ROBY WILL VENCATTO

Relação de polimorfismos no gene *ABCB1* com a resposta a quimioterápicos no câncer de mama

CAMPINAS

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ROBY WILL VENCATTO

Relação de polimorfismos no gene *ABCB1* com a resposta a quimioterápicos no câncer de mama

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR(A): Profª. Drª. Carmen Silvia Bertuzzo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO ROBY WILL VENCATTO, E ORIENTADO PELA
PROF[A]. DR[A]. CARMEN SILVIA BERTUZZO.

_____

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Vencatto, Roby Will, 1987-
V552r Relação de polimorfismos no gene *ABCB1* com a resposta a quimioterápicos no câncer de mama / Roby Will Vencatto. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Carmen Silvia Bertuzzo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da mama. 2. Glicoproteína P. 3. Polimorfismo genético. 4. Recidiva. I. Bertuzzo, Carmen Silvia,1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Relationship between the *ABCB1* gene polymorphisms and response to chemotherapy in breast cancer
Palavras-chave em inglês:
Breast neoplasms
P-glicoprotein
Genetic polymorphism
Recurrence
Área de concentração: Ciências Biomédicas
Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Banca examinadora:
Carmen Silvia Bertuzzo [Orientador]
Marilda de Souza Gonçalves
Andrea Trevas Maciel Guerra
Data de defesa: 29-07-2015
Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ROBY WILL VENCATTO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO

MEMBROS:

1. **PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO** _____
2. **PROF(A). DR(A). MARILDA DE SOUZA GONÇALVES** _____
3. **PROF(A). DR(A). ANDREA TREVAS MACIEL GUERRA** _____

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29 de julho de 2015

RESUMO

O câncer de mama é classificado mundialmente, como o segundo tipo de câncer mais frequente e comum entre as mulheres e tem natureza multifatorial. O tratamento sistêmico do câncer é denominado quimioterapia antineoplásica, e o seu efeito terapêutico depende da concentração plasmática e tempo de exposição à droga. A resposta aos medicamentos possui variação entre os pacientes, podendo decorrer de fatores como: outras patologias, farmacocinética e farmacodinâmica diferenciadas, fatores ambientais e genéticos, sendo este último, estudado na farmacogenética e farmacogenômica, onde se verifica a resposta ao tratamento pela variação herdada de cada indivíduo. Em determinadas populações, polimorfismos genéticos podem levar a respostas diferenciadas de um medicamento por induzir peculiaridades na farmacocinética ou farmacodinâmica. Em muitos medicamentos em uso, os transportadores de drogas são importantes na questão de absorção, acumulação no tecido e eliminação do organismo.

O gene *ABCB1,* codifica a glicoproteína-P que é uma transportadora de membrana, responsável pelo efluxo celular de uma variedade de drogas, xenobióticos, metabólitos celulares e agentes anticancerígenos, estruturalmente independentes. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar se os polimorfismos C1236T e G2677T/A do gene *ABCB1*, possuem associação com a resposta ao tratamento quimioterápico.

Foi realizado estudo com 146 pacientes do sexo feminino, que usaram os quimioterápicos doxorrubicina e ciclofosfamida de forma adjuvante, independente se fizeram quimioterapia neoadjuvante. A presença de recidiva foi utilizada como parâmetro de avaliação do tratamento. A genotipagem dos polimorfismos foi feita por reação da polimerase em cadeia alelo específica. As análises de sobrevivência livre da doença e global foram realizadas pelo *software* SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) vs20.0 e as demais avaliações no SAS (Statistical Analysis Software) vs9.3. Os genótipos para os polimorfismos C1236T e G2677T/A estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e suas distribuições genotípicas foram respectivamente CC= 57 (39,04%), CT= 64 (43,84%), TT= 25 (17,12) [sendo, χ^2: 0,91 e P-value> 0,05] e GG= 69 (47,26%), GA= 63 (43,15%), AA= 10 (6,85%), GT= 2 (1,37%), AT= 2 (1,37%) [χ^2: 1,081 e P-value>0,05]. As freqüências alélicas foram de C= 0,61 e T= 0,39 (polimorfismo C1236T) e G= 0,70, A= 0,29 e T= 0,01 (polimorfismo G2677T/A).

No presente estudo não foi encontrado relação dos genótipos dos polimorfismos C1236T e G2677T/A com a recidiva, não podendo inferir se o tratamento das pacientes foi influenciado por polimorfismos presentes na expressão da glicoproteína-P.

Concluímos que os polimorfismos avaliados no gene *ABCB1* nesta amostra da população brasileira, não atuam no tratamento das pacientes com câncer de mama.

Palavras-chave: neoplasias da mama, glicoproteína-P, polimorfismo genético, recidiva.

ABSTRACT

Breast cancer is classified worldwide as the second most frequent and common cancer among women and has a multifactorial nature. The systemic treatment of the cancer is called chemotherapy, and its therapeutic effect depends on the plasma concentration and length of exposure to the drug. The drug response varies among patients and may be the result of many things, such as: other diseases, different pharmacokinetics and pharmacodynamics, environmental and genetic factors. Genetic factors are studied in pharmacogenetics and pharmacogenomics, which verify the response to the treatment through the inherited variation of each individual. In some populations, genetics polymorphisms can lead to different responses to a drug by inducing peculiarities on the pharmacokinetics or pharmacodynamics**.** In many drugs in use, the drug carriers are important in terms of absorption, accumulation in tissue and elimination from the body**.**

The *ABCB1* gene, which encodes the P-glycoprotein that is a membrane transporter, responsible for the cellular efflux of a variety of drugs, xenobiotics, cellular metabolites and anticancer agents, structurally independent. Thus, the objective of this study was to determine whether the C1236T and G2677T/A polymorphisms of the *ABCB1* genes could be associated with the response to chemotherapy.

The study featured 146 female patients who used doxorubicin and cyclophosphamide adjuvantly, independent of the neoadjuvant chemotherapy. The relapse was used as a parameter of association to the treatment. Genotyping of polymorphisms was performed by polymerase in specific allele chain reaction. The free and global survival analysis, was performed by the SPSS (Statistical Package for Social Sciences) software vs20.0. Other statistical tests were performed by SAS (Statistical Analysis Software) vs9.3. The genotypes for the polymorphisms were in Hardy-Weinberg and their genotype distributions were respectively CC= 57 (39,04%), CT= 64 (43,84%), TT= 25 (17,12) [sendo, χ^2: 0,91 e P-value> 0,05] e GG= 69 (47,26%), GA= 63 (43,15%), AA= 10 (6,85%), GT= 2 (1,37%), AT= 2 (1,37%) [χ^2: 1,081 e P-value>0,05]. Allele frequencies were C= 0,61 and T= 0,39 (C1236T polymorphism) and G= 0,70, A= 0,29 e T= 0,01 (G2677T/A polymorphism).

In the present study, no relationship between the relapse and the genotypes of the C1236T and G2677T/A polymorphisms was found. In this case, we cannot infer that the treatment of patients was influenced by polymorphisms that act in the glycoprotein-P expression.

We conclude that the polymorphisms in the *ABCB1* gene evaluated in this sample of the brazilian population do not act in the treatment of patients with breast cancer.

Keywords: breast neoplasms, P-glicoprotein, genetic polymorphism, recurrence.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS ____ *xiii*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES ____ *xvii*

Figuras ____ xvii

Gráficos ____ xvii

Tabelas ____ xviii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ____ *xix*

1. Introdução ____ *1*

1.1 Aspectos gerais do câncer ____ 1

1.2 Câncer de mama ____ 2

1.2.1 Recidiva (metástase) ____ 6

1.2.2 Tratamento ____ 7

1.3 Farmacodinâmica e farmacocinética ____ 12

1.4 Farmacogenética e farmacogenômica ____ 12

1.5 Polimorfismos em genes ____ 13

1.6 Gene *ABCB1* e glicoproteína –P ____ 14

1.7 Polimorfismos no gene *ABCB1* ____ 17

2. Justificativa ____ *21*

3. Objetivos ____ *22*

4. Material e métodos ____ *23*

4.1 Casuística ____ 23

4.2 Método para análises moleculares ____ 24

4.2.1 Extração de DNA do sangue periférico ____ 24

4.2.2 Detecção dos polimorfismos ____ 25

4.3 Análise estatística ____ 31

5. Resultados ____ *32*

5.1 Caracterização Geral ____ 32

5.2 Relação dos polimorfismos com a recidiva ____ 34

5.3 Análise de sobrevivência livre da doença e global frente aos polimorfismos avaliados no gene *ABCB1* ____ 35

5.4 Análise regressão logística univariada e multivariada 44

6. Discussão ***46***

6.1 Aspectos gerais 46

6.2 Polimorfismos e associação com o tratamento 47

7. Conclusão ***52***

8. Referências bibliográficas ***53***

9. Anexos ***59***

AGRADECIMENTOS

A DEUS, FORÇA SUPREMA, GRANDE ESPÍRITO *que está acima de tudo e todos e neles habita. Por me mostrar a cada dia desta minha caminhada rumo ao Grande Descobrimento, que tudo não se passa de um lila e que todas os momentos são para nos preparar para o desfecho final e devemos desenvolver nosso papel da melhor forma possível em comunhão com todos os seres e que podemos recorrer a ELE a qualquer instante, em nosso Interior. OBRIGADO AMADO ESPÍRITO pela Força de todos os dias.*

AOS MEUS MESTRES *terrenos que vieram nesta vida como meus pais Leni e Rui. OBRIGADO por tudo que vocês me deram, pela educação, valores e caráter a mim ensinado. OBRIGADO pelo apoio de sempre, pelo ombro amigo nos momentos de "desespero" e mesmo, apesar da distância, estamos conectados.*

AOS MEUS IRMÃOS *Riva e Rudy, pelas conversas, pedidos de sugestões, conselhos, opiniões, pelos nossos momentos de devaneios a base de uma cervejinha quando visito suas casas,* ***AO MEU SOBRINHO*** *Ryan e* ***A MINHA SOBRINHA*** *Heloisa, maravilhosos seres que desejo toda Felicidade e Sabedoria,* ***AS MINHAS CUNHADAS*** *Elisangela e Fran, que sempre estão torcendo por mim.*

AS MATRIARCAS *Sabina e Rita, minhas avós que sempre vibraram por mim e minhas conquistas, pelas nossas conversas, por sempre se disporem a me relatarem suas histórias de vida, da qual sempre tive curiosidade, OBRIGADO pelo exemplo de pessoas honestas e guerreiras.*

A MINHA ORIENTADORA *Carmen Bertuzzo, pessoa boníssima, OBRIGADO por me orientar neste trabalho e conceder a oportunidade de eu estar realizando esta pós-graduação, por ser esta "mãezona" com todos seus alunos, por abrir sempre as portas de sua casa para me ouvir.*

A *Susana Ramalho, oncologista do CAISM que se dispôs instantaneamente a ajudar neste trabalho de forma atenciosa, OBRIGADO.*

A MINHA MENTORA ESOTÉRICA E AMIGA *Ludmila, por ser esta pessoa boa que é – apesar dela não achar isso [risos] – pessoa de uma cultura espetacular e de um esclarecimento de vida invejável, que procura sempre ensinar me o que sabe, sempre ouve minhas angústias e me dá conselhos e me ajuda a tirar os véus da ignorância e enxergar as coisas de uma maneira diferente e divertida. Sabes que a considero como uma irmã, OBRIGADO pela amizade.*

AO MEU AMIGO *Felipe e* ***AMIGA*** *Hanan, pelos momentos de descontração, ajuda, conversas, troca de experiências e ideias, por sempre me convidarem a participar de determinados momentos da vida de vocês, OBRIGADO pela parceria e amizade.*

A MINHA PARTNER DE INGLÊS E AMIGA *Ilária, obrigado pelos conselhos, caronas, pela troca de conversas, por sempre se preocupar com a minha pessoa e me lembrar"Roby nada de andar sozinho a noite pela Unicamp" [risos], OBRIGADO por esta sincera amizade.*

AS AMIZADES DO GRUPO BERTUZZO*, Luciana Rezende, Stéphanie, Andréia Bieger, Marília e Fernando, pelos nossos "momentos descontração" na sala da chefe, pelas conversas, pelas ajudas, a todos vai o meu Muito OBRIGADO. Em caráter especial, agradeço Luciana Rezende e Stéphanie pelo auxílio laboratorial na etapa final deste trabalho.*

A TODO PESSOAL DO LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR E CITOGENÉTICA*, não citarei nomes de todos para não correr o risco de esquecer alguém, mas sentirão em vossos corações o meu OBRIGADO. Entretanto, faz se necessário mencionar alguns nomes, a Luciana Bonadia, Marilza e Madá, por sempre me darem dicas e ajudas na parte técnica laboratorial, para que este trabalho se desenvolvesse da melhor maneira, a Mirian Molck por me ajudar com artigos no inicio deste trabalho, a Tânia por me ensinar a mexer com o software Gene Runner e a escolher primers e enzimas, a Camila Martins (residente da genética) por me auxiliar no inicio do trabalho com os prontuários e a Elaine Lustosa por me socorrer às vezes, verificando os dados das pacientes pelo sistema do HC.*

A DONA *Cida pelo cafezinho da manhã e tarde e* ***AS MENINAS*** *da limpeza, pelas conversas e risadas nos corredores.*

AO PESSOAL DO BIORREPOSITÓRIO DO LABORATÓRIO DE GENÉTICA DO CÂNCER*, Carla, Gustavo e a professora Carmen Passos Lima, pela ajuda com as amostras.*

AO DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA*, as secretarias pelas ajudas e por me deixarem "pegar" um cafezinho extra [risos] e aos professores pelo repasse de conhecimento técnico nas aulas.*

A FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS *– UNICAMP.*

AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS*, em especial a secretaria Marcinha, por sempre sanar as minhas dúvidas e me ajudar.*

AO CAISM – UNICAMP*, e* ***AO SAME*** *(Serviço de Arquivo Médico e Estatística) em especial a Rogéria - in memoriam - e Rosana por me auxiliarem quando necessário com os prontuários.*

AO NÚCLEO DE ESTATÍSTICA *do CAISM, em especial a Graciella.*

AS PACIENTES *(quando possível) e* ***SEUS FAMILIARES****, pela atenção e ajuda quando precisei de informações via telefone, cujo em alguns relatos, presenciei momentos de tristeza e alegria, ao passo que recebi alguns conselhos de vida.*

AS PACIENTES *que autorizaram o estudo com suas amostras de DNA, com intuito de ajudar futuramente nas pesquisas, OBRIGADO.*

A CAPES *pela bolsa de estudos a mim concedida.*

A FAEPEX *pelo apoio de fomento deste estudo.*

Desenvolver este trabalho me fez refletir em muito a vida humana, a relação doença e paciente e os muitos fatores "externos" que interagem e influenciam no tratamento. Aprendi muito com esta dissertação, não apenas a vivência técnica de escritas científicas e experimentos de laboratório com a intenção de melhorias na área da saúde, mas também há compreender um pouco esta chamada VIDA e enxergar que no final de tudo, às pessoas só querem ser felizes.

Espero não ter esquecido ninguém nos agradecimentos, mas caso isso tenha ocorrido, saibam que não foi intencional, pois a todos que me ajudaram neste caminhar acadêmico de forma direta ou indireta e ajudam conseguinte nesta trajetória terrena, saibam que no momento em que vocês estenderam as mãos a mim de forma despretensiosa, seja com ajuda na parte técnica profissional ou na área humana - pois não existe um Roby separado para ambas atribuições - dentro de mim vibrou a gratidão e o reconhecimento pelo ato generoso atribuído, por que no final de tudo, vocês não ajudaram somente a mim e sim a vocês também, mesmo talvez não estando cientes disso, porque na verdade SOMOS TODOS UM.

OM, OM, OM*, que o Grande Som Cósmico vibre em suas almas um dia, é o que Desejo a todos.*

AMÉM

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1. Alterações no tecido mamário na presença de câncer. 4
Figura 2. Localização cromossômica e tamanho do gene *ABCB1*. 15
Figura 3. Modelo de Higgins –Flipase. 16
Figura 4. Modelo de efluxo da glicoproteína-P. 17
Figura 5. Posição dos SNP's na Glicoproteína-P. 19
Figura 6. Esquema de ciclagem da PCR para o polimorfismo C1236T no gene *ABCB1*... 27
Figura 7. Genotipagem do polimorfismo C1236T no gene *ABCB1*. 28
Figura 8. Esquemas de ciclagem polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1*. 30
Figura 9. Genotipagem polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1*..... 30

Gráficos

Gráfico 1. Polimorfismo C1236T no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença. 36
Gráfico 2. Polimorfismo C1236T (genótipo CC vs agrupamento TT+CT) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença. 37
Gráfico 3. Polimorfismo C1236T (Genótipo TT versus agrupamento CC+CT) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença. 37
Gráfico 4. Polimorfismo C1236T no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global. . 38
Gráfico 5. Polimorfismo C1236T (genótipo CC vs agrupamento TT + CT) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global. 39
Gráfico 6. Polimorfismo C1236T (genótipo TT vs agrupamento CC+CT) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global. 39
Gráfico 7. Polimorfismo G2677/A (genótipo GG vs GT+GA vs AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença. 40
Gráfico 8. Polimorfismo G2677T/A (GG+GT+GA vs AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença. 41

Gráfico 9. Polimorfismo G2677T/A (GG vs GT+GA+AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença. 41
Gráfico 10. Polimorfismo G2677T/A (GG vs GT+GA vs AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global. 42
Gráfico 11. Polimorfismo G2677T/A (GG+GT+GA vs AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global. 43
Gráfico 12. Polimorfismo G2677T/A (GG vs GT+GA+AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global. 43

Tabelas

Tabela1. Primers e fragmentos dos genótipos para o polimorfismo C1236T no gene *ABCB1*. 25
Tabela 2. Protocolo para reação de PCR – adaptado. 26
Tabela 3. Primers do polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1*. 28
Tabela 4. Protocolo para reação de PCR do polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1*– adaptado. 29
Tabela 5. Variáveis clínicas. 33
Tabela 6. Genótipos (e agrupamentos) do polimorfismo C1236T versus recidiva. 34
Tabela 7. Genótipos (e agrupamentos) do polimorfismo G2677T/Ano gene *ABCB1* versus recidiva. 35
Tabela 8. Regressão logística univariada polimorfismo C1236T. 44
Tabela 9. Regressão logística univariada para polimorfismo G2677T/A. 44
Tabela 10. Regressão logística multivariada para os polimorfismos. 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

***ABCB1*:** ATP-binding cassette sub-sub family B (MDR/TAP) member 1

AC: Antraciclina e Ciclofosfamida

ACT: Antraciclina, Ciclofosfamida e Taxano.

ADP: Adenosina difosfato

ATP: Adenosina trifosfato

***BRCA1*:** Breast Cancer Gene 1 (Gene do Câncer de Mama 1)

***BRCA2*:** Breast Cancer Gene 2 (Gene do Câncer de Mama 2)

CAISM: Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher

CDI: Carcinoma Ductal Invasivo

CLI: Carcinoma Lobular Invasivo

CMF: Ciclofosfamida, Metrotexato e 5-fluorouracil

CNS: Conselho Nacional de Saúde

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

HC I-INCA: Hospital do Câncer I – Instituto Nacional do Câncer

HCL: Acído Clorídrico

HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

kDa: Kilodalton

MDR1: Multidrug Resistance 1 gene (Gene de Resistência a Multidrogas)

$MgCl_2$: Cloreto de Magnésio

MS: Ministério da Sáude

NaCl: Cloreto de Sódio

OMS: Organização Mundial da Saúde

***p53*(gene):** Tumor Suppressor*p53* (Supressor Tumoral *p53*)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

P-gp: P- glycoprotein (glicoproteína-P)

PH: Potencial Hidrogeniônico

Pi: Fosfato inorgânico

RE: Receptor de Estrógeno

RNA: Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

RNAm: RNA mensageiro

RP: Receptor de Progesterona

SAS: Statistical Analysis Software

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TAC: Taxano, Antraciclina, Ciclofosfamida

UICC: União Internacional Contra o Câncer

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer é uma neoplasia que consiste na proliferação celular exacerbada, formando um tumor com presença de malignidade, ou seja,com crescimento descontrolado, capaz de invadir tecidos vizinhos ou sítios distantes (metástase), ou ambos [1]. As células que apresentam crescimento anormal formam um tumor denominado neoplasma. Se este for benigno, não invadirá os demais tecidos; caso torne-se invasivo, é denominado tumor maligno [2].

Duas características genéticas são definidas em relação às células cancerígenas: (i) elas se dividem de forma anormal, não obedecendo aos limites da divisão celular, e (ii) colonizam e invadem os tecidos vizinhos. As duas características juntas apresentam fator de gravidade para a doença [2]. A característica das células cancerígenas de se desprenderem do tecido de origem, entrarem na circulação sanguínea ou linfática, e se alojarem em outros locais do corpo, formando assim tumores secundários, mostra que, quanto mais elas se dispersarem, mais difícil será para erradicá-las [2].

O câncer é caracterizado como uma doença genética que envolve mutações em diferentes genes, que podem ser mutações em proto-oncogenes, com ganho de função de um alelo, ou mutações inativadoras em gene supressor tumoral; ou ainda translocações cromossômicas que geram genes quiméricos que codificam proteínas com novas funções, ou causam alterações na expressão gênica. As mutações podem ocorrer tanto em células germinativas quanto em células somáticas, sendo o último caso o mais freqüente [1].

Conforme Onuchi e Chammas (2010) [3], para que haja a formação de um tumor é necessário duas a seis variações genéticas, que irão atuar na proliferação, diferenciação e morte celular. Assim, uma mutação não é suficiente para gerar a carcinogênese. Da mesma forma, Bruce e colaboradores (2008) [2] explicaram que se uma mutação fosse capaz de converter uma célula normal em célula cancerígena, não haveria seres humanos viáveis. Mesmo em um ambiente sem fatores mutagênicos, estima-se que ocorram 10^{-6}mutações espontâneas por gene a cada divisão celular, por limitações na replicação e reparo do DNA.

Um tumor maligno é detectável pelos métodos de imagem ao alcançar em torno de 1cm de diâmetro. A aplicação precoce da quimioterapia ou radioterapia pós cirurgia objetiva tratar a doença chamada micrometastática, na qual o volume de doença é menor; portanto, neste estágio, a quimioterapia é mais efetiva em prevenir a metástase [4].

1.2 Câncer de mama

O câncer de mama é classificado mundialmente como o segundo tipo de câncer de maior prevalência, sendo o mais comum entre as mulheres. Atualmente é um problema de saúde pública devido à elevada incidência e mortalidade [5,6]. A estimativa de novos casos no Brasil é de aproximadamente 57.120 (dados atualizados em 2014), com taxa de óbitos em torno de 14.388 (dados de 2013), sendo que destes, 14.207 são mulheres e 181 homens [5].

O câncer de mama, assim como os demais tipos de câncer, compreende um grupo de patologias com causas multifatoriais. Assim, a influência e consequente interação de fatores genéticos e ambientais que não estão totalmente elucidados contribuem para a ativação da doença. Em relação à carcinogênese mamária, o principal fator na genética são alterações de genes supressores tumorais, como o *BRCA1*, *BRCA2* e *p53* [7].

Segundo Amendola e Vieira (2005) [8], em relação aos fatores de risco no carcinoma de mama temos importantes fatores internos, como dependência da constituição hormonal e predisposição hereditária e fatores externos, relacionados com o ambiente, que causam danos ao genoma. Dos fatores externos, podemos citar agentes químicos, físicos e biológicos que podem levar ao desenvolvimento da patologia.

De acordo com Videira e colaboradores (2014) [9], as células tumorais adquirem graves características fisiopatológicas que conferem a este "novo" tecido capacidade migratória, proliferativa e uma sobrevida. Alterações chave vão sendo desencadeada ao longo do processo do carcinoma mamário (Figura 1).

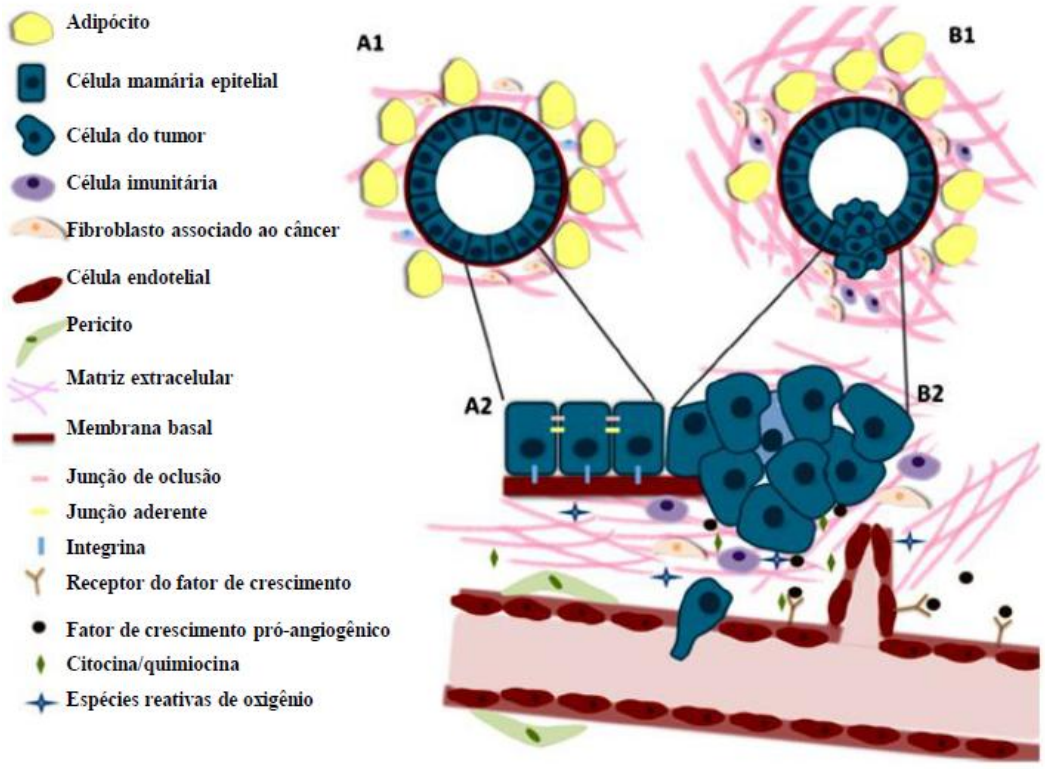


Figura 1. Alterações no tecido mamário na presença de câncer.A1: mama normal onde as células epiteliais polarizadas revestem o ducto. A2: junções celulares que garantem estabilidade entre as células vizinhas e ligação das integrinas na membrana basal, restringindo a proliferação e mantendo a polaridade normal. B1: células no ducto perdendo sua polaridade, migrando e proliferando, gerando densa matriz de colágeno. B2: microambiente do tumor, apresentando complexidade e com envolvimento de células imunes, fibroblastos com sinais de crescimento e autossuficiência. Surge um ambiente inflamatório e oxidante e a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese).**Adaptado de:** Videira e colaboradores (2014) [9].

Por sua heterogeneidade, o câncer de mama possui em sua classificação vários subgrupos associados a características biológicos e histológicos, com diferentes apresentações clínicas e padrões terapêuticos de resposta [10].

Com o intuito de melhor dividir a evolução das neoplasias malignas e com o entendimento da biologia tumoral, houve por parte da União Internacional Contra o Câncer (UICC) a busca de desenvolver um sistema de classificação para aprimorar o tratamento e dar sobrevida aos pacientes. Esta é conhecida como estadiamento e possui vários critérios

de avaliação representados por letras – sistema TNM, que significam: dimensão do tumor primário (T), extensão da propagação do tumor em linfonodos regionais (N), e ausência, ou não, de metástase à distância (M). Para cada classificação existem subcategorias representadas por números. Para o T temos subcategorias de 1 a 4; N, 0 a 3 e M, 0 a1. Estas combinações possibilitam a classificação do estadio do tumor [11].

É de suma importância conhecer a evolução da patologia e a identificação dos órgãos acometidos. Essas informações são de fundamental relevância para averiguar o comportamento biológico do tumor, escolha da terapêutica, predição de complicações, prognóstico da doença, verificação dos resultados e posterior análise oncológica na pesquisa clínica e básica [11].

De acordo com Cirqueira e colaboradores (2011) [12], existem no câncer de mama diversos subtipos moleculares, que direcionam a especificidade terapêutica e que justificam as diferenças entre os tumores, podendo influenciar no tratamento.

Em publicação recente, feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS), foi lançada a nova classificação dos tipos de tumores na mama. De acordo com esta instituição, a classificação atual para o Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) - que na prática médica é mais conhecido - ficou denominada como carcinoma mamário de tipo não especial, e representa 70% dos casos. Já o Carcinoma Lobular Invasivo (CLI), ficou alocado na classificação dos tumores histologicamente especiais, por critérios morfológicos [10].

A classificação histológica do câncer de mama possui limitações e sua subjetividade acaba por enquadrá-las nos grupos CDI ou CLI em aproximadamente 85% dos casos. Com isso, o sistema classifica tumores de amplo espectro clínico e biológico em uma mesma

categoria, onde pode haver influência discriminatória da graduação histológica e presença de receptores hormonais (RE: receptor de estrógeno e RP: receptor de progesterona) [10].

1.2.1 Recidiva (metástase)

A capacidade de metástase de um tumor maligno aparece quando este adquire habilidades de motilidade e invasividade. As características metastáticas surgem quando as células malignas se separam do tumor primário e migram pela circulação linfática ou sanguínea, tendo que lidar com o sistema imunológico e escapar da apoptose. Estudos experimentais indicam que são poucas as células que chegam ao tecido distante e sobrevivem em estado latente, enganando o sistema imune e a terapia sistêmica [13].

Para que uma única célula a distância possa gerar proliferação detectável clinicamente, é necessário que tenha ou adquira plasticidade. Após a disseminação, estas células malignas podem parar a divisão celular e aguardar as condições (no novo ambiente) necessárias para dar início à proliferação. O estado de dormência (latência) é pouco conhecido e pode durar mais de dez anos. No câncer de mama, após a cirurgia do tumor primário, pode levar anos ou até décadas para se evidenciarem as metástases [13].

Os ossos são metástases preferenciais no câncer de mama. As células de disseminação do tumor que se alojam preferencialmente na medula óssea podem causar recidivas (re-disseminação) em outros órgãos também. Entretanto, as células de disseminação do tumor podem se alojar em diversos outros órgãos, como pulmões e fígado podendo dificultar sua detecção [13].

Acredita-se que as características do tumor primário são conservadas na metástase. Algumas associações foram observadas no câncer de mama, dentre as quais, as assinaturas genéticas de metástases (pulmões e ossos) e expressão de HER-2 e receptor de estrógeno (RE), que têm sido ligadas ao aumento de propagação para locais específicos. Mesmo com os avanços, acredita-se que de 20% a 30% dos pacientes com câncer de mama com início precoce experimentarão recidivas com doença metastática [14].

Em um estudo realizado entre 2001 a 2004 no Hospital do Câncer I – Instituto Nacional do Câncer (HC I-INCA), que incluiu 36 pacientes com carcinoma invasivo, estádio II e III e que fizeram tratamento para o câncer de mama, houve 12 pacientes com progressão local, intervalo de um ano para a recidiva mais breve e oito anos para a mais tardia [15].

1.2.2 Tratamento

De acordo com o INCA, o tratamento do câncer de mama depende de certas condições do paciente, tais como: idade, menopausa, comorbidades e gostos pessoais, além do estadiamento da doença (associado ao prognóstico da doença) e de suas características biológicas. O tratamento tem maior potencial curativo se a doença for diagnosticada logo no início. Em caso de evidência de metástases, o tratamento busca melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevida do paciente [16].

O tratamento atual do câncer de mama pode ser local por cirurgia e radioterapia, ou tratamento sistêmico, pela quimioterapia citotóxica, terapia hormonal e terapia biológica [16,17].

1.2.2.1 Quimioterapia e câncer de mama

A utilização de compostos químicos, com a finalidade de combater a reprodução celular, é denominada quimioterapia [18] e pode ser nomeada como quimioterapia antineoplásica ou antiblástica [19]. Esta estratégia química de tratamento tornou-se uma ferramenta de grande força contra o câncer por volta da década de 1950. Através de estudos americanos na primeira década do século XX, foi descrita a capacidade de certas substâncias químicas de destruírem células leucocitárias. Na Primeira Guerra Mundial foi observado que o composto químico conhecido como gás mostarda, altamente tóxico e utilizado em combate, levava à diminuição na contagem de leucócitos no sangue, o que abriu a possibilidade de estudos futuros de seu uso para tratamento de leucemias [18].

Em 1941, em pesquisas conduzidas pelos farmacologistas Alfred Gilman e Louis Goodman na Universidade de Yale, observou-se que o gás mostarda causou remissão de alguns linfomas em cobaias. No ano posterior, eles mostraram que esta substância fazia desaparecer tumores em pessoas doentes. Ao longo dos anos, a indústria farmacêutica produziu vários quimioterápicos, e muitos deles, foram e ainda são utilizados em associação para melhor efetividade terapêutica [18].

É de notório conhecimento que os agentes quimioterápicos afetam tanto as células neoplásicas quanto as normais. Entretanto, seu maior dano é causado nas células malignas devido à diferenças quantitativas entre estas duas populações de células frente aos processos metabólicos. As diferenças entre populações celulares, tanto de natureza bioquímica quanto em relação ao crescimento de células malignas e normais, provavelmente produzem os efeitos específicos [19].

O diagnóstico precoce do tumor (que por base possui aproximadamente o equivalente a 10^9 e 10^{12} células, ou seja, inferior a 1 cm de tamanho) é de suma relevância para se obter êxito na quimioterapia. Considerando que a cada ciclo do tratamento elimina-se aproximadamente 99% das células e que, por conseguinte, deve-se repetir os ciclos para se efetivar a morte em todas as células do tumor, quanto maior o tumor, mais células malignas para se destruir, diminuindo a eficiência do tratamento [20].

Os agentes quimioterápicos se classificam de acordo com sua atuação no ciclo celular, podendo ser: ciclo-inespecíficos atuantes nas células que estão ou não no ciclo de proliferação; ciclo-específicos atuantes nas células que estão em proliferação e os fase-específicos, que possuem ação em determinada fase do ciclo celular [19].

A dose básica de um quimioterápico é ajustada de acordo com a superfície corporal do paciente (m^2), levando em consideração o seu peso e altura. Com a obtenção deste índice, multiplica-se a dose básica do agente antineoplásico, resultando na dose do paciente. Vale destacar que alguns medicamentos são aplicados em dose única, não levando em conta a superfície corporal, e que outros quimioterápicos são prescritos por Kg do peso corporal [11].

Segundo o INCA, o efeito terapêutico e tóxico dos quimioterápicos depende da concentração plasmática da droga e do tempo de sua exposição. Sua toxicidade é variável para os diversos tecidos e depende da droga que é utilizada, pois nem todos os geram efeitos indesejáveis [19].

De acordo com Westbrooke e colaboradores (2013) [21], sabe-se que a janela terapêutica da maioria dos pacientes é estreita e pode reagir diferentemente à administração de doses iguais. Como ocorre com o uso de agentes hormonais e outras terapias específicas,

não unicamente as características histopatológicas e clínicas, mas também a farmacogenética, pode esclarecer as diferenças individuais na potencialidade de agentes citotóxicos e na segurança dos mesmos.

Como anteriormente descrito, a quimioterapia pode ser efetuada com a administração de um ou mais agentes quimioterápicos. Levando em conta a sua finalidade, ela pode ser classificada em: (i) curativa: onde o objetivo é conseguir o controle por completo do tumor; (ii) adjuvante: tem por meta eliminar células residuais locais ou circulantes, sendo que essa modalidade se segue após a cirurgia curativa; (iii) neoadjuvante: tem por objetivo reduzir parcialmente o tumor, para posterior complementação com a cirurgia ou radioterapia; e (iv) paliativa: tem por finalidade a melhora da qualidade de vida, e não visa à cura [19].

Para o tratamento do câncer de mama, existem diferentes drogas quimioterápicas que são utilizadas: paclitaxel e docetaxel (agem nos microtúbulos); doxorrubicina e epirrubicina (antraciclinas); 5-fluorouracil [5-FU], capecitabina e gemcitabina (antimetabólitos); ciclofosfamida (agentes alquilantes), cisplatina e carboplatina (platinas). Muitas vezes a combinação de drogas é utilizada, demonstrando maior eficácia, sendo elas: "docetaxel, doxorrubicina e ciclofosfamida (TAC); ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil (CMF); doxorrubicina e ciclofosfamida (AC); doxorrubicina e ciclofosfamida, seguido de paclitaxel ou docetaxel (ACT)" [6].

As drogas doxorrubicina e epirrubicina são antraciclinas amplamente usadas no tratamento do câncer de mama. Foram observadas muitas variações farmacogenéticas em genes que codificam enzimas metabolizadoras de antraciclinas, transportadores de drogas e

enzimas associadas ao estresse oxidativo e apoptose. Aproximadamente 50% da infusão de doxorrubicina é eliminada em sua forma intacta [21].

A combinação AC é amplamente utilizada em pacientes com indicação para o tratamento quimioterápico, mas para aqueles que apresentam risco baixo a moderado de recidiva. Primeiramente, esta combinação foi testada pela *National Surgical Adjuvante Breast and Bowel Project*, com o intuito de substituir o esquema CMF, que era o tratamento adjuvante eficaz estabelecido. Em 1998, a *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* publicou uma meta-análise com 11 testes clínicos randomizados que abordou a poliquimioterapia, observando que o uso de combinações com antraciclinas conferia melhora na sobrevida e recorrência, quando comparadas com a combinação CMF [22].

A ação antiblástica e citotóxica da doxorrubicina parece estar relacionada à capacidade de se intercalar nas bases nucleotídicas, inibindo a replicação e ação das DNA e RNA-polimerases, e a sua capacidade de ligar-se a membrana celular pode afetar funções celulares. A formação de complexos de DNA passíveis de clivagem por conta da interação do fármaco com a topoisomerase-II parece ser um mecanismo citocida relevante [23].

O quimioterápico ciclofosfamida é agente alquilante que age de modo inespecífico, atuando em todas as fases do ciclo celular. É um medicamento que tem a capacidade de substituir em outra molécula um átomo de hidrogênio por um radical alquil, ligando-se assim ao DNA e impedindo a separação dos filamentos da dupla hélice, prejudicando a replicação celular [19].

1.3 Farmacodinâmica e farmacocinética

A terapêutica medicamentosa tem por objetivo chegar à resolução desejada, produzindo o mínimo de efeitos colaterais e alcançando o benefício esperado [24].

Existem certas considerações acerca dos medicamentos que precisam ser observadas, pois estes devem satisfazer exigências mínimas para serem efetivos na clínica, sendo capazes de passar pelas barreiras fisiológicas limitantes existentes no corpo humano [25].

Os efeitos que um fármaco gera no corpo (ligação fármaco-receptor) são esclarecidos pela farmacodinâmica [25], que envolve a parte da concentração-efeito da interação; já a questão de dose-concentração é explicada pela farmacocinética, que abrange alguns processos como: absorção, distribuição e eliminação do fármaco [24].

Conhecer os fatores que podem interferir no mecanismo de ação do fármaco e também entender sua natureza dinâmica é de relevância para a prática clínica. Se um fármaco for incapaz de chegar ao seu alvo, em uma concentração desejável, para a obtenção do seu efeito esperado, levará ao fracasso até a mais próspera terapia medicamentosa [25].

1.4 Farmacogenética e farmacogenômica

Sabe-se que a resposta aos medicamentos sofre variações em determinados pacientes, tanto na sua resposta terapêutica, quanto na toxicidade gerada. Estas variações podem decorrer de alguns fatores como: doenças, farmacocinética e farmacodinâmica diferenciadas, fatores ambientais e genéticos. Considerando que fatores genéticos podem

influenciar na eficácia e segurança de um medicamento, a farmacogenética e a farmacogenômica vem sendo estimuladas recentemente [26].

Não se deve esquecer os fatos históricos que acabaram por moldar o percurso da farmacogenética, pois por volta de 510 a.c, Pitágoras já havia percebido que a ingestão de favas feita por alguns indivíduos resultou em reação fatal para alguns, não todos, e foi em 1957 que Vogel criou o termo Farmacogenética [27].

A farmacogenética e a farmacogenômica envolvem o estudo do desempenho gerado pela variação herdada de cada indivíduo frente à resposta fenotípica de drogas, tais como sua toxicidade [28].

Ao se fazer referência à farmacogenética, verifica-se que seu estudo tipicamente refere-se ao efeito de um número limitado de genes; já quando o foco se estende a um padrão multigênico dentro do genoma e suas interações, temos o conceito de farmacogenômica [26,28].

1.5 Polimorfismos em genes

Em determinadas populações, polimorfismos genéticos podem levar a respostas diferenciadas de um medicamento por induzirem peculiaridades na farmacocinética ou farmacodinâmica. Uma das maiores fontes de variação farmacocinética, gerada por polimorfismos, são as que afetam as enzimas que atuam no metabolismo dos fármacos [29].

Os polimorfismos são variantes individuais no genoma e ocorrem na população geral de forma estável, onde sua frequência é de 1% ou superior [26,28]. Na sequência de DNA, os polimorfismos podem reduzir ou aumentar a atividade do gene codificado, sendo

que estes podem ser: polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), microssatélites, minissatélites [30], deleções e inserções [26].

Aproximadamente 1,4 milhões de SNPs estão identificados no genoma humano e acredita-se que muitos estejam envolvidos na variabilidade da farmacocinética e farmacodinâmica das drogas [28].

Em muitos medicamentos em uso, os transportadores de drogas, são importantes na absorção, acumulação no tecido e eliminação do organismo, podendo influenciar na eficácia/toxicidade da droga. A alta concentração de drogas pode resultar em toxicidade causando reações adversas. Por outro lado, a falta de eficácia da droga pode resultar em redução da terapêutica, por conta da exposição e/ou mutações de alvos de drogas. Os transportadores de membrana tem sido reconhecidos por sua contribuição na variabilidade frente à exposição da droga e sua resposta [31].

1.6 Gene *ABCB1* e glicoproteína –P

O gene *ABCB1*, também conhecido como gene de resistência a multidrogas 1 (*Multidrug Resistance gene* - *MDR1*), é responsável pela codificação da glicoproteína-P da membrana celular. Esta proteína transportadora é responsável pelo efluxo celular dependente de ATP (Adenosina Trifosfato) de uma variedade de drogas, xenobióticos, metabólitos celulares [32] e agentes anticancerígenos estruturalmente independentes [33], reduzindo a exposição do ambiente intracelular a compostos com potencial tóxico. Este

gene (Figura 2) está localizado na região 7q21.12 [32] e possui 28 exons, tendo tamanho de 209 Kb [34].

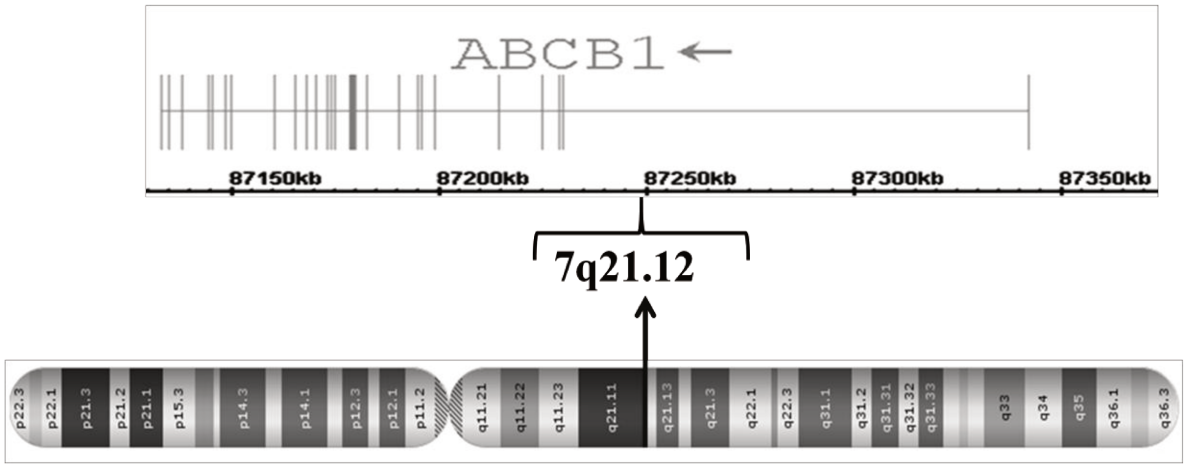


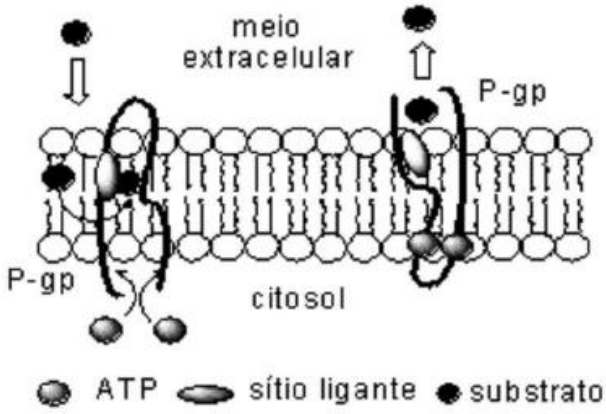
Figura 2. Localização cromossômica e tamanho do gene *ABCB1*.

A glicoproteína-P é expressa em vários tecidos não tumorais, como intestino, fígado, rim, e em diversos tumores apresenta baixa expressão, que aumenta após administração de medicamentos que sejam seus substratos. O aumento está relacionado com a resistência a quimioterápicos como cisplatina, antraciclinas e vincristina, ao passo que, clinicamente, a expressão elevada se associa com a diminuição da taxa de remissão e sobrevida [35].

A glicoproteína-P possui duas subunidades, sendo que cada uma tem 12 segmentos transmembrana, 1280 aminoácidos e peso molecular aproximado de 170 kDa [36].

Muitos modelos para a glicoproteína-P foram propostos com a intenção de desvendar seu mecanismo de efluxo. O modelo mais reconhecido considera a atividade protéica como um "*aspirador hidrofóbico"* onde as subunidades formam um canal único,

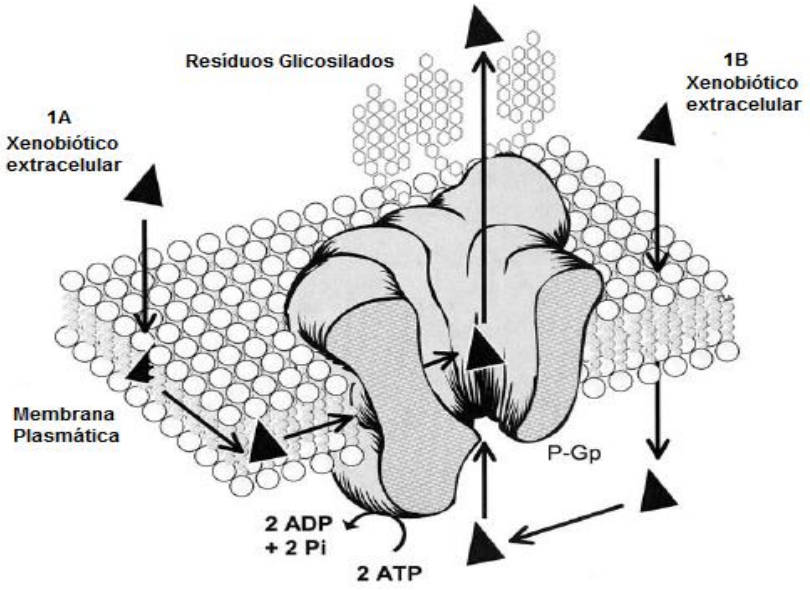
por onde o fármaco é expelido, seja na sua forma carregada ou neutra. Em contrapartida, Stein, em sua proposta, adapta o modelo anterior, e considera que há mudanças na conformação da glicoproteína-P por hidrólise do ATP, abrindo assim um canal para a "expulsão" do fármaco. Já para Higgins, esta proteína tem a ação semelhante a um *flipase*, seu modelo mesclado com o de Stein (Figura 3) é o mais aceito atualmente [36].



Legenda: P-gp: glicoproteína-P, ATP: adenosina trifosfato

Figura 3. Modelo de Higgins –Flipase. O substrato (que chega do meio extracelular) retido na bicamada lipídica se liga ao sítio ligante da glicoproteína-P, em cujo interior celular haverá a ligação do ATP nas extremidades internas da glicoproteína-P (conforme indicado) e conseguinte conversão de energia, abrindo assim as extremidades da glicoproteína-P que está no meio extracelular e expelindo o substrato. **Adaptado de:** Ruber e colaboradores (2010) [36].

É importante ressaltar que a glicoproteína-P realiza sua atividade de efluxo celular tanto do compartimento intracelular como interagindo com moléculas presentes na bicamada lipídica (Figura 4), como mostrado anteriormente [37].



Legenda: P-gp: glicoproteína-P, ATP: adenosina trifosfato, ADP: adenosina difosfato, Pi: fosfato inorgânico.

Figura 4. Modelo de efluxo da glicoproteína-P. 1A: Xenobiótico extracelular fica retido na membrana plasmática e a P-gp faz o seu efluxo.1B: Xenobiótico extracelular atravessa a membrana plasmática e fica no meio intracelular , sofrendo efluxo posteriormente. **Adaptado de:** Marzolini e colaboradores (2004) [37].

1.7 Polimorfismos no gene *ABCB1*

Conforme Sheng e colaboradores (2012) [32], estudos anteriores mostram que o SNP localizado no exon 26 [38], conhecido como C3435T (rs1045642), gerou diminuição dos níveis de RNAm, expressão e atividade da glicoproteína-P. De acordo com Wang e colaboradores (2012) [33], este SNP é considerado o mais importante neste gene. A expressão elevada da glicoporteína-P em células tumorais, mostrou associação com má resposta à quimioterapia e mau prognóstico. Assim, o efeito deste polimorfismo, o desenvolvimento da resistência às drogas e a recaída após a quimioterapia têm sido extensivamente estudados. Os estudos visam entender a ação da glicoproteína-P que pode proteger o organismo de xenobióticos, agentes ambientais e cancerígenos.

Tem sido demonstrado que o polimorfismo C3435T, apesar de ser uma alteração silenciosa que codifica o aminoácido isoleucina, afeta a expressão e atividade da glicoproteína-P em muitos aspectos. Estudo funcional demonstrou que o genótipo TT está associado com expressão inferior da glicoproteína-P quando comparado com o genótipo CC, sendo que esta correlação do polimorfismo C3435T com expressão da proteína e RNAm nem sempre é encontrada. Estudos recentes evidenciaram significância funcional do SNP C3435T e mostraram que o mecanismo molecular se relaciona com menor estabilidade do RNAm nos indivíduos com variante alélica 3435T [33].

No estudo de Kafka e colaboradores (2003) [39] com 68 mulheres, foi observada a associação da variante 3435T e uma melhor resposta à quimioterapia frente às antraciclinas, no tratamento de câncer de mama, localmente avançado, com ou sem taxanos [21,40].

Segundo Rubis e colaboradores (2012) [41], estudos clínicos foram realizados por causa da elevada frequência do polimorfismo C3435T do gene *ABCB1* e diferenças étnicas, com o intuito de clarear o impacto clinico deste polimorfismo na farmacodinâmica e farmacocinética de várias drogas. Porém, existem algumas discrepâncias com relação à farmacocinética clínica ao se fazer o uso dos mesmos medicamentos.

Já os polimorfismos C1236T, no exon 12 (rs1128503) e G2677T/A, no exon 21 (rs2032582) [38] no mesmo gene, de acordo com Chen e colaboradores (2009) [42], são frequentemente analisados em conjunto com o C3435T. O polimorfismo C1236T é uma alteração sinônima; já o G2677T/A acarreta mudança de aminoácido conforme o alelo (troca de Alanina para Serina/Treonina) [43].

Na Figura 5 está apresentada a localização destes SNPs em correspondência com o aminoácido na glicoproteína-P.

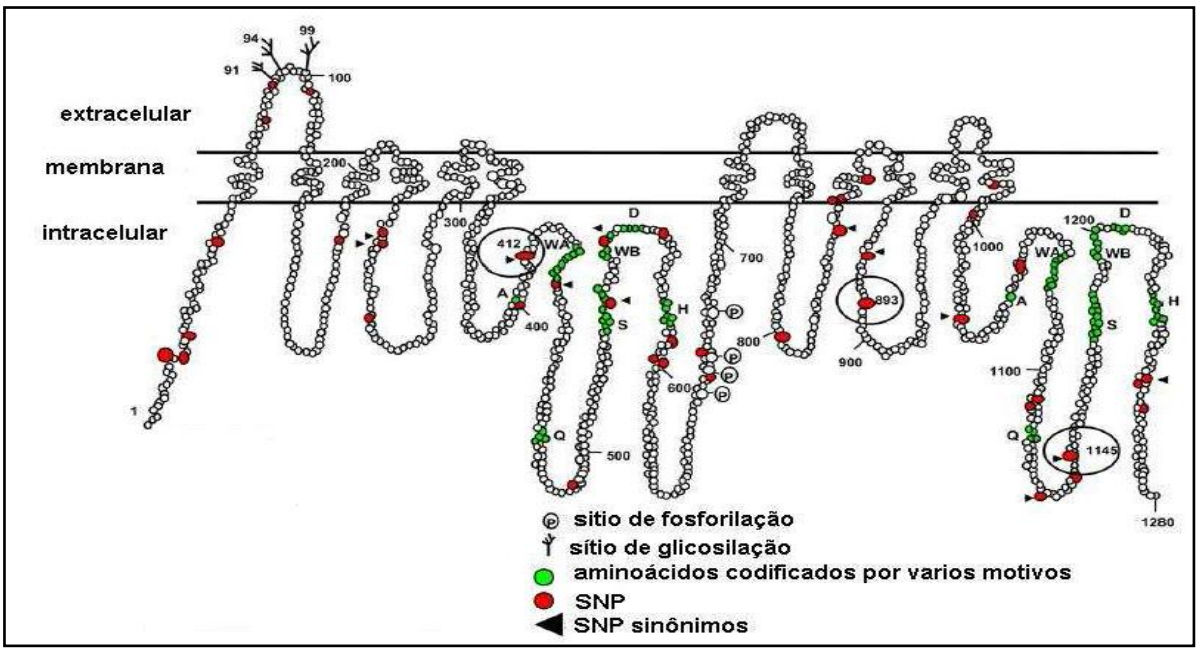


Figura 5. Posição dos SNPs na Glicoproteína-P. As localizações 412, 893 e 1145 representam os aminoácidos onde estão localizados os SNPs C1236T, G2677T e 3435 C>T, respectivamente.
Adaptado de: Fung e Gottesman (2009) [44]

De acordo com Rubis e colaboradores (2012) [41], o polimorfismo C1236T que codifica uma glicina também é alvo de estudo, por não estar clara a sua contribuição no metabolismo de xenobióticos e drogas.

Observou-se em estudo com 92 pacientes em tratamento com docetaxel, que o polimorfismo sinônimo C1236T teve associação com déficit na liberação renal do medicamento [6].

Conforme Gonzáles-Neira (2012) [6], o polimorfismo C1236T pode ser importante na farmacocinética do medicamento doxorrubicina. Foi relatado que pacientes com alelo T tinham picos plasmáticos elevados do medicamento, quando comparado a homozigotos do alelo C.

Têm sido mostrado que o genótipo GG para o polimorfismo G2677T/A está associado com a quimioresistência ao medicamento paclitaxel. Na avaliação dos genótipos CC, GG, CC, respectivamente, para os polimorfismos C3435T, G2677A/T e C1236T, se mostrou que esses genótipos, frente a exposição à doxorrubicina, possuíam níveis baixos do quimioterápico,se comparados com os demais genótipos [6].

Com base nestes estudos, faz-se necessária também a verificação destes dois polimorfismos C1236T e G2677T/A.

2. Justificativa

Como observado, o câncer de mama ocupa a segunda posição mundial em prevalência, sendo o mais comum em mulheres, com uma taxa anual de 22% de novos casos. Verifica-se uma incidência aumentada desta patologia, em países desenvolvidos e nos em desenvolvimento. A sobrevida média na população mundial é de 61% - após cinco anos. No Brasil a mortalidade permanece elevada, acreditando ser, pelo fato do diagnóstico tardio. Conforme já mostrado anteriormente, de acordo com os dados de 2013 do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), houve 14.207 mulheres acometidas pelo câncer de mama no Brasil [5].

Alguns pesquisadores apontam para a relação do gene *ABCB1* na carcinogênese, porém outros negligenciam esta questão e demonstram a relação da glicoproteína-P no metabolismo de drogas e conseguinte na eficácia terapêutica [41].

Conforme visto anteriormente, muito têm sido estudado sobre o polimorfismo C3435T, sendo observada relação deste com a resistência a tratamentos medicamentosos. Ao mesmo tempo, outros polimorfismos, como o C1236T e G2677T/A, no mesmo gene (*ABCB1*), também estão em evidente investigação (e muitas vezes estudados com base na interação C3435T), e podem indicar relação com os tratamentos quimioterápicos.

Levando em conta estes aspectos, o presente analisou em uma amostra brasileira, se os últimos polimorfismos mencionados, possuem associação com a eficácia do tratamento medicamentoso no câncer de mama. De acordo com Chen e colaboradores (2009) [42],estudos apontaram que estes polimorfismos, parecem ter influência na função da glicoproteína-P.

3. Objetivos

O **objetivo geral** foi avaliar os polimorfismos C1236T e G2677T/A do gene *ABCB1* e analisar a associação com a recidiva da doença e, desta forma, esclarecer e contribuir na pesquisa, e consequentemente na melhoria terapêutica nos tratamentos.

Os **objetivos específicos** são:

1) Genotipar os polimorfismos no gene *ABCB1* (C1236T e G2677T/A) em pacientes com diagnóstico de câncer de mama que fizeram tratamento quimioterápico,
2) Associar os genótipos para os diferentes polimorfismos avaliados encontrados, com o resultado da resposta a quimioterápico adjuvante, utilizando a presença ou não de recidiva (sobrevida livre da doença) como parâmetro de avaliação do efeito terapêutico,
3) Avaliar a sobrevida global frente aos genótipos encontrados, para verificar em conjunto com a sobrevida livre da doença.

4. Material e métodos

4.1 Casuística

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp e aprovado conforme pareceres consubstanciados 368.384 e 808.216 (Anexo 1).

A partir do banco de dados (Laboratório Genética do Câncer) com 554 casos, foram selecionados por critérios de inclusão, 146 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de Carcinoma Ductal Invasivo, em estadio II ou III, no período de outubro/2002 a abril/2007 e que fizeram tratamento quimioterápico com antraciclina (doxorrubicina) e ciclofosfamida no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM/Unicamp) com seguimento até abril/2015. As amostras de DNA genômico e sangue periférico das pacientes vieram do Biorrepositório (Laboratório de Genética do Câncer) que é de responsabilidade da Prof. Dra. Carmen Silvia Passos Lima e está de acordo com a resolução CNS/MS 441/11.

Os dados clínicos foram atualizados em abril de 2015 e obtidos por verificação dos prontuários. Além das informações já descritas sobre a inclusão das amostras, foram coletadas informações a respeito do grau histológico e nuclear do tumor, data do diagnóstico da patologia, data da cirurgia, data da recidiva (se houve), local da recidiva, data do óbito (se houve), se o óbito foi relacionado ao câncer, data da última consulta, perda de seguimento, presença ou não de receptores hormonais (RE, RP e HER-2), uso de radioterapia adjuvante e uso hormonioterapia (Tamoxifeno).

4.2 Método para análises moleculares

4.2.1 Extração de DNA do sangue periférico

A extração do DNA genômico de sangue periférico de 118 amostras armazenadas foi realizada pela técnica de cloreto de lítio (modificada de Whoodhead et al., 1986 [45]). Após o descongelamento das amostras do biorrepositório, houve a homogeneização e transferência de 500 µL do sedimento para um tubo de polipropileno de 1,5 mL e foram adicionados 800 µL de tampão de lise celular (Sacarose 320 mM; Tris-HCl pH 7,5 10 mM; $MgCl_2$ 5 mM; Triton 100X 1%), seguindo com 15 segundos de homogeneização e centrifugação por cinco minutos a 8000 rpm e descarte do sobrenadante. Essa etapa foi repetida por duas vezes ou até que o precipitado adquirisse cor clara. Posteriormente, foi adicionado 395 µL de tampão de digestão (Tris-HCl pH 7,5 10 mM; EDTA 1 mM; NaCl 10 mM; SDS 0,5%) e 10 µL de proteinase K(20 mg/ml). O precipitado foi ressuspendido e os tubos homogeneizados durante 15segundos. Na sequência, as amostras permaneceram em banho-maria a 55^{o}C por duas horas, sendo agitadas após uma hora.

Posterior a incubação de 55^{o}C, foram adicionados 200 µL de cloreto de lítio 7,5 N e as amostras foram resfriadas a -20^{o}C por 15 minutos. Logo após, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm durante dez minutos para a precipitação de contaminantes. O sobrenadante foi transferido para um segundo tubo onde foram acrescentados 1000 µL de etanol 100% concentrado gelado. O tubo foi invertido 50 vezes, aproximadamente, ou até que o DNA precipitasse visivelmente. Após, houve a centrifugação a 13000 rpm durante dez minutos e descarte do álcool posteriormente, seguido da adição de 1000 µL de etanol 70% concentrado. Na sequência, os tubos foram agitados e centrifugados novamente, e o

álcool descartado. O tubo permaneceu à temperatura ambiente para a evaporação natural do álcool. Para finalizar, o DNA extraído foi ressuspendido em 60 µL de água deionizada estéril, homogeneizados e levados ao banho-maria a 55^{o}C por dez minutos.

As amostras de DNA foram quantificadas no equipamento EPOCH^{TM} (Bio Tek Instruments Inc, USA) e estocadas em freezer a -20^{o}C.

4.2.2 Detecção dos polimorfismos

Para se detectar os genótipos dos polimorfismos C1236T e G2677T/A do gene *ABCB1*, o método utilizado foi a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - alelo específico, de acordo com Chen e colaboradores(2009)[42], porém adaptações foram necessárias.

Polimorfismo C1236T

Na tabela 1 estão apresentados os dados para genotipagem, sendo que os tamanhos dos fragmentos foram corrigidos em base de dados.

Tabela 1. Primers e fragmentos dos genótipos para o polimorfismo C1236T no gene *ABCB1*(**Fonte:** Chen et al (2009) com modificações[42]).

Nome do primer	Sequência do primers5' > 3'	Tamanho (pb)	Tamanho do fragmento (pb)
1236 P1	AATGTTCACTTCAGTTACCCATCTCG	26	512
1236 P2	AATGATTTCCCGTAGAAACCTTAC	24	
1236 T	TGCACCTTCAGGTTCTGA	18	239
1236 C	TGGTAGATCTTGAAGCGC	18	308

Pb: pares de bases

Para a realização da análise pela técnica de PCR alelo específico houve adaptações da técnica publicada, e o polimorfismo foi analisado separando-se os alelos T e C, conforme protocolo a seguir (tabela 2):

Tabela 2. Protocolo para reação de PCR – adaptado.

Alelo T					**Alelo C**				
Reagente	***Volume (µL)***	***Concentração final*[ ]**			***Reagente***	***Volume (µL)***	***Concentração final*[ ]**		
H_2O	13,95	N.A			H_2O	13,45	N.A		
Tampão	2,5	KCL	Tris HCL pH:8,4	Nonidet P40	Tampão	2,5	KCL	Tris HCL pH:8,4	Nonidet P40
		50mM	10mM	0,08% (V/V)			50mM	10mM	0,08% (V/V)
$MgCl_2$	2,0	2mM			$MgCl_2$	2,0	2mM		
dNTP's	2,0	0,1mM			dNTP	2,0	0,1mM		
Primer P1	1,0	10 picomoles			Primer P2	1,0	10 picomoles		
Primer P2	0,5	5 picomoles			Primer C	1,0	10 picomoles		
Primer T	1,0	10 picomoles			Primer CI-F	0,5	5 picomoles		
DMSO	1,25	5%			Primer CI-R	0,5	5 picomoles		
Taq	0,3	1,5U			DMSO	1,25	5%		
DNA	0,5	50ng			Taq	0,3	1,5U		
					DNA	0,5	50ng		

H_2O= água estéril para injeção, **Tampão=** produto utilizado para estabilidade da reação (contém: KCl, Tris-HCL e Nonidet P40), **$MgCl_2$=** cloreto de magnésio, **dNTPs=** desoxirribonucleotídeos (contém: bases nitrogenadas adenina, citosina e guanina e timina, açúcar desoxirribose e três grupos fosfatos), **Primer=** sequência nucleotídica, **DMSO=** dimetilsulfóxido (usado para otimização da reação), **Taq =** enzima DNA polimerase, **DNA=** ácido desoxirribonucléico, **N.A**: não aplicável.

O volume final de cada reação foi de 25µL, ressaltando que para este experimento houve a necessidade de se aplicar a enzima Taq DNA polimerase por método de *Hot Start* manualmente, segundos antes, do término da temperatura de desnaturação e início do primeiro ciclo, para assim, se evitar produtos inespecíficos. A enzima Taq DNA polimerase utilizada, é de produção do próprio Laboratório de Genética Molecular, onde os experimentos foram realizados.

A reação de PCR foi realizada em termociclador da marca Eppendorf, por programa *touchdown* direto (Figura 6) e de acordo com os ciclos e temperaturas preestabelecidos.

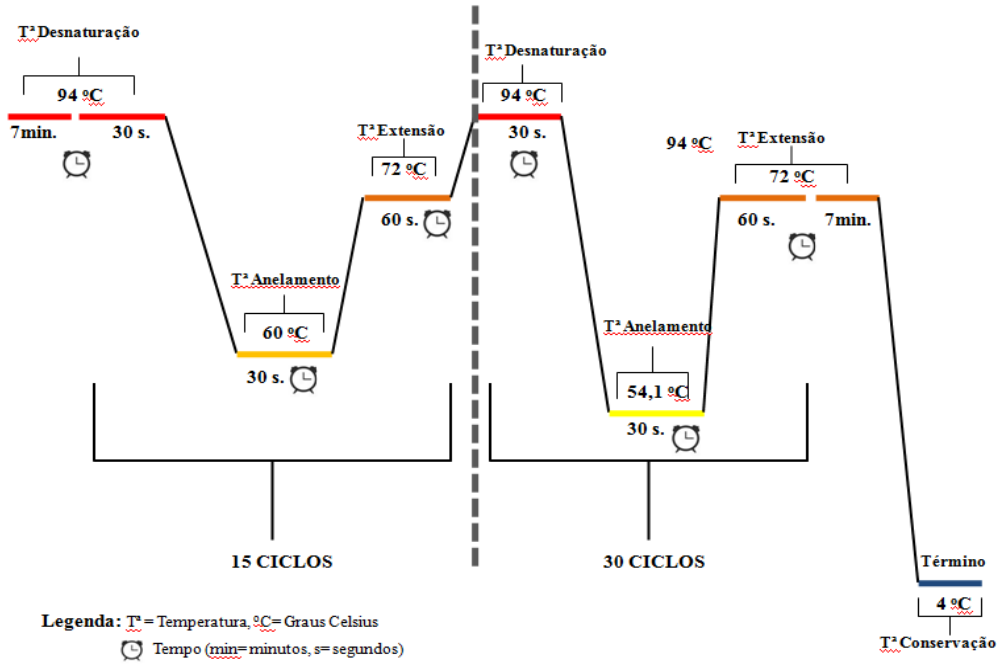


Figura 6. Esquema de ciclagem da PCR para o polimorfismo C1236T no gene *ABCB1*.

Conforme a figura 7, para o alelo T, o produto final observado em gel de agarose a 1,5% foi de 239pb, juntamente com o controle da reação (P1 e P2) de 512pb. Já o alelo C, foi observado no mesmo gel com uma banda de 308pb, entretanto neste caso, foi necessário colocar primers *forward* (F) e *reverse* (R) de outro gene, o *MTHFR* 1298, como controle interno (CI) da reação, formando uma banda de 150pb.

Em todas as corridas analíticas, foi usado controle externo de amplificação e amostra controle em branco, para ambos os alelos.

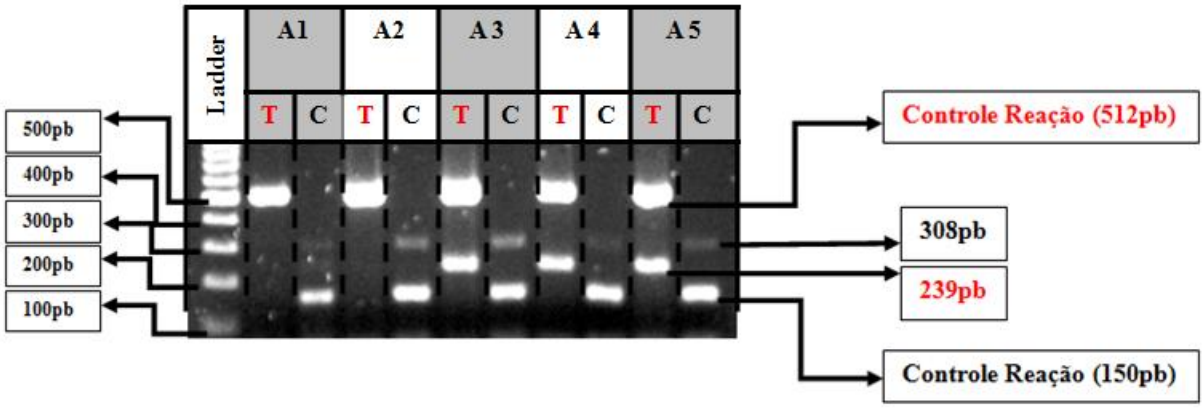


Figura 7. Genotipagem do polimorfismo C1236T no gene *ABCB1*. Para cada duas colunas (A1, A2, A3, A4, A5) há um genótipo estabelecido.
Legenda: Ladder: marcador de peso molecular, T/C: alelos específicos, pb: pares de bases, A1/2/3/4/5: amostra 1/2/3/4/5.

Polimorfismo G2677T/A

A tabela 2 mostra informações dos primers utilizados para genotipagem, sendo esta, efetuada em duas etapas (Nested-PCR).

Tabela 3. Primers do polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1*(**Fonte:** Chen et al (2009) com modificações[42]).

Nome do primer	Sequência Primers5' > 3'	Tamanho (pb)	Tamanho do Fragmento (pb)
2677 P1	TACCCATCATTGCAATAGCAG	21	223
2677 P2	GAAAAAGATTGCTTTGAGGAATGG	24	
2677 G	GATAAGAAAGAACTAGAAGCTG	22	161
2677 T	GATAAGAAAGAACTAGAAGCTA	22	161
2677 A	GATAAGAAAGAACTAGAAGCTT	22	161

Pb, pares de base.

De acordo com o protocolo apresentado na tabela 4 foi realizado a reação de PCR.

Tabela 4. Protocolo para reação de PCR do polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1*– adaptado.

1ª PCR					**2ª PCR**				
Reagente	***Volume (µL)***	***Concentração final*[ ]**			***Reagente***	***Volume (µL)***	***Concentração final [ ]***		
H_2O	12,7	N.A			H_2O	12,7	N.A		
Tampão	2,5	KCl	Tris HCl pH:8,4	Nonidet P40	Tampão	2,5	KCl	Tris HCl pH:8,4	Nonidet P40
		50mM	10mM	0,08% (V/V)			50mM	10mM	0,08% (V/V)
$MgCl_2$	1,5	1.5mM			$MgCl_2$	1,5	1,5mM		
dNTP's	4,0	0,2mM			dNTP	4,0	0,2mM		
Primer P1	1,25	12,5 picomoles			Primer P2	1,25	12,5picomoles		
Primer P2	1,25	12,5 picomoles			Primers T/G/A	1,25	12,5picomoles		
DMSO	0.5	5%			DMSO	0.5	5%		
DNA	1,0	50ng			Produto 1ª PCR	1,0	N.A		
Taq	0,3	1,5U			Taq	0,3	1,5U		

H_2O= água estéril para injeção, **Tampão=** produto utilizado para estabilidade da reação (contém: KCl, Tris-HCL e Nonidet P40), **$MgCl_2$=** cloreto de magnésio, **dNTPs=** desoxirribonucleotídeos (contém: bases nitrogenadas adenina, citosina e guanina e timina, açúcar desoxirribose e três grupos fosfatos), **Primer=** sequência nucleotídica, **DMSO=** dimetilsulfóxido (usado para otimização da reação), **Taq** = enzima DNA polimerase, **DNA=** ácido desoxirribonucléico, **N.A**: não aplicável.

O volume final da reação foi de 25µL em cada tubo e a enzima Taq utilizada para as amplificações foi a mesma do polimorfismo anterior, já mencionada. Devemos ressaltar que na primeira etapa (1ª PCR) foi obtido o amplificado de 221pb, servindo este, de produto para a segunda etapa (2ª PCR), que por sua vez foi realizada em três tubos distintos para cada alelo específico (G/T/A), obtendo um fragmento de 161pb.

As reações seguiram as temperaturas e tempo de ciclagem, conforme mostrado na Figura 8 e foram realizadas em termociclador da marca eppendorf. A genotipagem foi analisada em gel de poliacrilamida a 12% (**Figura 9**).

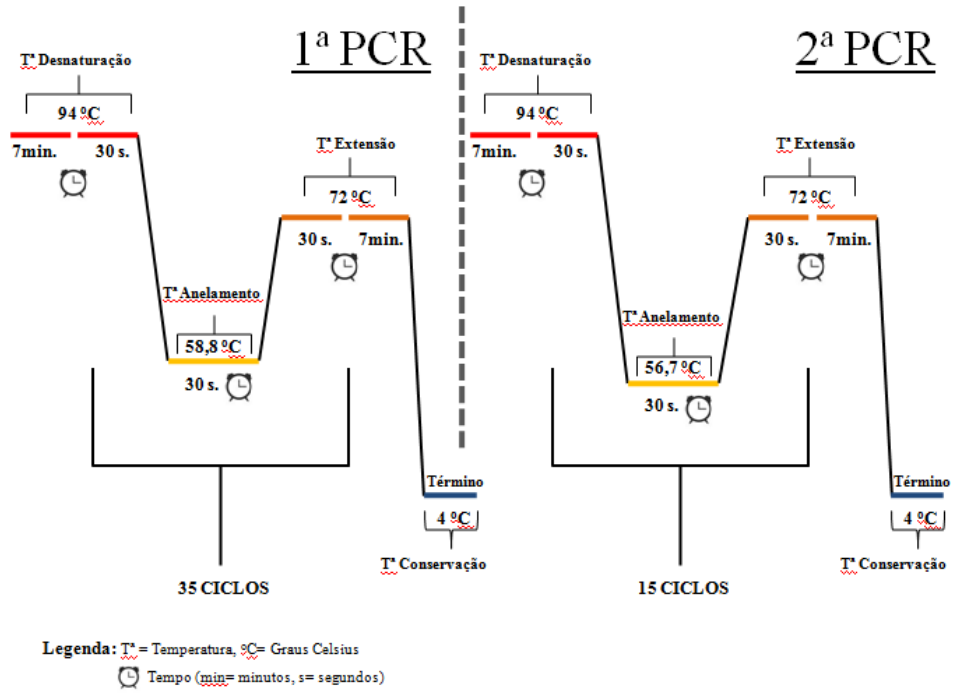


Figura 8. Esquemas de ciclagem polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1*.

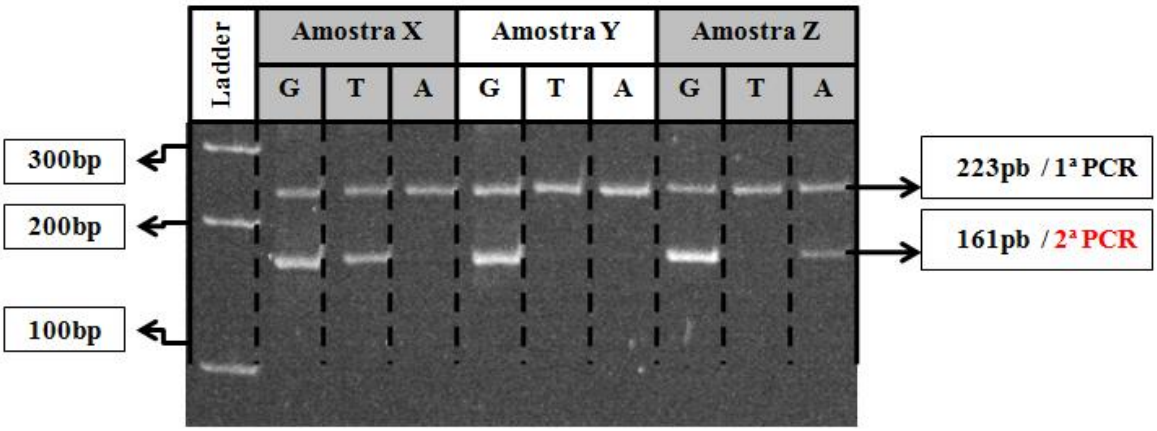


Figura 9. Genotipagem polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1*.
Para cada três colunas (amostras X, Y e Z) há um genótipo estabelecido, sendo neste gel respectivamente: GT, GG e GA. **Legenda:** Ladder: marcador de peso molecular, G/T/A: alelos específicos, pb: pares de bases, PCR: polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase).

Em todas as corridas analíticas, tanto na 1ª PCR quanto na 2ª PCR foi colocado um controle externo para os alelos G/T/A e uma amostra de branco para cada alelo específico. A 2ª PCR foi apenas realizada após conferência em gel de poliacrilamida a 12% da 1ª PCR.

4.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão (vs) 20.0 para a análise da curva de sobrevivência (livre da doença e global) e SAS (*Statistical Analysis Software*) versão (vs) 9.3, para os demais testes empregados (regressão logística univariada e multivariada, e regressão de cox univariada e multivariada) frente a recidiva e os genótipos.

O tempo de seguimento para a curva de Sobrevida Livre da Doença nos casos com recidiva obteve-se a partir da data de diagnóstico até a data da recidiva e nos casos onde não houve recidiva usou-se a data do diagnóstico até a data da última consulta. A sobrevida global também foi estabelecida, sendo que para os casos onde houve óbito, calculou-se a análise usando a data do diagnóstico até a data do óbito, já nos casos onde não houve óbito o tempo estimado foi do diagnóstico até a última consulta.

Foi empregado o Teste Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher para verificar a associação dos genótipos com o a presença ou não de recidiva.

O cálculo do poder amostral foi realizado pelo programa G-Power versão (vs) 3.1.9.2. e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi efetuado pelo *software* Oege e manualmente.

5. Resultados

5.1 Caracterização Geral

Foram analisados 146 casos, sendo que todas as pacientes fizeram cirurgia curativa e quimioterapia adjuvante com a combinação dos quimioterápicos doxorrubicina (antraciclina) e ciclofosfamida, seguindo de acordo com protocolos estabelecidos pelo centro de tratamento, sendo que a média de idade no diagnóstico foi de 49,91 com um desvio padrão de 10,62 anos. Na caracterização clínica, foram obtidos os dados descritos na Tabela 5.

Ambos polimorfismos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e seus genótipos se distribuíram da seguinte maneira:

- **Genótipos:** Polimorfismo C1236T: **CC**= 57 (39,04%), **CT**= 64 (43,84%), **TT**= 25 (17,12) [sendo, χ^2: 0,91 e P-value> 0,05].
- **Genótipos:** Polimorfismo G2677T/A: **GG**= 69 (47,26%), **GA**= 63 (43,15%), **AA**= 10 (6,85%), **GT**= 2 (1,37%), **AT**= 2 (1,37%) [sendo,χ^2: 1,081 e P-value>0,05].

Levando em conta a frequência do menor alelo para o polimorfismo C1236T e G2677T/A, foi obtido respectivamente, um poder amostral de 63 (erro alpha de 0.05) / 90 (erro alpha de 0,01) e 98 (erro alpha de 0,05) / 139 (erro alpha de 0,01).

Em relação à frequência alélica de cada polimorfismo, a distribuição seguiu-se da seguinte forma: C= 0,61 e T= 0,39 (C1236T); G= 0,70, A= 0,29 e T=0,01 (G2677T/A).

Tabela 5. Variáveis clínicas.

Variável Clínica		Pacientes (n=146)	Frequência (%)
Estadio do tumor	II	23	15,75
	III	123	84,25
Grau histológico do tumor	II	15	10,34
	III	130	89,66
	Sem dado	1	-
Grau nuclear do tumor	2	39	26,9
	3	106	73,1
	Sem dado	1	-
Quimioterapia neoadjuvante	Sim	74	50,68
	Não	72	49,32
Recidiva	Sim	88	60,27
	Não	58	39,73
Óbito	Sim	80	56,34
	Não	62	43,66
	Sem dado	4	-
Óbito relacionado à doença	Sim	71	88,75
	Não	9	11,25
Perda de seguimento	Sim	4	2,74
	Não	142	97,26
Radioterapia adjuvante	Sim	140	96,55
	Não	5	3,45
	Sem dado	1	-
Receptor de estrógeno	Sim	83	57,24
	Não	62	42,76
	Sem dado	1	-
Uso de Tamoxifeno (TMX)	Sim	88	61,97
	Não	54	38,03
	Sem dado	4	-
Receptor Her-2	Sim	10	55,56
	Não	8	44,44
	Sem dado*	128	-

* A análise de receptor Her-2 (Cerb-2) só entrou em vigor no serviço a partir de 2006.

Com relação ao tropismo metastático nos casos positivos para recidiva, os mesmos se distribuíram nas seguintes regiões: fígado, pulmão, pleura, ossos, pele, linfonodos e outras partes (mama contralateral, local, regional, plastrão, axilas, partes moles, linfonodos

axilares, fossa supraclavicular, cérebro, sistema nervoso central, locorregional e sistêmica), sendo que a prevalência foi de 40% em ossos.

5.2 Relação dos polimorfismos com a recidiva

Para averiguar se houve relação dos polimorfismos com o parâmetro recidiva, foi realizado os testes de associação (qui-quadrado ou exato de Fischer, conforme critérios do *software*) e os dados estão descritos nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Genótipos (e agrupamentos) do polimorfismo C1236T versus recidiva.

Genótipos	**RECIDIVA**		**Total (146)**	**P-value**
	Sim	***Não***		
CC	36 (63,16%)	21(36,84%)	57	
CT	41 (64,06%)	23 (35,94%)	64	0,19
TT	11 (44%)	14 (56%)	25	
CC	36 (63,16%)	21 (36,84%)	57	0,57
TT + CT	52 (58,43%)	37 (41,57%)	89	
TT	11 (44%)	14 (56%)	25	0,07
CC + CT	77 (63,64%)	44 (36,36%)	121	
Total	88	58		

(%frequência por linha)
Nível de significância P-value< 0,05

Podemos observar pela tabela 6, que o polimorfismo C1236T não se associou a recidiva em nenhum dos genótipos e agrupamentos (p>0,05).

Tabela 7. Genótipos (e agrupamentos) do polimorfismo G2677T/Ano gene *ABCB1* versus recidiva.

Genótipos	**RECIDIVA**		**Total (146)**	**P-value**
	Sim	***Não***		
GG	43 (62,32%)	26 (37,68%)	69	
GA	35 (55,56%)	28 (44,44%)	63	
AA	7 (70%)	3 (30%)	10	0,72*
GT	1 (50%)	1(50%)	2	
TA	2 (100%)	0 (0%)	2	
GG	43 (62,32%)	26 (37,68%)	69	
GT + GA	36 (55,38%)	29 (44,62%)	65	0,39
AA + TA	9 (75%)	3 (25%)	12	
GG + GT + GA	79 (58,96%)	55 (41,04%)	134	0,36*
AA + TA	9 (75%)	3 (25%)	12	
GG	43 (62,32%)	26 (37,68%)	69	0,63
GT + GA + AA + TA	45 (58,44%)	32 (41,56%)	77	
Total	88	58		

(%frequência por linha)
****Foi empregado o teste Exato de Fisher***
Nível de significância P-value< 0,05

Conforme verificamos na tabela 7, não houve associação dos genótipos e agrupamentos para o polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1* com a recidiva (p>0,05).

5.3 Análise de sobrevivência livre da doença e global frente aos polimorfismos avaliados no gene *ABCB1*

A média para o tempo de seguimento segue descrita conforme a seguir:

- Sobrevida livre da doença: 64,76 meses, valor mínimo: 4,37 meses e valor máximo: 143,80 meses).
- Sobrevida global:78,67 meses, valor mínimo: 8,80 meses e valor máximo: 146,40 meses).

Os dados estão apresentados nos gráficos de Kaplan-Meier com os genótipos (e agrupamentos) dos polimorfismos, para a sobrevida livre da doença e global.

- Sobrevida livre da doença:

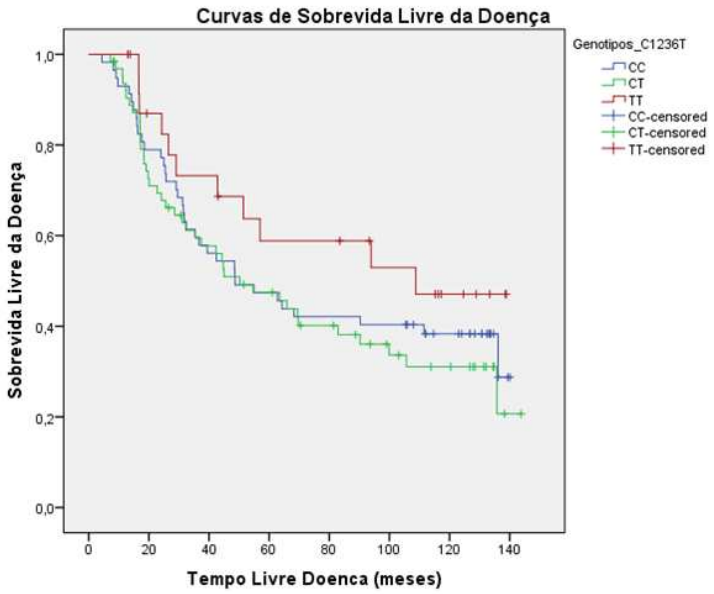


Gráfico 1. Polimorfismo C1236T no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,282**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve recidiva.

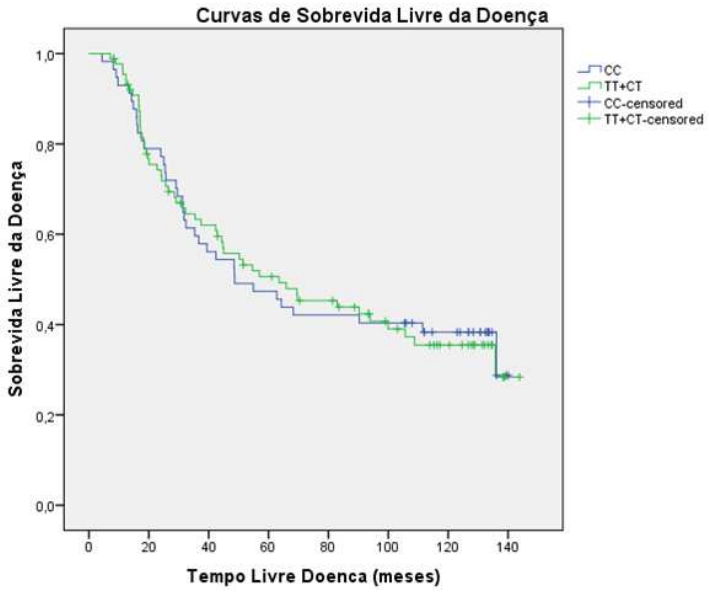


Gráfico 2. Polimorfismo C1236T (genótipo CC vs agrupamento TT+CT) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,983**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve recidiva.

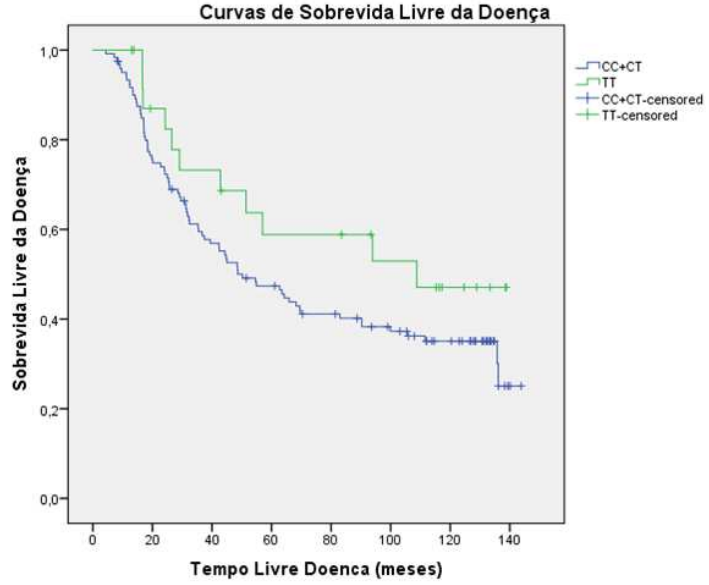


Gráfico 3. Polimorfismo C1236T (Genótipo TT versus agrupamento CC+CT) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,147**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve recidiva.

Dessa forma, nos gráficos 1, 2 e 3, observa-se que não houve diferença nas distribuições da sobrevida livre da doença para os diferentes genótipos (e agrupamentos) do polimorfismo C1236T no gene *ABCB1*, conforme confirmado pelo teste Log-Rank, onde os valores de P-value não foram significativos.

- Sobrevida global:

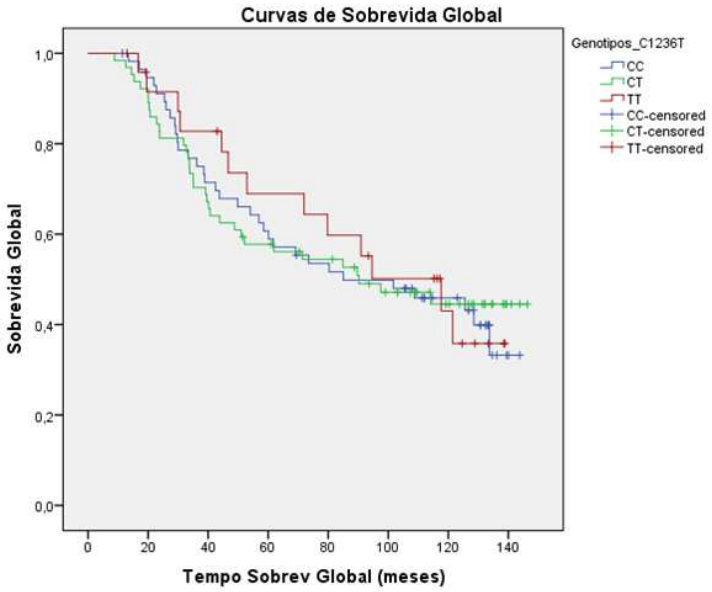


Gráfico 4. Polimorfismo C1236T no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,961**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve óbito.

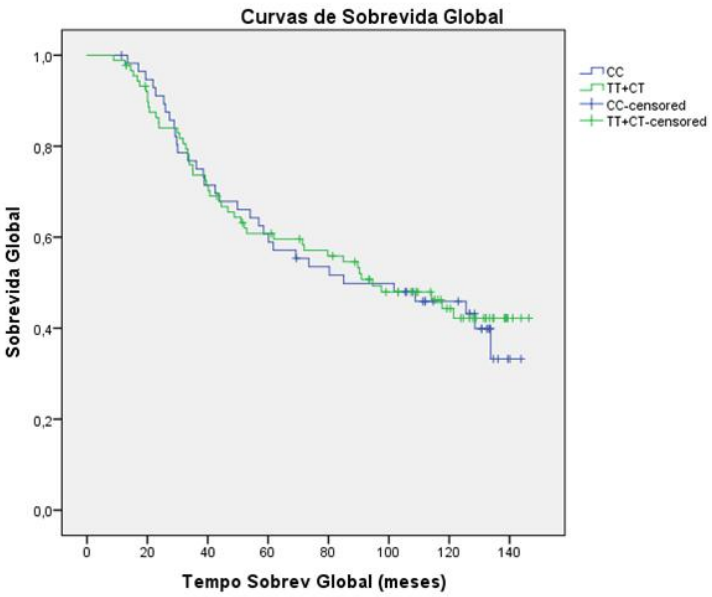


Gráfico 5. Polimorfismo C1236T (genótipo CC vs agrupamento TT + CT) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,834**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve óbito.

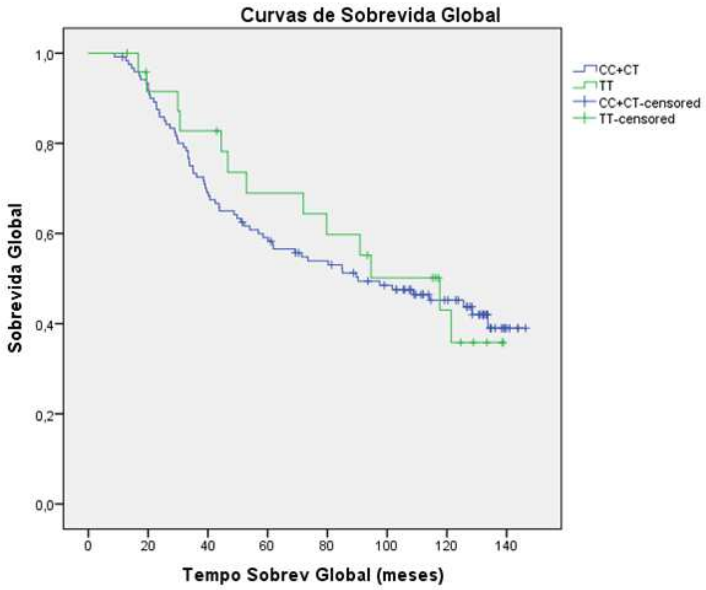


Gráfico 6. Polimorfismo C1236T (genótipo TT vs agrupamento CC+CT) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,800**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve óbito.

De acordo com os gráficos 4, 5 e 6, considerando a sobrevida global, observa-se pelo teste Log-Rank (p>0,05) que não houve diferença nas distribuições de sobrevida em relação aos diferentes genótipos (e agrupamentos) do polimorfismo C1236T.

A seguir estão apresentados os gráficos de sobrevivência para o polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1,* considerando os genótipos agrupados.

- Sobrevida livre da doença:

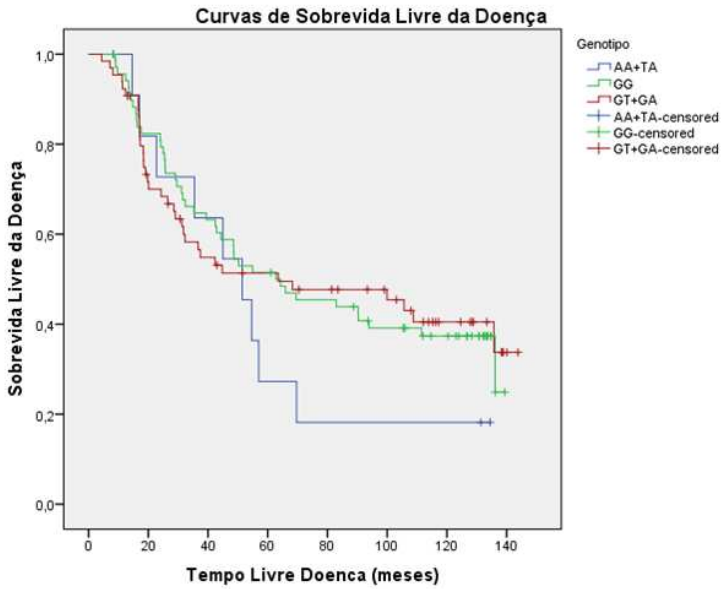


Gráfico 7. Polimorfismo G2677/A (genótipo GG vs GT+GA vs AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,580**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve recidiva.

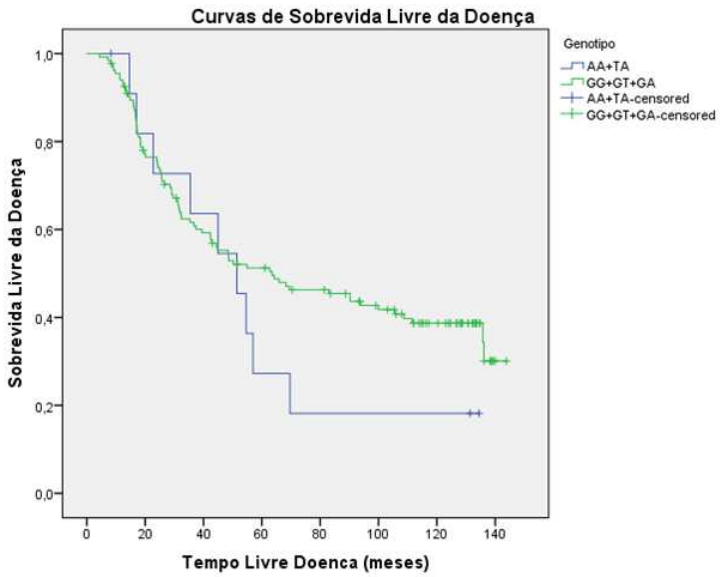


Gráfico 8. Polimorfismo G2677T/A (GG+GT+GA vs AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,298**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve recidiva.

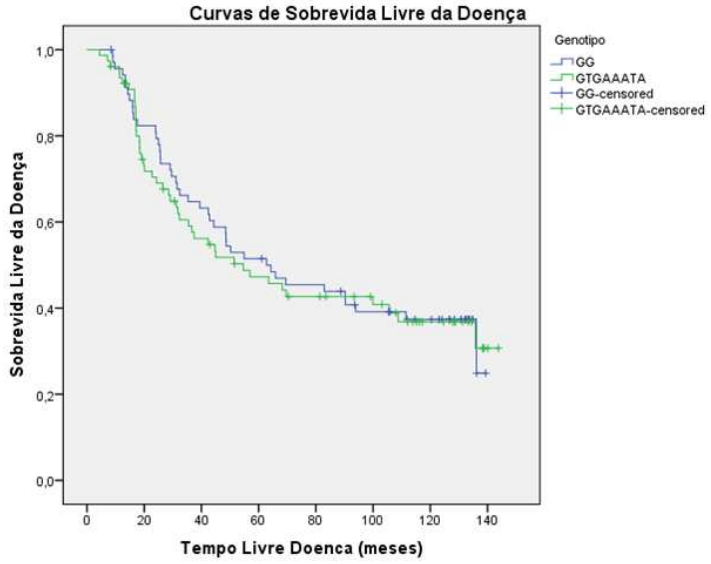


Gráfico 9. Polimorfismo G2677T/A (GG vs GT+GA+AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida livre da doença.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,820**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve recidiva.

Na análise de sobrevida livre da doença para os genótipos agrupados do polimorfismo G2677T/A no gene *ABCB1*, como observado nos gráficos 7, 8 e 9, não houve diferença nas distribuições.

- Sobrevida global:

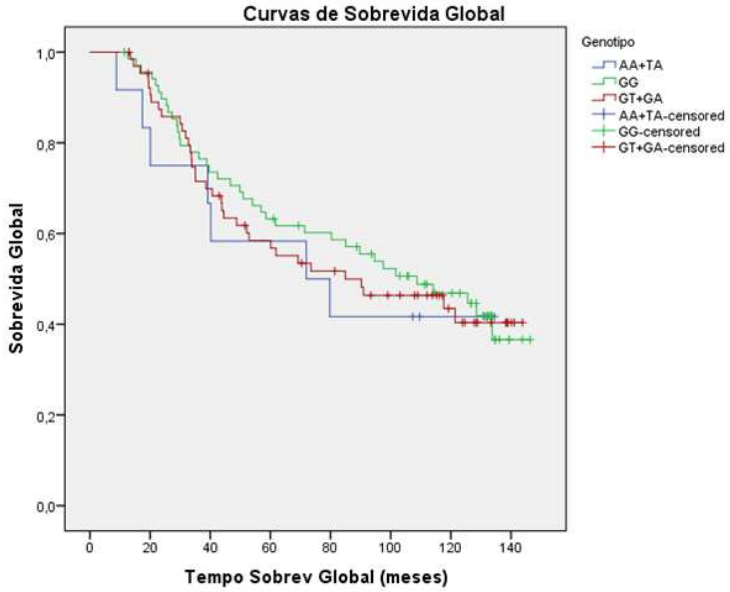


Gráfico 10. Polimorfismo G2677T/A (GG vs GT+GA vs AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,880**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve óbito.

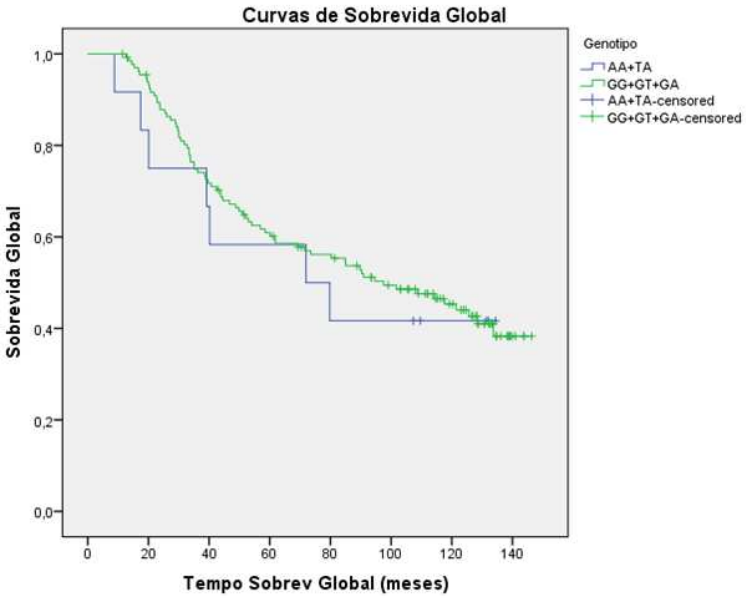


Gráfico 11. Polimorfismo G2677T/A (GG+GT+GA vs AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,730**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve óbito.

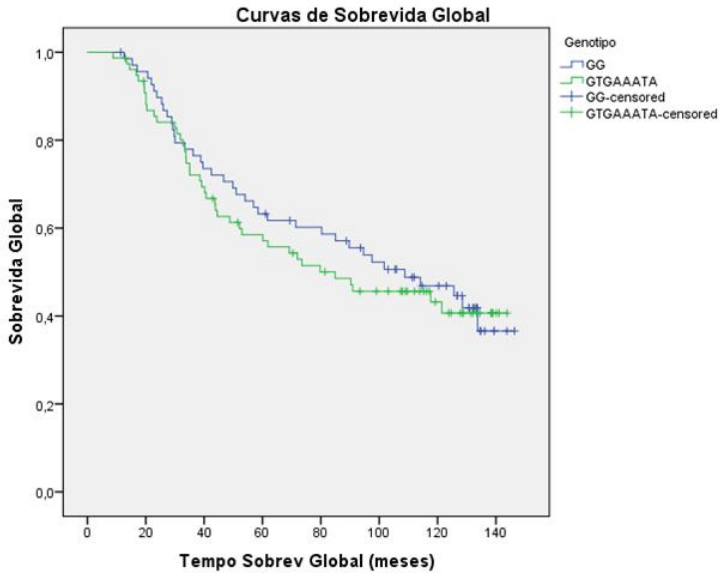


Gráfico 12. Polimorfismo G2677T/A (GG vs GT+GA+AA+TA) no gene *ABCB1* e associação com a sobrevida global.
Nível de significância P-value < 0,05
Teste de Log-Rank: **p= 0,649**
Observação: Censored (censurado) são os casos onde não houve óbito.

Conforme observado nos gráficos 10 11 e 12 na análise de sobrevida global, os genótipos agrupados do polimorfismo G2677T/A não mostraram significância na distribuição das curvas, o que podemos comprovar pelo teste Log-Rank (valor com p>0,05).

5.4 Análise regressão logística univariada e multivariada

Foi analisado para a associação com a recidiva (88 casos) a análise logística univariada para ambos polimorfismos, conforme as tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Regressão logística univariada polimorfismo C1236T.

Variáveis	*OddsRatio*	*Intervalo Confiança 95%*	*P-value*
CC vs TT*	2,182	0,844 - 5,783	0,11
CT vs TT	2,269	0,891 - 5,923	0,09
CC vs TT+CT*	1,220	0,618 - 2,437	0,57
CC+CT vs TT*	2,227	0,934 - 5,432	0,07

*Os genótipos TT e agrupamento TT+CT foram considerados como referência, pois de acordo com o estudo de associação (Tabela 6) mostraram-se menor risco para recidiva.
vs= versus. Nível de significância P-value< 0,05

Tabela 9. Regressão logística univariada para polimorfismo G2677T/A.

Variáveis	*OddsRatio*	*Intervalo Confiança 95%*	*P-value*
AA+TAvs GT+GA*	2,417	0,652 - 11,641	0,22
GG vs GT+GA	1,332	0,669 - 2,699	0,42
AA+TAvs GG+GT+GA*	2,089	0,592 - 9,73	0,29
GG vsGT+GA+AA+TA*	1,176	0,605 - 2,297	0,63

*Os agrupamentos GT+GA, GG+GT+GA e GT+GA+AA+TA foram considerados como referência, pois de acordo com o estudo de associação (Tabela 7) mostraram-se menor risco para recidiva.
vs= versus. Nível de significância P-value< 0,05

Conforme observado nas tabelas 8 e 9 considerando a regressão logística univariada para os polimorfismos C1236T e G2677T/A no gene *ABCB1*, não foi observado associação entre os genótipos e agrupamentos estudados, para a recidiva.

Foi realizada a regressão logística multivariada, considerando os genótipos não agrupados CC / CT / TT para o polimorfismo C1236T e o agrupamento GG / GT+GA / AA+TA do polimorfismo G2677T/A (Tabela 10).

Tabela 10. Regressão logística multivariada para os polimorfismos.

Polimorfismo	***Variáveis***	***OddsRatio***	***Intervalo Confiança 95%***	***P-value***
C1236T	CC vs TT* CT vs TT	2,274 2,151	0,732-7,27 0,817 - 5,794	0,16 0,12
G2677T/A	AA+TAvsGT+GA* GG vs GT+GA	2,194 1,03	0,572 - 10,779 0,438 - 2,403	0,28 0,95

*O genótipo TT do polimorfismo C1236T e o agrupamento GT+GA foram considerados como referência, pois de acordo com o estudo de associação (Tabela 6 e 7) mostraram-se menor risco para recidiva.
vs= versus. Nível de significância *P-value*< 0,05.

De acordo com a análise de regressão logística multivariada, não houve diferença em ambos polimorfismos.

Para finalização das analises, foi empregado os testes de regressão de cox univariada e multivariada para os dois polimorfismos, e não foi observado em nenhum dos testes, resultados significativos entre os genótipos e agrupamentos dos polimorfismos, para a sobrevida livre da doença.

6. Discussão

6.1 Aspectos gerais

O impacto mundial e nacional considerando-se a mortalidade pelo câncer de mama é grande e sua morbidade é evidente. Conforme Re e colaboradores (2012) [46], este tipo de neoplasia é a mais comum entre as mulheres do mundo ocidental.

Os tratamentos quimioterápicos usados para erradicação do câncer muitas vezes não temo efeito terapêutico esperado. De acordo com Efferth e colaboradores (2005) [47], os obstáculos principais que surgem na quimioterapia do câncer é o desenvolvimento da resistência ao medicamento e os efeitos indesejáveis da toxicidade.

Acredita-se que a expressão da glicoproteína-P em tecidos normais tem importância na farmacocinética e farmacodinâmica de muitas drogas [47,48], e os SNPs no gene *ABCB1* necessitam ser estudados para verificar se estão envolvidos na resposta terapêutica [47].

Conforme Alsaif e colaboradores (2013) [49] a superexpressão da glicoproteína-P, devido à ativação do gene *ABCB1*, é a causa mais comum de resistência ao tratamento quimioterápico. O foco principal deste trabalho foi averiguar se os polimorfismos C1236T e G2677T/A do gene *ABCB1* podem estar, de fato, influenciando no tratamento quimioterápico do câncer de mama em nossa população.

A recidiva foi o parâmetro de verificação da resposta ao tratamento, pois todas as pacientes incluídas fizeram uso de quimioterapia adjuvante (alguns casos com neoadjuvância) e foram tratadas com intenção curativa, de modo que a recidiva revela uma falha do tratamento. De acordo com meta análise realizada de 2015, não foi verificada

nenhuma diferença entre a quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante) e quimioterapia pós operatória (adjuvante), em termos de sobrevida global e livre da doença, resultando em equivalência entre os tratamentos [50]. Foram feitos dez estudos de análise de sobrevida global, com 4.620 mulheres (1.139 mortes estimadas) e dez estudos para análise de sobrevida livre da doença, com 4.510 mulheres (estimativa de 1.596 com evento de recidiva),

Conforme observado em nosso estudo, 96,55% das pacientes fizeram uso de radioterapia adjuvante, cuja ação é local, ao contrário da quimioterapia adjuvante que age sistemicamente. Das pacientes com receptor de hormônio positivo, 61,97% receberam terapia hormonal com tamoxifeno, o que de fato contribuiu para um melhor prognóstico.

6.2 Polimorfismos e associação com o tratamento

Estudos que focam em especial os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T do gene *ABCB1* buscam correlacionar os genótipos e a resistência ao tratamento quimioterápico, com o intuito de encontrar formas de melhorar a conduta terapêutica. Conforme Loh e Soong (2011) [51], com base nos avanços no âmbito científico a farmacogenética vem ganhando destaque, com expectativa de ganhos na prática clínica e em direção à medicina personalizada.

A farmacogenética pode auxiliar nas adaptações ao tratamento, indicando quimioterápicos menos tóxicos e mais sensíveis contra o câncer, melhorando a sobrevida e evitando comprometer a qualidade de vida dos pacientes [52].

Acredita-seque a associação dos três polimorfismos (**C1236T, G2677T/A** e C3435T) pode explicar a influência da farmacogenética.

Em estudo com 62 pacientes asiáticas que receberam doxorrubicina de forma adjuvante, foi descrita alteração na farmacocinética da droga, sugerindo que os polimorfismos citados (respectivamente) no gene *ABCB1* possam ser importantes do ponto de vista funcional. No estudo, foi encontrada influência na disposição do medicamento doxorrubicina com relação ao aumento dos níveis, da concentração de picos plasmáticos e diminuição da eliminação da droga em pacientes com o alelo variante para os polimorfismos [53].

Analisou-se no estudo previamente citado, que as pacientes com combinações **CC-GG**-CC tinham níveis baixos de exposição à droga, quando comparados com as combinações **CT-GT**-CT e **TT-TT**-TT. E, observou-se que pacientes com as combinações **CC-GG**-CC tem menor pico plasmático do metabólito doxorubicinol em comparação com os pacientes TT para os três polimorfismos. Em relação à eliminação da droga,verificou-se que pacientes com os genótipos **CC-GG**-CC tinham aumento significativo em comparação com os genótipos heterozigotos **CT-GT**-CT. Pacientes que tinham uma única variante T para o polimorfismo **C1236T** podem sofrer influência no aumento de exposição aos níveis de doxorrubicina [53].

Um estudo prospectivo com 41 pacientes caucasianos com câncer (sendo dez de mama) não mostrou relação dos polimorfismos **C1236T**, **G2677T/A** e C3435T com o processo de eliminação de vinorelbina [40]. Já em estudo recente de 2013, com 100 pacientes com câncer de mama, o polimorfismo **C1236T** apresentou associação com a

resposta aos regimes quimioterápicos, sendo que os genótipos CT/TT apresentam baixa resposta terapêutica [49].

De acordo com Wang e colaboradores (2005) [43], os três SNPs estão em desequilíbrio de ligação, o que é ressaltado por Marzolinie colaboradores (2004)[37]. Estes relatam que pesquisas apontam forte desequilíbrio de ligação entre as combinações de haplótipos do polimorfismo C3435T e **G2677T/A**, sendo que posteriormente verificou-se que o polimorfismo **C1236T** também está ligado aos demais. Quando as combinações de genótipos foram examinadas, mais de 50% dos indivíduos apresentaram desequilíbrio de ligação. Assim, sugere-se pelo fato de haver desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo C3435T e o **G2677T/A**, que as atribuições feitas em relação às diferenças funcionais da glicoproteína-P pelo SNP C3435T poderiam ser consequências da associação do SNP não sinônimo G2677T/A [37].

Há existência de certas discrepâncias de dados no que concerne o polimorfismo **G2677T/.** Alguns estudos demonstram que o genótipo TT está associado à alta expressão da glicoprotéina-P, ao passo que outros estudos apontam uma relação de baixa expressão frente a este mesmo genótipo. Um estudo que avaliou a relação dos polimorfismos C3435T e **G2677T/A** e a expressão da glicoproteína-P em 26 amostras de fígado humano demonstrou que o polimorfismo **G2677T/A** não tem efeito na expressão; os pesquisadores sustentam este achado com base em outros registros, apesar de reconhecerem que uma limitação do estudo foi o pequeno número de amostras [54].

Em estudo que avaliou os SNPs **G2677T/A** e C3435T em 121 pacientes, sendo que 103 receberam *a priori* quimioterapia com antraciclina (54 adjuvante e 49 no tratamento para metástase), foi realizada a genotipagem de 108 indivíduos e observada resistência

tanto para antraciclina, quanto para o paclitaxelpara o genótipo GG (**G2677T/A**). Entretanto, nenhuma associação foi encontrada nos genótipos do polimorfismo **G2677T/A** e haplótipos **2677**/3435 com a sobrevida global e livre da recidiva. Em relação à taxa de resposta ou controle da doença, não houve associação do SNP **G2677T/A** e dos haplótipos [55].

Diante da variedade de estudos de associação dos polimorfismos **C1236T** e **G2677T/A**, muitas vezes estudados em conjunto com o C3435T e na forma de haplótipos, pode-se observar incertezas sobre este assunto. Alguns estudos encontraram relações significativas e outros não. Em nosso estudo, não se observou associação dos genótipos (e agrupamentos) para os polimorfismos C1236T e G2677T/A com resposta ao tratamento quimioterápico para as análises estatísticas utilizadas.

Nossa pesquisa vai ao encontro de estudo realizado com 261 pacientes com câncer de mama em estádio II/III tratadas com docetaxel e doxorrubicna (antraciclina), em três ciclos de quimioterapia neoadjuvante seguido de cirurgia e tratamento quimioterápico adjuvante, onde não foram encontradas diferenças na sobrevida global e livre da doença, para os polimorfismos **G2677T/A** e **C1236T** [56].

Em referência ao estudo citado, o grupo analisado é maior que o do nosso estudo, apesar do poder amostral em nossa casuística estar acima do recomendado para cada polimorfismo (**C1236T e G2677T/A**). Esta questão nos remete a observar que o câncer de mama é uma doença complexa, com muitas variáveis que possuem implicações no tratamento. De acordo com Colleoni e colaboradores (2010) [57], estas variáveis são características do próprio tumor, do tratamento e do paciente, concluindo-se que os subtipos de tumor correlacionam-se com a magnitude do efeito do tratamento quimioterápico.

É importante frisar que de acordo com Bray e colaboradores (2010) [22], fatores envolvendo o tumor como: fase e grau, linfonodos acometidos, RE e RP e expressão de ERBB2 (HER-2), são conhecidos por influenciar na resposta aos quimioterápicos AC (Antraciclina e Ciclofosfamida); e conforme Azevedo e colaboradores (2009) [15] a invasão e dimensão linfonodal é um dos fatores de risco que contribui para o prognóstico, ou seja, quanto mais extensa for a invasão das células malignas, maior chance de disseminação sistêmica e tendência para progressão rápida, acarretando assim um mau prognóstico neste caso e dificuldades no tratamento.

A resposta de nosso estudo foi a não relação dos achados genéticos, aqui pesquisados, com o tratamento. Porém, devemos olhar mais profundamente para outros fatores genéticos e não genéticos que possam estar influenciando na resposta medicamentosa, para assim contribuir na melhoria do tratamento do câncer de mama, e caminhar para a terapia personalizada.

7. Conclusão

Nesta amostra da população brasileira, tendo como parâmetro a recidiva da doença, não foi encontrada uma associação dos polimorfismos com o tratamento quimioterápico (antraciclina e ciclofosfamida).

8. Referências bibliográficas

1. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson e Thompson Genética Médica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

2. Bruce A, et al. Molecular biology of the cell. 5thed, New Tork: Garland Science, 2008.

3. Onuchic AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med**. 2010; 89 (1): 21-31.

4. Instituto Nacional do Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 3ed, Rio de Janeiro: INCA, 2008.

5. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [online]. [acesso: 2015 set 15]. Disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama

6. Gonzáles-Neira A. Pharmacogenetics of chemotherapy efficacy in breast câncer. **Pharmacogenomics**. 2012; 13(6): 677-690.

7. Segal SL, Bittelbrunn AC, Biazús JV, Menke CH, Cavalheiro JA, Xavier NL, Rabin EG, Cericatto R. Genética e câncer de mama. **Revista HCPA**. 2001; 21(2): 191-197.

8. Amendola LCB, Vieira R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2005; 51(4): 325-330.

9. Videira M, Reis LR, Brito MA. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanism of multidrug resistance. **Biochimicaet BiophysicaActa**. 2014; 1846: 312-325.

10. Geyer FC, Nigro de MV. Tipos histológicos especiais de câncer de mama. **ONCO &**. 2013.

11. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de bases técnicas da oncologia –SAI/SUS – Sistema de informações ambulatoriais. 14ed. Brasília: O Ministério, 2013.

12. Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Freitas-Junior R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **FEMINA**. 2011; 39(10): 499-503.

13. Joosse SA. Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells.**EMBO Molecular Medicine.**2015; 7(1): 1-11.

14. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **J Clin Oncol**. 2010; 28: 3271-3277.

15. Azevedo de CM, Alvarenga AV, Pereira WCA, Infantos AFC. Análise computacional da textura de tumores de mama em imagens por ultrassom de pacientes submetidas a cirurgia conservadora. **Radiol Bras**. 2009; 42(6): 363-369.

16. Instituto Nacional de Câncer - Tratamento [online]. [acesso: 2014 abr 09]. Disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/tratamento.

17. Vianna-Jorge R, Festa-Vasconcellos JS, Goulart-Citrangulo SMT, Leite MS. Functional polymorphisms in xenobiotic metabolizing enzymes and their impact on the therapy of breast câncer. **Frontiers in Genetics**. 2013; 3(329): 1-19.

18. Teixeira LA (Coordenador), Fonseca CMO. De doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2007.

19. Instituto Nacional de Câncer - Quimioterapia [online]. [acesso: 2014 abr 13]. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101.

20. Almeida de VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**. 2005; 28(1):118-129.

21. Westbrook K, Stearns V. Pharmacogenomics of breast cancer therapy: An update. **Pharmacology Therapeutics**. In press 2013.

22. Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Cole M, Verrill M, Jamieson D, Boddy AV. Influence pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. **British Journal of Cancer**. 2010; 102: 1003-1009.

23. Righetto L. Cloridrato de doxorrubicina: pó liofilizado [bula de medicamento]. Buenos Aires: IMA S.A.I.C. Argentina.

24. Katzung BG. Farmacologia básica e clínica. 10ed. Porto Alegre: AMGH,2010.

25. Golan DE, Tashjian Jr AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. Princípios de farmacologia : a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2009.

26. Metzger IF, Souza-Costa DC, Tanus-Santos JE. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas**. Medicina (Ribeirão Preto)**. 2006; 39(4): 515-521.

27. Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. **Br J Clin Pharmacol**.2001; 52: 345-347.

28. Ayoub N, Lucas C, Kaddoumi A. Genomics and pharmacogenomics of breast câncer: current knowledge and trends. **Asian Pacific J Cancer Prev**. 2011; 12: 1127-1140.

29. Pessôa RF, Nácul FE, Noël F. Farmacogenética e farmacogenômica. Evidências de como a genética pode influenciar a eficácia de fármacos e a busca por novos alvos farmacológicos**. Infarma**. 2006; 18(11/12): 41-48.

30. YiannakopoulouECh. Pharmacogenomics of breast cancer targeted therapy: Focus on recente patents. **Recent Patents DNA Gene Sequences**. 2012; 6(1): 33-46.

31. Ishikawa T. Recent advances in pharmacogenomics of ABC transporters involved in breast cancer therapy. **Pharmacogenomics**. 2012; 13(6): 633-636.

32. Sheng X, Zhang L, Tong N, Luo D, Wang M, Xu M, Zhang Z. MDR1 C3435T polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 39 case-control studies. **MolBiol Rep**. 2012; 39: 7237-7249.

33. Wang J, Wang B, Bi J, Li K, Di J. MDR1 gene C3435T polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 34 case-control studies. **J Cancer Res ClinOncol**. 2012; 138: 979-989.

34. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glicoprotein and its clinical relevance in drug disposition. **Xenobiotica**. 2008; 38(7-8): 802-832.

35. Reis M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Medicina (Ribeirão Preto)**. 2006; 39(4): 577-586.

36. Ruber PC, Maruiama CH, Almeida WP. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Quim Nova**. 2010; 33(10): 2148-2154.

37. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glicoprotein): recent advances and clinical relevance. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. 2004; 75(1): 13-33.

38. EnsemblGenome Browser [base de dados da internet]. England; update 2014; acesso em 03 Dec 2014. Disponível em: http://www.ensembl.org.

39. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Polymorphism C3435T of the MDR-1gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. **Int J Oncol** 2003; 22:1117-1121.

40. Tan SH, Lee SC, Goh BC, Wong J. Pharmacogenetics in breast cancer therapy. **Clin Cancer Res**. 2008; 14(24): 8027-8041.

41. Rubis B, Hotysz H, Barczak W, Gryczka R, Lacinski M, Jagielski P, et al. Study of ABCB1 polymorphism frequency in breast cancer patients from Poland. **Pharmacological Reports**. 2012; 64: 1560-1566.

42. Chen B, Fang J, Zhang W, Jin Z, Yu Z, Cai W. Detection of C1236T, G2677T/A, and C3435T polymorphism of MDR1 by Amplication Refractory Mutation System PCR. **J Clin Lab Anal**. 2009; 23: 110-116.

43. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrig resistance polypeptide 1(MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. **Pharmacogenetics and Genomics**. 2005; 15: 693-704.

44. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. **BiochimicaetBiophisicaActa**. 2009; 1794: 860-871.

45. Woodhead JL, Fallon R, Figuered H, Longdale J, Malcom ADB. Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies KE, ed .Human genetic diseases – a pratical approach. Oxford: **IRL Press**; 1986. 51-64.

46. Re MD, Michelucci A, Simi P, Danesi R. Pharmacogenetics of anti-estrogen treatment of breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**. 2012; 38: 442-450.

47. Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. **Pharmacology and Therapeutics**. 2005; 107: 155-176.

48. Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphism in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. **Br J of Clin Pharmacology**. 2005; 59(3): 365-370.

49. Alsaif AA, et al. Association of multiple drug resistance-1 gene polymorphism with multiple drug resistance in breast cancer patients from an ethnic Saudi Arabian population. **Cancer epidemiology.** 2013; 37: 762-766.

50. Van der Hage JH, Van de Velde Cornelis CJH, Mieog Sven JSD. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: **The Cochrane Library**. 2015.ed 5Art. No. CD005002. DOI: 10.1002/14651858.CD005002.pub2

51. Loh M, Soong R. Challenges and pitfalls in the introduction of pharmacogenetics for cancer. **Annals Academy of Medicine**. 2011; 40(8): 369-374.

52. Kristyanto H, Utomo AR. Pharmacogenetic application in personalized cancer treatment. **Acta Med Indones- Indones J Intern Med**. 2010; 42(2): 109-115.

53. Lal S, Wong ZW, Sandanaraj E, Xiang X, Ang PCS, Lee EJD, Chowbay B. Influence of *ABCB1* and *ABCG2* polymorphism on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. **Cancer Sci**. 2008; 99(4): 816-823.

54. Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the *ABCB1* gene and P-glycoprotein expression in human liver. **Br J Clin Pharmacol**. 2005; 59(3): 365-370.

55. Chang H, Rha SY, Jeung HC, Im CK, Ahn JB, Kwon WS, Yoo NC, Roh JK, Chung HC. Association of the *ABCB1* gene polymorphisms 2677G>T/A and 3435C>T with clinical outcomes of paclitaxel monotherapy in metastatic breast cancer patients.**Annal of Oncology**. 2009; 20: 272-277.

56. Kim HJ, Im SA, Keam B, Ham HS, Lee KH, Kim TY, Kim YJ, Oh DY, Kim JH, Han W, Jang IJ, Kim TY, Park IA, Noh DY. *ABCB1* polymorphism as prognostic factor in breast cancer patients treated with docetaxel and doxorubicin neoadjuvant chemotherapy. **Cancer Sci**. 2015; 106(1): 86-93.

57. Colleoni M, Cole BF, Viale G, Regan MM, Price KN, Maiorano E, Mastropasqua MG, Crivellari D, Gelber RD, Goldhirsch A, Coates AS, Gusterson BA. Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. **J Clin Oncol**. 2010; 28: 2966-2973.

9. Anexos

Termos de aprovação Comitê de Ética em Pesquisa.

FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação do polimorfismo ABCB1 3435C>T com a resposta a quimioterápicos no câncer de mama

Pesquisador: Roby Will Vencatto
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 16949413.4.0000.5404
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Medicas - UNICAMP
Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 368.384
Data da Relatoria: 12/08/2013

Apresentação do Projeto:
Trata-se de um estudo sobre a influência do polimorfismo do gene ABCB1 3435C>T (o qual codifica a glicoproteína-P, relacionada à resistência a drogas) no tratamento quimioterápico do câncer de mama. Propõe-se avaliar DNA genômico mantido em biorrepositório, originalmente obtido a partir de amostras de sangue colhidas de pacientes diagnosticadas com câncer de mama e que receberam tratamento quimioterápico no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti ¿ CAISM (estudo em andamento projeto CAE 09124812.4.0000.5404). No estudo propõem-se analisar 300 amostras e, ainda, a dispensa do TCLE.

Objetivo da Pesquisa:
Verificar presença do polimorfismo ABCB1 3435C>T em pacientes com diagnóstico de câncer de mama em tratamento quimioterápico ou que já efetuaram o mesmo. 2)Avaliar o efeito terapêutico/toxicidade do tratamento quimioterápico dos pacientes em estudo. 3)Correlacionar o genótipo encontrado nos pacientes com os tratamentos quimioterápicos utilizados pelos mesmos, na terapêutica contra o câncer de mama.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Serão utilizadas amostras de biorrepositório de estudo anterior, assim, o risco indicado no projeto envolve a manutenção do sigilo das informações dos sujeitos para o que, menciona-se que serão tomadas todas as precauções necessárias para a guarda das informações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo pretende contribuir para a compreensão da influência do polimorfismo do gene ABCB1 3435C>T (o qual codifica a glicoproteína-P, relacionada à resistência a drogas) no tratamento quimioterápico do câncer de mama. Os autores esclarecem que serão utilizadas no estudo amostras de biorrepositório e informações coletadas a partir dos prontuários destas pacientes em estudos anteriores e já incluídas no banco de dados do grupo de pesquisa. Esclarecem, ainda, que só serão utilizadas no estudo amostras de pacientes que consentiram por meio de assinatura do TCLE com o armazenamento de amostras para estudos futuros.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentada "folha de rosto" assinada pela pesquisadora principal e pelo diretor da FCM, uma vez que a FCM/UNICAMP foi indicada como instituição proponente a FCM/UNICAMP.

Foi apresentado o formulário "Projeto de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos" CONEP preenchido.

Propõe-se dispensa do TCLE, justificando-se: As amostras de DNA genômico das pacientes utilizadas neste estudo advêm de um projeto anterior (CAE 09124812.4.0000.5404) e só serão estudadas amostras que a paciente autorizou a utilização das mesmas, não serão estudados os DNAs gênomicos em que no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

do projeto anterior o paciente não deu o aval para tal utilização de sua amostra. Com isso solicita-se a dispensa do TCLE.

Recomendações:

Com relação a recomendação da necessidade de anuência da direção do Hospital da

Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM para a realização do estudo, particularmente, para a coleta de dados dos prontuários das pacientes, os autores esclareceram que tais informações já se encontram no banco de dados do grupo de pesquisa como resultado de estudos anteriores.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os autores do projeto esclareceram todas as pendências apontadas no Parecer Consubstanciado anterior.

Os documentos estão adequados e atendem à Resolução 466/2012, CNS, MS.

Coordenação deste CEP incluiu regulamento do biorepositório citado pelo pesquisador, em arquivo no sistema da Plataforma Brasil.

Projeto aprovado, após resolução de pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

CAMPINAS, 22 de Agosto de 2013

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação de polimorfismos no gene ABCB1 com a resposta a quimioterápicos no câncer de mama

Pesquisador: Roby Will Vencatto

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

Versão: 4

CAAE: 16949413.4.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Medicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 808.216

Data da Relatoria: 01/10/2014

Apresentação do Projeto:

Tratas-se de emenda ao projeto original, na qual pesquisadores solicitam, com as devidas justificativas, as seguintes mudanças: inclusão de mais dois polimorfismos na análise do material biológico em estudo, mudança do título do projeto e mudança na técnica de detecção dos polimorfismos, de modo a empregar a técnica de PCR alelo específico em lugar da técnica de RFLP originalmente proposta.

Nesta apresentação, pesquisadores enviam formulário da plataforma Brasil devidamente corrigido, contemplando novo título do projeto, além de objetivos e metodologia atualizados.

Objetivo da Pesquisa:

.1) Verificar presença dos polimorfismos do gene ABCB1 (3435C>T, C1236T e G2677T/A) em pacientes com diagnóstico de câncer de mama em tratamento quimioterápico ou que já efetuaram o mesmo.

.2)Avaliar o efeito terapêutico/toxicidade do tratamento quimioterápico dos pacientes em estudo.

3)Correlacionar o genótipo encontrado nos pacientes com os tratamentos quimioterápicos utilizados pelos mesmos, na terapêutica contra o câncer de mama.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mantidos em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto recebeu parecer de aprovação por este CEP (núm.36838) e utilizará amostras de DNA genômico advindas de projetos anteriormente aprovados (CAAE 09124812.4.0000.5404 e 12324713.9.0000.5404). Serão estudadas apenas as amostras nas quais os pacientes autorizam a utilização das mesmas. Por isso, solicita-se a dispensa do TCLE, com o compromisso já assumido de preservar a identidade dos participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação enviada está adequada e em acordo com os preceitos da Res. CNS 466-2012.

Recomendações:

--

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada com dispensa de apresentação de TCLE aos participantes envolvidos no estudo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

CAMPINAS, 26 de Setembro de 2014

Assinado por:
Monica Jacques de Moraes
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br