Bruno Ferencz Papp Cadima

**Determinação de polimorfismos dos genes
ABCC2 e ABCG2 como fator preditivo de
resposta ao tratamento com cisplatina em
pacientes com carcinoma epidermóide de
cabeça e pescoço**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Miriam Hatsue
Honda Federico

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cadima, Bruno Ferencz Papp

Determinação de polimorfismos dos genes ABCC2 e ABCG2 como fator preditivo de resposta ao tratamento com cisplatina em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Bruno Ferencz Papp Cadima. -- São Paulo, 2010.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Oncologia.

Orientadora: Miriam Hatsue Honda Federico.

Descritores: 1.Carcinoma de células escamosas 2.Neoplasias de cabeça e pescoço
3.Cisplatina 4.Farmacogenética 5.Transportadores de cassetes de ligação de ATP
6.Polimorfismo de fragmento de restrição 7.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/DBD-324/10

*Aos meus pais por todo o apoio que me
deram durante toda a minha vida e por sempre
acreditarem que a educação é essencial na
formação do ser humano.*

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À Dra. Miriam Hatsue Honda Federico pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e pela orientação.

À Dra. Mitzi Brentani e ao Dr. Roger Chammas os chefes do laboratório durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes que decidiram participar deste estudo.

Ao Dr. Gilberto de Castro que realizou a parte clínica do trabalho.

Às Dras. Simone Maistro, Flávia Mangone, Fátima Pasini e Dr. Igor Snitkovisky pelos ensinamentos e orientação na ausência da Dra. Miriam.

À Dra. Maria Lucia Hirata Katayama, Dra. Rosimeire Roela e Dra. Patrícia Bortmam, pelo companheirismo e força durante esses anos de trabalho.

À Karina Augusto Escobar, contribuiu de maneira direta na execução deste trabalho, me ajudando na técnica de sequenciamento, discutindo partes teóricas, me ajudando com a parte burocrática e ainda arranjando tempo para ser uma excelente namorada.

Minhas companheiras do grupo de câncer de cabeça e pescoço Lilian Pires Barbeta e Karen Brunialti por toda a ajuda que recebi e pela amizade que levarei para minha vida toda; e a Juliana Yamaguchi, que me ajudou bastante nas reações de PCR-RFLP.

Aos demais amigos do laboratório, Adriana Priscila Trapé, Paulo Del Valle, Laura Tojeiro Campos, Simone Crestoni Fernandes, Yuri Urata, Elen Bastos e Natalia que ainda estão conosco e também aos que deixaram o laboratório: Cristina Campofiorito, Mateus Barros, Maira Martinez, Carla

Agradecimentos

Pinheiro, Cíntia Milani, Suzana Terumi Honda, Arthur Alvarenga, Ticiania, Renata , Leonardo, entre outros.

A Maria José Benevides, Elizangela Dias, Rosilene Arruda, Jair Cláudio, Willame Macedo e Ivonete Lima, por sempre ajudarem a todos, em tudo, desde a limpeza do laboratório e preparação dos materiais até os trâmites burocráticos, sem essas pessoas o laboratório para.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 Introdução	01
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivo Específico	16
3 Casuística e Métodos	17
3.1 Casuística	18
3.2 Métodos	21
3.2.1 Extração de leucócitos	21
3.2.2 Extração de DNA genômico	21
3.2.3 Determinação do genótipo por PCR-RFLP	23
3.2.4 Determinação do genótipo por sequenciamento	26
3.2.5 Análises estatísticas	29
4 Resultados	31
4.1 Determinação do genótipo dos polimorfismos Gly126stop e Val12Met do gene ABCG2; Val417Ile e Ser789Phe do gene ABCC2 por PCR-RFLP	33
4.2 Determinação dos genótipos Ala1450Thr do gene ABCC2 e Gly141Lys do gene ABCG2 por sequenciamento	38
4.3 Frequência dos polimorfismos	39
4.4 Resposta ao tratamento com cisplatina	40
4.5 Curvas de sobrevida	42
5 Discussão	45
6 Referências Bibliográficas	51
7 Anexos	60

Lista de Figuras

Figura 01: Mecanismo de ação da cisplatina.....	06
Figura 02: Mecanismo de influxo e efluxo da cisplatina na célula.....	08
Figura 03: Diagrama esquemático da estrutura do ABCG2	09
Figura 04: Homodimerização do ABCG2.....	10
Figura 05: Diagrama esquemático da estrutura do ABCC2.....	12
Figura 06: Foto representativa da extração de DNA genômico.....	23
Figura 07: Foto representativa do produto da amplificação dos gene ABCG2.....	32
Figura 08: Análise do genótipo Gly126stop por Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do tamanho do fragmento de Restrição.....	34
Figura 09: Análise do genótipo Val12Met por Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do tamanho do fragmento de Restrição.....	35
Figura 10: Análise do genótipo Val417Ile por Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do tamanho do fragmento de Restrição	36
Figura 11: Análise do genótipo Ser789Phe por Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do tamanho do fragmento de Restrição	37
Figura 12: Resultado do seqüenciamento da fita reversa de um dos pacientes selvagens	38

Figura 13: Resultado do seqüenciamento da fita reversa de um dos pacientes homozigotos polimórficos (Lys/Lys).....	39
Figura 14: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço classificados de acordo com a presença do polimorfismo Val12Met.....	42
Figura 15: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço classificados de acordo com a presença do polimorfismo Gly141Lys.....	43
Figura 16: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço classificados de acordo com a presença do polimorfismo Val417Ile.....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características clínicas e patológicas de 90 pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade de cabeça e pescoço.....	20
Tabela 2: Oligonucleotídeos e enzimas de restrição.....	25
Tabela 3: Frequência alélica da população estudada.....	40
Tabela 4: Relação entre os polimorfismos e a resposta à cisplatina.....	41

Resumo

Os transportadores da família ABC são proteínas transmembrânicas envolvidas com o tráfego de substâncias endógenas e exógenas do meio intracelular para o extracelular, sendo alvos de estudo na resistência celular a agentes quimioterápicos. O ABCC2 é um transportador transmembrânico que exporta ativamente fármacos aniônicos conjugados e facilita o transporte de agentes anticâncer. O ABCG2 é outro transportador transmembrânico que tem influência na farmacocinética e farmacodinâmica de certos xenobióticos e substratos endógenos; além disso, acredita-se que este gene contribui para a resistência a várias drogas. Por esses motivos identificamos por sequenciamento ou PCR-RFLP os polimorfismos dos genes ABCC2 (Val417Ile, Ser789Phe e Ala1450Thr) e ABCG2 (Val12Met, Gly126stop códon, Gly141Lys) em 90 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC) e tentamos correlacionar a presença do polimorfismo com resposta a tratamento que incluiu cisplatina em todos os pacientes. Não encontramos nenhuma correlação entre a presença de polimorfismo para Val12Met, Gly141Lys e Val417Ile, determinados em 68 pacientes tratados exclusivamente com cisplatina e radioterapia, e a resposta ao tratamento. As curvas de sobrevida, determinadas por Kaplan-Meier, considerando polimórfico os pacientes que continham pelo menos um dos alelos alterados e selvagem os que não tivessem nenhum deles, mostraram que os pacientes selvagens para o polimorfismo Val12Met tiveram tendência a uma pior sobrevida (sobrevida mediana de 18,7 meses) em relação aos pacientes polimórficos (sobrevida mediana não atingida; $P=0,089$ – Teste de log-rank), já os pacientes selvagens para o polimorfismo Gly141Lys tiveram tendência a uma pior sobrevida (sobrevida mediana de 15,8 meses) em relação aos pacientes polimórficos (sobrevida mediana de 25,6 meses; $P = 0,16$ – Teste de log-rank). Não observamos correlação entre os outros polimorfismos e sobrevida. Quanto ao GLY126stop, somente um paciente foi identificado como polimórfico. Conclusões: No nosso estudo, a frequência do polimorfismo Val12Met de 10% está próxima dos 18% descrito na população normal (Kobayashi 2004). Nosso trabalho foi o primeiro a correlacionar estes polimorfismos com resposta ao tratamento em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e indica que Val12Met e Gly141Lys e o gene ABCG2 como um todo são candidatos a um estudo maior.

Descritores: 1. Carcinoma de células escamosas 2. Neoplasias de cabeça e pescoço 3. Cisplatina 4. Farmacogenética 5. Transportadores de cassetes de ligação de ATP 6. Polimorfismo de fragmento de restrição 7. Reação em cadeia da polimerase.

Summary

ATP binding cassette (ABC) transporters form one of the largest transmembrane protein families. These proteins use cellular ATP to drive the transport of various substrates across cell membranes including many exogenous and endogenous compounds, which includes drugs used in cancer treatment. ABCC2 is an ATP binding cassette transporter which accepts a diverse range of substrates, including glutathione, glucuronide, and sulfate conjugates of many metabolites and xenobiotics. ABCG2 is a member of the ATP binding cassette (ABC) transporters whose function is to pump out of the cell a wide variety of endogenous and exogenous compounds. Widely expressed in stem cells, ABCG2 is also recognized as a universal marker of stem cells. For these reasons we had identified the following polymorphisms of ABCC2 gene: -Val417Ile, Ser789Phe and Ala1450Thr- and of ABCG2 gene as well: -Val12Met, Gly126stop codon, Gly141Lys in 88 patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Methodology included PCR - RFLP and direct sequencing. Survival analysis was done using Kaplan-Meier curves and response measured by RECIST criteria. Comparisons were done between polymorphic patients in which at least one polymorphism was present as opposed to the patients without the polymorphism. Correlation with response to treatment was studied for Val12Met, Gly141Lys e Val417Ile in 68 patients exclusively treated with concomitant cisplatin and radiotherapy and no correlation was found between these markers and treatment response. Patients without the Val12Met presented a trend towards shorter survival (median survival 18.7 months) as compared to polymorphic patients (median survival not reached, long rank $p=0.089$). Although statistical significance was not reached, patients wild type for Gly141Lys polymorphism (median survival 15.8 months) had shorter survival than polymorphic patients (25.6 months, $p=0.16$). We did not observe any other correlation between other polymorphisms and survival. With respect to Gly126stop, only one patient was identified as polymorphic and survival analysis was not possible. As far as we know this is the first study to try to correlate these polymorphisms with treatment response and survival in HNSCC patients. Although we were unable to draw any definitive conclusions, our results indicate that Val12Met and Gly141Lys deserve to be further studied in the future.

Descriptors: 1. Squamous cell carcinoma 2. Head and neck neoplasm 3. Cisplatin 4. Pharmacogenetics 5. ATP binding cassette transporters 6. Restriction fragment length polymorphism 7. Polymerase chain reaction.

INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC) tem grande importância em nosso meio por várias razões. Primeiro, a alta incidência da doença, sendo que as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA, Ministério da Saúde, Brasil) indicam cerca de 14120 novos casos, somente de câncer de cavidade oral, serão diagnosticados em nosso país no ano de 2010. Em segundo lugar, este câncer tem uma alta mortalidade, sendo que a taxa de sobrevida após 5 anos pós-diagnóstico permaneceu inalterada na última década, independente dos progressos no tratamento (Greenlee *et al.*, 2001). Isto acontece porque muitos pacientes apresentam tumor irresssecável ao diagnóstico, e cerca de 50% dos pacientes tratados com intenção curativa apresentam recidiva da doença. A terceira e última razão, mesmo pacientes com estágio precoce I/II curados pelo tratamento apresentam uma taxa de 20% de segundo tumor primário de trato aerodigestivo superior (Takes *et al.*, 1997).

Essa falha ao tratamento inicial, seja cirurgia, cirurgia associada à radioterapia, radioterapia ou radioterapia combinada à quimioterapia, pode estar atribuída a características clínico patológicas, biologia tumoral e morbidades associadas, destas sendo a presença de linfonodos comprometidos o fator prognóstico mais importante (Piccirillo *et al.*, 1996). Contudo, nenhum dos fatores prognósticos parece ser absoluto como preditivo de recidiva ou do curso clínico nesses pacientes.

Inúmeros outros fatores podem explicar diferenças na eficácia e toxicidade de agentes quimioterápicos tais como idade, etnia, sexo, dieta. Diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco podem

também sofrer influência dos polimorfismos genéticos em proteínas que atuam na sua via de metabolização e ação do medicamento (Abraham *et al*, 2006).

A farmacogenética, definida como o estudo da constituição genética do indivíduo no contexto da resposta aos medicamentos, é uma área em desenvolvimento que parece promissora no estudo do câncer de forma geral. No caso da quimioterapia anti-neoplásica, tem-se analisado polimorfismos em genes de enzimas que servem como alvo dos agentes quimioterápicos, que participam da sua metabolização ou de reparo do dano do DNA. Estas análises podem ser feitas a partir de DNA extraído de sangue periférico, prescindindo de amostra tumoral, nem sempre de fácil obtenção.

A farmacogenômica estuda a função do genoma (especialmente do genoma tumoral) na atividade dos agentes anticâncer. Envolve a avaliação sistemática de como os compostos químicos modificam o amplo padrão de expressão nos tecidos de interesse. Em contraste com a farmacogenética, não foca as diferenças de uma pessoa para outra com relação aos efeitos dos fármacos, mas antes, examina as diferenças relacionadas aos efeitos das drogas e à mudança do padrão de expressão dos genes (Lindpaintner, K., 2002).

A escolha dos genes candidatos a estudos em farmacogenética tem-se baseado, principalmente, na procura por variações genéticas em enzimas de metabolização, proteínas transportadoras e proteínas alvo da ação do fármaco. Esta escolha requer primeiramente o conhecimento da via de ação do fármaco, pois com esta informação pode-se escolher os genes com maior

probabilidade de ter um papel na disposição e resposta, além de reduzir o número de genes potenciais requeridos na investigação (Abraham *et al*, 2006).

Os genes polimórficos apresentam variantes alélicas com frequência superior a 1%, entretanto, o uso comum deste termo refere-se a mudanças na sequência do DNA que não afetam ou tem efeito menor na função e produção de uma proteína. O tipo mais comum de polimorfismo é a substituição de um único nucleotídeo (SNP – single nucleotide polymorphism). Os polimorfismos podem ocorrer nas proteínas diretamente envolvidas na ação dos fármacos, tanto quando a proteína é o alvo ou quando a proteína participa do reparo ao dano causado pelo fármaco, com isso sua eficácia pode ser comprometida e/ou sua toxicidade aumentada.

Assim, conclui-se que a identificação de polimorfismos funcionais em pacientes antes da quimioterapia pode ajudar a prescrição de uma combinação ótima de agentes quimioterápicos (Robert, J *et al.*, 2005). Mas quais polimorfismos estudar? Um grupo particularmente promissor e que tem merecido a atenção de vários grupos são os SNPs de proteínas que atuam em mecanismos de resistência à quimioterapia e radioterapia, dentre eles a família de transportadores, de grande importância na defesa da célula a agentes exógenos. Além disso, os métodos de genotipagem são simples, rápidos, eficientes, reprodutíveis e relativamente baratos e por isso tem grande potencial para terem uma relação custo benefício compatível com a prática clínica.

No caso dos pacientes com HNSCC, o quimioterápico mais usado em associação com radioterapia ou isoladamente é a cisplatina. Esta é um fármaco antigo, sintetizado e caracterizado por Peyrone em 1845. Suas propriedades anticancerígenas só foram descritas em 1970, quando Rosenberg e colaboradores estudaram os efeitos dos campos elétricos no crescimento de *Escherichia coli*.

Em HNSCC, a cisplatina é usada associada à radioterapia como tratamento exclusivo nos casos da doença localmente avançada irressecável, associada à radioterapia em esquemas de adjuvância em pacientes com alto risco de recidiva, ou em esquemas de quimioterapia exclusiva com intuito paliativo na doença metastática.

A cisplatina é muito eficiente no tratamento de vários carcinomas como o testicular, ovário, bexiga, cervical, cabeça e pescoço, esôfago e células não pequenas de pulmão (Giaccone et al., 2000). Desde a introdução da cisplatina como agente quimioterápico, muitos estudos sobre seus efeitos citotóxicos na célula foram desenvolvidos. O mecanismo de ação deste quimioterápico (figura 01) mostra que para exercer efeito citotóxico, a cisplatina é ativada, de forma não enzimática, havendo uma troca dos grupos de cloro por moléculas de água. O produto liga-se de forma covalente a posição N7 de resíduos de guanina ou adenina, formando pontes na mesma fita ou nas fitas complementares do DNA. Estas alterações levam a erros na síntese do DNA, com acúmulo das células na fase G2 do ciclo celular e indução da apoptose (Johnson et al., 2001).

Apesar do sucesso, a cisplatina apresenta muitas desvantagens, como seus efeitos colaterais, incluindo neurotoxicidade, nefrotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômitos (Giaccone et al., 2000). Esses efeitos tóxicos limitam a dose que deve ser ministrada ao paciente (Cepeda et al., 2007). Além disso, como a taxa de resposta em HNSCC é de cerca de 50%, é altamente desejável a pré-seleção de pacientes com maior chance de resposta.

Figura 01 – Mecanismo de ação da cisplatina – Após a entrada da droga no citoplasma, a molécula de platina perde seus cloros e passa então a interagir com a molécula de DNA, promovendo o bloqueio da transcrição e da replicação e assim a parada do ciclo celular e conseqüente apoptose (Modificado de Kartalou et al., 2001).

A resistência à cisplatina pode desenvolver-se como resultado de uma diminuição no influxo ou aumento no efluxo do fármaco, conjugação

com a glutathione, detoxificação da droga ou reparo no DNA. Porém, é pouco provável que apenas um destes mecanismos leve à resistência, mas sim uma combinação entre eles (Rabick & Dolan, 2007).

Um dos mecanismos de resistência à cisplatina parece ser a diminuição efetiva da concentração da droga na célula. Reduções na concentração intracelular de cisplatina de 20-70% foram encontradas em linhagens celulares resistentes à cisplatina, reforçando a importância do influxo e do efluxo desta molécula no processo de resistência a este agente (Rabick & Dolan, 2007). No caso da cisplatina, ela pode atravessar a membrana celular por difusão passiva, mas apenas este processo parece não ser suficiente para saturar o meio intracelular. Este parece depender principalmente de duas famílias de transportadores: os transportadores de cobre (CTR1 – *copper transport protein 1*, responsável pelo influxo) e a família de transportadores ABC (*ATP - binding cassette transporters* - ABCG2 e ABCC2, responsáveis pelo efluxo), conforme mostra a figura 2. Por esses motivos, escolhemos focar o ABCG2 e o ABCC2 para utilizarmos em nosso estudo.

Figura 02 – Mecanismo de influxo e efluxo da cisplatina na célula – A entrada da droga na célula ocorre por difusão passiva ou via transportador de cobre (CTR1), no citoplasma a molécula de platina troca seus átomos de cloro por duas moléculas de água, transformando-se na sua forma ativa. Sua forma ativa pode chegar ao DNA, ou ser detoxificada pela glutatona ou ainda sair da célula por difusão passiva ou via transportadores ligados ao ATP (ABCG2 e ABCC2) (Modificado de Cepeda et al., 2007).

O ABCG2 (ATP-binding cassette, sub-family G, member 2) é o segundo membro da família G dos transportadores ABC, está localizado no cromossomo 4 e codifica uma proteína de 72KDa composta por 655 aminoácidos (figura 3) (Bailey-Dell et al., 2001). A proteína consiste de apenas uma região ligada ao ATP e um domínio transmembrânico; é conhecida como um meio transportador, pois é necessário que ocorra uma homodimerização para que ocorra o transporte de substratos (Kage *et al.*, 2002), como mostra a figura 4. Este processo de homodimerização ainda

não está esclarecido, o que se sabe é que é necessária a ligação de uma molécula de ATP para que aconteça; e que na presença de agentes redutores sulfidril o complexo de 140 KDA quebra-se em dois de 70 KDA, sugerindo que o complexo é mantido por pontes dissulfeto (Krishnamurthy & Schuetz, 2006).

Figura 03 – Diagrama esquemático da estrutura do ABCG2 – A proteína tem seis domínios transmembrânicos e uma região de ligação de ATP; está representado também em que parte da proteína os polimorfismos estudados se encontram (Modificado de Mizuarai *et al.*, 2004).

Especula-se que o ABCG2 tenha uma maior influência na farmacocinética e farmacodinâmica de certos xenobióticos e substratos endógenos; além disso, acredita-se que este gene contribui para a resistência a várias drogas, como a cisplatina, camptotecina, doxorubicina, daunorubicina, etoposide, metotrexato, mitoxantrona, 7-Etil-10-Hidroxycamptotecina (SN-38), topotecan e vincristina (Borst *et al.*, 1999;

Jonker *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2005). Além disso, é possível que este transportador participe de outros processos celulares, incluindo a proliferação celular. Estudos recentes mostram que fatores de crescimento como EGF e progesterona tenham papel significativo na regulação da expressão e atividade do ABCG2 em várias células (Chen *et al.*, 2009).

Figura 4 – Homodimerização do ABCG2 – O ABCG2 é um meio transportador, portanto ele se liga a outra molécula idêntica, por um processo desconhecido, para realizar o transporte através da quebra de ATP (Ding *et al.*, 2010).

Os polimorfismos do exon 2 códon 34 (Val12Met), exon 4 códon 376 (Gly126stop) e exon 5 códon 421 (Gly141Lys) são os mais conhecidos deste gene. Um trabalho com linhagens câncer de mama comparou a expressão gênica de linhagens que continham ou não os polimorfismos e o efluxo das drogas topotecan, mitoxantrone e SN-38; observando uma perda de função e menor resistência aos fármacos nas linhagens polimórficas (Imai *et al.*, 2002). Kobayashi e colaboradores (2005) também mostraram uma perda de função da proteína contendo estes polimorfismos em placenta através de um estudo de expressão protéica.

A alteração Gly141Lys está localizada na região de ligação do ATP, causando não uma alteração na função, mas na expressão da proteína; além disso, há também uma instabilidade da proteína alterada devido à diferença de cargas entre a glutamina e a lisina, alterando a sua estrutura terciária, tornando-a mais suscetível à degradação. O polimorfismo Val12Met afeta a região N – terminal da região intracelular da proteína (Tamura *et al.*, 2007) podendo levar a uma mudança na função do transporte causada por distúrbios na localização da proteína na membrana (Mizuarai *et al.*, 2007). Já a alteração Gly126Stop produz um códon de parada, gerando uma proteína truncada.

O ABCC2 (ATP-binding cassette, sub-family C, member 2), localizado no cromossomo 10, codifica uma proteína de 200KDa com 1545 aminoácidos se localiza na região apical da membrana de células epiteliais

polarizadas de órgãos com grande secreção como o fígado, rim, bem como na barreira sanguínea cerebral e placenta (Koing *et al.*, 1999; Yong *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2005). Sua estrutura esta representada na figura 5. Seu cDNA foi originalmente isolado de uma cultura de células cancerígenas humanas resistentes à cisplatina (Taniguchi *et al.*, 1996), sugerindo que este transportador possa estar relacionado com resistência a fármacos aniônicos como a cisplatina.

Figura 05 – Diagrama esquemático da estrutura do ABCC2 – A proteína tem dezessete domínios transmembrânicos e duas regiões de ligação de ATP; está representado também em que parte da proteína os polimorfismos estudados se encontram (Modificado de Gerk e Vore., 2002).

O ABCC2 foi inicialmente designado como um transportador canicular multiespecífico de ânions orgânicos; ele exporta ativamente fármacos aniônicos conjugados com glucuronatos, sulfatos e glutathionas (Keper *et al.*, 1997) e facilita o transporte de agentes anticâncer, incluindo a cisplatina,

vinblastina e derivados de camptotecina (Borst *et al.*, 1999). Recentemente, foi sugerido que o ABCC2 pode ser responsável por interações de drogas como micofelonato, mofetil e ciclosporina em receptores de órgãos transplantados (Hesselink *et al.*, 2005).

Em um trabalho, Hirouchi e colaboradores (2004) realizaram um estudo funcional e de expressão dos mRNAs do gene ABCC2 utilizando células da linhagem LLC-PK1 transfectadas por adenovírus contendo os polimorfismos do exon 18 códon 2366 (Ser789Phe) e exon 31 códon 4348 (Ala1450Thr) e linhagens selvagens; observando uma baixa expressão do mRNA quando as células apresentavam uma destas alterações, indicando um possível impacto funcional destes polimorfismos neste transportador. Um trabalho mostrou que em pacientes com câncer de bexiga os níveis de mRNA eram maiores em portadores dos alelos selvagens em relação aos que continha o polimorfismo do exon 10 códon 1249 (Val417Ile) (Kroetz *et al.*, 2006); além disso, Schwabedissen *et al.* encontrou uma menor expressão de mRNA associado a presença do alelo polimórfico em linhagens de placenta humana.

Muitos SNPs têm sido identificados em indivíduos normais de várias etnias; considerando o seu importante papel no processo de excreção, é possível que estes polimorfismos possam contribuir para as diferenças interindividuais nas atividades de transporte e excreção.

Apesar de vários estudos relacionando polimorfismos e resistência à cisplatina já terem sido realizados, não há ainda uma relação estabelecida

entre os polimorfismos presentes nos transportadores de membrana e a resistência à cisplatina, o que justifica a investigação do polimorfismo destes genes (ABCG2 e ABCC2) em outros grupos de pacientes tratados com cisplatina.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar, prospectivamente, o valor prognóstico da presença do polimorfismo dos genes ABCC2 e ABCG2 para a resposta ao tratamento de rotina que inclua cisplatina, nos pacientes portadores de HNSCC localmente avançado ou metastático.

Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a presença dos polimorfismos Val12Met, Gly126stop, do gene ABCG2 e Val417Ile, Ser789Phe do gene ABCC2 nos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço por PCR-RFLP. Determinar a presença do polimorfismo Ala1450Thr do gene ABCC2 e Gly141Lys do gene ABCG2 nos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço por sequenciamento.
-
-

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística

Todos os pacientes incluídos neste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e este trabalho obteve a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sob o número 0246/08 em 04 de junho de 2008 (anexo 1).

Os critérios de inclusão dos pacientes neste estudo foram: (a) diagnóstico histológico ou citológico confirmado de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, (b) idade mínima de 18 anos, (c) indicação de rotina de tratamento combinado de cisplatina com radioterapia ou quimioterapia exclusiva que incluía a cisplatina, no Serviço de Oncologia do INRAD-HCFMUSP, (d) aptos e desejosos de assinarem o termo de consentimento após serem informados dos objetivos de estudo. No total, foram coletados amostras de 90 pacientes no período de outubro de 2004 a fevereiro de 2008, cujas principais características clínico-patológicas estão listadas na tabela 1. Todos os tumores foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos na 5ª edição da Classificação de TNM de tumores malignos da UICC (União internacional contra o câncer).

Para as análises de resposta ao tratamento e sobrevida foram utilizados apenas os dados dos pacientes que receberam quimiorradioterapia exclusiva, ou seja, os pacientes com tumor irresssecável, tratados com quimio/RDT como tentativa curativa, paliativa ou como parte do esquema de

quimiorradioterapia exclusiva. Foram excluídos os pacientes que receberam cisplatina como parte do tratamento adjuvante (em pacientes com tumores ressecados e com características de mau prognóstico com finalidade de evitar recidiva) por abrangerem poucos casos, reduzindo então o número de pacientes total para 68 nesse grupo.

A avaliação da resposta ao tratamento foi definida segundo os critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos (RECIST), onde se comparou os resultados da tomografia computadorizada antes e após o tratamento.

Foi definido como resposta completa (RC) ao tratamento o desaparecimento total de toda evidência clínica e imageológica da neoplasia, quando mantida por pelo menos quatro semanas; resposta parcial (RP) sendo aquela onde houve uma diminuição de pelo menos 30% do tamanho do maior diâmetro da lesão mensurável à avaliação inicial, confirmada em quatro semanas; progressão da doença (PD) como um aumento do tamanho da lesão em pelo menos 20%, ou aparecimento de novas lesões; doença estável (DE), quando os critérios acima não são alcançados. Estes critérios foram aplicados na tomografia computadorizada realizada após um mês do término do tratamento.

Tabela 1: Características dos 68 pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade de cabeça e pescoço incluídos nas análises.

Número de pacientes		
Gênero	Masculino	63
	Feminino	05
Idade Mediana	57 (29-76) anos	
Linfonodo	N0	11
	N1	07
	N2	24
	N3	21
	ND	05
Tamanho tumoral	T1	02
	T2	08
	T3	06
	T4	44
	ND	08
Estadiamento	II	02
	III	06
	IVa	60
	ND	-
Diferenciação histológica	CEC I	19
	CEC II	34
	CEC III	5
	ND	13
Sítio Primário	Cavidade oral	12
	Orofaringe	27
	Hipofaringe	8
	Laringe	17
	Língua	1
	Outros	3

ND = não determinado

Métodos

Extração de leucócitos

Para a separação dos leucócitos, as amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 100 g em temperatura de 4°C, para a separação do soro. O soro foi separado em tubos de 1,5 ml e estocado. O restante do sangue foi transferido para um tubo de 50 ml e completado com TE (tris HCl e EDTA) pH 8.0 até 40 ml. O tubo foi homogeneizado com vigor durante um minuto e centrifugado a 1500 g por sete minutos. Foram aspirados 35ml do tubo, restando 5 ml do precipitado no fundo. O tubo foi homogeneizado com vigor por dez segundos. Foram adicionados 20 ml de TE e homogeneizado com vigor novamente durante um minuto. O tubo foi centrifugado a 1500 g por cinco minutos. Foram desprezados 20 ml de sangue e os 5 ml restantes foram aliquotados em tubos de 1,5 ml e devidamente identificados. Os tubos de 1,5 ml foram centrifugados durante 30 segundos a 12000 g. O sobrenadante foi desprezado, restando somente o precipitado de leucócitos nos tubos. As amostras foram estocadas em freezer -70°C.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico com o auxílio do kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Foi utilizado o protocolo de extração de DNA para 300 µl de amostra de sangue.

Para lisar as membranas celulares, foram adicionados 900 µl de *Cell Lysis Solution* nos tubos de 1,5 ml contendo os leucócitos. Os tubos foram homogeneizados gentilmente e a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente para a lise das células, e logo após centrifugados a 13000 g por 20 minutos a temperatura ambiente. Foi descartada a maior quantidade de sobrenadante possível restando apenas de 10 a 20 µl de líquido residual. Para ressuspender as células brancas os tubos foram homogeneizados vigorosamente cerca de 10 a 15 segundos. Para lisar as membranas nucleares, foram adicionados 300 µl de *Nuclei Lysis Solution*. A solução foi incubada a 37°C por uma hora, para desaparecerem os grumos. Foi adicionado 1,5 µl de *Rnase Solution* para degradar o RNA presente na amostra. A amostra foi homogeneizada por inversão de 2 a 5 vezes e incubada a 37°C durante 15 minutos e foi esfriada a temperatura ambiente. Foram adicionados 100 µl de *Protein Precipitation Solution* para degradar as proteínas presente na amostra, em seguida a amostra foi homogeneizada vigorosamente por 10 a 20 segundos. A amostra foi centrifugada a 13000 g por 3 minutos a temperatura ambiente. Foi formado um precipitado, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 ml contendo 300 µl de Isopropanol a temperatura ambiente e a amostra foi homogeneizada por inversão até o DNA estar visível. A amostra foi centrifugada a 13000 g por um minuto a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionado o mesmo volume de etanol 70%. A amostra foi homogeneizada gentilmente por inversão para lavar o precipitado. Logo após, centrifugada a 13000 g por um minuto a temperatura ambiente. O etanol foi aspirado

restando o precipitado de DNA que secou durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para a eluição foi adicionado 100 µl de *Rehydration Solution* sendo incubada durante 1 hora a 65°C e em seguida por 16 horas a temperatura ambiente.

Em seguida à extração do DNA de leucócitos do sangue periférico, a integridade dos DNAs foi verificada por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo (Figura 6).

Figura 6: Foto representativa da extração de DNA genômico extraídos dos leucócitos do sangue periférico, onde podemos observar a integridade do DNA, em gel de agarose 0,8%.

Determinação do genótipo dos polimorfismos Val12Met e Gly126stop do gene ABCG2; Val417Ile e Ser789Phe do gene ABCC2 por PCR-RFLP

Os genótipos dos polimorfismos Val12Met e Gly126stop do gene ABCG2; Val417Ile e Ser789Phe do gene ABCC2 foram determinados por análise de Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP); escolhemos esta técnica para determinar a maioria dos polimorfismos por ser uma técnica mais simples e

também 2 µg do peso molecular de 100 pb como padrão de corrida, somado a 2 µl do tampão. A eletroforese foi realizada com 70 Volts e com um tampão de TBE 1X.

Tabela 2: Oligonucleotídeos e enzimas de restrição

Gene	SNP	Sequência do primer	Enzima de restrição	Tamanho do fragmento (bp)
ABCG2	Val12Met	Forward 5' – CAGTAATGTCGA AGTTTTATCGCA - 3' Reverse 5' – AAATGTTTCATAGC CAGTTTCTTGGA - 3'	<i>BseMI</i>	291
	Gly141Lys	Forward 5' - GTTGTGATGGGCACTCTGACGGT - 3' Reverse 5' - CAAGCCACTTTTCTCATTGTT - 3'	–	290
	Gly126stop	Forward 5' – ATAGCATGTGT TGGAGGGAAAAA - 3' Reverse 5' – ATTGGTATCAC TGTCCTTACAAG - 3'	<i>Taill</i>	417
ABCC2	Val417Ile	Forward 5' – AACTTGGCCAGGAAGGAGTACACC - 3' Reverse 5'-CTGGGTGACTTTTTCTTTACCTGAATG-3'	<i>PSP 1406I</i>	260
	Ser789Phe	Forward 5' – TTAGTGGGGGTGAGAAGCAG - 3' Reverse 5' – CAGACATGTCCTCCCCTCTC - 3'	<i>PSTI</i>	225
	Ala1450Thr	Forward 5' – GCTTCGGAAATCCAAGATCC - 3' Reverse 5' - CGAACTCGTTTTGGATGGTC - 3'	–	171

O produto das PCR para a determinação dos polimorfismos Gly126stop, Val12Met, Val417Ile e Ser789Phe foi digerido seguindo recomendações do fabricante das enzimas Tail, BseMI, Psp 1406I e PstI, respectivamente. Para as enzimas Tail e BseMI as condições foram: 15 µl do produto da PCR, 10X Tampão R, 2 unidades/µl da enzima, para um volume final da mistura de 30 µl; já para as enzimas Psp 1406I e PstI: 5 µl do produto da PCR, 10X Tampão (O para PstI e Tango para Psp 1406I) e 2

unidades/ μ l da enzima, para um volume final da mistura de 20 μ l. Cada mistura foi homogeneizada gentilmente por alguns segundos e, em seguida: incubada a 65°C por 4 horas para Gly126stop, 55°C por 6 horas para Val12Met, 37°C por 16 horas para Val417Ile; 37°C por 16 horas para Ser689Phe. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, em TBE1X (Tris-base 0,08 %, ácido bórico 0,55 % e EDTA 0,1 M, pH 8,0) e solução de Brometo de Etídio 0,5 mg/ml. Utilizou-se também 2 μ g do peso molecular de 50 pb como padrão de corrida, somado a 2 μ l do tampão. A eletroforese foi realizada com 50 Volts e com um tampão de TBE 1X.

Determinação do genótipo Ala1450Thr do gene ABCC2 e Gly141Lys do gene ABCG2 por seqüenciamento

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores para cada polimorfismo foram desenhados em regiões intrônicas com o intuito de manter a região polimórfica no centro do fragmento.

Para a reação, as concentrações finais utilizadas foram: 0,2 mM de cada desoxinucleotídeos trifosfatos, 2,5 unidades por reação de *Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen)*, 15 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 1,5 mM MgCl₂, 1 μ M de cada oligonucleotídeo específico DNA a 50 ng. O volume final de 15 μ l foi completado com água ultrapura.

A reação foi realizada no aparelho termociclador e submetida a variações de temperatura. Desnaturação: 95°C por 5 minutos; 40 ciclos: 94°C por 50 segundos, 68°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto; extensão final: 72°C por 5 minutos.

4 µl do produto da PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose para DNA para a verificação da especificidade do produto amplificado. O gel continha 1,5% de agarose, TBE 1X (Tris-base 0,08 %, ácido bórico 0,55 % e EDTA 0,1 M, pH 8,0) e solução de Brometo de Etídio 0,5 mg/ml. Utilizou-se também 2 µg do peso molecular de 100 pb como padrão de corrida, somado a 2 µl do tampão. A eletroforese foi realizada com 70Volts e com um tampão de TBE 1X.

Sequenciamento direto

Conforme instruções do fabricante para o sequenciamento em *MegaBACE-1000* (GE Biosystems), o mix da reação foi preparado de acordo com a análise quantitativa das bandas encontradas em gel de agarose. Foram realizadas duas reações para cada fragmento analisado, uma para a fita senso e outra para a fita anti-senso, a fim de cobrir toda a área de interesse e confirmar o resultado através da comparação das duas fitas, que devem ser complementares por toda a extensão do fragmento em questão.

As amostras utilizadas apresentavam bandas com massa de 50 a 80 ng de DNA. Para o oligonucleotídeo iniciador, a concentração final foi de 1

pmol/μl. O pré-mix, contendo os demais reagentes da reação, provém do kit Dynamic ET Dye (código US81095 / GE Biosystems). O volume final, neste caso 10 μl, foi completado com água ultra-pura (livre de RNAses e DNAses).

Dentre os dNTPs utilizados, alguns são marcados com um agente fluoróforo e possuem uma hidroxila a menos no carbono 3 da molécula, sendo portanto chamados de dideoxynucleotídeos. Isto faz com que a extensão da fita seja interrompida quando estes são incorporados e seja emitida uma fluorescência característica, que vai ser capturada pelo aparelho seqüenciador.

A reação foi levada ao termociclador e submetida a 25 ciclos de variação de temperatura, permanecendo por 20 segundos a 95°C para a desnaturação das fitas do DNA, 15 segundos a 50°C para o anelamento do oligonucleotídeo iniciador, 1 minuto a 60°C para que a enzima pudesse realizar a extensão das fitas e, por tempo indeterminado, a 4°C, interrompendo a reação.

O próximo passo foi precipitar e a purificar o DNA resultante da reação anterior. Para tal, foram adicionados 20 μl de isopropanol a 80% a cada amostra, agitando então por 20 segundos. Centrifugou-se por 35 minutos a 2250 g, com aceleração=6 e breque=0. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado por inversão e a placa contendo as amostras foi centrifugada com a parte superior voltada para baixo sobre um papel absorvente por 1 minuto a 59 g. Adicionou-se 200 μl de etanol a 70% e as amostras foram agitadas por aproximadamente 1 minuto. Centrifugou-se as amostras por 10 minutos a 2250 g, com aceleração=6 e breque=0.

Despejou-se o sobrenadante por inversão e a centrifugação com a placa invertida foi repetida. Todas as centrifugações ocorreram à temperatura ambiente. O etanol das amostras evaporou após estas ficarem à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. O precipitado foi então ressuspenso em 10 µl de solução *loading MegaBACE*, ou formamida a 70% com água deionizada e as amostras estavam prontas para serem seqüenciadas.

As reações de seqüenciamento foram feitas em placas de 96 poços, uma vez que a separação dos fragmentos gerados foi feita por eletroforese capilar no aparelho MegaBACE-1000 (GE Biosystems), que capta o sinal fluorescente dos dideoxinucleotídeos e fornece o resultado na forma de picos de fluorescência. Para verificar a qualidade das sequências obtidas após a eletroforese, utilizou-se o software Chromas versão 2.33 (Technelysium Pty. Ltd.).

Análises estatísticas

Os valores das variáveis categóricas dos polimorfismos estudados, como determinante de resposta à cisplatina, foram analisados pelo Teste de Fisher. As curvas de sobrevivência foram construídas segundo o método de Kaplan-Meier e a importância prognóstica destes polimorfismos determinada pelo teste de log rank. A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS 15.0. Para verificar se as freqüências alélicas de cada polimorfismo estavam

em equilíbrio de Hardy – Weinberg utilizou-se o teste de X^2 , calculado da seguinte forma:

$X^2 = n.F^2$, onde n = número total de indivíduos e F = fator de endogamia, calculado por:

$F = 1 - h/2p.q$, onde h = frequência de heterozigotos, p = frequência alélica do alelo selvagem e q = frequência alélica do alelo polimórfico.

Sendo significativo $X^2 < 3,84$; 2 graus de liberdade.

RESULTADOS

Inicialmente foram padronizadas as condições para realização dos ensaios de PCR com os oligonucleotídeos desenhados, tais como a temperatura de anelamento e a especificidade da reação (figura 7).

Figura 7: Foto representativa do produto da amplificação dos gene ABCG2. 4 μ l de cada um dos produtos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%. **1 e 2 – Val12Met, 4 e 5 - Gly126stop, 7 e 8 – Gly141Lys e 3, 6 e 9 – controle negativo.**

Determinação do genótipo dos polimorfismos Gly126stop e Val12Met do gene ABCG2; Val417Ile e Ser789Phe do gene ABCC2 por PCR-RFLP

Conforme descrito em métodos, realizou-se uma PCR para a amplificação do fragmento de interesse, 4 µl de cada um dos produtos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, para verificar a especificidade do fragmento amplificado. Os produtos de PCR foram digeridos seguindo recomendações do fabricante das enzimas e verificados em gel de agarose 3%.

Determinação do genótipo do polimorfismo Gly126stop

Os produtos contendo 3 fragmentos (200pb, 122pb e 95pb) foram identificados como homozigotos selvagens, 4 fragmentos (322pb, 200pb, 122pb e 95pb) foram identificados como heterozigotos e 2 fragmentos (322pb e 95pb) como homozigotos polimórficos.

Figura 8: Análise do genótipo Gly126stop do gene ABCG2 por Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do tamanho do fragmento de Restrição. **Os pacientes de 1 - 6 e de 8 – 12 foram identificados como Gly/Gly (selvagem); já o 7 foi identificado como Gly/Stop (heterozigoto).**

Determinação do genótipo do polimorfismo Val12Met

Os produtos contendo 1 fragmento (291pb) foram identificados como homozigotos selvagens, 3 fragmentos (291pb, 260pb e 31pb) foram identificados como heterozigotos e 2 fragmentos (260pb e 31pb) como homozigotos polimórficos. Entretanto, ao separar as bandas de 260bp e

291pb a banda de 31pb não aparece, por ser muito menor; para garantir que os homozigotos selvagens não são artefatos da falha de digestão, utilizou-se sempre uma amostra de heterozigoto conhecido como controle positivo das reações de digestão.

Figura 9: Análise do genótipo Val12Met do gene ABCG2 por Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do tamanho do fragmento de Restrição. **Os pacientes 3 e 10 foram identificados como Val/Met (heterozigoto), já o restante Val/Val (selvagem).**

Determinação do genótipo do polimorfismo Val417Ile

Os produtos contendo 2 fragmentos (239pb e 26pb) foram identificados como homozigotos selvagens, 3 fragmentos (265pb, 239pb e 26pb) foram identificados como heterozigotos e 2 fragmentos (265pb e 26pb)

como homozigotos polimórficos. Entretanto, ao separar as bandas de 265bp e 239pb a banda de 26pb não aparece, por ser muito menor; para garantir que os homozigotos selvagens não são artefatos da falha de digestão, utilizou-se sempre uma amostra de heterozigoto conhecido como controle positivo das reações de digestão.

Figura 10: Análise do genótipo Val417Ile do gene ABCC2 por Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do tamanho do fragmento de Restrição. Os pacientes 1, 7 e 9 foram identificados como Val/Val (selvagem); os pacientes 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12 e 13 como Val/Ile (heterozigoto) e o 2 como Ile/Ile (homozigoto polimórfico).

Determinação do genótipo do polimorfismo Ser789Phe

Os produtos contendo 2 fragmentos (136pb e 93pb) foram identificados como homozigotos selvagens, 3 fragmentos (229pb, 136pb e 93pb) foram identificados como heterozigotos e 1 fragmento (229pb) como homozigotos polimórficos.

Figura 11: Análise do genótipo Ser789Phe do gene ABCC2 por Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo do tamanho do fragmento de Restrição. **Não encontramos pacientes com este genótipo nesta população.**

Determinação dos genótipos Ala1450Thr do gene ABCC2 e Gly141Lys do gene ABCG2 por sequenciamento

Conforme descrito em métodos, realizou-se uma PCR para a amplificação do fragmento de interesse, 4 µl de cada um dos produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, para verificar a especificidade do fragmento amplificado. Realizou-se então, o sequenciamento direto das fitas senso e anti-senso do produto amplificado, sendo o resultado obtido na forma de picos de fluorescência, de acordo com a leitura realizada pelo aparelho seqüenciador, conforme mostram as figuras 12 e 13.

Figura 12: Resultado do sequenciamento da fita reversa de um dos pacientes selvagens. Não encontramos pacientes polimórficos para Ala1450Thr do gene ABCC2 nesta população.

encontrado. As frequências de todos os polimorfismos estudados estavam em equilíbrio de Hardy – Weinberg, conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3: Frequência alélica da população estudada (n = 90)

Mudança de aminoácido	Genótipo			Frequência Genotípica	Frequência Alélica (Intervalo de confiança de 95%)	χ^2
ABCG2	S/S	S/P	P/P			
Gly 126 stop	89	01	00	0,01	0,005 (0,00 – 0,01)	1,22
Val12Met	81	09	00	0,1	0,05 (0,04 – 0,12)	0,33
Gly141Lys	74	13	01	0,16	0,084 (0,02 – 0,08)	0,25
ABCC2						
Val417Ile	56	31	3	0,38	0,21 (0,16 – 0,26)	0,13
Ser789Phe	90	00	00	00	00	-
Ala1450Thr	90	00	00	00	00	-

χ^2 significativo ($\chi^2 < 3,84$; 2g.l.) para todos os polimorfismos, indicando que estão em equilíbrio de Hardy – Weinberg.

S = Selvagem; P = Polimórfico

Resposta ao tratamento com cisplatina

Como não havia pacientes polimórficos o suficiente para realizar a análise para os polimorfismos Gly126stop, Ala1450Thr e Ser789Phe, analisou-se a correlação entre o polimorfismo e resposta ao tratamento com cisplatina somente para o Val12Met, Gly141Lys e Val417Ile.

Foi decidido utilizar nas análises somente os pacientes que receberam quimiorradioterapia exclusiva, ou seja, os pacientes com tumor irresssecável, tratados com quimio/RDT como tentativa curativa, paliativa ou como parte do esquema de quimiorradioterapia exclusiva. Foram excluídos

os pacientes que receberam cisplatina como parte do tratamento adjuvante, pois estes abrangiam poucos casos, reduzindo então o número de pacientes total para 68 nesse grupo.

Para a análise da relação entre polimorfismos e resposta ao tratamento utilizou-se o teste de Fisher que não revelou correlação entre a presença dos polimorfismos e resposta ao tratamento com cisplatina, conforme mostra a tabela 4.

Tabela 4: Relação entre os polimorfismos e a resposta à cisplatina

	Respondedores	Não respondedores	
Gene	Nº (%)	Nº (%)	P
ABCG2 (Val12Met)			
V/V	35 (57,3)	26 (42,7)	0,234
V/M e M/M	6 (85,7)	1 (14,3)	
ABCG2 (Gly141Lys)			
G/G	33 (58,9)	23 (41,1)	1
G/L e L/L	7 (58,4)	5 (41,6)	
ABCC2 (Val417Ile)			
V/V	25 (56,8)	19 (43,2)	0,452
V/I e I/I	16 (66,6)	8 (33,3)	

Respondedor = resposta total + resposta parcial

Não respondedor = sem resposta

Curvas de sobrevida

As curvas de sobrevida global foram feitas através do método de Kaplan-Meier. Com o objetivo de procurar por correlações entre a presença do polimorfismo e sobrevida global foram realizadas categorizando os pacientes como selvagens ou polimórficos (heterozigostos e homozigotos).

Observou-se que os pacientes selvagens para o polimorfismo Val12Met tiveram tendência a uma pior sobrevida (sobrevida mediana de 14,1 meses) em relação aos pacientes polimórficos (sobrevida mediana não atingida; $P=0,089$ – Teste de Log-rank, Figura 14).

Figura 14: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço classificados de acordo com a presença do polimorfismo Val12Met.

Já os pacientes selvagens para o polimorfismo Gly141Lys tiveram tendência a uma pior sobrevida (sobrevida mediana de 15,8 meses) em relação aos pacientes polimórficos (sobrevida mediana de 25,6 meses; $P = 0,16$ – Teste de Log-rank); enquanto não houve correlação entre a presença do polimorfismo Val417Ile e sobrevida, conforme mostram as figuras 15 e 16.

Figura 15: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço classificados de acordo com a presença do polimorfismo Gly141Lys.

Figura 16: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço classificados de acordo com a presença do polimorfismo Val417Ile.

DISCUSSÃO

De acordo com o nosso estudo não encontramos correlação entre os polimorfismos Gly141Lys, Val12Met e Gly126stop do gene ABCG2 e Val417Ile, Ser789Phe e Ala1450Thr do gene ABCC2 e resposta à quimioterapia com cisplatina.

Todas as frequências gênicas encontradas neste estudo estavam em equilíbrio de Hardy – Weinberg, porém chamou a atenção o fato das frequências do Val12Met e Gly141Lys (10% e 16%, respectivamente) estarem bem abaixo das descritas na literatura em indivíduos normais japoneses (35% e 50%) e mais próxima a de pacientes de câncer de pulmão caucasianos (8% e 28%) (Kobayashi *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2009).

Para o gene ABCG2 encontramos somente um paciente com o polimorfismo Gly126stop, frequência que está de acordo com a literatura em indivíduos normais sem câncer da população japonesa (Kobayashi *et al.*, 2005; Hirouchi *et al.*, 2004). Apesar de ser pouco freqüente (aproximadamente 1%), achamos que polimorfismo Gly126stop merece um estudo numa população maior, uma vez que este alelo produz um códon de parada, gerando uma proteína truncada podendo diminuir a quantidade da proteína na célula, resultando em hipersensibilidade de células normais para agentes anti-câncer (Sugimoto *et al.*, 2005). Acreditamos ser importante o estudo deste polimorfismo, apesar da baixa frequência, visto o impacto que esta alteração pode ter na proteína, além de não haver nenhum relato na literatura sobre essa frequência na população brasileira e poucos trabalhos da população em geral, sendo a maioria deles de origem japonesa.

Quanto ao polimorfismo Val12Met do gene ABCG2, acreditamos que a significância estatística não foi atingida, talvez, devido ao pouco número de polimórficos (n=7) em relação aos pacientes selvagens (n=61), pois 6 dos 7 (85,7%) pacientes Val12Met responderam ao tratamento enquanto no grupo selvagem apenas 35 dos 61 (57,3%) pacientes responderam ao tratamento (p=0,23). Quanto à curva de sobrevida, nenhum dos pacientes polimórficos desta análise morreu, enquanto o grupo selvagem teve sobrevida mediana de 18,7 meses (p=0,084, log rank). Mizuarai e colaboradores (2007) mostraram que a presença desta alteração resultou em aumento do acúmulo de droga *in vitro* e perda de resistência celular para um grande número de drogas, entre eles o topotecam, doxorrubicina, mitoxantrone e vincristina. Eles também mostraram a perda da localização na membrana em células LLC-PK1 transfectadas com cDNA carregando esta mutação. Por outro lado, não foi encontrada relação entre a presença do Val12Met e resistência às drogas SN38, SN35 e SN 398 (análogos de camptotecina) em linhagens de células Flp-In transfectadas com este polimorfismo (Tamura *et al.*, 2007).

Em relação ao polimorfismo Gly141Lys, encontramos uma tendência de menor sobrevida dos pacientes com genótipo selvagens (sobrevida mediana de 15,8 meses) comparado aos pacientes que possuem este polimorfismo (sobrevida mediana não atingida, p = 0,13, Log Rank); dados estes que vão de acordo com Muller e colaboradores de 2009, que também não conseguiu correlacionar a presença do polimorfismo com resposta ao tratamento, mas observou menor sobrevida dos pacientes selvagens em

relação aos polimórficos em pacientes com câncer de pulmão de pequenas e não – pequenas células com tratamento a base de platina.

O fato dos pacientes que possuíam polimorfismos que provocam déficit de função no ABCG2 não apresentarem melhor resposta ao tratamento, mas terem maior sobrevida que os pacientes com a variante normal deste gene, em nosso estudo, indica que o gene pode estar envolvido em outros processos da célula tumoral além do efluxo de drogas. Este gene é muito expresso em uma grande variedade de células – tronco, podendo ter importância na manutenção de indiferenciação de células progenitoras, por expelir da célula o fator de indução de diferenciação DIF-1 (Zhou *et al.*, 2001). Além disso, a sua alta atividade está diretamente relacionada à sobrevivência celular em situação de hipóxia devido a sua capacidade de exportar da célula agentes tóxicos, entre eles a heme – porfirina, que em grande quantidade gera radicais livres danosos ao DNA (Krishnamurthy *et al.*, 2004 e Susanto *et al.*, 2008).

Um trabalho recente mostrou em linhagens celulares DU145 e A549 que a inibição do ABCG2 por RNA de interferência e inibidores químicos levava a inibição da proliferação celular. O mecanismo proposto foi o de que a supressão deste gene leva a parada celular na fase G0/G1, associado com uma diminuição da expressão de ciclina D3, aumento da expressão de p21 e aumento de número de células que entram em apoptose (Chen *et al.*, 2009).

Com base nestes dados da literatura, podemos especular que este gene não está associado apenas à resistência a drogas, mas também a

processos celulares importantes para a sobrevivência das células tumorais, sendo necessários mais estudos funcionais para elucidar estes processos.

Para o gene ABCC2, não encontramos pacientes com os polimorfismos Ser789Phe e Ala1470Ala já o Val417Ile foi mais frequente neste grupo (38%) em relação às populações, sem câncer, de origem japonesa (10,9%) e judia (22,7%) (Wada *et al.*, 2006).

Não encontramos relação com resposta ao tratamento e nem com sobrevida para o SNP Val417Ile. Resultados similares aos de Hirouchi *et al.* (2004), que não encontrou efeito funcional deste polimorfismo na proteína, e de Sun *et al.* (2009) que não encontrou correlação entre a presença desta alteração e resposta à quimioterapia a base de platina em pacientes com câncer de pulmão de células não – pequenas. Fujita *et al.* (2008) mostrou que em pacientes com câncer colorretal metastático tratados com irinotecam tiveram uma menor curva tempo – concentração quando possuíam o alelo alterado, tendo maior resistência a esta droga. Não há um consenso na literatura quanto ao papel deste polimorfismo no resultado final da ação protéica e na resistência aos fármacos; o fato dele se localizar na porção transmembrânica da proteína, região mais associada à especificidade do substrato do que com a atividade transportadora, não fornece qualquer informação de como esta alteração possa modular a eficiência da proteína, indicando que ele provavelmente não exerça influência na resistência de drogas.

Resumindo, nosso trabalho foi o primeiro a correlacionar estes polimorfismos em genes codificadores de transportadores de cisplatina com

resposta ao tratamento em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Embora não tenhamos encontrado nenhuma correlação significativa, achamos que dos polimorfismos estudados, Val12Met e Gly141Lys e o gene ABCG2 merecem ser melhor estudados.

REFERÊNCIAS

Abraham, J; Earl, HM; Pharoah, PD; Caldas, C. **Pharmacogenetics of Cancer Chemotherapy**. Biochimica et Biophysica Acta. 2006 1766: 168-183

Bailey-Dell, KJ; Hassel, B; Doyle, LA; Ross, DD. **Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporters G2) gene**. Biochimica et Biophysica Acta. 2001 1520: 234-241.

Borst, P; Evers, R; Kool, M; Wijnholds, J. **The multidrug resistance protein family**. Biochim Biophys Acta. 1999 1461(2):347-57.

Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. **Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity**. Anticancer Agents Med Chem. 2007 Jan;7(1):3-18

Chen Z, Liu F, Ren Q, Zhao Q, Ren H, Lu S, Zhang L, Han Z. **Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation**. Int J Cancer. 2009 Jul 29

Ding X, Wu J, Jiang C. **ABCG2: A potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy**. Life science. 2010; 86: 631-637.

Gerk PM, Vore M. **Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition.** J Pharmacol Exp Ther. 2002 Aug;302(2):407-15.

Giaccone G. **Clinical perspectives on platinum resistance.** Drugs. 2000;59 Suppl 4:9-17; discussion 37-8.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. **Cancer statistics.** Cancer J Clin. 2001 Jan-Feb;51(1):15-36.

Fujita K, Nagashima F, Yamamoto W, Endo H, Sunakawa Y, Yamashita K, Ishida H, Mizuno K, Matsunaga M, Araki K, Tanaka R, Ichikawa W, Miya T, Narabayashi M, Akiyama Y, Kawara K, Ando Y, Sasaki Y. **Association of ATP-binding cassette, sub-family C, number 2 (ABCC2) genotype with pharmacokinetics of irinotecan in Japanese patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFIRI).** Biol Pharm Bull. 2008; 11: 2137-42.

Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund W, Kroemer HK, Warzok RW, Cascorbi I. **Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex.** Pharmacogenomics J. 2007 Feb;7(1):56-65.

Hesselink DA, van Hest RM, Mathot RA, Bonthuis F, Weimar W, de Bruin RW, van Gelder T. **Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2.** Am J Transplant. 2005 May;5(5):987-94.

Hirouchi M, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Ieiri I, Ohtsubo K, Sugiyama Y. **Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2.** Pharm Res. 2004 May;21(5):742-8.

Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Miki Y, Sugimoto Y. **C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance.** Mol Cancer Ther. 2002 Jun;1(8):611-6.

Ito, K; Suzuki, H; Horie, S; Sugiyama, Y. **Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport.** Pharm. Res. 2005 (10):1559-77.

Johnson SW, Stevenson JP, O'Dwyer PJ. **Cisplatin and its analogues.** Cancer, Principles and Practice of Oncology. 2001(6): 376-380.

Jonker, JW; Buitelaar, M; Wagenaar, E; van der Valk, MA; Scheffer, GL; Scheper, RJ; Plosh, T; Kuipers, F; Elferink, RP; Rosing, H; Beijin, JH; Schinkel, AH. **The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyrin.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 99(24):15649-54.

Kage, K; Tsukahara, S; Asada, S; Ishikawa, E; Tsuruo, T; Sugimoto, Y. **Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization.** Int J Cancer. 2002 97(5):626-30.

Kartalou M, Essigmann JM. **Mechanisms of resistance to cisplatin.** Mutat Res. 2001 Jul 1;478(1-2):23-43.

Keppler D, Leier I, Jedlitschky G. **Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2.** Biol Chem. 1997 Aug;378(8):787-91.

Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, Takane H, Maegawa S, Kigawa J, Suzuki H, Nanba E, Oshimura M, Terakawa N, Otsubo K, Mine K, Sugiyama Y. **Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta.** Drug Metab Dispos. 2005 Jan;33(1):94-101.

Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. **Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance.** Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 6;1461(2):377-94.

Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. **The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme.** J Biol Chem. 2004 Jun 4; 279(23):24218-25.

Krishnamurthy P, Schuetz JD. **Role of ABCG2/bcrp in Biology and Medicine.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2006; 46: 381-410.

Lindpaintner, K. **The impact of pharmacogenetics and pharmacogenomics on drug discovery.** Nature Reviews. Drug Discovery. 2002; 1:463-9.

Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. **Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2.** Int J Cancer. 2004 Mar 20;109(2):238-46.

Meyer zu Schwabedissen HE, Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C, Cascorbi I, Kroemer HK. **Variable expression of**

MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. Drug Metab Dispos. 2005 Jul;33(7):896-904.

Müller PJ, Dally H, Klappenecker CN, Edler L, Jäger B, Gerst M, Spiegelhalder B, Tuengerthal S, Ficsher JR, Drings P, Bartsch H, Risch A. **Polymorphism in ABCG2, ABCC3 and CNT1 genes and their possible impact on chemotherapy outcome of lung cancer patients.** Int. J. Cancer 2009; 124: 1669-1674.

Peyrone, M. Ann Chem. Pharm., 1845, 51: 1.

Piccirillo JF, Feinstein AR. **Clinical symptoms and comorbidity: significance for the prognostic classification of cancer.** Cancer. 1996 Mar 1;77(5):834-42.

Rabik, CA; Dolan, ME. **Molecular mechanism of resistance and toxicity associated with platinating agents.** Cancer Treatment Reviews. 2007 33: 9-23.

Robert J, Morvan VL, Smith D, Pourquier P, Bonnet J. **Predicting drug response and toxicity based on gene polymorphisms.** Crit Rev Oncol Hematol. 2005 Jun;54(3):171-196

Rosenberg, B; VanCamp, L; Trosko, JE; Mansour, VH. **Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents.** Nature. 1969 222(191): 385-386.

Sun N, Sun X, Chen B, Cheng H, Feng J, Cheng L, Lu Z. **MRP2 and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer.** Cancer Chemother Pharmacol. 2009 Jul 1. [Epub ahead of print]

Susanto J, Lin YH, Chen YN, Shen CR, Yan YT, Tsai ST, Chen CH, Shen CN. **Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells.** PLoS One. 2008;3(12):e4023.

Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Wijffels K, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, van Krieken JH. **Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer.** J Pathol. 2001 Jul;194(3):298-302.

Tamura A, Wakabayashi K, Onishi Y, Takeda M, Ikegami Y, Sawada S, Tsuji M, Matsuda Y, Ishikawa T. **Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2.** Cancer Sci. 2007 Feb;98(2):231-9.

Taniguchi S, Mochida Y, Uchiumi T, Tahira T, Hayashi K, Takagi K, Shimada M, Maehara Y, Kuwano H, Kono S, Nakano H, Kuwano M, Wada M. **Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in the colon.** Mol Cancer Ther. 2003 Dec;2(12):1351-9.

Wada M. **Single nucleotide polymorphism in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response.** Cancer Letters 2004; 234: 40-50.

Young AM, Allen CE, Audus KL. **Efflux transporters of the human placenta.** Adv Drug Deliv Rev. 2003 Jan 21;55(1):125-32.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. **The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype.** Nat Med. 2001 Sep;7(9):1028-34.

ANEXOS

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/06/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0246/08**, intitulado: "**DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES ABCC2 E ABCG2 COMO FATOR PREDITIVO DE RESPOSTA AO TRATAMENTO COM CISPLATINA EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO**" apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Miriam Hatsue Honda Federico**

Pesquisador (a) Executante: **Bruno Ferencz Papp Cadima**

CAPPesq, 05 de Junho de 2008

Ciente,
p/ S
Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador da Pós-Graduação
Área de Oncologia
FMUSP

Eduardo Massad
Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br