

FARMACOGENOMA DO FLUOROURACIL. ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DA DIIDROPIRIMIDINA DESIDROGENASE

MÉRCIA PANDOLFO¹
ROGÉRIO AGENOR ARAÚJO²
LORRAINE NASCIMENTO³
LUÍZ RICARDO GOULART⁴.

1. Mestre, Farmacêutica Bioquímica, Laboratório de Genética Molecular, Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Campus de Umuarama, Uberlândia, MG.
2. Mestre, Médico do Hospital do Câncer, UFU.
3. Bióloga, Estagiária do Laboratório de Genética e Bioquímica, UFU.
4. Professor Doutor, Instituto de Genética e Bioquímica, UFU.

Autor responsável M. Pandolfo E-mail: merciap@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O 5-fluorouracil (5-FU), um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia do câncer (DIASIO & HARRIS, 1989), é um antimetabólito que interfere na duplicação e transcrição do DNA. Embora o mecanismo de ação desse fármaco ainda não ter sido completamente elucidado é provável que seja pela ligação do fluorodeoxiribonucleotídeo monofosfatado (FdUMP), um metabólito da droga à timidilato sintetase,

inativando-a, portanto, impedindo a síntese das timinas e consequentemente a síntese do DNA.

Um segundo mecanismo é a incorporação de outro metabólito da droga, o Furd, ao RNA mensageiro no momento de sua transcrição, no lugar da uracila, formando, assim, um falso RNA. A biotransformação do 5-FU em β -alanina fluorinada resulta em sua excreção do organismo. Cerca de 70-80% desta biotransformação é realizada pela diidropirimidina desidrogenase (Dpd) a β -alanina fluorinada (WOODCOCK et al, 1980).

A Dpd é a primeira enzima dos três passos da via metabólica das bases pirimidinas, sua ausência inviabiliza a metabolização das timinas e uracilas. A completa deficiência de atividade da Dpd também está associada à toxicidade ao 5-FU. Tuchman e colaboradores (1985) foram os primeiros a descreverem um paciente com grave toxicidade ao 5-FU associada à desordem no metabolismo das pirimidinas.

A incidência de parcial ou completa deficiência da Dpd tem sido estudada por vários autores (LU & ZHANG, 1993; RIDGE et al, 1998a; ETIENNE et al, 1994). A base molecular da timinauracilúria foi determinada ao se estudar o fenótipo e o genótipo da família de um paciente que não mostrou atividade da Dpd. Neste estudo os RNAm de fibroblastos do paciente e de 4 membros da família foram submetidos a RT-PCR usando iniciadores de reação gerados a partir da seqüência do cDNA do DPYD humano, no paciente, o RNAm do gene DPYD tinha 165 nucleotídeos a menos, resultante da perda de um exon.

Os pais se mostraram heterozigotos para esta deleção e um irmão só possuía transcrito normal (MEINSMA et al, 1995). A substituição de G!A no sítio doador de *splicing* levou a deleção completa do exon 14 (165 pb) do gene DPYD (IVS14+1G-A), em famílias não relacionadas e que possuíam pacientes de câncer com deficiência de Dpd e que haviam apresentado grave toxicidade ao tratamento com 5-FU (WEI et al, 1996).

Inúmeras mutações já foram descritas para este gene desde seu sequenciamento. Grupos étnicos diferentes apresentam prevalências diferenciadas destas mutações (VAN KUILENBURG et al, 1999) que causam danos diferenciados na atividade da enzima e somente a IVS14+1G-A está confirmada como base molecular para toxicidade ao 5-FU (RIDGE et al, 1998b; VREKEN et al, 1997).

Acredita-se que o maior sítio para o metabolismo do 5-FU seja o fígado (HO, 1986). No entanto, o risco de um procedimento invasivo para medir a atividade da Dpd não é justificado. Alguns estudos já demonstraram que as células mononucleadas do sangue podem ser usadas como um marcador da atividade da Dpd hepática (LU et al, 1993; CHAZAL et al, 1996), mas, estudos para determinar a atividade da Dpd são trabalhosos e muito caros não sendo recomendados para aplicação em larga escala (MILANO et al, 1999).

Este ensaio teve como objetivo determinar a frequência alélica da mutação IVS14+1G-A em indivíduos sãos e em pacientes portadores de câncer, a fim de mostrar que esta mutação pode ser um mecanismo comum de deficiência da Dpd e da toxicidade exacerbada em pacientes de câncer tratados com 5-FU utilizando uma técnica simples e de baixo custo.

Casística e métodos

Pacientes

Em um estudo de coorte realizado, no período de janeiro a junho de 2001, investigou-se a presença de polimorfismo genético para enzima Dpd em 70 pacientes previamente diagnosticados como portadores de neoplasias (58 portadores de câncer de mama e 12 portadores de câncer gastrointestinal) assistidos pelo serviço ambulatorial do Hospital do Câncer da Universidade Federal de Uberlândia.

Todos os indivíduos não eram relacionados entre si e residiam nas regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, em Minas Gerais, Brasil. A aprovação ética deste estudo foi obtida pelo comitê de ética local da Universidade Federal de Uberlândia e as amostras foram coletadas mediante

consentimento informado de todos indivíduos (Anexo I), independente do estágio da doença e tempo de tratamento.

Grupo controle

Participaram do grupo controle 70 indivíduos não portadores de câncer, cujas amostras sanguíneas foram obtidas de maneira randômica no ato da coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina em um laboratório de análises clínicas da cidade.

Isolamento do DNA de sangue periférico

O DNA foi obtido, a partir de células mononucleadas de sangue periférico pelo método de extração de DNA descrito por Sambrook (1989) com modificações (Anexo II). O DNA extraído foi diluído em água ultrapura e sua qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 0.8%, corado com brometo de etídio. Os DNA foram armazenados a -80°C.

Genotipagem do polimorfismo

O fragmento genômico de 409 pb contendo o exon 14 foi amplificado por meio da PCR. Os *primers* utilizados "flanqueam" a região intrônica que contém a seqüência consenso AG e GT doadora de *splicing* foram o DPDGF 5'TGCAATATGTGAGGAGGGACC3' e DPDGR 5'CAGCAAAGCAACTGGCAGA-TTC3'. A reação de amplificação do fragmento ocorreu em um volume final de 50 µl contendo Tampão da Taq DNA polimerase 10X (200 mM Tis-HCl (pH 8.3) e 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador de reação, 200 µM de cada dioxinucleotídeo trifosfato, 1,5 unidades de Taq polimerase (Invitrogen) e 500 ng de DNA genômico como molde. Depois da desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos a amplificação ocorreu em 30 ciclos de 94°C para desnaturação por 40 segundos, 62°C por 40 segundos para anelamento dos primers e 72°C por 1 minuto para extensão. Os produtos foram submetidos a 72°C por 10 minutos para extensão final. O produto da PCR foi separado em gel de agarose a 1,2% e corado com brometo de etídio.

O polimorfismo da Dpd foi identificado por LIS-SSCP (MARUYA et al, 1996) adicionando-se 2 microlitros da amplificação a 10µl de solução LIS (10% of sacarose, 0.01% de azul de bromofenol e 0.01% of xileno cianol FF), esta mistura foi incubada a 97°C por 10 min e imediatamente resfriada e aplicada em um gel de poliacrilamida (numa razão de 49 de acrilamida:1 de bisacrilamida) a 8% com 300V por 7 horas a 4°C, usando tampão TBE 1X (45mM Tris-borato/ 1 mM EDTA).

Os padrões eletroforéticos SSCP no gel foram detectados após coloração com prata (Anexo III). Para determinar o padrão de cada alelo, as amostras foram submetidas à restrição enzimática em 20 µl reação contendo tampão NE 1X (10mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotretol pH70), 1 µl produto amplificado pela PCR e 3U da endonuclease *HpyCH4* (Biolabs), um isoesquisômero da *MaeI* (A-CGT). A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas. A endonuclease *HpyCH4* reconhece o sítio A-CGT e promove a restrição do fragmento gerando um de 238 pb e outro de 131 pb. A troca de G-A leva a perda deste sítio de restrição. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Resultados

Análise LIS-SSCP para mutações no exon 14. O produto resultante da amplificação da região genômica contendo o exon 14 foi desnaturado em tampão de LIS e imediatamente aplicado em gel de poliacrilamida. As fitas foram separadas pela desnaturação e durante a corrida assumiram 03 padrões

distintos conforme as diferentes conformações geradas de acordo com sua composição de nucleotídeos.

Fitas de igual composição migram na mesma velocidade ocupando a mesma posição no gel, já fitas com outras composições assumem conformações diferentes, portanto, migram de maneiras distintas, assumindo posições também distintas no gel (Figura 1). O padrão desenvolvido pela grande maioria dos indivíduos analisados (137), era do tipo homozigoto para o alelo G na posição IVS14, confirmado pela RFLP.

O segundo padrão apareceu em 2 indivíduos, que se mostraram heterozigotos para o alelo IVS14+1G-A na RFLP. Um terceiro padrão (Figura 1B, coluna 3) foi desenvolvido apenas em 01 indivíduo no grupo controle, porém, na RFLP se mostrou do tipo IVS14GG o que sugere se tratar de outra mutação no mesmo fragmento. Nenhum alelo IVS14+1A foi encontrado entre os indivíduos não portadores de tumores.

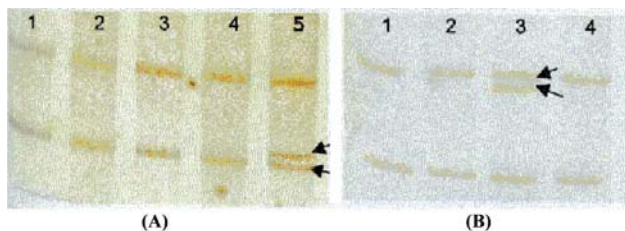


Figura 1. Análise por PCR-LISS-SSCP do grupo de alelos do gene DPYD. (A) colunas de 1-4 amostras homozigotas para o alelo IVS14G, coluna 5 amostra heterozigota para o alelo IVS14A. (B) colunas 1,2, e 4 amostras homozigotas para o alelo IVS14G, coluna 5 amostra com nova mutação.

Análise RFLP da mutação IVS14+1G-A. O fragmento de 409 pb amplificado resultante da PCR contendo IVS14+1G-A tem um único sítio de restrição para enzima HpyCH4 IV (A-CGT) o qual produz dois fragmentos, um de 278 pb e outro de 131 pb no alelo do tipo selvagem. Este sítio é eliminado quando a substituição G para A no sítio doador de splicing ocorre (Figura 2). A RFLP foi empregada com a finalidade de determinar a correspondência entre os padrões de corrida no LIS-SSCP com os genótipos para IVS14+1G-A.

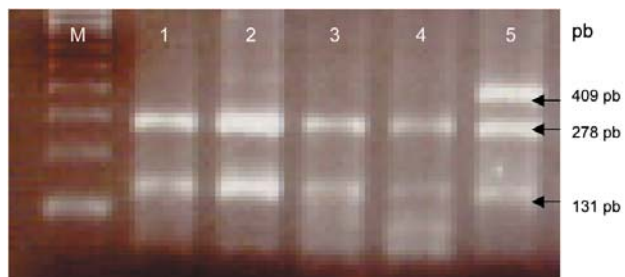


Figura 2. Análises RFLP para grupo de alelos do gene DPYD, coluna M contém marcador de 100-pb (GIBCO BRL), colunas de 1-4 amostras homozigotas selvagens, coluna 5 amostra heterozigota mutante para mutação IVS14+1G-A.

Após análise dos 70 pacientes, 2 (2,8%) deles se mostraram heterozigotos para a mutação IVS14+1G-A sendo os demais homozigotos selvagens. Entre os indivíduos sadios não foi encontrado nenhum alelo para a mutação IVS14+1G-A. As duas pacientes heterozigóticas para a mutação IVS14+1G-A eram portadoras de neoplasia mamária, nenhum alelo mutante foi encontrado entre os portadores de câncer do trato gastrointestinal.

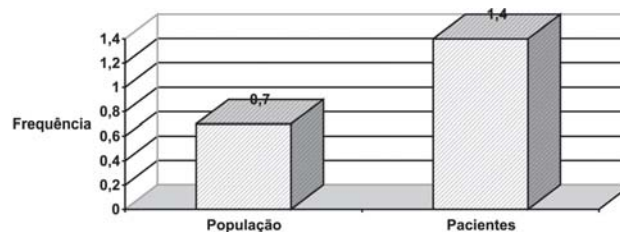


Figura 3. Frequência do alelo IVS14+1G-A na população (controle + pacientes) e entre pacientes portadores de câncer (mama + gastrointestinal).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A mutação de ponto G-A na sequência conservada do sítio doador de splicing foi indicada como a mais comum (52%) entre os pacientes com completa deficiência de Dpd (VAN KUILENBURG et al, 1999). Triagens para presença da substituição G-A no sítio doador de splicing revelou diferenças étnicas (Tabela 1).

Tabela 1. Diferenças étnicas na prevalência do alelo IVS14+1G-A.

População	Frequência alelo IVS14A	Nº de alelos	autores
Alemães	1,8%	2.714	Van Kuilenburg (2000)
Finlandeses	2,2%	90	Wei (1996)
Tailandeses	2,7%	72	Wei (1996)
Ingleses	Nenhum alelo	60	Wei (1996)
Japoneses	Nenhum alelo	70	Wei (1996)
Afro-americanos	Nenhum alelo	40	Wei (1996)
Brasileiros	0,7%	280	Este estudo

Analisando separadamente a frequência alélica entre pacientes e indivíduos sadios, nota-se que ela foi diferente entre os dois grupos, porém, esta diferença não se mostrou significativa ($p > 0,05$), mas, num ensaio realizado por Lu e colaboradores (1998) quando foram analisadas as atividades enzimáticas da Dpd entre pacientes com câncer e a população normal, encontrou-se que entre os pacientes a atividade da Dpd foi menor que a encontrada entre os indivíduos sadios, encontrou ainda que entre os pacientes com câncer de mama a atividade da Dpd era menor que em pacientes com câncer de colorretal.

Curiosamente, no presente estudo a prevalência do alelo IVS14A, que implica em menor atividade da Dpd, foi maior nos pacientes com câncer de mama do que em pacientes com câncer do trato gastrointestinal, embora este dado seja de baixo valor significativo, devido ao pequeno número de indivíduos contidos na amostragem. Existe correlação entre os genótipos da IVS14+1G-A e a atividade da Dpd no organismo, o homozigoto selvagem apresenta maior atividade que homozigoto mutante e o heterozigoto apresenta atividade intermediária (WEI et al, 1996).

Num ensaio onde foi avaliada a atividade enzimática da Dpd, Lu e colaboradores (1998) encontraram que entre os pacientes a atividade foi menor que entre os indivíduos sadios. Nesse mesmo estudo Lu e colaboradores encontraram nos pacientes com câncer de mama menor atividade da Dpd do que em pacientes com câncer de colorretal.

Não estão claras as razões para as diferenças genotípicas e fenotípicas entre os indivíduos sadios e doentes, muitos

fatores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo podem colaborar com a variabilidade da atividade enzimática num organismo. Por isso, estudos futuros em que se avalie a ação do genótipo e esta atividade nestes três grupos de indivíduos poderia ser útil para elucidar esta lacuna.

A maior parte dos estudos de prevalência da IVS14+1G-A foram realizados, através da técnica de Restrição Enzimática (RFLP), utilizando a enzima de restrição *Maell*, que é muito cara, o que inviabiliza uma triagem entre todos os pacientes com câncer para esta mutação antes de iniciar o tratamento, neste estudo duas alternativas mais econômicas foram desenvolvidas com o intuito de minimizar os custos.

A primeira delas foi à substituição da endonuclease *Maell* pela *HpyCH4 IV*, que é seu isoesquisômero cujo custo é 75% inferior ao da *Maell*. Outra alternativa que se mostrou econômica foi o uso da técnica LIS-SSCP que se mostrou eficiente para detectar esta mutação a um custo ainda menor que o obtido com a substituição da endonuclease *Maell* pela *HpyCH4 IV* na RFLP.

Usando esta metodologia de genotipagem para mutação G-A, foi demonstrado que existe uma frequência relativamente alta do alelo mutante 0,7% na população brasileira. Qual seria, então, a importância desta mutação na vida das pessoas? Considerando outros distúrbios metabólicos como a fenilcetonúria, que ocorre em um a cada 20.000 indivíduos e é, hoje, uma preocupação de saúde pública no Brasil ou ainda mais, se considerar a morbidade decorrente da completa deficiência desta enzima em pacientes em tratamento com 5-FU e o corrente uso desta droga nos tratamentos de neoplasias, parece que uma triagem genética para esta mutação dos pacientes antes do tratamento com 5-FU pode ser útil na prevenção de grave e às vezes letal toxicidade relacionada ao 5-FU (VAN KULENBRUG et al, 2001) em pacientes heterozigotos e homozigotos para a mutação IVS14+1G-A.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS:

- CHAZAL, M, ETIENNE, M.C., RENEE, N. BOURGEON, A., RICHELME, H., MILANO, G. Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. *Clin. Cancer Res.* v.2, p.507-510, 1996.
- DIASIO, R.B., HARRIS, B.E. Clinical pharmacology of 5-FU. *Clinical Pharmacokinetics.* v.16, p.215-237, 1989.
- ETIENNE, M.C., LAGRANGE, O., DASSONVILLE, R., FLEMING, A., THYSS, N., RENÉE, N., SCHNEIDER, M., DEMARD, F., MILANO, G. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J. Clin. Oncology.* v.12, p.2248-2253, 1994.
- HO, D.H., TOWNSEND, L., LUMA, M.A. And Bodely, G P. Distribuiding inhibition of dihydrogenase activities in human tissues using 5-fluorouracil as a substrate. *Anticancer Res.* v.6, p.781-784, 1986.
- LU, Z, ZHANG, R., DIASIO, R.B. Dihydropyrimidina dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res.*, v.53, p.5433-5438, 1993.
- LU, Z., ZHANG, R., CARPENTER, J.T., DIASIO, R.B. Decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity in a population of patients with breast cancer: implication for 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin. Cancer Research.* v.4, p.325-329, 1998.
- MARUYA, E., SAJI, H., YOKOYAMA, S. PCR-LIS-SSCP (low ionic strength single strand conformation polymorphism) – a single method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1, -DQB1, and -DPB1. *Genome Research*, v.6, p.51-57, 1996
- MEINSMA, R., FERNANDEZ-SALGUERO, P., VAN KUILENBURG, A.B.P., VAN GENNIP, A.H., GONZALEZ, F.J. Human polymorphism in drug metabolism: mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene results in exon skipping and thymine uraciluria. *DNA and Cell Biol.* v.14, n.1, p.1-6, 1995.
- MILANO, G., ETIENNE, M.C., PIERREFITE, V., BARBERI-HEYOB, M., DEPORT-FETY, R., RENÉE, N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *British J. Cancer.* v.79, p.627-630, 1999.
- RIDGE, A.S., SLUDDEN, J., BROWN, O., et al. Dihydropyrimidina dehydrogenase pharmacogenetics in Caucasian subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* v.46, p.151-156, 1998a.
- RIDGE, S.A., SLUDDEN, J., WEI, X., SAPONE, A., BROWN, O., CANNEY, P., FERNANDEZ-SALGUERO, P., GONZALEZ, F.J., CASSIDY AND MCLEOD, H.L. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in patients with colorectal cancer. *British J. Cancer.* v.77, n.3, p.497-500, 1998b.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning.* 2 ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, New York, USA, 1989.
- THUCMAN, M., STOECKELER, J.S., KIANG, D.T., O'DEA, R.F., RAMMARINE, M.L. Familial pyrimidine and pyrimidemia associated with severe fluorouracil toxicity. *N. Engl. J. Med.* v.313, p.245-249, 1985.
- VAN KUILENBURG, A.B.P., MULLER, E.W., HAASJES, J., MEINSMA, R., ZOETEKOUW, L., WATERHAM, H.R., BAAS, F., RICHEL, D.J., VAN GENNIP, A.H. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (Dpd) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing Dpd deficiency. *Clin. Cancer Research.* n.7, p.1149-1153, 2001.
- VAN KUILENBURG, A.B.P., VREKEN, P., ABELING, N.G.G.M., BAKKER, H.D., MEINSMA, R., VAN HOLOPAINEN, I., PULKKI, K., RIVA, D., BOTTEON, G., HOLME, E., TULLINIUS, M., KLEIJER, W.J., BEEMER, F.A., DURAN, M. and 7 others. Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Human Genet.* v.104, p.1-9, 1999.
- VREKEN, P., VAN KUILENBURG, A.B.P., MEINSMA, R., VAN GENNIP, A.H. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency: identification and expression of missense mutations C29R, R886H and R235W. *Human Genet.* v.101, p.333-338, 1997.
- WEI, X., MCLEOD, H.L., MCMURROUGH, J., GONZALEZ, F.J., FERNANDEZ-SALGUERO, P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J. Clin. Investig.* v.98, n.3, p.610-615, 1996.
- WOODCOCK, T.M., MARTIN, D.S., DAMIM, L.E.M., KEMENY, N.E., YOUNG C.W. Combination clinical trials with thymine and fluorouracil: a phase I and clinical pharmacologic evaluation. *Cancer.* v.45, p.1135-1143, 1980.