



Possível relação dos polimorfismos no gene *ABCB1* com as toxicidades induzidas por carboplatina em pacientes com câncer de pulmão

Larissa B. Bastos*, Cecília S. Seguin, Pedro Eduardo N. S. Vasconcelos, Aristoteles S. Barbeiro, Lair Zambon, Mauricio W. Perroud Jr., Patricia Moriel, Eder C. Pincinato.

Palavras-chave: Carboplatina, Polimorfismo, *ABCB1*, Câncer de Pulmão

Resumo

O câncer de pulmão é classificado em dois grupos principais de acordo com o tipo histológico. O carcinoma de não pequenas células engloba todos os tipos histológicos (carcinoma epidermoide, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células), exceto o carcinoma de pequenas células que constitui o segundo grupo. Aproximadamente 70% dos casos de câncer de pulmão são os carcinomas de não pequenas células (HENSING, et al., 2014).

O fumo é considerado o mais importante fator de risco modificável para o desenvolvimento do câncer de pulmão, responsável por 75% a 80% dos casos em homens e 50% dos casos nas mulheres (JEMAL, et al., 2011).

O esquema terapêutico quimioterápico padrão envolve a associação de derivado da platina (cisplatina ou carboplatina) e o etoposido. A carboplatina, é um derivado da platina e se liga covalentemente ao DNA, formando complexos platina-DNA, que induzem a célula à apoptose, porém, ao contrário da cisplatina, a carboplatina é mais estável no plasma. A carboplatina é eliminada principalmente pela urina, na qual cerca de 30% da droga é secretada inalterada (THOMPSON MICROMEDEX; 2015).

Os transportadores ABC compreendem a maior família de proteínas transmembranas que utilizam a energia derivada do ATP para transportar substâncias. Entre os transportadores mais importantes desta família, podemos citar a glicoproteína P (pgP), também conhecida como *MDR1* ou *ABCB1*, o transportador canalicular multiespecífico de ânions orgânicos (c-MOAT, *MRP2* ou *ABCC2*) e a proteína de resistência ao câncer de mama (*BCRP* ou *ABCG2*).

O gene *ABCB1* codifica a Pgp, e está localizado no rim, fígado e intestino (Marzolini et al, 2004). Polimorfismos no gene *ABCB1* são conhecidos por alterarem sua atividade funcional, contribuindo assim para diferenças interindividuais no metabolismo da platina. Consequentemente, estes polimorfismos podem predispor alguns pacientes a maiores toxicidades geradas pela carboplatina, uma vez que uma alteração no gene *ABCB1* pode interferir diretamente na concentração da carboplatina no interior da célula.

Acredita-se que indivíduos com polimorfismos no gene da *ABCB1* teriam maior predisposição ao desenvolvimento de toxicidades induzidas pelos derivados da platina. Espera-se que, se confirmada, essa possível associação possa ajudar a melhorar o tratamento desses pacientes dentro do contexto da medicina personalizada.

Metodologia

Trata-se de um estudo analítico, experimental, clínico, prospectivo, quantitativo, cuja amostragem será não probabilística do tipo consecutiva.

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC/UNICAMP) e o contato com os pacientes foi realizado no Ambulatório de Pneumologia Clínica. Este estudo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (CAAE: 83196318.8.0000.5404).

Foram inseridos indivíduos consecutivamente com número inicial previsto para 50 pacientes, porém devido ao início da bolsa em janeiro de 2020 e pandemia foram inseridos apenas 38 pacientes.

Foram investigadas nefrotoxicidade, mielotoxicidade e toxicidades gastrointestinais induzidas por carboplatina. Os polimorfismos do gene da *ABCB1* seriam detectados por PCR real-time, mas devido a pandemia de COVID-19, não foi possível fazer a determinação, uma vez que foi determinado o fechamento da UNICAMP aos alunos.

Como esse projeto faz parte de um projeto maior, foi possível realizar antes do fechamento da UNICAMP a determinação dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1*, em 20 amostras, que foram amplificadas por PCR-multiplex. Esses genes codificam as enzimas GSTs M1 (*GSTM1*), T1 (*GSTT1*) e P1 (*GSTP1*), respectivamente. Estas enzimas são também de extrema importância na detoxificação de fase II, envolvidas na conjugação de substratos tóxicos à célula, catalisando a conjugação do peptídeo glutationa (GSH) a estes compostos, tornando-os hidrofílicos e mais facilmente excretados pela urina (MOYER *et al.*, 2010).

Resultados e Discussão

Foram incluídos na pesquisa um total de 38 pacientes, maioria do sexo feminino (58%), com diagnóstico prevalente de adenocarcinoma (61%). Quanto aos hábitos de tabagismo e etilismo, 76% afirmaram já ter fumado, sendo 61% classificados como tabagistas acentuados de acordo com o índice de tabagismo (IT), definido como o número de cigarros fumados por dia multiplicado pelo número de anos do hábito e 55% são etilistas (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos pacientes (n = 38)

Idade (média ± desvio padrão, anos)	64,13 ± 6,62
Sexo (n, %)	
Masculino	16 (42)
Feminino	22 (58)
KPS	
100	32 (84)
90	6 (16)
IMC (média ± desvio padrão)	24,38 ± 6,21
Tabagismo	
Não tabagista	11 (29)
Tabagista discreto	4 (11)
Tabagista moderado	3 (8)
Tabagista acentuado	20 (53)
Etilismo	
Abstêmio	17 (45)
Etilista discreto	10 (26)
Etilista moderado	4 (11)

Etilista acentuado	5 (13)
Etilista mais que acentuado	2 (5)
Tipo histológico	
Oat cell	1 (3)
Adenocarcinoma	23(61)
CEC	14 (37)
Tamanho do tumor – T (n, %)	
T1	1 (3)
T2	2 (5)
T2b	1 (3)
T3	4 (11)
T4	27 (71)
Metástase em linfonodos – N (n, %)	
N0	5 (13)
N1	2 (5)
N2	20 (53)
N3	5 (13)
NX	4 (11)
Metástase a distância – M (n, %)	
M0	9 (24)
M1	1 (3)
M1a	7 (18)
M1c	5 (13)
M2	1 (3)
MX	11 (29)

Legenda: KPS – escala de Karnofsky. IMC – índice de massa corpórea.

A tabela 2 demonstra a média e desvio padrão para todos os parâmetros analisados, com valores basais, dia 15 e dia 20 da quimioterapia. Além disso o cálculo para o valor de p foi feito por meio do Teste T, comparando os valores basais com D15 e valores basais com D20.

Tabela 2. Parâmetros avaliados antes e após primeiro ciclo de quimioterapia (média ± desvio padrão) (n = 38)

	Basal	D15	D20	Valor de P*
Hemoglobina	12,50 ± 1,40	12,15 ± 1,68	12,03 ± 1,90	< 0,05 ^{a, b}
Leucócito	8858,00 ± 5256,53	5723,16 ± 2882,21	6635,26 ± 3533,26	< 0,05 ^{a, b}
Neutrófilo	5893,89 ± 1803,90	3874,92 ± 1708,33	4677,58 ± 1920,09	< 0,05 ^{a, b}
Linfócito	3107,87 ± 3021,99	2913,32 ± 1474,21	2834,42 ± 1150,75	0,71 ^a ; 0,57 ^b
Plaqueta	414368,42 ± 456266,84	268236,84 ± 93580,85	271736,84 ± 101411,31	< 0,05 ^{a, b}
Albumina	3,70 ± 0,42	3,76 ± 0,59	3,71 ± 0,53	0,46 ^a ; 0,77 ^b
Bilirrubina total	0,38 ± 0,09	0,36 ± 0,10	0,34 ± 0,10	0,38 ^a ; < 0,05 ^b
GGT	63,84 ± 54,06	54,74 ± 44,05	52,24 ± 47,67	< 0,05 ^{a, b}
Proteínas totais	6,67 ± 0,80	6,34 ± 0,89	6,34 ± 0,76	< 0,05 ^{a, b}

FALC	112,16 ± 60,25	103,79 ± 59,43	105,39 ± 61,66	< 0,05 ^a ; 0,09 ^b
AST	17,61 ± 6,45	18,63 ± 7,53	18,66 ± 9,74	0,33 ^a ; 0,48 ^b
ALT	17,55 ± 10,81	20,63 ± 12,48	19,53 ± 15,51	0,09 ^a ; 0,36 ^b
Creatinina	0,78 ± 0,23	0,75 ± 0,18	0,77 ± 0,18	0,25 ^a ; 0,32 ^b
Clearance de creatinina	86,37 ± 32,58	89,57 ± 27,54	88,49 ± 26,87	0,76 ^a ; 0,81 ^b
Ca	9,14 ± 0,42	8,93 ± 0,41	8,94 ± 0,35	0,08 ^a ; 0,09 ^b
K	4,55 ± 0,49	4,18 ± 0,85	4,34 ± 0,44	< 0,05 ^{a, b}
Mg	1,68 ± 0,16	1,57 ± 0,19	1,57 ± 0,39	< 0,05 ^a ; 0,09 ^b
Na	137,03 ± 3,50	135,76 ± 4,00	136,32 ± 2,81	< 0,05 ^a ; 0,11 ^b
Pi	3,86 ± 0,64	3,68 ± 1,03	3,85 ± 1,04	0,20 ^a ; 0,78 ^b
Ureia	31,03 ± 16,05	31,71 ± 14,71	29,21 ± 13,75	0,61 ^a ; 0,27 ^b
Ácido úrico	4,48 ± 0,94	4,68 ± 1,20	4,52 ± 1,20	0,35 ^a ; 0,45 ^b

Legenda: GGT - Gamaglutamiltransferase, ALT - Alaninaaminotransferase, AST - Aspartatoaminotransferase, Ca - Cálcio, K - Potássio, Mg - Magnésio, Na - Sódio, Pi - Fósforo Inorgânico.

*valores de p

^a - valor encontrado com relação a basal e D15

^b - valor encontrado com relação a basal e D20

Com relação aos parâmetros hematológicos, apenas linfócitos não sofreu redução significativa após o primeiro ciclo de tratamento. Para os outros como hemoglobina, neutrófilos, leucócitos e plaquetas houve redução nas médias de concentração em relação ao basal e D15 e basal e D20.

Para os parâmetros de hepatotoxicidade foram observadas alterações significativas para bilirrubinas totais, GGT, proteínas totais e fosfatase alcalina após o primeiro ciclo de quimioterapia, porém sem relevância clínica, uma vez que eles não apresentaram muitos graus de toxicidade.

Já para a nefrotoxicidade, alguns parâmetros tiveram uma alteração estatisticamente significativa, como hipocalemia, hipomagnesia e hiponatremia. Os outros parâmetros não tiveram alteração estatisticamente significativa após o primeiro ciclo de quimioterapia.

Foi observado também que 29% dos pacientes apresentaram algum grau de náusea, 8% para vômito e 21% para diarreia, parâmetros analisados para as toxicidades gastrointestinais após o primeiro ciclo de quimioterapia.

Como o início da bolsa se deu em janeiro de 2020, infelizmente não foi possível realizar o PCR real time para amplificar os genes do *ABCB1*, uma vez que as sondas não chegaram a tempo e a Unicamp foi fechada aos estudantes. Os DNAs foram extraídos e congelados em freezer a -80°C. O PCR real time será realizado assim que o retorno dos alunos for possível e seguro.

Com relação aos genes *GSTM1* e *GSTT1*, a amplificação foi realizada para 20 pacientes, utilizando a técnica de PCR multiplex e utilizando como controle positivo da reação a amplificação do gene da beta-globina. Apenas um paciente não foi possível amplificar, assim, os 19 pacientes restantes tiveram as regiões do gene da beta-globina amplificadas, o genótipo para os genes *GSTM1* e *GSTT1* puderam ser obtidos em todos os pacientes.

Após a análise do gel de agarose, os 19 pacientes foram genotipados para os polimorfismos das *GSTM1* e *GSTT1* em presentes quando à presença do

gene (genótipo selvagem) e deletados quando ocorre ausência do gene (polimorfismo gênico). Os dados podem ser encontrados na tabela 3.

Tabela 3. Genótipo dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* (n = 19)

	Presente (n, %)	Deletado (n, %)
<i>GSTM1</i>	7 (37)	12 (63)
<i>GSTT1</i>	17 (90)	2 (10)

A maioria dos pacientes apresentou o genótipo deletado para o polimorfismo *GSTM1* (63%), já para o genótipo *GSTT1* a maioria dos pacientes apresentou o genótipo presente (90%), o que está de acordo com a literatura, uma vez que a frequências de 55% e 18,5% para os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* deletados já foram observadas em brasileiros, respectivamente (ARRUDA et al., 1998; PINCINATO et al, 2019).

Conclusão

Nosso estudo evidencia que os pacientes com câncer de pulmão atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP são do sexo feminino, com idade média de 64,13 anos, tabagistas acentuados e etilistas discretos, sendo o adenocarcinoma prevalente, extensão do tumor graduada em 4 (T4), metástase em linfonodos graduada em 2 (N2), com KPS de 100%.

Com relação as toxicidades, foi observado uma maior prevalência nas toxicidades hematológicas, principalmente do parâmetro hemoglobina, o que condiz com a literatura, uma vez que a principal toxicidade da carboplatina é a supressão da medula óssea. Porém, nenhuma correlação estatística foi encontrada entre os polimorfismos do gene *GSTM1* e *GSTT1* e as toxicidades induzidas pela carboplatina. Acreditamos que, com a inserção de um número maior de pacientes seja possível um entendimento melhor e só então poder confirmar ou refutar a relação entre as toxicidades e os polimorfismos.