

# **POLIMORFISMO NOS GENES *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3* *ESLCO1B1* COMO FATOR PREDITIVO DE MUCOSITE ORAL EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Darlen Cardoso de CARVALHO

CARVALHO, Darlen Cardoso de. **Polimorfismo nos genes *abcc1*, *abcc2*, *abcc3* *eslco1b1* como fator preditivo de Mucosite Oral em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda.** Projeto de investigação científica, do Curso de Odontologia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2020.

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma forma predominante de câncer em crianças, constituindo cerca de um terço de todas as neoplasias malignas infantis (SWERDLOW *et al.*, 2008; BHOJWANI *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2018), representando 75% dos casos de leucemias infantis. A região Norte do Brasil apresenta a maior taxa de incidência deste tipo de neoplasia, acima de 39%. Embora nos últimos anos as taxas de sobrevida dos pacientes com LLA tenham aumentado devido ao progresso terapêutico, ainda existe um elevado índice de pacientes infantis que não respondem ao tratamento quimioterápico convencional, cerca de 20% desses pacientes apresentam

sérias complicações toxicológicas. Levantamentos epidemiológicos realizados em pacientes tratados para LLA na referida região mostrou que cerca de 60% desses pacientes não respondem ao tratamento quimioterápico convencional, o que contribui para um maior índice de mortalidade, se comparado com outras regiões do Brasil. Com abordagens quimioterapêuticas modernas e intensivas, quase 80% das crianças e adolescentes com LLA agora estão sendo curados de suas doenças (VAGACE *et al.*, 2012; LOPEZ-LOPEZ *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2018). O metotrexato (MTX) é um dos principais agentes quimioterápicos com as melhores eficácias demonstradas contra a LLA. No entanto, devido à estreita faixa terapêutica, toxicidades significativas ao MTX ocorrem durante o tratamento da LLA, causando interrupção ou descontinuação quimioterapêutica. É um antimetabólito que interfere no metabolismo do ácido fólico, levando à incapacidade das células em produzirem proteínas e conseqüentemente se desenvolverem. Entretanto, apesar de seu grande sucesso clínico, ainda pode causar toxicidade e diversos efeitos adversos, podendo levar não apenas à morbidade, mas também à interrupção do tratamento e potencialmente possibilitar ao

paciente a obter resultados não satisfatórios (VAGACE *et al.*, 2012; GERVASINI e VAGACE, 2012). A modulação no risco de desenvolver Mucosite Oral (MO) pode ser influenciada por polimorfismos em genes da família ABC e da *SLCO*, por estarem relacionados ao transporte de MTX no organismo. A MO é a complicação frequente observada da terapia contra a LLA. O desenvolvimento de MO tem um impacto direto na qualidade de vida do paciente e pode afetar a sua sobrevivência pois pode levar à dor, comprometimento da ingestão oral, perda de peso, aumento da incidência de infecções secundárias ou sistêmicas e ao tratamento oncológico insatisfatório. A MO é a principal reação adversa observada em crianças em tratamento para LLA (NEMES *et al.*, 2018). É causada por dano celular devido à rápida divisão de células epiteliais ao longo de todo o trato gastrointestinal, podendo levar à dor, à ingestão oral comprometida, à perda de peso. É uma causa comum de morbidade em crianças com LLA e fonte frequente de sequelas a longo prazo, sendo um efeito colateral comum atribuído ao uso do MTX (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2004; MATHUR *et al.*, 2012; EPSTEIN *et al.*, 2012; WONG, 2014). O MTX possui grande variabilidade de resposta entre os

pacientes, a qual pode ser parcialmente explicada pelas diferentes sequências nos genes responsáveis pelo seu transporte, como os membros da família de transportadores de ânions orgânicos transportadores de soluto (*SLCO*) e genes da família *ABC* de transportadores de cassete de ligação de ATP. Esses genes têm como função auxiliar a entrada e saída do MTX na célula-alvo. Variações genéticas podem interferir no tipo de resposta esperada pelo tratamento com MTX em pacientes oncológicos (STRAND *et al.*, 1999, SWERTS *et al.*, 2006). Estudos com polimorfismos em genes farmacogenéticos como as variantes rs28364006 do gene *ABCC1*, rs717620 do gene *ABCC2*, rs9895420 do gene *ABCC3* e rs4149056 do gene *SLCO1B1* podem ajudar a prever riscos de desenvolver toxicidades, como a MO, proporcionando dados clínicos capazes de justificar a elaboração de protocolos específicos, aplicáveis ao tratamento oncológico da LLA, que melhorariam a qualidade de vida dos pacientes, pela diminuição dos efeitos adversos decorrentes da terapia convencional e aumento de eficácia terapêutica. Assim este estudo investigou a associação de variantes polimórficas nos genes *ABCC1* (rs28364006), *ABCC2* (rs717620), *ABCC3* (rs9895420) e

*SLCO1B1*(rs4149056) e a ocorrência de MO em pacientes pediátricos portadores de LLA, em tratamento com MTX. A modulação no risco de desenvolver MO pode ser influenciada por polimorfismos em genes da família ABC e da *SLCO*, por estarem relacionados ao transporte de MTX no organismo. A família ABC consiste em tornos de 48 membros de proteínas, classificados em sete famílias diferentes (de A a G), dependendo da sequência de aminoácidos (CHAVES *et al.*, 2014). Esses transportadores são classificados como transportadores ativos, pois requerem uma fonte de energia, ATP, para transportar substratos através de uma membrana. São encontrados em vários tecidos como fígado, intestino, rim, barreira hematoencefálica, barreira sangue-testículo e placenta e são responsáveis por mediar o transporte de diversos tipos de substratos pelo efluxo de resíduos ou fármacos, incluindo o MTX (STRAZIELLE *et al.*, 2015). Alterações genéticas, como nos genes *ABCC1*, *ABCC2* e *ABCC3*, têm sido associadas na modulação do risco de toxicidade em pacientes pediátricos com LLA tratados com MTX (ZGHEIB *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014; RAZALI *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2018). O Polimorfismo rs28364006 no gene *ABCC1* tem sido

associado com toxicidade ao MTX em pacientes com LLA (ZGHEIB *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014). Quanto ao gene *ABCC2*, acredita-se que este funcione como um componente da defesa do organismo contra a toxicidade, pois ele restringe a entrada de genotoxinas a partir do trato intestinal e atua facilitando a remoção de metabólitos tóxicos do organismo via bile e urina. O gene *ABCC2* é importante para a excreção de MTX e seu metabolito tóxico. O polimorfismo -24C>T (rs717620) contribui supostamente para a variabilidade da cinética MTX. No trabalho desenvolvido por Liu *et al.* (2014), o alelo T no gene *ABCC2* foi significativamente associado a riscos mais elevados de toxicidade hematológica de alto grau ao MTX (leucopenia, anemia e trombocitopenia) e não-hematológica (dano gastrointestinal e MO). Em outro trabalho desenvolvido por Razali *et al.*, (2019), os pacientes com os genótipos TC e TT do polimorfismo rs717620 foram significativamente associados à leucopenia de alto grau. O polimorfismo rs9895420 (T>A) do gene *ABCC3* está associado com a proteção gastrointestinal, podendo atuar até cinco vezes mais nessa proteção, o que o torna muito relevante no tratamento da LLA infantil. Esse polimorfismo também está relacionado

com o efluxo e resistência a diversas drogas, incluindo o MTX. Apesar de sua função ainda não estar determinada, sabe-se que essa proteína está envolvida no processo de transporte da excreção biliar e intestinal de ânions orgânicos (CARVALHO *et al.*, 2018). O gene *SLCO1B1* codifica um transportador aniônico (OATP1B1) localizado na membrana dos hepatócitos, que medeia o transporte de muitos medicamentos, incluindo o MTX, do sangue para o fígado (TREVIÑO *et al.*, 2009; MIKKELSEN *et al.*, 2011; NIEMI *et al.*, 2011). Assim, polimorfismos no gene *SLCO1B1* podem ser funcionalmente prejudiciais, associados à capacidade alterada de transporte do MTX (RAMSEY *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2017). O trabalho desenvolvido por Treviño *et al.* (2009), utilizando abordagem de genoma amplo (GWAs), relacionou vários polimorfismos no gene *SLCO1B*, incluindo o polimorfismo rs4149056, com toxicidades graves ao MTX. O estudo proposto é transversal, retrospectivo. A amostra consistiu de 197 DNAs de pacientes pediátricos (de 1 a 15 anos de idade) com LLA, de 2006 a 2016, em dois hospitais públicos referência no tratamento de câncer infantil (Hospital Ophir Loyola, e Hospital Oncológico Infantil Octavio Lobo, Belém -- PA, Brasil). O sangue desses

pacientes foi previamente obtido, para realizar outros projetos de pesquisa sobre o mesmo assunto. A coleta das amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará (número 119.649). O tratamento inicial dos pacientes foi realizado de acordo com protocolo BFM-2002 (Grupo Europeu *Berlim-Frankfurt Münster*), assim, foram estratificados em grupos de risco padrão, médio e alto. Na fase de consolidação e manutenção, foram utilizadas MTX e 6-mercaptopurina (6-MP). Na fase de consolidação para os pacientes de risco padrão e de médio, foi aplicado o protocolo M. Esse protocolo consiste em doses de 2.000 mg/m<sup>2</sup> de MTX. O protocolo de HR (5.000 mg/m<sup>2</sup> de MTX) foi aplicado para os pacientes classificados como de alto risco. Durante a fase de manutenção, os pacientes de risco padrão e médio receberam 20 mg/m<sup>2</sup> de MTX, enquanto os pacientes de alto risco foram tratados com o protocolo de *St. Jude* (PIU *et al.*, 2004), que consiste em 40 mg/m<sup>2</sup> de MTX. Os dados de toxicidade foram coletados dos prontuários dos pacientes e classificadas de acordo com *NCI Common Toxicity Criteria* versão 4.0. Foram incluídas exclusivamente as toxicidades grave de MO (grau 3 – 4) relatada para cada paciente durante o período de



consolidação e manutenção do tratamento da LLA. O material genético foi extraído de amostras de sangue periférico dos pacientes, utilizando o Kit comercial *Biopur Kit* de Extração *Mini Spin Plus – 250* (Biopur, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante e quantificadas utilizando o espectrofotometro NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific NanoDrop 1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE*). A análise molecular dos polimorfismos foi realizada com o sistema *TaqMan®* (*Applied Biosystems®*, Foster City, Califórnia, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o equipamento *7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). A análise da ancestralidade genética foi realizada por meio de um painel de 61 *Ancestry Informative Markers* (AIM), conforme descrito por Santos *et al.* (2010) e Ramos *et al.* (2016). As proporções individuais de ancestrais europeus, africanos e ameríndios foram estimadas usando o *software* STRUCTURE v2.3.3, assumindo três populações parentais (europeias, africanas e ameríndias). O *software* JASP v. 0.9.2.0 foi usado para realizar todas as análises estatísticas (teste t de *Student*, teste de *Mann-Whitney*, teste do qui-quadrado e regressão logística). O efeito dos polimorfismos sobre o risco de

desenvolver MO foi avaliado por regressão logística, controlada para os grupos de risco de estratificação dos pacientes com LLA. Foram considerados significativos *p-value* (P) inferiores ou igual a 0,05. Inicialmente foram coletadas amostras de 197 pacientes com LLA, no entanto 59 pacientes foram excluídos do trabalho por não apresentarem dados clínicos completos, restando 138 pacientes. Destes, nove amostras foram removidas nas análises para a variante rs28364006 do gene *ABCC1*, cinco amostras foram removidas para a variante do gene *ABCC2* e uma amostra foi removida para o polimorfismo do gene *ABCC3*, pois não obtiveram genotipagens bem-sucedidas. A média de idade dos pacientes foi de  $5,49 \pm 3,48$ . O sexo masculino foi mais frequente (64,5%), assim como leucemia do tipo B (87,7%). A maioria dos pacientes apresentou estratificação de alto risco (54,3%). Em geral, 37 pacientes (26,8%) apresentaram episódios de MO grau 3 – 4, na fase de consolidação e manutenção da terapia para LLA infantil. Os dados citogenéticos para as fusões BCR-ABL, ETV6-RUNX1, MLL-AF4, SIL-TAL e TCF3-PBX1 estavam disponíveis para 99 dos pacientes investigados (71,8%). Dos pacientes, 46,5% não tiveram nenhuma das translocações estudadas. A fusão mais

frequente foi TCF3-PBX1 (23,2%), seguida de BCR-ABL (16,2%) e ETV6-RUNX1 (12,1%). Observou-se que a composição étnica dos pacientes com LLA com foi de 45% Europeu, 34% Ameríndio e 21% Africano. As análises de comparação dos dados clínicos (tipo de leucemia, leucometria, translocações cromossômicas e risco de estratificação) e demográficos (gênero, idade e ancestralidade genética) entre os pacientes que apresentaram MO com os que não apresentaram não demonstraram nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ). O genótipo AA da variante rs28364006 do gene *ABCC1* foi relacionado a um efeito de proteção para desenvolver MO grave no tratamento da LLA infantil (OR=0,315; IC95%=0,167-0,544;  $P < 0,001$ ). O genótipo CC da variante rs717620 do gene *ABCC2* foi relacionado a um efeito de proteção para desenvolver MO (OR=0,278; IC95%=0,147-0,526;  $P < 0,001$ ). O genótipo TT da variante rs9895420 do gene *ABCC3* também foi associado a um efeito protetor ao desenvolvimento de MO grave (OR=0,157; IC95%=0,157-0,543;  $P < 0,001$ ). Da mesma forma, o genótipo TT da variante rs4149056 do gene *SLCO1B1* foi associado a um efeito protetor ao desenvolvimento de MO no tratamento da LLA infantil

(OR=0,293; IC95%=0,155-0,555; P<0,001). Encontramos uma associação significativa entre o genótipo AA da variante rs28364006 do gene *ABCC1*, o genótipo CC da variante rs717620 do gene *ABCC2*, o genótipo TT da variante rs9895420 do gene *ABCC3* e o genótipo TT da variante rs4149056 do gene *SLCO1B1*, todos relacionados a um efeito de proteção ao desenvolvimento de MO grave no tratamento da LLA pediátrica. Este trabalho contribui para um melhor entendimento desses genes e variantes no que diz respeito ao tratamento da LLA infantil na população miscigenada amazônica brasileira.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Guideline on dental management of pediatric patients receiving chemotherapy, hematopoietic cell transplantation, and/or radiation. *Pediatr Dent*. 26(7 Suppl): 144–9. 2004.
- BHOJWANI, D. *et al*. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 62(1):47-60. 2015.
- CARVALHO, D.C. *et al*. Pharmacogenomics and variations in the risk of toxicity during the consolidation/maintenance phases of the treatment of

pediatric B-cell leukemia patients from an admixed population in the Brazilian Amazon. *Leuk Res.*74:10-13. 2018.

CHAVES, C. *et al.* Human ABC transporters at blood-CNS interfaces as determinants of CNS drug penetration. *Curr Pharm Des.* 20(10):1450–62. 2014.

EPSTEIN, J.B. *et al.* Oral complications of cancer and cancer therapy: from cancer treatment to survivorship. *CA Cancer J Clin.* 62: 400–22. 58. 2012.

GERVASINI, G e VAGACE, J.M. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Genet* 3:1–11. 2012.

LIU, S.G. *et al.* Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 6;8(23):37761-37772. 2017.

LIU, Y. *et al.* Association of ABCC2 -24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 9:1–7. 2014.

LOPEZ-LOPEZ, E. *et al.* Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*

15(10):1383-98. 2014.

MATHUR, V.P. *et al.* Oral health in children with leukemia. *Indian J Palliat Care.* 18: 12–8. 2012.

MIKKELSEN, T.S. *Pharmacogenet Genomics.* 21(10):679-86.2011.

NEMES, J. *et al.* Oral mucositis as the most common complication of childhood cancer therapy. Review of the literature]. *Orv Hetil.* 159(13):495-502. 2018.  
ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 23:655–674. 2009.

PUI, C.H. *et al.* Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood.* 104(9):2690-6. 2004.

RAMOS, B.R. *et al.* Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica.* 144(3):259-65. 2016.

RAMSEY, L.B. *et al.* Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Res.* 22:1–8. 2012.

RAZALI, R.H. *et al.* Association of ABCC2 with levels and toxicity of methotrexate in Malaysian Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Pediatr Hematol Oncol.* 23:1-13. 2019.

SANTOS, N.P. *et al.* Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48 – Insertion-Deletion. *Hum Mutat.* 31(2):184-90. 2010.

STRAND, V. *et al.* Treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with placebo and methotrexate. Leflunomide Rheumatoid Arthritis Investigators Group. *Arch Intern Med.* 159:2542–2550. 1999.

STRAZIELLE, N. *et al.* Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain. *Front Neurosci.* 9:21. 2015.

SWERDLOW, S.H. *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press. p. 157–78. 2008.

SWERTS, K. *et al.* Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 42:295–309. 2006.

TREVIÑO, L.R. *et al.* Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with

methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol* 27:5972–5978. 2009.

VAGACE, J.M. *et al.* Central nervous system chemotoxicity during treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 84:274–286. 2012.

WONG, HM. Oral complications and management strategies for patients undergoing cancer therapy. *ScientificWorldJournal* 2014: 581795. 2014.

XU, H. *et al.* Insights of Acute Lymphoblastic Leukemia with Development of Genomic Investigation. *Methods Mol Biol.*1754:387-413. 2018.

ZGHEIB, N.K. *et al.* Genetic polymorphisms in candidate genes predict increased toxicity with methotrexate therapy in Lebanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics.* 24:387–396. 2014.