

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C3435T DO GENE MDR1 EM  
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA**

Lígia Cristina Guimarães

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

Uberlândia – MG  
Abril – 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C3435T DO GENE MDR1 EM  
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA**

Lígia Cristina Guimarães

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

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

Uberlândia – MG  
Abril – 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C3435T EM PACIENTES  
PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA**

Lígia Cristina Guimarães

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 11/07/02 NOTA 100

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

*Lígia*  
\_\_\_\_\_  
Ms. Gismar Silva Vieira

\_\_\_\_\_  
Bióloga Juliana Meola

Uberlândia \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

# ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1- Farmacogenética do Câncer	08
2.2- Glicoproteína – P	10
3-MATERIAL E MÉTODOS	
3.1- Obtenção das Amostras	13
3.2- Extração de DNA	13
3.3- Otimização da Reação em Cadeia da Polimerase	13
3.4- Detecção do polimorfismo por LIS-SSCP	14
3.5- Restrição Enzimática	14
3.6- Coloração por Nitrato de Prata	14
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5- CONCLUSÃO	20
6- BIBLIOGRAFIA	21

**“Se você está insatisfeito com alguma coisa mesmo que seja uma coisa boa, que gostaria de realizar e não está conseguindo -, PARE AGORA. Se as coisas não andam, só existem duas explicações: ou sua perseverança está sendo testada, ou você precisa mudar de rumo. Para descobrir qual das opções é correta – já que são atitudes opostas - use o silêncio e a oração. Aos poucos as coisas vão ficando misteriosamente claras, até que você tem forças suficientes para escolher. Uma vez tomada a decisão, esqueça por completo a outra possibilidade. E siga adiante, porque Deus é o Deus dos Valentes. Disse Domingos Sabino:  
- Tudo sempre acaba bem no final. Se as coisas não estão bem é porque você ainda não chegou ao final.”**

**(“Maktub” – Paulo Coelho)**

Ao meu pai, minha homenagem  
por acreditar nos meus sonhos  
e torna-los realidade.  
À minha mãe dedico.  
Aos meus, irmãos Luis e Lúcio, ofereço.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e oportunidades concebidas.

À minha família, pelo apoio e dedicação aos meus sonhos, tanto nos momentos de alegrias e tristezas.

Ao meu namorado, Leonardo, pela compreensão, pelo carinho e pelo ensinamento do que é amar.

Às fashions (Cristiani, Érica e Claudinha) ao ambiente familiar proporcionado nesses quatro anos juntas

Ao Prof. Luiz Ricardo Goulart pela amizade, confiança e oportunidade de crescer.

Aos amigos do laboratório (Ana Cândida, Frederico, Adriana, Elis, Wânia, Juliana, Machain, Jaqueline, Mércia, Nádia, Giovana, Renata, Guilherme, Lorraine, Priscila, outros) pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos meus colegas de faculdade, pelas lições de vida.

Ao Laboratório Biogenetics (Warlei, Juliana, Irislande, Gismar, Cirino, Juarez, Jane, Raquiene, Thaeny, Nice) pela amizade verdadeira e oportunidade de crescimento.

À Juliana Alves São Julião, pelo companheirismo e pela ajuda na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade oferecida.

Aos demais, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O MDR1 é um gene que confere resistência a multidrogas, está localizado no cromossomo 7 (7q21) e é constituído de 28 éxons. Um polimorfismo no éxon 26 (C3435T) mostra uma significativa correlação com os níveis de expressão da glicoproteína-P, que é uma proteína de membrana celular e tem a função de bomba de efluxo, transportando os fármacos para fora da célula e baixando o nível intracelular a níveis subletais. Esse baixo nível de drogas no meio intracelular confere à célula resistência ao tratamento.

Este trabalho teve como objetivo analisar a frequência do polimorfismo gene MDR1 em pacientes portadores de neoplasias mamárias. A pesquisa incluiu 60 pacientes portadores de neoplasias mamárias assistidos pelo Hospital do Câncer da Universidade Federal de Uberlândia, escolhidos aleatoriamente. O DNA foi extraído e submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O polimorfismo foi pesquisado pelas técnicas: LIS-SSCP e Restrição Enzimática com a endonuclease *Mbo I*.

A técnica LIS-SSCP não se mostrou eficiente para a pesquisa do polimorfismo do gene MDR1, por se tratar de uma mutação de ponto que não promoveu uma configuração diferenciada da cadeia de DNA afetada.

A frequência genotípica das amostras investigadas variou da seguinte forma: 15% das amostras apresentaram um padrão homocigoto para o alelo T (mutante), 45% apresentaram um padrão homocigoto C (selvagem) e 40% um padrão heterocigoto (portadores do alelo mutante).

Um estudo da expressão da glicoproteína-P nos pacientes portadores de polimorfismo no éxon 26 do gene MDR1 (mutantes TT) poderá direcionar a terapêutica do câncer, bem como garantir a aderência e o sucesso do tratamento.



## 1- INTRODUÇÃO

A heterogeneidade na resposta individual a medicamentos, tanto em termos de toxicidade como eficácia de tratamento tem levado a numerosos esforços na realização de estudos relacionados à terapia medicamentosa. Causas potenciais para esta variabilidade nos efeitos da droga inclui a patogênese e a severidade da doença a serem tratadas, interações medicamentosas, idade, estado nutricional, função renal e hepática e doenças concorrentes. Com relação a todas estas causas de variabilidade clínica dos efeitos das drogas, são reconhecidas atualmente as diferenças hereditárias no metabolismo e disposição das drogas. Variações genéticas a resposta comum a determinado agente químico pode ser devido a alterações no alvo (ex. sistemas receptores), ou seja, alterações na farmacodinâmica, ou na biodisponibilidade da droga (ex. sistema de biotransformação), ou ainda, alterações na farmacocinética (Kalow, 1997).

O gene de resistência a multidrogas humano (MDR1) tem como produto a glicoproteína-P (PGP), uma proteína integral de membrana pertencente à família das

proteínas dependentes de ATP para realizar o transporte de substrato. (Ueda et al., 1988; Bost et al., 2000). A glicoproteína-P foi originalmente identificada pela habilidade em conferir resistência a multidrogas em células tumorais. A principal função dessa proteína é o efluxo, dependente de energia, de substratos incluindo bilirrubina, drogas cancerígenas (ex.: alcalóides, antracilinas, colchicina, taxanos) (Gottesman et al., 1995).

O gene MDR1 localiza-se no braço longo do cromossomo 7 e é formado por uma região promotora e 28 éxons (Chen et al., 1990). Sua expressão encontra-se em níveis muito alto nas glândulas adrenais e no rim, em níveis intermediários no pulmão, no fígado, no jejuno, no cólon e no reto e em baixos níveis em muitos outros tecidos (Fojo et al., 1987).

A distribuição da glicoproteína-P em tecidos normais sugere que esta desempenhe o papel de excreção de xenobióticos tóxicos e metabólitos na urina, bile e no lúmen intestinal (Thiebaut et al., 1987). A habilidade de células tumorais desenvolverem simultaneamente resistência a múltiplos compostos citotóxicos representa o principal problema na quimioterapia do câncer. Aumentos na expressão do MDR1 têm sido associados com muitos cânceres resistentes, como exemplo, o carcinoma de células renais (Riordan et al., 1985; Fojo et al., 1987; Goldstein et al., 1989).

Estudos de linhas celulares resistentes a multidrogas têm revelado que a resistência a muitas drogas nos cânceres é devido à baixa concentração de drogas dentro da célula. Isto deve-se ao aumento da expressão do gene MDR1 o que é comumente observado em tumores que não tenham regredido durante o tratamento, ou depois da quimioterapia, como exemplo, câncer de mama, câncer de ovário, linfoma, leucemia (Goldstein et al., 1989). A expressão do MDR1 em tumores mamários pode também estar associado com uma pobre resposta à quimioterapia. (Trock et al., 1997). Mutações no gene MDR1 em camundongos resulta na ausência da glicoproteína-P e isto leva ao aumento no nível da droga em muitos tecidos e a diminuição na sua eliminação (Schinkel et al., 1996). A glicoproteína-P também está envolvida no transporte *in vitro* de três inibidores de proteases HIV-L, potentes agentes na terapia da infecção por HIV (Kim et al., 1998). Depois de uma administração, concentrações

plasmáticas encontram-se elevadas duas a cinco vezes em camundongos com MDR1 deficiente e com administração intravenosa, concentrações cerebrais estão elevadas de 7-36 vezes (Kim et al., 1998). Administração intravenosa de um potente inibidor da PGP resulta no aumento até 37 vezes aumentando a concentração de inibidores de proteases no cérebro de camundongos (Choo et al., 2000).

Contudo, a biologia molecular para variação da glicoproteína-P entre pacientes ainda não é clara. Recentemente, um simples polimorfismo de nucleotídeo (SNP) resultado da transição C para T tem sido descrito no éxon 26 (C3435T), onde o alelo homozigoto T está associado mais que 4 vezes a diminuição no nível da expressão da glicoproteína-P em comparação com níveis CC (Hoffmeyer et al., 2000).

Os benefícios de um estudo farmacogenômico para o paciente consistem em assegurar que somente o paciente com resposta favorável receba determinada terapia medicamentosa, melhorando a eficácia e aderência ao tratamento, minimizando os efeitos adversos e reduzindo os custos de gerenciamento da doença.

Este trabalho teve como objetivo genotipar o polimorfismo c3435t do gene MDR1 em pacientes com câncer de mama evitando posteriormente o uso de drogas substratos para a glicoproteína-P.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

Cada ser humano apresenta uma individualidade bioquímica que pode ser demonstrada por meio da biologia molecular, a qual lhe é tão peculiar quanto às próprias impressões digitais. A causa dessa variação reside na diversidade genética dos indivíduos. Proteínas e enzimas são os produtos gênicos primários e a existência de variantes enzimáticas e protéicas decorre da existência de alelos diferentes que produzem proteínas (ou enzimas) parecidas, porém não iguais. Desse modo, embora as pessoas sejam fenotipicamente semelhantes, em nível molecular as diferenças são muitas.

Muitos fatores contribuem na resposta individual a uma determinada droga, como os genéticos, ambientais e fisiológicos que participam na regulação das reações de biotransformações de drogas. Os fatores mais importantes são o uso concomitante de outras drogas, a patogenia e severidade da doença, o estado nutricional, a idade, função renal e hepática e o polimorfismo genético. As diferenças genéticas podem ser refletidas na capacidade das pessoas em absorver, distribuir, biotransformar e excretar uma droga após sua administração são reconhecidamente responsáveis pelas grandes

diferenças interindividuais observadas em resposta a esta droga numa população. Na execução de todos esses processos o organismo utiliza enzimas, muitas das quais sem grande importância aparente para a saúde do indivíduo em condições usuais, porém essenciais e indispensáveis para o metabolismo de certas drogas. Conseqüentemente, a deficiência de enzimas com tais características só são descobertas quando o indivíduo apresenta reações inesperadas ao uso de drogas. Essas reações podem ser observadas quanto à eficácia e quanto aos efeitos adversos. Mas, seja qual for o tipo de reação inesperada, o denominador comum na maioria das situações decorre de uma enzima anormal (variante genética) incapaz de desempenhar o seu papel no metabolismo da droga. Como todas as enzimas estão sob controle direto dos genes, as relações entre gene, enzimas e drogas tornam-se evidentes (Croop, 1988).

Variações na resposta a certas substâncias foram notadas através da história, o historiador Heródoto mencionou a ocorrência da doença denominada favismo, comum na área do Mediterrâneo. Determinadas pessoas, após ingerirem a fava (*Vicia faba*) desenvolviam crise hemolítica aguda (Salzano, 1990). Na década de 50, surgiram as primeiras demonstrações de que reações a drogas têm componentes genéticos. Com o desenvolvimento da tecnologia e a capacidade em rastrear variações genéticas pode-se sugerir que certos tipos de reação individual a drogas poderiam ser causados pela presença de enzimas ou proteínas diferentes do usual. O termo farmacogenética foi criado para designar essa nova especialidade que tem por objetivo estudar as relações entre a constituição genética e o metabolismo dos fármacos. Inicialmente, os estudos eram restritos a mecanismos monogênicos de herança, porém o acúmulo de observações em gêmeos monozigóticos evidenciou a existência também de controle genético multifatorial no metabolismo do fármaco. Assim, a farmacogenética deixou de ser uma área restrita ao estudo sobre algumas reações em comum a drogas para tornar-se uma disciplina de importância central em farmacologia e terapêutica. (Kalow e Spielberg, 1991).

A farmacologia pode ser dividida em duas áreas, farmacocinética e farmacodinâmica. A farmacocinética está focada na absorção, biodisponibilidade e excreção da droga, o que determinam a concentração sistêmica da droga. No entanto, a farmacodinâmica estuda o mecanismo de transporte, interação e a concentração da

droga no sítio receptor dentro da resposta terapêutica. Em nível molecular, farmacocinética é controlada em parte por enzimas de metabolização e a farmacodinâmica é controlada por proteínas receptoras. Em outras palavras, uma mudança molecular numa enzima metabólica pode causar baixa (lenta) ou elevada (rápida) metabolização de uma determinada droga. Isto pode causar uma super ou uma inadequada quantidade da droga no sítio receptor, a despeito de uma dose normal.

As diferenças fenotípicas na quantidade da droga excreta, através de uma via cujos genes apresentam polimorfismo, levam à classificação dos indivíduos como metabolizadores (rápidos) ou ruins (lentos). Em muitos casos, o metabolismo deficiente de um fármaco através de uma via polimórfica associa-se a uma grande incidência de efeitos adversos na população com metabolismo lento. Todas as principais deficiências na atividade metabolizadora de fármacos são geralmente monogênicas e herdadas com traços autossômicos recessivos (Evans et al, 1999).

O polimorfismo genético é simplesmente a variação na estrutura de um gene, podendo ocorrer de várias formas. A mais comum é o polimorfismo de um único nucleotídeo (mutação de ponto), no qual um nucleotídeo é alterado em um gene (American Pharmaceutical Association Annual Meeting, 2000). Um gene é considerado funcionalmente polimórfico quando existem variantes alélicas estáveis na população, uma ou mais, das quais alteram a proteína codificada em relação a seqüência do tipo selvagem. Em muitos casos o polimorfismo genético está associado à redução da atividade da proteína codificada, mas existem também exemplos onde o alelo variante codifica uma proteína com atividade aumentada (Evans et al, 1999).

O polimorfismo pode ocorrer em enzimas de metabolização, proteínas receptoras e proteínas transportadoras de drogas, interferindo nos efeitos da droga. As diferenças genéticas entre os indivíduos interferem na segurança, eficácia e cumprimento do tratamento (Curt, 1984).

Estudos farmacogenéticos focalizam as diferenças nas respostas as drogas devido a fatores hereditários e polimórficos (variação genética) que levam a alterações das concentrações sistêmicas da droga e das respostas terapêuticas. Estudos farmacogenômicos referem-se a aplicação da tecnologia genômica na terapia

medicamentosa e no desenvolvimento de drogas (American Pharmaceutical Association Annual Meeting, 2000).

Na prática diária os estudos farmacogenômicos teriam aplicações nas seguintes situações:

- Doenças crônicas onde o indivíduo fará uso da medicação por um longo período, talvez, a vida toda;
- Terapia por longo tempo ou aquela que deve ser dada por um longo período antes que a eficácia possa ser avaliada;
- Regimes terapêuticos muito caros;
- Casos como osteoporose, doenças neurodegenerativas, câncer nas quais terapia imprópria pode causar mudanças irreversíveis;
- Tratamentos associados a riscos de eventos adversos severos;
- Ao um custo baixo, os estudos farmacogenômicos poderiam ser usados em tratamentos que freqüentemente causam eventos adversos (American Pharmaceutical Association Annual Meeting, 2000). Reações adversas a medicamentos (RAM) é um evento que ocorre nas terapias, em parte pela variabilidade individual em resposta a droga. Estima-se que nos Estados Unidos morrem cerca de 100.000 pessoas por ano em hospitais devido a ocorrência de RAM. O médico tendo em mãos quem será metabolizador rápido ou lento, poderá otimizar a terapêutica ajustando o regime de dose antes de iniciar o tratamento, melhorando os resultados clínicos e diminuindo os custos em saúde. Teste farmacogenômico pode ser um aparato útil no uso racional de medicamentos. (American Pharmaceutical Association Annual Meeting, 2000).

Na indústria farmacêutica a aplicação de estudos farmacodinâmicos está no desenvolvimento de novas drogas. O uso da farmacogenômica pode propiciar estudos mais rápidos e eficientes, aumentando a segurança, eficácia e o cumprimento.

O câncer é um complexo grupo de doenças genéticas causadas por fatores ambientais, alterações em células germinativas ou mutações células somáticas. Alguns tipos de cânceres estão associados a alterações genéticas que podem afetar o prognóstico. A quimioterapia do câncer está limitada por significativas variações

interindividuais na resposta e toxicidade. Os polimorfismos genéticos estão geralmente ligados a variações na farmacocinética ou farmacodinâmica de drogas empregadas para este fim.

Uma triagem farmacogenômica para drogas utilizadas no tratamento do câncer pode levar a identificação de uma específica predisposição à toxicidade ou resposta deficiente à droga (Iyer et al, 1998).

## 2.1- FARMACOGENÉTICA DO CÂNCER

O câncer é um termo genérico para uma variedade de neoplasmas malignos que podem resultar em efeitos deletérios ao hospedeiro devido ao seu caráter invasivo e metastático.

As células tumorais podem surgir a qualquer fase da vida, em qualquer tecido, podendo apresentar a característica de invadir tecidos vizinhos por extensão direta ou disseminar-se através do organismo por vasos linfáticos ou sanguíneos.

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

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

Um dos maiores problemas na farmacologia do câncer é a previsão dos resultados do tratamento em termos de toxicidade e resposta do tumor. Saber porque alguns pacientes apresentam elevada toxicidade a uma dose padrão, porque alguns respondem a quimioterapia enquanto outros não, se as mesmas drogas e dosagens são usadas, é uma questão que vem intrigando. A causa da variabilidade na resposta à



quimioterapia pode ser classificada em duas classes, as relacionadas no hospedeiro e as relacionadas ao tumor (Canal et al, 1998).

Com relação ao tumor, muitos fatores podem influenciar a quimioterapia, por exemplo: tipo do tumor, localização, volume, agressividade, estágio de disseminação, tratamentos anteriores (resistência), níveis de marcadores moleculares biológicos e fenótipo farmacogenético (Canal et al, 1998).

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

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

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

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

Os polimorfismos genéticos de algumas classes de enzimas envolvidas na farmacocinética e na farmacodinâmica de alguns agentes antineoplásicos já foram descritos.

Tiopurina S-metiltransferase (TPMT) o qual exibe um polimorfismo autossômico co-dominante, realiza importante função no metabolismo de drogas antileussêmicas e imunossupressoras como 6-mercaptopirina (6-MP), tioguanina e azatioprina. Em

pacientes deficientes de TPMT, elevadas concentrações de nucleotídeos de 6-tioguanina acumulam em tecidos hematopoiéticos o qual é a base para hemotoxicidade observada nestes pacientes. Paciente de TPMT pode requerer redução das doses usuais de 6-MP para prevenir a hemotoxicidade. Em contraste, homocigóticos com elevada atividade de TPMT pode apresentar resistência a terapia por 6-MP (Krynetski et al, 1999 ; Iyer et al, 1998).

Outra família importante é a Glutathione S-transferase (GST), são enzimas da fase II de metabolização de substratos específicos, como herbicidas, inseticidas, carcinogênicos e drogas anticâncer. Resistência aos quimioterápicos antineoplásicos como os agentes alquilantes, foi diretamente relacionado com a superexpressão das GST (Iyer et al, 1998).

O polimorfismo na aceitação da isoniazida pela n-acetiltransferase (NAT) foi um dos primeiros polimorfismos genéticos a serem identificados e documentados. Segundo a atividade da NAT os indivíduos podem ser classificados como lento ou rápido acetilador (Iyer et al, 1998).

A uridina difosfato glucoronosiltransferase constitui numa super família de enzimas que desempenham importante função na eliminação de metabólitos nucleofílicos de carcinogênicos. Duas principais classes de UGT foram identificadas: UGT1 e UGT2. UGT1 são enzimas que catalisam a glucorinidação da bilirrubina e fenóis, enquanto os substratos das UGT2 incluem zidovudina, morfina e agentes antiinflamatórios não esteróides (Iyer et al, 1998).

O sistema citocromo P450 é o principal sistema de biotransformação no homem. Polimorfismo para vários membros desta super família já foram descritos. Para drogas anticâncer o citocromo P450 metaboliza ciclofosfamida, ifosfamida, etoposido, teniposido, paclitaxal (taxol), tamoxifeno, tio-TEPA, vinblastina e vindesida (Vermes et al, 1997).

## **2.2- GLICOPROTEÍNA-P**

A corrente hipótese para explicar a clássica resistência a várias drogas em células que super expressam a glicoproteína-P (PGP) é sua função de bomba de

efluxo, onde transporta as drogas anticâncer para fora da célula, reduzindo a concentração intracelular a níveis subletais (Trambas, 1997).

O desenvolvimento de resistência a várias drogas não relacionadas é o maior impedimento para quimioterapia. Chen et al (1986) demonstraram que a resistência em células tumorais humanas para colchicina, vinblastina ou adriamicina está associada com a amplificação de determinada seqüência de DNA designada como locus de resistência a múltiplas drogas (MDR1). Super expressão da glicoproteína-P (PGP) parece ser uma característica bem consistente de células de mamíferos que mostram resistência a várias drogas anticâncer e foram indicadas para serem mediadoras da resistência (Kartner et al, 1985 ; Riordan et al, 1985).

Slovak et al (1987) encontraram mudanças em 7q como a mais freqüente aberração em linhagem de células resistente a doxorubicina. A amplificação gênica em células de tumor humano é freqüentemente mediada por elementos extracrossomais, inclusive "*doublé minutchromosomes*" (DMs). Podem ser formados a partir de pequenos precursores circulares submicroscópicos referidos como epissomas. Ruiz et al (1989) demonstraram a replicação autônoma dos epissomas contendo MDR1 em uma linguagem de célula humana multi-resistente a droga.

Estudos que examinaram quase 50 casos de câncer de mama usando métodos de detecção de RNA indicaram que cânceres de mamas recentemente diagnosticados mostram a incidência de 0-29% de expressão PGP, mas que estes podem aumentar para 70% (Sanfilippo et al, 1991). A expressão de PGP em cânceres de mamas apresenta um significativo aumento com o uso de taxanos e doxorubicina no tratamento ( Roy et al, 1985).

Examinando diferentes PGP para mutação adquirida no curso da quimioterapia, Mickley et al (1997) identificaram um rearranjo gênico envolvendo o gene MDR1 de uma linhagem de célula como novo mecanismo de resistência adquirida. A deleção dos 68 primeiros resíduos de MDR1 em uma linhagem de células adriamicina selecionadas depois de uma translocação 4,7,(t4q;7q), resultou em um RNAm híbrido contendo seqüências do MDR1 e um novo gene no cromossomo 4. Expressão de RNAm híbrido foi controlado pelo gene do cromossomo 4, provando um modelo de superexpressão

do MDR1. O rearranjo randômico cromossomal com superexpressão de RNAm híbrido de MDR1 estabelece um mecanismo de resistência adquirida.

Hoffmeyer et al (2000) descreveram a identificação de 15 polimorfismos no gene MDR1 humano em uma população. Um destes polimorfismos mostrou significativa correlação com níveis de expressão de MDR1 e atividade da PGP in vivo.

O MDR1 é expresso em células não tumorais, incluindo leucócitos, mas sua função fisiológica para MDR1 tem sido pobremente definida. Rondolf et al (1998) identificaram uma função fisiológica para MDR1 durante a mobilização de células dendríticas apresentando antígeno e ajudou a elucidar como estas células migram da periferia para nódulos linfáticos para iniciar imunidade mediana por linfócitos T.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1-OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

Sangue periférico foi obtido de pacientes portadores de neoplasias mamárias assistidos pelo serviço do Hospital do Câncer da Universidade Federal de Uberlândia. As amostras foram colhidas pelo sistema *vacutainer* em tubos contendo EDTA. A pesquisa contou com a participação voluntária de 60 pacientes que assinaram um termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Anexo I).

#### **3.2-EXTRAÇÃO DE DNA**

O DNA foi extraído segundo protocolo (Anexo II).

#### **3.3-OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi feita utilizando 500ng de DNA, 10 pmol dos *primers* MDRL LF (5'- TGC TGG TCC TGA AGT TGA TCT GTG AAC – 3') e

MDRL LR (5'- ACA TTA GGC AGT GAC TCG ATG AAG GCA – 3'). Tampão da Taq DNA polimerase 1 X (10 mM tris e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP e 2U Taq DNA polimerase para uma reação final de 50 µL. A reação foi levada ao termociclador (PTC – 150 MiniCycler TM) programado para: 95°C por 4 minutos de desnaturação, 31 ciclos de 95°C por 30 min, 61°C por 30 segundos de anelamento, 72°C por 1 minuto de extensão e 72°C por 10 minutos de extensão final. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio.

### **3.4-DETECÇÃO DO POLIMORFISMO POR LIS-SSCP**

O polimorfismo foi pesquisado pela técnica LIS-SSCP, onde 1µL do produto amplificado foi desnaturado em 20µL de tampão de LIS (sacarose 10%, azul de bromofenol 0,01% e xilenocianol 0,01%) a 98°C por 5 min e aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante de acrilamida/bis,49:1 a 8%, 6%, 12% e submetido a eletroforese por 4hs, 15mA à temperatura ambiente e corado por nitrato de prata.

### **3.5-RESTRICÇÃO ENZIMÁTICA**

O produto amplificado pela PCR foi submetido à restrição enzimática com 15µL de DNA, 11µL de água,3µL do tampão da enzima e 1 unidade da endonuclease Mbo I. Essa reação foi submetida ao banho-maria a 37°C por 2 horas. O produto cortado foi aplicado no gel de agarose a 2% e submetido a eletroforese por 30 minutos e corado com brometo de etídio. O produto também foi analisado em gel de poliacrilamida a 8% e submetido a eletroforese por 4hs, 15mA à 4°C e corado por nitrato de prata/carbonato de sódio.

### **3.6- COLORAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA**

Após a eletroforese, o gel foi retirado e fixado em solução de ácido 10% por 30min, lavado 2x por 2 minutos em água destilada. Logo após, foi colocada a solução

de nitrato de prata (200mg), formaldeído (150ul) e água (100ml) e incubada por 20 minutos. Lavou-se 2x novamente com água por 30 segundos e, imediatamente, colocou-se a solução reveladora gelada de carbonato de sódio (3g), formaldeído (150ul), tiosulfato de sódio (50ul) e água (100ml) até que os alelos apareceram. A reação foi finalizada com solução fixadora por no mínimo 10 minutos.

## 4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene de resistência a multidrogas MDR1 mostra uma íntima relação com os níveis de expressão da glicoproteína-P, sendo a superexpressão desta uma característica bem consistente de células de mamíferos que mostram resistência a várias drogas anticâncer (Kartner et al, 1985 ; Riordan et al,1985). Portanto, uma quimioterapia não responsiva pode estar correlacionada com o polimorfismo estudado.

Os *primers* utilizados para a amplificação do éxon 26, do gene MDR1, foram eficientes, resultando num fragmento de 248 pb, como foi previsto (Figura 1).

O polimorfismo do gene MDR1 não foi detectado pela técnica do LIS-SSCP, a simples troca de uma base C3435T não produziu uma conformação diferente na fita de DNA mutada. A fita selvagem e a mutada tiveram o mesmo padrão quando foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante de concentrações variadas (Figura 2). Uma possível explicação para a não detecção desse polimorfismo é a de que a posição e o tipo de mutação não apresentam correlação com a mobilidade das fitas, mas com as sequências de bases ao redor da mutação (Glavac e Dean, 1993).

Quando o produto foi submetido a restrição enzimática, foi detectada a mutação pesquisada tanto em gel de agarose (Figura 3), quanto em gel de poliacrilamida para



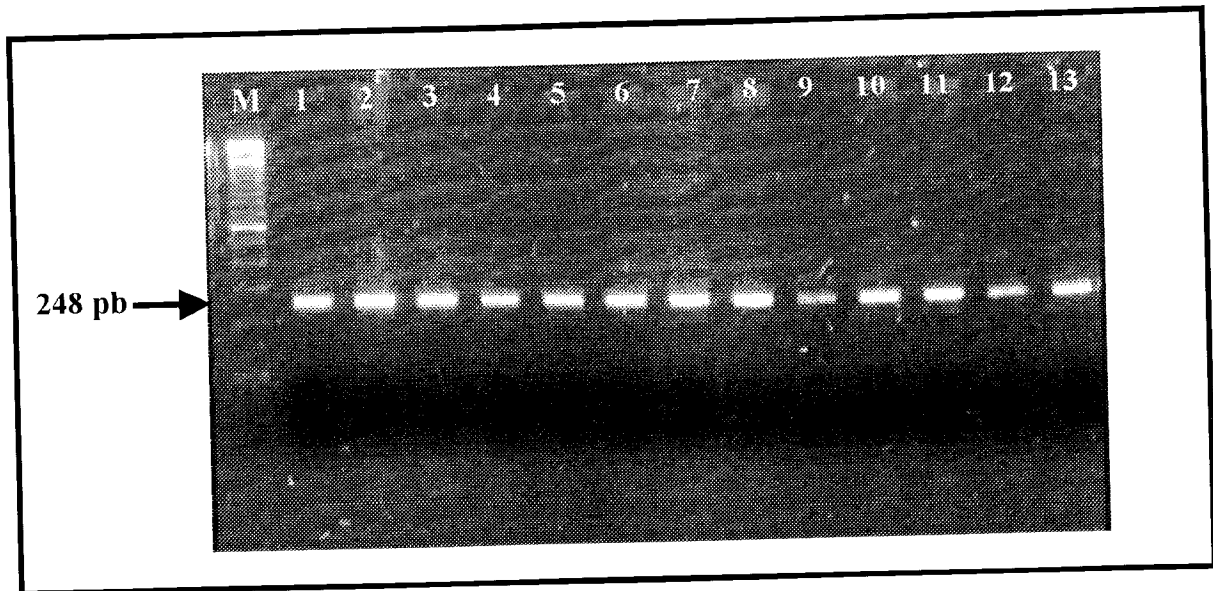
detecção da banda de 60 pb (Figura 4). A enzima Mbo I corta o DNA selvagem produzindo fragmentos de 172bp, 60bp e 16bp. A mutação C3435T destrói um sítio de restrição da enzima Mbo I produzindo fragmentos de 232bp e 16bp.

Dos 60 pacientes submetidos à pesquisa, constatou-se o seguinte resultado:

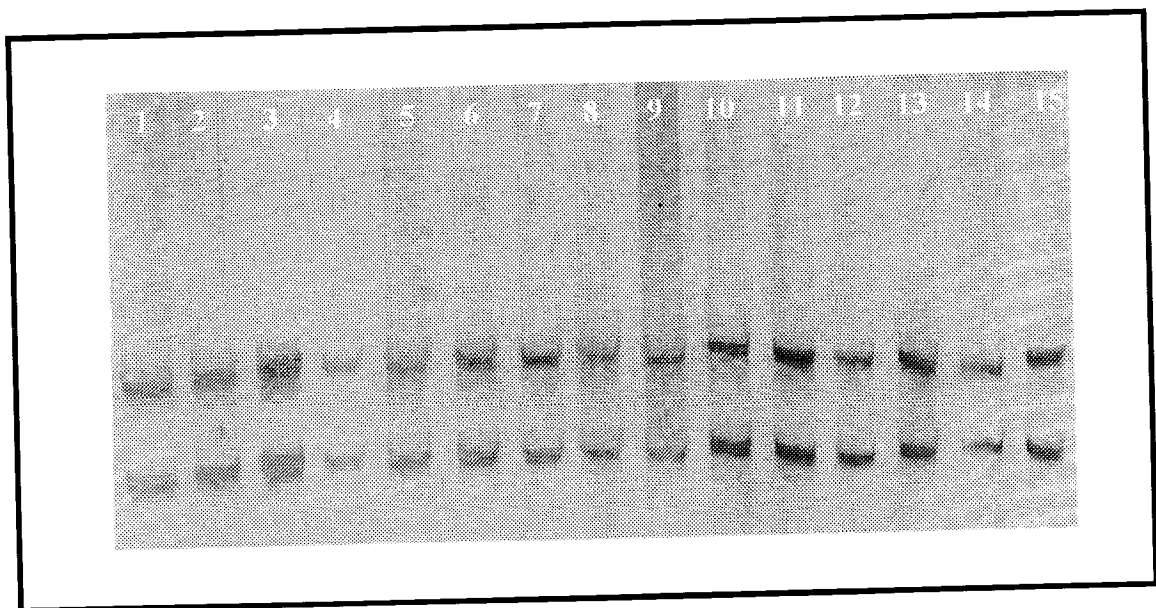
FREQUÊNCIA OBSERVADA		
CLASSIFICAÇÃO	NUMERO DE PACIENTES	FREQUÊNCIA GÊNOTÍPICA
Heterozigotos (CT)	24	40%
Mutantes (TT)	9	15%
Selvagens (CC)	27	45%
Total	60	100%

A mutação C3435T faz-se presente na população amostrada e pode ser comparada com populações de ancestrais africanos. O genótipo TT acomete 1%, 4% e 6% de pessoas Africanas, Kenianas e Sudanês respectivamente (Hoffmeyer et al., 2000).

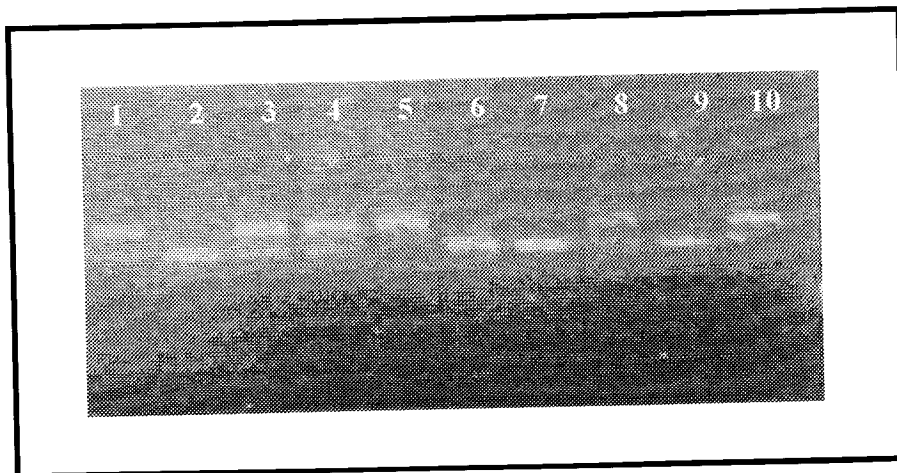
A pesquisa encontrou uma frequência relativamente maior de mutação nos pacientes amostrados com relação ao estudo de Hoffmeyer et al., 2000. Os pacientes mutantes homozigotos apresentam uma diminuição mais que quatro vezes no nível de glicoproteína-P (Hoffmeyer et al., 2000).



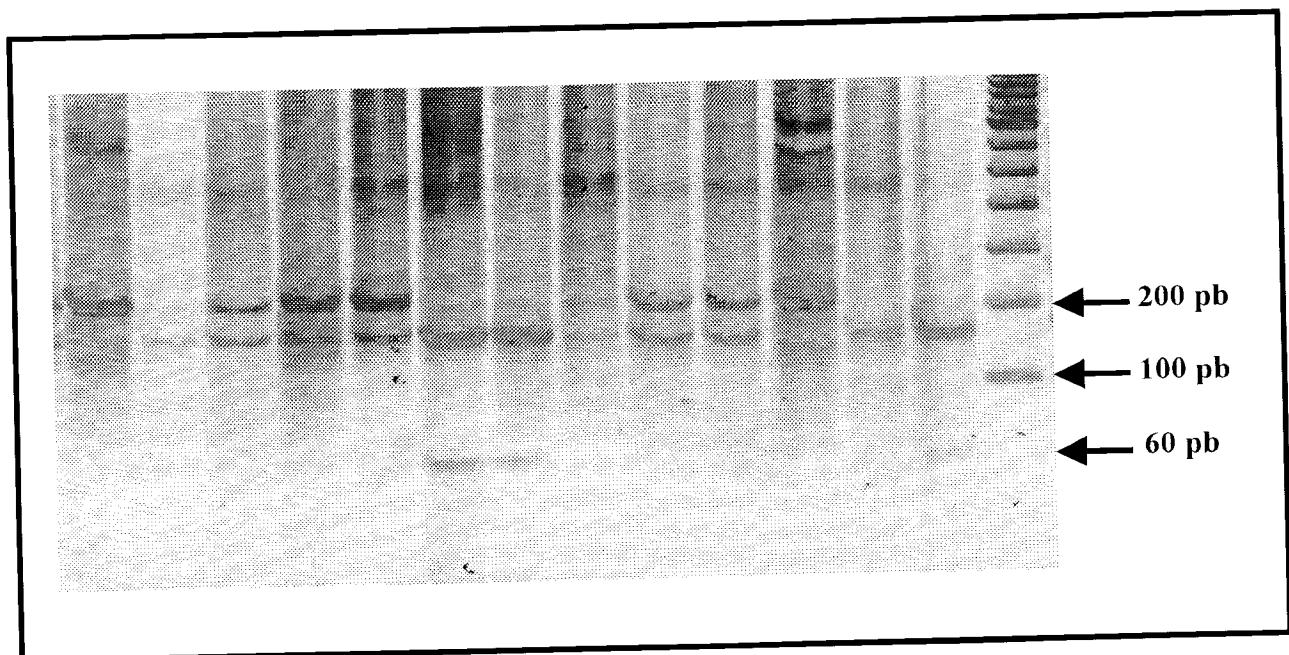
**Figura 1.** Padrão eletroforético em gel de agarose 2%, de um fragmento de 248 pb do éxon 26 do gene MDR1. M = marcador de 100 pb; 1 a 13 correspondem a amostras de pacientes portadores de neoplasias mamárias.



**Figura 2.** Padrão eletroforético em gel LIS-SSCP a 8% para a análise do alelo MDR1.



**Figura 3.** Padrão eletroforético do produto cortado pela endonuclease Mbo I para a análise do alelo MDR1 , em gel de agarose 2%. Os números 5 e 10 são homozigotos para o alelo T; 1, 3, 4 e 8 são heterozigotos; 2, 6, 7 e 9 são homozigotos para o alelo C.



**Figura 4.** Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Os amplicons foram cortados pela endonuclease Mbo I para a genotipagem do MDR1. Os números 1 e 11 são homozigotos para o alelo T; 3, 4, 5, 8, 9 e 10 são heterozigotos; 2, 6, 7, 12, 13 são homozigotos para o alelo C; M = marcador de 100 pb.

## 5-CONCLUSÕES

- A mutação de ponto não proporcionou uma conformação diferencial do DNA para os pacientes analisados.
- A restrição enzimática mostrou-se uma técnica de baixo custo e eficiente;
- A alta incidência do alelo C pode explicar a alta incidência de resistência e tumores agressivos nos indivíduos portadores de neoplasias mamárias e assistidos pelo Hospital do Câncer da Universidade Federal de Uberlândia;
- Um estudo da expressão da glicoproteína-P nos pacientes portadores de polimorfismo no éxon 26 do gene MDR1 (mutantes TT) poderá direcionar a terapêutica do câncer, bem como garantir a aderência e o sucesso do tratamento.

## 6 – BIBLIOGRAFIA

**AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION ANNUAL MEETING.** – Washington, DC,; March 10-14,2000. [Pharmacists Conference Summaries-@ 2000 Medscape,Inc.]Disponível em: <http://www.aphameeting.org> Acesso em: 30 maio 2000.

BOST,P.; EVERS,R.; KOOL,M.; WIJINHOLDS,J. – **A family of drug transporters:** the multidrug resistance-associated proteins. J. Natl. Cancer Inst. 92; 1295-1302; 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER-INCA, COORDENADORIA DE PROGRAMAS DE CONTROLE DE CÂNCER – PRO-ONCO. - **O Problema do Câncer no Brasil.** 4ª edição. Rio de Janeiro, INCA/Pro-Onco. 59p.1997.

CANAL,P.; CHATELUT,E.; GUICHARD,S. – **Practical treatment Guide for Dose Individualization in Cancer Chemotherapy.** Drugs, Massachusetts, USA. vol.56, n.6; pp.1019-1038; 1998.

CHEN,C.; CHIN,J.E.; UEDA,K.; CLARK,D.P.; PASTAN,I.; GOTTESMAN,M.M.;  
RONINSON,I.B. – **Internal duplication and homology with bacterial transport  
proteins in the MDR1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human  
cells.** Cell. vol.47; pp.381-389; 1986.

CHEN.C.J.; CLARK,D.; UEDA,K.; PASTAN.I.; GOTTESMAN,M.M.; RONINSON,I.B. -  
**Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and  
origin of p-glycoprotein.** J. Boil Chem. 265; pp.506-514; 1990.

CHOO,E.F.; LEAKE,B.; WANDEL,C.; IMAMURA,H.; WOOD,A.J.; WILKINSON,G.R.; et  
al. – **Pharmacologic inhibition of P-glycoprotein transport enhances the  
distribution of HIV-1 protease inhibitor into brain and tests.** Drug Metab. and  
Dispos. 28; pp.655-660; 2000.

CROOP,J.M.; GROS,P.; HOUSMAN,D.E. – **Genetics os multidrug resistance.** J.Clin.  
Invest. vol.81; pp.1303-1309; 1988.

CURT,G.; CLENDENENN,N.; CHABNER,B. – **Drug resistance in câncer.** Cancer  
Treat. Rep. 68; pp.87-99; 1984.

EVANS,W.E.; RELLING,M.V. – **Pharmacogenomics: translating funcional genomics  
into rationl therapeutics.** Science, Washington,DC. vol.286; pp.487-491;15 oct.1999.

FOJO,A.T.; UEDA,K.; SALMÓN,D.J.; POPLACK,D.G.; GOTTESMA,M.M.; PASTAN,I. –  
**Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues.** Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA. 82; pp.7661-7665; 1987.

GLAVAC,D.; DEAN,M. – **Optimization of the Single Strand Conformation  
Polimorphism (SSCP) technique for detection of point mutations.** Human Mutation.  
2; pp.404-414; 1993.

GOLDSTEIN,L.J.; GALSKI,H.; FOJO,A.T.; WILLINGHAM,M.C.; LAI,S.L.; GAZDAR,A.; et al. – Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. J. Natl. Cancer Inst. 81; pp.116-124; 1989.

HOFFMEYER,S.; BURK,O.; VON RICHTER,O.; ARNOLD,H.P.; BROCKMOLLER,J.; JOHNE,A.; CASCORBI,I.; GERLOFF,T.; ROOTS,I.; EICHELBAUM,M.; BRINKMANN,U. – **Funcional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene:** multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proc. Nat. Acad. Sci. vol.97; pp.3473-3478; 2000.

IYER,L.; RATAIN,M.J. – **Clinical Oncology Update:** Pharmacogenetics and Cancer Chemotherapy. European Journal of Cancer. vol.34; n.10; pp.1493-1499; Elsevier Science Ltda; 1998.

KALOW,W. – **Pharmacological in Biological Perspective.** Pharmacological Reviews, USA. vol.49; n.4; pp.369-379; dec.1997.

KALOW,W.; SPIELBERG,S. – Farmacogenética Humana. IN. KALANT,A.; ROSCHLAU. – **Principios de Farmacologia Médica.** Cap.12; ed.5; Guanabara Koogan; RJ; 1991.

KARTNER,N.; EVERNDEN-PORELLE,D.; BRADLEY,G.; LING,V. – **Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies.** Nature. vol.316; pp.820-823; 1985.

KIM,R.B.; FROMM,M.F.; CHRISTOPH,W.; LEAKE,B.; WOOD,A.J.J.; RODEN,D. – **The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors.** J. Clin. Invest. 101; pp.289-294; 1998.

KRYNETSKI,E.Y.; EVANS,W.E. – **Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm.** Pharm. Res. vol.16; n.3; pp.342-249; mar.1999.

MICKLEY,L.A.; SPENGLER,B.A.; KNUTSEN,T.A.; BIEDLER,J.L.; FOJO,T. – **Gene rearrangement: a novel mechanism for MDR1 gene activation.** J. Clin. Invest. 99; pp.1947-1957; 1997.

RANDOLPH,G.J.; BEAULIEUS,S.; POPE,M.; SUGAWARA,I.; HOFFMAN,L.; STEINMAN,R.M.; MULLER,W.A. – **A physiologic function for P-glicoprotein (MDR1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels.** Proc. Natl. Acad. Sci. 95; pp.6924-6929; 1998.

RIORDAN,J.R.; DEUCHARS, K.; KARTNER,N.; ALAN,N.; TRENT,J.; LING,V. – **Amplification of P-glicoprotein genes in multidrug resistant mammalian cell lines.** Nature. 309; pp.626-628; 1985.

ROY,S.N.; HOROWITZ,S.B. – **Aphosphoglycoprotein associated with Taxol resistance in J744.2 cells.** Cancer Res. vol.45; pp.3856-3863; 1985.

RUIZ,J.D.; CHOI,K.; VON HOFF,D.D.; RONINSON,I.B.; WAHL,G.M. – **Autonomously replicating episomes contain MDR1 genes in a multidrug-resistant human cell line.** Molec. Cell. Biol. vol.9; pp.109-115; 1989.

SALZANO,F.M. – Genética e Farmácia, ed. Manolo Ltda., São Paulo; 1990.

SANFILIPPO,O.; ROCHMI,E.; DEMARCO,C.; et al. – **Expression of P-glicoprotein in breast cancer tissue and in vitro resistance to doxorubicin and vincristine.** Eur. J. Cancer. 7; pp.155-158; 1991.



SCHINKEL,A.H.; WAGENAAR,E.; MOL,C.A.A.M.; VAN DEEMTER,L. – **P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the penetration and pharmacological activity of many drugs.** J. Clin. Invest. 97; pp.2517-2524; 1996.

SLOVAK,M.L.; HOELTGE,G.A.; TRENT,J.M. – **Cytogenetic alterations associated with the acquisition of doxorubicin resistance:** possible significance of chromosome 7 alterations. Cancer Res. vol.47; pp.6646-6652; 1987.

THIEBAUT,F.; TSUMO,T.; HAMADA,H.; GOTTESMAN,M.M.; PASTAN,I.; WILLINGHAM,M.C. – **Cellular localization of the multidrug resistance gene product in normal human tissues.** Proc. Natl Acad. Sci. USA. 84; pp.7735-7738; 1987.

TRAMBAS,C.M.; MULLER,H.K.; WOODS,G.M. – **P-glycoprotein mediated multidrug resistance and its implications for Pathology.** Pathology. vol.29; pp.1-130; 1997.

TROCK,B.J.; LEONESSA,F.; CLARKE,R. – **Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible significance.** J. Natl. Cancer Inst. 89; pp. 917-931; 1997.

UEDA,K.; CORNWELL,M.M.; GOTTESMAN,M.M.; PASTAN,I.; RONINSON,I.B.; LING,V.; et al. – **The MDR1 gene, responsible for multidrug resistance, codes for P-glycoprotein.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 141; pp.956-962; 1988.

VERMES,A.; GUICHELAAR,H.J.; KOOPMANS,R.P. – **Individualization of cancer therapy based on cytochrome P450 polymorphism: a pharmacogenetic approach.** Cancer Treatment Reviews. vol.3, n.4/5; sept./nov.; 1997.

**ANEXO I**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO**

O laboratório de genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia está realizando estudo genético relacionado à resistência a multidrogas. Este estudo está sendo dirigido pelo Professor Doutor Luiz Ricardo Goulart Filho e Doutor Rogério Agenor de Araújo juntamente com a acadêmica Lígia Cristina Guimarães, graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia.

O projeto consiste na expressão gênica em pacientes portadores de neoplasias mamárias.

Para detectar a expressão gênica, será utilizada uma alíquota de sangue periférico previamente colhido no ambulatório do Hospital do Câncer, quando os enfermeiros forem puncionar a veia para a quimioterapia, assim, o paciente não sofrerá nenhum desconforto adicional.

O material coletado será enviado ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames de DNA.

O paciente poderá pedir esclarecimentos da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e aqueles que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

Pelo presente termo apresentado por este documento,

Eu, \_\_\_\_\_

Concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Paciente, \_\_\_\_\_

Testemunhas \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO II

### EXTRAÇÃO DE DNA

- 1) Colete 5ml de sangue, na presença de anticoagulante (EDTA, ACD ou Heparina). Homogeeinize bem o sangue antes de proceder a extração.
- 2) Adicione 10,0ml de TLH.
- 3) Agite até ocorrer a lise (mudança na cor do sangue-rosada).
- 4) Centrifugue por 5 minutos a 1000rpm ( centrifuga clínica).
- 5) Descarte o sobrenadante sobre a água sanitária.
- 6) Solte o pelet de linfócitos manualmente dando leves pancadas no fundo do tubo manualmente  $\pm$  5 vezes. Isto é essencial.
- 7) Adicione mais 10,0ml de TLH e homogeeinize manualmente.
- 8) Centrifugue novamente 5 minutos a 1000 rpm.
- 9) Descarte o sobrenadante sobre a água sanitária.
- 10) Solte novamente o pelet e adicione mais 10,0ml de TLH. Centrifugue por 5 minutos a 1000 rpm.
- 11) Descarte o sobrenadante e solte o pelet manualmente e adicione 1,5ml de tampão de lise do núcleo (TLN) 1x. Adicione gotejando 50 $\mu$ l de SDS (separar a 4°C).
- 12) Adicione 25 $\mu$ l de proteinase K 20mg/ml. Deixe 16 horas ou overnight a 37°C.
- 13) Adicione 500  $\mu$ l de NaCl saturado. Agitar vigorosamente 20 segundos.
- 14) Deixe no freezer por 15 minutos e centrifugar 10 minutos a 3000 rpm. Transferir o sobrenadante para outro tubo.
- 15) Adicione dois volumes de etanol absoluto a temperatura ambiente para precipitação. Prenda o pelet na parede e adicione 2 volumes de etanol 70%.
- 16) Lave o DNA no etanol 70%, descarte o etanol e ressuspenda o DNA em TE ( $\cong$  500 $\mu$ l).

TLH 1X (Tampão de lise de Hemácias)

Reagentes	Estoques	Final	1 litro	100ml
NH <sub>4</sub> Cl	3,1 M	0,155 M		
KHCO <sub>3</sub>	2,0 M	0,010 M		
EDTA	0,5 M	1,0 mM		
H <sub>2</sub> O				

TLN 1X (Tampão de Lise do Núcleo)

Reagentes	Estoques	Final	1 litro	200ml	100ml
Tris-HCl pH 8,0	1,0 M	0,010 m			
NaCl	3,0 M	0,40 m			
EDTA	0,5 M	2,0 Mm			
H <sub>2</sub> O					