



## 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)

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

Etilista acentuado	5 (13)
Etilista mais que acentuado	2 (5)
<b>Tipo histológico</b>	
Oat cell	1 (3)
Adenocarcinoma	23(61)
CEC	14 (37)
<b>Tamanho do tumor – T (n, %)</b>	
T1	1 (3)
T2	2 (5)
T2b	1 (3)
T3	4 (11)
T4	27 (71)
<b>Metástase em linfonodos – N (n, %)</b>	
N0	5 (13)
N1	2 (5)
N2	20 (53)
N3	5 (13)
NX	4 (11)
<b>Metástase a distância – M (n, %)</b>	
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)

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

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

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

\*valores de p

<sup>a</sup> – valor encontrado com relação a basal e D15

<sup>b</sup> – 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)

	<b>Presente (n, %)</b>	<b>Deletado (n, %)</b>
<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.