



# DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO GENÉTICO, RÁPIDO E ECONÔMICO PARA A DETECÇÃO DE VARIANTES DO GENE DA DIHIDROPIRIMIDINA DESIDROGENASE

**Palavras-Chave:** Gene DPYD, Polimorfismos genéticos, PCR Multiplex.

**Autores(as):**

Letícia Jan Abbade [FCF – UNICAMP]

Profa. Dra. Patricia Moriel [FCF – UNICAMP]

Prof. Dr. Eder de Carvalho Pincinato (orientador) [FCM – UNICAMP]

## INTRODUÇÃO:

Embora as fluoropirimidinas sejam fármacos antigos, sua eficácia e a falta de tratamentos melhores fazem com que ainda sejam amplamente utilizadas. Assim, continuam sendo a base para o tratamento quimioterápico de alguns tumores, como o câncer colorretal, e em outros tumores sólidos, como mama ou estômago.

Estima-se que mais de 30% dos pacientes tratados com fluoropirimidinas apresentam eventos adversos que podem variar de leves a fatais. Os mais comuns são diarreia, neutropenia e síndrome mão-pé (MIKHAIL, et al., 2010). As fluoropirimidinas são metabolizadas pela enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD) (UNIPROT, 2022). A DPD é codificada pelo gene dihidropirimidina desidrogenase (DPYD), e é expresso em muitos tecidos, principalmente no fígado (KNIFFIN, 2010). A DPD catalisa a reação que transforma reversivelmente as pirimidinas (incluindo as fluoropirimidinas) em dihidropirimidinas.

A deficiência desta enzima está associada a eventos adversos mais graves e frequentes em pacientes em uso de fluoroprimidinas (DIASIO, et al., 1994). Atualmente, existem diretrizes clínicas que recomendam analisar vários polimorfismos no gene da DPYD (AMSTUTZ, et al., 2018) e ajustar a dose ou alterar o tratamento para prevenir toxicidades graves em pacientes que apresentam algum deles (MEULENDIJKS, et al., 2015). A análise prévia do gene DPYD mostrou ser benéfica para os pacientes, reduzindo eventos adversos graves e mortes. Do ponto de vista financeiro, a triagem genética inicial dos pacientes não onera o serviço de saúde, pois ao evitar toxicidades, evitam-se custos de hospitalização, exames adicionais ou novos tratamentos, conforme diversos estudos de custo-efetividade (CORTEJOSO, et al., 2016; HENRICKS, et al., 2019). No entanto, estima-se que esses testes não sejam capazes de prever mais de 25% das toxicidades graves que ocorrerão (CORTEJOSO, et al., 2016).

A grande maioria dos hospitais não dispõe de tecnologia necessária para determinar a atividade

enzimática da DPD e, desta forma, é necessário melhorar a eficiência de predição da genotipagem de DPYD incorporando novas variantes que causem este déficit. Por sua vez, os avanços no estudo da farmacogenética da toxicidade da fluoropirimidina aumentaram o número dessas variantes no gene DPYD que devem ser identificadas antes da administração de fluoropirimidina a um paciente. Porém, a maioria dos testes disponíveis para a genotipagem do DPYD são realizados utilizando-se a técnica de PCR em tempo real associada à fluoróforos. Estas técnicas utilizam equipamentos e reagentes de alto custo, o que inviabilizam a sua implementação e ampla utilização em laboratórios que não possuem muitos recursos financeiros.

Por esta razão, neste projeto propomos o desenvolvimento de um método alternativo de genotipagem de variantes de DPYD que permita a detecção simples, rápida e econômica de pacientes em risco de toxicidade antes do início do tratamento com fluoropirimidinas e que possa ser adaptado a diferentes populações.

## **METODOLOGIA:**

Para atingir o objetivo, os polimorfismos do DPYD escolhidos para compor o método foram selecionados de acordo com a relevância clínica descrita no CPIC e PharmGKB, além de polimorfismos de maior frequência na população brasileira, de acordo com a ABraOM, sendo eles: c.1129–5923C>G (HapB3), c.190511G>A (\*2A), c.2846A>T, c.1679T>G (\*13), 557A>G. Os primers para estes polimorfismos foram desenhados utilizando-se o software SanpGene e seguiram a estratégia para o método de PCR-Alelo-específica.

As regiões genômicas dos polimorfismos foram amplificadas utilizando-se o termociclador MiniAmp Plus (Applied Biosystems, Waltham, MA USA 02451), utilizando-se uma reação multiplex para amplificação de 5 amplicons. A reação é composta por um volume final de 10 uL, contendo 5 uL of HotStartTaq Master Mix Kit (Qiagen), 1 uL de mix de primers A ou B (2 uM de cada primer), 2 uL de água livre de nucleases e 2 uL de DNA genômico (40 ng).

As condições do PCR são: um ciclo para ativação da Taq polimerase e desnaturação inicial de 95 °C por 15 segundos, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão de 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 minutos e um ciclo infinito a 4 °C. Os fragmentos de amplificação foram revelados em um gel de agarose a 2% ou gel de poliacrilamida a 15%, marcados com o corante Sybr Safe DNA (Invitrogen) e detectados por luz ultravioleta em um transiluminador (Loccus).

Para o desenvolvimento do método foram utilizadas amostras de DNA com genótipos conhecidos para as variantes do DPYD, determinados por RT-PCR utilizando-se sondas Taqman (ThermoFisher) para a genotipagem. Estas amostras de DNA estão armazenadas no bio-repositório do Laboratório CliPhar, do Curso de Farmácia – UNICAMP.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os polimorfismos escolhidos para compor o painel de variantes do DPYD para o desenvolvimento do PCR multiplex foram: c.190511G>A (\*2A); c.2846A>T (DP3); c.1679T>G (\*13); c.1129–5923C>G (HapB3); 557A>G e 2194G>A (\*6). Como citado anteriormente, os primers foram desenhados utilizando-se a estratégia PCR-AS. Nesta estratégia, o primer Wild-Type (WT) é complementar à sequência que inclui o SNP em sua extremidade 3', incluindo-se um erro no nucleotídeo anterior. Desta forma, apenas os genes que apresentam a sequência sem o polimorfismo se ligam na fita mãe, permitindo a ligação da Taq. Caso o gene seja polimórfico, os dois últimos nucleotídeos não se ligam na fita molde e a Taq não se liga ao complexo. O mesmo raciocínio é utilizado para o desenho do primer mutado (MUT). Caso os primers não sejam específicos, um novo erro pode ser introduzido no antepenúltimo nucleotídeo e assim por diante, aumentando a especificidade do primer (Ravichandran, 2022).

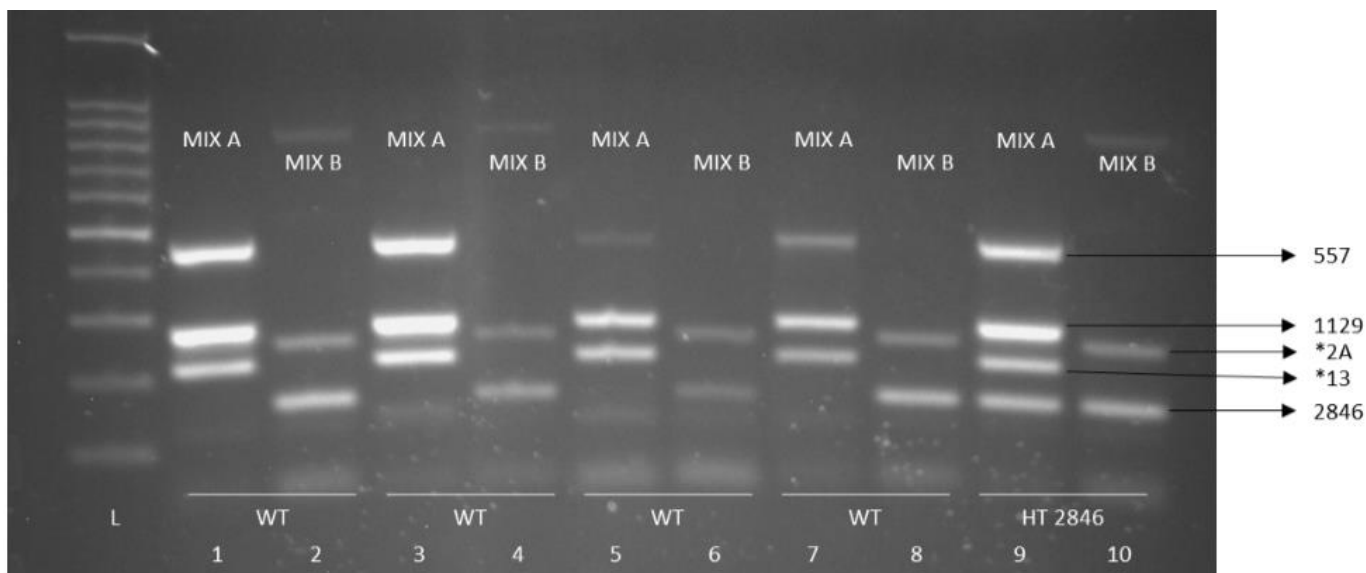
Inicialmente, os primers desenhados foram testados isoladamente, com o intuito de verificar a especificidade em amplificar as regiões gênicas corretamente. Posteriormente, os primers foram associados um a um para compor um mix de primers A e mix de primers B, conforme descritos na tabela 1.

**Tabela 1.** Composição do mix de primers para a realização do PCR multiplex.

Polimorfismos	Primer Mix A*	Primer Mix B*
c.557A>G	DP557-WT-MAS3 DP-7R2	DP557-MUT-MAS5 DP-7R2
c.1129–5923C>G	DP1129-WT-MAS3 DP1129-FM	DP1129-MUT-MAS4 DP1129-FM
*2A	DP2A-MUTc DP-E14-F	DP2A-WTc DP-E14-F
*13	DP-13-WT-AS DP-E13-R	DP13-MUT-AS DP-E13-R
c.2846A>T	DP-3-MUT-AS DP-E22-R	DP-3-WT-AS DP-E22-R

\* Cada primer possui uma concentração de 2 µM. Os primers estão apresentados em códigos, que foram utilizados internamente para organização do laboratório.

Diversos testes foram realizados, e após todas as alterações necessárias para ajustar a especificidade de todos os primers, foi possível realizar um PCR multiplex com 5 primers, como pode se observar na imagem abaixo.



**Figura 1:** Gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do PCR alelo específico multiplex de amostras controle homocigoto referência (WT) para todos os polimorfismos estudados (linhas 1 a 8) e um controle heterocigoto para o polimorfismo c.2846 (linhas 9 e 10). Os polimorfismos amplificados estão identificados pelos números e setas na imagem. Linha L= marcador de pares de base (100 pb). WT: wild-type, HT: heterocigoto.

Foram também realizadas análises de custos, comparando-se o padrão ouro, que é a genotipagem por RT-PCR utilizando-se sondas TaqMan e o teste PCR-AS multiplex desenvolvido neste projeto. O resultado destas análises indicou que o teste de PCR-AS é pelo menos 3 vezes mais barato quando comparado com RT-PCR.

## CONCLUSÕES:

De acordo com os resultados obtidos, os primers desenhados são específicos para a correta identificação do genótipo dos polimorfismos estudados.

Foi possível desenvolver um método simples, rápido e barato, capaz de identificar em duas reações de PCR, 5 diferentes polimorfismos para o DPYD. Este método é pelo menos 3 vezes mais barato do que o RT-PCR, utilizando-se as sondas de hidrólise TaqMan.

Sendo assim, é possível dizer que o desenvolvimento de um método genético, rápido e econômico para a detecção de variantes do gene da hidropirimidina desidrogenase foi concluído com sucesso e que pode ser utilizado pela grande maioria dos laboratórios de biologia molecular, o que poderá garantir uma menor ocorrência de eventos adversos em pacientes que realizam tratamento de tumores com fluoropirimidinas.

## BIBLIOGRAFIA

AMSTUTZ, U. et al. guideline for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing: 2017 update. *Clin Pharmacol Ther*, v. 103, n. 2, p. 210-6, 2018.

- CORTEJOSO, Lucía et al. Cost–effectiveness of screening for DPYD polymorphisms to prevent neutropenia in cancer patients treated with fluoropyrimidines. **Pharmacogenomics**, v. 17, n. 9, p. 979-984, 2016.
- DIASIO, R. B. et al. Determination of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in fibroblasts of a DPD deficient pediatric patient and family members using a polyclonal antibody to human DPD. **Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VIII**, p. 7-10, 1994.
- ETIENNE-GRIMALDI, Marie-Christine et al. New advances in DPYD genotype and risk of severe toxicity under capecitabine. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0175998, 2017.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, Xandra et al. Severe toxicity to capecitabine due to a new variant at a donor splicing site in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) gene. **Cancer Management and Research**, p. 4517-4522, 2018.
- HENRICKS, Linda M. et al. A cost analysis of upfront DPYD genotype–guided dose individualisation in fluoropyrimidine-based anticancer therapy. **European Journal of Cancer**, v. 107, p. 60-67, 2019.
- KNIFFIN, C.L. Dihydropyrimidine dehydrogenase. In: <https://www.omim.org/entry/612779?search=dpd&highlight=dpd>. Acesso em 13 de julho de 2023.
- MEULENDIJKS, Didier 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. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 16, p. 1639-1650, 2015.
- MIKHAIL, Sameh E.; SUN, Jun F.; MARSHALL, John L. Safety of capecitabine: a review. **Expert opinion on drug safety**, v. 9, n. 5, p. 831-841, 2010.
- RAVICHANDRAN, Lavanya et al. Allele-specific and multiplex PCR based tools for cost-effective and comprehensive genetic testing in Congenital Adrenal Hyperplasia. **MethodsX**, v. 9, p. 101748, 2022.
- UNIPROT. UniProtKB-Q12882 (DPYD\_HUMAN). In: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q12882>. Acesso em 10 de julho de 2023.
- WHIRL-CARRILLO, Michelle et al. An evidence-based framework for evaluating pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 110, n. 3, p. 563-572, 2021.