

ESTUDI FARMACOGENÈTIC DE LES VARIANTS DEL GEN *DPYD* RELACIONADES AMB EL METABOLISME DE LES FLUOROPYRIMIDINES EN MALALTS ONCOLÒGICS.

FLUOROPYRIMIDINES: MECANISME D'ACCIÓ, METABOLISME I TOXICITAT

Les fluoropyrimidines, que inclouen el 5-fluorouracil (5-FU) i els seus profàrmacs (capecitabina, tegafur) són compostos anticancerígens que actuen com antimetabòlits en les quimioteràpies de diversos tumors (mama, colorectal, pàncrees, etc). La seva estructura química és anàloga a la molècula d'uracil (U), base pirimidínica que forma part de l'ARN humà, amb la diferència de que incorpora un àtom de fluor a la posició 5 (figura 1).



Figura 1. Estructura química de la base nitrogenada a les molècules d'uracil (esquerra) i 5-fluorouracil (dreta).

L'acció antineoplàstica del fàrmac es basa en que les cèl·lules canceroses, amb una alta inestabilitat genètica, poden ser més receptives a les molècules anàlogues que imiten el compost natural que les cèl·lules normals, aportant una certa selectivitat a l'efecte citotòxic.

El 5-FU penetra en la cèl·lula utilitzant un transportador natural de l'uracil. Un cop dins, és transformat per diferents vies enzimàtiques en diversos metabòlits actius, responsables de l'efecte antineoplàstic. En última instància es produeix un dany de l'ADN i l'ARN, per la incorporació dels metabòlits actius a les molècules d'àcids nucleics durant el procés de síntesi, a més d'una depleció del nucleòtid deoxitimidina trifosfat (dTTP) que provoca una inhibició dels processos de síntesi i reparació de l'ADN.

Després de l'administració del fàrmac, només una petita fracció (1-5%) es transforma en els diferents compostos actius, mentre que, fins a un 80% de la dosi administrada és catabolitzada en metabòlits inactius. L'enzim dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), codificat per el gen *DPYD*, catalitza la reducció del 5'-FU a 5,6-dihidro-5-fluorouracil, el pas limitant en el procés de degradació. El catabolisme del 5-FU es realitza fonamentalment al fetge i en la mucosa gastrointestinal.

Catlab Informa

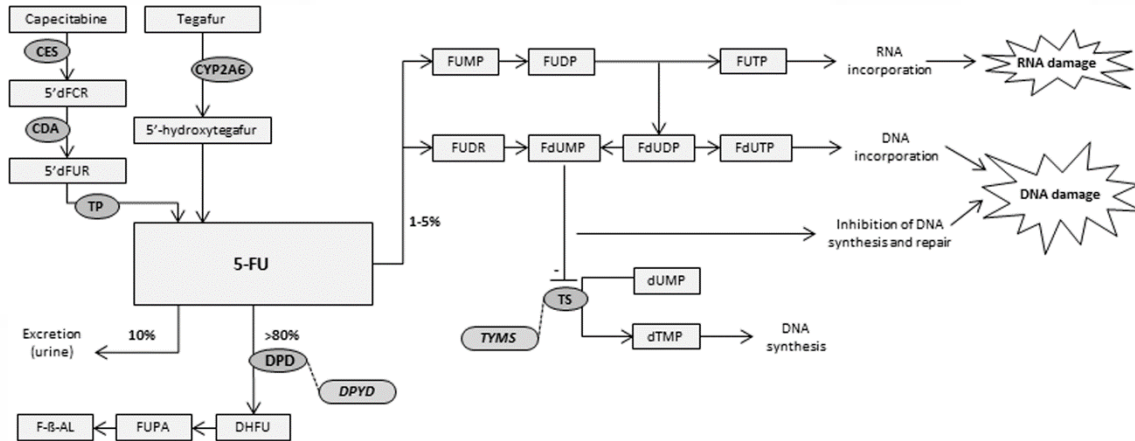


Figura 2. Representació esquemàtica del metabolisme de les fluoropirimidines. En resum: el 5-FU, el tegafur, y la capecitabina es metabolitzen en tres metabòlits principals. El FdUMP, que inhibeix la timidilat sintasa y evita la conversió del dUMP en dTMP, necessària per a la síntesis de pirimidines i ADN. El FdUTP s'incorpora a l'ADN, el FUTP se incorpora a l'ARN, i tots dos desencadenen la mort cel·lular.

CES: carboxilesterasa; CDA: citidina deaminasa; 5'dFCR: 5'-deoxi-5-fluorocitidina; 5'dFUR: 5'-deoxi-5-fluorouridina, 5-FU: 5-fluorouracilo, TP: timidina fosforilasa; DPD: dihidropirimidina deshidrogenasa; DHFU: 5,6-dihidrofluorouracilo, FUPA: fluoro-β-ureidopropionat, F-β-AL: fluoro-β-alanina; FUMP: fluorouridina monofosfat; FUDP: fluorouridina difosfat, FUTP fluorouridina trifosfat, FUDR: fluorodeoxiuridina, FdUMP: fluorodeoxiuridina monofosfat, FdUDP: fluorodeoxiuridina difosfat; FdUTP: fluorodeoxiuridina trifosfat; dUMP deoxiuridina monofosfat; dTMP: deoxitimidina monofosfat; TS: timidilat sintasa.

Obtingut de: Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene–drug interaction of DPYD and fluoropyrimidines

El balanç entre la proporció de metabòlits actius i els productes de degradació és clau per l'adequat funcionament del fàrmac. La presència de nivells circulants de 5-FU superiors al rang terapèutic poden provocar una major resposta, però també desencadenar una toxicitat severa, deguda a l'excés de metabòlits citotòxics. Una proporció dels pacients en tractament amb fluoropirimidines pateixen efectes adversos per aquesta causa, incloent diarrea, mucositis, aplàsia medul·lar i síndrome mà-peu. Entre un 0,5 i un 1% dels casos es pot arribar, inclús, a l'èxitus del pacient.

Entre tots el factors que afecten a la concentració de metabòlits actius, el més important és l'activitat de l'enzim DPD. Diferents estudis han mostrat que al voltant del 39-61% dels pacients que presenten toxicitat severa associada al tractament amb fluoropirimidines, presenten una activitat de DPD disminuïda, que és deguda, principalment, a variants genètiques en el gen que la codifica.

Catlab Informa

GEN *DPYD*. FARMACOGENÈTICA DEL METABOLISME DE FLUOROPIRIMIDINES.

El gen *DPYD* comprèn 950 Kb al cromosoma 1p22 amb 4399 nucleòtids en 23 exons, i és altament polimòrfic. Es coneixen nombroses variants genètiques en *DPYD* que alteren la seqüència de proteïnes o el processament de l'ARN missatger. Algunes d'aquestes variants no afecten a l'activitat de l'enzim DPD de manera clínicament rellevant, mentre que d'altres donen una funció enzimàtica disminuïda o nul·la. La detecció d'aquestes variants permet fer una predicció de l'activitat enzimàtica abans de començar el tractament, i d'aquesta forma, prevenir la majoria d'efectes adversos deguts a la deficiència de DPD.

Fins al moment, hi ha quatre polimorfismes genètics per als que existeixen estudis a llarg terme, que han demostrat el seu efecte sobre l'activitat enzimàtica i la seva utilitat clínica, i pels que existeixen recomanacions fermes per a la dosificació de fluoropirimidines. Aquestes variants son:

- c.1905+1G>A (rs3918290): Defineix l'al·lel *2A del gen i és la variant més estudiada. El canvi de base (G>A) en la regió de *splicing* de l'intró 14, provoca la supressió de l'exó 14, donant lloc a una deleció de 165 parells de bases en l'ARN missatger i, com a conseqüència, la producció d'una proteïna truncada que és degradada per el proteasoma i, per tant, una **pèrdua completa de l'activitat enzimàtica** associada a aquest al·lel.
- C.1679T>G (rs55886062): Defineix l'al·lel *13 del gen. El canvi de base (T>G) desencadena la substitució de l'aminoàcid leucina per un residu de serina a la posició 560 de la proteïna. Es tracta d'un canvi no conservatiu que provoca que la proteïna sintetitzada es **completament afuncional**, segurament degut a l'alteració de la seva estructura secundària.
- c.2846A>T (rs67376798): El canvi de base (A>T) desencadena la substitució de l'aminoàcid aspartat per un residu de valina a la posició 949 de la proteïna. Es tracta d'un canvi no conservatiu que genera una proteïna amb una **funcionalitat molt disminuïda**.
- c.1129 - 5923C>G: Defineix l'haplotip HapB3. Es tracta d'una variant intrònica que genera un lloc críptic de *splicing*, de forma que part del transcrit dóna lloc a una proteïna no funcional. El resultat és una **disminució de la quantitat d'enzim actiu** associat a aquest al·lel. La variant c.1236G>A es troba en complet desequilibri de lligament amb ella i per tant es pot estudiar en el seu lloc.

Tenint en compte l'anterior, consorcis científics especialitzats en farmacogenètica, com el *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) anglès o el *Dutch Pharmacogenetics Working Group* (DPWG) neerlandès, recomanen realitzar el càlcul d'una puntuació (*score*) que dóna una idea de la capacitat del pacient per a metabolitzar les fluoropirimidines, en funció de les variants trobades. A cada un dels dos al·lells del gen d'un

Catlab Informa

pacient se li assigna una puntuació, en funció de la capacitat de metabolització que aporta l'enzim produït a partir d'aquest al·lel (Taula 1).

TIPUS DE VARIANT	VARIANTS	PUNTUACIÓ
Sense variants que alterin la funció	-	1
Funció disminuïda	c.1129 - 5923C>G (<i>HapB3</i>) c.2846A>T	0,5
No funcional	c.1905+1G>A (*2A) c.1679T>G (*13)	0

Taula 1. Puntuació associada a l'al·lel en funció del tipus de variant segons les guies CPIC i DPWG

A partir d'aquestes puntuacions, es calcula un *score* global mitjançant la suma dels valors dels dos al·lells. En funció del *score* d'activitat es pot classificar als individus en tres categories diferents, d'acord amb la capacitat de metabolització predita a partir del genotip:

- Metabolitzadors normals (*score* = 2): Individus que no presenten cap de les variants.
- Metabolitzadors intermedis (*score* = 1-1,5): Individus portadors d'una o dues variants de funció reduïda o una sola variant associada amb pèrdua completa de funció.
- Metabolitzadors pobres (*score* = 0-0,5): Individus portadors d'una variant de pèrdua de funció, junt amb qualsevol altra variant.

Aquesta predicció permet realitzar una correcció de la dosi del fàrmac estàndard, en els pacients que presenten alguna variant associada a pèrdua de funció, de forma que els nivells de fàrmac actiu es mantinguin dins del rang terapèutic i, a la vegada, es redueixi la possibilitat d' efectes adversos greus.

Actualment les recomanacions del CPIC estableixen, per a metabolitzadors intermedis, una reducció de la dosi inicial al 50% de la dosi estàndard, independentment de la puntuació d'activitat (1 o 1,5). En metabolitzadors normals, no està indicat cap ajust de la dosi inicial, mentre que, en metabolitzadors pobres, es recomana utilitzar un tractament alternatiu, degut a l'elevat risc de toxicitat (veure taula 2). En aquests darrers, sempre que el *score* d'activitat no sigui 0, es podria considerar una reducció molt important de la dosi inicial del fàrmac (per sota del 25% de la dosi estàndard), sempre sota una vigilància clínica i farmacocinètica estricta.

Taula 2. Resum de les recomanacions del CPIC per a la dosificació de fluoropirimidines en funció del genotip de *DPYD*.

FENOTIP ESPERAT	COMBINACIONS DE VARIANTS	SCORE	DOSI INICIAL RECOMANADA
Metabolitzador normal	✓ No es detecten variants	2	Dosi estàndard
Metabolitzador intermedi	✓ Una o dues variants de funció parcial o ✓ Una variant no funcional	1 - 1,5	50% de la dosi estàndard
Metabolitzador pobre	✓ Una variant no funcional i una de funció parcial o ✓ Dues variants no funcionals	0 - 0,5	Tractament alternatiu

Catlab Informa

Malgrat la utilitat de l'estudi farmacogenètic, s'ha de tenir en compte que té una sèrie de limitacions:

- Els quatre canvis analitzats no són els únics que poden tenir efecte sobre l'activitat enzimàtica de la DPD. Múltiples variants genètiques menys conegudes s'estan estudiant actualment, i és probable que en un futur s'incloguin dins de les recomanacions.
- Els polimorfismes de *DPYD* no són l'únic factor que pot modificar el metabolisme de les fluoropirimidines. Variants en altres gen com *TYMS* o *MTHFR* també poden estar implicades, a més d'altres factors com el sexe i l'edat del pacient, o factors ambientals.

No obstant les limitacions mencionades, no existeixen dubtes sobre la utilitat de l'anàlisi. Valorant l'impacte d'aquesta pràctica sobre la seguretat del pacient i els costos associats als efectes adversos, les autoritats espanyoles, en una *Nota de Seguridad* amb data del 11 de maig de 2020, ja han establert recomanacions per a l'estudi farmacogenètic de *DPYD* previ a qualsevol tractament amb fluoropirimidines, i societats científiques internacionals, com la *European Society of Medical Oncology (ESMO)*, consideren que hauria de ser la norma assistencial (*Standard of care*).

L'ESTUDI FARMACOGENÈTIC DE *DPYD* A L'HOSPITAL UNIVERSITARI MÚTUA DE TERRASA - CATLAB

La implementació de l'estudi farmacogenètic del gen *DPYD* ha estat el resultat de la col·laboració estreta entre els serveis d'Oncologia i Farmàcia de l'Hospital Universitari Mútua de Terrasa i l'àrea de Genètica de Catlab.

Tots els pacients diagnosticats de tumors sòlids, però principalment càncer colorectal, càncer de mama i tumors neuroendocrins, són candidats potencials per al tractament amb fluoropirimidines en algun moment de la seva trajectòria terapèutica. Qualsevol inici de tractament amb una fluoropirimidina requereix actualment, el genotipat previ de *DPYD* per ajustar la dosi inicial i evitar així possibles toxicitats greus.

Les dosis de fluoropirimidines utilitzades a les diferents indicacions d'oncologia depenen de l'esquema prescrit pel clínic, que pot ser de tipus monoteràpia o bé en combinació amb altres agents quimioteràpics. El servei de Farmàcia realitza el càlcul de la dosi a priori, habitualment expressada en mg/m², en funció de la superfície corporal del pacient. Aquesta dosi teòrica de fluoropirimidina es modificarà en cas de detectar una alteració genètica que afecti a l'activitat de l'enzim DPD.

Una vegada realitzada l'extracció d'un tub de sang al pacient, la mostra es deriva a Catlab, per a la realització de l'estudi genètic. A l'àrea de genètica l'anàlisi de les quatre variants genètiques d'interès es realitza mitjançant una variant de la reacció en cadena de la polimerasa coneguda com *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)*.

Catlab Informa

El mètode emprat no requereix d'una extracció prèvia de l'ADN de la sang, com succeeix a la majoria d'estudis de genètica molecular, sinó que és suficient amb realitzar una lisi dels leucòcits de la sang, que produeix el lliurament del seu material genètic al medi.

La tècnica LAMP té la capacitat d'amplificar fragments específics d'ADN, permetent la detecció altament sensible de les seqüències diana. La reacció LAMP és isotèrmica, això vol dir que es realitza amb una sola temperatura, i constitueix un avantatge important sobre la PCR convencional. El sistema LAMP necessita d'una polimerasa que tingui una alta activitat de desplaçament, a més a més de la seva capacitat replicativa. Utilitza 6 encebadors, que identifiquen 8 regions diferents del gen, i incrementen l'especificitat de la tècnica. Aquesta tecnologia permet obtenir resultats dels diferents genotips amb un interval de temps no superior als 50 minuts.

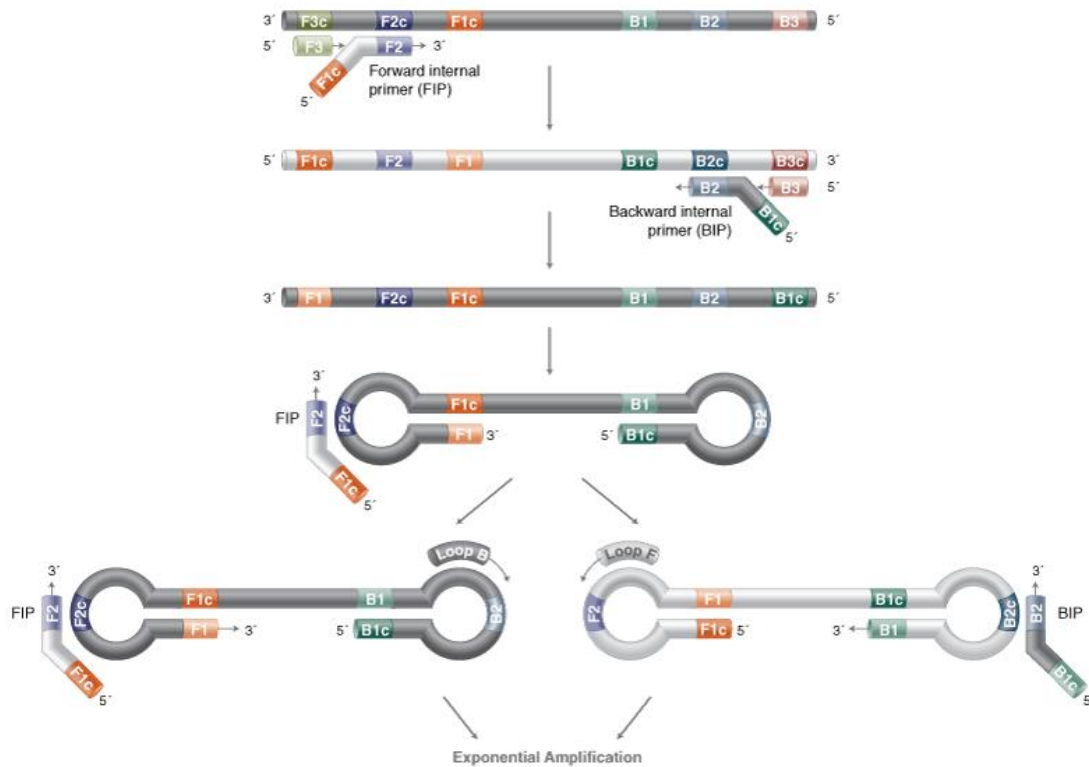


Figura 3. Representació esquemàtica del procés d'amplificació a una reacció LAMP.

Obtingut de: Loop-Mediated Isothermal Amplification | NEB. <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp>.

Per a cada una de les quatre posicions del gen analitzades, es realitza una reacció independent. Immediatament després de l'amplificació, la detecció de les variants es realitza mitjançant un anàlisi de corba de *melting* (dissociació). L'ADN amplificat es sotmet a un increment gradual de temperatura que provoca la separació dels dos brins. Aquesta separació es detecta mitjançant sondes fluorescentes que permeten distingir, a cada reacció, els al·lels amb una variant de pèrdua de funció de l'al·lel normal, per diferències en la temperatura de dissociació dels brins (figura 4).

Catlab Informa

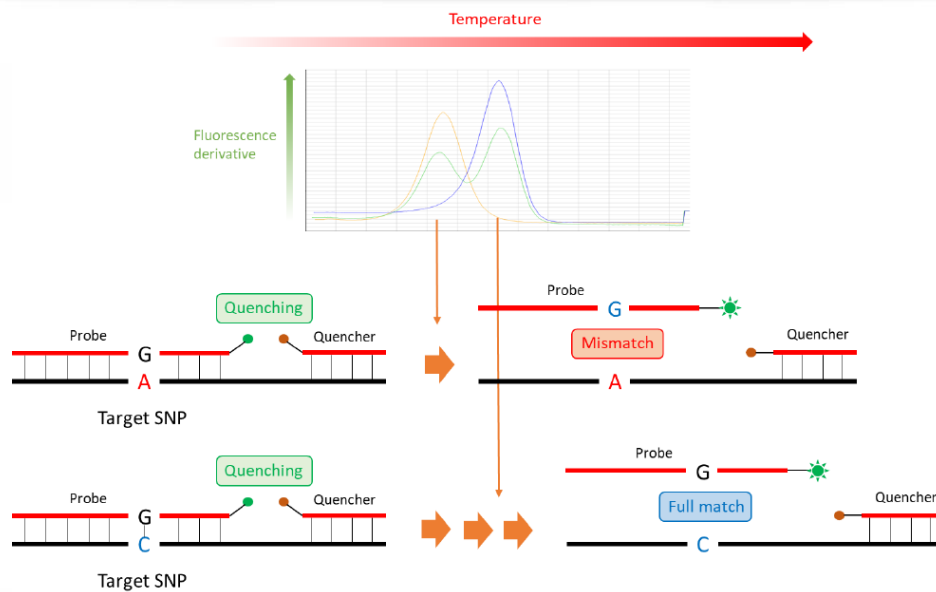


Figura 4. Detecció de dues variants diferents mitjançant anàlisi de corba de *melting*. Cada un dels dos pics a la gràfica superior correspon a un dels dos possibles nucleòtids detectats a la reacció (en colors, les corbes per a les diferents mostres).

Obtingut de: LaCAR MDx SA. Lamp Human DPD DeficiencyKit (4 Mutations). Instructions of use. v03.

Una vegada realitzada l'anàlisi es calcula la puntuació d'activitat per al pacient i s'elabora un informe, on s'indica la capacitat de metabolització predita i les recomanacions per a l'ajust de dosi segons el CPIC. Existeix un compromís per part de Catlab de donar un temps de resposta per a aquest informe no superior a una setmana.

En funció dels resultats de l'informe farmacogenètic, el servei de Farmàcia pot realitzar un ajust de la dosi de fluoropirimidines calculada, o inclús considerar l'ús d'un tractament alternatiu, si el risc de toxicitat fos molt alt (metabolitzadors pobres).

Malgrat l'anterior, és convenient realitzar un seguiment estret d'aquests tractaments, perquè la realització de l'estudi farmacogenètic no pot prevenir la toxicitat al 100 % dels casos, i pot ser necessari un ajust a posteriori. En casos particulars quan, malgrat un resultat farmacogenètic normal, existeix una elevada sospita de que el pacient no es troba dins del rang terapèutic, o presenta signes de toxicitat greu, es pot valorar l'anàlisi dels nivells plasmàtics del fàrmac.

La implementació de l'estudi farmacogenètic del gen *DPYD* a la rutina clínica de l'Hospital Universitari Mútua de Terrassa és un pas endavant en el tractament segur de pacients oncològics, que s'ha avançat a les darreres recomanacions nacionals al respecte i a una més que probable futura obligatorietat. La coordinació entre serveis i el breu temps de resposta garanteixen que es pugui realitzar un ajust de dosi guiat per genotip, abans de l'inici de qualsevol tractament amb fluoropirimidines i, d'aquesta manera, anticipar i evitar la majoria d'efectes adversos, que en ocasions poden suposar, inclús, un risc directe per a la vida del malalt. A més, aquesta pràctica pot suposar un gran estalvi en els costos causats per aquests episodis de toxicitat, com els derivats del tractament dels efectes secundaris i hospitalització.

Catlab Informa

Actualment, Catlab i l'Hospital Mútua de Terrassa treballen en la implementació de nous estudis farmacogenètics que milloren la seguretat dels pacients oncològics i la precisió dels tractaments utilitzats, apropant-nos cada vegada més a una medicina completament personalitzada.

Jordi Roigé

Genètica Catlab
jroige@catlab.cat

Carlos Lombardía

Genètica Catlab
clombardia@catlab.cat

Alba Manzaneque

Facultativa ajunta Farmàcia HUMT
amanzaneque@mutuaterrassa.cat

Lluís Cirera

Cap de servei Oncologia i Hematologia HUMT
lcirera@mutuaterrassa.es

BIBLIOGRAFIA

1. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**, 330–338 (2003).
2. Ezzeldin, H. & Diasio, R. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency, a Pharmacogenetic Syndrome Associated with Potentially Life-Threatening Toxicity Following 5-Fluorouracil Administration. *Clinical Colorectal Cancer* **4**, 181–189 (2004).
3. Henricks, L. M., Opdam, F. L., Beijnen, J. H., Cats, A. & Schellens, J. H. M. DPYD genotype-guided dose individualization to improve patient safety of fluoropyrimidine therapy: call for a drug label update. *Annals of Oncology* **28**, 2915–2922 (2017).
4. Amstutz, U. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin. Pharmacol. Ther.* **103**, 210–216 (2018).
5. Lunenburg, C. A. T. C. *et al.* Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene–drug interaction of DPYD and fluoropyrimidines. *European Journal of Human Genetics* **28**, 508–517 (2020).
6. CPIC® Guideline for Fluoropyrimidines and DPYD. <https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/>.
7. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Nota de Seguridad, ref. MUH (FV), 8/2020. Fluorouracilo, capecitabina, tegafur y flucitosina en pacientes con déficit de dihidropirimidina deshidrogenasa. (2020).