

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANDRÉS FERNANDO ANDRADE GALARZA**

**AValiação GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DA ENZIMA DIIDROPIRIMIDINA  
DESIDROGENASE (DPD) E RISCO DE TOXICIDADE COM O USO DE  
FLUOROPYRIMIDINAS.**

**Porto Alegre  
2016**

**ANDRÉS FERNANDO ANDRADE GALARZA**

**AVALIAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DA ENZIMA DIIDROPIRIMIDINA  
DESIDROGENASE (DPD) E RISCO DE TOXICIDADE COM O USO DE  
FLUOROPYRIMIDINAS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Área de atuação: Oncologia Clínica, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

*Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann*

**PORTO ALEGRE  
2016**

A meus queridos pais Fernando e Martha, que ainda na distância sempre ficaram presentes em todas as conquistas deste sonho.

À minha esposa, pela força no dia a dia, Catalina, por todo seu amor, pela espera e carinho nos dias mais difíceis, pela luta de perto e longe, que acreditou sempre neste sonho.

*Seu trabalho vai preencher boa parte de sua vida e a única maneira de ser verdadeiramente satisfeito é fazer o que acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é amar o que você faz.*  
*Steve Jobs.*

*O mundo fica nas mãos daqueles que têm coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos.*  
*Paulo Coelho.*

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento de um trabalho acadêmico com certeza não é resultado do esforço isolado de uma pessoa, mas sim, a parceria de muitas horas de trabalho cansativo e esforço diário, eu gostaria agradecer às pessoas que participaram e acreditaram neste trabalho.

Inicialmente, e quase sem palavras, tenho e devo agradecer a meu orientador, professor, modelo e amigo Doutor Gilberto Schwartzmann, quem há três anos acreditou num médico do Equador, para iniciar um desafio longe de casa, como foi o de preparar esta tese de doutorado. Tudo o que eu possa escrever e agradecer vai ser pequeno, diante dos conhecimentos, conselhos, aulas, pela força nos momentos difíceis. Simplesmente, é um ser maravilhoso com um coração gigante para ajudar, e um mestre para motivar na formação científica.

Também devo agradecer para o professor Rafael Linden, a professora Marina Venzon Antunes e todo o laboratório da farmacologia da Universidade FEEVALE em Novo Hamburgo, um grupo de trabalho incrível, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelas inovações e ideias para que o trabalho seja um sucesso, pelas horas intermináveis de análises das amostras, pelas correrias em desenvolver novos métodos de estudo, pela ajuda na apresentação do trabalho dos diferentes eventos, e na redação dos arquivos científicos. Este trabalho sem dúvida é de vocês.

Devo agradecer ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, aos colegas da zona 11 do Serviço da Oncologia, aos professores, médicos, residentes, pessoal da enfermagem, trabalho social, administrativo, pela ajuda diária no desenvolvimento deste projeto, mas, principalmente, aos pacientes, que na verdade são as estrelas neste trabalho de pesquisa. Sem eles e sua vontade nenhuma pesquisa teria sucesso. Apesar da sua doença, seu estado de saúde, acreditaram que este estudo poderia ser útil na prática clínica e para futuros pacientes.

Muito obrigado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela oportunidade de uma pessoa estrangeira poder ter a honra de ser um de seus alunos.

Finalmente, minha família, Pauli, Luciana, meus irmãos, sobrinhas, cunhadas, primas, amigos do Equador e meus amigos do Brasil, pela força para nunca desistir deste sonho. Obrigado, Brasil, obrigado Porto Alegre, lugares que são agora parte importante da minha vida.

## RESUMO

**Base teórica:** As fluoropirimidinas possuem significativa variabilidade na resposta terapêutica e na ocorrência de toxicidade, o que tem sido relacionado à deficiência na depuração metabólica mediada pela enzima diidropirimidina desidrogenase (DPD). Mutações nos genes codificadores da enzima, bem como fatores ambientais podem levar à baixa ou nula expressão enzimática, provocando efeitos adversos graves devido ao acúmulo destes fármacos. Até o presente, nenhum teste reconhecidamente válido para a identificação de indivíduos em risco de toxicidade severa está estabelecido na prática oncológica. A genotipagem para o gene *DPYD* apresenta poder preditivo limitado, pois é capaz de rastrear somente as mutações já conhecidas, que apresentam baixa frequência populacional. Por esta razão, ensaios funcionais baseados na avaliação da redução fisiológica do uracil (U) para diidrouracil (UH<sub>2</sub>), igualmente medida pela DPD, têm sido propostos na identificação de pacientes predispostos à toxicidade. Nesta abordagem são estimadas as razões plasmáticas [UH<sub>2</sub>]/[U] em níveis basais ou após uma dose oral do U. Recentemente, foi sugerida a realização do teste funcional em saliva como amostra alternativa ao plasma, com maior estabilidade dos analitos. Entretanto, a associação entre as razões metabólicas nesta matriz e a toxicidade não foi validada em amostras clínicas. **Objetivos:** Avaliar a efetividade dos métodos de determinação da razão metabólica [UH<sub>2</sub>]/[U] em plasma e saliva e a genotipagem para o gene *DPYD* como preditores de toxicidade por fluoropirimidinas em pacientes com neoplasias gastrointestinais. Adicionalmente, o trabalho propôs o desenvolvimento de um método bioanalítico para a determinação de U e UH<sub>2</sub> por cromatografia líquida de alta eficiência. **Métodos:** Foram obtidas amostras pareadas de plasma e saliva de 60 pacientes diagnosticados com neoplasia gastrointestinal e com indicação de tratamento com fluoropirimidinas. As concentrações de U e UH<sub>2</sub> foram determinadas nas duas matrizes através de LC-MS/MS. Os efeitos adversos do primeiro ciclo de quimioterapia foram classificados de acordo com o NCI-CTCAE versão 4. A genotipagem da *DYDP* foi realizada por PCR tempo real e incluiu os alelos \*2A; \*13, Y186C; I560S, \*7 Y186C. **Resultados:** 35% dos pacientes apresentaram toxicidade severa (graus 3/4), sendo a neutropenia a mais frequente (n=11). A genotipagem da *DYDP* não foi capaz de identificar pacientes em risco de toxicidade, uma vez que não foram encontrados portadores de alelos variáveis. As razões [UH<sub>2</sub>]/[U] variaram amplamente entre os pacientes, de 0,09 a

26,73 no plasma e de 0,08 a 24 na saliva. As razões [UH<sub>2</sub>]/[U] no plasma e na saliva demonstraram correlação elevada ( $r_s = -0,575$ ;  $P < 0,01$ ), porém, a saliva demonstrou maior correlação com o grau de toxicidade quando comparada ao plasma ( $r_s = -0,515$ ;  $P < 0,01$  vs  $r_s = -0,282$   $P < 0,05$ ). Pacientes com grau de toxicidade 3/4 ( $n = 21$ ) apresentaram menor razão metabólica em comparação a pacientes com grau 1/2 ( $n = 26$ ) ou com ausência de toxicidade ( $n = 13$ ) (média 0.59 vs 2.22 e 2.83 no plasma e 1.62 vs 6.88 e 6.75 na saliva,  $P < 0.01$ ). A partir de curva ROC foi determinado o valor de corte de 1,16 para a razão em saliva com 86% de sensibilidade e 77% de especificidade para a identificação de pacientes com toxicidade severa. Nas amostras de plasma o valor de corte foi 4.0 com 71% de sensibilidade e 76% de especificidade. Adicionalmente, foi desenvolvido e validado um método bioanalítico para a dosagem de U e UH<sub>2</sub> com exatidão (98.4–105.3%) e precisão precisão intra-ensaio (5.1–12.1%) e inter-ensaios (5.3–10.1%) satisfatórios.

**Conclusão:** Neste grupo de pacientes a genotipagem dos alelos \*2A; Y186C; I560S, Y186C e \*7 da *DPYD* não mostrou-se útil na identificação de indivíduos com deficiência severa da DPD. Entretanto, as razões metabólicas [UH<sub>2</sub>]/[U] demonstraram ser um promissor teste para avaliar a funcionalidade da enzima e identificar a maioria dos casos de pacientes com sujeitos a toxicidade grave à fluoropirimidinas, com sensibilidade superior da saliva.

**Palavras-chave:** Fluoropirimidinas, farmacocinética, câncer, diidropirimidina desidrogenase (DPD), uracil, diidrouracil, toxicidade.



## ABSTRACT

**Background:** Variation on therapeutic response to fluoropyrimidines and toxicity have been related to impaired dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) mediated metabolism. Mutations in genes encoding the enzyme as well as environmental factors can lead to reduced or absent enzyme expression, causing serious adverse effects due to the accumulation of these drugs. To date, there is no clinically recognized valid assay, for the identification of individuals at risk of severe toxicity in oncological practice. *DPYD* genotyping has a limited prediction power, since it is able to identify only the already known mutations, which have low frequency in population. Therefore, functional DPD assays based on the assessment of uracil (U) to dihydrouracil (UH<sub>2</sub>) metabolism, which is also dependent on DPD, have been proposed to identify patients prone to toxicity. Thus, endogenous metabolic ratios of [UH<sub>2</sub>]/[U] or after an oral dose of U are determined in plasma. Recently, the use of saliva has been suggested as alternative matrix to plasma, with higher stability of analytes. However, the association between salivary metabolic ratios and toxicity has not been validated in clinical samples. **Objective:** To evaluate the use of plasma and saliva uracil (U) to dihydrouracil (UH<sub>2</sub>) metabolic ratios and *DPYD* genotyping, as a means to identify patients with dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency and fluoropyrimidine toxicity. Additionally, the work proposed the development of a bioanalytical method for the determination of U and UH<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography. **Methods:** Paired plasma and saliva samples were obtained from 60 patients with gastrointestinal cancer before fluoropyrimidine treatment. U and UH<sub>2</sub> concentrations were measured by LC-MS/MS. *DPYD* was genotyped for alleles \*2A; Y186C; I560S, Y186C and \*7. **Results:** 35% of the patients had severe toxicity. There was no variant allele carrier for *DPYD*. The [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios were 0.09-26.73 in plasma and 0.08-24.0 in saliva, with higher correlation with toxicity grade in saliva compared to plasma ( $r_s = -0.515$  vs  $r_s = -0.282$ ). Median metabolic ratios were lower in patients with severe toxicity as compared to those with absence of toxicity (0.59 vs 2.83 plasma; 1.62 vs 6.75 saliva,  $P < 0.01$ ). A cut-off of 1.16 for salivary ratio was set with 86% sensitivity and 77% specificity for the identification of patients with severe toxicity. Similarly, a plasma cut-off of 4.0 revealed a 71% sensitivity and 76% specificity.

Additionally, a bioanalytical method for the quantification of U and UH<sub>2</sub>, with adequate accuracy (98.4–105.3%) and precision (intra-assay CV 5.1–12.1% and inter-assay CV 5.3–10.1%) was developed and validated. **Conclusions:** *DPYD* genotyping for alleles \*2A; Y186C; I560S, Y186C and \*7 was not helpful in the identification of patients with severe DPD deficiency in this series of patients. The [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios, however, proved to be a promising functional test to identify the majority of cases of severe DPD activity, with saliva performing better than plasma.

**Keywords:** Fluoropyrimidines, pharmacokinetics, cancer, dihydropyrimidine deshydrogenase (DPD), uracil, dihydrouracil, toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

### Figuras da revisão da literatura:

- Figura 1.** Estratégia de busca das referências bibliográficas.....Pág 20
- Figura 2.** Estimativa dos novos casos e mortes por câncer no mundo 2013.....Pág 22
- Figura 3.** Estimativa das *principais* causas de morte por câncer no Brasil 2013..Pág 22
- Figura 4.** Fórmula do 5 Fluorouracil.....Pág 23
- Figura 5.** Metabolismo do 5 Fluorouracil.....Pág 25
- Figura 6.** Fórmula da Capecitabina.....Pág 27
- Figura 7.** Metabolismo da Capecitabina.....Pág 27
- Figura 8.** Fórmula do Tegafur.....Pág 28

### Figuras da produção científica:

#### Artigo 1

**Figura 1.** Uracil and dihydrouracil plasma and salivary concentrations and metabolic ratios according to toxicity grade. A.1 uracil in plasma; A.2 dihydrouracil in plasma; A.3 [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratio in plasma; B.1 uracil in saliva; B.2 dihydrouracil in saliva; B.3 [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratio in saliva. P values for Mann-Whitney test, data are represented as median, 25 -75 percentiles, and range.....Pág 63

**Figura 2.** Receiver operating characteristics (ROC) curves of [UH<sub>2</sub>]/[U] plasma and salivary metabolic ratios to identify patients with 5-FU-related severe toxicity.....Pág 64

#### Artigo 2

**Figura. 1.** Typical chromatograms of plasma extracts obtained at 210 and 260 nm. A: Quality control sample at low concentration (QCL) containing U and UH<sub>2</sub> at 0.25 µg mL<sup>-1</sup>; B: Quality control sample at high concentration (QCH) containing U and UH<sub>2</sub> at 15.0 µg mL<sup>-1</sup>; C: Patient sample 2 h after an oral loading dose of 1000 mg U containing U at 3.62 µg mL<sup>-1</sup> and UH<sub>2</sub> at 1.41 µg mL<sup>-1</sup>.....Pág 82

## LISTA DE TABELAS

### Tabelas da revisão da literatura:

<b>Tabela 1.</b> Esquema de Quimioterapia Clínica Mayo.....	<i>Pág 33</i>
<b>Tabela 2.</b> Esquema de Quimioterapia Roswell – Park.....	<i>Pág 33</i>
<b>Tabela 3.</b> Esquema de Quimioterapia De Gramont.....	<i>Pág 33</i>
<b>Tabela 4.</b> Esquema de Quimioterapia Flox.....	<i>Pág 34</i>
<b>Tabela 5.</b> Esquema de Quimioterapia Folfox 6 modificado.....	<i>Pág 34</i>
<b>Tabela 6.</b> Esquema de Quimioterapia Capecitabina.....	<i>Pág 34</i>
<b>Tabela 7.</b> Esquema de Quimioterapia Capeox.....	<i>Pág 34</i>
<b>Tabela 8.</b> Comparação da eficácia clínica dos esquemas de Quimioterapia.....	<i>Pág 34</i>
<b>Tabela 9.</b> Escala de Desempenho Clínico validada pelo National Cancer Institute.....	<i>Pág 36</i>
<b>Tabela 10.</b> Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) intestinais desenvolvidos pelo National Cancer Institute.....	<i>Pág 37</i>
<b>Tabela 11.</b> Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) para sintomas constitucionais desenvolvidos pelo National Cancer Institute.....	<i>Pág 38</i>
<b>Tabela 12.</b> Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) hematológica desenvolvidos pelo National Cancer Institute.....	<i>Pág 39</i>
<b>Tabela 13.</b> Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) dermatológica desenvolvidos pelo National Cancer Institute.....	<i>Pág 40</i>
<b>Tabela 14.</b> Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) neurológica desenvolvidos pelo National Cancer Institute.....	<i>Pág 41</i>

### Tabelas da produção científica:

#### Artigo 1

<b>Tabela 1.</b> Correlations between study variables, data area represented as Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ) and 95% confidence interval (N=60).....	<i>Pág 61</i>
<b>Tabela 2.</b> Uracil, dihydrouracil and $[UH_2]/[U]$ metabolic ratios in plasma and saliva samples, according to adverse events grade, data are represented as median (25 and 75 percentiles) (N=60).....	<i>Pág 62</i>

**Tabela 3.** Salivary and plasma DPD functional tests performances according to chemotherapy regimen (N=60).....*Pág 65*

**Tabela Suplementar 1.** Patients demographic and clinical characteristics, uracil, dihydrouracil and [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios (N=60).....*Pág 70*

**Artigo 2.**

**Table 1.** Method validation parameters: linearity, precision, accuracy, extraction yield, plasma and processed sample stability at room temperature and at autosampler.  
.....*Pág 83*

## LISTA DE ABREVIATURAS

DPD	Diidropirimidina Desidrogenase
5 – FU	5 Fluorouracil
U	Uracil
UH <sub>2</sub>	Diidrouracil
FdUMP	Monofosfato de fluorodeoxiuridina
FUMP	Monofosfato de fluorouridina
FUDP	Difosfato de fluorouridina
FdUDP	Monofosfato de fluorodoxiuridina
FdUTP	Trifosfato de fluorodeoxiuridina
FUTP	Trifostato de fluorouridina
UTP	Uridina - 5 – fluorouridina
FUR	Fluoridina
FUDR	Fluorodeoxiuridina
UP	Uridina fosforilase
UK	Uridina Kinase
OPRT	Fosforibosiltransferase orotate
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
RR	Ribonucleótido redutase
TS	Timidilato Sintetase
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato Redutase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
UFT	Tegafur e Uracil
S1	Tegafur, Gimeracil e Oteracil
RP	Fase reversa
PGC	Carbono Grafítico Poroso
BSA	Albumina de soro bovino
IS	Padrão interno
QC	Controle de qualidade
QCLOQ	Controle de qualidade no limite de quantificação
QCL	Controle de qualidade baixo
QCM	Controle de qualidade médio

QCH	Controle de qualidade alto
QT	Quimioterapia
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .....	20
2.2 O CÂNCER.....	21
2.3 FLUOROPIRIMIDINAS .....	23
2.3.1 5 – Fluoruracil (5 FU) .....	23
2.3.2 Fluoropirimidinas orais .....	26
2.3.2.1 Capecitabina .....	26
2.3.2.2 Tegafur .....	28
2.3.2.3 UFT .....	28
2.3.2.4 S 1.....	30
2.4 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA DPD.....	31
2.5 ESQUEMAS DE QUIMIOTERAPIA .....	33
2.6 EFEITOS SECUNDÁRIOS DAS FLUOROPIRIMIDINAS.....	35
2.6.1 Tabela do Desempenho Clínico dos pacientes .....	36
2.6.2 Toxicidade Gastro – intestinais. ....	37
2.6.3 Toxicidade, Sintomas Constitucionais .....	38
2.6.4 Toxicidade, Medula Óssea .....	39
2.6.5 Toxicidade, Dermatologia .....	40
2.6.6 Toxicidade Neurológica .....	41
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>42</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	43
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	43
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>44</b>
<b>6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	<b>51</b>



<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>85</b>
7.1 CONCLUSÃO GERAL .....	85
7.2 CONCLUSÕES SECUNDÁRIAS.....	85
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>87</b>
<b>9. UMA ÚLTIMA MENSAGEM</b> .....	<b>90</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida da população mundial cresceu significativamente no século XXI. Entretanto, aumentou potencialmente a incidência de doenças crônicas, consideradas problemas de primeira ordem na saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2008, foram registradas 57 milhões de mortes em todo o mundo, das quais, 36 milhões (63%) foram atribuídas às doenças crônicas. Para 2030, aumento semelhante é projetado para o câncer, que irá ascender de 7,6 milhões para 15 milhões de novos casos.<sup>1,2</sup>

A quimioterapia é uma das modalidades de tratamento do câncer. As fluoropirimidinas são fármacos muito utilizados no tratamento adjuvante, neoadjuvante ou paliativo de tumores colorretais, estômago, pâncreas, entre outros. O primeiro relatório sobre a síntese e atividade biológica de 5-fluorouracil foi da equipe do Dr. Charles Heidelberger, no final dos anos 1950 na Universidade de Califórnia. O 5-FU é um pró-fármaco convertido ao metabólito ativo, impedindo a síntese das timinas e consequentemente a síntese do DNA, e também interfere no processamento do RNA. Cerca de 70-80% destas bi-transformações é realizada pela diidropirimidina desidrogenase (DPD). A deficiência parcial ou completa da atividade da DPD está associada à toxicidade ao 5-FU.

Entre 10 a 25% dos pacientes tratados com 5-FU apresentam toxicidades graves, incluindo 0,5 a 3% de mortes tóxicas, dependendo da dose e do regime recebido. A intensidade da toxicidade pode representar risco de morte para pacientes com deficiência da enzima DPD. As reações adversas após a administração de 5-FU incluem febre, mucosite, estomatite, vômitos, náuseas, diarreia que pode levar a casos extremos de desidratação e hipotensão, exantema maculopapular, neutropenia e síndrome mão-pé.

Recentemente, foi demonstrado que 70% das toxicidades graves e 80% das mortes tóxicas podem estar relacionadas com a deficiência da enzima DPD e, portanto, poderiam ser prevenidas com a avaliação prévia da atividade desta enzima.

As técnicas atualmente disponíveis para a genotipagem das enzimas envolvidas no metabolismo do 5 FU, diidropirimidina desidrogenase (*DPYD*), timidilato sintetase (*TYMS*) e metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) são capazes de

rastrear somente as mutações que já são conhecidas. Assim, devido à provável existência de outras mutações ainda não conhecidas, a genotipagem é considerada de baixo valor preditivo. Recentemente, foram propostas alternativas mais simples e eficientes para caracterizar a atividade da enzima DPD antes do início do tratamento com 5-FU, tais como a administração oral de uma dose teste de uracil e subsequente determinação das concentrações plasmáticas de uracil e seu metabólito diidrouracil através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), normalmente associada a detectores espectrofotométricos.

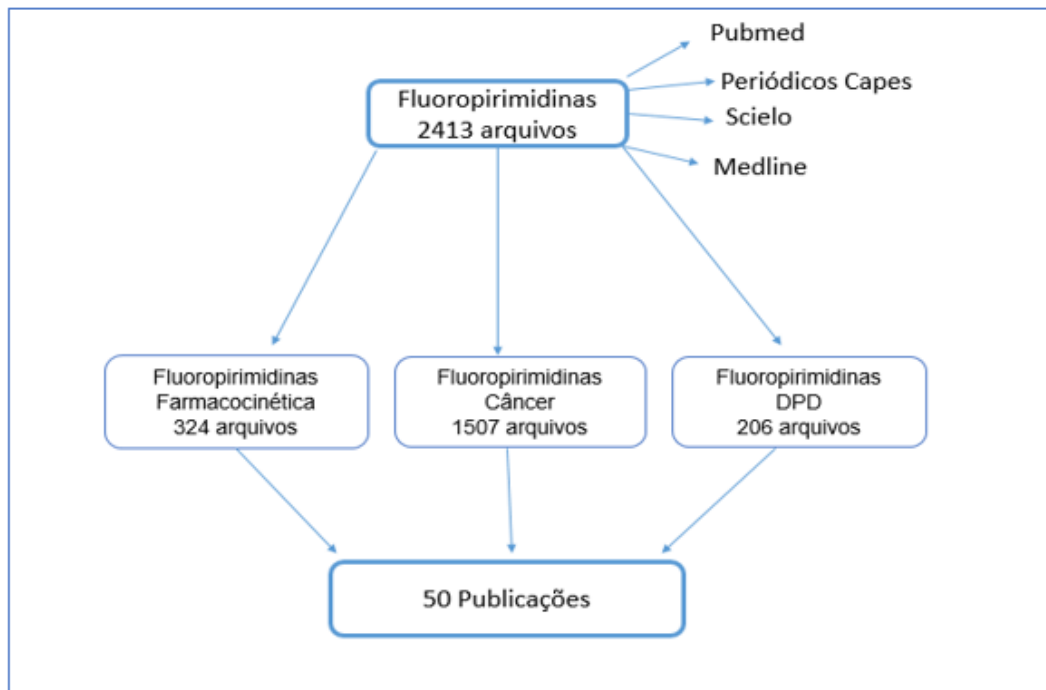
Considerando que a enzima DPD é responsável pela redução fisiológica de uracil (U) para diidrouracil (UH<sub>2</sub>), a avaliação da razão [UH<sub>2</sub>]/[U] no plasma está relacionada à atividade da DPD e pode permitir individualizar as doses de 5-FU de acordo com o nível de atividade da enzima de cada paciente. Atualmente, se tem estudos em saliva para medir a razão [UH<sub>2</sub>]/[U] como método não invasivo, com resultados similares aos encontrados em sangue periférico. Portanto, a dosagem da atividade do DPD deveria ser uma ferramenta importante no dia a dia do oncologista, pois assim evitar-se-ia a ocorrência de mortes tóxicas e efeitos adversos severos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Foram identificadas 2413 publicações com a palavra-chave fluoropirimidinas; a busca bibliográfica foi realizada nas bases de dados PubMed, Periódicos Capes, Scielo e Medline. Realizamos os cruzamentos com as palavras-chave: fluoropirimidinas - farmacocinética, fluoropirimidinas - câncer e fluoropirimidinas - DPD achando 324, 1507 e 206 publicações, respectivamente. Após análise criteriosa, foram classificadas como relevantes e incluídas neste trabalho 50 publicações utilizadas para a redação dos tópicos apresentados.

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo.



## 2.2 O CÂNCER

O câncer é uma doença crônica de alta incidência, está relacionada entre as cinco principais causas de morte no mundo. Considerando-se somente as doenças crônicas, o câncer é a segunda maior causa de morte (21%), somente inferior às doenças cardiovasculares (48%).<sup>3,4</sup>

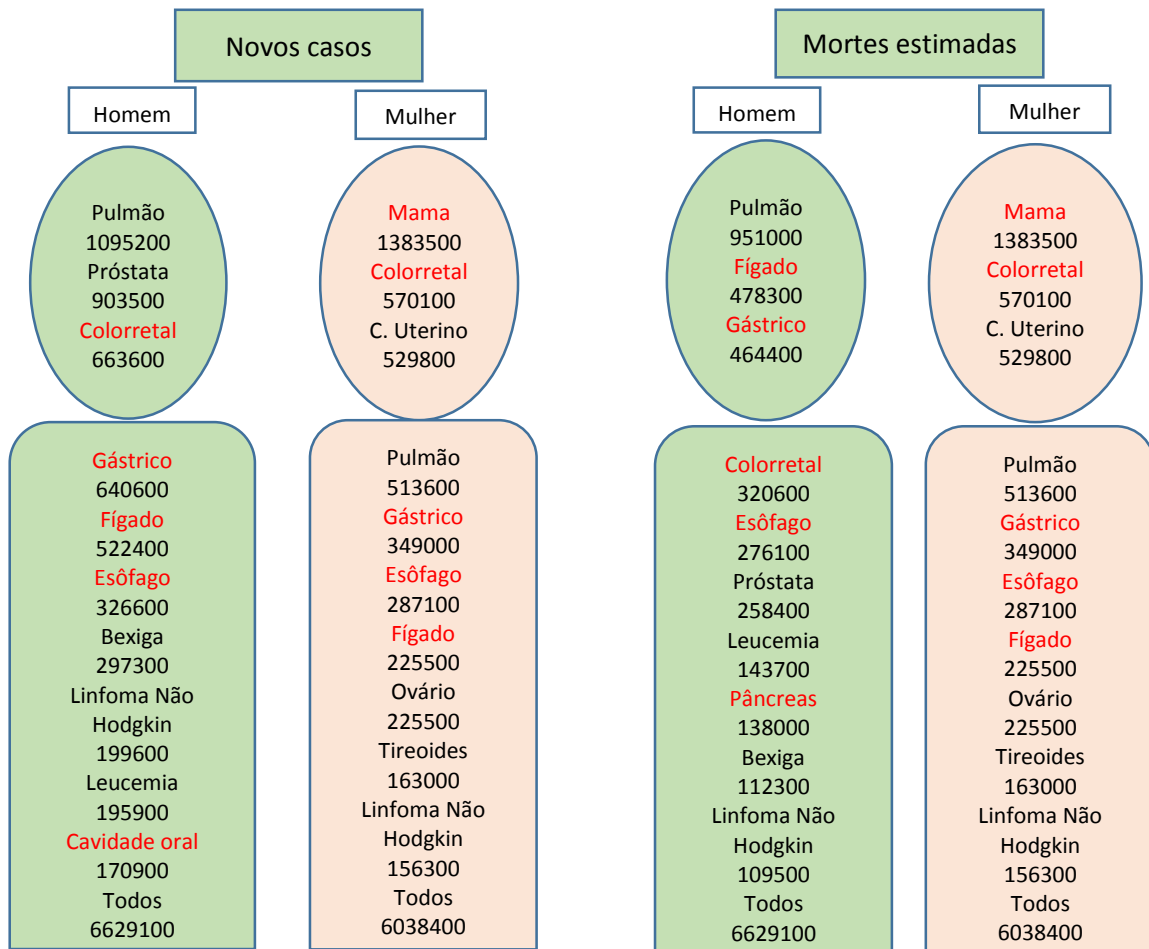
Hábitos alimentares inadequados, o tabagismo, o consumo de álcool, a exposição à poluição, o aumento na idade da população e fatores genéticos são relacionados ao desenvolvimento do câncer, que acomete indivíduos de países desenvolvidos e em processo de desenvolvimento. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que tenham ocorrido 518.510 novos casos de câncer em 2014, destes, 257.870 homens e 260.640 mulheres, demonstrando assim a magnitude do seu impacto sobre a saúde no país.<sup>5</sup>

Segundo dados do INCA, a neoplasia de maior incidência em 2014 nos indivíduos do sexo masculino foi o câncer de próstata (60.180 casos, 30,8%), seguido do câncer de traquéia, brônquio e pulmão (17.210 casos, 8,8%), colorretal (14.180 casos, 7,3%), de estômago (12.670 casos, 6,5%), da cavidade oral (9.990, 5,1%), do esôfago (7.770 casos, 4%), de bexiga (6.210 casos, 3,2%), de laringe (6.110 casos, 3,1%), linfoma não-Hodgkin (5.190 casos, 2,7%) e do sistema nervoso central (4.820 casos, 2,5%).<sup>5</sup>

Na avaliação dos indivíduos do sexo feminino, o câncer de mama (52.680, 9,3%) foi a neoplasia de maior incidência em 2014, seguido do câncer do colo do útero (17540 casos, 9,3%), colorretal (15.960 casos, 8,4%), da tireóide (10.590 casos, 5,6%), de traquéia, brônquio e pulmão (10110, 5,3%), do estômago (7.420 casos, 3,9%), do ovário (6.190 casos, 3,3%), do corpo uterino (4.520 casos, 2,4%), linfoma não-Hodgkin (4.450 casos, 2,4%) e do sistema nervoso central (4.450 casos, 2,4%).<sup>5</sup>

Quatro das 10 neoplasias mais frequentes entre homens e/ou mulheres (colorretal, de cabeça e pescoço, de estômago e de mama) apresentam indicação terapêutica neoadjuvante, adjuvante ou paliativa com o antineoplásico 5-fluorouracil (5-FU)<sup>6-18</sup>. O 5-FU foi introduzido na terapêutica em 1957 e continua a ser parte essencial do tratamento de uma variedade de tumores, particularmente tumores gatrointestinais, de cabeça e pescoço e de mama. Seu uso está associado ao aumento da sobrevida dos pacientes.

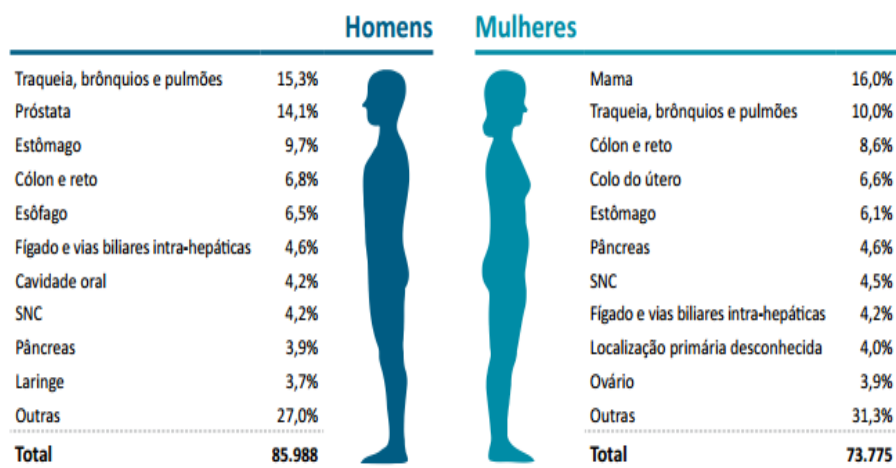
Figura 2. Estimativa dos novos casos e mortes por câncer no mundo em 2013.



\*Em vermelho, os tumores que têm as fluoropirimidinas como parte de seu tratamento.

Fonte: Globocan (2013)

Figura 3. Estimativa das principais causas de morte por câncer no Brasil em 2013.



Fonte: INCA (2013)

## 2.3 FLUOROPIRIMIDINAS

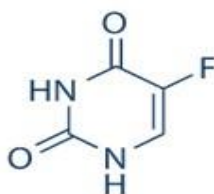
É um grupo de quimioterápicos que têm sua ação como Antimetabolitos, interferindo nas sínteses do ADN e ARN, os fármacos que são deste grupo incluem 5 – Fluorouracil, e na atualidade temos drogas orais como a Capecitabina, S 1, Tegafur e UFT.

### 2.3.1 5 – Fluoruracil (5 FU)

É um dos quimioterápicos mais utilizados, da família dos antimetabolitos, tem seu uso no tratamento adjuvante, neoadjuvante ou paliativo de tumores colorretais, de estômago, pâncreas, esôfago, mama, entre outros. O primeiro relatório sobre a síntese e atividade biológica de 5-FU foi da equipe do Dr. Charles Heidelberger (de Nova Iorque 1920 – 1983) que, em 1957, na Universidade da Califórnia, relatou sobre a atividade do 5-FU, indicando que inibiu o crescimento de tumores em ratos e logo em humanos.<sup>22</sup>

5-FU - sua fórmula química é  $C_4H_3N_2FO_2$  (gráfico 3), seu peso molecular é 130.078 g/mol, seu ponto de fusão é 282 °C, tem uma união proteica de 12%, sua excreção é pelo pulmão e pela urina, suas vias de administração são intravenosa e tópica.<sup>23</sup>

Figura 4 – Fórmula estrutural do 5-FU.



Fonte: De Vita, Cancer. Principles and Practice of Oncology 10th edition pag 210.<sup>62</sup>

O 5-FU foi usado inicialmente de forma isolada e com o tempo passou a ser utilizado em diferentes esquemas de combinações, melhorando assim a resposta clínica dos pacientes. Esses esquemas variam em suas doses, tempo e tipo de infusão, que pode ser em *bolus* ou infusões contínuas. A abordagem para calcular as doses de 5-FU mais amplamente utilizada é baseada na área de superfície corporal<sup>24</sup>.

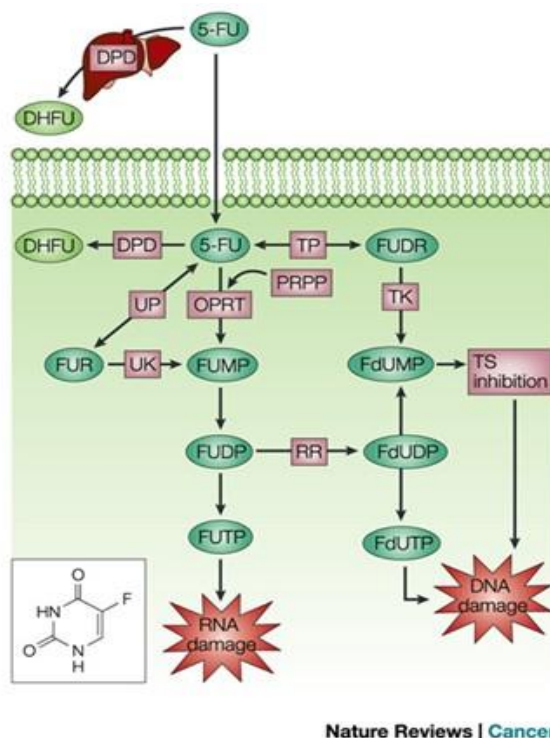
O 5-FU apresenta um tempo de meia vida curto, entre 10 a 20 minutos. Sua depuração total do corpo varia conforme o esquema de administração: 0,5-1,5 L/min para aplicação em *bolus* e 5-58 L/min para infusões contínuas. A enzima diidropirimidina desidrogenase (DPD) é a principal responsável pela degradação do 5-FU, sendo expressa principalmente no fígado. Entretanto, diversos pacientes possuem mutações genéticas que levam à não expressão desta enzima, o que pode provocar efeitos adversos graves devido ao acúmulo do fármaco.<sup>24</sup>

Após ocorrer a penetração na célula, o 5-FU é metabolizado através de duas vias que concorrem entre si: a via anabólica, que dá origem aos metabólitos ativos, e a via catabólica, que inativa o 5-FU e conduz a eliminação do fármaco. A atividade biológica do 5-FU está associada ao seu metabolismo, devido à formação de monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP). O FdUMP é um metabólito ativo que age inibindo a enzima timidilato sintetase (TS) e impedindo assim a síntese de DNA, levando a célula à apoptose.<sup>19</sup>

O 5-FU também é convertido em monofosfato de fluorouridina (FUMP), que pode ser submetido a duas fosforilações sucessivas para formar o difosfato de fluorouridina (FUDP) e, em seguida, o trifosfato de fluorouridina (FUTP), o qual pode ser incorporado no RNA ao invés da uridina-5-trifosfato (UTP), interferindo no processamento do RNA. A citotoxicidade resulta da interferência do fármaco na replicação do RNA e da depleção da timidina, que segue ligada com a enzima timidilato sintetase.<sup>25</sup>



Figura 5. Metabolismo do 5 FU.



**5-FU** 5 Fluorouracil. **FdUMP** Monofosfato de fluorodeoxiuridina. **FUMP** Monofosfato de fluorouridina. **FUDP** Difosfato de fluorouridina. **FdUDP** Monofosfato de fluorodeoxiuridina. **FdUTP** Trifosfato de fluorodeoxiuridina. **FUTP** Trifosfato de fluorouridina. **UTP** Uridina - 5 - fluorouridina. **FUR** Fluoridina. **FUDR** Fluorodeoxiuridina. **UP** Uridina fosforilase. **UK** Uridina Kinase. **OPRT** Fosforibosiltransferase orotate. **PRPP** Fosforribosil pirofosfato. **RR** Ribonucleótido redutase. **TS** Timidilato Sintetase. **MTHFR** Metilenotetrahydrofolato Redutase.

Fonte: Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. Nature Reviews Cancer, 2003, pag 330-338<sup>64</sup>

Entre 10 a 25% dos pacientes tratados com 5-FU apresentam toxicidades graves, incluindo 0,5 a 3% de mortes tóxicas, dependendo da dose e do regime recebidos.<sup>25</sup> As reações adversas após a administração de 5-FU incluem febre, mucosite, estomasite, vômitos, náuseas, diarreia que pode levar a casos extremos de desidratação e hipotensão, exantema maculopapular, neutropenia e síndrome mão-pé. Outras reações que ainda podem ser observadas são mudanças na função cognitiva e ataxia cerebelar. No entanto, estas manifestações podem passar despercebidas a menos que seja realizado um exame neurológico completo.<sup>27</sup>

A intensidade da toxicidade pode representar risco de morte para pacientes com deficiência da enzima DPD. Recentemente, foi demonstrado que 70% das

toxicidades graves e 80% das mortes tóxicas podem estar relacionadas com a deficiência da enzima DPD e, portanto, poderiam ser prevenidas com a avaliação prévia da atividade desta enzima.<sup>26</sup>

Na última década, uma grande variedade de esquemas de infusão intravenosa com 5-FU foi desenvolvida, levando a uma melhora na resposta terapêutica, porém, sem redução significativa na toxicidade. As doses de 5-FU continuam sendo calculadas usando a área de superfície corporal, entretanto, 40 a 60% dos pacientes recebem doses inferiores às adequadas.<sup>28</sup>

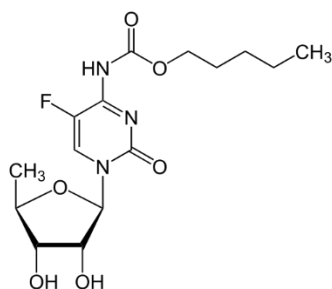
### 2.3.2 Fluoropirimidinas orais

O 5-FU tem absorção errática quando administrado pela via oral, devido à alta concentração intestinal de diidropirimidina desidrogenase (DPD), por este motivo, a droga é administrada por via endovenosa, o que requer visitas frequentes dos pacientes ao serviço de saúde. Além disso, a administração por infusão contínua requer a colocação de cateteres e o uso de bombas de infusão. As fluoropirimidinas orais são pró-drogas do 5-FU e mimetizam as infusões contínuas daquela droga, representando uma nova opção terapêutica para pacientes com tumores habitualmente tratados com 5-FU; as drogas usadas são, Capecitabina, Tegafur, UFT, e S 1.<sup>42</sup>

#### 2.3.2.1 Capecitabina

É um agente citotóxico, derivado do carbamato de fluoropirimidina, tumor-ativado e tumor-seletivo. A formação de 5-FU é catalisada preferencialmente no tumor por um fator angiogênico associado ao tumor, denominado timidina fosforilase (ThyPase), minimizando assim a exposição dos tecidos saudáveis do organismo ao 5-FU sistêmico. A biotransformação enzimática sequencial da capecitabina para 5-FU leva a maiores concentrações dentro dos tecidos do tumor. A fórmula é  $C_{15}H_{22}FN_3O_6$ .<sup>23</sup>

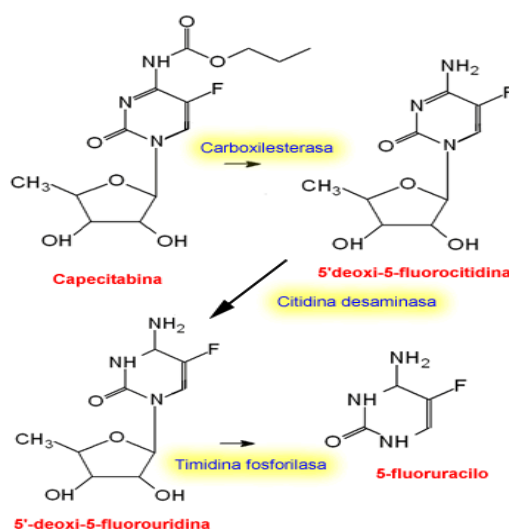
Figura 6. Fórmula estrutural da Capecitabina



Fonte: De Vita, Cancer. Principles and Practice of Oncology 10th edition pag 211.<sup>62</sup>

A Capecitabina é metabolizada inicialmente, através da carboxilesterase hepática, para 5'-DFCR, a qual é convertida a seguir em 5'-DFUR através da citidina desaminase, localizada principalmente no fígado e nos tecidos tumorais. A formação de 5-FU ocorre preferencialmente no tumor pelo fator angiogênico associado ao tumor, dThdPase (Timidina fosforilase), minimizando assim a exposição sistêmica dos tecidos saudáveis do organismo ao 5-FU sistêmico. A AUC plasmática do 5-FU é de 6 a 22 vezes menor do que aquela observada após a administração intravenosa em bolus de 5-FU (dose de 600 mg/m<sup>2</sup>). Os metabólitos da capecitabina tornam-se citotóxicos somente após sua conversão para 5-FU e para anabólitos do 5-FU. O 5-FU é catabolizado adicionalmente para os metabólitos inativos diidro-5-fluoruracil (FUH2), ácido 5-fluoro-ureidopropiônico (FUPA) e  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina (FBAL), via diidropirimidina desidrogenase (DPD).<sup>43</sup>

Figura 7. Metabolismo da Capecitabina

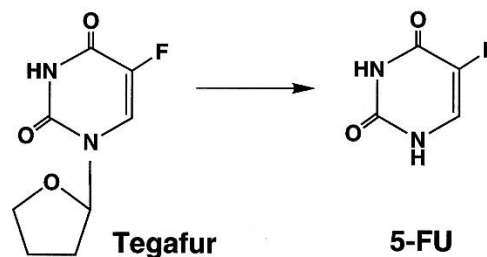


Fonte: De Vita, Cancer. Principles and Practice of Oncology 10th edition pag 212.<sup>62</sup>

### 2.3.2.2 Tegafur

É um pró-fármaco que, após metabolização, transforma-se em 5-fluoruracil utilizado como antineoplásico, o metabólito ativo interfere na fase S do ciclo celular. A via de administração é a oral ou intravenosa. O tegafur foi sintetizado na União Soviética, e inicialmente estudado em ensaios clínicos nos EUA na década de 80; pela alta taxa de neurotoxicidade desta droga pela via endovenosa a pesquisa foi interrompida. Só então, investigadores japoneses passaram a estudar o tegafur administrado por via oral e conseguiram combiná-lo com diversas substâncias moduladoras de sua atividade. Após administração oral, o tegafur é gradualmente convertido em 5-FU, principalmente, pela actividade da enzima CYP2A6 no fígado. 5-FU é ativado no interior das células por fosforilação para obter o metabólito ativo de 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP). Na presença de folato reduzido, FdUMP se liga a timidilato-sintase, que leva a formar um complexo ternário, o qual inibe a síntese de ADN. Além disso, o trifosfato de 5-fluorouridina (FUTP) é incorporado no ARN, causando a interrupção de funções do ARN.<sup>45, 46</sup>

Figura 8. Fórmula estrutural do Tegafur



Fonte: De Vita, Cancer. Principles and Practice of Oncology 10th edition pag 213.<sup>62</sup>

### 2.3.2.3 UFT

É um quimioterápico que tem uma combinação do tegafur e de uracil na proporção molar de 1:4. Após absorção oral, o tegafur é transformado em 5-FU pelo sistema microsossomal hepático. O uracil é o substrato natural da enzima DPD, e

compete favoravelmente com o 5-fluorouracil pela enzima quando ambos são administrados juntos e estão presentes na circulação, resultando em uma meia vida mais prolongada do que o 5-FU, imitando uma infusão contínua. Assim, a associação de uracil leva a um maior efeito citotóxico do tegafur, isto é, do 5-FU que resulta de sua metabolização. Em virtude da potencialização do efeito do 5-FU pelo ácido folínico (leucovorin), o UFT também foi combinado com o leucovorin. Esta combinação levou ao aumento do efeito citotóxico do UFT em modelos experimentais, e também da inibição da enzima timidilato sintetase em tumores gástricos de seres humanos.<sup>47,48</sup>

O desenvolvimento inicial do UFT foi feito no Japão onde essa medicação foi utilizada com sucesso em uma grande variedade de tumores, quase sempre utilizado como agente único. Depois dos resultados positivos obtidos no oriente na década de 90, foram desenvolvidos estudos com esta droga em Estados Unidos e na Europa.<sup>50</sup>

Devido à similaridade do UFT com o 5-FU, os estudos da fase II utilizando UFT e leucovorin foram dirigidos para pacientes com adenocarcinomas de colón e reto metastáticos. Um estudo do M. D. Anderson Cancer Center, incluindo 45 pacientes, descreveu uma taxa de resposta de 42% com toxicidade aceitável; o efeito colateral mais comum foi diarreia, apresentando em quatro pacientes toxicidade grau 3. A partir dos bons resultados obtidos, foi realizado um estudo fase III comparando UFT e leucovorin com o regime da Clínica Mayo (5 – FU em bolus e leucovorin). O estudo incluiu 816 pacientes e avaliou o regime UFT 300 mg/m<sup>2</sup>/dia combinado com 25-30 mg de leucovorin três vezes ao dia, por 28 dias repetidos a cada 35 dias, comparou com o regime clássico da Clínica Mayo, 425 mg/m<sup>2</sup>/dia de 5 – FU endovenoso combinado com 20 mg/m<sup>2</sup>/dia de leucovorin por 5 dias repetido a cada 28 dias. Nos resultados, não foram encontradas diferenças significativas quanto à taxa de resposta de 12% para UFT e leucovorin e 15% para o regime de 5 – FU leucovorin, tempo para progressão 3,5 para UFT e leucovorin versus 3,8 para o regime 5 – FU leucovorin. A sobrevida mediana foi de 12,4 para UFT leucovorin comparado com 13,4 do regime 5 – FU leucovorin. A diferença encontrada entre os dois regimes foi a toxicidade, com menores efeitos para UFT leucovorin, com os resultados, neutropenia grave <1% para este esquema versus 56% para o esquema 5 – FU leucovorin, diarreia 67% para UFT leucovorin, comparado com 76% do esquema 5 – FU leucovorin, estomatite 24% para UFT leucovorin versus 75% do esquema 5 – FU leucovorin.<sup>47,48,49,50</sup>

#### 2.3.2.4 S 1

É uma quarta geração de fluoropirimidinas composta por tegafur/ gimeracil/ oteracil. O tegafur combinado com o gimeracilo que é um inibidor do (DPD) para evitar a degradação de 5-FU, e combinado também com o oteracilo, que é um inibidor da orotato fosforibosiltransferase (OPRT) que reduz a actividade do 5-FU na mucosa gastrointestinal normal. A combinação de tegafur, gimeracilo e oteracilo, numa razão molar de 1: 0,4: 1, prolonga a exposição e a atividade anti-tumor, enquanto reduz a toxicidade de 5-FU sozinho.<sup>19</sup>

O S 1 tem sido investigado principalmente no Japão, onde foi aprovado como quimioterapia paliativa ou tratamento adjuvante para pacientes submetidos à ressecção curativa. Outros países asiáticos também definiram regimes com S-1 como adjuvância (Coreia) ou como tratamento padrão em câncer gástrico avançado (Coreia, Singapura e China). O SPIRITS, um estudo fase III realizado por Koizumi, et al, com 305 pacientes, comparou S-1 sozinho com S-1/cisplatina, encontrando superioridade para o regime combinado em relação à sobrevida global ( $p=0,04$ ;  $HR=0,77$ ,  $IC:95\%$ ,  $0,61-0,98$ ) e à taxa de resposta (54% vs 31%). Apesar da maior toxicidade (maior incidência de neutropenia, anemia, náusea e anorexia) do regime combinado, este foi geralmente bem tolerado. Outro estudo japonês fase III, publicado por Boku et al., demonstrou sobrevida global similar para o S-1 quando comparado a 5FU ou à combinação irinotecano/cisplatina (tempos de sobrevida média de 11,4 vs 10,8 vs 12,3 meses).<sup>51</sup>

Como a taxa de conversão metabólica da pró-droga oral tegafur para o fluorouracil parece ser diferente conforme a população étnica, foi conduzido um estudo fase I para estabelecer a dose máxima tolerada de S-1/cisplatina no ocidente. Após avaliada a eficácia e segurança desta combinação, em um estudo multicêntrico fase II, Ajani et al. publicaram os resultados do estudo FLAGS, que incluiu 24 países e 146 centros, com 1053 pacientes estratificados (centro, número de sítios metastáticos, quimioterapia adjuvante prévia e extensão da doença) e randomizados para receber S-1/cisplatina ou 5FU/cisplatina (5FU em infusão de 24h). O regime S-1/cisplatina não apresentou aumento estatisticamente significativo da sobrevida global (8,6 vs 7,9 meses, com  $HR: 0,92$ ;  $IC 95\%$ ,  $0,80$  a  $1,05$ ;  $p=0,20$ ), mas resultou em menor toxicidade com taxas inferiores de neutropenia grau 3/4 (32,3 % vs 63,6%),

neutropenia complicada (5% vs 14,4%), estomatite (1,3% vs 13,6%), hipocalcemia (3,6% vs 10,8%) e morte relacionada ao tratamento (2,5% vs 4,9%;  $p < 0,05$ ).<sup>52,53</sup>

## 2.4 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA DPD

Embora os benefícios da administração das fluoropirimidinas estejam estabelecidos, a toxicidade associada é um grande problema clínico e tem sido relatado em associação com variantes deletérias na sequência do gene diidropirimidina desidrogenase (*DPYD*)<sup>29,30</sup>. Desta forma, a administração de uma dose padrão de qualquer fluoropirimidina para uma população de pacientes produz uma ampla gama de respostas, devido à grande variabilidade metabólica individual<sup>25</sup>. A análise da atividade da enzima DPD pode ser um determinante importante para prever a eficácia, toxicidade e pode ser útil para individualizar a administração das fluoropirimidinas antes da primeira dose.<sup>20</sup>

A deficiência da DPD pode ser total ou parcial, o que pode resultar em falha terapêutica e efeitos adversos graves, incluindo a morte, devido ao acúmulo do fármaco no organismo.<sup>20</sup> Estas reações adversas devido à quimioterapia interferem drasticamente com a saúde e estima-se aumentar significativamente os custos hospitalares e com outros medicamentos. Vários métodos para prever a atividade da DPD têm sido propostos tais como genotipagem do gene diidropirimidina desidrogenase (*DPYD*),<sup>29-31</sup> determinação da atividade DPD em células mononucleares do sangue periférico,<sup>27,31,32</sup> avaliação da razão metabólica endógena  $[UH_2]/[U]$  no plasma e saliva, sendo uma forma funcional de avaliar a atividade da enzima DPD.<sup>32,33</sup>

### 2.4.1 Genotipagem

Diversos trabalhos têm estudado a relação das variantes no gene *DYPD* e os efeitos secundários que tem acontecido com o uso das fluoropirimidinas. LOGANAYAGAN *et al.* (2009) investigaram essa associação em um estudo com 47 pacientes com câncer colorretal que desenvolveram toxicidades grau 3 e 4 após administração de 5 FU, a variante 1905 + 1 G>A (*DYPD* 2A) foi considerada a mais comum (8.5%), todos os casos desenvolveram diarreia grave. Em 6% dos pacientes

foi identificada a variante 2846A>T (*DPYD 9B*) que apresentaram mucosites e em apenas um paciente foi identificada a variante 1679T>G (*DPYD 7*) que apresentou neutropenia. SCHWAB et al. (2008) em 638 pacientes que tiveram toxicidade grau 3-4 encontrou uma prevalência de 5,5% do gene mutado para o alelo 2A. Galván et al (2011) em 102 pacientes argentinos achou 0,98% do gene mutado para *DPYD \*2A*. Barra et al (2014) fez um estudo com 151 pacientes domiciliados na Região Norte do Brasil para avaliar a toxicidade por 5 – FU, documentando uma morte relacionada à toxicidade de 5-FU. O polimorfismo *DPYD \*5* estava relacionado com o aumento de 8 vezes na ocorrência de toxicidade grave, e não foi achado a variante *DYPD 2A*. Deenen et al. (2016) Avaliou a presença de *DPYD* em uma coorte de 2.038 pacientes, a variante mais prevalente foi o alelo *DPYD \*2A*, com uma frequência de 1,1%<sup>29-32</sup>. As técnicas atualmente disponíveis para a genotipagem são capazes de rastrear somente as mutações que já são conhecidas. Assim, devido a provável existência de outras mutações ainda não conhecidas, a genotipagem é considerada de baixo valor preditivo

#### 2.4.2 Fenotipagem

Uma alternativa mais simples e eficiente para caracterizar a atividade da enzima DPD antes do início do tratamento com fluoropirimidinas é a avaliação da razão metabólica  $[UH_2]/[U]$ , considerando que a enzima DPD é responsável pela redução fisiológica de U para  $UH_2$ . Isto foi estudado em plasma e na saliva.

Em um estudo com 68 pacientes, KRISTENSEN et al. (2010) propuseram um valor de corte 4 na razão  $[UH_2]/[U]$  em plasma para detectar pacientes propensos à toxicidade grau 3 ou 4, com uma sensibilidade de 87% e especificidade 93%. Semelhantemente, BOISDRON-CELLE et al. (2007) obtiveram especificidade de 71,4% e sensibilidade de 76,5% para o valor de corte 4 para as razões metabólicas plasmáticas encontradas em 60 pacientes. M. LAUNAY et al (2015) classificaram em seu estudo pacientes com razão  $[UH_2]/[U] >4$  como metabolizadores normais e  $<4$  deficientes para DPD, sendo que para o último grupo, razões entre 1 e 2 indicavam considerada deficiência intermediária e  $<1$  deficiência severa (N=59).

CARLSSON et al. (2014) publicou o único estudo até o presente em amostras de saliva. Foram avaliados 73 pacientes, observando média e desvio padrão de  $1.3 \pm 0.85$  para a razão  $[UH_2]/[U]$  em os pacientes que tiveram toxicidade grau 3 – 4 após terapia



com 5-FU, sem a definição de valores de corte para predição da toxicidade severa.<sup>50, 54, 55, 56</sup>

O estudo da razão [UH<sub>2</sub>]/[U] em amostras de saliva podem oferecer maior praticidade de coleta e, talvez, uma maior acurácia, comparado ao plasma e será objeto de estudo nesta tese (Antunes et al, comunicação pessoal).

## 2.5 ESQUEMAS DE QUIMIOTERAPIA

Diversos esquemas de quimioterapia com as fluoropirimidinas para o tratamento do câncer têm sido propostos, seja isoladamente ou em combinação com outros fármacos. Os esquemas descritos a seguir são os mais comuns na prática no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, principalmente para os tumores gastrointestinais que foram o alvo deste estudo.

Tabela 1. Esquema de Qt Clínica Mayo

<b>Medicamento</b>	<b>Doses</b>	<b>Dias</b>	<b>Administração</b>
Leucovorin	20 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dias 1-5	BOLUS, antes de 5 Fu
5 – FU	425 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dias 1-5	BOLUS.

Repetir a cada 4 semanas para os três primeiros ciclos; depois, a cada 5 semanas durante um total de 6 ciclos.<sup>54</sup>

Tabela 2. Esquema de Qt Roswell – Park

<b>Medicamento</b>	<b>Doses</b>	<b>Dias</b>	<b>Administração</b>
Leucovorin	500 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1	Infusão de 2 horas
5 – FU	500 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1	Bolus 1 hora depois do início do LV

Repetir a cada semana x 6 semanas, mais 2 semanas de folga para completar um ciclo, no total 4 ciclos.<sup>55</sup>

Tabela 3. Esquema de Qt De Gramont

<b>Medicamento</b>	<b>Doses</b>	<b>Dias</b>	<b>Administração</b>
Leucovorin	200 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1 - 2	Infusão de 2 horas
5 – FU	400 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1 - 2	Bolus depois do LV
5 – FU	600 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1 - 2	Infusão de 22 horas

Repetir a cada duas semanas durante 12 ciclos.<sup>56</sup>

Tabela 4. Esquema de Qt Flox

Medicamento	Doses	Dias	Administração
Leucovorin	500 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1	Infusão de 2 horas
5 – FU	500 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1	Bolus depois do LV
Oxaliplatina	85 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1	Infusão de 2 horas

Repetir 5 - FU e Leucovorin nos dias 1, 8, 15, 22, 29, 36. Oxaliplatina nos dias 1, 15 e 29. Cada ciclo se repete a cada 8 semanas, total de 3 ciclos.<sup>57</sup>

Tabela 5. Esquema de Qt Folfox 6 modificado

Medicamento	Doses	Dias	Administração
Leucovorin	400 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1	Infusão de 2 horas
5 – FU	400 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1	Bolus depois do LV
5 – FU	2400 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1	Infusão de 46 horas
Oxaliplatina	85 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1	Infusão de 2 horas

Repetir a cada 2 semanas por 12 ciclos.<sup>58,59</sup>

Tabela 6. Esquema de Qt Capecitabina

Medicamento	Doses	Dias	Administração
Capecitabina	1250 mg/m <sup>2</sup> /dia	Dia 1-14	Via oral, doses repartidas em 2 tomadas

Repetir a cada 21 dias por 8 ciclos.<sup>60,61</sup>

Tabela 7. Esquema de Qt Capeox

Medicamento	Doses	Dias	Administração
Capecitabina	1000 mg/m <sup>2</sup> /día	Dia 1 -14	Via oral, a doses repartidas em 2 tomadas
Oxaliplatina	130 mg/m <sup>2</sup> /día	Dia 1	Infusão de 2 horas

Repetir a cada 21 dias por 8 ciclos.<sup>62,63</sup>

Tabela 8. Comparação da eficácia clínica dos esquemas de Qt.

	Clínica Mayo	Roswell-Park	De Gramont	FOLFOX 6	CapeOx	FLOX
<b>SLE 5</b>	73%	69%	73%	78%	77%	78%
<b>SG 5</b>	74%	74%	80%	85%	84%	85%

**SLE 5** = sobrevida livre de doença em 5 anos. **SG5** = sobrevida global em 5 anos. (Os dados de eficácia validados pelo FDA para avaliar a eficácia do tratamento adjuvante de câncer de cólon em 2004). Os esquemas de adjuvância mencionados são para os estágios III de cólon, já que nos estágios II é controverso o uso da QT, e no estágio IV a Qt é paliativa.<sup>54-63</sup>

## 2.6 EFEITOS SECUNDÁRIOS DAS FLUOROPIRIMIDINAS

O tratamento do câncer usa drogas diferentes que, por sua natureza, podem ser prejudiciais para as células normais do corpo; sem dúvida, são muitos os efeitos que o uso dos quimioterápicos pode ter. A Organização Mundial de Saúde OMS define reações adversas a medicamentos (RAM) como qualquer efeito nocivo, não intencional e indesejável. Ela ocorre em pacientes após administradas doses profiláticas, diagnósticas ou terapêuticas. Esta definição exclui falhas terapêuticas, sobredosagem acidental ou intencional, e abuso da droga.

A Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do National Cancer Institute (NCI) tem dividido a toxicidade de acordo com diferentes escalas de classificação clínica de sintomas ou sinais que são a partir de 0 (nenhuma toxicidade) a 4 (toxicidade máxima). Neste trabalho, dividimos por aparatos as principais toxicidades das fluoropirimidinas mais usadas no serviço da oncologia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (5-FU e capecitabine).

Em Oncologia, é fundamental que se utilize a descrição do desempenho clínico de cada paciente, que pode ser alterado pela própria doença ou pelo tratamento. Por isso, antes de discutir os efeitos secundários das fluoropirimidinas, descrevem-se os critérios ou escalas mais usadas na descrição da performance dos pacientes.

## 2.6.1 Tabela do Desempenho Clínico dos pacientes

Tabela 9. Escala da Desempenho Clínico validada pelo National Cancer Institute (NCI).<sup>64,65</sup>

Critérios de Performance status					
Escore	ECOG (Zubrob)	Escore	Karnofsky	Escore	Lansky
0	Totalmente ativo capaz de desempenhar todas as atividades pré doença sem restrição.	100	Normal, sem queixas, sem evidência de doença. Capaz	100	Totalmente ativo, normal.
		90	de continuar em atividade normal.	90	Restrições menores em atividade física vigorosa.
1	Restrito em atividade física vigorosa, mas pode caminhar e é capaz de realizar trabalho de natureza leve ou sedentário.	80	Atividade normal com esforço	80	Ativo, mas se cansa rápido. Maior restrição de tempo e
		70	alguns sinais ou sintomas de doença. Cuida de si mesmo incapaz de continuar atividades.	70	menos tempo gasto em atividades físicas.
2	Pode caminhar e é capaz de cuidar de si mesmo, mas não consegue realizar quaisquer atividades de trabalho. Ativo em mais de 50% das horas em que está acordado.	60	Requer assistência ocasional, mas consegue atender à maior	60	Levanta-se e movimenta-se, faz atividades tranquilas. Consegue se vestir, mas fica deitado
		50	parte de suas necessidades. Requer assistência considerável, e cuidados médicos frequentes.	50	durante muito tempo no dia faz atividades muito tranquilas.
3	Capaz de cuidar de si mesmo de forma limitada apenas, confinado à cama ou cadeira mais de 50% das horas em que fica acordado.	40	Incapacitado, requer cuidados especiais e assistência.	40	A maior parte do tempo na cama participa de atividades tranquilas.
		30	Gravemente incapacitado, indica-se hospitalização. Morte não iminente.	30	Acamado precisa de assistência para atividades tranquilas.
4	Totalmente incapacitado. Não consegue cuidar de si mesmo de maneira alguma. Totalmente confinado à cama ou cadeira	20	Muito enfermo, indica –se hospitalização. Morte não iminente.	20	Dorme frequentemente, atividades limitadas e passivas.
		10	Moribundo, processo fatais que progredem rapidamente.	10	Não sai da cama

## 2.6.2 Toxicidade Gastro – intestinais.

Tabela 10. Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) intestinais desenvolvidos pelo National Cancer Institute (NCI).<sup>64,65</sup>

	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
<b><u>Náusea</u></b>	Sem alteração	Perda de apetite sem alteração nos hábitos alimentares.	O consumo oral diminui, sem perda de peso significativa, Desidratação grau 1, pode-se indicar líquidos orais para <24 horas.	Ingestão calórica inadequada oral ou de líquidos.  Desidratação de grau 2, pode precisar de líquidos por via oral, sonda ou via venosa por >24h.	Consequências que podem ser fatais.
<b><u>Vômito</u></b>	Sem alteração	1 episódio em 24 horas.	2 – 5 episódios em 24 horas. Vai precisar líquidos por via oral < 24 horas.	6 o mais episódios em 24 horas. Vai precisar líquidos por via venosa	Consequências que podem ser fatais. Desidratação grave.
<b><u>Diarreia</u></b>	Sem alteração	Aumento de < 4 evacuações/dia. Tem que ser verificado as evacuações pré tratamento.	Aumento de 4 - 6 evacuações/dia. Ou evacuações noturnas.	Aumento de 7 ou mais evacuações/dia. Incontinência, ou necessidade de suporte parenteral.	Colapso hemodinâmico. Requer tratamento parenteral intensivo.
<b><u>Mucosite oral</u></b>	Sem alteração	Úlceras indolores, eritema ou irritabilidade leve na ausência de lesões.	Eritema doloroso, edema ou úlceras, mas consegue comer ou engolir.	Eritema doloroso, edema ou úlceras que requerem hidratação venosa.	Ulceração grave, ou requer suporte nutricional enteral, ou parenteral.

### 2.6.3 Toxicidade, Sintomas Constitucionais

Tabela 11. Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) para sintomas constitucionais desenvolvidos pelo National Cancer Institute (NCI).<sup>64,65</sup>

	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
<b><u>Fadiga (astenia, mal estar)</u></b>	Sem alteração	Aumento da fadiga com relação aos valores iniciais, mas não altera atividades normais.	Causa dificuldade para realizar algumas atividades ou redução do status de performance em 1 nível de ECOG, ou 20% na escala de Karnofsky.	Severa, dificuldade de realizar a maioria das atividades, ou redução do status de performance em 2 níveis de ECOG, ou 40% na escala de Karnofsky.	Confinamento à cama ou incapacitante
<b><u>Tremores</u></b>	Sem alteração	Leve, requer tratamento sintomático	Severo e ou prolongado, requer tratamento narcótico	Não responsivo à medicação narcótica	_____
<b><u>Suores (diaforese)</u></b>	Normal	Leve e ocasional	Frequente ou ensopado	_____	_____
<b><u>Perda de peso</u></b>	< 5%	5 - < 10%	10 - < 20%	> 20%	_____

### 2.6.4 Toxicidade, Medula Óssea

Tabela 12. Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) hematológica desenvolvidos pelo National Cancer Institute (NCI).<sup>64,65</sup>

	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
<b><u>Hemoglobina (Hg)</u></b>	Normal: 12 - 14 g/dl mulher 14 - 16 g/dl homem	10 - 12 g/dl	8 - 10 g/dl	6,5 - 8 g/dl	< 6,5 g/l
<b><u>Leucócitos</u></b>	Normal: 4000 - 10000 células/mm <sup>3</sup>	4000 - 3000 /mm <sup>3</sup>	3000 - 2000 /mm <sup>3</sup>	2000 1000 /mm <sup>3</sup>	< 1000 /mm <sup>3</sup>
<b><u>Neutrófilos</u></b>	Normal: 1500 - 3000 /mm <sup>3</sup>	2000 - 1500/mm <sup>3</sup>	1500 - 1000 /mm <sup>3</sup>	1000 - 500	< 500 /mm <sup>3</sup>
<b><u>Plaquetas</u></b>	Normal: 150000 - 400000/mm <sup>3</sup>	150000 - 75000/mm <sup>3</sup>	75000 - 50000/mm <sup>3</sup>	50000 - 25000/mm <sup>3</sup>	< 25000 /mm <sup>3</sup>

## 2.6.5 Toxicidade, Dermatologia

Tabela 13. Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) dermatológica desenvolvidos pelo National Cancer Institute (NCI).<sup>64,65</sup>

	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
<b><u>Alopecia</u></b>	Sem alteração	Leve perda de cabelo	Perda pronunciada de cabelo	_____	_____
<b><u>Alterações nas Unhas</u></b>	Sem alteração	Descoloração (coiloníquia) ou pitting	Perda parcial ou total da(s) unha(s) ou dor no leito ungueal	_____	_____
<b><u>Reação cutânea mão – pé</u></b>	Sem alteração	Alteração cutânea ou dermatite sem dor tipo eritema ou descamação	Alteração cutânea com dor, não interfere na função	Alteração cutânea com dor, interfere na função	
<b><u>Rash/ descamação</u></b>	Sem alteração	Erupção macular ou papular ou eritema sem sintomas	Erupção macular ou papular ou eritema com prurido que cobre < 50% do corpo. Descamação ou outras lesões que cobrem < 50% do corpo	Eritroderma generalizado sintomático ou erupção papular, vesicular ou descamação > 50% do corpo	Dermatite exfoliativa ou dermatite ulcerativa generalizada



## 2.6.6 Toxicidade Neurológica

Tabela 14. Critérios Comuns de Toxicidade (Common Toxicity Criteria) neurológica desenvolvidos pelo National Cancer Institute (NCI).<sup>64,65</sup>

	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
<b><u>Tontura</u></b>	Sem alteração	Não interfere na função	interfere na função, mais não interfere nas atividades da vida cotidiana	Interfere nas atividades da vida cotidiana	Confinamento a cama ou incapacitante
<b><u>Perda da memória</u></b>	Sem alteração	Perda da memória que não interfere na função	Perda da memória que interfere na função, mas não interfere nas atividades da vida cotidiana	Perda da memória que interfere nas atividades da vida cotidiana	Amnésia
<b><u>Neuropatia motora</u></b>	Sem alteração	Fraqueza subjetiva mas sem achados objetivos	Fraqueza objetiva leve que interfere na função, mas não interfere nas atividades da vida cotidiana	Fraqueza objetiva que interfere nas atividades da vida cotidiana	Paralisia
<b><u>Neuropatia sensorial</u></b>	Sem alteração	Perda dos reflexos profundos do tendão ou parestesia incluindo formigamento, mas não interfere na função	Perda sensorial objetiva ou parestesia incluindo formigamento, interfere na função, mas não interfere nas atividades da vida cotidiana	Perda sensorial ou parestesia que interfere nas atividades da vida diária	Perda sensorial permanente que interfere na função
<b><u>Tremor</u></b>	Sem alteração	Leve e breve ou intermitente, mas não interfere na função	Tremor moderado que interfere na função, mas não interfere nas atividades da vida cotidiana	Tremor severo que interfere nas atividades da vida cotidiana	—

### 3. JUSTIFICATIVA

O 5-FU é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento adjuvante, neoadjuvante ou paliativo no câncer colorretal, de mama, de estômago, cabeça e pescoço. Mesmo com o emprego de esquemas terapêuticos combinados, diversos estudos indicam uma ampla variabilidade na resposta ao tratamento antineoplásico, com alta incidência de pacientes com toxicidade severa.

A farmacocinética do 5-FU desempenha papel importante na determinação de sua eficácia e toxicidade, cujas variações na resposta podem estar relacionadas à atividade da enzima DPD, em consequência de polimorfismos nos genes *DPYD*. Deve-se destacar que a genotipagem isoladamente identifica apenas uma minoria de casos de deficiência de DPD. Outros fatores, como diferenças na absorção, distribuição e excreção do fármaco, peso, idade, sexo e ciclo circadiano também são responsáveis em parte pelas variações nos níveis plasmáticos de 5-FU. Portanto, devem ser associados testes funcionais, que possam avaliar globalmente a atividade da enzima. Desta forma, poder-se-á personalizar as doses a serem administradas aos pacientes.

Este trabalho tem por objetivo principal avaliar genotipicamente e fenotipicamente a enzima DPD, explorando matrizes biológicas alternativas ao sangue, no caso a saliva, em estudos de fenotipagem.

A identificação de pacientes portadores de deficiência de DPD poderá aumentar a segurança no uso destes fármacos, evitando mortes por toxicidade e permitindo uma individualização de sua administração. Além disto, a análise comparativa da performance de testes funcionais em amostras de sangue versus saliva, se confirmado o valor do uso deste último, poderá permitir uma coleta de amostras facilitada, não invasiva para a testagem.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a efetividade dos métodos de determinação da razão uracil e diidrouracil em plasma e saliva e a genotipagem para o gene *DPYD* como preditores de toxicidade por fluoropirimidinas em pacientes com neoplasias gastrointestinais.

### 4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Determinar os polimorfismos do gene *DPYD* e suas frequências na população estudada.
- Determinar a frequência de toxicidade severa à quimioterapia com fluoropirimidinas entre os pacientes estudados.
- Estimar as razões metabólicas endógenas de  $[UH_2]/[U]$  em plasma e saliva dos pacientes estudados.
- Correlacionar a atividade da DPD aos parâmetros de toxicidade do tratamento com fluoropirimidinas.
- Propor um valor de corte das razões metabólicas salivares de  $[UH_2]/[U]$  para a identificação *a priori* de pacientes predispostos a toxicidade severa às fluoropirimidinas.
- Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de U e  $UH_2$  em amostras de plasma e saliva.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Organização Mundial da Saúde. **Cause-specific mortality: regional estimates for 2008.** Genebra, 2011. Disponível em: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates\\_regional/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_regional/en/index.html)
  
- 2) Organização Mundial da Saúde. **Causes of death 2008: data sources and methods.** Genebra, 2011. Disponível em [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/cod\\_2008\\_sources\\_methods.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf)
  
- 3) Organização Mundial da Saúde. **Cause-specific mortality: regional estimates for 2008. Genebra, 2011.** Disponível em [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates\\_regional/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_regional/en/index.html).
  
- 4) International Agency for Research on Cancer. **Globocan 2013: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2013 Causes of death 2008: data sources and methods.** Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
  
- 5) Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. [Internet]. Rio de Janeiro: INCA. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil.** Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>
  
- 6) Lembersky BC et al. **Oral uracil and tegafur plus leucovorin compared with intravenous fluorouracil and leucovorin in stage II and III carcinoma of the colon: results from national surgical adjuvant breast and bowel project protocol C-06.** J ClinOncol 2006; 24:2059.
  
- 7) Haller, DG et al. **Phase III study of fluorouracil, leucovorin and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of intergroup 0089.** J ClinOncol 2005; 23:8671.
  
- 8) QUASAR Collaborative Group. **Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study.** Lancet 2007; 370:2020.
  
- 9) Haller, DG et al. **Phase III study of fluorouracil, leucovorin and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of intergroup 0089.** J ClinOncol 2005; 23:8671.

- 10) O'Connell, MJ et al. **Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer.** J ClinOncol 1997; 15:246.
- 11) de Gramont A et al. **Oxaliplatin/5FU/LV in adjuvant colon cancer: updated efficacy results of the MOSAIC trial, including survival, with a medium follow-up of six years.** 2007 ASCO annual meeting. Abstract 4007.
- 12) Goldberg RM et al. **Pooled analysis of safety and efficacy of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin administered bimonthly in elderly patients with colorectal cancer.** J ClinOncol 2006; 24:4085.
- 13) Andre, T et al. **Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer.** N Engl J Med 2004; 350:2343.
- 14) Tournigand, C et al. **FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study.** J ClinOncol 2004; 22:229.
- 15) Wolmark N et al. **A phase III trial comparing FULV to FULV + oxaliplatin in stage II or III carcinoma of the colon: survival results of NSABP protocol C-07.** 2008 ASCO annual meeting. LBA4005.
- 16) Kuebler JP et al. **Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07.** J ClinOncol 2007; 25:2198.
- 17) Falcone A et al. **Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The Gruppo Oncologico Nord Ovest.** J ClinOncol 2007; 25:1670.
- 18) Macdonald, JS et al. **Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction.** N Engl J Med 2001; 345:725
- 19) Malet-Martino M, Martino R. **Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review.** Oncologist 2002;7(4):288-323.

- 20) Alnaim L. **Individualization of 5-Fluorouracil in the Treatment of Colorectal Cancer**. SRX Pharmacology 2010;2010:1-12.
- 21) Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. [Internet]. Rio de Janeiro: **INCA; 2013. Tipos de Câncer: colorretal**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao>
- 22) Miller E C and Miller J A, Charles Heidelberger. **A Biographical Memoir**. National Academy of Sciences, Washington, 1989.
- 23) The Free Merriam – Webster Dictionary. **Fluorouracil - Definition and More**. Retrieved 2014; 11-19
- 24) Blaschke M, Cameron S, Emami K, Blumberg J, Wegner U, Nischwitz M, et al. **Measurement of 5-FU plasma levels in patients with advanced cancer: correct approach to practical procedures is essential**. Int J Clin Pharmacol Ther 2011;49(1):83-5.
- 25) Breda M, Barattè S. **A review of analytical methods for the determination of 5-fluorouracil in biological matrices**. Anal Bioanal Chem 2010;397(3):1191-201.
- 26) Cordier PY, Nau A, Ciccolini J, Oliver M, Mercier C, Lacarelle B, et al. **5-FU-induced neurotoxicity in cancer patients with profound DPD deficiency syndrome: a report of two cases**. Cancer Chemother Pharmacol 2011;68(3):823-6.
- 27) Lee A, Ezzeldin H, Fourie J, Diasio R. **Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: impact of pharmacogenetics on 5-fluorouracil therapy**. Clin Adv Hematol Oncol 2004;2(8):527-32.
- 28) Gamelin E, Delva R, Jacob J, Merrouche Y, Raoul JL, Pezet D, et al. **Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer**. J Clin Oncol 2008;26(13):2099-105.
- 29) Loganayagam A, Arenas-Hernandez M, Fairbanks L, Ross P, Sanderson JD, Marinaki AM. **The contribution of deleterious DPYD gene sequence variants to fluoropyrimidine toxicity in British cancer patients**. Cancer Chemother Pharmacol 2010;65(2):403-6.

- 30) Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, et al. **Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group.** *J Clin Oncol* 2008;26(13):2131-8.
- 31) van Staveren MC, Theeuwes-Oonk B, Guchelaar HJ, van Kuilenburg AB, Maring JG. **Pharmacokinetics of orally administered uracil in healthy volunteers and in DPD-deficient patients, a possible tool for screening of DPD deficiency.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68(6):1611-7.
- 32) Afzal S, Gusella M, Vainer B, Vogel UB, Andersen JT, Broedbaek K, et al. **Combinations of polymorphisms in genes involved in the 5-Fluorouracil metabolism pathway are associated with gastrointestinal toxicity in chemotherapy-treated colorectal cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2011;17(11):3822-9.
- 33) Deenen MJ, Meulendijks D, Cats A, Sechterberger MK, Severens JL, Boot H, Smits PH, Rosing H, Mandigers CM, Soesan M, Beijnen JH, and Schellens JH. **Upfront Genotyping of DPYD\*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis.** *J Clin Oncol* 2016, 34 (3) 227 – 234.
- 34) Yang CG, Ciccolini J, Blesius A, Dahan L, Bagarry-Liegey D, Brunet C, et al. **DPD-based adaptive dosing of 5-FU in patients with head and neck cancer: impact on treatment efficacy and toxicity.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;67(1):49-56.
- 35) Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C, Marinelli R, Barile C, Bononi A, et al. **Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer.** *Br J Cancer* 2009;100(10):1549-57.
- 36) McDade TW, Williams S, Snodgrass J. **What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research.** 2007; 4:899-925.
- 37) Ychou M, Duffour J, Kramar A, Debrigode C, Gourgou S, Bressolle F, et al. **Individual 5-FU dose adaptation in metastatic colorectal cancer: results of a phase II study using a bimonthly pharmacokinetically intensified LV5FU2 regimen.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;52(4):282-90.
- 38) Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E. **Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes.** *J Natl Cancer Inst* 2009;101(22):1543-52.

- 39) Ciccolini et al. **Rapid and Inexpensive Method for Anticipating Severe Toxicity to Fluorouracil and Fluorouracil-based Chemotherapy.** Ther Drug Monit 2006; 28 (5)678-685.
- 40) Mundstock EC. **Amostragem I. Cadernos de matemática e estatística – UFRGS, série B, nº 45, Porto Alegre, 2005.**
- 41) Cordier PY, Nau A, Ciccolini J, Oliver M, Mercier C, Lacarelle B, Peytel E. **5-FU-induced neurotoxicity in cancer patients with profound DPD deficiency syndrome: a report of two cases.** Cancer Chemother Pharmacol 2011; (68):823–826.
- 42) Ulrich CM, Bigler J, Velicer C et al. **Searching Expressed Sequence Tag Databases: Discovery and Confirmation of a Common Polymorphism in the Thymidylate Synthase Gene.** Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 2000(9)1381-1385.
- 43) Hoff PM, Royce M, Medgyesy D, et al: **Oral fluoropyrimidines.** Semin Oncol 1999; 26:640-646.
- 44) Dooley M, Goa KL: **Capecitabine.** Drugs 1999; 58: 69-76
- 45) Schuller J, Cassidy J, Dumont E, et al: **Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients.** Cancer Chemother Pharmacol 2000; 45: 291-297.
- 46) Langer C J, **The role of tegafur/uracil in pulmonary malignancy.** Drugs, 58 Suppl 3, 1999, pp. 71-75.
- 47) Ward S, Kaltenthaler E, Cowan J, Brewer N. **Clinical and cost-effectiveness of capecitabine and tegafur with uracil for the treatment of metastatic colorectal cancer.** Systematic review and economic evaluation in Health Technol Assess, vol. 7, nº 32.
- 48) Hoff, PM, Pazdur, R, Benner, SE, et al: **UFT and leucovorin: A review of its clinical development and therapeutic potential in the oral treatment of cancer.** Anticancer Drugs 1998; 9: 479-490.
- 49) Okabe, H, Toko, T, Saito, H, et al: **Augmentation on the chemotherapeutic effectiveness of UFT, a combination of tegafur (1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil) with uracil by oral 1-leucovorin.** Anticancer Res 1997; 17:157-164.



- 50) Carlsson G, Odin E, et al: **Pretherapeutic uracil and dihydrouracil levels in saliva of colorectal cancer patients are associated with toxicity during adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2014 Oct;74(4):757-63
- 51) Kobayakawa M, Kojima Y. **Tegafur/gimeracil/oteracil (S-1) approved for the treatment of advanced gastric cancer in adults when given in combination with cisplatin: a review comparing it with other fluoropyrimidine-based therapies.** *Onco Targets Ther.* 2011;4:193-201.
- 52) Miyazaki I, Kawai T, Harada Y, Moriyasu F. **A predictive factor for the response to S-1 plus cisplatin in gastric cancer.** *World J Gastroenterol.* 2010 Sep 28;16 (36):4575-82.
- 53) Matt P, van Zwieten-Boot B, Calvo Rojas G, Ter Hofstede H, Garcia-Carbonero R, Camarero J, Abadie E, Pignatti F. **The European Medicines Agency review of Tegafur/Gimeracil/Oteracil (Teysuno™) for the treatment of advanced gastric cancer when given in combination with cisplatin: summary of the Scientific Assessment of the Committee for medicinal products for human use (CHMP).** *Oncologist.* 2011;16 (10):1451-7.
- 54) Kristensen MH, Pedersen P, Mejer J. **The value of Dihydrouracil / Uracil Plasma Ratios in Predicting 5 – Fluorouracil related toxicity in colorectal cancer patients.** *The Journal of International Medical Research.* 2010; 38: 1313 – 1323.
- 55) Launay M, Duval M, Dahan L. **Beating the odds: efficacy and toxicity of dihydropyrimidine dehydrogenase –driven adaptive dosing of 5 FU in patients with digestive cancer.** *Br J Clin Pharmacol.* 2016 Jan;81(1):124-30.
- 56) Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Colangelo LH, Lopa SH, Petrelli NJ, Goldberg RM, Atkins JN, Seay TE, Fehrenbacher L, O'Reilly S, Chu L, Azar CA, Wolmark N. **Initial safety report of NSABP C-08: A randomized phase III study of modified FOLFOX6 with or without bevacizumab for the adjuvant treatment of patients with stage II or III colon cancer.** *J Clin Oncol.* 2009 Jul 10;27(20):3385-90. Epub 2009 May 4.

- 57) Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, Smyrk TC, Sinicrope FA, Chan E, Gill S, Kahlenberg MS, Shields AF, Quesenberry JT, Webb TA, Farr GH Jr, Pockaj BA, Grothey A, Goldberg RM. **Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial.** JAMA. 2012 Apr 4;307(13):1383-93.
- 58) Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M, Maroun J, Walde D, Weaver C, Harrison E, Burger HU, Osterwalder B, Wong AO, Wong R. **Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study.** J Clin Oncol. 2001 Apr 15;19(8):2282-92.
- 59) Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, Bugat R, Findlay M, Frings S, Jahn M, McKendrick J, Osterwalder B, Perez-Manga G, Rosso R, Rougier P, Schmiegel WH, Seitz JF, Thompson P, Vieitez JM, Weitzel C, Harper P; Xeloda Colorectal Cancer Study Group. **Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study.** J Clin Oncol. 2001 Nov 1;19(21):4097-106.
- 60) Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F, Saltz L. **Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer.** J Clin Oncol. 2008 Apr 20;26 (12):2006-12.
- 61) Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F, Cassidy J. **Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study.** J Clin Oncol. 2008 Apr 20; 26 (12):2013-9.
- 62) De Vita V, Lawrence T, Rosenberg S. **Cancer. Principles and Practice of Oncology 10th edition.**
- 63) Saad E, Hoff P, Carnelós R, Katz A. **Crítérios Comuns de Toxicidade do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, Common toxicity criteria of the National Cancer Institute.** Revista Brasileira de Cancerologia, 2002, 48(1): 63-96.
- 64) Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. **5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies.** Nature Reviews Cancer, may 2003, 330-338 .

## 6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigo submetido - Clinica Chimica Acta

### **Endogenous plasma and salivary uracil to dihydrouracil ratios and *DPYD* genotyping as predictors of severe fluoropyrimidine toxicity in patients with gastrointestinal malignancies**

Andrés Fernando Andrade Galarza<sup>a,b</sup>, Rafael Linden<sup>c</sup>, Marina Venzon Antunes<sup>c</sup>, Roberta Zilles Hahn<sup>c</sup>, Anelise Schneider<sup>c</sup>, Suziane Raymundo<sup>c</sup>, Rodrigo Staggemeier<sup>c</sup>, Fernando Rosado Spilki<sup>c</sup>, Gilberto Schwartzmann<sup>a,b \*</sup>

<sup>a</sup>Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Oncologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the use of plasma and saliva uracil (U) to dihydrouracil (UH<sub>2</sub>) metabolic ratio and *DPYD* genotyping, as a means to identify patients with dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency and fluoropyrimidine toxicity. **Methods:** Paired plasma and saliva samples were obtained from 60 patients with gastrointestinal cancer, before fluoropyrimidine treatment. U and UH<sub>2</sub> concentrations were measured by LC-MS/MS. *DPYD* was genotyped for alleles \*2A; Y186C; I560S, Y186C and \*7. **Results:** 35% of the patients had severe toxicity. There was no variant allele carrier for *DPYD*. The [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios were 0.09-26.73 in plasma and 0.08-24.0 in saliva, with higher correlation with toxicity grade in saliva compared to plasma (rs=-0.515 vs rs=-0.282). Median metabolic ratios were lower in patients with severe toxicity as compared to those with absence of toxicity (0.59 vs 2.83 plasma; 1.62 vs 6.75 saliva, P<0.01). A cut-off of 1.16 for salivary ratio was set (AUC 0.842), with 86% sensitivity and 77% specificity for the identification of patients with severe toxicity. Similarly, a plasma cut-off of 4.0 (AUC 0.746), revealed a 71% sensitivity and 76% specificity. **Conclusions:** *DPYD* genotyping for alleles \*2A; Y186C; I560S, Y186C and \*7 was not helpful in the identification of patients with severe DPD deficiency in this series of patients. The [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios, however, proved to be a promising functional test to identify the majority of cases of severe DPD deficiency, with saliva performing better than plasma.

**Keywords** Dihydrouracil; uracil; dihydropyrimidine dehydrogenase; *DPYD*; fluoropyrimidine; toxicity

## Highlights

- The limited sensibility of *DPYD* genotyping significantly limits its clinical use.
- Plasma and salivary DPD tests can detect patients at risk of severe toxicity
- Salivary [UH<sub>2</sub>]/[U] ratio performed better than plasma
- Salivary test had 85.7% sensitivity and 76.9% specificity to predict severe toxicity

## 1. INTRODUCTION

Since its introduction more than 50 years ago, 5-fluorouracil (5-FU) has become a component of the standard therapy for a variety of solid tumors, particularly gastrointestinal cancers [1]. The overall response rate for 5-FU, as a single agent in advanced colorectal cancer, is quite limited (approximately 10 to 20%). However, over the years, its association with folinic acid and other cytotoxic agents, such as oxaliplatin and irinotecan [2], and, more recently, with target therapies such as bevacizumab and cetuximab, have produced objective tumor responses in up to 50% of cases [3].

5-FU is a pro-drug metabolized via anabolic and catabolic routes. The anabolic pathway is responsible for the intracellular conversion of 5-FU to its active metabolites: fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP), fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP) and fluorouridine triphosphate (FUTP). These metabolites, particularly FdUMP, inhibits RNA synthesis and thymidylate synthase (TS), a key enzyme for DNA synthesis [4]. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) mediates the conversion of 5-FU to dihydrofluorouracil (DHFU), being the rate-limiting step of 5-FU catabolism in both normal and tumor cells. Up to 80% of administered 5-FU is broken down by DPD in the liver, while the remaining proportion of the administered dose is excreted directly in the urine [5].

The standard approach for calculating 5-FU drug dosage has been to use body surface area ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ). Unfortunately, there is no rigorous scientific basis for this strategy, which has been associated with considerable variability in plasma 5-FU levels [6]. Considering an optimal target exposure of  $20\text{--}30 \text{ mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ , only 20% to 30% of patients have 5-FU levels that are in the appropriate therapeutic range, while approximately 40% to 60% of patients are under-dosed and 10% to 20% over-dosed. Such inter-patient as well as intra-patient pharmacokinetic variability is a major contributor to patient toxicity and treatment failure [6]. Adverse events following 5-FU administration include hematologic (leukopenia or neutropenic fever), gastrointestinal (mucositis, stomatitis, diarrhea, nausea and vomiting), neurologic and, less frequently, dermatologic and cardiac toxicities [7]. Previous studies revealed that up to 30% of patients experience severe toxicities following 5-FU administration, with 0.5% to 3% toxic deaths [8–11].

As DPD accounts for about 80% of the metabolic inactivation of 5-FU, DPD deficiency has been recognized as an important risk factor predisposing patients to the development of severe toxicity. In a retrospective study, Ciccolini *et al.* (2006) demonstrated that 71% of severe toxicities and 80% of toxic deaths could be related to functional DPD deficiency [12]. Thus, the assessment of individual DPD activity has been proposed as a means to individualize 5-FU administration before the first dose [10,12,13,14,15,16].

DPD is encoded by the gene *DPYD* and variants *in DPYD* may cause a decreased DPD activity. Although prospective *DPYD* genotyping was suggested as a valuable tool to identify patients with DPD deficiency, and thus at risk for severe and potential life-threatening toxicity, results of genotyping studies have not yet been fully implemented in daily clinical care.

Genotypic studies focusing on the identification of *DPYD* polymorphisms have produced so far controversial results. Some studies reported that variant allele carriers are at increased risk of developing severe toxicity [7,13,17,18], while other reports fail to confirm such association [12,19,20]. Furthermore, using current genotypic methods, *DYPD* gene abnormalities can only be identified in about 20% of cases. Thus, there must be other reasons why some patients have more side effects than others.

Alongside *DPYD* genotyping, several phenotypic methods have been proposed for establishing, indirectly, the presence or absence of a DPD deficiency status. These approaches have mainly focused on the measurement of endogenous plasma uracil (U) to dihydrouracil (UH<sub>2</sub>) ratio [13,14,12,21,22] or, alternatively, the ratio at defined time points after administration of a loading dose of U [23,24].

DPD-deficient patients are expected to present small ratios, both due to the accumulation of U or reduced synthesis of UH<sub>2</sub>. Monitoring the [UH<sub>2</sub>]/[U] ratio and comparing it with a toxicity cut-off value, determined from a reference population, should allow the detection of patients at risk and subsequently lead to a possible dose adjustment [10].

An important limitation of plasma-based phenotype is the poor stability of U in blood samples, requiring immediate centrifugation or the addition of preservatives [25]. Recently, Carlson *et al.* (2014) described the evaluation of endogenous [UH<sub>2</sub>]/[U] ratios in saliva of patients under fluoropyrimidine chemotherapy, describing significant

differences between patients with or without severe toxicity [26]. However, the authors had not evaluated the diagnostic performance of the test.

Even considering the availability of several approaches to predict DPD activity in patients scheduled to receive fluoropyrimidine-based chemotherapy, the sensitivity and specificity of determining DPD status on a genotypic or a phenotypic basis still remains uncertain, as well as their comparative performance.

In the present study, our objective was to evaluate and compare two DPD phenotyping strategies, namely using endogenous  $[UH_2]/[U]$  ratios in plasma and saliva, as well as *DPYD* genotyping for the most common alleles *\*2A*; *Y186C*; *I560S*, *Y186C*, as predictive tests for fluoropyrimidine toxicity in patients with gastrointestinal malignancies.

## 2. METHODS

### 2.1 Study Population and Data Collection

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (approval number 402.139). After informed consent, 60 adult patients diagnosed with digestive cancer (colorectal, stomach or pancreas) were enrolled in the study between July 2014 and July 2015. All patients were scheduled for adjuvant, neoadjuvant or palliative chemotherapy with a fluoropyrimidine-containing regimen, and none had received a fluoropyrimidine before. Patients with kidney, liver or heart dysfunctions and prolonged use of corticosteroids were excluded. Data on age, gender, weight, body mass index (BMI), body surface area (BSA) and race were recorded.

Blood and saliva samples were taken before the first chemotherapy cycle for the evaluation of DPD functional status and genotyping analysis. An 8 mL sample of venous blood was drawn into 2 tubes containing EDTA as anticoagulant, with patients being fasten for 8 hours. One tube was immediately centrifuged and the plasma transferred to 2 mL polypropylene tube, the other EDTA tube was reserved for genotyping analysis. The saliva sample was collected at the same time by chewing on for 2 min the cotton wool swabs of a commercial saliva collecting device (Salivette<sup>®</sup>, Sarstedt, Germany). Immediately after, the collecting device was centrifuged and the

saliva transferred to a 2 mL polypropylene tube. Sample collection was performed between 8:00 and 9:00 a.m.

Plasma, saliva and whole blood samples were stored at -70 °C until analysis.  $[UH_2]/[U]$  metabolic ratios were calculated after the quantification of U and  $UH_2$  in plasma and saliva samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Toxicity was monitored using the standard Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v. 4.0, including mild (grade 1), moderate (grade 2) and severe (grade 3 and 4) neutropenia, mucositis, diarrhea, nausea/vomiting, cutaneous rash or other 5-FU related adverse event. Blood cell counts were performed two days prior to the second chemotherapy cycle. In case of grade 3 toxicity, treatment was interrupted until toxic manifestations disappeared, treatment being restarted with a 25% dose reduction of 5-FU or capecitabine. In cases of grade 4 toxicity, treatment was interrupted until toxic manifestations were resolved and treatment was then restarted with a decrease of 50% of capecitabine or 5-FU, without bolus administration.

## **2. 2 Determination of *U* and *UH<sub>2</sub>* concentrations in plasma and saliva**

Plasma and saliva concentrations of U and  $UH_2$  were measured by LC-MS/MS after a simple liquid-liquid extraction. Briefly, a 500  $\mu$ L aliquot of plasma or saliva was transferred to 5 mL polypropylene tube added with 100  $\mu$ L of internal standard solution 5-fluorouracil (5-FU) 0.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, followed by 30 s of vortex mixing. After, proteins were precipitated with 500 mg of ammonium sulfate, followed for 1 min of vortex mixing. The resulting mixture was added with 3.5 mL of a mixture of ethyl acetate and isopropanol (85:15, v/v) and mixed for 10 min in a rotatory mixer at 50 rpm. After 10 min centrifugation at 3000 g, 3 mL of the supernatant was transferred to an evaporation tube and dried at 60 °C under vacuum. The dried extract was reconstituted with 100  $\mu$ L of ultrapurified water and centrifuged for 10 min at 10.000 g.

An aliquot of 25  $\mu$ L of supernatant was injected into an Ultimate 3000 XRS UHPLC system (Thermo Scientific, San Jose, USA). Separation was performed in an Acquity C18 column (150  $\times$  2.6 mm, p.d. 1.7  $\mu$ m) from Waters (Milford, USA), maintained at 10 °C and eluted at a mobile phase flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. The mobile phase consisted of acetic acid 0.5% (eluent A) and acetonitrile plus 0.1% formic acid



(eluent B). Initial eluent composition was 96% A, maintained for 2.5 min, and followed by a linear 1.0 min ramp to 50%, which was maintained for 2.0 min. The mobile composition returned to 96% A at 6.5 min. Equilibration time was 4.5 min. Detection was performed in a TSQ Quantum Access triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, USA). The MS conditions were as follows: electrospray ionization (ESI), positive mode, capillary voltage of 4 kV; sheath gas, nitrogen at a flow rate of 60 arbitrary units; auxiliary gas, nitrogen at flow rate of 50 arbitrary units; collision gas, argon; vaporizer temperature, 202 °C; and ion transfer capillary temperature, 250 °C. The scan time was set at 0.1 s per transition. The following transitions were used for MRM acquisition: U  $m/z$  113→70 (quantitation) and  $m/z$  113→40 and 113→96 (qualification); UH<sub>2</sub>  $m/z$  115→70 + 115→30 (quantitation) and  $m/z$  115→55 (qualification); 5-FU  $m/z$  131→114 (quantitation) and  $m/z$  131→58 and 131→67 (qualification). Collision energies were 13, 33 and 14 eV for U; 15, 17 and 19 eV for UH<sub>2</sub>; 13, 26 and 14 eV for 5-FU. The analytical method was validated and allowed a satisfactory separation of U and UH<sub>2</sub> in both matrices. The method was linear from 5 to 1000 ng mL<sup>-1</sup> with LLOQ of 5 ng mL<sup>-1</sup> for U and 10 ng mL<sup>-1</sup> for UH<sub>2</sub> in both matrices. Accuracy was in the range of 91.3-103.4 % and 89.9-103.1%, and within and between assay coefficients of variation were in the range of 3.8-10.4% and 2.9-8.7% for plasma and saliva, respectively.

### 2.3 *DYPD* genotyping

Since Brazilian population is highly heterogeneous, as a result of a large population mixing from European, African and Amerindian origins, *DPYD* genotyping assays included the most studied variant alleles *DPYD*\*2A; \*13, Y186C; I560S, \*7; Y186C and I560S variant alleles which are highly frequent (26%) in African-Americans patients with reduced DPD activity [27]. Genomic DNA was extracted and purified from 200 µl of whole blood using PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) according to manufacturer's directions. The DNA concentration was measured using Qubit® 2.0 Fluorometer (Cat. no. Q32866). Patients were tested for five *DPYD* polymorphisms *DPYD* \*2A (c.1905+1G>A, rs3918290); \*13 (1679T>G, rs55886062), Y186C (rs115232898); I560S (rs55886062) and \*7 (rs72549309). Genotyping was performed using a TaqMan® Genotyping Master Mix with TaqMan genotyping assays (Applied Biosystems) in a StepOne Plus Real Time PCR system (Life Technologies, Carlsbad,

California, USA) according to manufacturer's directions. The amount of DNA engaged in the PCR reaction was standardized at 1–20 ng per well. The polymorphisms were genotyped using TaqMan® SNP Genotyping Assays (rs72549309) and TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay (rs3918290, rs55886062, rs115232898, rs55886062). Allele discrimination was performed using StepOne software v2.3. Three patterns of inherited alleles are possible for autosomal codominant genes: (1) two wild type alleles, which give normal levels of DPD activity (2) one variant allele and one wild type allele, which results in 50% reduction in activity (3) two variant alleles where DPD activity is completely lacking. These correspond to high, intermediate, and low (deficient) enzyme activity [28].

## 2.4 Statistical analysis

Descriptive analysis was performed for all variables, including the Shapiro-Wilk test for normal distribution. Uracil and UH<sub>2</sub> plasma and salivary concentrations, as well as [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios were compared among toxicity groups (absent; mild/moderate: grade 1 to 2; and severe: grade 3 to 4), with Kruskal-Wallis test, followed by Mann-Whitney test. Quantitative variables were associated in Spearman correlation analysis. The predictive power of severe toxicity from [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios was evaluated using logistic regression, including demographic variables at the model. Chi-square or Fisher exact tests were used to examine associations between groups of toxicity and demographic variables as gender, race, 5-FU scheme (bolus, infusion and oral). In addition, receiver operating characteristic (ROC) curves were set to evaluate the diagnostic performance of [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios in plasma and saliva, as well as Uracil and UH<sub>2</sub> concentrations, to determine a threshold for identifying patients with 5-FU-related severe toxicity. The agreement between identification of patients with severe toxicity by plasma and saliva [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios cut-offs was evaluated by Kappa test. Statistical analyses were performed with Medcalc version 12.3 (Ostend, Belgium) and SPSS version 17, P<0.05 were considered statistically significant.

### 3. RESULTS

Sixty patients (n=23 women and n=37 men) with gastrointestinal cancer (gastric, n=2; colon, n=38; rectal n=18; and pancreatic cancer, n=2) were enrolled in the study. Demographic and clinical characteristics of the patients are listed in the supplementary material (Table S1). The mean age was 61 years (33 to 86), BMI was 25.01 kg/m<sup>2</sup> (15.4 to 37.3) and BSA was 1.74 m<sup>2</sup> (1.37 to 2.29). Most of the patients were white (71.7 %), with a smaller representation of other ethnic groups (15% brown and 13.3% black).

Thirteen patients (21.6%) had no 5-FU-related toxicity, 43.3% developed mild or moderate (n=15 grade 1; n=11 grade 2) and 35% severe adverse events (n=6 grade 3; n=15 grade 4). There was no statistically significant difference in the prevalence of severe toxicity between gender (43.5% women vs 29.5% men, P=0.209) or race (34.9% white vs 50% black vs 22.2 % brown, P=0.487). Neutropenia was the most frequent (52.4%) adverse event in patients with severe toxicity, followed by diarrhea (23.8%), mucositis (14.3%) and nausea and vomiting (14.3%).

Most individuals (63.3%) were under infusion regimen (FOLFOX, n=35; FOLFIRI, n=1; 5-FU-cisplatin, n=1; FOLFIRINOX, n=1), while some received bolus (18.3%) (LV-5-FU, n=11) and oral (18.3%) regimens (CapeOx, n=5; Capecitabine, n=6). We found a significant association between general toxicity and 5-FU scheme, 26.3% of patients under infusion, 63.3% bolus and 36.4% oral regimen had severe toxicity (P<0.05). However, such association was not evident when evaluating neutropenia alone, 13.5% of patients under infusion, 30.8% bolus and 20% oral regimen had severe neutropenia (P=0.38). Similarly, no differences on severe nausea and vomiting alone or diarrhea alone were found among 5-FU regimens (Grade 3/4 nausea/vomiting: 13.5% of infusion, 18.2% bolus and 9.1% of oral regimen patients, P=0.82; Grade 3/4 diarrhea: 10.5% infusion, 18.2% bolus and 18.2% oral regimen, P=0.702).

In this study, the genotyping analysis was not able to identify patients at risk of toxicity associated to DPD deficiency. Although we screened for the main *DPYD* polymorphic alleles \*2A; \*13, Y186C; I560S and \*7, which had been previously associated with impaired DPD metabolism, we found no variant allele carrier in our series. Therefore, no statistical comparison of genotyping and phenotyping approaches for predicting 5-FU-related severe toxicity could be performed.

U and UH<sub>2</sub> plasma and salivary concentrations were not normally distributed ( $W=0.45$ ,  $P < 0.001$  and  $W=0.96$ ,  $P < 0.05$  for plasma and  $W=0.72$ ,  $P < 0.001$  and  $W=0.75$ ,  $P < 0.001$  for saliva, respectively). U plasma levels ranged from 4.51 to 1,093 ng mL<sup>-1</sup> with a median of 15.15 ng mL<sup>-1</sup> (95% CI 8.59-18.65 ng mL<sup>-1</sup>) and UH<sub>2</sub> plasma concentrations ranged from 8.58 to 161.32 ng mL<sup>-1</sup> with a median of 74.86 ng mL<sup>-1</sup> (95% CI 62.64-86.46 ng mL<sup>-1</sup>). While U concentrations in saliva ranged from 4.61 to 858.00 ng mL<sup>-1</sup> with a median of 73.90 ng mL<sup>-1</sup> (95% CI 57.81-131.99 ng mL<sup>-1</sup>) and UH<sub>2</sub> ranged from 5.83 to 1075.80 ng mL<sup>-1</sup> with a median of 130.20 ng mL<sup>-1</sup> (95% CI 85.35-177.98 ng mL<sup>-1</sup>).

DPD functional test showed a marked difference of 297 times between the lowest (0.09) and the highest (26.73) plasma [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratio. Salivary [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios were also highly variable among patients, with a 300 times difference was found between the lowest (0.08) and the highest (24.00) values. Both plasma and salivary [UH<sub>2</sub>]/[U] ratios were not normally distributed ( $W= 88$ ,  $P < 0.001$  and  $W= 0.66$ ,  $P < 0.001$ , respectively).

Table 1 shows the correlation analysis of study variables, including age, BMI, toxicity grade, U and UH<sub>2</sub> plasma and salivary concentrations and [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios. In the study group, age and BMI were not associated to DPD metabolism, evaluated as [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratio, neither to toxicity grade. Salivary and plasma [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios were moderately correlated ( $r_s=0.567$ ,  $P < 0.01$ ). DPD metabolism, assessed as [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratio, was inversely correlated to toxicity degree.

In this study, saliva had a greater association with fluoropyrimidine related toxicity in comparison with plasma, that was only weakly correlated to adverse event grade ( $r_s=-0.515$ ,  $P < 0.01$  vs  $r_s=-0.282$ ,  $P < 0.05$ , respectively). U alone had no association to toxicity degree in either plasma or saliva. On the contrary, the concentration of its DPD mediated metabolite UH<sub>2</sub> demonstrated a significant association with toxicity degree, with Spearman correlation coefficients ( $r_s=-0.533$  for saliva and  $r_s=-0.323$  for plasma) similar to those obtained with [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios. In addition, the multivariate logistic regression analysis, with severe toxicity set as categorical dependent variable, indicated that salivary [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratio was the only factor statistically significant in this model (coefficient=-0.955, Wald=5.300,  $P=0.021$ ).

**Table 1.** Correlations between study variables, data area represented as Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ) and 95% confidence interval (N=60).

	$r_s$ (CI 95%)							
	Age	BMI	Adverse event grade	Uracil plasma	UH <sub>2</sub> plasma	[UH <sub>2</sub> ]/[U] plasma	Uracil saliva	UH <sub>2</sub> saliva
<b>BMI</b>	0.091 (-0.167 – 0.337)							
<b>Adverse event grade</b>	0.029 (-0.227 – 0.281)	0.036 (-0.220 – 0.288)						
<b>Uracil plasma</b>	0.209 (-0.048 – 0.439)	0.009 (-0.245 – 0.262)	0.086 (-0.171 – 0.333)					
<b>UH<sub>2</sub> plasma</b>	0.112 (-0.014 – 0.356)	-0.0653 (-0.314 – 0.192)	<b>-0.323*</b> (-0.533 – -0.075)	0.164 (-0.094 – 0.401)				
<b>[UH<sub>2</sub>]/[U] plasma</b>	-0.166 (-0.403 – 0.092)	-0.111 (-0.355 – -0.147)	<b>-0.282*</b> (-0.500 – -0.030)	<b>-0.829**</b> (-0.894 – -0.728)	<b>0.329**</b> (0.082 – 0.538)			
<b>Uracil saliva</b>	0.125 (-0.133 – 0.367)	0.159 (-0.099 – 0.397)	0.048 (-0.208 – 0.298)	<b>0.369**</b> (0.126 – 0.569)	-0.052 (-0.302 – 0.204)	<b>-0.350**</b> (-0.555 – -0.106)		
<b>UH<sub>2</sub> saliva</b>	0.052 (-0.205 to 0.302)	0.095 (-0.163 – 0.341)	<b>-0.533**</b> (-0.693 – -0.323)	-0.077 (-0.324 – 0.181)	<b>0.319*</b> (0.071 – 0.530)	<b>0.277*</b> (0.025 – 0.496)	<b>0.439**</b> (0.209 – 0.624)	
<b>[UH<sub>2</sub>]/[U] saliva</b>	-0.043 (-0.294 – 0.213)	-0.122 (-0.365 – 0.136)	<b>-0.515**</b> (-0.680 – -0.300)	<b>-0.369**</b> (-0.569 – -0.127)	<b>0.379**</b> (0.138 – 0.577)	<b>0.567**</b> (0.376 – 0.724)	<b>-0.627**</b> (-0.760 – -0.443)	<b>0.353**</b> (0.109 – 0.557)

BMI: body mass index; U: uracil, UH<sub>2</sub>: dihydrouracil.

Significant correlations are shown in boldface. \*P ≤ 0.05 e \*\*P ≤ 0.01

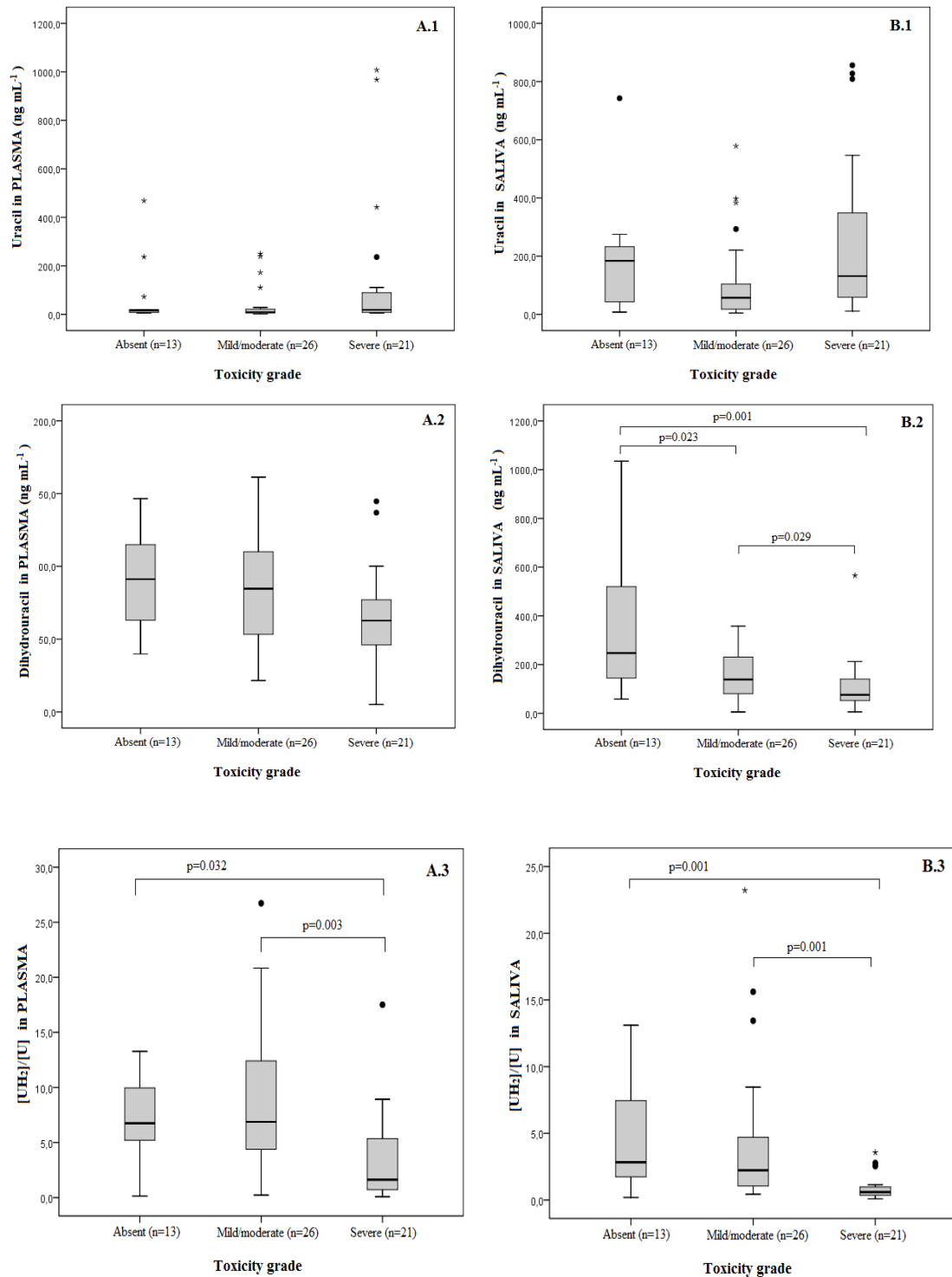
Table 2 presents plasma and salivary U and UH<sub>2</sub> concentrations, as well as [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios, according to toxicity groups (individual data from the 60 patients are presented in supplementary material, Table S1). Salivary UH<sub>2</sub> concentrations diminished proportionally to the increase of adverse events grade (P=0.001), similar observation was found for plasma, however it was not statistically significant (P=0.077). As expected, median plasma and salivary [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios were significantly lower in severe toxicity patients compared with those with mild/moderate adverse events or without toxicity (P=0.007 and P=0.001, respectively). In contrast, U levels demonstrated to have no relation with toxicity grade. Box-plot charts of U and UH<sub>2</sub> concentrations and [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios according to toxicity grade are shown in Figure 1.

**Table 2.** Uracil, dihydrouracil and [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios in plasma and saliva samples, according to adverse events grade, data are represented as median (25 and 75 percentiles) (N=60).

Adverse events	PLASMA (Median P25-P75)			SALIVA (Median P25-P75)		
	Uracil ng mL <sup>-1</sup>	Dihydrouracil ng mL <sup>-1</sup>	[UH <sub>2</sub> ]/[U] ratio	Uracil ng mL <sup>-1</sup>	Dihydrouracil ng mL <sup>-1</sup>	[UH <sub>2</sub> ]/[U] ratio
Absent (n=13)	16.40 (7.36-46.30)	91.20 (61.23-116.75)	6.75 <sup>b</sup> (3.01-11.09)	184.0 <sup>a,b</sup> (39.90-241.75)	247.40 <sup>c</sup> (130.00-571.95)	2.83 <sup>b</sup> (1.45-7.94)
Grade 1 & 2 (n=26)	9.40 (5.71-22.38)	84.66 (52.78-110.89)	6.88 <sup>b</sup> (4.08-12.94)	57.15 <sup>a</sup> (16.96-107.55)	138.72 <sup>b</sup> (79.53-235.52)	2.22 <sup>b</sup> (1.05-5.02)
Grade 3 & 4 (n=21)	18.60 (7.96-100.00)	62.72 (45.29-80.85)	1.62 <sup>a</sup> (0.65-5.55)	131.59 <sup>b</sup> (57.10-403.38)	75.60 <sup>a</sup> (48.25-144.55)	0.59 <sup>a</sup> (0.33-1.00)
P	0.236	0.077	0.007	0.059	0.001	0.001

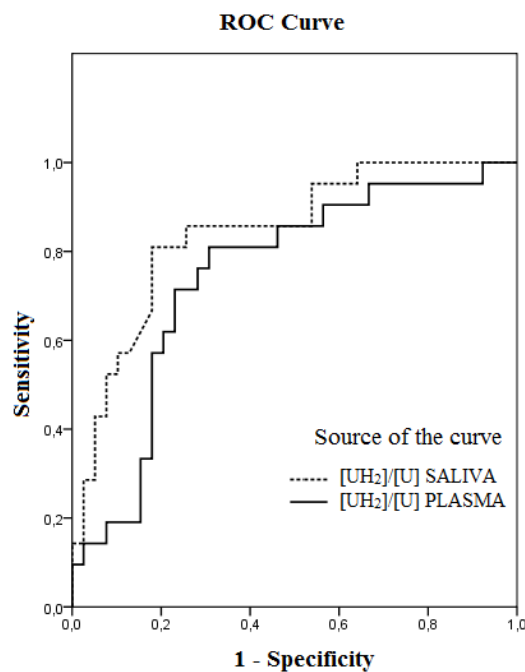
P value as Kruskal-Wallis test ( $\alpha = 0.05$ )

(<sup>a,b</sup>-same letter in the column do not differ in at 5 % of significance )



**Figure 1.** Uracil and dihydrouracil plasma and salivary concentrations and metabolic ratios according to toxicity grade. A.1 uracil in plasma; A.2 dihydrouracil in plasma; A.3 [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratio in plasma; B.1 uracil in saliva; B.2 dihydrouracil in saliva; B.3 [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratio in saliva. P values for Mann-Whitney test, data are represented as median, 25 -75 percentiles, and range.

The diagnostic capability of salivary and plasma  $[UH_2]/[U]$  metabolic ratios to identify patients predisposed to 5-FU-related severe toxicity was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curves (Figure 2). The ROC curve for plasma  $[UH_2]/[U]$  ratio had an area under the curve (AUC) of 0.737 (95% CI of 0.615 to 0.877,  $P=0.002$ ), whereas the salivary metabolic ratio presented an AUC of 0.855 (95% CI 0.739 to 0.946,  $P=0.001$ ). The difference found between plasma and saliva AUC 0.118 (95% CI -0.0504 to 0.246) was not statistically significant ( $P=0.16$ ). In addition, the agreement between identification of possible patients with severe toxicity using plasma and salivary cut-off was satisfactory (Kappa=0.557,  $P<0.001$ ), in fact 66.7% of the true-positive severe toxicity patients were identified in both tests simultaneously.



**Figure 2.** Receiver operating characteristics (ROC) curves of  $[UH_2]/[U]$  plasma and salivary metabolic ratios to identify patients with 5-FU-related severe toxicity.

Sensitivity and specificity of DPD functional tests to identify patients with 5-FU-related severe toxicity were set using the cut-off selected after the ROC analysis. A salivary  $[UH_2]/[U]$  metabolic ratio below 1.16 has 85.7% sensitivity and 79.0% specificity to identify patients with severe toxicity. Setting a slightly lower cut-off value for the saliva  $[UH_2]/[U]$  ratio (1.04) produced a slightly improved specificity (84.6%), but lowered sensitivity to 81.0%. Besides the comparability of ROC curve areas obtained from plasma and saliva, the diagnostic performance of the plasma DPD functional test



([UH<sub>2</sub>]/[U] cut-off 4.0) was marginally inferior than saliva, with a 71.4% sensitivity and 76.9% specificity, representing an increase of 14% of possible false negatives. In addition, positive and negative predictive values of the salivary test were slightly higher (69.2% and 91.2%) than those obtained from the plasma test (60% and 82.9%), data were estimated considering the prevalence of severe toxicity obtained in the study.

Considering the association between toxicity and treatment regimen, we evaluated the DPD functional tests performances according to the different chemotherapy regimens (Table 3). There was a significant association between the chemotherapy regimen and the salivary test performance ( $P=0.038$ ), assessed as the frequencies of true or false-positives and true or false-negatives. Since the positive and negative predict values were higher for the functional test performed with data from patients under infusion regimen compared to bolus, we performed an additional ROC curve using data solely from patients under infusion regimen. The AUC of 0.941 ( $P<0.001$ ;  $n=38$ ) was similar to the curve obtained with data from the three regimens, resulting in the same cut-off value of 1.16, but with higher sensitivity and specificity (90% and 88%, respectively).

**Table 3.** Salivary and plasma DPD functional tests performances according to chemotherapy regimen (N=60)

	Infusion (n=38)	Bolus (n=11)	Oral (n=11)	Total (N=60)
<b>Salivary cut-off 1.16</b>				
True-negative % (n)	65.8 (25)	18.2 (2)	36.4 (4)	51.7 (31)
True-positive % (n)	23.7 (9)	45.5 (5)	36.4 (4)	30.0 (18)
False-negative % (n)	2.6 (1)	18.2 (2)	0.0 (0)	5.0 (3)
False-positive % (n)	7.9 (3)	18.2 (2)	27.3 (3)	13.3 (8)
			<i>P=0.038</i>	
<b>Plasma cut-off 4.00</b>				
True-negative % (n)	57.9 (22)	36.4 (4)	27.3 (3)	48.3 (29)
True-positive % (n)	15.8 (6)	45.5 (5)	36.4 (4)	25.0 (15)
False-negative % (n)	10.5 (4)	18.2 (2)	0.0 (0)	10.0 (6)
False-positive % (n)	15.8 (6)	0.0 (0)	36.4 (4)	16.7 (10)
			<i>P=0.062</i>	

P value as Chi-square test

#### 4. DISCUSSION

In our study, 35% of patients had toxicities grades 3-4, a frequency considerably higher than usually reported in most recent studies. This higher rate of severe toxicity is possibly due to the high incidence of patients under bolus regimens of 5-FU (18.3%), a still common chemotherapeutic regimen in resource-limited settings. In fact, 63.3% of patients under 5-FU bolus regimens presented severe toxicity. In the other hand, when considering only patients under infusional regimens of 5-FU (FOLFOX, FOLFIRI and 5-FU-cisplatin), the incidence of severe toxicity was 26.3%, which in line with previous reports [8,9,21].

At the present, patients receiving fluorouracil or capecitabine do not have routine testing for DPD before their treatment. For a screening test to become standard, it needs to be accurate, fast, practical and cost effective. *DPYD* genotyping so far is not universally available, it is not routinely done in most hospitals and laboratories, it is costly and can only identify a limited number of cases at risk for severe fluoropyrimidine toxicity. Therefore, more research is necessary to improve screening for DPD deficiency.

As the majority of the toxicity associated to fluoropyrimidine chemotherapy is related to a decreased metabolic clearance of the drugs due to reduced activity of the DPD enzyme, multiple approaches to predict individual DPD activity were proposed. Several previous studies reported associations of *DPYD* gene variants with reduced DPD enzymatic activity and, as a consequence, increased toxicity during fluoropyrimidine chemotherapy [7,13,17,18]. However, the low frequency of these genetic variants in the general population contrast with the high incidence of reduced enzyme activity [10]. The reported frequency of *DPYD* mutated alleles in colorectal cancer patients, mostly in small cohorts (not including retrospective studies comprised exclusively of patients with severe toxicity), is in the range of 0 to 5 % [29,30]. Recently, Deenen *et al.* (2016) evaluated the presence of *DPYD* in a large cohort of 2,038 Caucasian cancer patients, in which the most prevalent variant was the *DPYD*\*2A allele, with a frequency of 1.1% [31]. Schwab *et al.* (2008) found a 5.5% prevalence of heterozygous mutant for \*2A allele within patients with grade 3 to 4 toxicity (n=110), with a limited sensitivity for mucositis (7.7%) and leucopenia (13%) [19].

There are only a few reports on *DPYD* polymorphisms in South American and Brazilian population [30,32,33], which are highly heterogeneous as result of a large population mixing from European, African, and Amerindian origins. However, this intermixture is uneven across the country, and it is known that the southern population is characterized by a higher density of citizen from European origin than any other Brazilian regions populations [34]. A evaluation for *DPYD* polymorphisms in Southeast Brazilians patients with 5-FU-related toxicity revealed the presence of deleterious mutation in heterozygous form (*2846A>T* or *IVS14 + 1G>A*) in 3 of 13 of patients with severe toxicity (23%) [35]. In other Brazilian population study (N=151), no *DPYD\*2* allele was found in Northern native individuals with European (62.4%), Native American (25.2%) and African (12.4%) descendant [30]. Similarly, Galvan *et al.* (2011) identified only 0.98% of homozygous individuals for *DPYD\*2A* within a group of Argentinian individuals (N=102), with no heterozygous for the null allele [32]. In line with these observations, despite the high rate of severe toxicity in our small cohort of 60 patients, no variant allele of *DPYD* was identified. Therefore, the limited sensibility of *DPYD* genotyping for the identification of patients prone to severe toxicity, based on already characterized mutant alleles, significantly limits its clinical use.

As genetic assays do not provide the needed diagnostic performance, several functional tests of DPD activity were proposed. Among them, the most clinically feasible are the determination of endogenous UH<sub>2</sub> to U either in blood plasma or saliva, using the ratio [UH<sub>2</sub>]/[U] as an index of enzyme activity. The measurement of both analytes is usually accomplished by LC-MS/MS systems present in many laboratories. A significant difference in the endogenous [UH<sub>2</sub>]/[U] ratio in plasma among groups of patients classified according to toxicity grades observed after fluoropyrimidine chemotherapy was characterized in several previous studies [13,12,21,22], as well as in the present cohort. The covariates gender, age and BMI were not correlated with DPD activity measured as the plasma [UH<sub>2</sub>]/[U] ratio. Previous studies reported a reduced DPD activity in female patients when compared to males [26,36]. However, in the present study, the covariates gender, age and BMI were not related to DPD activity measured as [UH<sub>2</sub>]/[U] ratio, which could be due to the higher percentage of males in the cohort and the heterogeneity of treatments.

Recently, Carlsson *et al.* (2014) reported on the use of endogenous salivary [UH<sub>2</sub>]/[U] ratios as an index of DPD activity [26]. This approach is particularly attractive

due to the facilitated sample collection, as well as the presence of higher levels of the metabolites in saliva when compared to blood plasma. In our group of patients, the  $[UH_2]/[U]$  ratio in saliva was higher correlated to the observed toxicity grade than the ratio measured in plasma ( $r_s=-0.515$  vs.  $r_s=-0.282$ ), highlighting the potential clinical application of this assay.

As expected the  $[UH_2]/[U]$  metabolic ratios were lower in patients with adverse events, the median ratio in the group with severe toxicity being 4.8 times lower than that from the group without toxicity. Carlsson *et al.* (2014) found a mean  $\pm$  SD  $[UH_2]/[U]$  ratio in patients who needed to lower drug dose ( $n=56$ ) or discontinue treatment due to toxicity ( $n=8$ ) of  $1.3 \pm 0.85$  for and in patients who completed treatment without adjustment of the dose of  $4.1 \pm 4.3$  ( $n=9$ ) [26], representing a 3.2 times mean difference.

The diagnostic capability of the  $[UH_2]/[U]$  ratio in plasma to identify patients that will present severe toxicity after fluoropyrimidine chemotherapy was demonstrated in several studies. Kristensen *et al.* (2010) proposed as cut-off ratio of 4.0 to detect patients prone to have toxicities grades 3 or 4, with a sensitivity of 87% and specificity of 93% [21]. The same toxicity cut-off was proposed by Launay *et al.* (2016) [22]. Boisdron-Celle *et al.* (2007), using a cut-off ratio of 6.0, had sensitivity of 82.4 and specificity of 78.4% [13]. Based on a ROC curve, we also selected a cut-off of 4.0, rendering sensitivity of 71.4 and sensitivity of 76.5%.

To the best of our knowledge, this is the first report on the diagnostic performance of  $[UH_2]/[U]$  ratio in saliva, as a means to identify patients at risk for severe toxicity after fluoropyrimidine chemotherapy. The  $[UH_2]/[U]$  cut-off of 1.16 in saliva had sensitivity of 85.7 and sensitivity of 76.9%, performing better than plasma ratios, resulting in a 9.2% and 8.3% higher positive and negative predictive values, respectively, compared to the plasma test.

Moreover, salivary U and  $UH_2$  levels are higher than plasma levels, leading to less demanding bioanalytical methods. Thus, the clinical application of the salivary  $[UH_2]/[U]$  assay could potentially reduce the incidence of severe toxicity from ~20 to 3%. This approach is particularly interesting when associated to the determination of 5-FU levels during infusional regimens, which can also support the increase of drug dosage in under-dosed patients, particularly those with higher than average DPD activity.

It is clear that the diversity of schemes could be a limitation of the study. We found a significant association between test performance and chemotherapy regimen in saliva samples ( $P=0.038$ ). A ROC curve for  $[UH_2]/[U]$  metabolic ratios in saliva performed exclusively with patients under infusion regimen ( $n=38$ ) presented sensitivity and specificity of 90% and 88%, respectively, which represents a gain on sensitivity of 4.3% and specificity of 9.0% as compared to all regimes ( $N=60$ ). This improved diagnostic performance is particularly important once infusional regimens are currently the predominant chemotherapy approach.

Despite its small sample size and the heterogeneity of the treatment modalities, this study indicates that both plasma and salivary functional DPD tests are suitable strategies to predict patients at risk of developing fluoropyrimidine-related toxicity caused by DPD deficiency, while *DPYD* genotyping was not relevant for the studied population. This study have presented for the first time the diagnostic performance of salivary  $[UH_2]/[U]$  metabolic ratios, considering the different chemotherapy regimens.

## 5. CONCLUSIONS

The occurrence of severe toxicity after exposure to fluoropyrimidine chemotherapy is strongly related to DPD enzyme activity. Considering the poor performance of *DYPD* genotyping to prospectively detect patients with low metabolic clearance, endogenous  $[UH_2]/[U]$  ratio in plasma or saliva are the currently most promising alternatives. Particularly, the endogenous  $[UH_2]/[U]$  salivary ratio, with a cut-off of 1.16, has specificity of 85.7 and sensitivity of 76.9% to detect patients with grades 3 or 4 of toxicity. The sensitivity and specificity of the salivary DPD functional test were greater within infusion scheme, as compared to other regimes. DPD activity determination using saliva was considered a straightforward and promising approach to identify patients with reduced enzyme activity, allowing tailoring of fluoropyrimidine doses. The validation of our results in a larger and more homogeneous patient population is warranted.

**Supplementary material:**

**Table S1. Patients demographic and clinical characteristics, uracil, dihydrouracil and [UH<sub>2</sub>]/[U] metabolic ratios (N=60).**

Type of cancer /stage	Ethnicity	Age (years)	Gender (F/M)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	BSA (m <sup>2</sup> )	Chemotherapy Scheme	Adverse effect (toxicity degree)	Plasma			Saliva		
								Uracil (ng mL <sup>-1</sup> )	UH <sub>2</sub> (ng mL <sup>-1</sup> )	[UH <sub>2</sub> ]/[U]	Uracil (ng mL <sup>-1</sup> )	UH <sub>2</sub> (ng mL <sup>-1</sup> )	[UH <sub>2</sub> ]/[U]
Colon IV	white	46	M	20.76	1.82	FOLFOX	(0)	14.40	127.80	8.88	74.00	623.90	8.43
Colon III	white	80	F	27.8	1.62	FOLFOX	(0)	5.88	39.80	6.77	124.90	1075.80	8.61
Colon III	brown	55	M	28.1	2.14	FOLFIRI	(0)	7.86	103.76	13.20	251.00	517.40	2.06
Colon III	brown	60	M	25.2	1.80	FOLFOX	(0)	16.40	85.40	5.21	232.50	217.00	0.93
Colon IV	brown	62	F	24.3	1.6	FOLFOX	(0)	16.60	112.10	6.75	275.30	476.10	1.73
Pancreatic IV	black	58	M	18.4	1.53	FOLFIRINOX	(0)	14.70	146.50	9.97	211.20	247.40	1.17
Colon III	white	67	F	16.9	1.27	FOLFOX	(0)	19.40	114.90	5.92	13.30	174.20	13.10
Rectal III	white	78	M	21.3	1.68	FOLFOX	(0)	5.30	64.70	12.21	36.50	115.50	3.16
Rectal III	white	56	M	27.9	1.85	CapeOx	(0)	17.80	118.60	6.66	203.30	759.80	3.74
Colon III	white	52	F	31.2	1.8	FOLFOX	(0)	73.20	59.46	0.81	184.00	520.00	2.83
Colon IV	black	65	M	20.6	1.83	CapeOx	(0)	469.00	63.00	0.13	742.50	144.50	0.19
Rectal III	white	64	M	22.4	1.6	Capecitabine	(0)	237.20	57.86	0.24	43.30	108.40	2.50
Colon III	white	45	F	26.8	1.68	FOLFOX	(0)	6.87	91.20	13.28	7.84	58.38	7.45
Gastric II	white	60	M	24.6	1.82	LV-5FU	mucositis(1)	5.09	57.30	11.26	578.30	249.70	0.43
Rectal III	white	48	M	25.3	1.84	LV-5FU	rash(1)	8.60	51.26	5.96	190.50	230.80	1.21
Rectal III	brown	51	F	26.3	1.75	+ cisplatin	nausea(1)	21.40	56.90	2.66	293.20	348.40	1.19
Colon III	white	68	F	31.7	1.6	FOLFOX	nausea(1)	6.00	32.40	5.40	138.30	207.40	1.49
Colon III	brown	74	F	21.6	1.49	FOLFOX	nausea/vomiting(1)	249.67	128.50	0.51	64.20	130.40	2.03
Colon III	white	53	M	21.3	1.87	FOLFOX	nausea/vomiting(1)	110.50	50.77	0.46	57.90	65.10	1.12
Rectal III	white	57	M	30.1	1.8	FOLFOX	nausea/vomiting(1)	239.00	53.28	0.22	104.30	109.30	1.05
Rectal III	white	76	F	32.0	1.67	Capecitabine	diarrhea(1)	172.40	83.80	0.49	99.40	81.90	0.82
Colon III	white	55	F	22.2	1.43	FOLFOX	nausea/vomiting(1)	4.51	38.61	8.56	8.47	20.39	2.41
Rectal III	white	64	M	30.85	1.93	FOLFOX	nausea/vomiting(1)	8.52	105.77	12.41	9.32	223.66	24.00
Colon III	white	56	M	28.36	2.18	FOLFOX	nausea/vomiting(1)	5.10	85.42	16.75	72.01	252.23	3.50
Colon III	white	65	M	25.14	1.92	FOLFOX	diarrhea(1)	5.14	86.41	16.81	19.84	266.67	13.44
Colon IV	white	74	M	25.86	1.82	CapeOx	mucositis(1)	25.32	161.32	6.37	60.75	147.05	2.42
Colon III	white	70	M	20.71	1.37	FOLFOX	mucositis(1), nausea/vomiting(1)	17.04	108.24	6.35	56.40	222.77	3.95
Colon III	white	76	M	28.12	1.75	FOLFOX	nausea/vomiting(1)	18.48	110.08	5.96	42.47	194.03	4.57

continua

Type of cancer /stage	Ethnicity	Age (years)	Gender (F/M)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	BSA (m <sup>2</sup> )	Chemotherapy Scheme	Adverse effect (toxicity degree)	Plasma			Saliva		
								Uracil (ng mL <sup>-1</sup> )	UH <sub>2</sub> (ng mL <sup>-1</sup> )	[UH <sub>2</sub> ]/[U]	Uracil (ng mL <sup>-1</sup> )	UH <sub>2</sub> (ng mL <sup>-1</sup> )	[UH <sub>2</sub> ]/[U]
Colon IV	brow	58	M	33.7	2.14	FOLFOX	fatigue(2) vomiting(2)	15.60	131.30	8.42	117.30	357.50	3.05
Colon III	white	59	F	20.8	1.51	FOLFOX	nausea/vomiting(2)	5.45	34.50	6.33	21.50	101.00	4.70
Colon III	black	63	M	22.5	1.92	FOLFOX	diarrhea(2)	9.50	83.90	8.83	50.40	77.00	1.53
Colon IV	white	75	F	23.5	1.57	CapeOx	nausea/vomiting(2)	28.70	90.70	3.16	397.60	310.40	0.78
Rectal II	white	56	M	23.9	1.82	LV-5FU	mucositis(2)	6.10	113.30	18.57	11.40	177.90	15.61
Colon IV	white	48	M	22.2	1.69	FOLFOX	nausea/vomiting(1) diarrhea(2)	5.48	21.51	3.93	4.61	5.83	1.26
Rectal III	black	50	M	24.86	1.81	FOLFOX	mucositis(2)	9.30	68.74	7.39	33.20	51.15	1.54
Rectal III	white	49	M	18.83	1.68	FOLFOX	mucositis(2) neutropenia(2)	8.28	125.60	15.17	13.85	82.49	5.96
Rectal II	black	66	F	23.95	1.71	LV-5FU	diarrhea(2)	19.86	87.16	4.39	73.52	53.17	1.72
Gastric IV	white	60	M	21.5	1.78	FOLFOX	nausea/vomiting(2)	8.50	75.71	8.91	9.50	80.37	8.46
Gastric IV	white	76	M	26.4	1.79	Capecitabine	nausea/vomiting (2)	5.79	154.75	26.73	18.00	130.00	7.22
Colon III	white	33	F	17.9	1.4	FOLFOX	nausea/vomiting(3)	8.10	72.40	8.94	265.50	140.80	0.53
Colon IV	brown	49	F	24.6	1.38	FOLFOX	neutropenia(3)	7.50	62.70	8.36	76.70	212.50	2.77
Colon III	white	54	M	30.5	2.2	FOLFOX	diarrhea(3) vomiting(3)	1093.00	144.70	0.13	809.00	101.20	0.13
Colon IV	black	50	F	25.8	1.68	LV-5FU	neutropenia (3)	442.00	74.00	0.17	197.90	148.30	0.75
Colon III	white	78	F	25.0	1.58	FOLFOX	neutropenia (3)	69.00	49.40	0.72	73.80	84.50	1.14
Rectal III	black	86	M	18.6	1.6	LV-5FU	neutropenia (3)	78.64	100.10	1.27	11.75	41.81	3.56
Rectal III	black	57	M	19.29	1.59	LV-5FU	mucositis(4) neutropenia(3)	21.80	44.50	2.04	55.40	52.60	0.95
Rectal III	black	46	M	20.8	1.64	LV-5FU	mucositis(4)	16.28	93.71	5.76	33.60	85.40	2.54
Pancreatic IV	white	56	F	22.4	1.60	Capecitabine	neutropenia(4)	69.11	53.60	0.78	58.80	56.90	0.97
Colon IV	white	58	F	15.4	1.42	FOLFOX	diarrhea(4) nausea/vomiting(4)	7.10	46.07	6.49	458.28	111.16	0.24
Colon III	white	56	M	28.1	1.98	FOLFOX	neutropenia(4) nausea/vomiting(3)	7.05	6.10	0.86	69.30	57.00	0.82
Colon III	brown	70	M	35.7	2.29	LV-5FU	nausea/vomiting(4)	10.80	57.80	5.35	143.20	43.90	0.31
Colon III	white	77	M	22.0	1.65	Capecitabine	diarrhea(4)	18.60	60.04	3.23	546.50	565.50	1.03
Colon IV	white	67	F	34.4	1.87	CapeOX	neutropenia(4) rash(3)	968.00	84.69	0.09	113.60	40.17	0.35
Colon III	white	77	M	20.9	1.67	LV-5FU	vomiting(3) diarrhea(4)	236.40	72.91	0.31	856.00	75.60	0.09
Colon III	white	68	F	24.7	1.46	FOLFOX	mucositis(4) neutropenia(4) sepsis, alopecia	89.00	77.00	0.87	193.40	179.30	0.93
Colon III	white	66	F	30.5	1.85	Capecitabine	diarrhea(3) nausea/vomiting(4)	111.00	65.00	0.59	827.60	66.70	0.08
Colon IV	white	68	M	27.3	1.88	FOLFOX	neutropenia(4)	9.01	28.37	3.15	131.59	59.23	0.45
Rectal III	white	59	F	37.3	1.78	LV-5FU	neutropenia(4) mucositis(2) diarrhea(3) sepsis	5.29	8.58	1.62	11.79	6.94	0.59
Rectal IV	white	47	M	23.4	1.62	FOLFOX	diarrhea(4) nausea/vomiting(4)	8.16	29.63	3.63	11.26	6.18	0.55
Rectal III	white	65	M	28.34	2.2	FOLFOX	diarrhea(4) neutropenia(2)	7.82	136.92	17.51	348.68	165.42	0.47

## DISCLOSURES

The authors have no conflict of interest to report. This work was supported by Universidade Feevale, Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE HCPA) and FAPERGS (registry number 13/1156-7) grants.

## REFERENCES

- [1] M. Malet-Martino, R. Martino, Oncologist Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-Fluorouracil, *Oncologist*. 7 (2002) 288–323.
- [2] L.B. Saltz, J. V. Cox, C. Blanke, L.S. Rosen, L. Fehrenbacher, M.J. Moore, et al., Irinotecan plus Fluorouracil and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer, *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 905–914.
- [3] L.B. Saltz, S. Clarke, E. Diaz-Rubio, W. Scheithauer, A. Figer, R. Wong, et al., Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study, *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 2013–2019.
- [4] A.B.P. van Kuilenburg, Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil., *Eur. J. Cancer.* 40 (2004) 939–950.
- [5] D. Longley, D. Harkin, P. Johnston, 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies., *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 330–338.
- [6] M.W. Saif, A. Choma, S.J. Salamone, E. Chu, Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes., *J. Natl. Cancer Inst.* 101 (2009) 1543–1452.
- [7] U. Amstutz, T.K. Froehlich, C.R. Largiadèr, Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity, *Pharmacogenomics.* 12 (2011) 1321–1336.
- [8] O. Capitain, A. Asevoaia, M. Boisdron-Celle, A.L. Poirier, A. Morel, E. Gamelin, Individual fluorouracil dose adjustment in FOLFOX based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional body-area-surface dosing: A phase II, proof-of-concept study, *Clin. Colorectal Cancer.* 11 (2012) 263–267.
- [9] P.Y. Cordier, A. Nau, J. Ciccolini, M. Oliver, C. Mercier, B. Lacarelle, et al., 5-FU-induced neurotoxicity in cancer patients with profound DPD deficiency syndrome: A report of two cases, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68 (2011) 823–826.
- [10] C. Mercier, J. Ciccolini, Profiling dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in patients with cancer undergoing 5-fluorouracil/capecitabine



therapy., *Clin. Colorectal Cancer*. 6 (2006) 288–296.

[11] Meta-Analysis Group In Cancer, E. Lévy, P. Piedbois, M. Buyse, J.P. Pignon, P. Rougier, et al., Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors., *J. Clin. Oncol.* 16 (1998) 3537–3541.

[12] J. Ciccolini, C. Mercier, A. Evrard, L. Dahan, J.-C. Boyer, F. Duffaud, et al., A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy, *Ther. Drug Monit.* 28 (2006) 678–685.

[13] M. Boisdron-Celle, G. Remaud, S. Traore, A.L. Poirier, L. Gamelin, A. Morel, et al., 5-Fluorouracil-related severe toxicity: A comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, *Cancer Lett.* 249 (2007) 271–282.

[14] J. Ciccolini, E. Gross, L. Dahan, B. Lacarelle, C. Mercier, Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope?, *Clin. Colorectal Cancer*. 9 (2010) 224–228.

[15] M.C. van Staveren, H. Jan Guchelaar, A.B.P. van Kuilenburg, H. Gelderblom, J.G. Maring, Evaluation of predictive tests for screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, *Pharmacogenomics J.* 13 (2013) 389–395.

[16] M.C. van Staveren, F. Opdam, H.-J. Guchelaar, A.B.P. van Kuilenburg, J.G. Maring, H. Gelderblom, Influence of metastatic disease on the usefulness of uracil pharmacokinetics as a screening tool for DPD activity in colorectal cancer patients., *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2015) 1–6.

[17] A. Morel, M. Boisdron-Celle, L. Fey, P. Soulie, M.C. Craipeau, S. Traore, et al., Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 2895–2904.

[18] A. Loganayagam, M. Arenas-Hernandez, L. Fairbanks, P. Ross, J.D. Sanderson, A.M. Marinaki, The contribution of deleterious DPYD gene sequence variants to fluoropyrimidine toxicity in British cancer patients, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65 (2010) 403–406.

[19] M. Schwab, U.M. Zanger, C. Marx, E. Schaeffeler, K. Klein, J. Dippon, et al., Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: A prospective clinical trial by the German 5-FU toxicity study group, *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 2131–2138.

[20] S.A. Ridge, J. Sludden, O. Brown, L. Robertson, X. Wei, A. Sapone, et al., Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in Caucasian subjects, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46 (1998) 151–156.

- [21] M.H. Kristensen, P. P, M. J, The Value of Dihydrouracil / Uracil Plasma Ratios in Predicting 5-Fluorouracil- related Toxicity in Colorectal Cancer Patients, *J. Int. Med. Res.* 38 (2010) 1313–1323.
- [22] M. Launay, L. Dahan, M. Duval, A. Rodallec, G. Milano, M. Duluc, et al., Beating the odds: Efficacy and toxicity of dihydropyrimidine dehydrogenase-driven adaptive dosing of 5-FU in patients with digestive cancer, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81 (2016) 124–130.
- [23] M.C. van Staveren, B. Theeuwes-Oonk, H.J. Guchelaar, A.B.P. Van Kuilenburg, J.G. Maring, Pharmacokinetics of orally administered uracil in healthy volunteers and in DPD-deficient patients, a possible tool for screening of DPD deficiency, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68 (2011) 1611–1617.
- [24] M.C. Van Staveren, A.B.P. van Kuilenburg, H.J. Guchelaar, J. Meijer, C.J.A. Punt, R.S. de Jong, et al., Evaluation of an oral uracil loading test to identify DPD-deficient patients using a limited sampling strategy, *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2015) 553–561.
- [25] G. Remaud, M. Boisdron-Celle, C. Hameline, A. Morel, E. Gamelin, An accurate dihydrouracil/uracil determination using improved high performance liquid chromatography method for preventing fluoropyrimidines-related toxicity in clinical practice, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 823 (2005) 98–107.
- [26] G. Carlsson, E. Odin, B. Gustavsson, Y. Wettergren, Pretherapeutic uracil and dihydrouracil levels in saliva of colorectal cancer patients are associated with toxicity during adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 74 (2014) 757–763.
- [27] U. Amstutz, S. Farese, S. Aebi, C.R. Largiadèr, Dihydropyrimidine dehydrogenase gene variation and severe 5-fluorouracil toxicity: a haplotype assessment, *Pharmacogenomics.* 10 (2009) 931–944.
- [28] L. Alnaim, Individualization of 5-Fluorouracil in the Treatment of Colorectal Cancer, *SRX Pharmacol.* 2010 (2010) 1–12.
- [29] S. Terrazzino, S. Cargnin, M. Del Re, R. Danesi, P.L. Canonico, A.A. Genazzani, *DPYD IVS14+1G>A* and *2846A>T* genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis, *Pharmacogenomics.* 14 (2013) 1255–1272.
- [30] W.F. Barra, N.P. Santos, D. Costa, S. Demachki, P.P. Assumpcao, S. Santos, et al., Dihydropyrimidine dehydrogenase gene (*DPYD*) polymorphisms associated with toxicity in patients treated with fluoropyrimidines in northern Brazil, *J. Clin. Oncol.* 2014 ASCO Annual Meeting, Abstract (2014) e13546.

- [31] M.J. Deenen, D. Meulendijks, A. Cats, M.K. Sechterberger, J.L. Severens, H. Boot, et al., Upfront Genotyping of *DPYD\*2A* to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis, *J. Clin. Oncol.* 34 (2016) 227–234.
- [32] C.A. Galván, O.C. Elbarcha, E.J. Fernández, D.M. Beltramo, N.W. Soria, Genetic profiling of *GSTP1*, *DPYD*, *FCGR2A*, *FCGR3A* and *CCND1* genes in an Argentinian population, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 1058–1061.
- [33] G.C. Cavalcante, N.S.C. Freitas, A.M.R. Santos, D.C. Carvalho, E.M. Silva, Investigation of Potentially Deleterious Alleles for Response to Cancer Treatment with 5-Fluorouracil, *Anticancer Res.* 35 (2015) 6971–6978.
- [34] F.B. Kohlrausch, C.S. Gama, M. Ine, P. Belmonte-de-abreu, S.M. Callegari-jacques, A. Gesteira, et al., Naturalistic pharmacogenetic study of treatment resistance to typical neuroleptics in European – Brazilian schizophrenics, *Pharmacogenetic Genomics.* 18 (2008) 599–609.
- [35] G.F. Cunha-Junior, L. De Marco, L. Bastos-Rodrigues, M.B. Bolina, F.L. Martins, G.A. Pianetti, et al., <sup>13</sup>C-uracil breath test to predict 5-fluorouracil toxicity in gastrointestinal cancer patients, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 72 (2013) 1273–1282.
- [36] M.C. Etienne, J.L. Lagrange, O. Dassonville, R. Fleming, A. Thyss, N. Renée, et al., Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients, *J. Clin. Oncol.* 12 (1994) 2248–2253.

Artigo publicado na revista Clinical Biochemistry, 2015 (48):915-918.

**Improved determination of uracil and dihydrouracil in plasma after a loading oral dose of uracil using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and porous graphitic carbon stationary phase**

Roberta Zilles Hahn<sup>a</sup>, Andrés Fernando Andrade Galarza<sup>b</sup>, Anelise Schneider<sup>a</sup>, Marina Venzon Antunes<sup>a</sup>, Gilberto Schwartzmann<sup>b</sup>, Rafael Linden<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Toxicological Analysis, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, Brazil

<sup>b</sup> Oncology Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brazil

### **Highlights**

- An improved method for determination of uracil and dihydrouracil in plasma by HPLC-PDA is described.
- The method is based on porous graphitic carbon stationary phase separation.
- This method was fully validated and being much faster than previously described separation with porous graphitic carbon stationary phase.

## Abstract

**Objectives:** The aim of this study was to develop and validate a high-performance liquid chromatographic method for the measurement of plasma concentrations of uracil and dihydrouracil after administration of an oral loading dose of uracil in the context of evaluation of DPD enzyme activity.

**Design and Methods:** Analytes were extracted from 500  $\mu\text{L}$  plasma sampler with a mixture of ethyl acetate isopropanol (85:15, v/v) after protein precipitation with solid ammonium sulfate. The extract was inject in the porous graphitic carbon stationary phase, eluted with water and acetonitrile in gradient mode, allowing complete separation of uracil, dihydrouracil and the internal standard (5-fluorouracil). Chromatograms were monitored at 210 and 260 nm.

**Results:** Total chromatographic run time, including reequilibration, was 30 min. The assay was linear in the concentration range of 0.2 to 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Accuracy was 98.4–105.3%, intra-assay precision was 5.1–12.1% and between-assay precision was of 5.3–10.1%. Analytes were stable in plasma at room temperature up to 6 h and for three freeze and thaw cycles. Processed samples are stable up to 12 h.

**Conclusions:** The developed method was fully validated and has significantly reduced running time when compared to previous assay using porous graphitic stationary phase, allowing complete resolution of uracil, dihydrouracil and internal standard. This assay might be suitable to investigate the eventual correlation between concentrations of uracil and dihydrouracil in plasma after an oral loading dose and DPD enzyme activity, with potential contribution to therapeutic drug monitoring.

**Keywords:** Fluoropyrimidine drugs, chemotherapy, dihydropyrimidine dehydrogenase, HPLC-PDA, porous graphitic carbon

## 1. Introduction

Despite its use in many chemotherapy treatments, fluoropyrimidine drugs are associated to a high rate of severe adverse effects (31-34%) and, eventually, to toxic deaths (0.3%) [1]. One of the main reasons for fluoropyrimidine toxicity is a deficiency on the metabolic clearance mediated by dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) enzyme [2]. Approaches to identify patients with reduced DPD activity are based on the measurement of the concentrations of the endogenous compound uracil (U) and its DPD metabolic product, 5,6-dihydrouracil (UH<sub>2</sub>), either in peripheral blood mononuclear cells [3], blood plasma [4] or saliva samples [5]. Another alternative was proposed by van Stareven et al. [6] and is based on the measurement of plasma concentrations of U and UH<sub>2</sub> after the administration of an oral loading dose of U, theoretically better reflecting DPD enzyme dynamics when high doses are administered to the patients.

Several methods based on high-performance liquid chromatography (HPLC) for measurement of U and UH<sub>2</sub> in biological samples were described, usually based on reversed-phase (RP) separations [7,8]. However, considering the high hydrophilicity of U and UH<sub>2</sub>, RP separations usually require 100% aqueous mobile phases and long chromatographic runs to allow the separations of these analytes. An alternative separation strategy was described by Rémaud et al. [9], with the use of porous graphitic carbon (PGC) as stationary phase, with increased resolution of U and UH<sub>2</sub>. Despite its better separation capabilities, the method of Rémaud et al. [9] had a very long running (52 min) and equilibration (25 min) time, not amenable to clinical routine.

Considering the potential clinical applications of a method for accurately classifying DPD activity, in this study we present an optimized and easily applicable liquid chromatographic method for determination of U and UH<sub>2</sub> in human plasma, based on PGC separation.

## 2. Material and methods

U, UH<sub>2</sub>, 5-fluorouracil (5-FU, internal standard) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Acetonitrile, ammonium sulfate, ethyl acetate and 2-propanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained through an Elga Purelab Ultra<sup>®</sup> apparatus from Elga

Labwater (High Wycombe, UK). Considering the presence of endogeneous U and UH<sub>2</sub>, the matrix for preparation of calibration and QC samples was a 6 % (w/v) aqueous solution of BSA.

U, UH<sub>2</sub> and 5-FU stock and working solutions were prepared in ultrapurified water. Calibrators were prepared by adding the appropriate amount of U and UH<sub>2</sub> solutions to 6% BSA solution (1:20, v/v) to obtain concentrations of 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 and 20 µg mL<sup>-1</sup>. Internal standard working solution (IS) was 5-FU 40 µg mL<sup>-1</sup>. Quality control (QC) samples were prepared to obtain U and UH<sub>2</sub> concentrations of 0.2 (quality control at the limit of quantification, QCLOQ), 0.25 (quality control low, QCL), 7.5 (quality control medium, QCM), and 15 µg mL<sup>-1</sup> (quality control high, QCH).

Sample preparation was based on liquid-liquid extraction. Briefly, 500 µL of either calibration, quality control or patient's samples (plasma) were added to glass tubes, followed by 75 µL of internal standard solution, followed by 30 s of vortex mixing. After, proteins were precipitated with 500 mg of ammonium sulfate, followed for 1 min of vortex mixing. The resulting mixture was added with 4 mL of a mixture of ethyl acetate and isopropanol (85:15, v/v) and mixed for 10 min in a rotatory mixer at 50 rpm. After 10 min centrifugation at 3,000 g, the supernatant was transferred to an evaporation tube and dried at 56 °C under a gentle stream of air. The dried extract was reconstituted with 200 µL of ultrapurified water and centrifuged for 10 min at 10,000 g. An aliquot of 50 µL of supernatant was injected into the HPLC.

The chromatographic equipment was an Acquity-PDA (Waters, Milford, USA). Separation was performed in a PGC stationary phase (Hypercarb<sup>®</sup>), 150 x 4.6 mm, 5 µm (Thermo Scientific, San Jose, USA) maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of a mixture of solvents A (ultra-purified water) and B (acetonitrile), with the following gradient program: 98% A from the beginning of the run to 7.5 min; 92% A from 7.51 to 13.0 min; 87% A from 13.01 to 19.0 min; 30% A from 19.01 to 24.0 min, followed of a equilibration time of 6 min at initial conditions. Mobile phase flow rate was 1 mL min<sup>-1</sup>. Total run time was 30.0 min. Chromatograms were monitored at 210 (UH<sub>2</sub>) and 260 (U and 5-FU) nm, with spectral acquisition between 210 and 380 nm.

Homoscedasticity of calibration data was evaluated at 7 levels with 6 replicates using the *F*-test at the confidence level of 95%. Curves were fitted by least-squares linear regression using several weighting factors. The calibration models were evaluated by their correlation coefficients (*r*) and cumulative percentage relative error ( $\sum\%RE$ ).

Precision and accuracy were evaluated analyzing the QC samples in triplicate on each of 5 days. Within-assay precision and between-day precision were calculated by one-way ANOVA with the grouping variable “day” and were expressed as CV %. Accuracy was defined as the percentage of the nominal concentration represented by the concentration estimated with the calibration curve. The acceptance criteria for accuracy were mean values within  $\pm 15\%$  of the theoretical value and for precision a maximum CV of 15% was accepted [10]. The acceptance criteria established for the LOQ was accuracy within  $100 \pm 20\%$  of the nominal value and a maximum CV of 20% for the QCLOQ [10].

Extraction efficiency was determined by comparing the peak areas of the analytes obtained at the plasma QC samples of the accuracy and precision experiments to those obtained with aqueous solutions at levels corresponding to complete recovery, measured in triplicate at three different days.

For estimation of stability of processed samples under the conditions of analysis, extracts of QCL and QCH samples control samples were pooled and injected at time intervals of 1 h, during 12 h. Stability of analytes was tested by regression analysis plotting absolute peak areas at each concentration vs. injection time and the concentration after 12 h was calculated. Also, aliquots of a QCL, QCM and QCH samples maintained at room temperature were tested in triplicate at times 0 and 6 h and values were compared. In both evaluations, variations of up to 10% in the measured concentrations were considered as acceptable. For evaluation of freeze-thaw stability, quality control samples (QCL, QCM and QCH) were analyzed before and after 3 freeze–thaw cycles. The variance was evaluated using ANOVA test and P values  $<0.05$  were considered statistically significant.

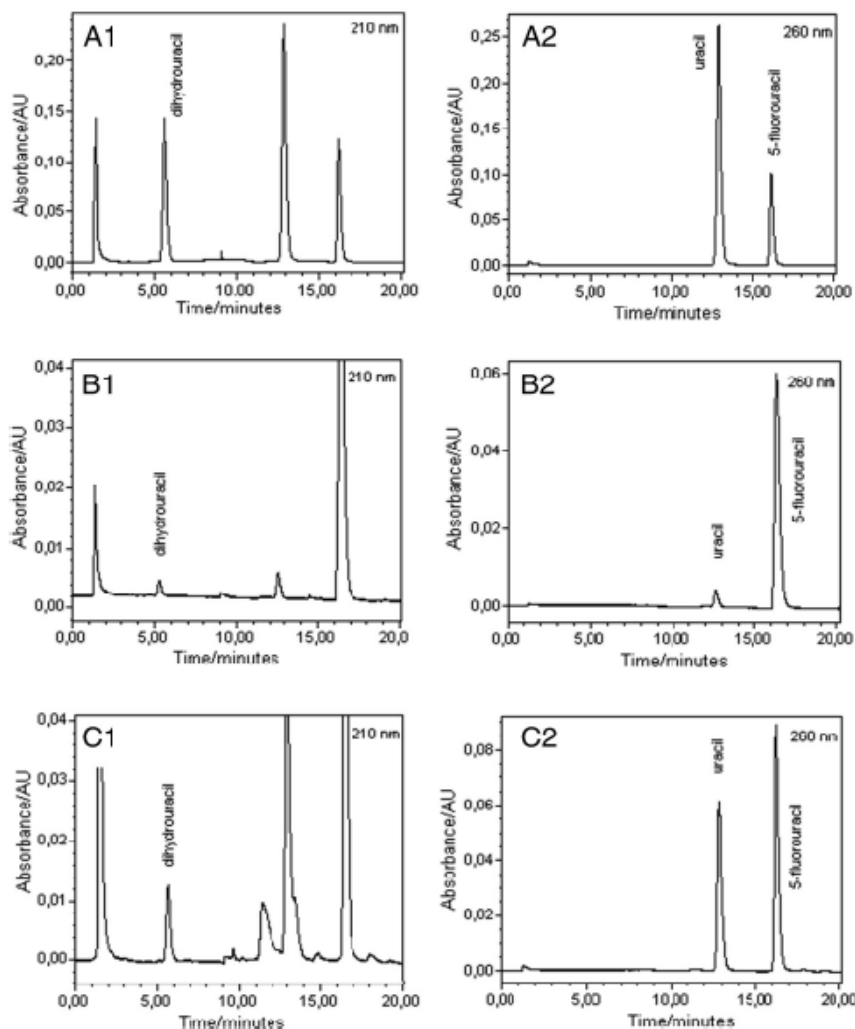
The method was applied to the measurement of U and UH<sub>2</sub> in plasma samples of colorectal cancer patients scheduled to receive fluoropyrimidine-based chemotherapy, 2 h after a 1,000 mg oral dose of U, on an ongoing clinical study.

### **3. Results**

Retention times were 5.0, 12.5 and 15.7 min for UH<sub>2</sub>, U and IS, respectively (Figure 1). Peaks were identified by retention time and by their characteristic UV absorption spectra. The use of a PGC stationary phase allowed an easy separation of



both UH2 and U. The optimized gradient conditions resulted in a total run time, including column reequilibration, of 30 min, markedly faster than the gradient proposed by Rémaud et al. [9], of 77 min.



**Figure 1.** Typical chromatograms of plasma extracts obtained at 210 and 260 nm. A: Quality control sample at low concentration (QCL) containing U and UH<sub>2</sub> at 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; B: Quality control sample at high concentration (QCH) containing U and UH<sub>2</sub> at 15.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; C: Patient sample 2 h after an oral loading dose of 1000 mg U containing U at 3.62  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and UH<sub>2</sub> at 1.41  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

The simple liquid–liquid extraction procedure presented satisfactory and reproducible extraction yield, of 66.1–67.5 and 65.3–67.1%, for U and UH<sub>2</sub>, respectively (Table 1). Calibration data presented significant heteroscedasticity. The best weighting factor for U was  $1/x$ , with  $\sum\% \text{RE}$  of  $1.03 \times 10^{-13}$ . For UH<sub>2</sub>, the best weighting factor was  $1/x^2$ , with  $\sum\% \text{RE}$  of  $1.33 \times 10^{-13}$ . Coefficients of correlation were above 0.999.

There was no indication of instability of the analytes in any of the tested conditions, demonstrating the feasibility of its processing in usual laboratory conditions (Table 1). Plasma samples maintained at room temperature had maximum concentration changes after 6 h of -4.9 and -9.3 for U and UH2, respectively. The concentration changes of processed samples on the autosampler of the HPLC equipment after 12 h were on the range of -2.3 to -6.1% for U and UH2, respectively. There was no indication of instability after three freeze–thaw cycles (Table 1).

Accuracy and precision results fulfilled the acceptance criteria [10] (Table 1). Accuracy values were within the range of 98.4–105.3% of nominal concentrations of the analytes. Intra-assay precision (CV %) was in the range of 5.1–12.1% and between-assay precision of 5.3–10.1%. The QC sample containing U and UH2 at concentrations of the lowest point of the calibration curve (QCLOQ) presented accuracy of 111.3 and 105.33%, intra-assay precision of 15.6 and 6.1, and inter-assay of 11.7 and 15.7%, for U and UH<sub>2</sub>, respectively.

**Table 1.** Method validation parameters: linearity, precision, accuracy, extraction yield, plasma and processed sample stability at room temperature and at autosampler.

Analyte	Linear regression	QC sample	Nominal concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Precision (CV %)		Accuracy (%)	Extraction yield (%)	Plasma concentration change after 6 h at RT (%)	Processed sample concentration change after 12 h in AS (%)	Freeze and thaw stability (P value)
				Intra-assay	Inter-assay					
U	$y = 0.2058 + 0.0082x$	QCLOQ	0.2	15.6	11.7	111.3	-	-	-	-
		QCL	0.25	5.8	5.8	102.9	67.5	-4.9	+2.2	0.76
		QCM	7.5	8.3	5.3	99.1	-	+0.8	-	0.55
		QCH	15	5.1	8.9	98.8	66.1	+0.1	-2.3	0.61
UH2	$y = 0.1119 + 0.0135x$	QCLOQ	0.2	6.1	15.7	105.3	-	-	-	-
		QCL	0.25	12.1	10.1	98.4	67.1	-9.3	-6.1	0.53
		QCM	7.5	7.5	6.1	99.4	-	-1.3	-	0.44
		QCH	15	7.0	7.7	98.7	65.3	+0.1	-2.1	0.71

QCLOQ: quality control at the lower limit of quantification, QCL: quality control low, QCM: quality control medium, QCH: quality control, RT: room temperature, AS: autosampler. Linearity n=42, precision and accuracy n=45, extraction yield n=30, plasma stability at room temperature n=18, processed sample stability n=24, freeze and thaw stability n=21.

#### 4. Conclusion

This work provides an improved, fully validated and clinically applicable HPLC-PDA method for the determination of U and UH2 using a carbon based stationary

phase, with complete chromatographic resolution of the analytes, adapted to evaluate DPD activity after the administration of an oral loading dose of U.

## References

[1] Meta-Analysis Group in Cancer. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16(11): 3537–3541.

[2] van Kuilenburg AB, Meinsma R, van Gennip AH. Pyrimidine degradation defects and severe 5-fluorouracil toxicity. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids* 2004; 23:1371–1375.

[3] Déporte-Féty R, Picot M, Amiand M, Moreau A, Campion L, Lanoë D, Renée N, Milano G. High-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for quantification of dihydrofluorouracil in human lymphocytes: application to measurement of dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 762(2):203-209.

[4] Kristensen MH, Pedersen P, Mejer J. The value of dihydrouracil/uracil plasma ratios in predicting 5-fluorouracil related toxicity in colorectal cancer patients. *Int J Med Res.* 2010; 38:1313-1323.

[5] Carlsson G, Odin E, Gustavsson B, Wettergren Y. Pretherapeutic uracil and dihydrouracil levels in saliva of colorectal cancer patients are associated with toxicity during adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 74(4):757-763.

[6] van Staveren MC, Theeuwes-Oonk B, Guchelaar HJ, van Kuilenburg ABP, Maring JG. Pharmacokinetics of orally administered uracil in healthy volunteers and in DPD-deficient patients, a possible tool for screening of DPD deficiency. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011; 68:1611-1617.

- [7] Déporte R, Amiand M, Moreau A, Charbonnel C, Campion L. High-performance liquid chromatographic assay with UV detection for measurement of dihydrouracil/uracil ratio in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2006; 834: 170-177.
- [8] Ciccolini J, Mercier C, Evrard A, Boyer J-C, Duffaud F, Dahan L, Richard K, Blanquicett C, Milano G, Blesius A, Durand A, Seitz J-F. A Rapid and Inexpensive Method for Anticipating Severe Toxicity to Fluorouracil and Fluorouracil-based Chemotherapy. *Ther. Drug Monit.* 2006; 28:678–685.
- [9] Remaud G, Boisdron-Celle M, Hameline C, Morel A, Gamelin E. An accurate dihydrouracil/uracil determination using improved high performance liquid chromatography method for preventing fluoropyrimidines-related toxicity in clinical practice. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2005; 823:98-107.
- [10] US Department of Health and Human Services FDA, guidance for industry. Analytical procedures and methods validation; August 2000.

## 7. CONCLUSÕES

### 7.1 CONCLUSÃO GERAL

Neste grupo de pacientes a genotipagem não foi capaz de detectar nenhum dos casos de toxicidade severa associados à quimioterapia com fluoropirimidinas. Contudo, os testes funcionais da DPD realizados após determinação das razões de biotransformação do substrato endógeno uracil à diidrouracil em amostras de plasma e saliva demonstraram-se eficazes na identificação de pacientes predispostos a toxicidade à fluoropirimidinas. A alta sensibilidade apresentada pelo teste em amostras de saliva, além das vantagens intrínsecas da matriz como, por exemplo, a facilidade da coleta e maior estabilidade dos analitos, indicam que esta matriz pode ser uma promissora substituída ao plasma.

### 7.2 CONCLUSÕES SECUNDÁRIAS

- A população em estudo apresentou elevada frequência de toxicidade após quimioterapia com fluoropirimidinas (35%), com índices superiores para pacientes em bolus (63%) em comparação aos pacientes que receberam infusão (26%).
- As razões metabólicas  $[UH_2]/[U]$  em amostras de plasma e saliva apresentaram correlação significativa.
- As razões metabólicas  $[UH_2]/[U]$  em amostras de saliva estiveram mais fortemente correlacionadas ao grau de toxicidade em comparação às razões obtidas em plasma. Estes dados podem ser atribuídos a maior estabilidade dos analitos na saliva, bem como às maiores concentrações nesta matriz, o que diminui a variabilidade da medida analítica.
- As razões do metabolismo do uracil à diidrouracil foram inferiores no grupo com toxicidade severa às fluoropirimidinas em comparação aos demais pacientes.
- Foi proposto pela primeira vez um valor de corte para o teste funcional da DPD em saliva, cujo valor de 1.16 apresentou com sensibilidade de 85.7% e

especificidade de 76.9% na identificação de pacientes com toxicidade severa após quimioterapia com fluoropirimidinas

- Apesar da variabilidade de regimes utilizados pelos pacientes, os testes funcionais da DPD em amostras de plasma e saliva foram capazes de identificar a maioria dos casos de toxicidade severa à fluoropirimidinas. Quando avaliados os resultados obtidos somente para pacientes em infusão (n=38), o teste da razão metabólica salivar apresenta ganho de 4.3% de sensibilidade e 9% de especificidade em comparação a avaliação com todos os regimes (N=60).
- Na população estudada, não foram identificados os polimorfismos do gene DPYD mais frequentemente identificados em pacientes com deficiência severa de DPD, quais sejam, as variantes alélicas \*2A; \*13, Y186C; I560S e \*7.
- Validou-se um método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de uracil e dihidrouracil em amostras de plasma e saliva, com intervalo de linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade adequados.

## 8. PERSPECTIVAS

As fluoropirimidinas são quimioterápicos amplamente utilizados no tratamento adjuvante, neoadjuvante ou paliativo do câncer, principalmente nos tumores gastrointestinais. Portanto, estudos que tenham como enfoque o aumento de seu índice terapêutico podem ter grande impacto clínico.

Em nosso estudo, observou-se toxicidade severa em 35% (6 pacientes grau 3 e 15 pacientes grau 4) dos pacientes submetidos à administração de 5-FU ou capecitabina. Esta percentagem é superior ao observado em vários estudos anteriores e pode se dever ao fato de que, por limitações de ordem financeira, tenhamos optado em nossa instituição pelo uso de esquemas de 5 FU em administração em bolus, o que se associa a maior risco de toxicidade em relação aos esquemas infusionais.

Estudos de genotipagem identificaram uma relação entre as variantes alélicas no gene *DPYD*, que codifica a enzima DPD, e a presença de deficiência em sua atividade enzimática. Até o presente, o gene *DPYD* possui pelo menos sete mutações identificadas. A mutação mais frequente em pacientes com deficiência parcial ou completa de atividade enzimática é o alelo *DPD\*2A*. Os pacientes heterozigotos para esse polimorfismo tem baixa atividade da enzima DPD e apresentam toxicidade para 5-FU. Estudos anteriores apontam cerca de 3% de pacientes heterozigotos para um alelo mutante *DPYD*. Em nosso estudo genotípico, não identificamos pacientes com toxicidade grave associada a presença nenhum dos mais reconhecidos polimorfismos da *DPYD*, como *\*2A*; *\*13*, *Y186C*; *I560S* e *\*7*. Como a sua incidência é baixa, é provável que uma maior amostragem pudesse revelar alguns destes polimorfismos.

Recentemente, foram propostas alternativas mais simples e eficientes para caracterizar a atividade da enzima DPD antes do início do tratamento com 5-FU, tais como a determinação das concentrações de uracil e seu metabólito diidrouracil no plasma e na saliva através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Considerando que a enzima DPD é responsável pela redução fisiológica de uracil para dihidrouracil, a avaliação da razão  $[UH_2]/[U]$  no plasma está relacionada à atividade da DPD e permite inferir sua atividade.

No presente estudo foram relacionadas as razões  $[UH_2]/[U]$  aos efeitos secundários graves nos pacientes com uso de fluoropirimidinas, utilizando não apenas amostras de plasma, mas também saliva. Quanto aos resultados em amostras de

saliva, nosso estudo é extremamente importante, por ser o estudo mais detalhado sobre esta relação a ser publicado na literatura.

Observamos que, em plasma, valores menores de 4 da razão  $[UH_2]/[U]$  se associavam a maior risco de apresentar toxicidade graus 3 ou 4. E em saliva, isto se verifica em valores menores de 1.16 da razão  $[UH_2]/[U]$ . Na análise da curva ROC, em nosso estudo, achamos que o teste da razão  $[UH_2]/[U]$  na saliva tem uma sensibilidade de 85.7% e uma especificidade de 76.9% para identificar pacientes com toxicidade severa, e no plasma tem 71,4% de sensibilidade e 76.5% de especificidade. Portanto, a super sensibilidade apresentada pelo teste em saliva em relação ao plasma, além das vantagens desta matriz, níveis superiores dos metabólitos e fácil coleta, a tornam mais atraente do que a utilização de plasma.

Os teste da razão  $[UH_2]/[U]$  na saliva e no plasma tem uma alta confiabilidade, já que a sensibilidade e especificidade são satisfatórias, se compararmos com outros testes já consagrados na clínica, como a dosagem plasmática do PSA no câncer de próstata. Para este, o valor de corte é de 4 ng/mL, com sensibilidade de 20,5% e especificidade de 93,6%. O teste para o rastreio de câncer colorretal, com o emprego do teste imunológico para sangue oculto fecal (iFOBT) possui especificidade entre 91% a 98%, com sensibilidade de 61 a 91%. Portanto, acreditamos que o estudo da razão  $[UH_2]/[U]$  é uma forma segura e satisfatória de identificarmos pacientes em risco para apresentar toxicidade grave com o uso destas fluoropirimidinas.

É importante relatar que os estudos desenvolvidos nesta tese permitiram que explorássemos também a possibilidade de inovarmos. Como o teste da razão  $[UH_2]/[U]$  em saliva foi vantajoso não apenas em seus aspectos analíticos, mas quanto a sua praticidade de coleta, imaginamos formas que pudessem tornar seu uso mais universal.

Na realidade, uma vez coletado material para análise, este deve ser armazenado em condições estáveis, para que seja posteriormente analisado em um laboratório de referência. Em nosso estudo, por exemplo, a saliva era coletada fresca e logo mantida em um freezer de -80 graus, pois as coletas eram realizadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, mas as análises na FEEVALE, em Novo Hamburgo.

Idealizamos, assim, uma nova e prática ferramenta, que consiste na coleta de saliva e seu armazenamento em papel seco após rápida secagem. Pudemos demonstrar que em papel seco a recuperação da amostra e sua estabilidade para análises se mantinha, sem qualquer prejuízo, por ao menos 7 dias. Com isso, poder-



se-á dispensar a necessidade de freezer e as amostras de saliva poderão ser coletadas em qualquer local e enviada por correio de entrega rápida (via de regra, até 3 dias no Brasil) ao laboratório de análises na FEEVALE. Isto permite que as análises sejam realizadas, com folga, nos 4 dias subsequentes. Esta inovação foi submetida à patente por nossa equipe junto ao INPI (descrição em anexo) e sua validação será objeto da tese de doutorado de um outro orientando do Prof. Schwartzmann.

## 9. UMA ÚLTIMA MENSAGEM

Tive o privilégio de viver uma linda experiência em Porto Alegre, além de trabalhar em um projeto que visava reconhecer pacientes com maior vulnerabilidade ao uso de fluoropirimidinas, o que por si só já é um objetivo muito importante, um dos desdobramentos deste trabalho será a validação de um teste rápido em papel seco, desenvolvido por nosso grupo, para a identificação de deficiência de DPD em saliva.

Isto não era parte integral de minha tese de doutorado, mas é muito entusiasmante. Por isto, decidi descrever sua submissão ao INPI sob a forma de um anexo. Nosso pedido de patente da saliva em papel seco será seguido de um novo projeto, objeto da tese de um outro aluno que chega, e que buscará a sua validação em um grupo maior de pacientes tratados com fluoropirimidinas, para que possa, um dia ser utilizado na rotina.

Ter meu nome como autor de artigos publicados em revistas indexadas internacionalmente já era um grande lucro. Ser co – autor de uma invenção é algo mais incrível ainda para mim.

Nossos estudos preliminares revelam que a estratégia é factível, rápida e de baixo custo, permitindo que paciente em locais com menor infraestrutura laboratorial possam realizar o teste. Isto permitirá que pacientes de regiões mais distantes tenham acesso a ele. É algo aplicável e acessível mesmo em países com maiores dificuldades estruturais e socioeconômicas.

Voltarei ao meu país, Equador, com muitas vivências ricas na bagagem. Além de ter vivido em um país maravilhoso, convivi com uma equipe fantástica, participando de duas importantes publicações científicas em periódicos internacionais indexados o que antes me parecia um sonho distante.

Mais do que isto, esta tese me fez entender melhor o sentido de nossa profissão, que é o de sempre buscar o melhor para os nossos pacientes. E não ter receio de inovar. Buscar novas soluções para os desafios que enfrenamos no dia a dia da prática médica.

## **10. ANEXOS**

### **Anexo 1**

#### **Manuscrito do projeto para obter a patente**

### **KIT E MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLOURPIRIMIDINAS**

#### **Setor tecnológico da invenção**

[01] De uma maneira geral a presente invenção pertence ao setor tecnológico da farmacologia bioquímica e se refere, mais especificamente, a um kit e método para teste de deficiência da enzima DPD para pacientes em tratamento com fluorpirimidinas, resultando na estimativa do risco de toxicidade severa causada por fármacos quimioterápicos.

#### **Estado da técnica conhecido**

[02] O câncer é uma doença crônica de alta incidência e está relacionada entre as cinco principais causas de morte no mundo. Considerando-se somente as doenças crônicas, o câncer é a segunda maior causa de morte, somente apresentando índices inferiores às doenças cardiovasculares. As neoplasias colorretal, de cabeça e pescoço, de estômago e de mama são as mais frequentes e apresentam indicação terapêutica neoadjuvante, adjuvante ou paliativa com o antineoplásico 5-fluorouracil (5-FU). O 5-FU foi introduzido nas práticas terapêuticas em 1957 e continua a ser parte essencial do tratamento de uma variedade de tumores.

[03] O 5-FU apresenta um tempo de meia vida curto, entre 10 a 20 minutos. Sua depuração total do corpo varia conforme a sua administração, sendo que a enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD) é a principal responsável pela degradação do 5-FU, sendo esta expressa principalmente no fígado. Entretanto, é sabido que diversos pacientes possuem mutações genéticas que levam a não expressão desta enzima, o que pode provocar efeitos adversos graves devido ao acúmulo do fármaco. Após ocorrer a penetração na célula, o 5-FU é metabolizado através de duas vias que concorrem entre si: a via anabólica, que dá origem aos metabólitos ativos, e a via catabólica, que inativa o 5-FU e conduz a eliminação do fármaco.

[04] Cerca de 10 a 25% dos pacientes tratados com 5-FU apresentam toxicidades graves, incluindo ainda um índice de 0,5 a 3% de mortes tóxicas, dependendo da dose

e do regime infusional recebido. Recentemente, foi demonstrado que 70% das toxicidades graves e 80% das mortes tóxicas podem estar relacionadas com a deficiência da enzima DPD e, portanto, poderiam ser prevenidas com a avaliação prévia da atividade desta enzima. Desta forma, a administração de uma dose padrão de 5-FU para uma população de pacientes produz amplo gama de respostas devido à grande variabilidade metabólica individual. A partir disso, constata-se que a análise da atividade da enzima DPD pode ser um determinante importante para prever a eficácia e toxicidade do 5-FU. Ainda tal informação pode ser útil para individualizar a administração de 5-FU antes da primeira dose, uma vez que esta enzima geneticamente polimórfica controla aproximadamente 80% da eliminação de 5-FU.

[05] A deficiência da DPD pode ser total ou parcial, o que pode resultar em falha terapêutica e efeitos adversos graves, incluindo a morte, devido ao acúmulo do fármaco no organismo. Estas reações adversas devido ao tratamento por quimioterapia interferem drasticamente na saúde do paciente e estima-se aumentar significativamente os custos hospitalares e com outros medicamentos.

[06] Portanto, diversas alternativas já foram avaliadas para prever a atividade da enzima DPD antes do início de tratamentos com fármacos da classe das fluoropirimidinas. Dentre esses testes, pode-se citar os testes de genotipagem de DYPD, gene codificante da enzima DPD, porém estas opções se mostraram especialmente pouco eficazes para identificar os pacientes com atividade enzimática reduzida. Quando empregados testes de genotipagem, verifica-se que apenas 20% dos casos avaliados são identificados, pois podem ocorrer modificações pós-translacionais das proteínas. Ou seja, podem haver modificações químicas de uma cadeia proteica depois de sua translação.

[07] Outras estratégias também já foram propostas, como a determinação de concentrações endógenas plasmática de uracil (U) e seu produto catabólico, formado também pela enzima DPD, dihidrouracil (UH<sub>2</sub>), bem como a determinação destes mesmos compostos após uma dose de sobrecarga oral de uracil. As alternativas acima descritas requerem a coleta de amostras de sangue venoso, seguida de centrifugação imediata e congelamento do plasma resultante para transporte e análise procedimental do material recolhido. Tal procedimento se faz necessário devido à instabilidade do uracil e do UH<sub>2</sub> no plasma humano, tornando extremamente complexa a logística associada a execução do teste.

[08] A possibilidade de caracterizar a atividade da enzima DPD antes do início do tratamento com 5-FU com a administração oral de uma dose teste de uracil já foi descrita. Após a ingestão da dose teste, são determinadas as concentrações plasmáticas de uracil (U) e seu metabólito dihidrouracil (UH<sub>2</sub>) através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), normalmente associada a detectores espectrofotométricos. Considerando que a enzima DPD é responsável pela redução fisiológica de uracil (U) para dihidrouracil (UH<sub>2</sub>), a avaliação da razão U/UH<sub>2</sub> no plasma está relacionada à atividade da DPD e pode permitir individualizar as doses de 5-FU de acordo com o nível de atividade da enzima de cada paciente.

[09] Esta abordagem foi aplicada em um estudo que demonstrou que, em pacientes com deficiência de DPD, a concentração plasmática de uracil indica uma depuração do uracil diminuída. Entretanto, foram utilizadas doses variáveis de uracil, dependentes da área de superfície corporal, múltiplas coletas de sangue venoso e cálculo de parâmetros farmacocinéticos que requerem amostragem intensiva. Além disso, os procedimentos de coleta do sangue, preparo e posterior destinação das amostras são complexos, bem como no tempo de vida útil do material recolhido é reduzido.

[010] Recentemente foi descrita a utilização de amostras de saliva para determinação das concentrações endógenas de uracil e dihidrouracil como marcadores da atividade da enzima DPD em pacientes que receberam tratamento quimioterápico a base de 5-FU, com diferenças significativas nas razões UH<sub>2</sub>/U entre pacientes com e sem toxicidade severa. Entretanto, as amostras de saliva também requerem congelamento imediato após a coleta e durante seu armazenamento e transporte.

[011] Desse modo, as técnicas atualmente disponíveis, baseadas em análises genéticas e na determinação das concentrações endógenas de uracil e dihidrouracil, embora sejam amplamente empregadas possuem baixa especificidade e sensibilidade para identificar os indivíduos com deficiência da atividade da enzima DPD. Assim pode-se verificar que essas técnicas apresentam claramente limitações de suas aplicações clínicas. A dificuldade do acondicionamento necessário para manter a integridade e para a realização do transporte das amostras é ainda um inconveniente agravante dos métodos atuais.

[012] Uma alternativa proposta pela ODPM (Onco Drug Personalized Medicine) é o uso combinado de dados genéticos e das concentrações endógenas de uracil e dihidrouracil em um algoritmo proprietário para estimativa do risco de toxicidade no

tratamento do câncer colorretal com fluorpirimidinas, com especificidade e sensibilidade superiores a 90%. Entretanto, esta abordagem possui um custo elevado em função dos múltiplos testes e informações necessárias para o uso do algoritmo proprietário. Além disso, no estudo acima citado, em que é descrito o uso de sobrecarga de uracil para identificação de pacientes com deficiência da atividade da enzima DPD, utilizaram-se doses variáveis de uracil e múltiplas coletas de sangue venoso, o que o torna inviável para implementação em larga escala.

[013] Ainda dentro do contexto da invenção aqui proposta é possível citar ainda algumas patentes de invenção como, por exemplo, a WO 1997035034 que propõe composições, métodos e estojos para a detecção de polimorfismos genéticos ou mutações relacionadas com a deficiência da DPD. Já a patente WO 2003018837 refere-se a um kit de diagnóstico e método para determinação do grau de compatibilidade da droga utilizada no tratamento. E ainda, outra alternativa é observada na patente WO 2010035076 na qual é desenvolvido um método, a partir de um algoritmo de decisão, para otimizar a dose de 5-FU administrada por infusão contínua em tratamentos.

[014] A patente europeia EP 1712643 também apresenta uma abordagem multiparamétrica para identificação de pacientes com risco elevado de toxicidade no tratamento do câncer com fluorpirimidinas. Essa abordagem inclui a determinação da presença de mutações no gene DYPD, a determinação das concentrações endógenas plasmáticas de uracil e dihidrouracil e a utilização de um algoritmo proprietário. Contudo, este método requer a realização de múltiplos testes laboratoriais, a conservação e transporte das amostras em condições especiais e a determinação das concentrações plasmáticas de uracil e dihidrouracil em níveis próximos aos limites de quantificação da maioria dos instrumentos analíticos. É visível que esses fatores pontuados acarretam em um aumento significativo da variabilidade das medidas obtidas em análise.

[015] Outra estratégia, recentemente publicada por um grupo de pesquisadores suecos, consiste na utilização de amostras de saliva para medir concentrações basais de U e UH<sub>2</sub>. As principais vantagens deste método são a facilidade da coleta, a dispensa da administração de qualquer fármaco antes da coleta da amostra e a maior estabilidade dos compostos em saliva quando comparada com o plasma, no qual existe atividade da DPD ainda in vitro. Contudo, embora tenha sido descrito diferenças significativas nas razões UH<sub>2</sub>/U salivares entre pacientes com e sem toxicidade grave,

não existe definição do desempenho diagnóstico do teste e, assim como nas amostras de plasma, a saliva deve ser mantida sob refrigeração durante o seu transporte e armazenamento, o que representa uma limitação logística significativa.

[016] Com isso, a partir dos inconvenientes existentes listados acima, é visível a existência de uma lacuna na criação de um teste diagnóstico prático para determinação da potencial intolerância de um dado paciente em tratamento com fármacos quimioterápicos. Verifica-se ainda a necessidade de um novo método que vise a melhoria nas técnicas de coleta, armazenamento e transporte das amostras biológicas para tal identificação.

### **Novidades e objetivos da invenção**

[017] Com o objetivo de sanar as falhas do estado atual da técnica destacadas acima, a presente invenção visa propor uma solução para o problema principal relacionado aos elevados custos dos procedimentos para a detecção da redução da atividade da enzima DPD. A solução em questão prevê a redução e/ou a eliminação de etapas como os métodos que necessitam de centrifugação, refrigeração do plasma, armazenagem e transporte de forma adequada para que as amostras não sejam danificadas. Além disso, a presente invenção visa eliminar a coleta de múltiplas amostras de sangue venoso, o que atualmente dificulta a implementação em larga escala do procedimento.

[018] Levando em consideração estes fatores, o invento, objeto do presente relatório, propõe um kit e método não invasivos para teste diagnóstico em pacientes em tratamento, visando a determinação do nível de intolerância destes indivíduos a fármacos quimioterápicos da classe das fluorpirimidinas. O método em questão compreende etapas simples de coleta de saliva, armazenagem e transporte da amostra coletada. Por fim, é associada uma avaliação da atividade da enzima dihidropirimidina desidrogenase e, através de um algoritmo, é estipulada uma classificação do risco individual de que o paciente apresente toxicidade de graus III, IV e V no tratamento quimioterápico.

[019] As vantagens do método consistem na utilização de amostras que são coletadas de forma não invasiva, sendo suficiente a coleta de apenas uma amostra biológica para determinação das concentrações de uracil (U) e dihidrouracil (UH<sub>2</sub>). Ademais, a estabilização das concentrações dessas substâncias na saliva seca em papel é executada através da adição de gimeracil, o que permite o transporte não refrigerado da amostra. O teste para determinação da deficiência de DPD a partir da

coleta de uma amostra de saliva em papel, representa uma alternativa simplificada e com possibilidade de realização em locais de mais difícil acesso.

[020] Resumidamente, os principais componentes da invenção consistem em: cilindro de algodão para coleta de saliva, seringa para eluição da saliva do cilindro de algodão, cartão para aplicação da saliva impregnado com o estabilizante gimeracil e embalagem para transporte do cartão com a amostra. Associada aos itens para obtenção, armazenagem e transporte da amostra do teste, a invenção inclui um método analítico para determinação das concentrações de uracil e dihidrouracil. Essas concentrações são obtidas através da análise do papel contendo a saliva seca por meio de cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas sequencial. Além disso, é empregado um algoritmo para identificação dos pacientes com risco elevado de toxicidades graus III-V devido a quimioterapia com fluorpirimidinas.

#### **Descrição dos desenhos anexos**

[021] A fim de que a presente invenção seja plenamente compreendida e levada à prática por qualquer técnico deste setor tecnológico, a mesma será descrita de forma clara, concisa e suficiente, tendo como base o diagrama de blocos do processo de teste de deficiência da enzima DPD de acordo com a

[022] **Figura 1** representa o diagrama de blocos das etapas do método para teste de deficiência da enzima DPD para pacientes em tratamento com fluorpirimidinas.

[023] **Figura 2** representa o diagrama de blocos das etapas de coleta de material biológico do método proposto na presente intenção através de coleta de saliva do paciente.

[024] **Figura 3** representa, exemplificativamente, o cartão de coleta com papel especial do presente kit para teste de deficiência da enzima DPD para pacientes em tratamento com fluorpirimidinas.

[025] **Figura 4** representa a relação seringa e cilindro de algodão do presente kit para teste de deficiência da enzima DPD para pacientes em tratamento com fluorpirimidinas a partir da saliva.



### **Descrição detalhada da invenção**

[026] O kit para teste de deficiência da enzima dihidropirimidina desidrogenase sobrecarga de uracil, que compõe a invenção, é compreendido basicamente de seringa descartável, cartão de coleta em papel *Whatman* 903 ou similar, cilindro de algodão, envelope plasmático com dissecador para transporte do cartão de coleta, suporte plástico para transporte não refrigerado dos componentes do kit e cartão de instruções de coleta.

[027] O cartão para coleta (1) composto de papel *Whatman* 903 ou similar é impregnado com gimeracil nas áreas de disposição das amostras coletadas (2), a fim de inibir a atividade da DPD. Além disso, a seringa descartável apresenta diâmetro D e o cilindro de algodão apresenta diâmetro D-n, sendo n uma unidade mínima que permita a introdução de tal cilindro no interior da seringa descartável.

[028] Conforme observado na Figura 1, na qual é apresentado o diagrama de blocos do método para o teste de deficiência da enzima DPD para pacientes em tratamento com flourpirimidinas através da coleta de uma amostra de material biológico do paciente. O material biológico é coletado do paciente através de um modo não invasivo, através da obtenção de uma amostra de saliva. Uma vez coletado o material, a amostra obtida é aplicada em um cartão de coleta (1) impregnado ou não de gimeracil, a fim de inibir a atividade da DPD. O cartão de coleta (1) então é seco e introduzido em um envelope com dissecador para que seja transportado para posterior análise. A análise do material coletados se dá a partir da perfuração do cartão de coleta (1) e consequente extração de um disco (2) impregnado da amostra coletada. A amostra é então extraída do disco (2) com ação de um solvente orgânico, preferencialmente metanol, acetato de etila, isopropanol e suas misturas, e, posteriormente, será concentrada através de aquecimento moderado em condições de vácuo. A amostra concentrada é injetada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector seletivo de massas, com seus componentes separados por eluição em gradiente em uma coluna de cromatografia. As concentrações de uracil e dihidrouracil são determinadas com base na razão de áreas entre os analitos e o padrão interno, e após são comparadas com as concentrações da curva de calibração do Cromatógrafo. O risco de toxicidade do paciente é então determinado com base na proporção entre as concentrações salivares de dihidrouracil e uracil (razão UH<sub>2</sub>/U), conforme descrito abaixo.

[029] Quando o teste de deficiência da enzima DPD para pacientes em tratamento com fluorpirimidinas é realizado através da saliva, o material biológico é coletado de forma não invasiva através da introdução de um cilindro de algodão (4) na boca do paciente durante 2 a 3 minutos, preferencialmente 2 minutos. O cilindro de algodão (4) absorve cerca de 2 ml a 5 ml de saliva do paciente, preferencialmente 3 ml de saliva do paciente. Após, o cilindro de algodão (4) é removido com instrumento esterilizado e será introduzido no interior da seringa descartável (3). Através do êmbolo (5) da seringa (3), o cilindro de algodão (4) é comprimido possibilitando a extração da saliva para análise. Com o auxílio da seringa descartável (3), as amostras de saliva deverão ser aplicadas no cartão para coleta (1).

[030] A determinação das concentrações basais de U e UH2 em amostras de saliva do paciente, através de cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas sequencial, indicam alto grau de certeza na determinação dos pacientes de que irão desenvolver toxicidade severa durante o tratamento quimioterápico. Os testes em questão indicam um valor de corte da razão de concentrações UH2/U em saliva de 1,16. Sendo assim, razões inferiores a 1,16 indicam menor atividade DPD. Tal teste com a utilização da saliva apresenta sensibilidade 85% e especificidade de 72% para identificar os pacientes que apresentarão toxicidades de graus III e IV em tratamento quimioterápicos com fluorpirimidinas.

[031] Além disso, é possível minimizar o impacto dos testes falso-positivos em regimes infusões através da medida de concentrações plasmáticas de 5-FU no primeiro ciclo, no caso do uso de doses reduzidas, e o consequente cálculo da área sob a curva, com ajuste de doses para os ciclos posteriores. De forma similar, falsos-negativos poderão ser identificados pela determinação de níveis plasmáticos de 5-FU, que potencialmente deverão estar acima dos limites já estabelecidos na literatura como os mais seguros.

[032] É importante salientar que a figura e descrição realizadas não possuem o condão de limitar as formas de execução do conceito inventivo ora proposto, mas sim de ilustrar e tornar compreensíveis as inovações conceituais reveladas nesta solução. Desse modo, as descrições e imagens devem ser interpretadas de forma ilustrativa e não limitativa, podendo existir outras formas equivalentes ou análogas de implementação do conceito inventivo ora revelado e que não fujam do espectro de proteção delineado na solução proposta.

[033] Tratou-se no presente relatório descritivo de um inovador método e kit para a determinação de pacientes que possuem deficiências na atividade da enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD), dotado de novidade, atividade inventiva, suficiência descritiva, aplicação industrial e, conseqüentemente, revestido de todos os requisitos essenciais para a concessão do privilégio pleiteado.

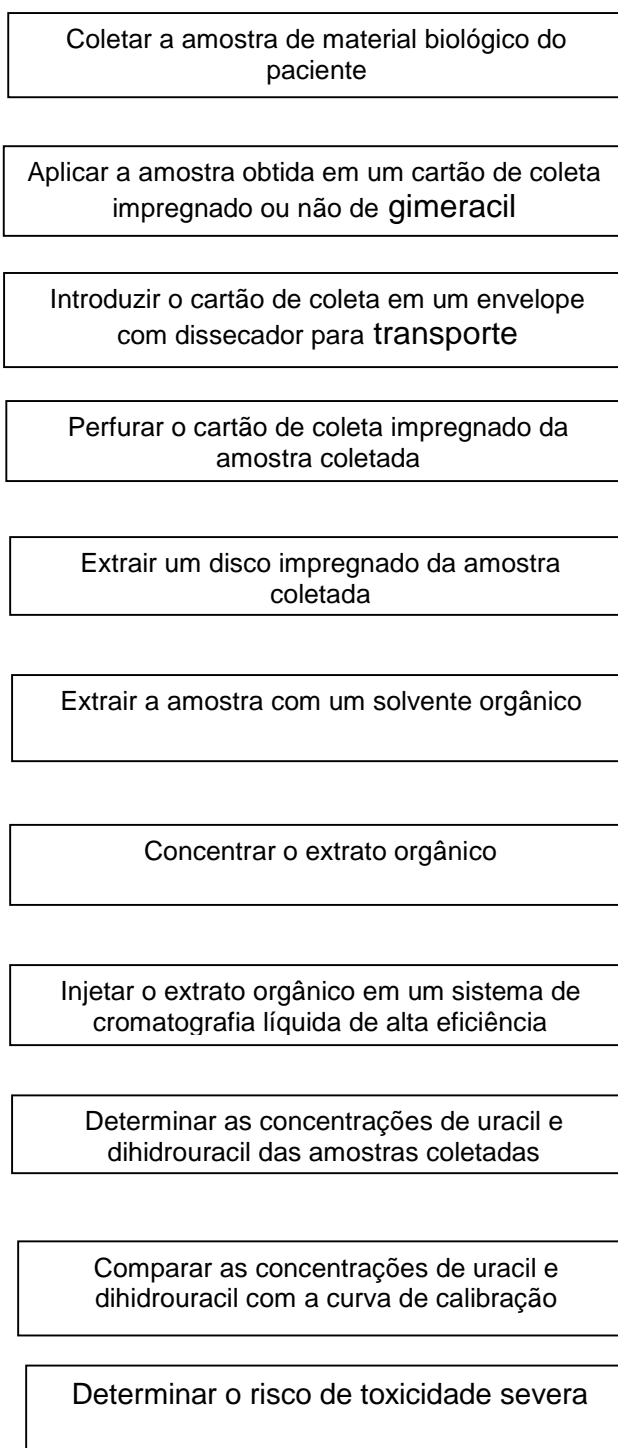


Fig. 1

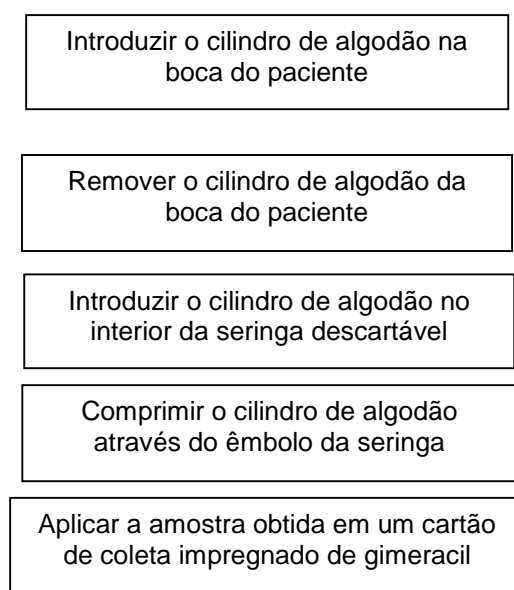


Fig. 2

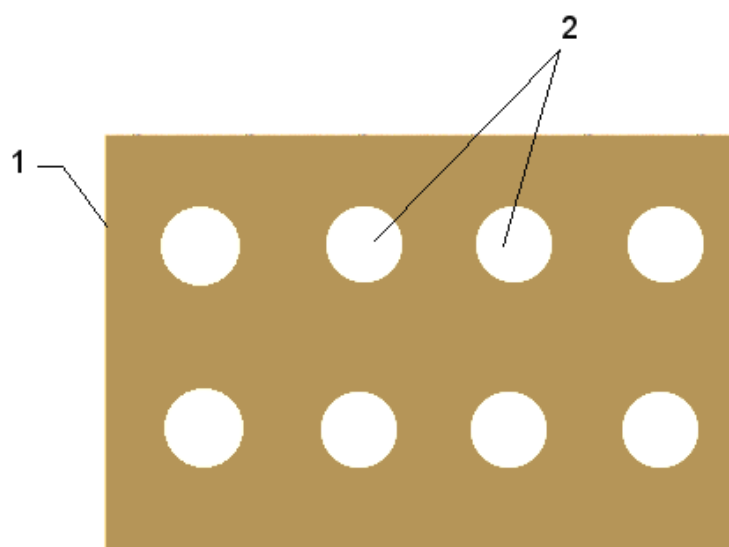


Fig. 3

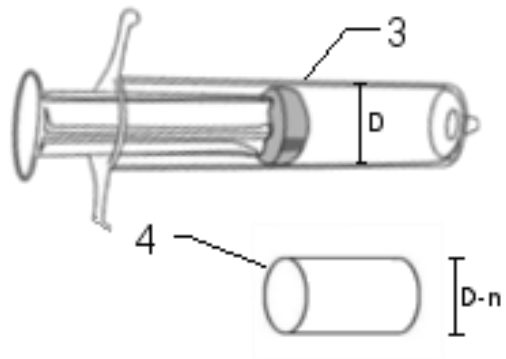


Fig. 4



Fig. 5



## **DECLARAÇÃO DE COTITULARIDADE DE INVENTORES COM PERCENTUAIS DIFERENTES**

**OBJETO: KIT E MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS**

**INVENTOR: GILBERTO SCHWARTSMANN, brasileiro, casado, médico, inscrito no CPF sob o nº 289.946.470-15, residente e domiciliado à Rua Santo Inácio 525 apt. 1201, Porto Alegre - RS, CEP: 90570-150, declara que possui 30% (30 por cento) de direitos sobre a invenção descrita no objeto.**

**INVENTOR: RAFAEL LINDEN, brasileiro, casado, farmacêutico, inscrito no CPF sob o nº 541.965.150-53, residente e domiciliado à Rua Francisco Emílio Muller, 2131 Taquara - RS, CEP: 95600-000 declara que possui 30% (30 por cento) de direitos sobre a invenção descrita no objeto.**

**INVENTOR: MARINA VENZON ANTUNES, brasileira, solteira, biomédica, inscrita no CPF sob o nº 003.258.550-05, residente e domiciliada à Rua Munique, 299 apt. 103, Nova Petrópolis - RS, CEP: 95150-000, declara que possui 30% (30 por cento) de direitos sobre a invenção descrita no objeto.**

**INVENTOR: ANDRÉS FERNANDO ANDRADE GALARZA, equatoriano, casado, médico, inscrito no CPF sob o nº 868.378.000-78, residente e domiciliado à Rua Anita Garibaldi, 2120 apt. 206, Porto Alegre - RS, CEP 90480-201, declara que possui 10% (10 por cento) de direitos sobre a invenção descrita no objeto.**

Estando todos os inventores relacionados de acordo com os percentuais estabelecidos acima em relação ao objeto descrito, declaram que estes percentuais previstos no presente instrumento, se aplicam à proteção da patente no Brasil e no exterior, relacionada ao OBJETO acima descrito, inclusive o direito de prioridade, em consonância e para os fins do disposto na Lei de Propriedade Industrial (Lei n.º 9279/96), na Convenção da União de Paris para a Proteção da Propriedade Industrial (CUP) e no Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT), declarando ter(em) reciprocamente fornecido a melhor descrição do OBJETO acima intitulado e informado todas as variações e derivações que conheciam na data de assinatura do presente instrumento. Este instrumento possui validade para proteção internacional da patente, desde que no mínimo dois inventores desejem dar continuidade na proteção internacional futura da patente.

Porto Alegre/RS, 03 de agosto de 2015

**Anexo 2****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**PESQUISA: *Avaliação genotípica e fenotípica da atividade da enzima DPD e sua relação com a ocorrência de toxicidade no tratamento com fluoropirimidinas.***

Código de identificação da paciente # \_\_\_\_\_  
PACIENTE

---

Prezado Sr./Sra.

Vamos realizar um estudo para identificar variações genéticas do metabolismo do 5-fluoracil (5-FU) que é um medicamento (quimioterapico) usado no tratamento do câncer.

Como o Sr/ Sra. teve diagnóstico de câncer e para o tratamento precisa de 5-fluorouracil, gostaríamos de convidá-la a participar do estudo. Caso você concorde em participar, realizaremos uma entrevista com questões pertinentes ao tratamento com 5-Fluoracil e registraremos suas informações médicas. Do dia de início da quimioterapia você estará em jejum de 8 horas, coletaremos uma amostra de 4 mL de sangue venoso e saliva para determinação das razões endógenas de uracil e dihidrouracil. Após, você receberá uma dose de 1 grama de uracil e passadas 2 horas coletaremos uma amostra de 4 mL de sangue venoso e uma amostra de sangue capilar do seu dedo. Posteriormente, você receberá sua terapia com 5-FU e durante o tratamento será coletada uma amostra de 4 mL de sangue venoso ao final do ciclo de tratamento de infusão para a determinação das concentrações do quimioterápico.

Durante o tratamento vamos fazer algumas perguntas relacionadas ao tratamento com 5-Fluoracil, como por exemplo, a presença de efeitos adversos.

Com as amostras de sangue e saliva, verificaremos se há a presença de uma alteração genética na enzima que metaboliza o 5-Fluoracilo, que está causando efeitos não desejados em seu tratamento.

Os materiais biológicos não serão utilizados para outras finalidades que não aquelas expostas neste termo. Durante a realização do estudo as amostras permanecerão armazenadas a -20 °C no laboratório que realizará as análises. Após o término do estudo as amostras serão descartadas.

A assinatura desse consentimento informado dará autorização aos pesquisadores do estudo de utilizarem os dados obtidos somente para fins científicos, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a identidade dos pacientes.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre os procedimentos diagnósticos e tratamento aos quais serei submetido(a), ressaltando que fui suficientemente informado de que minha participação neste estudo não ocasionará qualquer alteração em meu tratamento quimioterápico. Declaro que fui suficientemente esclarecido que: A) Para a realização dos testes laboratoriais serão coletadas amostras de sangue. B) Que não haverá riscos à minha saúde, podendo, entretanto, haver desconforto em função da punção venosa. C) Que poderei consultar os pesquisadores responsáveis em qualquer época

pessoalmente ou por telefone, para esclarecimento de qualquer dúvida. D) Que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar dessa pesquisa, que não precisarei apresentar quaisquer justificativas para isso, e caso deixe o estudo, não terei prejuízos no atendimento por esta instituição. E) Que todas as informações por mim fornecidas e/ou resultados obtidos serão mantidos em sigilo e que, estes somente serão utilizados para divulgações em reuniões e revistas sem a minha identificação. F) Que serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato de mudar o meu consentimento em participar da pesquisa. G) Que não terei quaisquer benefícios e/ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. H) Todos os custos relacionados a exames diagnósticos serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

O profissional Dr. Andrés Andrade Galarza, certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial. Em caso de dúvidas, poderei contatar para esclarecimentos o Dr. Gilberto Schwartzmann no Serviço de Oncologia Clínica do HCPA, 2º andar do prédio da Radioterapia, telefones: 3359.8335 ou 3359-8012 ou ainda através do e-mail [gschwartzmann@hcpa.ufrgs.br](mailto:gschwartzmann@hcpa.ufrgs.br).

Para eventuais esclarecimentos éticos poderá ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) no telefone (51) 3359 8304.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

OBS: Este termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário (a) ou seu representante legal e a outra, ao pesquisador.



**Anexo 3****Ficha para coleta de dados****1) Informações Gerais**

Nº Prontuário.....  
 Sexo .....  
 Idade .....  
 Raça .....  
 Peso .....  
 IM. corporal .....  
 Origem .....  
 Tel. Contato .....  
 Data da coleta da amostra .....  
 Data do início de tratamento com QT .....  
 Localização do tumor .....

**2) Dados referentes ao 5-FU**

5-FU administrado em bolus Sim (....) Não (.....)  
 Tempo de administração.....  
 5-Fu/m<sup>2</sup> dose administrada.....  
 Dose apreciado pela curva de concentração/tempo.....  
 Enzimas do metabolismo 5-FU, genótipo (....) (....) (....) (....) (....) (.. ...) (....) (.....)  
 (.....) (.....) (.....) (.....)  
 Terapia: Neoadjuvante (....) Adjuvante (.....) Paliativa (.....)  
 Protocolo de quimioterapia .....  
 Ciclos de QT previstos .....  
 Ciclos de QT realizada .....

5-FU Administrado em infusão Sim (....) Não (.....)  
 Tempo de administração.....  
 5-Fu/m<sup>2</sup> dose administrada.....  
 Dose apreciado pela curva de concentração/tempo.....  
 Enzimas do metabolismo 5-FU, genótipo (....) (....) (....) (....) (....) (.. ...) (....) (.....)  
 (.....) (.....) (.....) (.....)  
 Terapia: Neoadjuvante (....) Adjuvante (.....) Paliativa (.....)  
 Protocolo de quimioterapia .....  
 Ciclos de QT previstos .....  
 Ciclos de QT realizada .....

**3) Dados sobre o tumor**

Tipo de tumor .....  
 Etapa Clínica I (.....) II (.....) III (.....) IV (.....)  
 Tamanho .....  
 Grau de diferenciação 1 (.....) 2 (.....) 3 (.....)  
 Data do diagnóstico .....  
 Tratamentos prévios QT .....

**4) Dados relativos ao paciente****Reações adversas:**

Diarreia Leve (.....) Moderado (.....) Grave (.....)  
 Náuseas Leve (.....) Moderado (.....) Grave (.....)  
 Vômitos Leve (.....) Moderado (.....) Grave (.....)  
 Neutropenia: Grau 1: 1500-2000 células/mm<sup>3</sup> (.....) Grau 2: 1000 a 1500 células/mm<sup>3</sup> (.....) , Grau 3: 500 a 1000 células/mm<sup>3</sup> (.....) , Grau 4: <500 células/mm (.....)  
 Trombocitopenia: Grau 1: 150000-75000 /ul (.....) Grau 2: 75000 - 50000 /ul (.....) Grau 3: 50000 - 25000 /ul (.....) Grau 4: <25000 células/ul (.....)  
 Mucosite Leve (.....) Moderado (.....) Grave (.....)  
 Alopecia Leve (.....) Moderado (.....) Grave (.....)  
 Fadiga Leve (.....) Moderado (.....) Grave (.....)  
 Reações na pele Leve (.....) Moderado (.....) Grave (.....)  
 Dor no peito Leve (.....) Moderado (.....) Grave (.....)  
 Outro.....

Em Qual ciclo ocorreu os efeitos adversos 1(.....) 2(.....) 3(.....) 4(.....) 5(.....)  
 6(.....) 7 o + (.....)  
 Tempo livre da.....  
 Tempo que ocorreu a recaída.....  
 Diminuição do tamanho do tumor Sim (.....) Não (.....) Quanto.....