






Comunicaciones breves

## Estado redox en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados tratados con poliquimioterapia

### Redox Status in Patients with non-small Cell Lung Cancer in Advanced Stages Treated with Polychemotherapy

Gretel Riverón Forment<sup>1</sup>  Sergio Fernández García<sup>2</sup>  Anamarys Pandolfi Blanco<sup>1</sup>  Jiovanna Contreras Roura<sup>3</sup>  Yanet López Izada<sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Hospital Hermanos Ameijeiras, La Habana, La Habana, Cuba

<sup>3</sup> Empresa Laboratorios Farmacéuticos AICA, La Habana, La Habana, Cuba

<sup>4</sup> Hospital Militar Carlos Juan Finlay, La Habana, La Habana, Cuba

#### Cómo citar este artículo:

#### Resumen

**Fundamento:** en estadios avanzados del cáncer de pulmón de células no pequeñas el tratamiento se basa fundamentalmente en la poliquimioterapia. Estudios previos relacionan el desarrollo de resistencia al cisplatino con el aumento de los niveles del glutatión celular, mientras que, la depleción de este tripeptido se ha asociado con una mayor sensibilidad a este fármaco.

**Objetivo:** evaluar el efecto de la poliquimioterapia con cisplatino y vinblastina en los niveles intracelulares de glutatión y en el estado redox celular en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados.

**Métodos:** se realizó un estudio de casos y controles en el que se incluyeron 38 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios IIIb-IV, que concluyeron el esquema de tratamiento con cisplatino y vinblastina y 25 individuos aparentemente sanos como grupo control en el período correspondiente al período de mayo del 2016 a mayo del 2018 en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico de la Habana. Las concentraciones intraeritrocitarias del glutatión reducido y oxidado fueron determinadas mediante un método de HPLC-UV. El estado redox celular se calculó mediante la ecuación de Nerst. Los resultados se expresaron como medias y desviación estándar. Se utilizó la prueba no paramétrica U-Mann Whitney para la comparación de las medias aritméticas de las variables de respuesta.

**Resultados:** después del tratamiento se apreció una disminución de las concentraciones de glutatión reducido (920  $\mu$ M vs. 1252  $\mu$ M;  $p=0,036$ ) así como, cambios en el estado redox celular (-338,4 mV vs. -353,2 mV;  $p=0,029$ ) en contraste con los controles.

**Conclusiones:** la quimioterapia combinada con cisplatino induce una disminución de los niveles glutatión reducido y cambios en el estado redox celular. Estos efectos pueden contribuir a una mayor supervivencia en los pacientes que responden al tratamiento.

**Palabras clave:** oxidación-reducción, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, quimioterapia combinada

#### Abstract

**Background:** in advanced stages of non-small cell lung cancer, treatment is fundamentally based on polychemotherapy. Previous studies relate the development of resistance to cisplatin with increased levels of cellular glutathione, while depletion of this tripeptide has been associated with greater sensitivity to this drug.

**Objective:** to evaluate the effect of polychemotherapy with cisplatin and vinblastine on intracellular glutathione levels and cellular redox status in patients with non-small cell lung cancer in advanced stages.

**Methods:** a case-control study was carried out that included 38 patients with non-small cell lung cancer in stages IIIb-IV, who completed the treatment scheme with cisplatin and vinblastine, and 25 apparently healthy individuals as a control group from May 2016 to May 2018 at the Benéfico Jurídico Pneumological Hospital in Havana. The intraerythrocyte concentrations of reduced and oxidized glutathione were determined by an HPLC-UV method. The cellular redox state was calculated using the Nerst equation. The results were expressed as means and standard deviation. The non-parametric U-Mann Whitney test was used to compare the arithmetic means of the response variables.

**Results:** after treatment, a decrease in reduced glutathione concentrations (920  $\mu$ M vs. 1252  $\mu$ M;  $p=0.036$ ) was observed, as well as changes in the cellular redox state (-338.4 mV vs. -353.2 mV;  $p=0.029$ ) in contrast to controls.

**Conclusions:** chemotherapy combined with cisplatin induces a decrease in reduced glutathione levels and changes in the cellular redox state. These effects may contribute to increased survival in patients who respond to treatment.

**Key words:** oxidation-reduction, carcinoma non-small-cell lung, drug therapy combination

Recibido: 2022-06-10 18:10:43

Aprobado: 2022-06-22 13:40:28

Correspondencia: Gretel Riverón Forment. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. [gretel.riveron@infomed.sld.cu](mailto:gretel.riveron@infomed.sld.cu)

## INTRODUCCIÓN

El glutatión reducido (GSH) desempeña funciones vitales para las células. Se reconoce su papel en la protección del daño oxidativo y en la destoxificación de xenobióticos y quimiofármacos. Así como, en la regulación de procesos claves como la proliferación y la muerte celular. Por lo que las alteraciones en la homeostasis del GSH han estado implicadas en varias enfermedades, entre las que se puede mencionar el cáncer.<sup>(1)</sup>

De manera particular, en los tumores como el cáncer de pulmón (CP), la homeostasis del GSH se encuentra frecuentemente disregulada y los cambios en los niveles de este tripéptido, se han vinculado a los mecanismos de quimioresistencia, sin embargo, los eventos que vinculan al sistema del GSH con los procesos de resistencia a los quimiofármacos son extremadamente complejos y no están del todo esclarecidos. En este sentido, estudios *in vitro* sugieren que el incremento de las concentraciones de GSH durante la aplicación de los tratamientos puede promover mecanismos de resistencia a través de la inhibición de los procesos de apoptosis y promoviendo la expresión de enzimas destoxificadoras como la glutatión S-transferasa, la glutatión sintetasa y de proteínas transportadoras, como la proteína asociada a la resistencia multidrogas (MRP1). Esta última proteína participa como transportador de varios citostáticos como el cisplatino, la vincristina, el etopóxido y la doxorubicina y requiere para su actividad al GSH como sustrato.<sup>(2)</sup>

En estadios avanzados del CP los esquemas de poliquimioterapia (PQT) continúan siendo los de mayor elección, de acuerdo con su efecto en la supervivencia de los pacientes. En este sentido las terapias citotóxicas más empleadas incluyen en el esquema a agentes alquilantes como el cisplatino, el que se combina con otros quimiofármacos como la vinblastina y el etopósido en función de lograr una mejor respuesta terapéutica y para tratar de minimizar los eventos de quimiorresistencia descritos para el cisplatino.<sup>(3,4)</sup>

Pocos estudios han abordado los cambios en la homeostasis del glutatión reducido en pacientes con cáncer de pulmón después de finalizado el régimen de poliquimioterapia. En este contexto el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la poliquimioterapia con cisplatino y vinblastina en los niveles intracelulares de glutatión reducido, glutatión oxidado (GSSG) y en

el estado redox celular en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en estadios avanzados.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, analítico, de casos y controles. La muestra de estudio estuvo conformada por 38 pacientes confirmados con CPCNP en estadios avanzados (IIIB/IV) con una edad promedio de 63 años y de ambos sexos. Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron diagnosticados en el período correspondiente a mayo del 2016 a mayo del 2018 en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico (HNB) y fueron tratados solamente con un régimen de PQT basado en la combinación de cisplatino con vinblastina, según los protocolos establecidos por el servicio del HNB. En el grupo control fueron incluidos 25 sujetos aparentemente sanos con una edad promedio de 52 años y de ambos sexos. Estas personas fueron previamente entrevistadas y se les realizó un examen físico y estudios de laboratorio clínico (pruebas de función hepática, glicemia, creatinina, lipidograma y parámetros hematológicos), para confirmar su estado de salud. Además, se constató la no utilización de suplementos antioxidantes y hábitos tóxicos como el consumo de alcohol y el tabaquismo. Se descartaron procesos infecciosos agudos o enfermedades crónicas en agudización.

Para las determinaciones de los marcadores del estado redox del GSH, a todos los participantes se les extrajeron 2 ml. de sangre venosa en ayunas, la que se colectó en tubo con EDTA-K<sub>2</sub> como anticoagulante. En el caso de los pacientes la muestra se tomó al culminar el tratamiento oncológico.

Para la realización del estudio se obtuvo el lisado de eritrocitos. Posteriormente, se realizó el pre-tratamiento del lisado celular, el que consistió en la desproteínización con ácido perclórico al 10 % (5:1, v/v). La separación cromatográfica del GSH y del GSSG, así como el cálculo del potencial redox del par GSH:GSSG, indicador del estado redox celular, se realizó según reportes previos del grupo de trabajo.<sup>(5)</sup> Todos los procedimientos se llevaron a cabo dentro de las dos horas posteriores a la extracción.

Los resultados se expresaron como medias +/- desviación estándar. Se utilizó la prueba no paramétrica *U-Mann Whitney* para la comparación de las medias aritméticas de las

variables de respuesta (pacientes tratados vs. controles). La significancia estadística se estableció a partir de  $p < 0,05$ . Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATISTICA versión 8.0 para Windows.

En el desarrollo de la presente investigación se tuvieron en cuenta los criterios establecidos en la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en el 2013. Todos los participantes se incluyeron en el estudio luego de que emitieran

voluntariamente su consentimiento. El proyecto de investigación fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica.

## RESULTADOS

A continuación se relacionan los marcadores estudiados en el grupo de pacientes tratados con PQT y los controles. (Tabla 1).

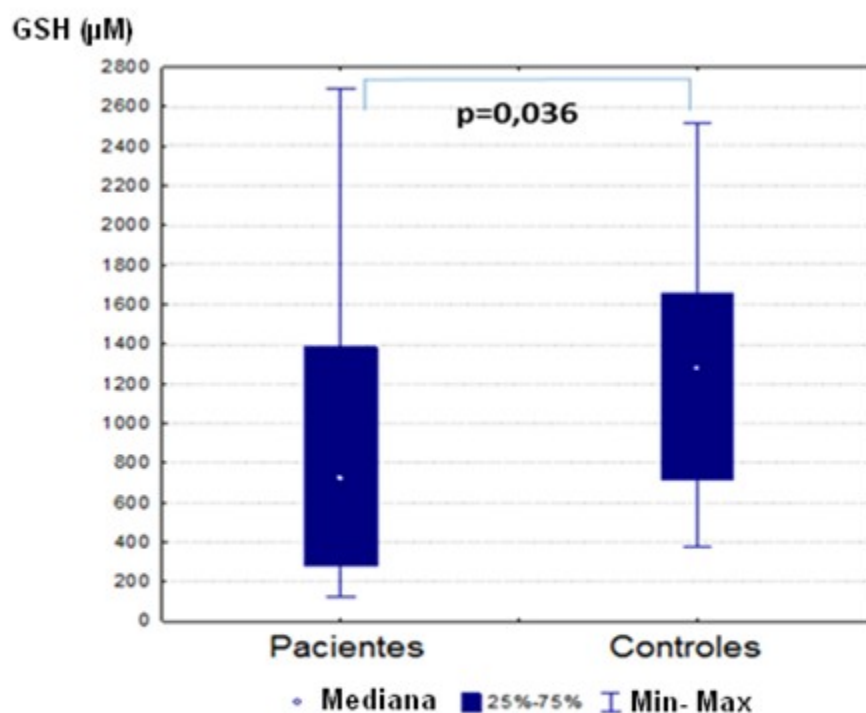
**Tabla 1.** Resultados de los marcadores estudiados en pacientes tratados con PQT (n=38) y controles (n=25)

Marcadores*	Pacientes	Controles	p†
GSH ( $\mu\text{M}$ )	920,3 $\pm$ 714,8	1252,0 $\pm$ 594,7	0,036
GSSG ( $\mu\text{M}$ )	246,4 $\pm$ 191,3	199,9 $\pm$ 23,5	0,498
Relación GSH/GSSG	5,7 $\pm$ 5,8	8,2 $\pm$ 1,0	0,035
Estado redox (mV)	-338,4 $\pm$ 24,7	-353,2 $\pm$ 3,6	0,029

\*Los resultados de los marcadores son expresados en Media  $\pm$  SD (Desviación estándar), †p: nivel de significación

Una vez concluido el tratamiento oncológico, los pacientes mostraron una disminución significativa en las concentraciones de GSH

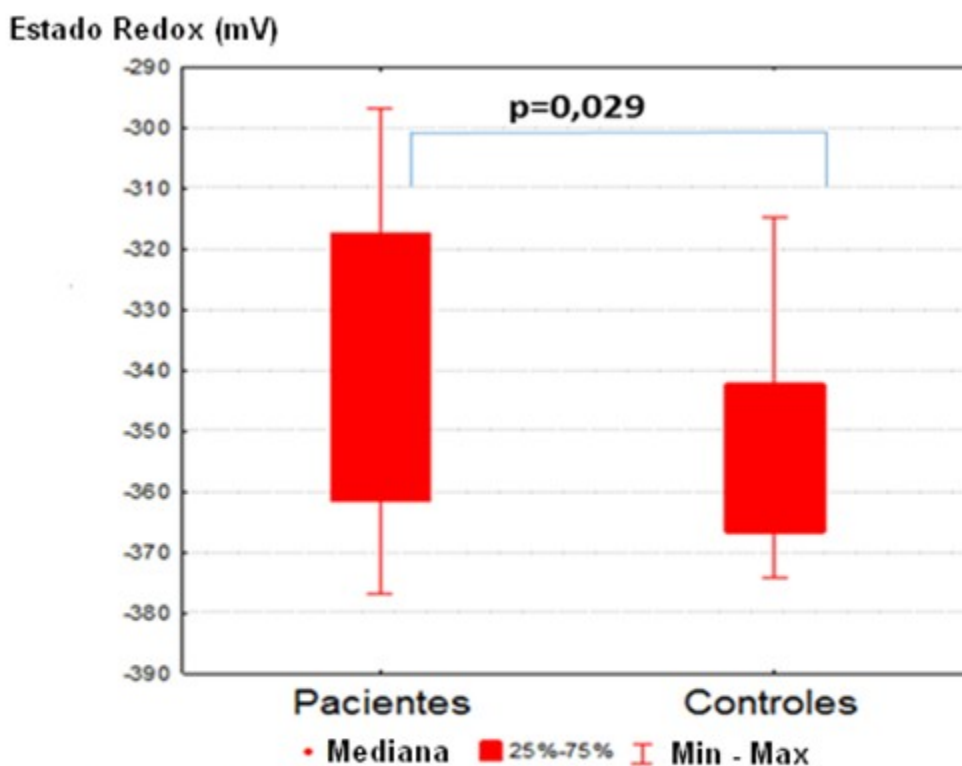
( $p=0,036$ ), sin embargo, las concentraciones de GSSG no difieren entre los grupos ( $p=0,498$ ). (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Concentraciones intraeritrocitarias de GSH en los pacientes una vez concluido el tratamiento y controles. Prueba *U-Mann Withney*,  $p=0,036$

El estado redox celular, determinado por el potencial redox del par GSH:GSSG muestra variaciones entre el grupo de pacientes tratados y los controles. Los sujetos sanos mostraban en valores absolutos un potencial redox mayor, -353

mV como promedio, lo que indica un potencial redox más reductor. En contraste con los pacientes tratados, los que mostraban un potencial más positivo, -338 mV como promedio, lo que sugiere un ambiente redox más oxidante. (Gráfico 2).



**Gráfico 2.** Potencial redox del par GSH: GSSG en pacientes con CP en estadios avanzados tratados con PQT y sujetos aparentemente sanos (grupo control). Prueba *U-Mann Withney*,  $p=0,029$

## DISCUSIÓN

Los tratamientos oncológicos no quirúrgicos, como la PQT están indicados en aquellos pacientes en los que la cirugía no es posible por el grado de extensión clínica de la enfermedad. Su intención es paliativa, para intentar mejorar la calidad de vida y en otros casos para aumentar la supervivencia. La mayoría de los quimiofármacos en su mecanismo de acción promueven citotoxicidad y liberación de ciertas especies reactivas del oxígeno (ERO).<sup>(6)</sup> En el caso particular del cisplatino da lugar a varias respuestas citotóxicas entre las que se incluyen: aumento de los procesos de peroxidación lipídica, la disfunción mitocondrial, inhibición de la síntesis proteica y daños al material genético.<sup>(7)</sup>

Los datos obtenidos en la presente investigación indican que una vez finalizado el tratamiento oncológico los pacientes muestran una disminución significativa en las concentraciones de GSH. En este contexto la depleción que se observa podría estar relacionada fundamentalmente a las funciones destoxicadoras de este compuesto, teniendo en

cuenta que el grupo sulfidrilo del GSH tiene una alta afinidad al platino<sup>(7,8)</sup> y por otra parte, no hay diferencias en los niveles de GSSG entre los grupos estudiados.

En concordancia con estos hallazgos, Srivastva y cols. reportaron que los niveles de GSH disminuyen con el incremento de los ciclos de quimioterapia en los pacientes con CPCNP.<sup>(9)</sup> En un estudio similar, realizado en pacientes con CP tratados con radioterapia y posteriormente con carboplatino, los autores refieren que al final de la terapia empleada, los pacientes mostraban una disminución del nivel de GSH intraeritrocitario, lo que se encontraba condicionado a la formación del complejo GSH-platino y que este proceso guardaba relación al tiempo del tratamiento.<sup>(10)</sup>

Por otra parte, basado en resultados de estudios experimentales, los que revelan que cuando se reducen los niveles de GSH, se observa un aumento significativo en la sensibilidad al cisplatino,<sup>(11)</sup> se podría esperar una respuesta favorable en los pacientes tratados, aspecto que deberá ser abordado en futuras investigaciones y

constituye una de las limitaciones del presente trabajo.

Los agentes que alteran las concentraciones de GSH pueden afectar la expresión de enzimas detoxificadoras, la proliferación celular y la apoptosis, debido a que los mecanismos de señalización redox participan en la regulación de estos eventos celulares.<sup>(7,8)</sup> Los resultados indican que la deficiencia del GSH afecta la relación GSH:GSSG y por consiguiente se producen cambios en el estado redox celular. Este marcador no solo va a reflejar la presencia de condiciones de estrés oxidativo sino también las posibles afectaciones en la señalización y control redox.<sup>(11)</sup> En el marco de esta investigación la relación GSH:GSSG en los pacientes tiende hacia un estado más oxidativo, contexto en el que se pueden activar cascadas de señalización que reducen la proliferación celular e incrementan los procesos de apoptosis, lo que constituiría el efecto terapéutico esperado. En este sentido, se ha descrito que la alteración del estado redox mediado por la modulación de las ERO puede impactar en la sensibilidad al cisplatino.<sup>(12,13)</sup> Estos resultados podrían ser el punto de partida para una evaluación personalizada de la respuesta de los pacientes a la PQT, aspecto que debería ser considerado en estudios próximos.

Finalmente, el régimen de poliquimioterapia con cisplatino y vinblastina induce una disminución de los niveles intraeritrocitarios de GSH y cambios en el estado redox celular. Estos efectos podrían contribuir a una mayor supervivencia en los pacientes que responden al tratamiento.

### Conflicto de intereses:

Los autores declaran la no existencia de conflictos de intereses relacionados con el estudio.

### Los roles de autoría:

1. Conceptualización: Gretel Riverón Forment.
2. Curación de datos: Gretel Riverón Forment.
3. Análisis formal: Gretel Riverón Forment.
4. Adquisición de fondos: Esta investigación no contó con la adquisición de fondos.
5. Investigación: Gretel Riverón Forment, Sergio

Fernández García, Anamarys Pandolfi Blanco, Giovanna Contreras Roura, Yanet López Izada.

6. Metodología: Gretel Riverón Forment, Sergio Fernández García, Anamarys Pandolfi Blanco, Giovanna Contreras Roura, Yanet López Izada.

7. Administración del proyecto: Gretel Riverón Forment.

8. Recursos: Sergio Fernández García, Anamarys Pandolfi Blanco, Yanet López Izada.

9. Software: Yanet López Izada.

10. Supervisión: Gretel Riverón Forment.

11. Validación: Gretel Riverón Forment, Sergio Fernández García.

12. Visualización: Anamarys Pandolfi Blanco, Yanet López Izada.

13. Redacción del borrador original: Gretel Riverón Forment, Sergio Fernández García, Anamarys Pandolfi Blanco.

14. Redacción revisión y edición: Giovanna Contreras Roura, Yanet López Izada.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic M. Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies. *Biomolecules*. 2020;10(10):1429
2. Molina M, Rocha CR, Kinker GS, Pelegrini AL, Menck CF. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulares cisplatin resistance in lung cancer cell. *Sci Rep*. 2019;9(1):17639
3. Pandolfi A, Fernández S, Riverón G, Gutiérrez R, Pupo J, de Armas A, et al. Daño al ADN y capacidad de reparación en pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas tratados con poliquimioterapia. *Rev Haban Cienc Med [revista en Internet]*. 2018 [citado 23 Oct 2021];17(2):[aprox. 10p]. Disponible en: <https://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2208>
4. Min HY, Lee HY. Mechanisms of resistance to chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Arch Pharm Res*. 2021;44(2):146-64

5. Riverón G, Contreras J, Pérez J, Marín LC, Concepción A, Zúñiga Y. Concentraciones intraeritrocitarias de glutatión reducido y oxidado en una muestra de sujetos sanos de La Habana. *Acta Bioclin [revista en Internet]*. 2021 [citado May 6];11(22):[aprox. 12p]. Disponible en: [https://redib.org/Record/oai\\_articulo3320327-concentraciones-intraeritrocitarias-de-glutatión-reducido-y-oxidado-en-una-muestra-de-sujetos-sanos-de-la-habana](https://redib.org/Record/oai_articulo3320327-concentraciones-intraeritrocitarias-de-glutatión-reducido-y-oxidado-en-una-muestra-de-sujetos-sanos-de-la-habana)
6. Fernández S, Riverón G, López Y, González D, Fariñas L, Lemus G, et al. Caracterización clínica y marcadores de estrés oxidativo en pacientes con cáncer de pulmón tratados con poliquimioterapia. *Rev Cub Med [revista en Internet]*. 2021 [citado 10 Ene 2022];60(3):[aprox. 8 p]. Disponible en: <https://revmedicina.sld.cu/index.php/med/article/view/2043>
7. Aldossary SA. Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomed Pharmacol J*. . 2019;12(1):41-52
8. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and test amen to resistance. *J Cell Biol*. 2018;217(7):2291-98
9. Srivastava AN, Gupta A, Srivastava S, Natu SM, Mittal B, Negi MPS, et al. Cisplatin combination chemotherapy induces oxidative stress in advanced non-small cell lung cancer patient. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(2):465-71
10. Groen HJ, Meijer C, De Vries EG, Mulder NH. Red blood cell glutathione levels in lung cancer patients treated by radiation and continuously infused carboplatin. *Anticancer Res*. 1996;16(2):1033-7
11. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*. 2002;348(1):93-112
12. Lang D, Wang L, He R, Ma J, Bin Y, Chi X, et al. Exogenous glutathione contributes to cisplatin resistance in lung cancer A549 cell. *Am J Transl Res*. 2018;10(5):1295-1309
13. Shah K, Khan MF, Badshah A, Jan SV, Farid A, Bibi H, et al. Effect of cisplatin on glutathione redox status in isolated plasma and cytosolic fraction. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2013;7(2):37-45