

# VARIANTES GENÉTICAS DA DIHIDROPIRIMIDINA DESIDROGENASE HUMANA (DPYD) NA PREDIÇÃO DE MUCOSITE ORAL EM PACIENTES ONCOLÓGICOS TRATADOS COM A FLUOROPYRIMIDINA 5- FLUOROURACIL

Darlen cardoso de CARVALHO

CARVALHO, Darlen cardoso de. **Variantes genéticas da dihidropirimidina desidrogenase humana (dpyd) na predição de mucosite oral em pacientes oncológicos tratados com a fluoropirimidina 5-fluorouracil.** Projeto de investigação científica, do Curso de Odontologia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2021.

O objetivo desta pesquisa foi investigar a associação de variantes polimórficas do gene *DPYD* (rs55886062; rs67376798; rs17116806) e a ocorrência da Mucosite Oral (MO) em pacientes oncológicos tratados com a fluoropirimidina 5-FU. Poucos estudos na literatura investigam a influência de variantes genéticas da *DPYD* na predisposição da MO em populações miscigenadas, como a da população do Norte do Brasil. Portanto estudos que descrevam o perfil molecular nessa população, a fim de ajudar no desenvolvimento de marcadores prognóstico para a MO, são relevantes, por criarem bases de dados capazes de justificar a elaboração de protocolos

específicos, que podem orientar a seleção dos métodos de prevenção adequados para controlar a MO em populações de alto risco, além de melhorar a qualidade de vida do paciente pela diminuição das complicações decorrentes da MO, aumentando, portanto, a eficácia terapêutica, e ocasionando a redução no custo do tratamento, tanto para o paciente, quanto para o sistema único de saúde (SUS) pela diminuição das internações decorrentes dos efeitos adversos a terapias decorrentes de 5-FU. O câncer é um grande problema de saúde mundial, responsável pela quarta causa de morte de pessoas com até 70 anos de idade. As neoplasias gastrointestinais incluem os cânceres de colorretal, esôfago, estômago, vesícula biliar, fígado, pâncreas, apêndice e ânus, que, juntos, são reprováveis por mais de 4,5 milhões de mortes por ano no mundo (SIEGEL *et al.*, 2020). O câncer gástrico é o quinto mais frequente no mundo, com mais de 1 milhão de novos casos estimados anualmente. Globalmente é a terceira causa mais comum de morte por câncer, com 784.000 somente em 2018 (BRAY *et al.*, 2018; OMS/WHO, 2018). O câncer colorretal é a terceira neoplasia maligna mais comum e a terceira causa de morte por câncer no mundo (JEMAL *et al.*, 2011). As fluoropirimidinas são quimioterápicos

utilizados amplamente no tratamento de tumores sólidos, como o câncer colorretal e de estômago, e envolve o fármaco 5-FU e seu pró-fármacos orais capecitabina e tegafur. A cada ano, mais de dois milhões de pacientes recebem tratamento com fluoropirimidinas em todo o mundo (MATSUSAKA & LENZ, 2015; MEULENDIJKS *et al.*, 2015; LUNENBURG *et al.*, 2020). O 5-FU é um análogo das pirimidinas uracila e timina, é metabolizado pelas mesmas vias metabólicas. O principal mecanismo de ação do 5-FU é a inibição da timidilato sintase (TYMS), uma enzima importante na duplicação e transcrição do DNA, por meio da sua conversão em monofosfato de fluoro-desoxiuridina (FdUMP). Outros dois mecanismos de ação envolvem a incorporação de dois metabólitos do 5-FU ao DNA e RNA, como o trifosfato de fluoro-desoxiuridina (FdUTP) e o trifosfato de fluorouridina (FUTP). O mecanismo de ação do 5-FU pode diferir de acordo com o mecanismo de administração, comumente na clínica é administrado na forma de injeção em bolus com leucovorina (formil tetra-hidrofolato) ou em infusão contínua. Evidências apontam que o tratamento em bolus favorece o dano ao RNA e o tratamento contínuo favorece o dano ao DNA (SOBRERO *et al.*, 1997; HUMENIUK *et al.*,

2009; WANG *et al.*, 2014). A 5-FU é utilizada em combinação com outros fármacos para aumentar sua eficácia, frequentemente é administrada em regimes quimioterápicos com a oxaliplatina (conhecido como FOLFOX) e irinotecano (FOLFIRI) (BEHERA *et al.*, 2009; PETERS *et al.*, 2009; KARASAWA *et al.*, 2009). As toxicidades graves (Grau  $\geq 3$ ) relacionadas no uso de 5-FU variam em torno de 30-35% e incluem principalmente diarreia, síndrome mão-pé, mucosite e mielossupressão. Para cerca de 1% dos pacientes, as toxicidades são fatais (ROSMARIN *et al.*, 2015). A mucosite é um efeito colateral comum de 5-FU, ocorrendo em 20 a 40% dos pacientes submetidos à quimioterapia convencional e em 80% daqueles submetidos ao tratamento com altas doses, e se manifesta como vômito, diarreia e esofagite (LALLA *et al.*, 2014). O tratamento com 5-FU leva aos casos mais graves da mucosite oral (MO), podendo chegar a atingir 90% dos pacientes após administração com o referido fármaco. A administração em bolus do agente também mostra maior toxicidade do que a infusão contínua (SAINI *et al.*, 2003; PALAPPALLIL *et al.*, 2011). Estudos experimentais sugerem que o 5-FU contribui para as características histopatológicas da MO, como a inibição da síntese de

DNA, intensificação de apoptose, diminuição de caderina-E nas células epiteliais, amplificação de sinais pró-inflamatórias, além de facilitar a transmigração de neutrófilos através das camadas epiteliais (SOBUE *et al.*, 2018). A enzima DPD, que é codificada pelo gene *DPYD* (dihidropirimidina desidrogenase humana), é responsável pela eliminação de aproximadamente 80% da dose administrada de 5-FU. A deficiência da enzima DPD, devido a variações genéticas na *DPYD*, tem se mostrado altamente preditivo de toxicidade induzida pela fluoropirimidina, incluindo a MO (VAN KUILENBURG, 2004; LUNENBURG *et al.*, 2020). O gene *DPYD* está localizado no cromossomo 1p21.3, tem 26 exons, abrangendo aproximadamente 900 kb. A enzima DPD é responsável por converter entre 80-85% da 5-FU em metabólitos inativos (DIASIO *et al.*, 1988; HARRIS *et al.*, 1991; MATSUSAKA & LENZ, 2015). A atividade reduzida da DPD leva a um acúmulo tóxico de 5-FU nos pacientes e se manifesta como toxicidades graves e algumas vezes fatais (ROSMARIN *et al.*, 2015). A deficiência da atividade da DPD pode resultar de variações alélicas dentro do gene *DPYD*. Estão descritas na literatura mais de 2.190 variantes diferentes da desse gene. O efeito clínico para a

maioria dessas variantes genéticas na atividade da DPD ainda não está completamente estabelecido e a dimensão do efeito pode diferir entre as diferentes variantes do gene (LUNENBURG *et al.*, 2020). A literatura relata diferenças étnicas na resposta ao 5-FU, em relação tanto à toxicidade quanto à eficácia. A taxa de resposta e de sobrevida global varia em pacientes americanos de origem europeia e africana. Esses últimos apresentam pior resposta ao tratamento com o quimioterápico (JESSUP *et al.*, 2005; SANOFF *et al.*, 2009). As taxas de toxicidade também podem variar em diferentes grupos populacionais. Pacientes asiáticos experimentam taxas mais elevadas de toxicidades hematológicas grave e fatal, em comparação com pacientes caucasianos, afro-americanos e hispânicos (HAN *et al.*, 2011). A frequência das variantes da *DPYD* varia em diferentes populações, a população caucasiana, por exemplo, tem aproximadamente 3 a 5% de deficiente da enzima DPD, enquanto a população afro-americanos tem deficiência da DPD de aproximadamente 8% (ELRAIYAH *et al.*, 2017). Poucos estudos na literatura relatam a frequência dessas variantes em populações miscigenadas com as brasileiras, assim como os seus efeitos clínicos (SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2018;

FERNANDES *et al.*, 2021). Agência reguladora de fármacos dos EUA, *Food and Drug Administration* (FDA), adicionou declarações nas bulas do medicamento 5-FU que alertam contra o grave potencial de toxicidade em pacientes com deficiência de DPD. O Consórcio de implementação de farmacogenética clínica (CPIC) estabelece algumas variantes não funcionais da *DPYD* como principais e recomenda o uso de medicamentos alternativos ou a redução (em 50%) de a dose padrão de fluoropirimidinas para pacientes que possuem deficiência da DPD, sendo eles homocigoto ou heterocigoto para essas variantes. Entre as principais variantes estão a c.1679T>G (rs55886062, *DPYD* \*13, p.I560S) e c.2846A>T (rs67376798, p.D949V) (GENTILE *et al.*, 2016; AMSTUTZ *et al.*, 2018; HENRICKS *et al.*, 2018). O trabalho de Offer e colaboradores (2013) estudou a conversão de 5 FU no metabólito 5-di-hidrofluorouracil. A presença da variante *DPYD* \*13 (rs55886062) mostrou uma redução de 75% da atividade da enzima DPD em relação ao tipo selvagem. O genótipo G foi associado à diminuição da atividade da *DPYD* quando testado com 5-FU em comparação com o genótipo T. Em uma meta-análise o alelo *DPYD* \*13 (rs55886062) foi associado a um risco

significativamente aumentado de grau 3 ou mais de toxicidade geral, toxicidade gastrointestinal e toxicidade hematológica (MEULENDIJKS *et al.*, 2015). A variante c.2846A>T (rs67376798) foi associado a uma redução de 59% da enzima DPD. Essa variante também foi associada em vários estudos a toxicidade relacionado ao uso de 5-FU (TERRAZZINO *et al.*, 2013; OFFER *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2014; MEULENDIJKS *et al.*, 2015). Uma variante C>A (rs17116806) incomum do gene *DPYD* foi investigada em um estudo de associação de todo o genoma (GWAS) em 221 pacientes europeus com câncer colorretal que haviam sido tratados com 5-FU, isoladamente ou em combinação com oxaliplatina (FOLFOX). Nesse estudo, o alelo A não foi associado à toxicidade medicamentosa ao 5-FU em comparação com o alelo C (FERNANDEZ-ROZADILLA *et al.*, 2013). No entanto, não está claro se esses resultados podem ser aplicados a populações miscigenadas, como a população da região Norte do Brasil. Um estudo de susceptibilidade genética em populações miscigenadas da Amazônia brasileira relatou que o polimorfismo rs17116806 do gene *DPYD* foi associado a um menor risco de desenvolvimento de cânceres gastrointestinais (DE CASTRO *et al.*, 2020). O



estudo proposto tem caráter transversal, descritivo e quantitativo. As amostras foram obtidas quando os pacientes eram atendidos para tirar sangue para acompanhamento de análises de sua patologia. A participação foi voluntária e prévia à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foi obtida aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Hospital João de Barros Barreto e pelo Hospital Ophir Loyola. O desenvolvimento do estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital João de Barros Barreto (protocolo número 231.244/2013) e pelo Hospital Ophir Loyola (298.994/2013). A amostra foi composta por 216 amostras de DNA de pacientes com câncer gastrointestinal (gástrico e colorretal), cujo sangue e DNA genômico foram previamente obtidos, para realizar projetos de pesquisa sobre o mesmo assunto. Todos os participantes do estudo receberam tratamento quimioterápico à base de 5-FU nos esquemas terapêuticos FOLFIRI, FOLFOX ou 5-FU sozinho ou associado à leucovorina. A via de administração dos medicamentos foi através de bolus, infusão ou via oral. Os dados de toxicidade foram coletados dos prontuários dos pacientes e classificadas de acordo com *NCI Common Toxicity*

*Criteria* versão 4.0 (CTCAE). O material genético foi extraído de amostras de sangue periférico dos pacientes, utilizando o Kit comercial *Biopur Kit de Extração Mini Spin Plus – 250* (Biopur, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante e quantificadas utilizando o espectrofotometro NanoDrop 1000 (*Termo Scientific NanoDrop 1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE*). A análise molecular dos polimorfismos foi realizada por meio do sistema *TaqMan®* (*Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA*), de acordo com o protocolo do fabricante. O princípio *TaqMan* utiliza uma sonda fluorescente para possibilitar a detecção de um produto específico da PCR conforme esse se acumula durante os ciclos da reação. Para tanto foi utilizado o equipamento 7500 *Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). A análise da ancestralidade genética foi realizada usando um painel de 61 *Ancestry Informative Markers* (AIM), conforme descrito por SANTOS *et al.*, 2010; e RAMOS *et al.*, 2016. As proporções individuais de ancestrais europeus, africanos e ameríndios foram estimadas usando o *software* STRUCTURE v2.3.3, assumindo três populações parentais (europeias, africanas e ameríndias). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa

SPSS V.25.0. Foram considerados significativos *p-value* inferiores ou igual a 0,05. Dos 216 pacientes investigados, 92 (42,6%) foram diagnosticados com câncer gástrico e 124 (57,4%) com câncer colorretal. Foi evidenciada uma distribuição similar entre os gêneros, com 112 homens (51,8%) e 104 mulheres (48,2%). A média de idade entre os pacientes foi de 54 anos. Em relação à distribuição da ascendência genômica dos pacientes, observou-se que a composição étnica foi de 48% Europeu, 31% Ameríndio e 21% Africano. Os dois tipos de tumores investigados foram analisados em conjunto devido à similaridade na conduta terapêutica (esquema envolvendo fluoropirimidinas). A maioria dos pacientes envolvidos possuíam estadiamento tumoral avançado grau III (42,6%) e grau IV (39,8%). Todos receberam 5-FU, isoladamente (7,4%) ou em associação com outros fármacos, sendo o esquema de tratamento mais frequente: 5-FU combinado a leucovorin (41,2%), seguido por FOLFOX (40,3%) e FOLFIRI (11,1%). A via de administração da quimioterapia mais incidente ocorreu por bolus, em quase 70% dos pacientes. O perfil do tipo de tratamento aplicado foi em sua maioria do tipo adjuvante 125 (57,9%). Durante o tratamento, 50 pacientes (23, 1%) apresentaram MO. Observou-se que 23 (10,6%)

vieram a óbito, dos quais três casos foram relacionados à toxicidade quimioterápica e 13 à progressão tumoral, isoladamente. Houve quatro pacientes que apresentaram combinação de toxicidade e progressão da doença resultando no óbito. E ainda, outros três pacientes tiveram óbito por outras causas, não relacionadas ao câncer. A maior parte dos pacientes com MO era do gênero feminino (52%), tinha câncer colorretal (66%) e apresentava estadiamento avançado do tumor, grau IV (40%). A média de idade entre os pacientes com MO foi de 54,3 anos e a maioria recebeu o esquema terapêutico FOLFOX (40%). Entre os pacientes com MO, 14% vieram a óbito. Em todas essas análises, não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ). Em relação aos dados genéticos, as análises não evidenciaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos de pacientes para as variantes rs55886062 e rs67376798 do gene *DPYP* entre os pacientes com e sem MO ( $P>0,05$ ). As frequências alélicas nos grupos de pacientes que apresentaram e não apresentaram MO foram, respectivamente: C= 0,67/0,52 e A= 0,33/0,48. Os pacientes que apresentavam o genótipo CC obtiveram um risco de 2,3 maior de desenvolver MO em relação aos que

tinham outros genótipos (OR = 2,272; IC 95% = 1,175 – 4,393; P = 0,015). Foi averiguado que a maioria dos pacientes com MO apresentavam estadiamento avançado do tumor e 14% tiveram desfecho clínico desfavorável. Os resultados sugerem que o genótipo CC da variante rs17116806 do gene *DPYD* pode desempenhar um papel clínico importante no risco de ocorrência de MO em pacientes portadores de câncer gastrointestinal em tratamento com o quimioterápico 5-FU. Este trabalho contribui para um melhor entendimento dessa variante no que diz respeito ao tratamento com fluoropirimidinas na população miscigenada amazônica brasileira.

## REFERÊNCIAS

AMSTUTZ, U. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther.* 103(2):210-216. 2018.

BEHERA, R.K. *et al.* Expression profiling of nucleotide metabolism-related genes in human breast cancer cells after treatment with 5-fluorouracil. *Cancer Invest.* 27(5):561-7. 2009.

BRAY, F. *et al.* GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68: 394-424. 2018.

DE CASTRO, A. *et al.* Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing and transporter genes, and the risk of gastric and colorectal cancer in an admixed population from the Brazilian Amazon. *American journal of translational research*, 12(10), 6626–6636. 2020.

DIASIO, R.B. *et al.* Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest.*81:47–51. 1988.

ELRAIYAH, T. *et al.* Novel Deleterious Dihydropyrimidine Dehydrogenase Variants May Contribute to 5-Fluorouracil Sensitivity in an East African Population. *Clin Pharmacol Ther.* 101(3):382-390. 2017.

FERNANDES, M.R. *et al.* Genetic Diversity of Drug-Related Genes in Native Americans of the Brazilian Amazon. *Pharmgenomics Pers Med.* 22; 14:117-133. 2021.

FERNANDEZ-ROZADILLA, C. *et al.* Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX

administration. *The pharmacogenomics journal*. 13,3; 209: 17. 2013.

GENTILE, G. *et al.* Genotype-phenotype correlations in 5-fluorouracil metabolism: A candidate DPYD haplotype to improve toxicity prediction. *Pharmacogenomics J*. 16(4):320–325. 2016.

HAN, H.S. *et al.* Racial differences in acute toxicities of neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in patients with early-stage breast cancer. *Eur J Cancer*. 47:2537–45. 2011.

HARRIS, B.E. *et al.* Severe 5-fluorouracil toxicity secondary to dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. A potentially more common pharmacogenetic syndrome. *Cancer*. 68:499–501. 1991.

HENRICKS, L.M. *et al.* DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. *Lancet Oncol*. 19(11):1459–1467. 2018.

HUMENIUK, R. *et al.* Decreased levels of UMP kinase as a mechanism of fluoropyrimidine resistance. *Mol Cancer Ther*. 8(5):1037-44. 2009.

JEMAL, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2):69-90. 2011.

JESSUP, J.M. *et al.* Adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: implications of race/ethnicity, age, and differentiation. *JAMA*. 294(21):2703-11. 2005.

KARASAWA, H. *et al.* Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Sci*. 100(5):903-13. 2009.

LALLA, R.V. *et al.* Mucositis Guidelines Leadership Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 120(10):1453-61. 2014.

LEE, A.M. *et al.* DPYD variants as predictors of 5-fluorouracil toxicity in adjuvant colon cancer treatment (NCCTG N0147). *J Natl Cancer Inst*. 106(12):dju298. 2014.

LUNENBURG, C.A.T.C. *et al.* Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene-drug interaction of DPYD and fluoropyrimidines. *Eur J Hum Genet*. 28(4):508-517. 2020.



MATSUSAKA, S. *et al.* Pharmacogenomics of fluorouracil-based chemotherapy toxicity. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 11(5): 811-821. 2015.

MEULENDIJKS, D. *et al.* Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. Lancet Oncol. 16(16):1639-50. 2015.

OFFER, S.M. *et al.* Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. Cancer Res. 74(9):2545-54. 2014.

OMS/WHO. Estimated age-standardized incidence rates (world) in 2018, stomach, both sexes, all ages. 2018.

PALAPPALLIL, D.S. *et al.* Comparative study of the toxicity of 5-fluorouracil-adriamycin-cyclophosphamide versus adriamycin-cyclophosphamide followed by paclitaxel in carcinoma breast. Indian J Cancer. 48(1):68–73. 2011.

PETERS, E.J. *et al.* Association of thymidylate synthase variants with 5-fluorouracil cytotoxicity. Pharmacogenet Genomics. 19(5):399-401. 2009.

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

ROSMARIN, D. *et al.* A candidate gene study of capecitabine-related toxicity in colorectal cancer identifies new toxicity variants at DPYD and a putative role for ENOSF1 rather than TYMS. *Gut*, 64(1), 111-120. 2015.

SAINI, A. *et al.* Twelve weeks of protracted venous infusion of fluorouracil (5-FU) is as effective as 6 months of bolus 5-FU and folinic acid as adjuvant treatment in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 88(12):1859–1865. 2003.

SANOFF, H.K. *et al.* Racial differences in advanced colorectal cancer outcomes and pharmacogenetics: a subgroup analysis of a large randomized clinical trial. *J Clin Oncol*. 27(25):4109-15. 2009.

SANTOS, N.P. *et al.* Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48 – Insertion-Deletion. *Hum Mutat*. 31(2):184-90. 2010.  
SIEGEL, R.L. *et al.* Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 70(1):7–30. 2020.

SOBRERO, A. F. *et al.* Fluorouracil in colorectal cancer--a tale of two drugs: implications for biochemical modulation. *J Clin Oncol*. 15(1):368-81. 1997.

SOBUE, T. *et al.* A. Chemotherapy-induced oral mucositis and associated infections in a novel organotypic model. *Mol Oral Microbiol.* 33(3):212-223. 2018.

SUAREZ-KURTZ, G. Pharmacogenetic testing in oncology: a Brazilian perspective. *Clinics (Sao Paulo, Brazil).* 73(suppl 1):e565s. 2018.

TERRAZZINO, S. *et al.* DPYD IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 14(11):1255-72. 2013.

VAN KUILENBURG, A.B. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer.* 40(7):939-50. 2004.

WANG, W *et al.* Recent studies of 5- fluorouracil resistance in pancreatic câncer. *World journal of gastroenterology,* 20(42):15682-15690. 2014.