770-1782, Out 2009.

BRAUCH, H.; SCHROTH, W.; GOETZ, M. P.; MURDTER, T. E. *et al.* Tamoxifen use in postmenopausal breast cancer: CYP2D6 matters. **J Clin Oncol**, 31, n. 2, p. 176-180, Jan 10 2013.

BRAUCH, H.; SCHWAB, M. Prediction of tamoxifen outcome by genetic variation of CYP2D6 in postmenopausal women with early breast cancer. **Br J Clin Pharmacol**, Ago 2013.

BRITO, C.; PORTELA, M. C.; DE VASCONCELLOS, M. T. Adherence to hormone therapy among women with breast cancer. **BMC Cancer**, 14, p. 397, Jun 3 2014.

BROWN, M. T.; BUSSELL, J. K. Medication adherence: WHO cares? **Mayo Clin Proc**, 86, n. 4, p. 304-314, Apr 2011.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics**. 12th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2012. 2079 p.

BRYANT, J.; FISHER, B.; DIGNAM, J. Duration of adjuvant tamoxifen therapy. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 30, p. 56-61, 2001.

BURSTEIN, H. J.; PRESTRUD, A. A.; SEIDENFELD, J.; ANDERSON, H. *et al.* American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. **J Clin Oncol**, 28, n. 23, p. 3784-3796, Aug 10 2010.

COLLER, J. K.; KREBSFAENGER, N.; KLEIN, K.; ENDRIZZI, K. *et al.* The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent

antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. **Br J Clin Pharmacol**, 54, n. 2, p. 157-167, Aug 2002.

CREWE, H. K.; ELLIS, S. W.; LENNARD, M. S.; TUCKER, G. T. Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. **Biochem Pharmacol**, 53, n. 2, p. 171-178, Jan 24 1997.

CREWE, H. K.; NOTLEY, L. M.; WUNSCH, R. M.; LENNARD, M. S. *et al.* Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen. **Drug Metab Dispos**, 30, n. 8, p. 869-874, Aug 2002.

CREWS, K. R.; GAEDIGK, A.; DUNNENBERGER, H. M.; LEEDER, J. S. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 update. **Clin Pharmacol Ther**, 95, n. 4, p. 376-382, Apr 2014.

DAVIES, C.; PAN, H.; GODWIN, J.; GRAY, R. *et al.* Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. **Lancet**, 381, n. 9869, p. 805-816, Mar 9 2013.

DE AMEIDA MELO, M.; DE VASCONCELOS-VALENCA, R. J.; NETO, F. M.; BORGES, R. S. *et al.* CYP2D6 gene polymorphisms in Brazilian patients with breast cancer treated with adjuvant tamoxifen and its association with disease recurrence. **Biomed Rep**, 5, n. 5, p. 574-578, Nov 2016.

DESTA, Z.; WARD, B. A.; SOUKHOVA, N. V.; FLOCKHART, D. A. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. **J Pharmacol Exp Ther**, 310, n. 3, p. 1062-1075, Set 2004.

DESTA, Z.; ZHAO, X.; SHIN, J. G.; FLOCKHART, D. A. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. **Clin Pharmacokinet**, 41, n. 12, p. 913-958, 2002.

DEZENTJE, V. O.; VAN BLIJDERVEEN, N. J.; GELDERBLUM, H.; PUTTER, H. *et al.* Effect of concomitant CYP2D6 inhibitor use and tamoxifen adherence on breast cancer recurrence in early-stage breast cancer. **J Clin Oncol**, 28, n. 14, p. 2423-2429, May 10 2010.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-

year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**, 365, n. 9472, p. 1687-1717, Mai 2005.

EHRICH, M.; CORRELL, D.; BOOM, D. V. D. SNP discovery using the MassARRAY system. **SEQUENOM Application Note**, 2004.

FARMER, K. C. Methods for measuring and monitoring medication regimen adherence in clinical trials and clinical practice. **Clin Ther**, 21, n. 6, p. 1074-1090; discussion 1073, Jun 1999.

FISCHER, M. A.; STEDMAN, M. R.; LII, J.; VOGELI, C. *et al.* Primary medication non-adherence: analysis of 195,930 electronic prescriptions. **J Gen Intern Med**, 25, n. 4, p. 284-290, Apr 2010.

FISHER, B.; COSTANTINO, J. P.; WICKERHAM, D. L.; CECCHINI, R. S. *et al.* Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. **J Natl Cancer Inst**, 97, n. 22, p. 1652-1662, Nov 16 2005.

FONT, R.; ESPINAS, J. A.; GIL-GIL, M.; BARNADAS, A. *et al.* Prescription refill, patient self-report and physician report in assessing adherence to oral endocrine therapy in early breast cancer patients: a retrospective cohort study in Catalonia, Spain. **Br J Cancer**, 107, n. 8, p. 1249-1256, Oct 9 2012.

FRIEDRICH, D. C.; GENRO, J. P.; SORTICA, V. A.; SUAREZ-KURTZ, G. *et al.* Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. **PLoS One**, 9, n. 10, p. e110691, 2014.

GAEDIGK, A.; SIMON, S. D.; PEARCE, R. E.; BRADFORD, L. D. *et al.* The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. **Clin Pharmacol Ther**, 83, n. 2, p. 234-242, Feb 2008.

GIULIANO, M.; SCHIFF, R.; OSBORNE, C. K.; TRIVEDI, M. V. Biological mechanisms and clinical implications of endocrine resistance in breast cancer. **Breast**, 20 Suppl 3, p. S42-49, Oct 2011.

GOETZ, M. P.; BRAUCH, H.; RATAIN, M. J.; COX, N. J. *et al.* Re: Concordance between CYP2D6 genotypes obtained from tumor-derived and germline DNA. **J Natl Cancer Inst**, 106, n. 5, Mai 2014.

GOETZ, M. P.; KNOX, S. K.; SUMAN, V. J.; RAE, J. M. *et al.* The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. **Breast Cancer Res Treat**, 101, n. 1, p. 113-121, Jan 2007.

GOETZ, M. P.; RAE, J. M.; SUMAN, V. J.; SAFGREN, S. L. *et al.* Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. **J Clin Oncol**, 23, n. 36, p. 9312-9318, Dez 2005.

GOETZ, M. P.; SUMAN, V. J.; HOSKIN, T. L.; GNANT, M. *et al.* CYP2D6 metabolism and patient outcome in the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group trial (ABCSCG) 8. **Clin Cancer Res**, 19, n. 2, p. 500-507, Jan 15 2013.

HERSHMAN, D. L.; SHAO, T.; KUSHI, L. H.; BUONO, D. *et al.* Early discontinuation and non-adherence to adjuvant hormonal therapy are associated with increased mortality in women with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 126, n. 2, p. 529-537, Apr 2011.

HERTZ, D. L.; MCLEOD, H. L.; IRVIN, W. J., JR. Tamoxifen and CYP2D6: a contradiction of data. **Oncologist**, 17, n. 5, p. 620-630, 2012.

HOPPE, R.; ACHINGER-KAWECKA, J.; WINTER, S.; FRITZ, P. *et al.* Increased expression of miR-126 and miR-10a predict prolonged relapse-free time of primary oestrogen receptor-positive breast cancer following tamoxifen treatment. **Eur J Cancer**, 49, n. 17, p. 3598-3608, Nov 2013.

HOSKINS, J. M.; CAREY, L. A.; MCLEOD, H. L. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. **Nat Rev Cancer**, 9, n. 8, p. 576-586, Ago 2009.

INCA. **Estimativas 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA .Coordenação de Prevenção e Vigilância., 2017.

JARDIM, D. L. F.; CALABRICH, A. F. C.; KATZ, A. Determinação da frequência de polimorfismos de CYP2D6 em mulheres brasileiras e revisão de literatura. **Rev Bras Mastologia**, 20, n. 1, p. 15-21, Jan 2010.

JIN, Y.; DESTA, Z.; STEARNS, V.; WARD, B. *et al.* CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. **J Natl Cancer Inst**, 97, n. 1, p. 30-39, Jan 2005.

JORDAN, V. C.; O'MALLEY, B. W. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. **J Clin Oncol**, 25, n. 36, p. 5815-5824, Dec 20 2007.

KATZENELLENBOGEN, J. A.; CARLSON, K. E.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Facile geometric isomerization of phenolic non-steroidal estrogens and antiestrogens: limitations to the interpretation of experiments characterizing the activity of individual isomers. **J Steroid Biochem**, 22, n. 5, p. 589-596, May 1985.

KESMODEL, S. B.; GOLOUBEVA, O. G.; ROSENBLATT, P. Y.; HEISS, B. *et al.* Patient-reported Adherence to Adjuvant Aromatase Inhibitor Therapy Using the Morisky Medication Adherence Scale: An Evaluation of Predictors. **Am J Clin Oncol**, 41, n. 5, p. 508-512, May 2018.

KING, B. P.; KHAN, T. I.; AITHAL, G. P.; KAMALI, F. *et al.* Upstream and coding region CYP2C9 polymorphisms: correlation with warfarin dose and metabolism. **Pharmacogenetics**, 14, n. 12, p. 813-822, Dec 2004.

KITZMILLER, J. P.; LUZUM, J. A.; BALDASSARRE, D.; KRAUSS, R. M. *et al.* CYP3A4*22 and CYP3A5*3 are associated with increased levels of plasma simvastatin concentrations in the cholesterol and pharmacogenetics study cohort. **Pharmacogenet Genomics**, 24, n. 10, p. 486-491, Oct 2014.

KIYOTANI, K.; MUSHIRODA, T.; IMAMURA, C. K.; HOSONO, N. *et al.* Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. **J Clin Oncol**, 28, n. 8, p. 1287-1293, Mar 10 2010.

KIYOTANI, K.; MUSHIRODA, T.; SASA, M.; BANDO, Y. *et al.* Impact of CYP2D6*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. **Cancer Sci**, 99, n. 5, p. 995-999, Mai 2008.

KOBIELA, J.; STEFANIAK, T.; KRAJEWSKI, J.; KALINSKA-BLACH, B. *et al.* Dynamics of estrogen-induced oxidative stress. **Acta Biochim Pol**, 54, n. 2, p. 289-295, 2007.

LAM, W. Y.; FRESCO, P. Medication Adherence Measures: An Overview. **Biomed Res Int**, 2015, p. 217047, 2015.

LEE, C. R.; GOLDSTEIN, J. A.; PIEPER, J. A. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. **Pharmacogenetics**, 12, n. 3, p. 251-263, Apr 2002.

LEXICOMP. **Tamoxifen: Drug information**. 2018. Disponível em: https://www.uptodate.com/contents/tamoxifen-drug-information/print?source=see_link. Acesso em: April, 2018.

LIM, H. S.; JU LEE, H.; SEOK LEE, K.; SOOK LEE, E. *et al.* Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. **J Clin Oncol**, 25, n. 25, p. 3837-3845, Set 2007.

LORD, S. J.; BERNSTEIN, L.; JOHNSON, K. A.; MALONE, K. E. *et al.* Breast cancer risk and hormone receptor status in older women by parity, age of first birth, and breastfeeding: a case-control study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 17, n. 7, p. 1723-1730, Jul 2008.

MADLENSKY, L.; NATARAJAN, L.; TCHU, S.; PU, M. *et al.* Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. **Clin Pharmacol Ther**, 89, n. 5, p. 718-725, May 2011.

MARTINS, D. M.; VIDAL, F. C.; SOUZA, R. D.; BRUSACA, S. A. *et al.* Determination of CYP2D6 *3, *4, and *10 frequency in women with breast cancer in Sao Luis, Brazil, and its association with prognostic factors and disease-free survival. **Braz J Med Biol Res**, 47, n. 11, p. 1008-1015, Nov 2014.

MCCOWAN, C.; WANG, S.; THOMPSON, A. M.; MAKUBATE, B. *et al.* The value of high adherence to tamoxifen in women with breast cancer: a community-based cohort study. **Br J Cancer**, 109, n. 5, p. 1172-1180, Sep 3 2013.

MCDONNELL, A. M.; DANG, C. H. Basic review of the cytochrome p450 system. **J Adv Pract Oncol**, 4, n. 4, p. 263-268, Jul 2013.

MORISKY, D. E.; GREEN, L. W.; LEVINE, D. M. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence. **Med Care**, 24, n. 1, p. 67-74, Jan 1986.

MURDTER, T. E.; SCHROTH, W.; BACCHUS-GERYBADZE, L.; WINTER, S. *et al.* Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. **Clin Pharmacol Ther**, 89, n. 5, p. 708-717, Mai 2011.

NAKAMURA, Y.; RATAIN, M. J.; COX, N. J.; MCLEOD, H. L. *et al.* Re: CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 trial. **J Natl Cancer Inst**, 104, n. 16, p. 1264; author reply 1266-1268, Ago 2012.

NCCN. **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer, version 1.2018.** 2018. Disponível em:

<https://www.nccn.org/patients/guidelines/cancers.aspx#breast>. Acesso em: 22April2018.

NOWELL, S. A.; AHN, J.; RAE, J. M.; SCHEYS, J. O. *et al.* Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, 91, n. 3, p. 249-258, Jun 2005.

OSBORNE, C. K.; WIEBE, V. J.; MCGUIRE, W. L.; CIOCCA, D. R. *et al.* Tamoxifen and the isomers of 4-hydroxytamoxifen in tamoxifen-resistant tumors from breast cancer patients. **J Clin Oncol**, 10, n. 2, p. 304-310, Feb 1992.

OSTERBERG, L.; BLASCHKE, T. Adherence to medication. **N Engl J Med**, 353, n. 5, p. 487-497, Aug 4 2005.

PARTRIDGE, A. H.; WANG, P. S.; WINER, E. P.; AVORN, J. Nonadherence to adjuvant tamoxifen therapy in women with primary breast cancer. **J Clin Oncol**, 21, n. 4, p. 602-606, Feb 15 2003.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, 406, n. 6797, p. 747-752, Aug 17 2000.

PERRY, R. R.; KANG, Y.; GREAVES, B. R. Relationship between tamoxifen-induced transforming growth factor beta 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. **Br J Cancer**, 72, n. 6, p. 1441-1446, Dec 1995.

PHARMVAR. **Pharmacogene Variation Consortium**. 2018. Disponível em: <https://www.pharmvar.org/>. Acesso em: April 2018.

PRADO, C. M. **Desenvolvimento de metodologia para determinação dos genótipos principais dos genes CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9: aplicação na Farmacogenética**. 2009. 141f f. (Tese de Doutorado) - Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PROVINCE, M. A.; GOETZ, M. P.; BRAUCH, H.; FLOCKHART, D. A. *et al.* CYP2D6 Genotype and Adjuvant Tamoxifen: Meta-Analysis of Heterogeneous Study Populations. **Clin Pharmacol Ther**, 95, n. 2, p. 216-227, Feb 2014.

QIAGEN. QIAmp DNA Mini and Blood Mini Handbook. : Qiagen 2012.

RAE, J. M.; DRURY, S.; HAYES, D. F.; STEARNS, V. *et al.* CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst**, 104, n. 6, p. 452-460, Mar 21 2012.

RAE, J. M.; LEYLAND-JONES, B.; REGAN, M. Response. **J Natl Cancer Inst**, 106, n. 5, Mai 2014.

RAE, J. M.; REGAN, M. M.; THIBERT, J. N.; GERSCH, C. *et al.* Concordance between CYP2D6 genotypes obtained from tumor-derived and germline DNA. **J Natl Cancer Inst**, 105, n. 17, p. 1332-1334, Set 2013.

RATAIN, M. J.; NAKAMURA, Y.; COX, N. J. CYP2D6 genotype and tamoxifen activity: understanding interstudy variability in methodological quality. **Clin Pharmacol Ther**, 94, n. 2, p. 185-187, Aug 2013.

REGAN, M. M.; LEYLAND-JONES, B.; BOUZYK, M.; PAGANI, O. *et al.* CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. **J Natl Cancer Inst**, 104, n. 6, p. 441-451, Mar 2012.

ROCHEDIAGNOSTICS. AmpliChip CYP450 Test. Doc Rev. 5.0. Mannheim: Roche Molecular Systems 2008.

SACHSE, C.; BROCKMOLLER, J.; BAUER, S.; ROOTS, I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. **Am J Hum Genet**, 60, n. 2, p. 284-295, Fev 1997.

SALADORES, P.; MURDTER, T.; ECCLES, D.; CHOWBAY, B. *et al.* Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. **Pharmacogenomics J**, 15, n. 1, p. 84-94, Feb 2015.

SALADORES, P. H.; PRECHT, J. C.; SCHROTH, W.; BRAUCH, H. *et al.* Impact of metabolizing enzymes on drug response of endocrine therapy in breast cancer. **Expert Rev Mol Diagn**, 13, n. 4, p. 349-365, Mai 2013.

SCHAEFFELER, E.; SCHWAB, M.; EICHELBAUM, M.; ZANGER, U. M. CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR. **Hum Mutat**, 22, n. 6, p. 476-485, Dez 2003.

SCHROTH, W.; ANTONIADOU, L.; FRITZ, P.; SCHWAB, M. *et al.* Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. **J Clin Oncol**, 25, n. 33, p. 5187-5193, Nov 2007.

SCHROTH, W.; GOETZ, M. P.; HAMANN, U.; FASCHING, P. A. *et al.* Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. **JAMA**, 302, n. 13, p. 1429-1436, Oct 2009.

SISTONEN, J.; SAJANTILA, A.; LAO, O.; CORANDER, J. *et al.* CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. **Pharmacogenet Genomics**, 17, n. 2, p. 93-101, Feb 2007.

SLAMON, D. J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L. A.; HOLT, J. A. *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, 244, n. 4905, p. 707-712, May 12 1989.

SOLOMON, M. D.; MAJUMDAR, S. R. Primary non-adherence of medications: lifting the veil on prescription-filling behaviors. **J Gen Intern Med**, 25, n. 4, p. 280-281, Apr 2010.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 14, p. 8418-8423, Jul 8 2003.

SPOELSTRA, S. L.; RITTENBERG, C. N. Assessment and measurement of medication adherence: oral agents for cancer. **Clin J Oncol Nurs**, 19, n. 3 Suppl, p. 47-52, Jun 2015.

STANTON, V., JR. Re: CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 trial. **J Natl Cancer Inst**, 104, n. 16, p. 1265-1266; author reply 1266-1268, Aug 22 2012.

STEARNS, V.; JOHNSON, M. D.; RAE, J. M.; MOROCHO, A. *et al.* Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. **J Natl Cancer Inst**, 95, n. 23, p. 1758-1764, Dec 2003.

TEFT, W. A.; GONG, I. Y.; DINGLE, B.; POTVIN, K. *et al.* CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. **Breast Cancer Res Treat**, 139, n. 1, p. 95-105, May 2013.

THOMPSON, A. M.; JOHNSON, A.; QUINLAN, P.; HILLMAN, G. *et al.* Comprehensive CYP2D6 genotype and adherence affect outcome in breast cancer patients treated

with tamoxifen monotherapy. **Breast Cancer Res Treat**, 125, n. 1, p. 279-287, Jan 2011.

VALLEJOS, C. S.; GOMEZ, H. L.; CRUZ, W. R.; PINTO, J. A. *et al.* Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. **Clin Breast Cancer**, 10, n. 4, p. 294-300, Aug 1 2010.

VRIJENS, B.; DE GEEST, S.; HUGHES, D. A.; PRZEMYSŁAW, K. *et al.* A new taxonomy for describing and defining adherence to medications. **Br J Clin Pharmacol**, 73, n. 5, p. 691-705, May 2012.

WEGMAN, P.; ELINGARAMI, S.; CARSTENSEN, J.; STAL, O. *et al.* Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. **Breast Cancer Res**, 9, n. 1, p. R7, 2007.

WESTLIND-JOHNSSON, A.; HERMANN, R.; HUENNEMEYER, A.; HAUNS, B. *et al.* Identification and characterization of CYP3A4*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. **Clin Pharmacol Ther**, 79, n. 4, p. 339-349, Apr 2006.

WORLDHEALTHORGANIZATION. **Adherence to long-term therapies: Evidence for action**. Geneva: World Health Organization, 2003. 92 4 154599 2.

XIE, H. G.; KIM, R. B.; WOOD, A. J.; STEIN, C. M. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 41, p. 815-850, 2001.

YAGER, J. D. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 27, p. 67-73, 2000.

YANG, X. R.; CHANG-CLAUDE, J.; GOODE, E. L.; COUCH, F. J. *et al.* Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. **J Natl Cancer Inst**, 103, n. 3, p. 250-263, Feb 2011.

YERSAL, O.; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World J Clin Oncol**, 5, n. 3, p. 412-424, Aug 10 2014.

ZANGER, U. M. The CYP2D subfamily. *In*: IOANNIDES, C. (Ed.). **Cytochromes P450: role in the metabolism and toxicity of drugs and others xenobiotics**. London: Royal Chemistry Society, 2008. p. 241-275.

ZANGER, U. M.; RAIMUNDO, S.; EICHELBAUM, M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 369, n. 1, p. 23-37, Jan 2004.

ZANGER, U. M.; TURPEINEN, M.; KLEIN, K.; SCHWAB, M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. **Anal Bioanal Chem**, 392, n. 6, p. 1093-1108, Nov 2008.

ZINEH, I.; BEITELSHEES, A. L.; GAEDIGK, A.; WALKER, J. R. *et al.* Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. **Clin Pharmacol Ther**, 76, n. 6, p. 536-544, Dez 2004.

APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DAS ENZIMAS CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 PARA METABOLIZAÇÃO DE TAMOXIFENO E CORRELAÇÃO FENOTÍPICA

Você está sendo convidada a participar desta pesquisa porque você ou outra mulher recebeu o diagnóstico de câncer de mama. Algumas pacientes com câncer de mama se beneficiam do uso de um remédio chamado tamoxifeno em algum momento do tratamento. O tamoxifeno é um bloqueador de hormônio feminino e é usado como parte do tratamento do câncer de mama naqueles tipos que crescem com estímulo de hormônios femininos. A resposta ao tamoxifeno varia de paciente para paciente e algumas podem não responder ao tratamento com este medicamento. Uma das causas em estudo para essa falta de resposta ao tamoxifeno se deve ao fato de que algumas mulheres apresentam naturalmente uma forma diferente de algumas enzimas do fígado o que pode diminuir o efeito deste remédio. Essa alteração no fígado não causa nenhum sintoma ou doença, e por isso é preciso fazer usualmente um exame genético para sabermos se você tem essa alteração ou não.

Nesta pesquisa analisaremos amostras de sangue, urina e do próprio tumor (no caso das pacientes com câncer) em dois diferentes momentos. Na primeira etapa (etapa 1) será avaliado o material genético obtido de uma amostra de sangue e do tumor da mama de mulheres diagnosticadas com câncer de mama atendidas pelo Serviço de Ginecologia e Mama e pelo Serviço de Oncologia Clínica deste hospital.

Em uma segunda etapa (etapa 2), das pacientes que forem iniciar o uso do tamoxifeno, amostras de sangue e urina serão coletadas antes e após o início do tratamento para verificarmos quanto do medicamento estará sendo excretado.

Para análise dos resultados também um grupo de voluntárias saudáveis (o que pode ser o seu caso), participante do estudo fornecendo um amostra de sangue.

Embora já existam alguns estudos em andamento em outros países sobre este tema, ainda não existem muitos estudos no Brasil; também ainda não existe nenhuma determinação para mudar o tratamento com tamoxifeno mesmo nas pessoas com essa alteração enzimática no fígado. Dessa forma, este estudo não implicará em nenhuma mudança no tratamento que seu médico prescrever.

Para que você possa decidir se quer participar deste estudo, a seguir serão esclarecidos os objetivos da pesquisa que será feita no seu material genético, a fim de que todas as informações importantes sejam explicadas. Assim, você poderá tomar sua decisão conhecendo todos os benefícios, riscos e implicações que possam ocorrer devido à pesquisa. Caso tenha alguma dúvida ou não tenha entendido algo, por favor, pergunte novamente até que tenha compreendido tudo.

Esclarecemos ainda que você é livre em decidir se gostaria de participar apenas da etapa 1, ou se, caso preencha os critérios para participar da etapa 2, gostaria de participar das duas etapas (etapa 1 e etapa 2).

OBJETIVO DO ESTUDO

Será feita uma análise genética no tecido do tumor da mama (apenas das pacientes com diagnóstico de câncer de mama) e do seu sangue. Através da análise deste material tentaremos descobrir alterações genéticas que possam estar associadas a uma resposta adequada ou não, relacionada ao uso do tamoxifeno. Mulheres que apresentam alterações nas enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5, podem ter efeitos diferentes com o tratamento com o medicamento tamoxifeno. O objetivo deste estudo é identificar a frequência que estas alterações ocorrem em mulheres brasileiras que apresentam câncer de mama e fazem uso de tamoxifeno, e assim correlacionar estas alterações com o tipo de resposta que apresentarão ao tratamento. Também temos como objetivo identificar biomarcadores de resposta ao tratamento para o câncer de mama.

TCLE v2.0 de 26 de julho de 2014 – CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 mama HEG

você não assine este Termo de Consentimento. Seu acompanhamento ou tratamento não será modificado pelo fato de você não querer participar deste estudo.

RISCOS

O seu tratamento e acompanhamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A obtenção da amostra do tecido do tumor da mama que está arquivado, não oferecerá riscos a você. Para a obtenção da amostra de sangue poderá haver algum desconforto no local da coleta, como dor leve ou um pequeno hematoma (mancha rosa) que devem sumir em algumas horas ou em poucos dias. Esclarecemos que caso não aceite mais participar do estudo é garantida sua liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

BENEFÍCIOS

Esta pesquisa será importante para avaliar a frequência destas alterações genéticas em mulheres brasileiras com câncer de mama e entender se estas alterações relacionam-se a uma resposta ideal ou pior ao uso do tamoxifeno. Inicialmente, a pesquisa não trará nenhum benefício para você. Algumas pesquisas recentes apontam que alguns tipos de alterações genéticas do gene em estudo podem definir se o paciente terá ou não boa resposta ao tamoxifeno, e aquelas que apresentam alterações genéticas poderiam ser candidatas a terapias alternativas inicialmente, porém esses resultados ainda precisam ser comprovados.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSABILIDADES

O seu médico será informado e terá acesso a todos os resultados desta pesquisa, e poderá informá-la dos resultados caso você deseje.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

É importante que você saiba que os registros médicos e resultados desta pesquisa estarão disponíveis para serem consultados apenas pela equipe de saúde que cuidará de você, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, além da equipe de pesquisadores envolvidos.

Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos. Durante toda a condução do estudo você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

CUSTOS

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida e as amostras já coletadas serão descartadas.

TCLE v2.0 de 26 de julho de 2014 – CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 mama HEG

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Para participar do estudo você deverá fornecer amostras de sangue e do tecido mamário para a realização dos testes genéticos. O material genético será extraído do tecido do tumor da mama e do sangue e, através de técnicas de laboratório, será feita a pesquisa de alterações genéticas. **Importante:** O material da mama será obtido do material utilizado previamente para seu diagnóstico nesta instituição. **Uma nova coleta para o estudo não será necessária.**

Em um outro momento solicitaremos que, após ter recebido a indicação médica de tratamento com o medicamento tamoxifeno, você participe de uma nova coleta de material. Coletaremos amostras de sangue e urina durante o primeiro ano de tratamento com tamoxifeno (antes do uso, 3 meses, 6 meses e 12 meses após início do uso da medicação), para sabermos quanto dele foi metabolizado e excretado. Nestes dias de coleta você deverá estar em jejum por pelo menos 4 horas e não deverá ter feito uso de qualquer bebida alcoólica. Estas coletas de sangue também serão utilizadas para monitoramento da sua função hepática, por meio da dosagens dos níveis de bilirrubinas e do seu perfil lipídico (triglicéridos e colesterol).

Caso você seja uma voluntária saudável convidada a participar deste estudo, os procedimentos realizados serão apenas a coleta de sangue para o teste genético e para monitoramento da sua função hepática, por meio da dosagens dos níveis de bilirrubinas e do seu perfil lipídico (triglicéridos e colesterol). Os exames de sangue para avaliação dos níveis de bilirrubinas e perfil lipídico serão realizados no início de sua participação no estudo, 3 meses, 6 meses e 12 meses após você ter assinado este documento.

A coleta de sangue é feita na veia do braço com uma agulha, sendo retirado o equivalente a uma colher de sopa de sangue para o teste.

Os testes genéticos serão realizados no Instituto de Farmacologia Clínica Dr. Margarette Fischer-Bosch, em Stuttgart na Alemanha, e será utilizado exclusivamente para esta pesquisa. Após as análises o material será retornado ao Brasil e seu material genético ficará armazenado nos Hospital Erasto Gaertner. Caso haja necessidade de alguma outra avaliação, você será recontatada para uma nova autorização, após devida aprovação do comitê de ética.

Os demais ensaios serão realizados no laboratório de análise clínicas do próprio Hospital Erasto Gaertner.

Além dos dados citados acima, serão coletadas algumas informações sobre sua doença (se for o caso) e os medicamentos dos quais faz uso. Para tal solicitaremos que você participe de uma breve entrevista ao assinar este documento e demais informações serão coletadas do seu prontuário e com seu médico. Coletaremos dados tais como idade, sexo, histórico reprodutivo, localização do tumor, tipo do tumor, e tratamentos que você já fez.

Durante o seu primeiro ano de uso do medicamento tamoxifeno serão realizadas entrevistas periódicas e uma consulta com a equipe clínica do estudo (ao início, 3 meses, 6 meses e 12 meses após a primeira dose de tamoxifeno) para determinar se você vem tomando a medicação de modo adequado ou se você tem alguma queixa relacionada ao uso da medicação.

Todas informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Se você concordar em participar desse estudo, o seu médico fará uma solicitação ao laboratório de patologia dos blocos de parafina do tumor de mama para uma revisão das lâminas.

Você será acompanhada quanto ao seu tratamento pela equipe médica da instituição e continuará realizando suas consultas e exames laboratoriais conforme rotina da instituição e curso do seu tratamento.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não existem métodos alternativos a sua participação neste estudo. Caso você não queira participar, nenhuma amostra será coletada ou analisada, bastando para isso, que

TCLE v2.0 de 26 de julho de 2014 – CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 mama HEG

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para o Dr. Jose Claudio Casali da Rocha, Dra Thais Abreu de Almeida ou para a Dra Jeanine Nardin no telefone (41) 3361-5297 ou (41) 3361-5196. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com um contato imparcial, o CEP do Hospital Erasto Gaertner, situado à Rua Dr Ovande do Amaral, 201, Jardim das Américas, Curitiba/PR, telefones (41) 3361-5166, ou também pelo e-mail: cep@pcc.org.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Acredito ter sido suficientemente esclarecida a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DAS ENZIMAS CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 PARA METABOLIZAÇÃO DE TAMOXIFENO E CORRELAÇÃO FENOTÍPICA".

Eu discuti com a equipe do estudo sobre a minha decisão em participar nesse estudo e fica decidido por mim participar:

apenas da etapa 1 deste estudo.

tanto da etapa 1, como da etapa 2 deste estudo, caso eu venha a fazer uso do tamoxifeno e preencha os critérios para participação da etapa 2.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo. Entendo que poderei ser submetido a exames de sangue adicionais aos necessários a meu tratamento e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma via assinada deste formulário de consentimento.

Assinatura do paciente/representante legal _____ Data ____/____/____

Assinatura da testemunha _____ Data ____/____/____

Assinatura do Pesquisador Principal _____ Data ____/____/____

TCLE v2.0 de 26 de julho de 2014 – CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 mama HEG

MÊS: |__| Mês 3 |__| Mês 6 |__| Mês 12 |__| INICIAIS: _____ PRONTUÁRIO: _____ Nº: _____

Q.5 – REAÇÃO ADVERSA / MEDICAÇÕES / QUESTIONÁRIO DE MOKISKY

MÊS: |__| Mês 3 |__| Mês 6 |__| Mês 12 |__| INICIAIS: _____ PRONTUÁRIO: _____ Nº: _____

I. REAÇÃO ADVERSA AO MEDICAMENTO

- I. Apresentou alguma reação adversa ao Tamoxifeno? Início do tamoxifeno ____/____/____
1. Sim
2. Não

B. Quali:	C. Início da reação	D. Tempo de reação	E. Tratamento
1. Fogachos			
2. Retenção de líquidos			
3. Náusea/Vômito			
4. Fadiga			
5. Eventos tromboembólicos			
6. Elevação dos níveis de triglicérides			
7.1 Alt. hepáticas (elevação bilirrubinas totais)			
7.2 Alt. hepáticas (elevação proteínas totais)			
7.3 Alt. hepáticas (elevação albumina)			
8. Alteração nível colesterol			
9.1 Outra			
9.2 Outra			
9.3 Outra			

II. MEDICAMENTOS EM USO

- A. Está em uso de alguma medicação?

1. Sim
2. Não

- B. Qual(is) medicamento(s) está em uso? (Incluir complexo vitamínico)

Medicamento	Dose	Unidade	Frequência
		1= mg	1 = OD (1 vez ao dia – 24h)
		2= UI	2 = BID (2 vezes ao dia – 12/12h)
		3 = ml	3 = TID (3 vezes ao dia – 8/8h)
		4= spray	4 = 6/6h
		5 = aplicação (pomada)	5 = a critério médico/se necessário
		6 = gotas	6 = outro
		7 = cp/cap	
		8 = mg	
		9 = outro	
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			

(se alguma medicação estiver na tabela abaixo, circular o nome na tabela ANEXO 1)

1

III. ADEÇÃO (AO TAMOXIFENO)

A. Teste de Morisky

Perguntas	1. SIM	2. NÃO
Você alguma vez esquece de tomar o medicamento?		
Você, as vezes, é descuidado quanto ao horário de tomar o seu medicamento?		
Quando você se sente bem, alguma vez, você deixa de tomar seu medicamento?		
Quando você se sente mal com o medicamento, deixa de tomá-lo?		

Resultado do Teste:

1. Alta (0 respostas SIM)
2. Média (1-2 respostas SIM)
3. Baixa (3-4 respostas SIM)

IV. ORIENTAÇÃO DE USO DO TAMOXIFENO

- A. Você recebeu alguma orientação ao início do tratamento com tamoxifeno?

1. Sim
2. Não

- B. Se sim, de quem? _____

2

LIGA PARANAENSE DE
COMBATE AO CÂNCER



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DAS ENZIMAS CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 PARA METABOLIZAÇÃO DE TAMOXIFENO E CORRELAÇÃO FENOTÍPICA

Pesquisador: JOSE CLAUDIO CASALI DA ROCHA

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

Versão: 1

CAAE: 28274714.6.0000.0098

Instituição Proponente: LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CANCER

Patrocinador Principal: BIOGEN - LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E HISTOCOMPATIBILIDADE LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 611.630

Data da Relatoria: 10/04/2014

Apresentação do Projeto:

Ciente.

Objetivo da Pesquisa:

Ciente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ciente.

Recomendações:

Ciente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ciente.

Endereço: Rua Dr. Ovarde do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3218-0324
CEP: 81.520-060
E-mail: cep@lppcc.org.br

Página 01 de 03

LIGA PARANAENSE DE
COMBATE AO CÂNCER



Continuação do Parecer: 611.630

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Curitiba, 01 de Abril de 2014.

José Claudio Casali da Rocha

Pesquisador Responsável

Prezado (a) Pesquisador,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como: "Determinação do genótipo das enzimas CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4 E CYP3A5 para metabolização de tamoxifeno e correlação fenotípica," cujo número de protocolo é P.P. nº 2321, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e ficou APROVADO.

Sem mais para o momento, agradecemos à atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.
Atenciosamente,

Coordenador do CEP
Dr. Jordan Zanetti Silva

Endereço: Rua Dr. Ovarde do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3218-0324
CEP: 81.520-060
E-mail: cep@lppcc.org.br

Página 02 de 03

LIGA PARANAENSE DE
COMBATE AO CÂNCER



Continuação do Parecer: 611.630

CURITIBA, 10 de Abril de 2014

Assinado por:
Jordan Zanetti Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Dr. Ovarde do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3218-0324
CEP: 81.520-060
E-mail: cep@lppcc.org.br

Página 03 de 03



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DAS ENZIMAS CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 PARA METABOLIZAÇÃO DO TAMOXIFENO E CORRELAÇÃO FENOTÍPICA

Pesquisador: JOSE CLAUDIO CASALI DA ROCHA

Área Temática: Genética Humana:
(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro.);

Versão: 2

CAAE: 28274714.6.0000.0098

Instituição Proponente: LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CANCER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 812.732

Data da Relatoria: 23/09/2014

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto foi satisfatório.

A apresentação do projeto foi de Acordo.

Objetivo da Pesquisa:

Não se Aplica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se Aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se Aplica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se Aplica

Recomendações:

Não se Aplica

Endereço: Rua Dr. Ovideu do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3218-0324
CEP: 81.520-060
E-mail: cep@pcc.org.br

Página 01 de 02



Continuação do Parecer: 812.732

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se Aplica

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

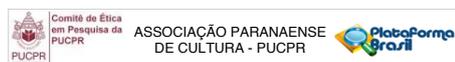
O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

CURITIBA, 06 de Outubro de 2014

Assinado por:
Jordan Zanetti Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Dr. Ovideu do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3218-0324
CEP: 81.520-060
E-mail: cep@pcc.org.br

Página 02 de 02



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DAS ENZIMAS CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 PARA METABOLIZAÇÃO DE TAMOXIFENO E CORRELAÇÃO FENOTÍPICA

Pesquisador: JOSE CLAUDIO CASALI DA ROCHA

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

Versão: 1

CAAE: 28274714.6.3001.0020

Instituição Proponente: LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CANCER

Patrocinador Principal: BIOGEN - LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E HISTOCOMPATIBILIDADE LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 679.837

Data da Relatoria: 04/06/2014

Apresentação do Projeto:

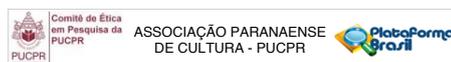
O projeto a ser realizado será um estudo de campo prospectivo, experimental, descritivo e quantitativo, realizado entre abril de 2014 a dezembro de 2014. A proposta do estudo é verificar a frequência dos genótipos das enzimas CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 na população de mulheres com câncer de mama da principal instituição oncológica de Curitiba-Pr. Também será desenvolvido um padrão de análise fenotípica de tais enzimas, a partir do perfil de metabolização do tamoxifeno. Para tal, o estudo será realizado em duas etapas. Na primeira etapa pacientes casos novos, portadoras de câncer de mama, serão genotipadas quanto aos alelos das enzimas de metabolização do tamoxifeno, sendo os fenótipos classificados entre: metabolizadores ultra rápidos (UM), rápidos (EM), intermediários (IM) e fracos (FM), e assim a frequência de cada perfil determinada para a população alvo.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a frequência dos genótipos das enzimas CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 na população de mulheres com câncer de mama de um hospital oncológico e desenvolver um padrão de análise fenotípica de tais enzimas para a metabolização do tamoxifeno conforme expressão

Endereço: Rua Inaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2252 **Fax:** (41)3271-2292
CEP: 80.215-901
E-mail: nep@pucpr.br

Página 01 de 03



Continuação do Parecer: 679.837

genotípica da mesmas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios apresentados estão adequados e de acordo com a resolução 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A metodologia e objetivos apresentados estão adequados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados e estão de acordo com a resolução 466/12.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

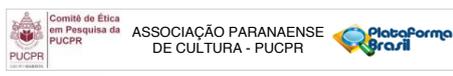
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/12, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP/PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Endereço: Rua Inaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2252 **Fax:** (41)3271-2292
CEP: 80.215-901
E-mail: nep@pucpr.br

Página 02 de 03



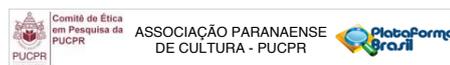
Continuação do Parecer: 679.637

CURITIBA, 09 de Junho de 2014

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
 (Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2292 Fax: (41)3271-2292 E-mail: nep@pucpr.br

Página 02 de 03



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
 Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DAS ENZIMAS CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 PARA METABOLIZAÇÃO DO TAMOXIFENO E CORRELAÇÃO FENOTÍPICA

Pesquisador: JOSE CLAUDIO CASALI DA ROCHA

Área Temática: Genética Humana:
 (Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro.);

Versão: 2

CAAE: 28274714.6.3001.0020

Instituição Proponente: LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CANCER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.007.990

Data da Relatoria: 25/03/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto a ser realizado será um estudo de campo prospectivo, experimental, descritivo e quantitativo, realizado entre abril de 2014 a dezembro de 2015. A proposta do estudo é verificar a frequência dos genótipos das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 na população de mulheres com câncer de mama da principal instituição oncológica de Curitiba-Pr.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

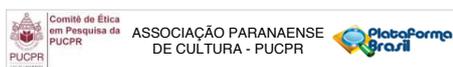
Avaliar a frequência dos genótipos das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 na população de mulheres com câncer de mama de um hospital oncológico e desenvolver um padrão de análise fenotípica de tais enzimas para a metabolização do tamoxifeno conforme expressão genotípica da mesmas.

Objetivo Secundário:

• determinar a frequência dos diferentes alelos polimórficos das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 em pacientes com câncer de mama; • classificar as pacientes quanto ao perfil fenotípico da metabolização do tamoxifeno (metabolizadores ultra rápidos - UM, rápidos

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br

Página 01 de 03



Continuação do Parecer: 1.007.990

- EM, intermediários - IM e fracos - PM); • correlacionar o genótipo das enzimas metabolizadoras do tamoxifeno com o perfil clínico, histopatológico e de subtipos moleculares definidos por imunistoquímica na população de mulheres com câncer de mama. • identificar biomarcadores úteis para determinação de fatores prognósticos e fatores preditivos de tratamento de diferentes subtipos de câncer de mama. • determinar os níveis de tamoxifeno e seus metabólitos em plasma humano e urina. • comparar os níveis de tamoxifeno e seus metabólitos encontrados no plasma e urina conforme os fabricantes do medicamento utilizado pela paciente (medicamento de referência x similares disponíveis no mercado brasileiro). • validar uma metodologia analítica para a determinação dos níveis do fármaco marcador da metabolização do tamoxifeno (dextrometorfano) em plasma humano e urina. • correlacionar o perfil de metabolização dos fármacos testados com a frequência genotípica das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5. • acompanhar clinicamente os resultados de tratamento das paciente genotipadas por 5 anos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não disponibilidade do material para análise durante o seguimento das pacientes.

Benefícios:

A realização deste trabalho permitirá à instituição conhecer um importante dado epidemiológico quanto ao perfil de metabolização do principal fármaco hormonal utilizado pela população de pacientes com câncer de mama tratadas na instituição. Tais dados permitirão um manejo mais adequado em tratamentos futuros. A análise com o fármaco dextrometorfano também permitirá o estabelecimento de técnica de baixo custo para análise do perfil fenotípico de metabolização do tamoxifeno, permitindo a disponibilização do teste a um maior número de pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa relevante, metodologicamente adequado; aprovado no CEP de origem e também pela CONEP

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Claro, objetivo, preserva o sujeito de pesquisa.

Recomendações:

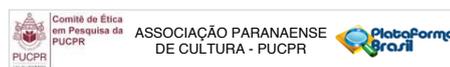
Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa aprovado.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br

Página 02 de 03



Continuação do Parecer: 1.007.990

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação de CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CURITIBA, 01 de Abril de 2015

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
 (Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br

Página 03 de 03

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DAS ENZIMAS CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 PARA METABOLIZAÇÃO DO TAMOXIFENO E CORRELAÇÃO FENOTÍPICA

Pesquisador: JOSE CLAUDIO CASALI DA ROCHA

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro.);

Versão: 3

CAAE: 28274714.6.0000.0098

Instituição Proponente: LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CANCER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 894.864

Data da Relatório: 23/11/2014

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, 25% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontam para mais de 57 mil casos novos de câncer de mama, sendo o câncer mais incidente entre as mulheres. Apesar de ser considerado o câncer relativamente de bom prognóstico quando diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. Na população de países desenvolvidos, a sobrevivência média após cinco anos apresenta um discreto aumento, cerca de 85%. Entretanto, naqueles em desenvolvimento, a sobrevivência ainda é baixa, em torno de 60%. Dentro os fatores de bom prognóstico no câncer de mama está a expressão de receptores de estrogênio (ER) e de progesterona (PR) no tecido tumoral. Cerca de 2/3 dos cânceres de mama são ER e/ou PR positivos, que são importantes fatores preditivos de resposta à hormonioterapia. Atualmente, um dos tratamentos para tais pacientes é o tratamento hormonal, que se baseia no uso de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte
UF, DF: Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878
E-mail: conep@saude.gov.br

Página 01 de 10

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 894.864

moduladores seletivos de receptor de estrogênio (SERM), como o tamoxifeno, inibidores da enzima aromatase e dos análogos do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH). O tamoxifeno é usado no tratamento de câncer de mama metastático, na prevenção de doença em mulheres de alto risco e em mulheres com carcinoma ductal in situ. A resposta clínica ao tamoxifeno varia entre as pacientes e aproximadamente 35% daquelas com câncer de mama ER positivo não respondem ao tratamento com tamoxifeno. Nos últimos 20 anos, avanços na compreensão das múltiplas etapas da carcinogênese e de alterações genéticas ocorreram no campo do diagnóstico, tratamento e prevenção do câncer de mama. O conhecimento dos fatores de risco relacionados a doença é um dos primeiros passos para o entendimento desta patologia. Dentro os fatores associados ao aumento do risco de câncer de mama estão a idade, história familiar, exposição a hormônios reprodutivos femininos (tanto endógeno como exógeno), fatores dietéticos, doença benigna da mama e fatores ambientais e genéticos. A exposição prolongada a níveis elevados de estrogênio é um dos principais fatores de risco conhecidos para o câncer de mama, devido à atividade mitótica deste hormônio nas células mamárias e à produção de metabólitos carcinogênicos. Desta forma, postula-se que os polimorfismos em genes que afetam os níveis de estrogênio podem aumentar o risco de câncer de mama e estarem relacionados a diferentes perfis de incidência desta patologia. A família do citocromo P450 (CYP), por exemplo, desempenha importante função no metabolismo do estrogênio, de medicamentos e de carcinógenos ambientais. Os genes dessas famílias são altamente polimórficos, compostos por diferentes alelos, que se traduzem em fenótipos com capacidades enzimáticas distintas e que podem também conferir risco tumoral. Estes fenótipos distintos também podem alterar a forma com que cada organismo metaboliza os diferentes fármacos utilizados no tratamento do câncer, como o próprio tamoxifeno, que também sofre a ação da família enzimática do citocromo P450, produzindo o endoxifeno, seu metabólito mais ativo sobre as células tumorais. As questões referentes ao polimorfismo das enzimas metabolizadoras dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer de mama tem sido um dos principais temas debatidos nos últimos anos. Medicamentos como o tamoxifeno e as moléculas pertencentes ao complexo enzimático do citocromo P450, como a CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5, têm tido especial atenção nas publicações referentes às respostas terapêuticas frente aos tratamentos realizados com esta terapia hormonal. O tamoxifeno é o mais antigo fármaco utilizado na hormonioterapia adjuvante, neoadjuvante e paliativa para o câncer de mama, pertence à classe dos SERM e seu mecanismo de ação se deve à inibição competitiva do receptor de estrogênio (ER). É o agente mais estudado como terapia endócrina adjuvante no câncer de mama tanto em mulheres pré como pós-menopausadas. Dados

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte
UF, DF: Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878
E-mail: conep@saude.gov.br

Página 02 de 10

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 894.864

do grupo The Early Breast Cancer Trialists' Group, que teve um seguimento de 15 anos e incluiu mais de 80.000 mulheres, demonstraram que o tamoxifeno administrado por cinco anos resulta em redução de 41% na taxa anual de recorrência por câncer de mama (HR 0.59) e 34% de redução no risco de morte anual (HR 0.66) para mulheres ER positivo. O ganho associado ao uso de tamoxifeno é atingido independente da idade da paciente, do status menopausal, ou do que se refere ao tratamento com ou sem quimioterapia adjuvante, e contribui com o aumento da sobrevivência observado nos 15 anos de seguimento. A duração ótima da terapia hormonal com o tamoxifeno tem sido de no mínimo cinco anos, apesar de dados mais recentes já indicarem o uso do medicamento por pelo menos 10 anos. Apesar de tais dados, um número considerável de pacientes positivas para os receptores hormonais, parecem não apresentar benefício algum da terapia com o tamoxifeno ou mesmo desenvolvem, em níveis mais elevados, eventos adversos relacionados ao tamoxifeno. Apesar da ação antiestrogênica do tamoxifeno na mama, é a sua propriedade estrogênica que é responsável pelos efeitos adversos. Mulheres recebendo tamoxifeno apresentam risco maior de câncer de endométrio, maior risco de toxicidade na retina, levando a um aumento no risco de catarata, além do tamoxifeno predispõe a uma maior chance de desenvolvimento de fenômenos tromboembólicos. A resposta clínica ao tamoxifeno varia de paciente para paciente e, como já citado, aproximadamente 35% das pacientes com câncer de mama receptor estrogênio positivo não responderão ao tratamento com tamoxifeno. As razões para respostas diferenciadas são multifatoriais, como interações medicamentosas ou fatores genéticos que afetem o perfil de atividade ou expressão de enzimas metabolizadoras envolvidas na ativação e excreção do medicamento. O tamoxifeno é um pró-fármaco que em si apresenta uma baixa afinidade aos receptores de estrogênio. A via de metabolização do tamoxifeno é catalizada por várias enzimas (CYPs) do citocromo P450. O endoxifeno, o metabólito ativo mais abundante e com potencial antiestrogênico maior quando comparado ao tamoxifeno, é primariamente produzido pela biotransformação do tamoxifeno a N-desmetil-tamoxifeno pelas CYP3A4 e CYP3A5, e subsequente metabolizado exclusivamente pela CYP2D6 a 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (endoxifeno). A CYP2D6 é produto de um gene altamente polimórfico com mais de 100 alelos variantes conhecidos, muitos dos quais resultam em atividades enzimáticas diferenciadas. Enquanto os alelos mais prevalentes são o CYP2D6*1 e *2 (ambos denominados selvagens ou wild-type), os quais produzem enzimas com atividade normal, existem outras variantes alélicas que ocasionam enzimas com atividade reduzida ou ausente. A atividade reduzida da enzima CYP2D6 foi avaliada em inúmeros estudos farmacocinéticos e está associada a níveis plasmáticos baixos dos metabólitos ativos do tamoxifeno, influenciando a eficácia do tratamento

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte
UF, DF: Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878
E-mail: conep@saude.gov.br

Página 03 de 10

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 894.864

de mulheres com câncer de mama metastático. Com base em estudos in vitro e in vivo, os alelos variantes da CYP2D6 podem ser diferenciados em 4 subgrupos de acordo com a atividade enzimática: alelos de atividade aumentada, alelos funcionantes normais, alelos de atividade reduzida ou alelos sem atividade. Conforme a combinação dos diferentes alelos 4 fenótipos de metabolização pode ser definidos: metabolizadores ultra rápidos (UM), rápidos (EM), intermediários (IM) e fracos (PM). Indivíduos com dois alelos nulos são classificados como metabolizadores fracos ou pobres metabolizadores (PM), com ocorrência em 5-10% dos caucásianos. Os alelos CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, e CYP2D6*6 são nulos, ocasionam o fenótipo PM e são responsáveis por aproximadamente 95% dos PMs caucásianos. Pacientes classificados como PMs apresentam baixos níveis plasmáticos de endoxifeno e resultados clínicos piores quando tratados com tamoxifeno. Embora a frequência dos metabolizadores fracos em asiáticos seja muito menor (1%), a presença do alelo CYP2D6*10, que causa substituição de um aminoácido no produto do gene, resulta em instabilidade da proteína alterando sua função, e foi observada em uma frequência de 40-50% naquela população. A prevalência dos alelos de CYP2D6 associados ao fenótipo PM, definida tanto pela função metabólica como pela detecção de dois alelos não-funcionantes, foi descrita em várias populações. Sua prevalência é de 7-10% em caucásianos do Norte Europeu, 1,9-7,3% em afro-americanos e menos de 1% na maior parte da população asiática. O fenótipo PM em brancos ocorre principalmente devido às variantes não-funcionais CYP2D6*3 e *4. Nos afro-americanos e nos asiáticos a variante não-funcionante é o alelo *5, presente em pelo menos 6% da população. A influência da ação metabólica da CYP2D6 na eficácia terapêutica do tamoxifeno tem sido alvo das pesquisas atuais. Inúmeros estudos mostram que a concentração plasmática de metabólitos como o endoxifeno está associada ao genótipo da CYP2D6 e ao polimorfismo de outras enzimas relacionadas ao metabolismo do tamoxifeno, como a CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e o CYP3A5, que também podem interferir na resposta terapêutica. As frequências alélicas de CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 em pacientes com câncer de mama ainda são desconhecidas no Brasil. A relação entre um perfil genotípico diferenciado e uma resposta terapêutica abaixo do esperado já foi estabelecido, contudo métodos de baixo custo, quando comparados às técnicas de genotipagem, e fáceis de serem executadas, podem ser desenvolvidos com o intuito de facilitar a determinação dos fenótipos de metabolização do tamoxifeno. Pacientes com o fenótipo PM poderiam se beneficiar de tratamentos alternativos e evitar a exposição desnecessária ao tamoxifeno. Ainda, a identificação de biomarcadores pode ser útil para determinar prognóstico e fatores preditivos de resposta a determinado tratamento. O câncer de mama - por ser uma doença heterogênea (tumores com receptores hormonais positivos

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte
UF, DF: Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878
E-mail: conep@saude.gov.br

Página 04 de 10

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 894.864

e tumores triplo negativos – negativos para receptores hormonais e para o HER2) com diferentes mecanismos biológicos, muitos deles ainda desconhecidos - requer diferentes esquemas de tratamento, tais como terapia hormonal para pacientes com ER positivo ou quimioterapia para pacientes com tumores triplo negativos. Por tal razão, faz-se necessária a identificação de biomarcadores nos mais variados subtipos de câncer de mama. Assim, biomarcadores identificados em estudos farmacogenéticos e a identificação de microRNAs marcadores da predição de falha de resposta em pacientes ER positivos e até mesmo pacientes com tumores triplo negativos, podem alterar o curso de tratamento e resposta da doença.

HIPÓTESE

De acordo com os dados atualmente disponíveis na literatura, se as mulheres estudadas na instituição de escolha apresentarem a mesma frequência genotípica dos polimorfismos das CYPs metabolizadoras do tamoxifeno citadas nas publicações da área, um considerável grupo de pacientes (de 7 a 10%) das mulheres apresentarão alguma alteração quanto ao perfil metabólico do tamoxifeno. Ainda, se o medicamento dextrometorfano (DMT) apresentar uma significativa correlação metabólica com o genótipo das pacientes, ele poderá ser utilizado como forma de mapeamento fenotípico de pacientes com câncer de mama sem a necessidade de um teste laboratorial genético para determinação do fenótipo de metabolização do tamoxifeno.

METODOLOGIA

Classificação do tipo de pesquisa e desenho geral do estudo: O projeto a ser realizado será um estudo de campo prospectivo, experimental, descritivo e quantitativo, realizado entre abril de 2014 a dezembro de 2019. A proposta do estudo é verificar a frequência dos genótipos das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 na população de mulheres com câncer de mama da principal instituição oncológica de Curitiba-PR. Também será desenvolvido um padrão de análise fenotípica de tais enzimas, a partir do perfil de metabolização do tamoxifeno. Para tal, o estudo será realizado em duas etapas. Na primeira etapa pacientes casos novos, portadoras de câncer de mama, serão genotipadas quanto aos alelos das enzimas de metabolização do tamoxifeno, sendo os fenótipos classificados entre: metabolizadores ultra rápidos (UM), rápidos (EM), intermediários (IM) e fracos (FM), e assim a frequência de cada perfil determinada para a população alvo. Uma vez identificados o perfil genotípico de cada paciente e o seu fenótipo, um subgrupo das pacientes de cada classificação e que tenham indicação de uso de tamoxifeno será formado (espera-se que aproximadamente 2/3 da população genotipada seja RE positiva e tenha

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

Página 05 de 10

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 894.864

indicação de uso de tamoxifeno). Estas pacientes serão convidadas a participar da segunda etapa do estudo, tal etapa também contará com a participação de um grupo controle composto por 60 voluntárias saudáveis (também genotipadas previamente). Na segunda etapa do estudo, tanto a metabolização do tamoxifeno como a de um fármaco de venda livre, com semelhante via de metabolização e baixo perfil de toxicidade, o fármaco dextrometorfano (Benalet TSC), serão avaliados. Para as pacientes com câncer de mama, quando seu tratamento com o tamoxifeno for iniciado, o fármaco após administrado será monitorado quanto a sua concentração plasmática e urinária durante o primeiro ano de tratamento. Também para 60 destas pacientes, assim como para as voluntárias saudáveis, será administrado uma única dose do dextrometorfano (30 mg) e, 3 horas após a administração, será monitorado quanto à sua concentração plasmática e urinária. Os dados de metabolização de ambos os fármacos serão correlacionados com o perfil genotípico de cada indivíduo, com o intuito de se obter uma metodologia alternativa de predição do perfil de metabolização do tamoxifeno, sem a necessidade de uma avaliação genética. O medicamento tamoxifeno não será administrado às voluntárias saudáveis por razões de segurança. Casuística: Para a primeira etapa do estudo serão selecionadas aproximadamente 300 mulheres portadoras de câncer de mama em qualquer estágio e recém-diagnosticadas durante o ano de 2014 que forem atendidas pelo Serviço de Ginecologia e Mama do Hospital Erasto Gaerter. As pacientes serão abordadas pela equipe clínica do estudo durante seu atendimento no respectivo serviço, sendo então esclarecidas sobre os objetivos do estudo e convidadas a participar do mesmo. Segundo o serviço de estatística da instituição, durante o ano de 2013 foram encaminhados 780 casos para o Serviço de Ginecologia e Mama e, de acordo com os dados mais recentes do Registro Hospitalar de Câncer da instituição, 50% dos casos encaminhados ao serviço confirmam diagnóstico para câncer de mama. Assim, espera-se que, durante um período de 12 meses, um mínimo de 80% dos casos novos atendidos na instituição sejam incluídos neste estudo. Das pacientes incluídas na primeira etapa, todas as pacientes com perfil histológico positivo para o receptor de estrogênio e que tenham indicação de uso de tamoxifeno na ocasião por indicação clínica, serão subdivididas de acordo com o fenótipo metabolizador definido pelo genótipo das enzimas em estudo (UM, EM, IM e FM) e serão convidadas para a segunda etapa. Também serão incluídas na pesquisa 60 voluntárias saudáveis para a segunda etapa do estudo.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Etapa 1:

- portadoras de câncer de mama em qualquer estágio, recém diagnosticadas;

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

Página 06 de 10

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 894.864

- indivíduos do sexo feminino na pré e pós-menopausa;
- pacientes com qualquer subtipo histológico, molecular ou qualquer status de receptor hormonal de câncer de mama;
- disponibilidade do bloco de parafina da biópsia do diagnóstico inicial.

Etapa 2:

- grupo de casos: o pacientes portadoras de câncer de mama, genotipadas na etapa 1 e sub-classificadas para um dos quatro padrões fenotípicos (UM, EM, IM e FM); o pacientes cujo status hormonal seja positivo para ER e que tenham indicação de tratamento com tamoxifeno.

- grupo controle: o voluntárias saudáveis (indivíduos que atendam aos critérios para doação de sangue em agências transfusionais de acordo com a portaria do Ministério da Saúde n. 1353 de 13 de junho de 2011); o voluntários que aceitem serem genotipadas em procedimento semelhante a etapa 1.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Etapa 1:

- pacientes que já tenham iniciado qualquer terapia anticâncer de caráter farmacológico ou sistêmico;
- pacientes que desenvolvam ou possuam história de segundo tumor primário não relacionado ao uso de tamoxifeno.

- indivíduos em uso de quaisquer medicamentos indutores ou inibidores das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5.

Etapa 2:

- pacientes ou voluntárias sabidamente grávidas;
- indivíduos em uso de quaisquer medicamentos indutores ou inibidores das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a frequência dos genótipos das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 na população de mulheres com câncer de mama de um hospital oncológico e desenvolver um padrão de análise fenotípica de tais enzimas para a metabolização do tamoxifeno conforme expressão genotípica da mesmas.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- determinar a frequência dos diferentes alelos polimórficos das enzimas CYP2D6, CYP2C9,

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

Página 07 de 10

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 894.864

- CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5 em pacientes com câncer de mama;
- classificar as pacientes quanto ao perfil fenotípico da metabolização do tamoxifeno (metabolizadores ultra rápidos - UM, rápidos - EM, intermediários - IM e fracos - FM);
- correlacionar o genótipo das enzimas metabolizadoras do tamoxifeno com o perfil clínico, histopatológico e de subtipos moleculares definidos por imunistoquímica na população de mulheres com câncer de mama.
- identificar biomarcadores úteis para determinação de fatores prognósticos e fatores preditivos de tratamento de diferentes subtipos de câncer de mama.
- determinar os níveis de tamoxifeno e seus metabólitos em plasma humano e urina.
- comparar os níveis de tamoxifeno e seus metabólitos encontrados no plasma e urina conforme os fabricantes do medicamento utilizado pela paciente (medicamento de referência x similares disponíveis no mercado brasileiro).
- validar uma metodologia analítica para a determinação dos níveis do fármaco marcador da metabolização do tamoxifeno (dextrometorfano) em plasma humano e urina.
- correlacionar o perfil de metabolização dos fármacos testados com a frequência genotípica das enzimas CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 e CYP3A5.
- acompanhar clinicamente os resultados de tratamento das paciente genotipadas por 5 anos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Constam no projeto cadastrado na Plataforma Brasil as seguintes descrições:

RISCOS

Não disponibilidade do material para análise durante o seguimento das pacientes.

BENEFÍCIOS

A realização deste trabalho permitirá à instituição conhecer um importante dado epidemiológico quanto ao perfil de metabolização do principal fármaco hormonal utilizado pela população de pacientes com câncer de mama tratadas na instituição. Tais dados permitirão um manejo mais adequado em tratamentos futuros. A análise com o fármaco dextrometorfano também permitirá o estabelecimento de técnica de baixo custo para análise do perfil fenotípico de metabolização do tamoxifeno, permitindo a disponibilização do teste a um maior número de pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No documento intitulado "Informações Básicas do Projeto", arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_324625_E1.pdf", datado de 24.10.2014, lê-se:

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

Página 08 de 10

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 694-864

"Enviamos esta emenda para informar que conseguimos para este projeto apoio do Instituto de Farmacologia Clínica Dr. Margarete Fischer-Bosch, em Stuttgart na Alemanha, conforme parceria com o Hospital Erasto Gaertner e a Profa. Dra. Hiltrud Brauch. A extração do material genético das amostras será realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Erasto Gaertner. CONTUDO AS ANÁLISES GENÉTICA SERÃO REALIZADAS NO INSTITUTO DE FARMACOLOGIA CLÍNICA DR. MARGARETE FISCHER-BOSCH, EM STUTTGART NA ALEMANHA. As demais análises químicas de farmacocinéticas serão realizadas no Hospital Erasto Gaertner com auxílio do Instituto de Farmacologia Clínica Dr. Margarete Fischer-Bosch. As análises laboratoriais serão financiadas pelos próprios pesquisadores, com exceção das análises realizadas pelo Instituto de Farmacologia Clínica Dr. Margarete Fischer-Bosch, em Stuttgart na Alemanha, que serão financiadas pelo próprio instituto conforme parceria com o Hospital Erasto Gaertner, na pessoa do Dr. Jose Claudio Casali da Rocha, e a Profa. Dra. Hiltrud Brauch. Informamos que nenhuma amostra ficará retida no Instituto de Farmacologia Clínica Dr. Margarete Fischer-Bosch após as análises definidas neste projeto. As amostras que não forem totalmente utilizadas serão destruídas ou retornadas ao Hospital Erasto Gaertner. As análises no Instituto de Farmacologia Clínica Dr. Margarete Fischer-Bosch serão realizadas pela colaboradora deste projeto, Jeanine Marie Nardin, como parte do doutorado sanduiche que a mesma realizará na Alemanha." (Destaque nossos).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplicam.

Recomendações:

Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos na emenda apresentada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº. 466 de 2012 e na Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ev-NNAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-921
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

Página 09 de 10

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 694-864

BRASILIA, 06 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ev-NNAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-921
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

Página 10 de 10