

Geraldo Felício da Cunha Júnior

**PAPEL DO TESTE RESPIRATÓRIO COM URACIL
MARCADO COM CARBONO-13 NA PREDIÇÃO DE RISCO DE TOXICIDADE AO
QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL EM PACIENTES PORTADORES DE
CÂNCER GASTROINTESTINAL**

Belo Horizonte
2011

Geraldo Felício da Cunha Júnior

**PAPEL DO TESTE RESPIRATÓRIO COM URACIL
MARCADO COM CARBONO-13 NA PREDIÇÃO DE RISCO DE TOXICIDADE AO
QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL EM PACIENTES PORTADORES DE
CÂNCER GASTROINTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, área de concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Belo Horizonte
2011

C972p Cunha Júnior, Geraldo Felício.
Papel do teste respiratório com Uracil marcado com Carbono-13 na
predição de risco de toxicidade ao quimioterápico 5-Fluorouracil em
pacientes portadores de câncer gastrointestinal [manuscrito]. / Geraldo
Felício Cunha Júnior. - - Belo Horizonte: 2011.
137f.: il.
Orientador: Luiz Gonzaga Vaz Coelho.
Área de concentração: Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias Gastrointestinais. 2. Testes Respiratórios. 3. Uracila. 4.
Fluoruracila/toxicidade. 5. Quimioterapia/efeitos adversos. 6. Dissertações
Acadêmicas. I. Coelho, Luiz Gonzaga Vaz. II. Universidade Federal de
Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WI 149

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Professor Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA

Professora Rocksane de Carvalho Norton

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Ricardo Santiago Gomez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Professor Renato de Lima dos Santos

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Professor Francisco José Penna

VICE-DIRETOR

Professor Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Manoel Otávio da Costa Rocha

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO - ÊNFASE EM CIÊNCIAS APLICADAS AO APARELHO DIGESTIVO

Professora Anelise Impeliziere Nogueira (Chefe do Departamento de Clínica Médica)

Professora Teresa Cristina Abreu Ferrari (Coordenadora do Programa)

Professora Valéria Maria de Azeredo Passos (Subcoordenadora do Programa)

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO - ÊNFASE EM CIÊNCIAS APLICADAS AO APARELHO DIGESTIVO

Professora Teresa Cristina Abreu Ferrari (Titular)

Professor Eduardo Garcia Vilela (Suplente)

Professora Valéria Maria A. Passos (Titular)

Professora Flávia Vasques Bittencourt (Suplente)

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho (Titular)

Professora Luciana Dias Moretzsohn (Suplente)

Professora Suely Meireles Rezende (Titular)

Professor Nilton Alves Rezende (Suplente)

Professor Francisco Eduardo C. Cardoso (Titular)

Professora Sandhi Maria Barreto (Suplente)

Professor Marcus Vinícius M. de Andrade (Titular)

Professor Antônio Luiz Pinho Ribeiro (Suplente)

William Pedrosa de Lima (Representante Discente Titular)

Pollyanna Barros Batista (Representante Discente Suplente)



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Luiz Gonzaga Vaz Coelho, José Renan da Cunha Melo, Celso Abdon Lopes de Mello, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **"PAPEL DO TESTE RESPIRATÓRIO COM URACILA MARCADA COM CARBONO-13 NA PREDIÇÃO DE RISCO DE TOXICIDADE AO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL EM PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER GASTROINTESTINAL"**, apresentada pelo mestrando **GERALDO FELÍCIO DA CUNHA JUNIOR**, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto – área de concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 29 de novembro de 2011.

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho
Orientador

Prof. José Renan da Cunha Melo

Prof. Celso Abdon Lopes de Mello



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado de GERALDO FELÍCIO DA CUNHA JUNIOR nº de registro 2009655286. Às treze horas e trinta minutos do dia vinte e nove de novembro de 2011, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação aprovada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "PAPEL DO TESTE RESPIRATÓRIO COM URACILA MARCADA COM CARBONO-13 NA PREDIÇÃO DE RISCO DE TOXICIDADE AO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL EM PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER GASTROINTESTINAL", requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto - área de concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado definitivo. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho/ Orientador
Prof. José Renan da Cunha Melo
Prof. Celso Abdon Lopes de Mello

Instituição: UFMG
Instituição: UFMG
Instituição: Hosp AC
Camargo/SP

Indicação: Aprovado
Indicação: Aprovado
Indicação: Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado

Aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de novembro de 2011.

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho/ Orientador

Prof. José Renan da Cunha Melo

Prof. Celso Abdon Lopes de Mello

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari/Coordenadora

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e o carimbo do Coordenador

Profª Teresa Cristina de Abreu Ferrari
Coord. PG. em Ciências Aplicadas
à Saúde do Adulto
Faculdade de Medicina / UFMG

À minha amada esposa Érika e a meus filhos, Rafael e Felipe,
razão do meu viver, dedico este trabalho pelas longas horas
em que resignadamente se privaram de minha companhia.
Aos meus pais pelo sacrifício em prover-me formação moral
e educação formal, e pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Gonzaga Vaz Coelho, orientador sempre presente, que com visão acadêmica e senso prático incentivou-me a expandir os meus limites.

Aos Professores Dr. Luiz Armando Cunha de Marco e Dr. Gerson Antônio Pianetti pelo interesse no projeto e apoio irrestrito.

Aos colegas e colaboradores Flávia Linhares, Isabela da Costa César, Luciana Bastos Rodrigues, Marina Borges Bolina e Osmar Reni, pela participação fundamental nos ensaios laboratoriais.

À Equipe de Oncologia da OXION pelo incentivo e cobertura nos momentos de ausência.

RESUMO

INTRODUÇÃO:

Não há métodos clinicamente disponíveis para prever toxicidade ao quimioterápico 5-fluorouracil (5FU). O teste respiratório com ^{13}C -uracil (UraBT) consiste em mensurar o $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado após ingestão de ^{13}C -uracil para avaliar a via catabólica do uracil e, conseqüentemente, do 5FU.

OBJETIVOS:

Primário: Avaliar a acurácia do UraBT em: 1) discriminar indivíduos que tiveram toxicidade graus 3-4 *versus* toxicidade graus 0-1; 2) discriminar indivíduos com deficiência da atividade de diidropirimidina-desidrogenase (DPD) comprovada por outros métodos (dentre os que tiveram toxicidade graus 3-4) daqueles sem deficiência de DPD (dentre os com toxicidade graus 0-1).

Secundários: (1) Desenvolver uma técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para mensurar uracil (U) e diidrouacil (UH_2) em plasma. (2) Identificar as mutações mais freqüentes no gene *DPYD* que causam deficiência em DPD em pacientes brasileiros.

CASUÍSTICA:

Recrutados 33 pacientes com câncer gastrointestinal previamente expostos ao 5FU dos quais 13 tiveram toxicidade graus 3-4 e 20 tiveram toxicidade graus 0-1.

MÉTODOS:

Realizados os seguintes testes: (1) sequenciamento de porções do gene *DPYD* em busca de mutações deletérias; (2) determinação da relação plasmática UH_2/U , biomarcador da atividade de DPD; (3) UraBT no espectrômetro infravermelho IRIS-2.

RESULTADOS:

4/13 pacientes com toxicidade grau 3-4 provaram-se DPD-deficientes: três por mutações deletérias e um por relação baixa UH_2/U . UraBT foi significativamente diferente entre os grupos com toxicidade graus 3-4 e graus 0-1 (sensibilidade 61,5%, especificidade 85%) e entre os pacientes DPD-deficientes e não DPD-deficientes (sensibilidade 75%, especificidade 85%).

CONCLUSÃO:

UraBT apresenta acurácia moderada em discriminar indivíduos com grave toxicidade daqueles que tiveram nenhuma ou leve toxicidade ao 5FU, e em discriminar DPD-deficientes de não DPD-deficientes.

Palavras-chave: 5-Fluorouracil, DPD, Teste respiratório com carbono-13, Toxicidade à quimioterapia, Câncer gastrointestinal.

ABSTRACT

INTRODUCTION:

There are no clinically available methods to predict toxicity to the chemotherapeutic drug 5-Fluorouracil (5FU). The breath test after ^{13}C -Uracil (UraBT) consists of measuring $^{13}\text{CO}_2$ in exhaled breath after ingestion of ^{13}C -Uracil to evaluate uracil (and 5FU) catabolic pathway.

OBJECTIVES:

To evaluate UraBT to 1) discriminate individuals with grade 3-4 toxicity versus grade 0-1 toxicity; 2) discriminate individuals with proven dihydropyrimidine-dehydrogenase (DPD) deficiency (among those with grade 3-4 toxicity) from those without DPD deficiency (among those with grade 0-1 toxicity). To develop a high-performance liquid chromatography method to measure plasma uracil (U) and dihydrouracil (UH_2). To find the most frequent mutations in gene *DPYD* that cause DPD-deficiency in Brazilian subjects.

PATIENTS:

33 patients with gastrointestinal cancer previously exposed to 5FU from which 13 had grade 3-4 toxicity and 20 grade 0-1 toxicity.

METHODS:

The following tests were developed and conducted: (1) sequencing *DPYD* gene in search for deleterious mutations; (2) determination of plasma ratio UH_2/U , surrogate marker of DPD activity; (3) UraBT in IRIS-2 infrared spectrometry.

RESULTS:

4/13 patients with grade 3-4 toxicity proved to be DPD-deficient: three had deleterious mutations, and one had low UH_2/U ratio. UraBT was significantly different between groups with grade 3-4 and grade 0-1 toxicity (sensitivity 61.5%; specificity 85%) and between DPD-deficient patients and non DPD-deficient patients (sensitivity 75%; specificity 85%).

CONCLUSION:

UraBT has moderate accuracy in discriminating individuals with grade 0-1 toxicity from those with grade 3-4 toxicity, and DPD-deficients from non DPD-deficients.

Keywords: 5-Fluorouracil, DPD, Breath tests, carbon-13, Toxicity to chemotherapy, Gastrointestinal cancer.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5FU	5-Fluorouracil
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTAE	Common Toxicity Criteria for Adverse Events
DPD	Diidropirimidina-desidrogenase
DPYD	Gene que codifica diidropirimidina-desidrogenase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TR	Teste respiratório
U	Uracil
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UH ₂	Diidrouracil
UraBT	Teste respiratório pós ingestão de uracil marcado com carbono-13

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
	ARTIGO 1 - Um método rápido de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas para determinação plasmática da relação Diidrouracil/Uracil: avaliação de toxicidade ao 5-Fluorouracil em pacientes com câncer gastrointestinal	14
	ARTIGO 2 - Teste respiratório com ¹³C-Uracil na predição de toxicidade pelo quimioterápico 5-Fluorouracil em pacientes com câncer gastrointestinal	35
2	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	APÊNDICE A - Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.....	58
	APÊNDICE B - Ficha Clínica	59
	APÊNDICE C - Quadro de graduação de toxicidade relacionada ao quimioterápico 5-Fluorouracil	60
	APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	61
	APÊNDICE E - Desenvolvimento da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação dos níveis plasmáticos de Uracil e Diidrouracil.....	64
	APÊNDICE F - ARTICLE 1 - A rapid HPLC-ESI-MS/MS method for determination of Dihydrouracil/Uracil ratio in plasma: evaluation of toxicity to 5-Fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer	80
	APÊNDICE G - ARTICLE 2 - ¹³C-Uracil breath test to predict 5-Fluorouracil toxicity in gastrointestinal cancer patients.....	107
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	107
	ANEXO B - Carta de aceite para publicação do Artigo 1 no periódico Therapeutic Drug Monitoring.....	137

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O 5-Fluorouracil (5FU) é um quimioterápico antimetabólito que imita bioquimicamente a base nitrogenada uracil, exercendo seus efeitos antitumorais através da inibição da enzima timidilato-sintetase e incorporação ao DNA e RNA como falso nucleotídeo. Constitui a base do tratamento dos cânceres do aparelho digestivo, notadamente o colorretal. É bem tolerado pela maioria dos pacientes, porém significativa proporção (que varia de 5-10% se aplicado em infusões contínuas até 31% se infusões em bolo por vários dias consecutivos) apresenta excessiva toxicidade, levando a internações prolongadas e onerosas, podendo ser fatal em 0,5-1,0% dos pacientes. A toxicidade clínica ao 5FU é, via de regra, determinada pela velocidade da via catabólica, enquanto que o efeito terapêutico depende do anabolismo. A enzima diidropirimidina-desidrogenase (DPD) é a etapa inicial e velocidade-limitante do catabolismo das pirimidinas e de seu análogo 5FU. Cerca de 80% do 5FU infundido por via endovenosa é rapidamente inativado pela DPD, com meia-vida de apenas 13 minutos. A inibição farmacológica desta enzima provoca aumento das concentrações e toxicidade ao 5FU, corroborando seu papel no metabolismo da droga. Desde 1985 descreve-se na literatura vários casos de grave toxicidade ao 5FU em indivíduos com baixa atividade de DPD.

Testes fenotípicos, como determinações séricas da atividade de DPD através de radioensaio ou inferência da atividade de DPD através da determinação da proporção plasmática de uracil (U) e seu metabólito diidrouacil (UH₂) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, identificam baixa atividade de DPD em 36-61% dos indivíduos que manifestam toxicidade grave ao 5FU. O teste genético (seqüenciamento das porções decodificadoras do gene que codifica a DPD, *DPYD*) encontra mutações deletérias (que justificam a síntese insuficiente ou deficiente de DPD) em 10-40% dos pacientes com grave toxicidade ou baixa atividade enzimática pelos testes fenotípicos.

Todos estes testes são onerosos, complexos e indisponíveis à maioria dos centros de tratamento de câncer, além de carecerem de acurácia suficiente para fins de triagem dos pacientes a serem submetidos ao 5FU. Deste modo, não existe nenhum teste preditivo de toxicidade ao 5FU disponível na prática clínica.

Estudos preliminares comprovaram que um Teste Respiratório (TR) após ingestão de uracil marcado com ¹³Carbono (dosando-se por espectrometria de luz infravermelha a quantidade de ¹³CO₂ expirada) correlacionou-se com a atividade da via catabólica do 5FU,

sendo simples e de fácil realização. Demonstrou-se sensibilidade de 100% e especificidade de 96% em discriminar um grupo de reconhecidos “DPD-deficientes” de uma população de “não DPD-deficientes”. No entanto, para a prática clínica, conhecer a acurácia do TR em prever quais pacientes apresentarão grave toxicidade ao 5FU seria mais relevante que identificar os deficientes em DPD. Não se conhece a acurácia do TR em discriminar indivíduos quanto à toxicidade apresentada.

O espectrômetro de luz infravermelha é disponível e largamente utilizado há mais de 10 anos no Laboratório de Testes Respiratórios do Instituto Alfa de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para realização de testes na área de gastroenterologia. O substrato 2-¹³C-Uracil apresenta-se em forma de pó branco inodoro e insípido, não-radioativo, sendo disponível comercialmente através de importação. O Teste Respiratório é simples, de fácil interpretação e passível de realização por profissionais de nível técnico. Além disso, é possível o armazenamento das bolsas coletoras de ar com envio para leitura em centros de referência.

Como não há estudos brasileiros sobre os fatores determinantes e as maneiras de se prever a toxicidade ao 5FU, foi elaborada uma metodologia de trabalho que envolveu o recrutamento de casuística composta por pacientes portadores de câncer gastrointestinal previamente expostos a doses terapêuticas de 5FU e cujo prontuário médico documentasse a ocorrência de toxicidade grave não-fatal (graus 3-4 do *Common Toxicity Criteria for Adverse Events* – CTAE – versão 3.0) ou toxicidade ausente ou leve (graus 0-1). A seguir, desenvolveu-se e aplicou-se a todos os pacientes os seguintes métodos de detecção de deficiência enzimática no catabolismo do 5FU:

A) Desenvolvimento da Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): A determinação plasmática dos níveis de U e UH₂ e da relação UH₂/U como marcador de atividade de DPD foi possível graças a parceria com o CEDAFAR Analítico, na Faculdade de Farmácia da UFMG. Baseado nos estudos de mensuração de UH₂/U disponíveis na literatura, nesta etapa foi desenvolvido e validado um método mais rápido e simples de detecção, com elevada precisão graças à utilização do Espectrômetro de Massas, aparelho que apresenta grande acurácia na quantificação de moléculas presentes em pequenas concentrações no plasma. O **objetivo primário** desta etapa era classificar, com base em resultado da relação UH₂/U baixa, pacientes que apresentaram grave toxicidade ao 5FU como DPD-deficientes, formando um grupo comparativo importante para o posterior estudo do TR. Como **objetivo secundário** buscou-se correlacionar os resultados da relação

UH₂/U para cada paciente com a presença ou ausência de toxicidade grave, a fim de se definir o papel deste exame em discriminar os dois grupos de pacientes. (**Artigo 1**). O artigo foi submetido em 07/08/2011 ao periódico “Therapeutic Drug Monitoring” tendo sido aceito para publicação em 03/11/2011 (**Anexo B**).

- B) Desenvolvimento de técnica para seqüenciamento de exons do gene *DPYD*:** O gene que codifica a DPD, *DPYD*, presente no cromossomo 1, é extenso, composto por 23 exons, com mais de 50 mutações detectadas até o momento, a maioria levando à deficiência de DPD. A frequência das mutações obedece a padrão étnico, sendo muito estudadas as mutações em países do norte da Europa, França, Inglaterra e Ásia. Não há estudos na população brasileira ou mesmo sul-americana. Através de parceria com o Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG seqüenciou-se, através de técnicas padronizadas de extração do DNA de linfócitos, com utilização de *primers* específicos e amplificação por técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), três *exons* que segundo a literatura abrigariam cerca de 30 a 50% das mutações deletérias do gene *DPYD*. O **objetivo primário** desta etapa foi provar deficiência de DPD em alguns dos pacientes com toxicidade grave ao 5FU através da identificação de mutação sabidamente deletéria. Estes pacientes comprovadamente DPD-deficientes formaram um importante grupo comparativo para o posterior estudo do TR. Os **objetivos secundários** foram: (1) identificar a frequência das principais mutações responsáveis pela deficiência de DPD em nosso meio; (2) detectar novas mutações não antes descritas.
- C) Estudo do Teste Respiratório:** O **objetivo primário** desta etapa, que agrega as informações adquiridas nas etapas anteriores, foi avaliar a acurácia do TR após ingestão de 2-¹³C-Uracil em discriminar um grupo de pacientes com câncer gastrointestinal previamente expostos ao 5FU e que apresentaram toxicidade graus 3-4 (n = 13) de um grupo controle formado por pacientes de características semelhantes exceto por terem apresentado toxicidade graus 0-1 (n = 20). Os **objetivos secundários** foram: (1) avaliar a acurácia do TR em discriminar pacientes DPD-deficientes (aqueles com toxicidade graus 3-4 e pelo menos um dos testes acima indicativos de deficiência em DPD) dos não DPD-deficientes (aqueles com toxicidade graus 0-1 e ambos os testes negativos para deficiência em DPD); (2) Testar a repetibilidade do TR bem como a preservação do ¹³C na bolsa coletora após armazenamento por 14 dias. O artigo referente a este estudo foi já submetido a periódico internacional (**Artigo 2**).

ARTIGO 1 - Um método rápido de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas para determinação plasmática da relação Diidrouracil/Uracil: avaliação de toxicidade ao 5-Fluorouracil em pacientes com câncer gastrointestinal

Isabela Costa César¹, Geraldo Felício Cunha-Júnior², Ricardo Martins Duarte Byrro¹,
Luiz Gonzaga Coelho², Gerson Antônio Pianetti¹

RESUMO

Um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria de massas para quantificação simultânea de uracil (U) e diidrouracil (UH₂) em plasma foi desenvolvido e testado em uma população de pacientes brasileiros com câncer gastrointestinal previamente exposta ao 5-Fluorouracil (5FU). Os analitos foram extraídos por um método líquido-líquido usando 5-clorouracil como padrão interno (PI). A separação foi realizada através de uma coluna de fase reversa do tipo XTerra C₁₈ com uma fase móvel composta de metanol e hidróxido de amônio a 0,1% (15:85). Detecção por espectrometria de massas foi realizada usando ionização eletrospray negativa e monitoramento seletivo de reação. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como matriz alternativa para preparo dos padrões para calibração, visando evitar a mensuração de U e UH₂ fisiológicos. Curvas de calibração foram construídas ao longo dos limites de 5-200 ng/mL para U e 10-500 ng/mL para UH₂. Os valores médios de desvio padrão relativo (DPR) na precisão intra-corrida foram 6,5% e 10,0% e na precisão inter-corrida foram 7,8% e 9,0% para U e UH₂, respectivamente. Os valores médios de exatidão ficaram entre os limites de 90% a 110% para ambos os analitos. Os analitos permaneceram estáveis no plasma sob condições diferentes de temperatura e tempo. O método, validado, foi empregado para determinar as concentrações plasmáticas de U e UH₂ em pacientes com câncer gastrointestinal (n = 32) previamente tratados com 5FU e para os quais a toxicidade clínica era bem documentada. Concentrações de U variaram de 21,8 a 56,6 ng/mL, enquanto as de UH₂ foram de 57,7 a 271,5 ng/mL. A relação UH₂/U variou de 1,56 a 6,18. O método comprovou-se uma forma rápida, confiável e

¹ Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Endereço para correspondência: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. Tel: +55 31 3409-6966; fax: +55 31 34096976 - Endereço Eletrônico: isaccesar@bol.com.br.

² Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Professor Alfredo Balena, 190, CEP 30130-100, Belo Horizonte, MG, Brasil.

reprodutível de quantificar os níveis plasmáticos de U e seu metabólito UH₂. A razão UH₂/U não discriminou pacientes previamente expostos ao 5FU com e sem toxicidade grave, possivelmente devido ao pequeno número de pacientes. Estudos adicionais em população mais numerosa são desejáveis.

Unitermos: Uracil; diidrouracil; CLAE; toxicidade ao 5-fluorouracil; DPD.

ABSTRACT

A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitation of endogenous Uracil (U) and Dihydrouracil (UH₂) was developed and tested in a Brazilian population of gastrointestinal cancer patients previously exposed to 5-Fluorouracil (5FU). The analytes were extracted by a liquid-liquid method using 5-clorouracil as internal standard. The separation was performed on a reversed-phase XTerra C₁₈ column with a mobile phase composed of methanol and aqueous 0.1% ammonium hydroxide (15:85). Mass spectrometry detection was carried out using negative electrospray ionization and Selected Reaction Monitoring. Bovine serum albumin was employed as an alternative matrix to prepare the calibration standards, aiming to avoid the measurement of physiologic U and UH₂. Calibration curves were constructed over the range of 5-200 ng/mL for U and 10-500 ng/mL for UH₂. The mean R.S.D. values in the intra-run precision were 6.5% and 10.0% and in the inter-run precision were 7.8% and 9.0% for U and UH₂, respectively. The mean accuracy values were within the range of 90% to 110% for both analytes. The analytes were stable in plasma under different conditions of temperature and time. The validated method was successfully applied to determine the plasma concentrations of U and UH₂ in patients with gastrointestinal cancer (n=32) previously treated with 5FU and for whom clinical toxicity was well documented. U concentrations varied from 21.8 to 56.6 ng/mL, while UH₂ concentrations were from 57.7 to 271.5 ng/mL. UH₂/U ratio ranged from 1.56 to 6.18. The method has proved to provide a quick, reliable and reproducible quantitation of the plasma concentrations of U and its metabolite UH₂. UH₂/U ratios did not discriminate patients previously exposed to 5FU with and without severe toxicities, possibly due to the small sample. Further studies in a larger population are desirable.

Keywords: Uracil; dihydrouracil; HPLC-ESI-MS/MS; 5-fluorouracil toxicity; DPD.

INTRODUÇÃO

O agente antimetabólito 5-Fluorouracil (5FU) foi sintetizado em 1957 e continua sendo uma das drogas quimioterápicas mais importantes, particularmente no tratamento do câncer gastrointestinal e de vias aéreas superiores [1,2]. Cerca de 30% dos pacientes que recebem 5FU apresentam toxicidade grau 3-4, notadamente diarreia, neutropenia febril e estomatite, levando a hospitalizações prolongadas e onerosas, com óbitos por toxicidade aproximando-se de 1% em várias séries [3]. A toxicidade é mais frequente em mulheres e idosos, mas é de outra forma imprevisível baseado em características clínicas [4,5]. Apesar do 5FU exercer seu efeito antitumoral pela via anabólica (inibição da timidilato-sintase e incorporação ao DNA e RNA genômicos), sua toxicidade é ditada pelo ritmo do catabolismo.

A diidropirimidina-desidrogenase (DPD, E1.2.3) é a enzima responsável pela primeira das três etapas do catabolismo das pirimidinas, e também de seu derivado fluorinado 5FU [6-7]. A DPD hepática imediatamente cataboliza 80-85% da droga infundida, levando a uma meia-vida plasmática de aproximadamente 15 minutos [8].

A deficiência congênita de atividade de DPD é a principal causa de timina-uracilúria, uma patologia com expressão clínica variável, levando a convulsões e retardo mental em cerca de metade dos pacientes [9-10]. Também é implicada como causa de reações adversas sérias (e às vezes fatais) ao 5FU [11]. Esta síndrome farmacogenética é consistente com padrão de transmissão autossômica recessiva [12].

Uma abordagem baseada na detecção de mutações no gene que codifica a DPD, chamado *DPYD*, é dificultada pela sua extensão, pela presença de mais de 50 diferentes mutações e pelo possível papel de determinantes epigenéticos de sua expressão, o que explica por que menos de 50% dos casos de grave toxicidade são explicados pela análise genética convencional [13-21].

Vários métodos visando determinar clinicamente a atividade enzimática de DPD *in vivo* têm sido desenvolvidos. O mais clássico é um ensaio radioenzimático em leucócitos mononucleares isoladas de sangue periférico. Contudo, este método requer manipulação de material radioativo, é demorado e trabalhoso, e a atividade de DPD é apenas fracamente correlacionada aos níveis plasmáticos de 5FU [22-26].

O teste respiratório consiste em mensurar níveis de $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado após a ingestão de uma solução aquosa de 2- ^{13}C -Uracil [27]. Apesar de não-invasivo e capaz de avaliar toda a via catalítica, ela requer equipamento especial e validação por outros grupos.

A mensuração plasmática do uracil (U) e seu metabólito diidrouacil (UH₂) com o cálculo da razão UH₂/U têm sido considerada um marcador global do catabolismo das

pirimidinas (e conseqüentemente do 5FU) e se correlaciona bem com atividade plasmática de DPD e com os níveis plasmáticos de 5FU [28-30]. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria ultravioleta é a técnica mais descrita [31-36], ao passo que espectrometria de massas foi explorada em apenas poucos trabalhos [37-38]. Nos últimos anos, CLAE acoplada a espectrometria de massas têm substituído a detecção por ultravioleta, técnicas eletroquímicas ou de fluorescência no campo bioanalítico, devido à sua inigualável sensibilidade e extraordinária seletividade [39-40]. Adicionalmente, sua maior disponibilidade em centros de referência e a redução dos tempos de análise têm possibilitado o emprego mais frequente deste método na prática analítica.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método simples e rápido de CLAE acoplado a espectrometria de massas para determinação da relação diidrouracil/uracil no plasma humano. Os resultados foram correlacionados com a ocorrência de toxicidade em uma população de indivíduos com câncer gastrointestinal previamente exposta a doses terapêuticas de 5FU.

EXPERIMENTO

Agentes químicos e reagentes

Uracil, diidrouracil, 5-clorouracil (padrão interno, PI) (**Fig. 1**) e albumina sérica bovina (BSA) foram comprados da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Água ultra-pura foi obtida de um sistema Millipore (Bedford, MA, USA). Metanol (grau HPLC) foi comprado de Tedia (Fairfield, OH, USA) e hidróxido de amônia, ácido fosfórico, cloreto de metileno, acetato de etila e metil-t-butil éter (grau analítico) foram obtidos de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

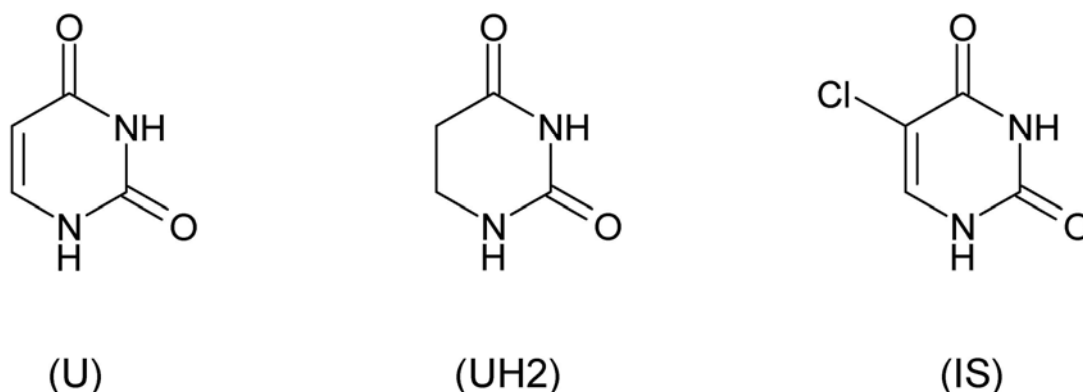


Figura 1: Estruturas químicas do uracil (U), diidrouracil (UH₂) e 5-clorouracil, o padrão interno (PI).

Instrumentação e condições analíticas

As análises por CLAE/espectrometria de massas foram realizadas em um sistema Waters (Milford, MA, USA), composto por uma bomba binária 1525 μ , injetor automático 2777, forno de colunas TCM/CHM e espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quattro LC, equipado com fonte de ionização electrospray. O *software MassLynx* v.4.1 foi utilizado para aquisição de dados e análise (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna *XTerra C₁₈* de fase reversa (250 x 4,6 mm i.d.; tamanho de partículas de 5 μ m) da *Waters* (Milford, MA, USA), mantida a temperatura de 40°C. A fase móvel foi formada por metanol e hidróxido de amônio aquoso a 0,1% pH 10 (15:85), a uma velocidade de fluxo de 0,8 mL/min. O volume injetado foi 50 μ L.

A detecção por espectrometria de massas foi realizada usando uma fonte de ionização electrospray no modo negativo. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizante e de dessolvatação e argônio foi usado como gás de colisão ($1,8 \times 10^{-3}$ to $2,0 \times 10^{-3}$ mbar). Os parâmetros de ionização foram: capilar 2,5 kV, extrator 2 V, lentes RF 0,5 V, temperatura da fonte 100°C, temperatura de dessolvatação 350°C, cone de U 20 V, cone de UH₂ 10 V e cone do PI 25 V. O fator *multiplier* foi estabelecido a 650 V. As energias de colisão foram otimizadas a 20 eV para U, 10 eV para UH₂ e 20 eV para PI. Monitoramentos seletivos de reação (MSR) foram empregados na aquisição de dados. As transições MSR foram m/z 110,6 $\rightarrow$ m/z 41,7, m/z 112,6 $\rightarrow$ m/z 41,7 and m/z 144,6 $\rightarrow$ m/z 41,7 para U, UH₂ e PI, respectivamente. O tempo de aquisição do *scan* foi 0,5 s para cada canal.

Preparo das soluções-padrão

Albumina sérica bovina em solução aquosa (80 mg/mL) foi empregada como matriz alternativa para preparar os padrões de calibração, visando evitar a mensuração do U e UH₂ fisiológicos caso se usasse plasma.

Soluções estoque de U, UH₂ e PI foram preparadas dissolvendo-se quantidades exatamente pesadas de cada uma delas em água e metanol (1:1). Soluções de trabalho de U e UH₂ foram preparadas diluindo as soluções estoque com o mesmo solvente.

A solução de trabalho de PI foi preparada diluindo-se a solução estoque com metanol a uma concentração final de 240 ng/mL. Todas as soluções estoque foram preparadas imediatamente antes do uso.

Preparo das amostras para calibração e controle de qualidade

Seis amostras para calibração foram preparadas adicionando-se quantidades apropriadas das soluções de trabalho de U e UH₂ em albumina sérica bovina (80 mg/mL). A concentração das amostras de calibração foram 5, 25, 50, 100, 150 e 200 ng/mL para U e 10, 50, 100, 200, 350 e 500 de UH₂. Amostras para controle de qualidade foram preparadas de forma similar, em concentrações baixas, intermediárias e altas: 15, 75 e 175 ng/mL de U e 30, 180 e 400 ng/mL para UH₂.

Preparo das amostras

Uma alíquota de 50 µL da solução de padrão interno (240 ng/mL de 5-clorouracil em metanol) e uma alíquota de 50 µL de ácido fosfórico em solução aquosa a 5% foram adicionadas a 500 µL de albumina sérica bovina ou plasma. As amostras foram misturadas por vortex por 10 s. Uma alíquota de 2 mL de acetato de etila, cloreto de metileno e metal-t-butil éter (4:3:3) foi adicionada e misturada por vortex por 60 s. Neste momento, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 min, a 4°C. Uma alíquota de 1,6 mL da camada orgânica foi transferida e evaporada até a secura usando um evaporador a 60°C. O resíduo foi reconstituído em 100 µL de metanol e água (15:85) e injetado no sistema cromatográfico.

Validação do método

O processo de validação foi realizado de acordo com o Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, recomendado pelo U. S. Food and Drug Administration [41].

A seletividade do método foi avaliada testando-se seis amostras de albumina sérica bovina antes da adição de U e UH₂. Adicionalmente, amostras de plasma obtidas de seis diferentes indivíduos foram testadas com objetivo de verificar possíveis interferências na transição do PI.

A linearidade foi avaliada em albumina sérica bovina através de curvas de calibração de seis pontos em duplicata por três dias consecutivos. As curvas foram construídas plotando-se a área do pico do analito dividida pela área do pico do PI *versus* a concentração de U e UH₂. As concentrações foram avaliadas dentro dos limites de 5-200 ng/mL para U e 10-500 ng/mL para UH₂. As curvas foram avaliadas em relação aos resíduos e ajustadas por regressão linear ponderada. O limite inferior de quantificação foi estabelecido como a menor concentração da curva de calibração na qual a precisão e exatidão estivessem dentro de 20%, por meio da análise de cinco replicatas. Adicionalmente, as respostas do analito nesta concentração deveriam estar pelo menos cinco vezes maiores que o ruído da linha de base.

Para avaliar a precisão e exatidão do método, amostras de controle de qualidade (CQ) em albumina sérica bovina em três concentrações distintas (15, 75 e 175 ng/mL para U e 30, 180 e 400 ng/mL para UH₂) foram analisadas em cinco replicatas em três dias distintos. A precisão intra-corrida e inter-corrida foram calculadas e expressas como desvios-padrão relativos (RSD%).

A recuperação foi determinada comparando-se as áreas dos picos obtidas das amostras extraídas em BSA com aquelas das soluções padrão injetadas diretamente, nas mesmas concentrações. A avaliação foi realizada analisando-se cinco replicatas, nas três concentrações do controle de qualidade. A recuperação do PI também foi determinada, em albumina sérica bovina e nas amostras de plasma, nas concentrações de trabalho.

O efeito matriz foi avaliado para verificar se existia supressão ou indução iônica devido a influência de outros componentes existentes na matriz que co-eluíam com os analitos. As áreas do pico em amostras nas quais os analitos foram adicionados após extração foram comparadas com aquelas das soluções padrão na fase móvel, nas mesmas concentrações. Os experimentos com U e UH₂ foram realizados usando albumina sérica bovina (n = 6) e o efeito de matriz do PI foi determinado em amostras de plasma normal obtidos de seis indivíduos diferentes. Este experimento foi realizado em concentrações de controle de qualidade baixas e altas de U e UH₂ e concentração de trabalho do PI.

Estudo de estabilidade no plasma

A estabilidade do U e UH₂ foi investigada nas amostras de plasma. Duas amostras de plasma recentemente coletadas foram adotadas como referência e a estabilidade dos analitos foi avaliada sob uma variedade de condições de armazenamento e manipulação, em cinco replicadas. A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi avaliada após três ciclos completos (-70 a 23°C) em dias consecutivos. A estabilidade de curta duração foi avaliada através da análise de amostras que foram deixadas a temperatura ambiente (23°C) por 6 h. A estabilidade de longa duração foi avaliada em amostras de plasma armazenadas a -20°C, por 51 dias. Para avaliar a estabilidade pós-preparativa, amostras de controle de qualidade foram extraídas e mantidas no injetor automático (8°C) por 20 h antes da injeção. Os analitos foram considerados estáveis quando 85-115% das concentrações iniciais eram encontradas.

O desenvolvimento do método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da razão plasmática UH₂/U encontra-se descrita em detalhes no Apêndice D.

Aplicação em um grupo de pacientes com câncer

Trinta e dois pacientes com diagnóstico prévio de câncer gastrointestinal foram selecionados baseado na exposição prévia ao 5FU e conhecimento preciso das toxicidades apresentadas de acordo com o *Common Toxicity Criteria Adverse Events (CTCAE)* versão 3.0 [42]. Pacientes foram encaminhados por vários serviços de oncologia do estado através da colaboração de oncologistas clínicos que preenchiam uma ficha clínica com as características demográficas e clínicas e do regime de quimioterapia e toxicidades apresentadas. As características clínicas são resumidas na **Tabela 1**. Doze pacientes tiveram toxicidade graus 3-4 após primeiro e/ou Segundo ciclo de quimioterapia. As mais comuns foram diarreia em 9/12 (75%), estomatite em 10/12 (83%) e neutropenia febril em 10/12 (83%). Vinte pacientes com características clínicas e tratamentos similares e que tiveram toxicidade graus 0-1 serviram como controles. No momento do recrutamento, todos os pacientes estavam recuperados das toxicidades e tinham um performance-status 0-1 de acordo com o *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)*. E funções hepática, renal e medular normais. Para aqueles em tratamento quimioterápico corrente, um intervalo de pelo menos duas semanas livre de quimioterapia era requerido. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da

Universidade Federal de Minas Gerais no Brasil e consentimento informado foi obtido de todos os participantes.

Tabela 1: Características dos 32 pacientes incluídos no estudo.

		Toxidade Grau 0-1* (n = 20)	Toxidade Grau 3-4* (n = 12)
Idade (anos)	Média	59,5	60,4
	Mediana	59,5	57,5
	Limites	37-81	46-89
		$p\text{-valor} = 0,835^a$	
Gênero (n, %)	Masculino	7 (35%)	4 (33%)
	Feminino	13 (65%)	8 (67%)
		$p\text{-valor} = 0,923^b$	
Etnia (n, %)	Caucasianos	9 (45%)	8 (67%)
	Não-caucasianos ^c	11 (55%)	4 (33%)
		$p\text{-valor} = 0,234^b$	
Tipos de câncer (n, %)	Colorretal	17 (85%)	12 (100%)
	Outros ^d	3 (15%)	0
		$p\text{-valor} = 0,159^b$	
Tipo de quimioterapia (N)	5FU em bolo, múltiplos dias ^e	13 (65%)	12 (100%)
	Outros (FOLFOX ^f /Al-Sarraf ^g)	7 (35%)	0 (0%)
		$p\text{-valor} = 0,068^b$	
Finalidade tratamento (n, %)	Neoadjuvante	4 (20%)	3 (25%)
	Adjuvante	15 (75%)	9 (75%)
	Paliativa	1 (5%)	0 (0%)
		$p\text{-valor} = 1,000^b$	
Radioterapia associada (n, %)	Yes	5 (25%)	4 (33%)
	No	15 (75%)	8 (66%)
		$p\text{-valor} = 0,612^b$	

Legenda: *De acordo com *Common Toxicity Criteria Adverse Events (CTCAE)* v 3.0 (Ref 42); ^a teste “t”; ^b teste χ^2 ; ^c todos os pacientes são afro-brasileiros ou mestiços, não haviam asiáticos ou indígenas; ^d câncer de esôfago ou canal anal; ^e 5FU em bolo endovenoso 350-425 mg/m² por 4-5 dias consecutivos a cada 4 semanas. ^f FOLFOX: Oxaliplatina 80 mg/m² dia 1 + Ácido Folínico 400 mg/m² dia 1 + 5FU 400 mg/m² bolo dia 1 + 5FU 2400 mg/m² em 46 h (infusão venosa contínua); ^g Al-Sarraf: Cisplatina 70-100 mg/m² D1 + 5FU 3000-4000 mg/m² em 96 h (infusão venosa contínua).

Após um jejum de oito horas, e entre 8-9 horas da manhã para evitar variações circadianas da DPD [22], uma amostra de 5 mL de sangue foi colhida de veia periférica em tubo heparinizado e imediatamente centrifugada em temperatura ambiente a 9000 rpm por 10 minutos. O plasma então foi congelado a -20°C até a análise, que era realizada 1-28 dias após, uma vez que demonstrou-se que o armazenamento a -20°C por até dois meses ou a -30°C por seis meses não modifica a recuperação de U e UH₂ [31,38].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições para CLAE/Espectrometria de massas

Para o desenvolvimento de um método com alta sensibilidade e seletividade, CLAE acoplada a espectrômetro de massas foi selecionada para quantificação de U e UH₂ no plasma. Trabalhos prévios com mesma técnica reportaram ionização *electrospray* em modo positivo [37] ou negativo [38]. Nós avaliamos a ionização em ambos os modos e, apesar do modo positivo gerar maiores intensidades de sinal para U e UH₂, interferências significativas dos componentes da matriz plasmática foram observadas. Por outro lado, a ionização *electrospray* no modo negativo gerou cromatogramas limpos, com alta seletividade e ausência de efeitos de matriz. [M-H]⁻ foi o íon predominante no espectro do quadrupolo Q1 para ambos analitos e padrão interno, e foi usado como precursor para obter os espectros dos íons produto. As transições de massas mais sensíveis e seletivas foram m/z 110,6 → m/z 41,7, m/z 112,6 → m/z 41,7 e m/z 144,6 → m/z 41,7 para U, UH₂ e padrão interno, respectivamente, obtidas após a otimização da energia de colisão. A **Figura 2** ilustra os espectros de fragmentação de U e UH₂.

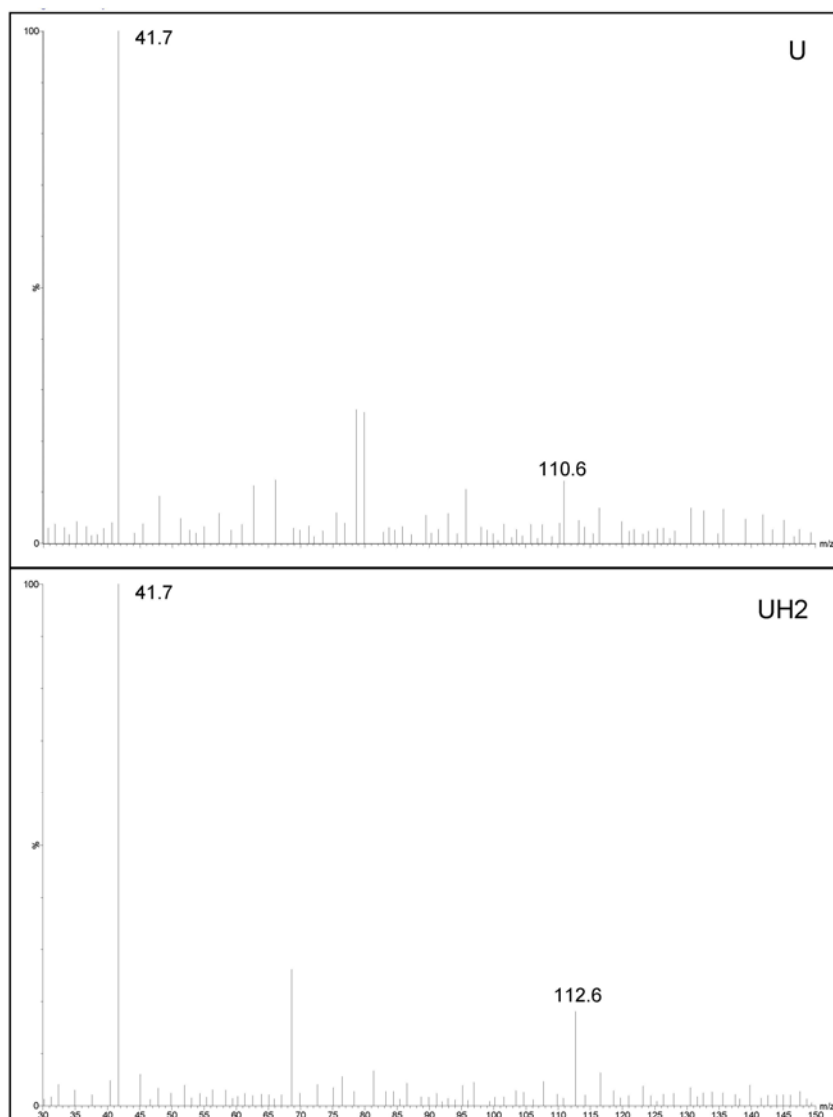


Figura 2: Espectros de fragmentação de uracil (U), diidrouacil (UH₂), obtidos por ionização *electrospray* no modo negativo.

A adição de hidróxido de amônio na fase móvel foi importante para melhorar as intensidades de sinal no modo íon negativo. Visando utilizar uma solução aquosa de hidróxido de amônio 0,1% (pH 10) na fase móvel, o uso de coluna cromatográfica com alta resistência ao pH era essencial. A coluna XTerra C₁₈ de fase reversa provou-se adequada para a análise, oferecendo excelente simetria dos picos e curto tempo de corrida. As demais condições da CLAE foram otimizadas de modo que o tempo de retenção fosse mantido em 5,0 min, o que significa uma grande vantagem em termos de tempo de corrida em relação à maioria dos testes para quantificação de U e UH₂ no plasma [31-33,35,37]. Os tempos de retenção para U, UH₂ e PI foram 2,7 min, 4,1 min and 2,5 min, respectivamente (**Fig. 3**) O

curto tempo de corrida aliado ao baixo consumo de solvente e baixo custo permitem a aplicação do método em larga escala.

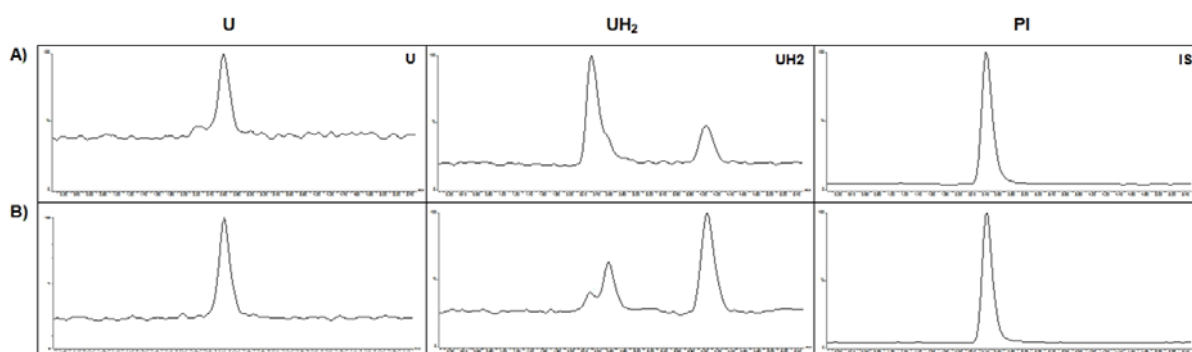


Figura 3: Cromatogramas MSR de (A) BSA adicionado com uracil (U), diidrouuracil (UH₂) e PI no limite inferior de quantificação (LIQ), (B) plasma do paciente n°20. Tempos de retenção: 2,7 min (U), 4,1 min (UH₂) and 2,5 min (PI).

Validação do método

Para avaliar a viabilidade do uso da albumina sérica bovina como matriz alternativa ao plasma, curvas de calibração foram construídas usando 5, 50, 100 e 200 ng/mL de U e 10, 100, 300 e 500 ng/mL de UH₂, em matrizes de BSA e de plasma. As amostras foram extraídas de acordo com o procedimento descrito em *Preparo de amostras*. As inclinações das curvas em albumina bovina ($4,80 \times 10^3$ para U e $1,51 \times 10^3$ para UH₂) e plasma ($4,20 \times 10^3$ para U e $1,27 \times 10^3$ para UH₂), obtidas plotando-se a área do pico do analito dividida pela área do pico do PI *versus* a concentração de U e UH₂, não demonstraram diferenças significativas entre as duas matrizes. As taxas de recuperação do U, UH₂ e PI em albumina bovina (37,3%, 35,3% e 51,7%, respectivamente) foram discretamente mais elevadas que as encontradas em plasma (33,3%, 30,8% e 48,1%, respectivamente). Contudo, usando a relação área do pico do analito/área do pico do PI, a mesma relação e inclinação foram obtidos para amostras em albumina sérica bovina e plasma. Assim sendo, albumina sérica bovina a 80 mg/mL demonstrou-se uma matriz alternativa confiável para preparo das curvas padrão e amostras de controle de qualidade para quantificação de U e UH₂. Resultados similares foram obtidos por Jiang *et al.* [30] e Deporté *et al.* [32], que também utilizaram BSA para determinação de U e UH₂ no plasma.

O estudo de seletividade confirmou não haverem picos interferentes nos tempos de retenção de U ou UH₂ em amostras de albumina sérica bovina, e nem interferências significativas dos componentes endógenos do plasma no tempo de retenção do PI.

As curvas de calibração mostraram-se lineares ao longo dos limites de 5-200 ng/mL para U e 10-500 ng/mL para UH₂. Um modelo de regressão linear ponderada (1/x) demonstrou coeficientes de regressão > 0,99 para ambos os analitos. Todas as concentrações padrão calculadas pelo modelo estavam dentro de 15% de desvio do valor nominal exceto no limite inferior de quantificação onde o desvio máximo aceitável foi estipulado em 20%. Os resíduos não apresentaram tendência de variação em função da concentração. Os limites inferiores de detecção foram 5 ng/mL e 10 ng/mL para U e UH₂, respectivamente.

A precisão e exatidão intra e inter-corrida foram calculadas analisando-se cinco replicatas de amostras de controle de qualidade em três níveis de concentração, em três dias diferentes. Os dados obtidos são demonstrados na **Tabela 2**. Os valores DPR médios para precisão intra-corrida foram 6,5% e 10,0% e a precisão inter-corrida foi 7,8% e 9,0% para U e UH₂, respectivamente. Os valores médios de exatidão foram 98,7% e 100,7% para U e UH₂, respectivamente. Estes dados indicam resultados reprodutíveis, e que o ensaio foi exato e confiável. As taxas de recuperação médias para U e UH₂ ($n = 15$), determinadas nas três concentrações, foram 37,3% e 35,3%, respectivamente. A recuperação do PI foi 51,7% ($n = 15$). A hidrofiliicidade dos analitos levou à taxas de recuperação relativamente baixas pela extração líquido-líquido; contudo, os sinais dos analitos demonstraram ser adequados para quantificar U e UH₂ com boa sensibilidade.

Tabela 2: Precisão e acurácia para Uracil e Diidrouuracil por CLAE/Espectrometria de massas.

Analito	Concentração nominal (ng/mL)	Intra-corrida			Inter-corrida		
		Concentração mensurada (média ± D.P.)	D.P.R. (%)	Acurácia (%)	Concentração mensurada (média ± D.P.)	D.P.R. (%)	Acurácia (%)
Uracil	15	14,3 ± 1,5	10,4	95,3	14,7 ± 1,6	10,9	98,0
	75	76,3 ± 4,5	5,9	101,7	74,2 ± 5,8	7,8	98,9
	175	178,9 ± 5,5	3,1	102,2	173,6 ± 8,0	4,6	99,2
Diidrouuracil	30	32,0 ± 2,7	8,4	106,6	31,9 ± 2,7	8,5	106,3
	180	183,2 ± 21,5	11,7	101,8	181,5 ± 17,2	9,5	100,8
	400	400,9 ± 39,6	9,9	100,2	380,4 ± 34,2	9,0	95,1

Legenda: D.P.R. = Desvio-padrão relativo; D.P. = Desvio-padrão

O efeito matriz foi avaliado comparando-se as áreas médias dos picos de U e UH₂ a partir de amostras de BSA nas quais os analitos foram adicionados após extração com aquelas das soluções padrão na fase móvel. De modo semelhante, o efeito de matriz para o PI foi também avaliado em amostras de plasma. A variação observada não excedeu os limites de 85-115%, indicando que os efeitos matriz para os analitos em BSA e PI em plasma não foram significantes.

Estudo de estabilidade no plasma

Nos estudos de estabilidade realizados em plasma, não houve diferença significativa entre as respostas dos analitos no tempo zero e após 6 h à temperatura ambiente (23°C), indicando adequada estabilidade de curta duração para U e UH₂. Adicionalmente, os analitos ficaram estáveis por 20 h no injetor automático, a 8°C. Amostras de controle de qualidade armazenadas a -20°C foram analisados após 51 dias e não haviam desvios significativos em relação às amostras imediatamente analisadas. Ambos U e UH₂ mantiveram-se estáveis em plasma após três ciclos de congelamento/descongelamento em dias consecutivos, ou seja, com variações médias dentro de $\pm 15\%$ da concentração inicial. Os resultados de estabilidade são demonstrados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Estabilidade para Uracil e Dihidrouracil no plasma.

Conditions	% of Uracil initial concentration	% of Dihydrouracil initial concentration
6 h at 23°C	91,3	99,5
20 h in autosampler (8°C)	90,7	103,5
51 days at -70°C	97,9	103,2
after 3 freeze/thaw cycles	104,6	90,8

Resultados na população de pacientes com câncer

O método validado foi empregado na determinação de concentrações plasmáticas de U e UH₂ em pacientes com câncer gastrointestinal (n = 32) previamente tratados com 5FU e para os quais a toxicidade clínica apresentada era bem documentada. Análises estatísticas foram realizadas com o software *Minitab statistical software* (Minitab Inc, USA) versão 16.

Os resultados da razão UH₂/U demonstraram distribuição normal (p -valor > 0,10, Teste de Ray-Joiner), variando de 1,56 a 6,18 (média = 3,932; desvio-padrão = 1,103). U e UH₂ não obedeceram a uma distribuição gaussiana (dados não demonstrados). A razão UH₂/U média foi 4,15 para pacientes com toxicidade ≤ 1 e 3,58 para pacientes com toxicidade grau 3-4. Esta diferença não atingiu significância estatística ($p = 0,148$) (**Tab. 4**). A ampla distribuição das razões UH₂/U entre os pacientes impossibilitou a determinação de pontos de corte.

Tabela 4: UH₂, U e UH₂/U de acordo com a toxicidade.

Variáveis		Toxidade grau 0-1* (n = 20)	Toxidade grau 3-4* (n = 12)
UH ₂ (ng/mL)	Média	141,8	112,7
	Mediana	128,8	108,2
	Limites	81,2 - 271,4	57,7 - 176,9
		<i>p</i> -valor = 0,083 ^b	
U (ng/mL)	Média	35,4	32,7
	Mediana	36,6	33,8
	Limites	21,5 - 65,9	20,4 - 58,2
		<i>p</i> -valor = 0,521 ^b	
UH ₂ /U	Média	4,15	3,58
	Mediana	4,11	3,54
	Limites	2,55 - 6,18	1,56 - 5,11
		<i>p</i> -valor = 0,148 ^a	

Legenda: (*) De acordo com Common Toxicity Criteria Adverse Events (CTCAE) v 3.0 (Ref 43); ^a Teste “t”;

^b Teste Mann-Whitney.

Para testar o método para repetibilidade, uma nova amostra de sangue foi colhida de sete pacientes três meses após a primeira coleta. Resultados foram comparados conforme descrito por Bland e Altman [43]; o coeficiente de repetibilidade para UH₂/U foi baixo (0,91) e as diferenças entre as médias foi de 0,08, o que é considerado aceitável para propósitos clínicos. A máxima diferença entre duas amostras pareadas para UH₂/U foi de 0,67. Aplicação de teste t pareado para diferenças entre os resultados do mesmo paciente mostraram intervalos de confiança a 95% de (-0,369, 0,523), com *p*-valor = 0,687, corroborando a hipótese de que as diferenças não são significativas.

DISCUSSÃO

Pacientes com sabida deficiência de DPD tem níveis plasmáticos de U marcadamente elevados [11-12]. Entretanto, a concentração de U é influenciada por outros fatores, incluindo dieta, o que poderia impedir a identificação de variações sutis porém significativas clinicamente da atividade de DPD [44]. De fato, a atividade de DPD e a depuração do 5FU foram apenas pobremente correlacionadas com as concentrações plasmáticas de U [22]. Determinar U e seu metabólito direto, UH₂, poderiam levar a uma estimativa indireta embora mais acurada do catabolismo das pirimidinas. No caso de deficiência em DPD, baixos níveis de UH₂ e altos níveis de U se traduziriam em uma baixa razão UH₂/U [28-30].

Na maioria dos estudos em populações não selecionadas ou portadoras de câncer, a razão UH₂/U tem distribuição Gaussiana [28,33,38]. Esta distribuição pode ser demonstrada em nosso estudo em pacientes com câncer gastrointestinal.

Estudos em diferentes países têm demonstrado grande variabilidade para os valores limites e médias de UH_2/U . Isso pode refletir diferenças relacionadas a questões étnicas e dietéticas bem como nas metodologias usadas na quantificação [28,40]. Entretanto, nossos resultados são similares aos descritos por Gamelin, Jiang e Zhou [29,30,34].

Têm-se defendido que um ponto de corte de 70% da atividade média de DPD em uma população de referência poderia identificar 90% dos pacientes susceptíveis à toxicidade [45-46]. Contudo, para a razão UH_2/U , este limiar varia entre 1,8 e 4,0 em diferentes estudos, com sensibilidade de 70-87% [29,36]. Nós não fomos capazes de encontrar um ponto de corte com boa sensibilidade e especificidade. Um estudo envolvendo uma população maior de pacientes saudáveis poderia ser realizado para se determinar os valores de referência para esta população.

Está claro que outras causas além da deficiência em DPD podem predispor à toxicidade pelo 5FU; estas incluem disfunção hepática [47], desnutrição [48-49] e mutações em outras enzimas do catabolismo das pirimidinas além da DPD [50-52]. De fato, em várias series a deficiência em DPD (avaliada por diferentes métodos) pôde ser demonstrada em apenas 30-60% dos pacientes com grave toxicidade ao 5FU [18,21,53]. Este fato, associado ao limitado número de pacientes, pode explicar por quê a razão UH_2/U não discriminou indivíduos de acordo com o grau de toxicidade sofrida neste estudo. Além disso, uma limitação do estudo é a ausência de amostras de pacientes que tiveram toxicidade grau 5 (óbito), ou toxicidade neurológica, que provavelmente seriam os mais profundamente DPD-deficientes.

CONCLUSÃO

Um método rápido e simples baseado em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas para determinação simultânea de U e seu metabólito UH_2 foi desenvolvido e validado. Considerando o baixo tempo de corrida, o método poderia ser aplicado em larga escala, com uma técnica simples de processamento da amostra e alta sensibilidade e seletividade, garantidos pelo detector de massas. A razão UH_2/U determinada em 32 pacientes oncológicos não se correlacionou com toxicidade prévia ao FU. Maior número de pacientes seria necessário para melhor avaliar esta correlação, assim como o estudo de UH_2/U em brasileiros saudáveis, de modo a se determinar os valores de corte para a nossa população que poderiam ser aplicados prospectivamente na identificação de pessoas identificadas como de risco para toxicidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do estudo. Também agradecemos à Prof. Maria de Lourdes Moreira Fernandes pelas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

1. Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs*. 2000 Nov;18(4):299-313.
2. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):330-8.
3. 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 Nov;16(11):3537-41.
4. Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, *et al*. Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 15;20(6):1491-8.
5. Chansky K, Benedetti J, Macdonald JS. Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer*. 2005 Mar 15;103(6):1165-71.
6. Canellakis ES. Pyrimidine metabolism. I. Enzymatic pathways of uracil and thymine degradation. *J Biol Chem*. 1956 Jul;221(1):315-22.
7. Lu ZH, Zhang R, Diasio RB. Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver. *J Biol Chem*. 1992 Aug 25;267(24):17102-9.
8. Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, *et al*. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res*. 1987 Apr 15;47(8):2203-6.
9. Berger R, Stoker-de Vries SA, Wadman SK, *et al*. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency leading to thymine-uraciluria: an inborn error of pyrimidine metabolism. *Clin Chim Acta*. 1984 Aug 31;141(2-3):227-34.
10. van Gennip AH, Abeling NG, Vreken P, *et al*. Inborn errors of pyrimidine degradation: clinical, biochemical and molecular aspects. *J Inherit Metab Dis*. 1997 Jun;20(2):203-13.
11. Tuchman M, Stoeckeler JS, Kiang DT, *et al*. Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *N Engl J Med*. 1985 Jul 25;313(4):245-9.
12. Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest*. 1988 Jan;81(1):47-51.

13. Yokota H, Fernandez-Salguero P, Furuya H, *et al.* cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, an enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J Biol Chem.* 1994 Sep 16;269(37):23192-6.
14. Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, *et al.* Structural organization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Cancer Res.* 1997 May 1;57(9):1660-3.
15. Wei X, Elizondo G, Sapone A, *et al.* Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics.* 1998 Aug 1;51(3):391-400.
16. van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer.* 2004 May;40(7):939-50.
17. Collie-Duguid ES, Johnston SJ, Powrie RH, *et al.* Cloning and initial characterization of the human DPYD gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Apr 29;271(1):28-35.
18. Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, *et al.* Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics.* 2000 Apr;10(3):217-23.
19. Noguchi T, Tanimoto K, Shimokuni T, *et al.* Aberrant methylation of DPYD promoter, DPYD expression, and cellular sensitivity to 5-fluorouracil in cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2004 Oct 15;10(20):7100-7.
20. van Kuilenburg AB, Meijer J, Mul AN, *et al.* Intragenic deletions and a deep intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene as novel mechanisms causing 5-fluorouracil toxicity. *Hum Genet.* 2010 Nov;128(5):529-38.
21. Ciccolini J, Gross E, Dahan L, *et al.* Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin Colorectal Cancer.* 2010 Oct;9(4):224-8.
22. Harris BE, Song R, Soong SJ, *et al.* Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res.* 1990 Jan 1;50(1):197-201.
23. Fleming RA, Milano G, Thyss A, *et al.* Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res.* 1992 May 15;52(10):2899-902.
24. Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res.* 1993 Nov 15;53(22):5433-8.
25. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, *et al.* Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol.* 1994 Nov;12(11):2248-53.
26. Van Kuilenburg AB, van Lenthe H, Blom MJ, *et al.* Profound variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human blood cells: major implications for the detection of partly deficient patients. *Br J Cancer.* 1999 Feb;79(3-4):620-6.

27. Mattison LK, Ezzeldin H, Carpenter M, *et al.* Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency by using a novel 2-¹³C-uracil breath test. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 15;10(8):2652-8.
28. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Larra F, *et al.* A simple chromatographic method for the analysis of pyrimidines and their dehydrogenated metabolites. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 1997;20:3155-3172.
29. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, *et al.* Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol.* 1999 Apr;17(4):1105.
30. Jiang H, Lu J, Ji J. Circadian rhythm of dihydrouracil/uracil ratios in biological fluids: a potential biomarker for dihydropyrimidine dehydrogenase levels. *Br J Pharmacol.* 2004 Feb;141(4):616-23.
31. Garg MB, Sevestre JC, Sakoff JA, *et al.* Simple liquid chromatographic method for the determination of uracil and dihydrouracil plasma levels: a potential pretreatment predictor of 5-fluorouracil toxicity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002 Jul 15;774(2):223-30.
32. Déporte R, Amiard M, Moreau A, *et al.* High-performance liquid chromatographic assay with UV detection for measurement of dihydrouracil/uracil ratio in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 Apr 13;834(1-2):170-7.
33. Ciccolini J, Mercier C, Evrard A, *et al.* A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. *Ther Drug Monit.* 2006 Oct;28(5):678-85.
34. Zhou ZW, Wang GQ, Wan S, *et al.* The dihydrouracil/uracil ratios in plasma and toxicities of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. *Chemotherapy.* 2007;53:127-131.
35. Ben Fredj R, Gross E, Ben Ahmed S, *et al.* The dihydrouracil/uracil ratio in plasma, clinical and genetic analysis for screening of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Pathol Biol (Paris).* 2009 Sep;57(6):470-6.
36. Kristensen MH, Pedersen P, Mejer J. The value of dihydrouracil/uracil plasma ratios in predicting 5-fluorouracil-related toxicity in colorectal cancer patients. *J Int Med Res.* 2010 Jul-Aug;38(4):1313-23.
37. Svobaite R, Solassol I, Pinguet F, *et al.* HPLC with UV or mass spectrometric detection for quantifying endogenous uracil and dihydrouracil in human plasma. *Clin Chem.* 2008 Sep;54(9):1463-72.
38. Jiang H, Jiang J, Hu P, *et al.* Measurement of endogenous uracil and dihydrouracil in plasma and urine of normal subjects by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002 Mar 25;769(1):169-76.

39. Hopfgartner G, Bourgoigne E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2003 May-Jun;22(3):195-214.
40. Zhou S, Song Q, Tang Y, *et al*. Critical review of development, validation and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. *Current pharmaceutical analysis*. 2005 January;1(1):3-14.
41. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research; 2001.
42. Cancer Therapy Evaluation Program. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*, Version 3.0, DCTD, NCI, NIH, DHHS. [National Cancer Institute web site]. August 9, 2006. Available at: http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf. Accessed June 15th, 2011.
43. Altman DG, Bland JM. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician*, 1983;32:307-317.
44. Heaf DJ, Davies JI. The effect of RNA supplementation of rat diets on the composition of body fluids. *Br J Nutr*. 1976 Nov;36(3):381-402.
45. Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, *et al*. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer*. 1999 Feb;79(3-4):627-30.
46. Van Kuilenburg AB, Van Lenthe H, Van Gennip AH. Radiochemical assay for determination of dihydropyrimidinase activity using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999 Jun 11;729(1-2):307-14.
47. Floyd RA, Hornbeck CL, Byfield JE, *et al*. Clearance of continuously infused 5-fluorouracil in adults having lung or gastrointestinal carcinoma with or without hepatic metastases. *Drug Intell Clin Pharm*. 1982 Sep;16(9):665-7.
48. Davis LE, Lenkinski RE, Shinkwin MA, *et al*. The effect of dietary protein depletion on hepatic 5-fluorouracil metabolism. *Cancer*. 1993 Dec 15;72(12):3715-22.
49. Christensen ML. The effect of dietary protein depletion on hepatic 5-fluorouracil metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1995 Jan-Feb;19(1):88-9.
50. Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, *et al*. Genetic regulation of beta-ureidopropionase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Jan;18(1):25-35.
51. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, *et al*. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J*. 2001;1(1):65-70.
52. Ichikawa W, Takahashi T, Suto K, *et al*. Orotate phosphoribosyltransferase gene polymorphism predicts toxicity in patients treated with bolus 5-fluorouracil regimen. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 1;12(13):3928-34.

53. McLeod HL, Sludden J, Hardy SC, *et al.* Autoregulation of 5-fluorouracil metabolism. *Eur J Cancer*. 1998 Sep;34(10):1623-7.

ARTIGO 2 - Teste respiratório com ^{13}C -Uracil na predição de toxicidade pelo quimioterápico 5-Fluorouracil em pacientes com câncer gastrointestinal

Geraldo Felício Cunha-Júnior^{1*}, Luiz Armando de Marco², Luciana Bastos-Rodrigues², Marina Borges Bolina², Flávia Linhares¹, Gerson Antônio Pianetti³, Isabela Costa César³, Luiz Gonzaga Coelho^{1*}

RESUMO

Histórico: Cerca de 30% dos pacientes submetidos a quimioterapia baseada em 5-Fluorouracil (5FU) apresentam grave toxicidade. Deficiência da atividade de diidropirimidina-desidrogenase (DPD) explica 36-61% dos casos. Não há métodos disponíveis na prática clínica para prever toxicidade. O teste respiratório com 2- ^{13}C -Uracil (UraBT) consiste em mensurar o $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado após ingestão do substrato para avaliar a via catabólica do 5FU.

Objetivos: Testar o desempenho do UraBT em discriminar indivíduos que tiveram toxicidade graus 3-4 daqueles que tiveram toxicidade graus 0-1; testar o desempenho do UraBT em discriminar indivíduos com deficiência de DPD comprovada por outros métodos (dentre os que tiveram toxicidade graus 3-4) daqueles sem deficiência de DPD (dentre os com toxicidade graus 0-1).

Métodos: Foram estudados 33 pacientes com câncer gastrointestinal previamente expostos ao 5FU dos quais 13 tiveram toxicidade graus 3-4 e 20, toxicidade graus 0-1. Todos foram submetidos a testes para avaliar atividade de DPD: (1) sequenciamento de porções do gene *DPYD* em busca de mutações deletérias; (2) relação plasmática de diidrouacil/uracil (UH_2/U), como biomarcador da atividade de DPD; (3) UraBT.

Resultados: 4/13 pacientes com toxicidade graus 3-4 provaram-se DPD-deficientes: três por mutações deletérias (IVS14+1G>A em um; SNP 2846^a > T em dois), e um por relação baixa UH_2/U . O *Delta Over Baseline* mediano em 50 minutos (DOB_{50}) foi significativamente diferente entre os grupos com toxicidade graus 3-4 e graus 0-1, e entre os

¹ Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Professor Alfredo Balena, 110, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brasil.

* Correspondência: G. F. Cunha-Júnior; email: geraldo.onco@gmail.com ou L.G. Coelho; email: lcoelho@gold.com.br. Tel: +55 31 3409 9403; fax: +55 31 3409-3406.

² Laboratório de Genética Molecular, Faculdade de Medicina da Federal de Minas Gerais. Av. Professor Alfredo Balena, 110, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brasil.

³ Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil.

pacientes DPD-deficientes ($n = 4$) e não DPD-deficientes ($n = 20$). $DOB_{50} \leq 161.4$ discriminou indivíduos com toxicidade graus 3-4 daqueles com toxicidade graus 0-1 ($S = 61,5\%$; $E = 85\%$), e pacientes deficientes em DPD daqueles sem deficiência em DPD ($S = 75\%$; $E = 85\%$).

Conclusões: UraBT teve acurácia moderada em discriminar indivíduos que manifestaram grave toxicidade daqueles que tiveram nenhuma ou leve toxicidade ao 5FU, bem como DPD-deficientes de não DPD-deficientes.

Palavras-chave: 5-Fluorouracil, deficiência em DPD, toxicidade, teste respiratório, diidrouacil/uracil.

ABSTRACT

Background: Up to 30% of patients undergoing 5-Fluorouracil (5FU)-based chemotherapy experience severe toxicity. Dihydropyrimidine-dehydrogenase (DPD) deficiency explains 36-61% of cases. Predicting toxicity is an unmet challenge. ^{13}C -Uracil Breath test (UraBT) consists of measuring $^{13}\text{CO}_2$ in exhaled breath after ingestion of 2- ^{13}C -Uracil to evaluate pyrimidine catabolism.

Methods: We studied 33 gastrointestinal cancer patients previously exposed to 5FU: thirteen had grade 3-4 and 20, grade 0-1 toxicity. Tests used to evaluate pyrimidine catabolism: (1) sequencing of three exons of *DPYD*; (2) plasma Dihydrouracil/Uracil ratio (UH_2/U); (3) UraBT. We tested the performance of UraBT to discriminate patients who had grade 0-1 toxicity *versus* grade 3-4 toxicity and patients with and without proven DPD-deficiency.

Results: 4/13 grade 3-4 toxicity patients proved to be DPD-deficient: three had deleterious mutations (IVS14+1G>A in one; SNP 2846A>T in two), and one had low UH_2/U ratio. Mean delta over baseline in 50 minutes (DOB_{50}) significantly differed between groups. $DOB_{50} \leq 161.4$ discriminated individuals with grade 3-4 from those with grade 0-1 toxicity (Sensitivity = 61.5%; Specificity = 85%) and DPD-deficient from non DPD-deficient (Sensitivity = 75%; Specificity = 85%).

Conclusions: UraBT has moderate accuracy in discriminating individuals who manifested severe toxicity from those who had mild or no toxicity to 5FU.

Keywords: Breath test, ^{13}C -Uracil, UH_2/U , DPD deficiency, 5-Fluorouracil toxicity.

INTRODUÇÃO

O 5-Fluorouracil (5FU) é a base do tratamento da maioria dos cânceres gastrointestinais. Até 31% dos pacientes que recebem múltiplas doses diárias em bolo e 5-10% dos tratados com infusões contínuas apresentam toxicidade grave, sobretudo neutropenia, estomatite, diarreia e, menos comumente, neurotoxicidade (Meta-Analysis Group In Cancer, 1998). As consequências são hospitalizações onerosas e prolongadas e até mesmo o óbito. Apesar de idade, sexo feminino e etnia afro-americana serem fatores de risco para o desenvolvimento dos efeitos adversos sérios pelo 5FU (Stein *et al.*, 1995; Mattison *et al.*, 2006a), não existem outros preditores clínicos confiáveis de toxicidade.

A enzima diidropirimidina-desidrogenase (DPD) é a primeira etapa do catabolismo das pirimidinas e também do 5FU (Diasio e Harris, 1989), sendo também a etapa velocidade-limitante. Mais de 80% do 5FU infundido é rapidamente catabolizado pela DPD (Woodcock *et al.*, 1980), com meia-vida plasmática de 13 minutos (Heggie *et al.*, 1987). Inibidores competitivos desta enzima aumentam os níveis sanguíneos e toxicidade do 5FU (Diasio, 1998). A relação entre deficiência de DPD e toxicidade grave a doses terapêuticas de 5FU é bem caracterizada (Tuchman *et al.*, 1985). Estudos de transmissão familiar da deficiência de DPD sugerem um padrão autossômico recessivo (Diasio *et al.*, 1988; Harris *et al.*, 1991; Meinsma *et al.*, 1995). A frequência de indivíduos parcialmente deficientes (heterozigotos) é 3% e os homozigotos perfazem cerca de 0,1% da população geral (Lu *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1995; Etienne *et al.*, 1994).

Levando-se em consideração o elevado número de pacientes tratados com 5FU no mundo e a toxicidade clinicamente imprevisível, a triagem dos pacientes para deficiência de DPD previamente ao uso do 5FU seria desejável (van Kuilenburg *et al.*, 2004).

A genotipagem do gene que codifica DPD, *DPYD*, parece atraente pois sua estrutura é bem caracterizada (Wei *et al.*, 1998), e pelo menos 40 mutações deletérias já foram descritas (Ciccolini *et al.*, 2010). Contudo, o seqüenciamento das porções decodificadoras de *DPYD* encontra mutações deletérias em apenas 10-40% dos casos de grave toxicidade ao 5FU (Collie-Duguid *et al.*, 2000; Amstutz *et al.*, 2011), sendo que a interação de fatores epigenéticos, mutações intrônicas profundas ou mutações de outras enzimas do catabolismo pirimidínico seqüenciais à DPD provavelmente justifiquem os casos restantes.

O método mais clássico de mensurar atividade de DPD é um ensaio radioenzimático em leucócitos mononucleares de sangue periférico (Fleming *et al.*, 1992), que detecta deficiência em 36-61% dos indivíduos que sofreram grave toxicidade ao 5FU (Lu *et al.*, 1993; Milano *et al.*, 1999; van Kuilenburg *et al.*, 2002a). Contudo, a análise é demorada, trabalhosa

e requer uso de material radioativo, o que a torna pouco prática. A determinação plasmática dos níveis de uracil (U) e seu metabólito diidrouracil (UH₂) por cromatografia líquida de alta eficiência avalia indiretamente a atividade de DPD. Uma razão baixa de UH₂/U indica baixa atividade, e relaciona-se a altos níveis plasmáticos de 5FU (Gamelin *et al.*, 1999) e toxicidade grave (Kristensen *et al.*, 2010). Suas principais limitações são a necessidade de instalações laboratoriais onerosas e complexas e o fato de que (como o radioensaio) ela testa apenas a atividade de DPD.

Mais recentemente Mattison *et al.* (2004) e Mattison *et al.* (2006a, 2006b) desenvolveram um teste respiratório não-invasivo, de fácil realização, que explora a diferença no catabolismo do 2-¹³C-uracil entre indivíduos normais e catalítico-deficientes. Seu princípio se baseia na mensuração do ¹³CO₂ no ar expirado após ingestão de uma quantidade predefinida de ¹³C-Uracil (UraBT). Como o CO₂ é um dos produtos finais do catabolismo das pirimidinas (**Fig. 1**), sua presença no ar expirado reflete a velocidade de catabolismo do uracil (e consequentemente do 5FU) pela via catalítica das pirimidinas, e não apenas a DPD. Este teste discriminou indivíduos com comprovada deficiência de DPD de controles saudáveis, com sensibilidade de 100% e especificidade de 96%. Contudo, na prática clínica, predizer toxicidade é mais relevante que discriminar DPD-deficientes de não DPD-deficientes.

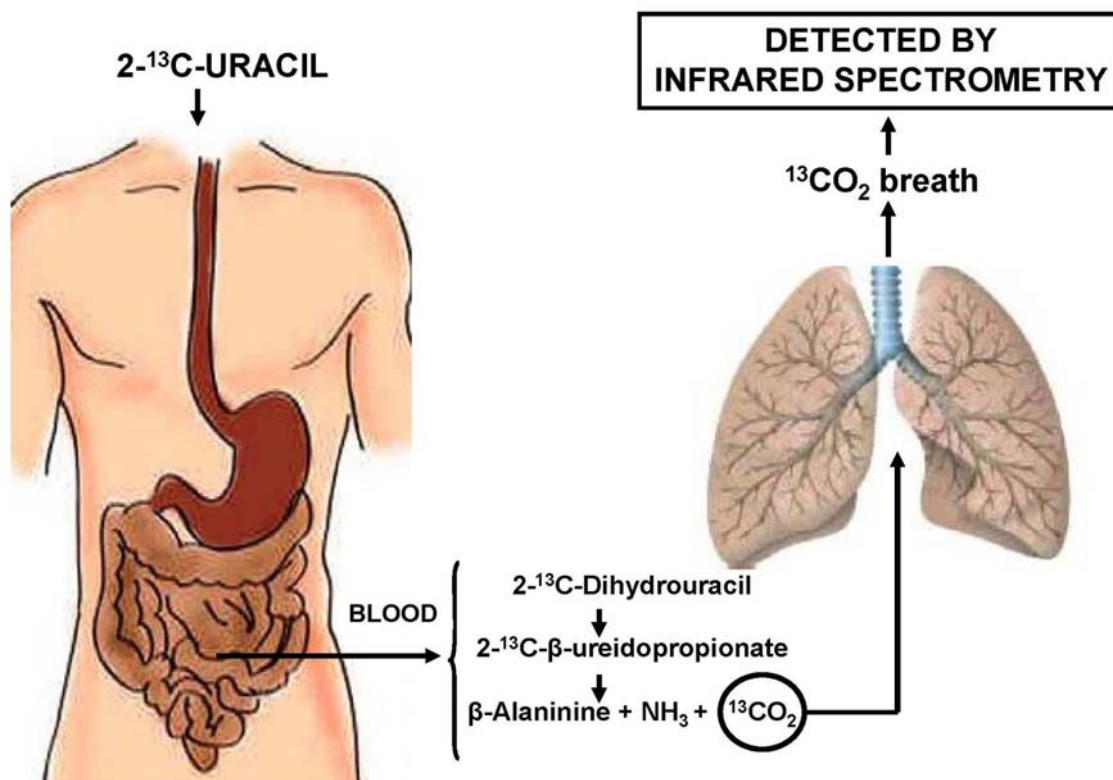


Figura 1: Princípio do teste respiratório com 2-¹³C-uracil.

O objetivo primário deste estudo foi testar a acurácia do UraBT em discriminar pacientes com câncer gastrointestinal que haviam sofrido toxicidade graus 3-4 após exposição ao 5FU de controles que haviam sofrido toxicidade graus 0-1. Os objetivos secundários foram: (1) testar todos os pacientes para deficiência de DPD através de sequenciamento do *DPYD* e razão UH_2/U para comprovar deficiência de DPD em uma subpopulação dos pacientes com toxicidade graus 3-4 e então avaliar a acurácia do UraBT em discriminar indivíduos com e sem deficiência de DPD; (2) testar a repetibilidade do UraBT; (3) testar a integridade da bolsa coletora em preservar o ¹³C após estocagem em temperatura ambiente por 14 dias.

PACIENTES E MÉTODOS

Seleção e recrutamento de pacientes

Em colaboração com vários centros regionais de tratamento oncológico do estado de Minas Gerais, Brasil, foram selecionados pacientes com câncer gastrointestinal previamente tratados com 5FU e para os quais a toxicidade fora bem documentada em prontuário médico

de acordo com o *CTCAE* versão 3.0. Antes do encaminhamento para a pesquisa, os médicos oncologistas preenchiam uma ficha clínica contendo informações demográficas, histopatológicas, estágio, regimes quimioterápicos e toxicidades apresentadas. Estas eram enviadas aos investigadores e avaliadas preliminarmente quanto aos critérios de inclusão e exclusão. Critérios de inclusão foram: ter apresentado, após uso de 5FU, toxicidade graus 3-4 (totalmente recuperada) ou graus 0-1; índice de desempenho de 0-1 de acordo com escala do *Eastern Cooperative Oncology Group*; capacidade de ingerir líquidos por via oral; testes hematológicos e bioquímicos normais; ter realizado a última quimioterapia com 5FU há pelo menos duas semanas. Critérios de exclusão foram: gastrectomia prévia; DPOC moderado a grave; insuficiência hepática; infecção ativa. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Consentimento informado foi obtido de todos os pacientes antes da entrada no estudo.

Após jejum de pelo menos oito horas, e entre as 8 e 9 horas da manhã para evitar variações circadianas da atividade de DPD (Harris *et al.*, 1990), duas alíquotas de 5 mL de sangue eram colhidas em uma veia periférica em tubos heparinizados e imediatamente centrifugadas em temperatura ambiente a 9.000 rotações por minuto por 10 minutos. O plasma era então congelado a -20°C até a análise para UH₂ e U, realizada 1 a 28 dias após (Gamelin *et al.*, 1999). Outros 5mL de sangue eram coletados em tubo com EDTA com objetivo de posterior extração do DNA. Após coleta de sangue, o paciente era pesado e medido e o teste respiratório era iniciado.

Determinação das razões UH₂/U

Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC-ESI-MS/MS) foi utilizada para quantificação de U e UH₂ no plasma. A análise foi realizada em um sistema Waters (Milford, MA, USA), composto por uma bomba binária 1525μ, injetor automático 2777, forno de colunas TCM/CHM e espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quattro LC, equipado com fonte de ionização electrospray. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna *XTerra C₁₈* de fase reversa (250 x 4.6 mm i.d.; tamanho de partículas de 5 μm) da Waters (Milford, MA, USA), mantida a temperatura de 40°C. A fase móvel foi formada por metanol e hidróxido de amônio aquoso a 0.1% pH 10 (15:85), a uma velocidade de fluxo de 0.8 mL/min. O volume injetado foi 50 μL. Os analitos foram extraídos por método liquid-líquido, usando 5-clorouracil como padrão interno (PI). A detecção por espectrometria de massas foi realizada usando uma fonte de ionização electrospray no modo negativo. Monitoramentos seletivos de reação (MSR) foram empregados na aquisição de dados. As

transições de massa empregadas foram m/z 110.6 $\rightarrow$ m/z 41.7, m/z 112.6 $\rightarrow$ m/z 41.7 e m/z 144.6 $\rightarrow$ m/z 41.7 para U, UH₂ e PI, respectivamente. Padrões de calibração foram preparados usando solução aquosa de albumina sérica bovina (80 mg/mL). Os limites de detecção e calibração foram 5-200 ng/mL e 10-500 ng/mL para U e UH₂, respectivamente. Valores de corte para diagnóstico de deficiência de DPD foram estabelecidos como a média menos dois desvios-padrão (assumindo que distribuição normal fosse constatada).

Teste genético do *DPYD*

DNA foi isolado pelo método descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). O DNA dos exons 13, 14 e 22 do *DPYD* de todos os pacientes foi amplificado pela técnica de PCR. Os oligonucleotídeos utilizados foram: Exon 13 (5'-GGACAATTTAGATGTAATATGAAACC A-3', 5'-AATGTGTAATGATAGGTCTTGTCAAA-3'), Exon 14 (5'-GTGAGAAGGACC TCATAAAATATTGTC-3', 5'-GAATTGGATGTTTAAATAAACATTCACCAAC-3'), Exon 22 (5'-TGAGCTTGCTAAGTAATTCAGTGG- 3', 5'-CAGAAAATGCTTTCTG CCGTA- 3').

O protocolo de PCR foi realizado em um volume final de 25 µl dos seguintes: 1 X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 40 mM NaCl, Triton X-100 0,1%, 1.5 mM MgCl₂), 500 µM dNTPs, 1.0 U de Taq DNA-polimerase, 20 ng de DNA genômico, 0.4 µM de cada oligonucleotídeo senso e anti-senso. Sequenciamento direto foi realizado duas vezes com diferentes produtos de PCR em um seqüenciador automático de DNA (*ABI 3130 Applied Biosystems, Foster City, CA*). As sequências foram analisadas pelo *software* Sequencher 4.9.

Teste respiratório com ¹³C-Uracil

Entre 8:30-9:00 horas, os voluntários iniciaram o teste respiratório coletando uma amostra basal de ar inspirado em uma bolsa de alumínio de 1,3 litros. Então uma dose de 6 mg/kg de 2- ¹³C-Uracil a 99.9% (*Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, EUA*) diluída em 150 ml de chá morno sem açúcar era imediatamente ingerida ao longo de 30 segundos. Após a ingestão da solução, amostras de ar eram colhidas a cada cinco minutos pelos primeiros 30 minutos e depois a cada 10 minutos pelos próximos 150 minutos (total = 22 amostras). Estas eram analisadas através do aparelho de espectrometria infravermelha IRIS-2 (*IRIS ¹³C Stable Isotope Breath Analysers - Wagner Analysen Technik GmbH, Bremen - Germany*).

Os resultados foram expressos de acordo com os seguintes índices (Amarri e Weaver, 1995; Ezzeldin *et al.*, 2009):

- **DOB** (*delta* over baseline): uma alteração na proporção $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ nas amostras de ar em relação à proporção basal antes da ingestão do traçador; o DOB expressa a recuperação do ^{13}C nas amostras respiratórias em pontos específicos do tempo após sua ingestão. **Fórmula:** $\text{DOB} = \delta (\text{amostra}) - \delta (\text{valor basal})$;
- **C_{max}**: máxima concentração encontrada;
- **T_{max}**: tempo no qual a máxima concentração (C_{max}) foi alcançada;
- **PDR** (Percentual cumulativo da dose de ^{13}C recuperado no ar expirado): uma análise de quanto do ^{13}C -Uracil ingerido é recuperado no ar expirado ao longo do tempo, calculado para cada intervalo de tempo; um PDR cumulativo pode ser obtido ao longo de toda a duração do teste.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças nas características clínicas (idade, gênero, etnia e regimes quimioterápicos) entre os dois grupos foram analisadas pelo teste “*t*” ou qui-quadrado de acordo com o tipo de variável (contínua ou dicotômica). O teste de *Mann-Whitney* foi realizado para comparar o índice de massa corpórea (IMC) já que sua distribuição não era normal.

O padrão de distribuição dos índices do teste respiratório foram testados para normalidade pelo teste de Ray-Joiner. Médias e desvios-padrão foram calculados para todos os subgrupos. Diferenças entre os resultados médios para cada índice foram calculadas pelo teste “*t*”.

Os índices do UraBT (DOB₅₀, C_{max}, T_{max}, PDR) foram comparados quanto à sua acurácia em discriminar os grupos de indivíduos e então combinados entre si e a características clínicas usando funções lineares discriminantes visando encontrar combinações com máxima acurácia. Sensibilidade e especificidade para diferentes pontos de corte foram calculadas.

Com objetivo de testar a integridade da bolsa coletora, foram comparadas análises de amostras de ar expirado de sete voluntários realizadas imediatamente após a coleta e após armazenamento por 14 dias em temperatura ambiente e a reprodutibilidade foi testada segundo Altman e Bland (1983).

Repetibilidade foi testada comparando-se o DOB_{50} de cinco pacientes que realizaram três testes consecutivos com intervalos de três a seis meses, utilizando-se o teste de *Friedman*. A hipótese nula (que não há diferenças nos valores entre os testes de um mesmo paciente) seria rejeitada se $p < 0.05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do pacote estatístico MINITAB (Minitab Inc., USA) versão 16.

RESULTADOS

Pacientes

Foram incluídos 33 pacientes previamente diagnosticados com câncer gastrointestinal e expostos a doses terapêuticas de 5FU com toxicidade clínica bem documentada. Deles, 13 tiveram toxicidade graus 3-4 após ciclos 1 ou 2 que não puderam ser explicadas por irradiação concomitante ou uso de outras drogas quimioterápicas. As toxicidades mais comuns foram neutropenia febril em 11/13 (85%); estomatite em 11/13 (85%) e diarreia em 10/13 (77%). Foi selecionado um grupo controle de 20 pacientes similares nas características basais exceto a toxicidade graus 0-1 e maior índice de massa corpórea (IMC) (**Tab. 1**).

Tabela 1: Características dos 33 pacientes incluídos no estudo.

		Toxicidade Grau 0-1* (n = 20)	Toxicidade Grau 3-4* (n = 13)
Idade (anos)	Média	59,5	60,4
	Mediana	59,5	57,5
	Limites	37-81	46-89
		p -valor = 0,835 ^a	
Gênero (n, %)	Masculino	7 (35%)	4 (31%)
	Feminino	13 (65%)	6 (69%)
		p -valor = 0,923 ^b	
Índice de Massa Corpórea	Mediana	25,6	21,7
		p -valor = 0,028 ^c	
Etnia (n, %)	Caucasianos	9 (45%)	9 (69%)
	Não-caucasianos ^d	11 (55%)	4 (31%)
		p -valor = 0,234 ^b	
Tipos de câncer (n, %)	Colorretal	17 (85%)	13 (100%)
	Outros ^e	3 (15%)	0 (0%)
		p -valor = 0,159 ^b	
Tipo de quimioterapia (N)	5FU em bolo, múltiplos dias ^f	13 (65%)	12 (92%)
	Outros (Bolo semanal/ FOLFOX ^g /Al-Sarraf ^h)	7 (35%)	1 (8%)
		p -valor = 0,068 ^b	
Finalidade tratamento (n, %)	Neoadjuvante	4 (20%)	3 (23%)
	Adjuvante	15 (75%)	10 (77%)
	Paliativa	1 (5%)	0 (0%)
		p -valor = 1,000 ^b	
Radioterapia associada (n, %)	Sim	5 (25%)	4 (31%)
	Não	15 (75%)	9 (69%)
		p -valor = 0,612 ^b	

Legenda: * De acordo com *Common Toxicity Criteria Adverse Events (CTCAE)* v 3.0; ^a teste “t”; ^b teste χ^2 ; ^c Teste *Mann-Whitney*; ^d Todos os pacientes são afro-brasileiros ou mestiços, não haviam asiáticos ou indígenas; ^e câncer de esôfago ou canal anal; ^f 5FU 350-425 mg/m² em bolo endovenoso por 4-5 dias consecutivos a cada 4 semanas; ^g FOLFOX: Oxaliplatina 80 mg/m² dia 1 + Ácido Folínico 400 mg/m² dia 1 + 5FU 400 mg/m² bolo dia 1 + 5FU 2400 mg/m² em 46h (infusão venosa contínua); ^h *Al-Sarraf*: Cisplatina 70-100 mg/m² D1 + 5FU 3000-4000 mg/m² em 96h (infusão venosa contínua).

Determinação da razão UH_2/U

As razões UH_2/U variaram segundo distribuição normal. ($p > 0.10$, Teste de *Ray-Joiner*), variando de 1,56 a 6,18 (média = 3.932; desvio-padrão = 1,103). A razão UH_2/U média foi 4.15 para pacientes com toxicidade graus 0-1 e 3.58 para os com toxicidade 3-4. Não houve diferença estatística ($p = 0,148$, teste *t*). A média menos dois desvios-padrão foi 1,726, coincidente com o ponto de corte de 1,8 encontrado por Gamelin *et al.* (1999). Baseado nisso, 1/13 pacientes com toxicidade graus 3-4 foram diagnosticados como DPD-deficientes. Nenhum dos pacientes com toxicidade graus 0-1 tiveram valores abaixo deste nível.

Teste genético

O seqüenciamento dos exons 13, 14 e 22 levaram à descoberta de cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (c.1627A>G, c.1678C>G, c.1896T>C, c.2846A>T, IVS14+1G>A) em 15/33 pacientes. O SNP 2846A>T, localizado no exon 22, foi encontrado em heterozigose em dois pacientes (ambos com toxicidade graus 3-4). Esta mutação causa deficiência de DPD (van Kuilenburg *et al.*, 2002b; Gross *et al.*, 2008). O SNP (IVS14+1G>A), que também causa deficiência de DPD (Meinsma *et al.*, 1995), foi encontrado em forma de heterozigose em um paciente com toxicidade grau 4. Deste modo, foram encontradas mutações deletérias em 3/13 pacientes com grave toxicidade, e estes foram classificados como DPD-deficientes. Entre os indivíduos do grupo de toxicidade graus 0-1, nenhuma mutação deletéria foi encontrada nestes econs.

Teste respiratório com ¹³C-Uracil

Os índices do UraBT (DOB₅₀, C_{max}, T_{max} e PDR) apresentaram distribuição normal. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada grupo (**Tab. 2**). Todos os pacientes com toxicidade graus 0-1 também foram considerados não DPD-deficientes, pois apresentaram a razão UH₂/U e teste genético normais. A **Figura 2** mostra os DOBs médios para cada tempo para os três subgrupos.

Tabela 2: Comparações dos índices do UraBT para pacientes com toxicidade graus 0-1, graus 3-4 e DPD-deficientes.

Pacientes		DOB ₅₀	C _{max}	T _{max}	PDR
Toxicidade graus 0-1 (n = 20)	Média(DP ^a)	193.5 (31.0)	206.5 (27.4)	50.5 (15.4)	61.5 (7.1)
Toxicidade graus 3-4 (n = 13)	Média (DP)	162.9 (28.8)	179.0 (29.7)	54.6 (19.4)	61.1 (5.3)
	^b p-valor	0.008	0.008	0.503	0.871
	^c IC (95%)	(8.6, 52.5)	(7.9, 49.1)	(-16.5, 8.3)	(-4.3, 5.1)
DPD-deficientes (n = 4)	Média (DP)	150.8 (33.1)	166.0 (20.1)	65.0 (17.3)	63.0 (3.7)
	^b p-valor	0.021	0.011	0.105	0.68
	^c IC (95%)	(7.1, 78.3)	(10.4, 70.7)	(-30.3, 3.3)	(-9.2, 6.1)

Legenda: ^a Desvio-padrão; ^b Teste “t” para diferença em relação ao grupo de toxicidade graus 0-1; ^c intervalos de confiança a 95%.

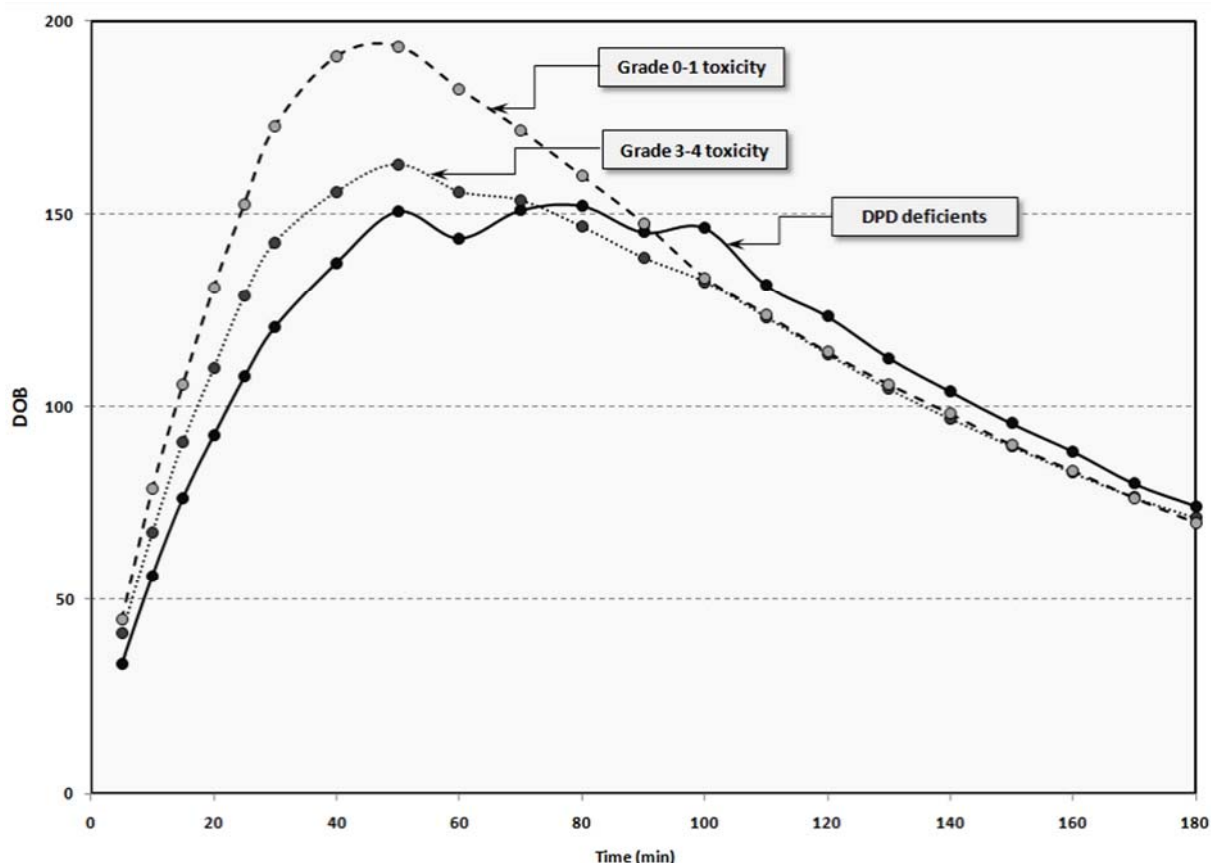


Figura 2: *Delta over baseline (DOB) médio para cada momento de tempo (0-180 min) de pacientes com toxicidade graus 0-1 (n = 20); pacientes com toxicidade graus 3-4 (n = 13); e o subgrupo de pacientes com toxicidade graus 3-4 e deficiência em DPD comprovada (n = 4).*

Discriminação entre os pacientes com toxicidade graus 3-4 (n = 13) e aqueles com toxicidade graus 0-1 (n = 20)

Os valores médios para DOB_{50} e C_{max} foram estatisticamente diferentes entre os pacientes com toxicidade grau ≤ 1 e aqueles com toxicidade graus 3-4 ($p = 0.008$ para ambos, teste t). As diferenças das medias para T_{max} e PDR não alcançaram significância estatística. Os intervalos de confiança para a diferença nos DOB_{50} 95% foram (8.6, 52.5) e para a diferença do C_{max} (7.9, 49.1).

Foi testada a acurácia de diferentes pontos de corte para DOB_{50} e C_{max} . Para $DOB_{50} \leq 161.4$ como diagnóstico de toxicidade grave, 8/13 pacientes com toxicidade graus 3-4 e 17/20 pacientes com toxicidade graus 0-1 seriam corretamente classificados (sensibilidade= 61.5%; especificidade= 85%). Para $C_{max} \leq 178.8$ como diagnóstico de

toxicidade, 9/13 pacientes com toxicidade graus 3-4 e 17/20 pacientes com toxicidade graus 0-1 seriam corretamente classificados (sensibilidade = 69%; especificidade = 85%).

Foram realizadas análises da função linear discriminante de Fisher para testar interações entre DOB_{50} , C_{max} , T_{max} e PDR, e cruzando cada índice com características clínicas como idade, gênero e índice de massa corpórea (IMC). Curiosamente, a combinação de IMC e DOB_{50} foi capaz de discriminar pacientes com toxicidade graus 3-4 daquelas com toxicidade graus 0-1 com sensibilidade de 83,3% e especificidade de 80% [Função discriminante: $(DOB_{50}) = -7.28(BMI) + 364.84$].

Discriminação entre pacientes com deficiência de DPD comprovada (n = 4) e pacientes sem deficiência de DPD (n = 20)

Diferenças significativas nos valores médios de C_{max} e DOB_{50} foram encontradas entre os grupos ($p = 0,021$ e $0,011$, respectivamente). Intervalos de confiança de 95% para a diferença de DOB_{50} foram $[7,1 - 78,3]$ e para a diferença C_{max} foram $[10,4 - 70,7]$. T_{max} e PDR não mostraram diferenças significativas entre os grupos.

A acurácia foi testada para DOB_{50} e C_{max} . Um ponto de corte de $DOB_{50} \leq 161,4$ discriminou 03/04 DPD-deficientes e 17/20 não DPD-deficientes (sensibilidade = 75%, especificidade = 85%). $C_{max} \leq 168,6$ discriminou 03/04 DPD-deficientes e 19/20 não DPD-deficientes (sensibilidade = 75%, especificidade = 95%).

Avaliação da capacidade das bolsas coletoras em reter ^{13}C ao longo do tempo

A integridade das bolsas coletoras em reter ^{13}C foi avaliada comparando-se DOBs de sete pacientes (154 amostras) antes e após armazenamento em temperatura ambiente por 14 dias. Calculando-se as diferenças dos valores mensurados menos suas médias, foi encontrado que com 95% de confiança, os resultados dos dois testes variavam entre $[-20,72, 11,62]$ (**Fig. 3**), demonstrando boa preservação do conteúdo de ^{13}C .

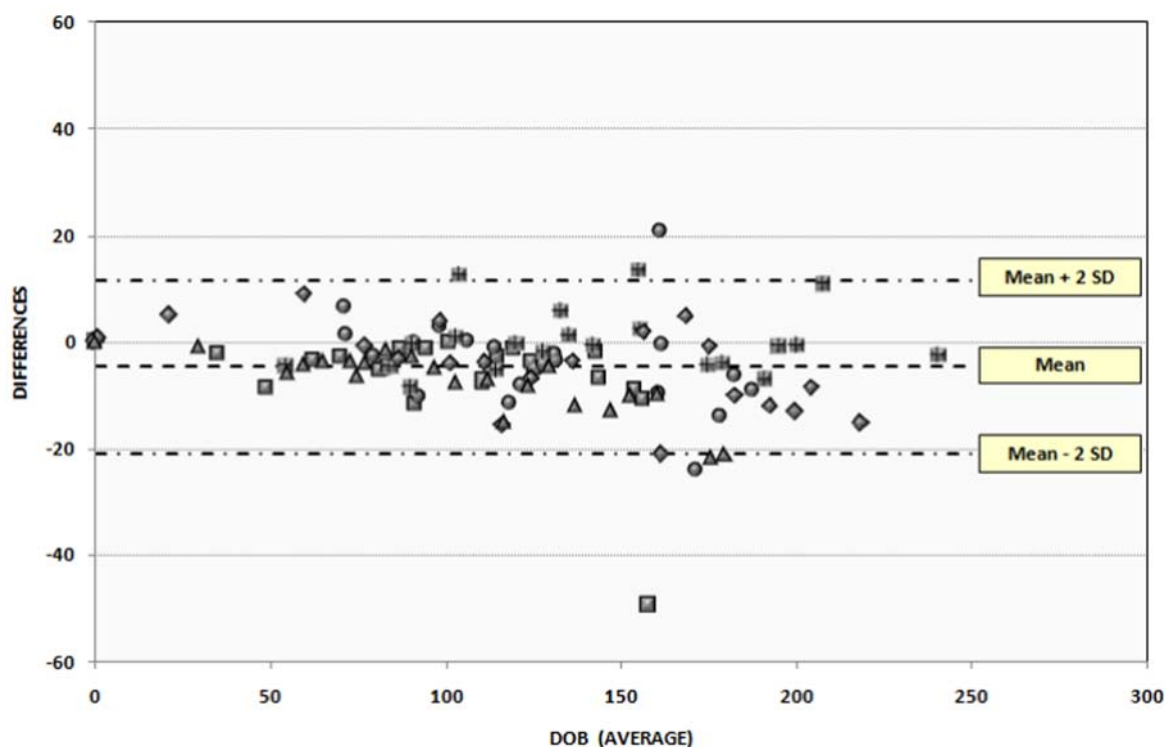


Figura 3 : Diferença dos valores em relação às suas médias para *Delta Over Baseline* (DOB) em sete pacientes antes e após 14 dias de armazenamento.

Repetibilidade

Repetibilidade foi avaliada comparando-se os resultados do UraBT de cinco pacientes que realizaram o teste três vezes cada um, num período de 3 a 6 meses. O teste não-paramétrico de Friedman foi aplicado. Não houveram diferenças significativas do ponto de vista estatístico para DOB_{50} , C_{max} , T_{max} ou PDR entre os três testes de cada paciente, o que sugere boa repetibilidade para o grupo.

DISCUSSÃO

O câncer colorretal é a terceira malignidade mais comum em homens e segunda em mulheres, correspondendo a 1,2 milhões de novos casos a cada ano (IARC, 2008). O 5FU e seus derivados orais são a base de seu tratamento quimioterápico. Como toxicidade grave ocorre em 10-31% dos pacientes dependendo do regime de tratamento, o desenvolvimento de testes preditivos de toxicidade é justificável. Em caso de suspeita de deficiência da via catabólica das fluoropirimidinas, a estratégia de tratamento poderia ser modificada em termos de dose ou regime (como doses iniciais menores, uso das menos tóxicas fluoropirimidinas

orais, infusões semanais ao invés de múltiplos dias em seguida, ou infusões protraídas ao invés das em bolo), ou mesmo poderia-se evitar o 5FU sempre que possível.

O sequenciamento do *DPYD* é demorado, oneroso e depende de laboratório e pessoal qualificados. Sua capacidade de detectar mutações deletérias em pacientes com grave toxicidade ao 5FU é de cerca de 50%. Levando em consideração que o presente estudo sequenciou apenas três dos 23 exons, a detecção de três pacientes mutantes em 13 com grave toxicidade (20%) está de acordo com a literatura.

A razão UH_2/U apresenta grande variabilidade de valores, limites e médias de acordo com o estudo consultado, o que poderia refletir diferenças técnicas nos métodos empregados ou diferenças étnicas entre as populações testadas. Os valores de corte para detecção de toxicidade também variam, refletindo estas mesmas diferenças e também o tipo de regime de 5FU que levou à toxicidade (bolo x infusão contínua). Nosso trabalho não encontrou diferença significativa do ponto de vista estatístico nas médias de UH_2/U entre os grupos com toxicidade graus 3-4 e graus 0-1. Tampouco foi encontrado um ponto de corte que fosse preditivo de toxicidade. Contudo, os valores encontrados para U, UH_2 e UH_2/U foram similares aos encontrados por Gamelin *et al.* (1999) no trabalho original. O número limitado de pacientes no estudo pode ter impedido a detecção de pequenas porém significativas diferenças. Nosso ponto de corte para detecção de deficiência (calculado como media menos dois desvios-padrão) foi similar ao valor de 1.8 encontrado por Gamelin *et al.* (1999). Como o principal objetivo do teste em nosso trabalho era a confirmação de deficiência em DPD, o valor adotado foi conservador em favor de sua alta especificidade.

Nosso estudo detectou quatro pacientes inquestionavelmente deficientes em DPD. Todos eram mulheres, o que pode corroborar para evidências que apontam para maior frequência de deficiência em DPD neste gênero (Milano *et al.*, 1999).

Recentemente, as dificuldades em se prever a toxicidade grave ao 5FU foram mais uma vez confirmadas por um estudo prospectivo alemão envolvendo 683 pacientes (Schwab, 2008). Através de análise genética completa do *DPYD*, timidilato-sintetase, metileno-tetraidrofolato redutase e da metilação do gene promotor do *DPYD*, e combinando-se estes achados com outras características clínicas como gênero, uso de ácido folínico e modo de administração contínuo ou em bolo, foi proposto um complexo cujo maior valor preditivo positivo possível foi 90% para homens mas apenas 46% para mulheres.

O teste respiratório tem a vantagem teórica de avaliar toda a via catabólica do 5FU, que é composta por DPD e mais duas enzimas sequenciais (diidropirimidinase e beta-ureido propionase). (Thomas *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008) e também, indiretamente, outros

parâmetros que podem interferir com a cinética do 5FU no plasma, como a via anabólica. ^{13}C -Uracil é um isótopo estável e não-radioativo, isento de efeitos colaterais, apresentando-se como um pó branco inodoro e insípido, pouco miscível em água mas de fácil armazenamento e manipulação. Ele permite uma avaliação rápida e não-invasiva da via catabólica do 5FU. As amostras de ar podem ser armazenadas à temperatura ambiente e enviadas a centros de referência equipados com espectrômetros de raios infravermelhos, existentes em centros de gastroenterologia, permitindo seu emprego em serviços oncológicos da comunidade.

No primeiro estudo sobre UraBT publicado, Mattison *et al.* (2004) descreveu o DOB_{50} como índice que melhor discriminava os pacientes DPD deficientes dos normais. Aplicando DOB aos 50 minutos, o valor de corte de 128,9 mostrou-se 100% sensível e 96% específico. Em estudos subsequentes, os mesmos autores (Mattison *et al.*, 2006b) mostraram forte correlação entre atividade de DPD e depuração plasmática de 2- ^{13}C -uracil, formação de 2- ^{13}C -diidrouracil, e concentrações de $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado, provendo dados inquestionáveis de que o UraBT realmente reflete o catabolismo de uracil. Contudo, apesar dos excelentes resultados iniciais, haviam alguns pontos a serem esclarecidos antes de adotar este teste na prática clínica: Em primeiro lugar, estes estudos compararam DPD-deficientes (diagnosticados por estudo genético ou radioensaio) e não DPD-deficientes. Como a deficiência de DPD pode ser comprovada em apenas 50% dos pacientes com toxicidade grave ao 5FU, os estudos não respondem qual seria a acurácia deste teste em prever toxicidade ao 5FU. Em outras palavras, nós não sabíamos como o teste se comportaria em discriminar os cerca de 50% dos pacientes que apresentariam grave toxicidade ao 5FU sem confirmação de DPD-deficiência. Em segundo lugar, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) são os parâmetros mais importantes na prática clínica que sensibilidade e especificidade. Assumindo para o UraBT uma sensibilidade de 100%, especificidade de 96% e probabilidade pré-teste (prevalência) de deficiência em DPD de 3%, e usando-se o Teorema de Bayes para estimar VPP e VPN, estes seriam respectivamente 0,43 e 1,0. Em outras palavras, UraBT “positivo” ($\text{DOB}_{50} \leq 128,9$) prediziria corretamente deficiência em DPD em apenas 43% dos casos. No presente estudo, considerando-se positivo um $\text{DOB}_{50} \leq 161,4$, a sensibilidade do UraBT é 61,5% e a especificidade, 85%. Assumindo uma chance pré-teste de toxicidade grau 3-4 de 31% para 5FU em bolo (Meta-Analysis Group In Cancer, 1998), e aplicando-se o Teorema de Bayes, o VPP é de 0,65 e o VPN, 0,83. Em outras palavras, um teste pré-tratamento mostrando $\text{DOB}_{50} \leq 161,4$ implica em um risco de 65% que este paciente sofra toxicidade grave ao 5FU.

Apesar dos nossos resultados indicarem diferenças significativas do ponto de vista estatístico para os índices DOB_{50} e C_{max} entre pacientes com toxicidade graus 3-4 x grau 0-1, e entre DPD-deficientes e não DPD-deficientes, nós encontramos intervalos de confiança a 95% muito amplos entre os pacientes com toxicidade graus 3-4 e graus 0-1: DOB_{50} (8,6; 52,5) e C_{max} (7,9; 49,1), o que pode refletir variabilidade de dados devido a amostra pequena. Ambos os índices tiveram um desempenho semelhante mas DOB_{50} é mais prático pois representa uma única mensuração em momento definido, enquanto C_{max} foi atingido em algum ponto entre 30 e 90 minutos, requerendo análise de várias amostras de ar expirado e tornando o exame mais demorado. Nossos valores médios e de corte para DOB_{50} and C_{max} foram mais altos que os previamente descritos (Mattison *et al.*, 2004) o que poderia refletir diferenças no poder de detecção do ^{13}C entre os aparelhos de espectrometria de raios infravermelhos, e/ou diferenças populacionais. Isso levanta a questão sobre a necessidade de se estabelecer valores de referência locais antes de se implementar o UraBT. Em contraste com os achados de Mattison *et al.* (2004), as diferenças para T_{max} e PDR não alcançaram significado estatístico.

Foi constatado que a combinação de IMC e DOB_{50} teve maior acurácia que o DOB_{50} isolado, com sensibilidade de 83% e especificidade de 80% em discriminar os grupos por toxicidade. Dados pré-clínicos demonstraram que a desnutrição protéico-calórica levou a redução da depuração do 5FU, redução da atividade hepática de DPD e excessiva toxicidade e óbitos em ratos submetidos ao 5FU (Davis *et al.*, 1993). Kaneko *et al.* (1991) demonstrou redução da atividade da DPD e beta-ureidopropionase em fígados de ratos alimentados com dieta sem proteína. Apesar de não se ter estudado o efeito da desnutrição sobre a toxicidade ao 5FU na metanálise de toxicidade (Meta-Analysis Group In Cancer, 1998), observou-se que pacientes com baixo *performance-status* tiveram mais toxicidade hematológica. Podemos especular que uma significativa parte destes também apresentavam-se desnutridos. Contudo, o IMC foi significativamente inferior no grupo que sofreu toxicidade grave, possivelmente porque a toxicidade levou a perda de peso. Não se pode confirmar baseado nesta análise de toxicidade retrospectiva que o IMC tenha impacto em prever toxicidade ao 5FU. Somente um estudo de desenho prospectivo poderia confirmar este achado.

Limitações do nosso estudo incluem o número limitado de pacientes e a ausência de pacientes com toxicidade grau 5 (óbito) ou neurotoxicidade, que seriam os mais DPD-deficientes (Milano *et al.*, 1999). Contudo, deve ser ressaltado que pacientes profundamente deficientes são raros, perfazendo não mais que 0,1% da população. Nossa casuística de pacientes com toxicidade graus 3-4 reflete a encontrada na prática do dia-a-dia. Não obstante,

a toxicidade teve profundo impacto para estes pacientes: todos necessitaram visitas a pronto-atendimentos, sendo que hospitalização ocorreu em 12/13, interrupção do tratamento com 5FU ocorreu em 6/13 e profundas alterações na dose ou regime de infusão nos demais. Seria importante identificar a priori estes não raros pacientes com deficiência parcial que se apresentam com toxicidades usuais mas clinicamente relevantes.

Concluindo, este estudo demonstra que o UraBT apresentou sensibilidade de 61,5% e especificidade de 85% em discriminar pacientes com toxicidade graus 3-4 daqueles com toxicidade graus 0-1. A acurácia é similar ou discretamente melhor que a de outros métodos mais complexos e onerosos, com a vantagem de ser um teste simples, rápido e menos oneroso. Estudos prospectivos devem ser realizados para confirmar o papel do UraBT na prática clínica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do estudo. Também agradecemos à Prof. Maria de Lourdes Moreira Fernandes pelas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

Altman DG, Bland JM (1983) Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician* **32**: 307-317.

Amarri S, Weaver LT (1995) ¹³C-breath tests to measure fat and carbohydrate digestion in clinical practice. *Clin Nutr* **14**: 149-54

Amstutz U, Froehlich TK & Largiadèr CR (2011) Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics* **12**: 1321-1336

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

Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, McLeod HL (2000) Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* **10**: 217 - 223.

Davis LE, Lenkinski RE, Shinkwin MA, Kressel, HY, Dal JM (1993) The Effect of Dietary Protein Depletion on Hepatic 5-Fluorouracil Metabolism. *Cancer* **72**: 3715-22.

Diasio RB (1998) The role of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) modulation in 5-FU pharmacology. *Oncology* **12**: 23 - 27.

Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT (1988) Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest* **81**: 47 - 51.

Diasio RB, Harris BE (1989) Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* **16**: 215 - 237.

Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renée N, Schneider M, Demard F, Milano G (1994) Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* **12**: 2248 - 2253.

Ezzeldin HH, Acosta EP, Mattison LK, Fourie J, Modak A, Diasio RB (2009) (13)C-5-FU breath test current status and future directions: a comprehensive review. *J Breath Res* **3**: 047002.

Fleming RA, Milano G, Thyss A, Etienne MC, Renée N, Schneider M, Demard F (1992) Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res* **52**: 2899 - 2902.

Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, Larra F, Ifrah N, Robert J (1999) Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol* **17**: 1105.

Gross E, Busse B, Riemenschneider M, Neubauer S, Seck K, Klein HG, Kiechle M, Lordick F, Meindl A (2008) Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. *PLoS One* **3**: e4003

Harris BE, Carpenter JT, Diasio RB (1991) Severe 5-fluorouracil toxicity secondary to dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. A potentially more common pharmacogenetic syndrome. *Cancer* **68**: 499 - 501.

Harris BE, Song R, Soong SJ, Diasio RB (1990) Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res* **50**: 197 - 201.

Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB (1987) Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* **47**: 2203 - 2206.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2011) Colorectal Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008: Summary. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp>. Last assessed in August 15th, 2011.

Kaneko M, Fujimoto S, Kikugawa M, Kontani Y, Tamaki N (1991) Effect of dietary protein on pyrimidine-metabolizing enzymes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **37**: 517-28.

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

Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* **19**: 5444.

Lu Z, Zhang R, Diasio RB (1993) Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res*. **53**: 5433 - 5438.

Lu Z, Zhang R, Diasio RB (1995) Population characteristics of hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity, a key metabolic enzyme in 5-fluorouracil chemotherapy. *Clin Pharmacol Ther* **58**: 512 - 522.

Mattison LK, Ezzeldin H, Carpenter M, Modak A, Johnson MR, Diasio RB (2004) Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency by using a novel 2-¹³C-uracil breath test. *Clin Cancer Res* **10**: 2652 - 2658.

Mattison LK, Fourie J, Desmond RA, Modak A, Saif MW, Diasio RB (2006a) Increased prevalence of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in African-Americans compared with Caucasians. *Clin Cancer Res* **12**: 5491 - 5495.

Mattison LK, Fourie J, Hirao Y, Koga T, Desmond RA, King JR, Shimizu T, Diasio RB. (2006b) The uracil breath test in the assessment of dihydropyrimidine dehydrogenase activity: pharmacokinetic relationship between expired ¹³CO₂ and plasma [2-¹³C]dihydrouracil. *Clin Cancer Res* **12**: 549 - 555.

Meinsma R, Fernandez-Salguero P, Van Kuilenburg AB, Van Gennip AH, Gonzalez FJ (1995) Human polymorphism in drug metabolism: mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene results in exon skipping and thymine uracilurea. *DNA Cell Biol* **14**: 1 - 6.

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

Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renée N (1999) Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer* **79**: 627 - 630.

Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, Kerb R, Blievernicht J, Fischer J, Hofmann U, Bokemeyer C, Eichelbaum M (2008). 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**: 2131 - 2138.

Stein BN, Petrelli NJ, Douglass HO, Driscoll DL, Arcangeli G, Meropol NJ (1995) Age and Sex Are Independent Predictors of 5-Fluorouracil Toxicity: Analysis of a Large Scale Phase III Trial. *Cancer* **75**: 11 - 17.

Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, Mattison LK, Fridley BL, Diasio RB (2008) Genetic regulation of beta-ureidopropionase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenet Genomics* **18**: 25 - 35.

Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, Mattison LK, Fridley BL, Diasio RB (2007) Genetic regulation of dihydropyrimidinase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenet Genomics* **17**: 973 - 987.

- Tuchman M, Stoeckeler JS, Kiang DT, O'Dea RF, Ramnaraine ML, Mirkin BL (1985) Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *N Engl J Med* **313**: 245 - 249.
- van Kuilenburg AB (2004) Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* **40**: 939 - 950.
- van Kuilenburg AB, Dobritzsch D, Meinsma R, Haasjes J, Waterham HR, Nowaczyk MJ, Maropoulos GD, Hein G, Kalhoff H, Kirk JM, Baaske H, Aukett A, Duley JA, Ward KP, Lindqvist Y, van Gennip AH (2002b) Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochem J* **364**: 157 - 163.
- van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, Van Gennip AH (2002a) Increased risk of grade IV neutropenia after administration of 5-fluorouracil due to a dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: high prevalence of the IVS14+1g>a mutation. *Int J Cancer* **101**: 253 - 258.
- Wagner Analysen Technik GmbH. <http://www.wagner-bremen.de>. Last assessed in August 15th, 2011.
- Wei X, Elizondo G, Sapone A, McLeod HL, Raunio H, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ (1998) Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics* **51**: 391 - 400.
- Woodcock TM, Martin DS, Damin LA, Kemeny NE, Young CW (1980) Combination clinical trials with thymidine and fluorouracil: a phase I and clinical pharmacologic evaluation. *Cancer* **45**: 1135 - 1143.

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de métodos preditores de toxicidade a drogas de índice terapêutico tão estreito como os agentes quimioterápicos é um importante capítulo da chamada “medicina personalizada”, que visa adequar o tratamento de modo a maximizar eficácia e minimizar toxicidade. A frequência do uso do 5-Fluorouracil na prática oncológica e o conhecimento de vários mecanismos determinantes de seu efeito terapêutico e toxicidade permitiram o desenvolvimento de diversos testes visando prever sua toxicidade. Entretanto, a acurácia subótima associada à complexidade e alto custo da maioria dos testes não permite ainda a sua aplicabilidade na prática clínica.

A determinação plasmática da relação Diidrouracil/Uracil foi factível em nosso meio e as concentrações obtidas foram semelhantes às de outros estudos publicados. Porém, embora as médias de UH_2/U tenham sido menores no grupo de grave toxicidade quando comparado ao de toxicidade leve ou ausente, esta diferença não mostrou-se significativa do ponto de vista estatístico em nossa casuística. Como outros estudos maiores demonstraram tal diferença, infere-se que o número limitado de pacientes estudados pode ter induzido ao erro tipo 2. Entretanto, usando-se as informações deste estudo-piloto, não se propõe a continuidade desta linha de estudo, uma vez que seria necessário um número de pacientes muito grande para se aferir possíveis pequenas diferenças ao nível de significância de $p \leq 0.05$.

O estudo genético (sequenciamento de três dos 23 exons) revelou mutações comuns em populações europeias e uma nova mutação, nunca antes descrita e provavelmente não deletéria, foi encontrada. Sua frequência determinada em uma amostra de 100 indivíduos foi de 2%, classificando-a como polimorfismo. Três entre os 13 pacientes com toxicidade grave apresentaram mutação reconhecidamente deletéria (sensibilidade = 20%). Embora o sequenciamento de todo o gene seja ideal para se detectar as mutações, este procedimento é lento e trabalhoso, dificultando seu emprego como método de triagem. Entretanto, em decorrência dos achados aqui encontrados, um estudo com sequenciamento de todos os *exons* do *DPYD* será conduzido pelo grupo e deverá constituir minha tese de doutoramento. Com isso, será possível melhor caracterização das mutações mais frequentes em nossa população. Espera-se que, com o sequenciamento de todos os *exons* do *DPYD* e a continuidade do recrutamento dos pacientes com toxicidade grave, poder-se-á desenvolver testes genéticos rápidos e pouco onerosos para detecção de mutações pontuais de nucleotídeos previamente ao uso do 5FU.

O Teste Respiratório determinando-se as concentrações de $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado após ingestão de 2- ^{13}C -Uracil permite rápida e simples avaliação de toda a via catabólica das pirimidinas e, conseqüentemente, de seu análogo 5FU. O exame é simples, não-invasivo, isento de riscos e de relativo baixo custo se comparado aos outros testes desenvolvidos com mesma finalidade, e apresenta acurácia no mínimo similar ou melhor que os outros métodos. O teste é reprodutível e pode ser realizado pelo menos até 14 dias após a coleta das amostras de ar expirado, em centros de referência. As amostras de ar expirado podem se resumir a duas, obtidas nos minutos 0-50 após ingestão do substrato, sem perda de acurácia em relação ao teste originalmente descrito com 22 amostras. O aumento da casuística com objetivo de melhor se caracterizar a acurácia do teste continuará sendo realizado por este grupo, e propõe-se parcerias com instituições de ensino e tratamento do câncer em nível nacional para se acelerar o recrutamento. Como etapa posterior pretende-se realizar estudo prospectivo multicêntrico aplicando-se o TR em grande número de pacientes antes do início da quimioterapia à base de 5FU a fim de comparar seus resultados com a toxicidade apresentada. Neste desenho de estudo também seria possível testar-se a associação de parâmetros do TR entre si e com outros fatores inerentes ao paciente a fim de otimizar-se a acurácia do teste e comprovar se a análise dos parâmetros do TR conjuntamente com o índice de massa corpórea realmente aumenta a acurácia do TR, conforme demonstrado em nosso estudo de maneira retrospectiva.

APÊNDICE A

Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS					FR - 286040
Projeto de Pesquisa Papel do teste respiratório com uracila marcada com carbono-13 na predição de risco de toxicidade ao quimioterápico 5-fluorouracil em pacientes portadores de câncer de via aerodigestiva					
Área de Conhecimento 4.00 - Ciências da Saúde - 4.01 - Medicina - Diag.				Grupo Grupo III	Nível Diagnóstico
Área(s) Temática(s) Especial(s)				Fase Não se Aplica	
Unitermos teste respiratório com carbono-13, deficiência de DPD, diidropirimidina-desidrogenase, fluoropirimidinas, farmacogenética, 5-fluorouracil, toxicidade à quimioterapia					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 116	Total Brasil 116	Nº de Sujeitos Total 116	Grupos Especiais		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO	Banco de Materiais Biológicos NÃO	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Luiz Gonzaga Vaz Coelho			CPF 137.209.106-87	Identidade M7604945	
Área de Especialização Medicina/Clinica Médica			Maior Titulação Doutor	Nacionalidade Brasileira	
Endereço Rua dos Otoni 705/601			Bairro São Lucas	Cidade Belo Horizonte - MG	
Código Postal 30150-270	Telefone 031-3226-2886 / 031-3222-4641		Fax 031-3226-2886	Email lcoelho@gold.com.br	
Termo de Compromisso Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.					
Data: ____/____/____			Assinatura		
Instituição Onde Será Realizado					
Nome Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG			CNPJ 17.217.985/0046-06	Nacional/Internacional Nacional	
Unidade/Órgão Faculdade de Medicina			Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO	
Endereço Av. Presidente Antônio Carlos, 6.627			Bairro Pampulha	Cidade Belo Horizonte - MG	
Código Postal 31270	Telefone 31 34094592		Fax 31 34094592	Email coep@prpq.ufmg.br	
Termo de Compromisso Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.					
Nome: _____			Assinatura		
Data: ____/____/____					

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 25/08/2009. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

APÊNDICE B

Ficha Clínica

Projeto de Pesquisa: *Papel do teste respiratório com uracila marcada com carbono-13 na predição de risco de toxicidade ao quimioterápico 5-Fluorouracil em pacientes portadores de câncer de via aerodigestiva.*

Iniciais do Paciente	Número Identificador do Paciente	Data de Nascimento	Gênero Fem ☐ Masc ☐	
Serviço de Origem	Médico de Origem	Data da Inclusão (Assinatura do TCLE)		
Sítio primário do câncer	Histopatologia / Imunohistoquímica		CID	
Estadiamento:	T:	N:	M:	Data do Diagnóstico
Finalidade do Tratamento ☐ Curativa ☐ Neoadjuvante ☐ Adjuvante ☐ Paliativa				
Peso (Kg)	Altura (cm)	Superfície Corporal (m ²)	Índice de Desempenho	
Tratamento que levou à Toxicidade		Dose (mg/m ²)	Dose Total (mg)	Data Início
Nº do ciclo em que a toxicidade se manifestou		Intervalo previsto entre os ciclos		
Informações Adicionais (Comorbidades, Medicações concomitantes, Tratamentos oncológicos prévios)				
Toxicidade Apresentada		Grau 2	Grau 3	Grau 4
Estomatite				
Diarréia				
Desidratação				
Neutropenia				
Plaquetopenia				
Alopécia				
Síndrome mão-pé				
Teste Sérico:				
Data Coleta	Hora Coleta	Uracil (nmol/ml)	Diidrouracil (nmol/ml)	Relação (U/UH2)
Teste Genético:				
Data Coleta	Hora Coleta	Mutações Investigadas	Mutações Presentes	
Teste Respiratório: Ficha anexa				
_____ Geraldo Felício da Cunha Jr Oncologia Clínica CRMMG 33221				

APÊNDICE C

Quadro de graduação de toxicidade relacionada ao quimioterápico 5-Fluorouracil

Toxicidade	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV
Estomatite	- eritema da mucosa - sintomas mínimos - dieta normal - mínimos sintomas respiratórios - não interfere na função e nem nas atividades do dia a dia	- ulcerações em faixa ou pseudomembranas - sintomático mas pode engolir dieta modificada - sintomas respiratórios interferindo na função mas não nas atividades do dia a dia	- ulcerações confluentes ou pseudomembranas - sangramento em mínimo trauma; - sintomático e incapaz de alimentar-se ou manter-se hidratado por via oral. - sintomas respiratórios interferindo nas atividades do dia-a-dia.	- necrose, sangramento espontâneo, risco de vida.
Diarréia	- aumento <4x ao dia acima do basal; - mínimo aumento do débito da colostomia;	- aumento 4-6x ao dia acima do basal; - hidratação venosa < 24h - moderado aumento do débito da colostomia;	- aumento $\geq$ 7x ao dia acima basal; - mínimo aumento do débito da colostomia; - hidratação venosa $\geq$ 24 horas - incontinência; - interferindo com as atividades da vida diária.	- risco de vida (ex, choque)
Desidratação	- membranas ressecadas; redução turgor da pele.	- hidratação venosa $\geq$ 24 horas	- hidratação venosa $\geq$ 24 horas	- risco de vida (ex, choque)
Neutropenia	< LLN - 1500/mm ³ < LLN - 1.5 x 10 ⁹ /L	< 1500 - 1000/mm ³ < 1.5 - 1.0 x 10 ⁹ /L	<1000 - 500/mm ³ <1.0 - 0.5 x 10 ⁹ /L	< 500/mm ³ < 0.5 x 10 ⁹ /L
Plaquetopenia	< LLN - 75,000/mm ³ < LLN - 75.0 x 10 ⁹ /L	< 75,000 - 50,000/mm ³ < 75.0 - 50.0 x 10 ⁹ /L	< 50,000 - 25,000/mm ³ < 50.0 - 25.0 x 10 ⁹ /L	< 25,000/mm ³ < 25.0 x 10 ⁹ /L
Alopécia	- parcial	- completa	-	-
Síndrome mão-pé	- mínimas alterações (eritema) assintomáticas.	- descamação, bolhas, sangramento, edema ou dor. Não interfere com função.	- Úlceras com dor; - interferem com a função.	-

Legenda: LLN: Limite inferior da normalidade.

Fonte: Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0, DCTD, NCI, NIH, DHHS. March 31, 2003 (<http://ctep.cancer.gov>), Publish Date: August 9, 2006

APÊNDICE D

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE PÓS-ESCLARECIMENTO PARA PARTICIPAR COMO PACIENTE EM PESQUISA CLÍNICA

Título do estudo: Papel do teste respiratório com uracila marcada com carbono-13 na predição de risco de toxicidade ao quimioterápico 5-Fluorouracil em pacientes portadores de câncer de via aerodigestiva.

Proposta

Ao assinar este documento você concorda em participar como paciente no estudo citado acima. Um estudo clínico é uma pesquisa com seres humanos, através da qual se tenta comprovar algum tratamento ou novo exame que possa melhorar a vida dos pacientes. Este estudo é aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Todos os procedimentos serão realizados com o maior rigor técnico e com o compromisso de não prejudicá-lo. Todos os seus exames bem como seu prontuário médico serão mantidos confidenciais e você não será identificado de maneira escrita ou verbal em nenhum trabalho, documento ou fotografia.

Você concorda em ler todo este termo e ouvir todas as explicações sobre o estudo clínico. Caso você não saiba ler, todas as informações serão lidas e explicadas oralmente para você.

Você concorda que fez todas as perguntas que julgou necessário para esclarecer suas dúvidas e recebeu respostas para todas não existindo questões pendentes.

Você receberá uma cópia deste formulário independente do consentimento para participar deste estudo.

Natureza e Objetivos do Estudo

Você foi convidado a participar deste estudo porque é ou foi portador de câncer do aparelho digestivo ou da região da cabeça e pescoço, e realizou quimioterapia com o agente quimioterápico *5-Fluorouracil*. Esta droga é bem tolerada e pouco tóxica para a maioria dos pacientes, entretanto, existem algumas pessoas que apresentam graves efeitos colaterais após a quimioterapia, decorrentes do menor metabolismo e eliminação do *5-Fluorouracil* pelo organismo.

Não existem até o momento testes disponíveis que possam prever quais pacientes terão tal toxicidade antes mesmo que usem o *5-Fluorouracil*.

O propósito deste estudo é comprovar a validade de um exame complementar chamado "**Teste Respiratório**" para prever a toxicidade ao quimioterápico 5-Fluorouracil (5FU). Seu tratamento e acompanhamento clínico continuarão sendo realizados por seu médico de origem, e nada será modificado em sua rotina, com a exceção do que está sendo informado neste documento.

Descrição dos Procedimentos

Ao assinar este termo, você concorda que o pesquisador revise seu Prontuário Médico com objetivo de preenchimento de Ficha Clínica onde

constarão dados relacionados ao seu tratamento prévio. Além disso, concorda em disponibilizar uma manhã, das 8 às 12 horas, **em jejum de 8 horas**, para realização dos seguintes procedimentos:

1. Coleta às 08:00horas de uma amostra de 20ml de sangue, para exames bioquímicos e estudo genético;
2. Você tomará 100ml de um líquido sem gosto, sem cheiro e sem efeitos colaterais e será requisitado a soprar um balão em intervalos de 20 minutos, durante um período de 3 horas;

Estes procedimentos serão realizados no Laboratório de Testes Respiratórios do Hospital das Clínicas da UFMG, localizado no 2º Andar, sala 200;

Suas informações serão registradas em uma ficha clínica, na qual não constará seu nome ou qualquer dado que permita identificá-lo.

Você poderá ser convidado a repetir o Teste Respiratório (sem porém ter que colher outra amostra de sangue) após 3 meses da primeira coleta. Poderá aceitar ou não este convite, sem nenhuma consequência negativa para você caso não aceite.

Riscos e desconfortos potenciais para você

Pelo fato deste ser um estudo que não modifica de nenhuma maneira seu tratamento ou acompanhamento clínico, os riscos e desconfortos para você seriam os relacionados à coleta de uma pequena amostra de sangue (p exemplo, uma pequena mancha arrocheada chamada equimose, e a dor da coleta de sangue). Outro desconforto seria o relacionado a permanecer no Laboratório de Testes Respiratórios, em jejum, durante 3 horas, colhendo amostras de ar de sua respiração a cada 20 minutos. O material ingerido para a realização do teste respiratório (Uracil marcado com Carbono-13) não é radioativo e não provoca qualquer efeito colateral.

Benefícios

Se participar deste estudo, não haverá benefícios diretos para você, pois não podemos alterar qualquer decisão de seu tratamento baseados nos resultados do Teste Respiratório ou demais exames, já que se tratam de dados preliminares.

Você não receberá nenhum pagamento devido à sua participação no estudo. Você receberá um vale-refeição e vales-transporte para cobrir seus gastos no dia de seu comparecimento ao Hospital das Clínicas para realização do teste respiratório. Você não terá qualquer despesa pessoal durante sua permanência no estudo, incluindo exames e consultas.

Você e seu médico serão informados dos resultados do teste, bem como de suas limitações, ao final do estudo.

Desistência

Você não é obrigado a participar deste estudo. Caso decida não participar, o seu tratamento e acompanhamento clínico atual e futuro não será prejudicado de nenhuma maneira. Você não será penalizado por não participar deste estudo.

Mesmo que você decida participar deste estudo, poderá a qualquer momento desistir e cancelar seu termo de consentimento informado, não necessitando para tal dar qualquer justificativa. Esta decisão não afetará você, seus registros médicos ou sua relação com os médicos ou instituições envolvidos.

Retirada do Estudo

O investigador poderá por sua vez excluí-lo do estudo a qualquer momento desde que julgue não estar havendo a cooperação necessária aos procedimentos do estudo, ou se julgar que sua participação possa de alguma forma lhe trazer riscos ou desconfortos.

Uso de amostra biológica (de sangue)

Um total de 20ml de seu sangue serão retirados com a única finalidade de realização de dosagens bioquímicas e estudos genéticos relacionados ao estudo. O Pesquisador descartará o remanescente da amostra de sangue.

Declaração de participação

Você atesta ter lido todo o texto acima em todas as 3 páginas, ter recebido respostas para todas as suas dúvidas, e de livre e espontânea vontade concorda em participar neste estudo clínico.

Em caso de dúvidas, poderá contactar os pesquisadores responsáveis ou o COEP da UFMG nos telefones e endereços abaixo:

Dr. Geraldo Felício da Cunha Jr
Av. Bernardo Monteiro 809, Sta Efigênia - BH
CEP 30150-280 Tel: 31 3273-3535 Telefone Celular: 31 9141-8266

Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho
Av. Alfredo Balena 110, 2º andar, Sta Efigênia - BH
CEP 30130-100 Tel: 3409-9403 Telefone Celular 31 –9981-4641

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
Endereço: Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar -
Sala 2005 - Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901
Tel: 31 3409-9542

_____ Assinatura do participante	_____ Data
_____ Assinatura do pesquisador	_____ Data
_____ Testemunha 1	_____ Data

APÊNDICE E

Desenvolvimento da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação dos níveis plasmáticos de Uracil e Diidrouracil

1. Padrões e reagentes

1. Uracila padrão *Sigma-Aldrich*
2. Diidrouracila padrão *Sigma-Aldrich*
3. 5-Clorouracila padrão *Sigma-Aldrich*
4. Albumina de soro bovino (BSA) *Sigma-Aldrich*
5. Metanol grau cromatográfico *Tedia*
6. Acetato de etila, diclorometanol, metil-ter-butil éter (MTBE), hidróxido de amônio e ácido fosfórico grau analítico

2. Condições Instrumentais

2.1 Condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) modular da marca *Waters* com coluna analítica *XTerra - Waters* (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), mantida a 40 °C, fluxo de 0,8 mL/min com *splitting* (9:1). O amostrador automático foi mantido a 8 °C, e o volume de injeção foi de 50 µL. O tempo total de corrida foi fixado em 5 minutos. A fase móvel foi composta por 15% de metanol e 85% de hidróxido de amônio aquoso 0,1% (v/v) pH 10.

2.2 Condições do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas da marca *Quattro LC* (MS/MS) foi operado em modo de ionização *eletronspray* negativo (ESI-). Os íons monitorados (Monitoramento Múltiplo de Reação – MRM) e as condições de operação do espectrômetro de massas são descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Íons monitorados e condições de operação do MS-MS

Analito	Íon precursor	Íon fragmento	Energia do cone (V)	Energia de colisão (eV)
Uracila	110.6	41.7	20	20
Diidrouracila	112.6	41.6	10	10
5-clorouracila	144.6	41.7	25	20

Source ES	Analyser
Cone – 20 V Capillary – 2.5 kV Extractor – 2 V RF Lens – 0.5 V Source Temp. – 100 °C Desolvation Temp. – 350 °C Desolvation Gas Flow – 500 L/Hr	LM 1 Resolution – 10.0 HM 1 Resolution – 10.0 Ion Energy 1 – 0.5 Entrance – 10 Collision – 0 Exit – 10.0 LM 2 Resolution – 7.5 HM 2 Resolution – 7.5 Ion Energy 2 – 1.5 Multiplier – 750

3. Preparo das soluções em solvente e Albumina sérica Bovina (BSA)

3.1 Solução estoque de Uracila em água a 250 µg/mL (S1)

Pesaram-se 12,5 mg de padrão de uracila e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se 30 mL de água, solubilizou-se em ultrassom por 5 minutos e avolumou-se com água.

3.2 Solução estoque diluída de Uracila em água a 12500 ng/mL (S2)

Transferiu-se 0,5 mL da S1 para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água.

3.3 Solução estoque de Diidrouracila em água a 500 µg/mL (S1)

Pesaram-se 25 mg de padrão de diidrouracila e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se 30 mL de água, solubilizou-se em ultra-som por 5 minutos e avolumou-se com água.

3.4 Solução estoque diluída de Diidrouracila em água a 25000 ng/mL (S2)

Transferiu-se 0,5 mL da S1 para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água.

3.5 Solução estoque de 5-Clorouracila em metanol:água (1:1) a 5000 ng/mL (S1)

Pesaram-se 5 mg de padrão de 5-clorouracila e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionaram-se 8 mL de metanol:água (1:1), solubilizou-se em ultra-som por 5 minutos e avolumou-se com o mesmo solvente. Transferiu-se 0,1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente.

3.6 Solução padrão interno de 5-Clorouracila em metanol a 240 ng/mL (SPI)

Transferiram-se 0,48 mL da S1 para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol.

3.7 Albumina de soro bovino (BSA) a 80 g/L

Pesaram-se 4 g de albumina de soro bovino e transferiu-se para béquer de 100 mL. Adicionaram-se 30 mL de água, solubilizou-se com bastão de vidro e transferiu-se para balão volumétrico de 50mL. Avolumou-se com água.

A partir das soluções estoque de uracila e diidrouracila, foram preparadas soluções diluídas contendo os dois analitos, para posterior adição em BSA. A Tabela 2 apresenta os volumes tomados e soluções empregadas para realizar as diluições em balões volumétricos de 10 mL. O solvente empregado para completar o volume foi água.

Tabela 2: Volumes tomados e soluções empregadas para realizar diluições de uracila e diidrouracila.

Ponto da curva	Uracila		Diidrouracila	
	Solução	Volume tomado (mL)	Solução	Volume tomado (mL)
1	S2	0,2	S2	0,2
2	S2	1,0	S2	1,0
3	S1	0,1	S1	0,1
4	S1	0,2	S1	0,2
5	S1	0,3	S1	0,35
6	S1	0,4	S1	0,5
Concentração Baixa	S2	0,6	S2	0,6
Concentração Média	S1	0,15	S1	0,18
Concentração Alta	S1	0,35	S1	0,4

Após preparo descrito na Tabela 2, adicionou-se 0,1 mL de cada solução em 4,9 mL de BSA e homogeneizou-se em vórtex por 40 segundos. As concentrações finais da curva analítica assim obtida estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Concentrações da curva analítica de uracila e diidrouracila.

Ponto da curva	Uracila (ng/ml)	Diidrouracila (ng/ml)
1	5	10
2	25	50
3	50	100
4	100	200
5	150	350
6	200	500
Concentração Baixa	15	30
Concentração Média	75	180
Concentração Alta	175	400

4. Extração da amostra

- Transferiu-se 500 µL da amostra de plasma ou BSA contaminados para tubo de vidro.
- Adicionou-se 50 µL de solução padrão interno (SPI) e 50 µL de ácido fosfórico 5% e agitou-se por 5 segundos.
- Adicionou-se 2 mL da mistura Acetato de Etila:MTBE:diclorometano (4:3:3, V/V) e agitou-se por 60 segundos.
- As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm, a 5 °C, por 5 minutos.
- Transferiram-se 1600 µL da camada orgânica (camada superior) para novo tubo de vidro. Evaporou-se o solvente a 60 °C sob corrente de ar seco.
- Adicionou-se ao tubo 100 µL de metanol:água (15:85) e agitou-se por 40 segundos.
- Transferiram-se 100 µL para vial com insert.

5. Validação do método bioanalítico

O método bioanalítico desenvolvido foi validado segundo os procedimentos preconizados pela Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos recomendado pelo *U.S. Food and Drug Administration (Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2001)*.

5.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio de curvas analíticas de seis pontos plotadas para resposta (área do analito/área do padrão interno) versus a concentração do analito, em três dias consecutivos. As faixas de concentrações plasmáticas avaliadas foram de 5 a 200 ng/ml para uracila e de 10 a 500 ng/ml de diidrouracila. Os critérios de aceitação utilizados foram: coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98; desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o limite de quantificação (LIQ) e desvio menor ou igual 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva. No mínimo quatro de seis concentrações da curva analítica devem cumprir com os critérios anteriores.

5.2 Limite de quantificação (LIQ)

O limite de quantificação pode ser estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Para isso, amostras plasmáticas com concentrações próximas ao LIQ foram analisadas em triplicata e determinou-se a precisão e exatidão das mesmas. A resposta do analito no LIQ deve ser reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80% a 120%.

5.3 Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico avalia a proximidade de medidas individuais do analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas provenientes de um volume homogêneo da matriz biológica. A exatidão avalia a proximidade do resultado médio fornecido pelo método em relação ao valor verdadeiro (concentração) do analito.

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por meio da análise em quintuplicata de amostras de plasma contendo uracila e diidrouracila em três diferentes concentrações: CQB (15 ng/ml de uracila e 30 ng/ml de diidrouracila), CQM (75 ng/ml de uracila e 180 ng/ml de diidrouracila) e CQA (175 ng/ml de uracila e 400 ng/ml de diidrouracila). As amostras de plasma contendo os analitos nessas concentrações foram extraídas e analisadas conforme o procedimento otimizado. As análises foram realizadas em três dias consecutivos, de forma que foram avaliadas precisão e exatidão intra-corrida e inter-corridas.

A precisão do método é expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), sendo que não se admitem valores superiores a 15%.

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, multiplicada por 100. A exatidão de métodos bioanalíticos deve estar compreendida entre 85% e 115%.

5.4 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do procedimento de extração de um método analítico, ou seja, a quantidade do analito que é efetivamente extraída no processo, em relação à quantidade originalmente presente na matriz biológica.

A recuperação do método foi avaliada por meio da análise em quintuplicata de amostras de plasma contendo uracila e diidrouracila em três diferentes concentrações: CQB (15 ng/ml de uracila e 30 ng/ml de diidrouracila), CQM (75 ng/ml de uracila e 180 ng/ml de diidrouracila) e CQA (175 ng/ml de uracila e 400 ng/ml de diidrouracila). A recuperação do padrão interno (5-clorouracila) também foi avaliada na concentração de trabalho utilizada (20 ng/ml).

Para determinar a porcentagem de recuperação do método, foi feita a comparação dos resultados obtidos com amostras de plasma contendo os analitos submetidas ao processo de extração e amostras dos analitos em fase móvel, nas mesmas concentrações.

5.5 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela análise de amostras de BSA antes da adição de uracila e diidrouracila, para verificação de existência de picos interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos. Foram analisadas também diferentes amostras de plasma sem adição da solução padrão interno para verificar a presença de interferentes no tempo de retenção de 5-clorouracila.

5.6 Efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz é imprescindível para verificar se componentes endógenos da matriz biológica são capazes de promover supressão ou indução da ionização dos analitos no espectrômetro de massas, alterando sua resposta no detector. Para avaliação do efeito de matriz, foi feita a comparação das áreas dos picos dos analitos em amostras diluídas em fase móvel e em amostras obtidas após reconstituição do resíduo extraído de plasma ou BSA brancos. Foi avaliado efeito matriz em BSA para uracila e diidrouracila nas concentrações baixa e alta (CQB e CQA) e em plasma para 5-clorouracila (20 ng/ml). Considera-se que não há efeito de matriz quando a diferença entre a área do pico do analito na solução reconstituída do plasma e aquela obtida em fase móvel é inferior a 15%.

5.7 Estabilidade

Todos os tipos de estabilidade foram avaliados empregando-se concentrações baixa e alta dos analitos (CQB e CQA), cada uma em triplicata. As amostras foram consideradas estáveis quando não se verificou desvio superior a 15% em relação ao valor obtido em amostras recém-preparadas. Além disso, em todas as análises, o desvio padrão relativo deve ser inferior a 15% e exatidão deve estar compreendida dentro da faixa de 85% a 115%.

5.7.1 Estabilidade de curta duração (ECD)

Para avaliação da estabilidade de curta duração, as amostras em BSA ou em plasma devem permanecer a temperatura ambiente de 4 a 24 horas, baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas a temperatura ambiente antes da extração e análise.

Amostras de plasma ou BSA contendo os analitos foram descongeladas e mantidas a temperatura ambiente por 6 horas. Após este tempo, outras amostras foram descongeladas e todas foram submetidas ao processo de extração e análise. As concentrações de uracila e diidrouracila das amostras de estabilidade de curta duração foram comparadas àquelas das amostras recém-preparadas.

5.7.2 Estabilidade de longa duração (ELD)

O tempo de armazenamento das amostras em BSA ou em plasma em freezer para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, de acordo com o cronograma proposto no protocolo do estudo clínico.

Para avaliação da estabilidade de longa duração, amostras armazenadas em freezer a -70 °C foram descongeladas e analisadas após 50, 100 e 150 dias de preparo. As concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras recém-preparadas.

5.7.3 Estabilidade pós-processamento (EPP)

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de injeção, deve-se avaliar a estabilidade dos analitos nas amostras processadas (incluindo o padrão interno), na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de tempo superior à duração das corridas analíticas do conjunto de amostras.

Para avaliação da estabilidade pós-processamento, amostras em BSA ou em plasma foram submetidas ao processo de extração e mantidas na bandeja do injetor automático por 20 horas antes da injeção. A temperatura da bandeja do injetor automático foi programada para 4 °C, de forma que as amostras foram mantidas sob refrigeração. As concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras injetadas imediatamente após a extração.

5.7.4 Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento (ECCD)

A estabilidade dos analitos deve ser avaliada após três ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras em BSA ou em plasma recém-preparadas foram congeladas a -70 °C e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento até atingir a temperatura ambiente. Após completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -70 °C por 24 horas e assim sucessivamente, até completar três ciclos. Ao final do terceiro ciclo, as amostras foram analisadas e as concentrações dos analitos foram comparadas com aquelas obtidas em amostras recém-preparadas.

ADENDO 1 - Espectros obtidos no espectrômetro de massas

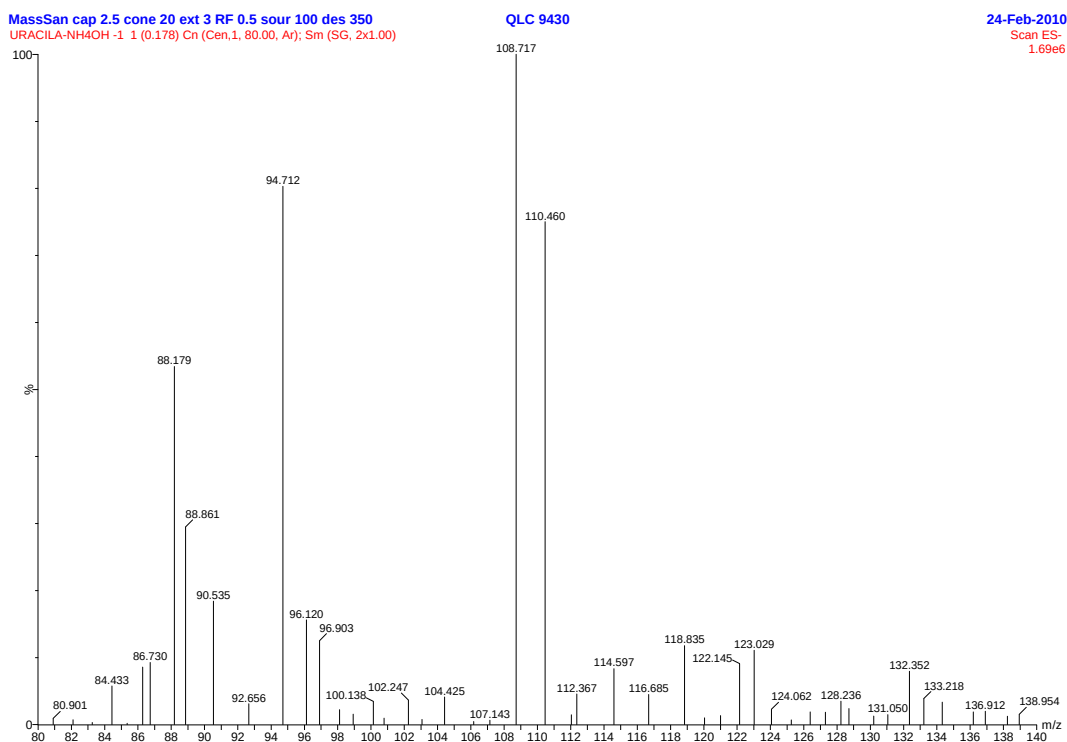


Figura 1: Espectro ESI(-) – MS do íon precursor de uracila.

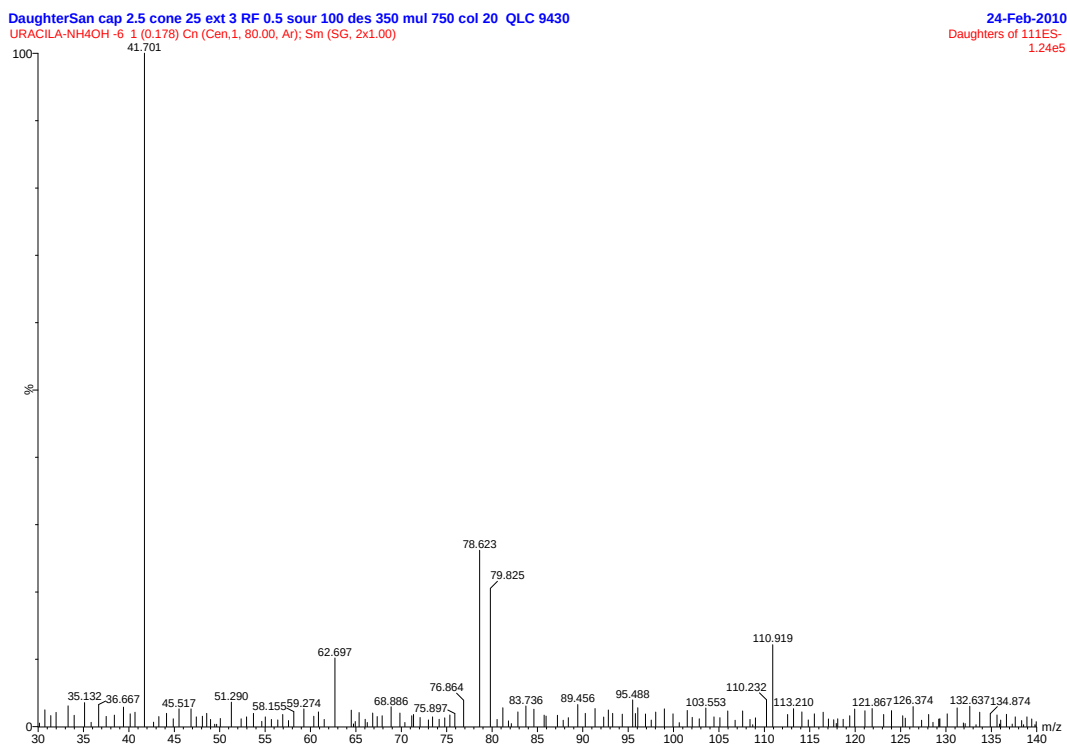


Figura 2: Espectro ESI(-) – MS de fragmentação de uracila.

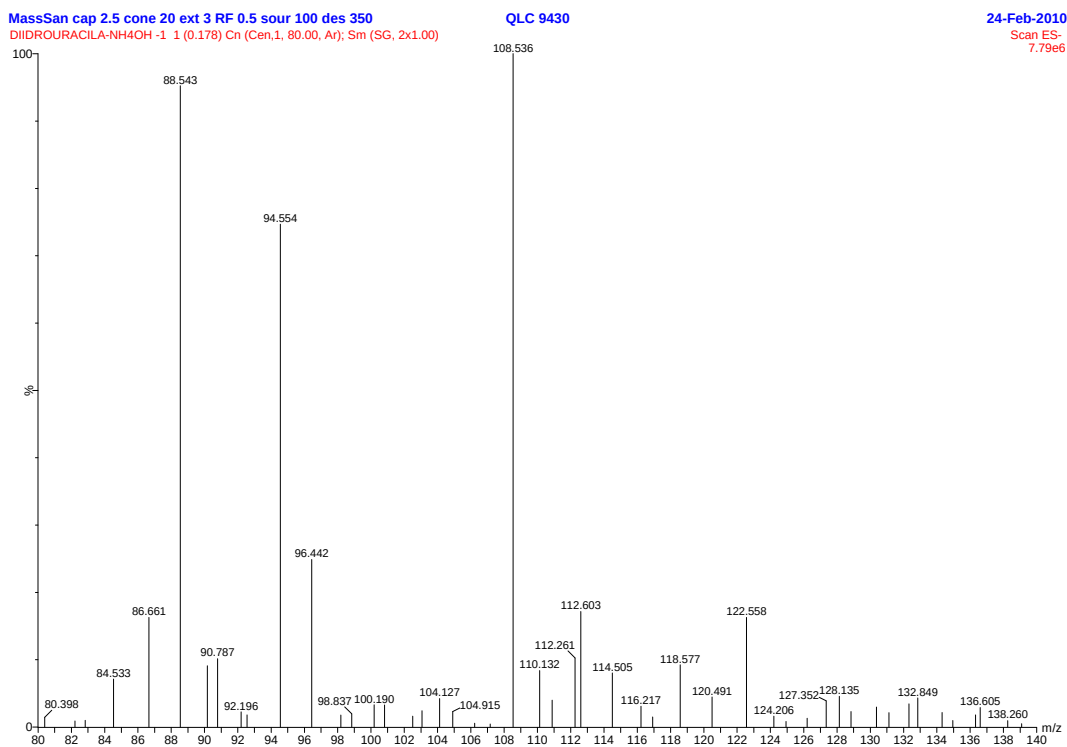


Figura 3: Espectro ESI(-) – MS do íon precursor de diidrouracila.

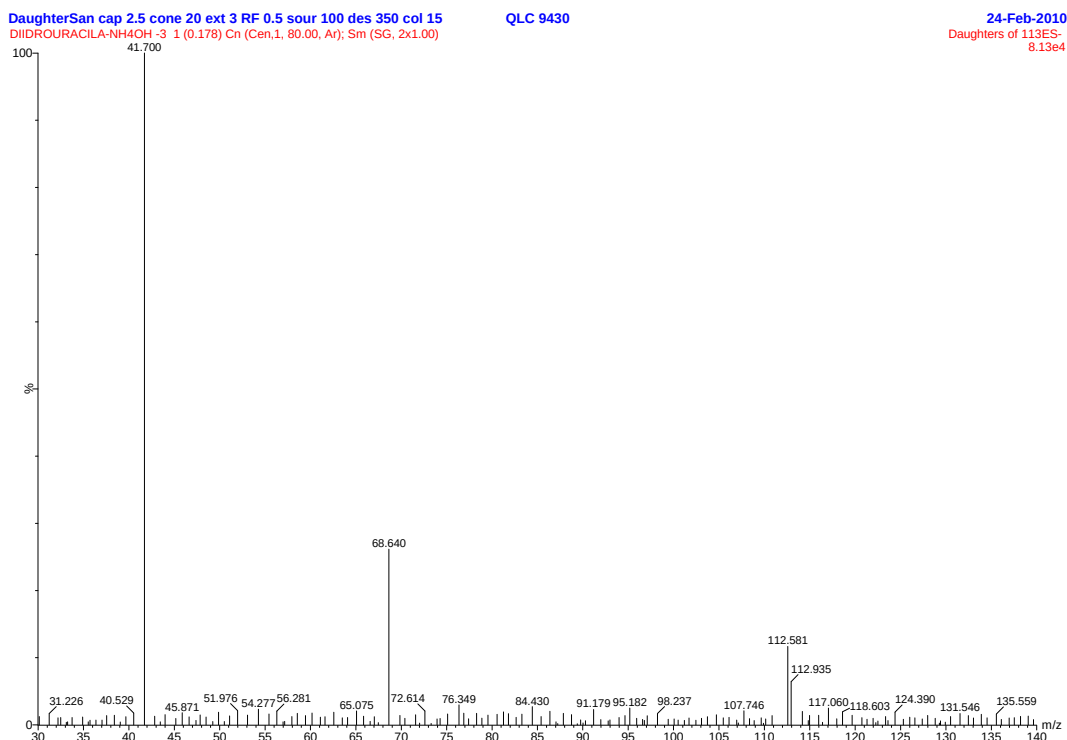


Figura 4: Espectro ESI(-) – MS de fragmentação de diidouracila.

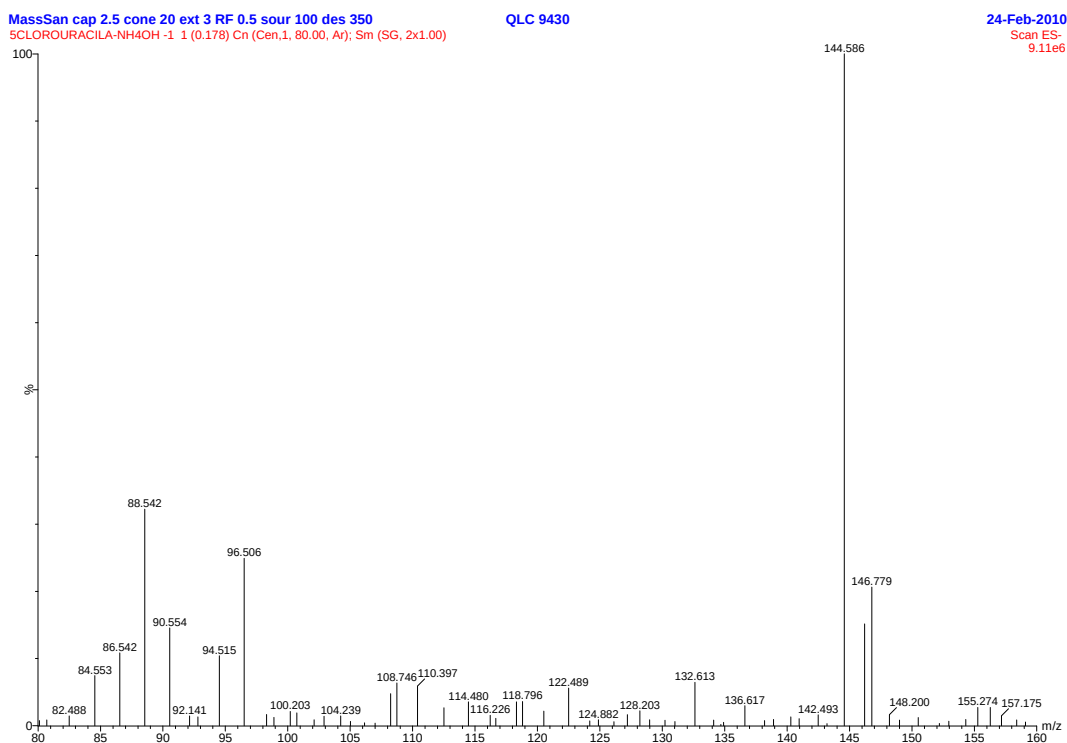


Figura 5: Espectro ESI(-) – MS do íon precursor de 5-clorouracila.

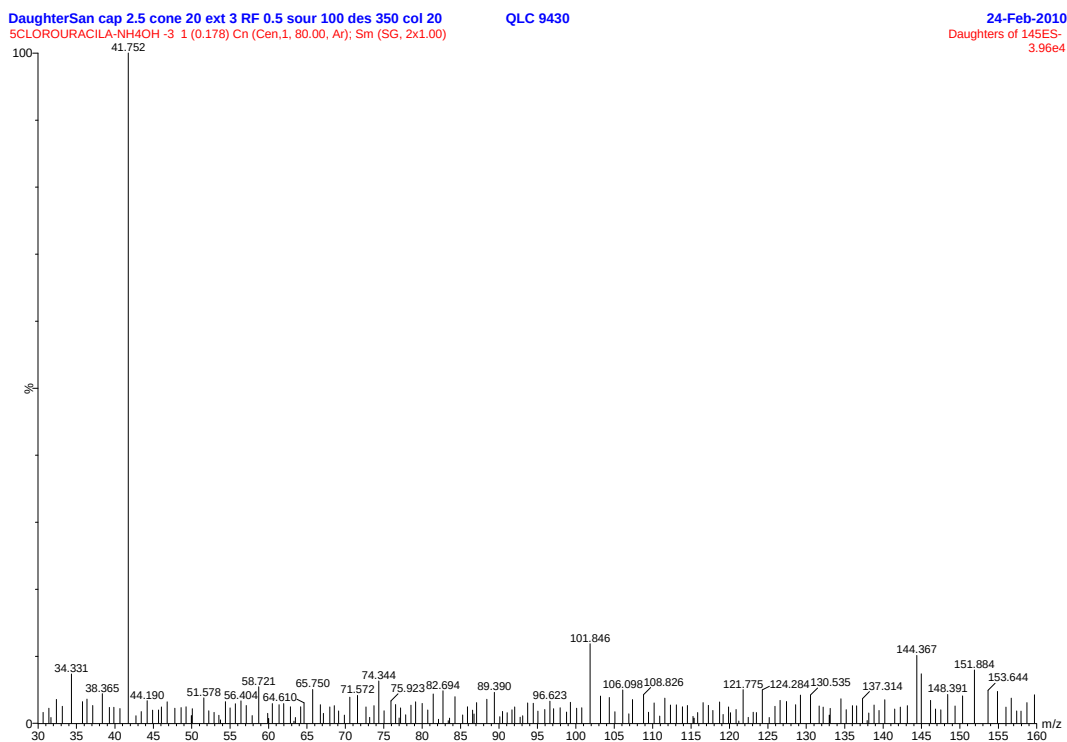


Figura 6: Espectro ESI(-) – MS de fragmentação de 5-clorouracila.

ADENDO 2 - Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS

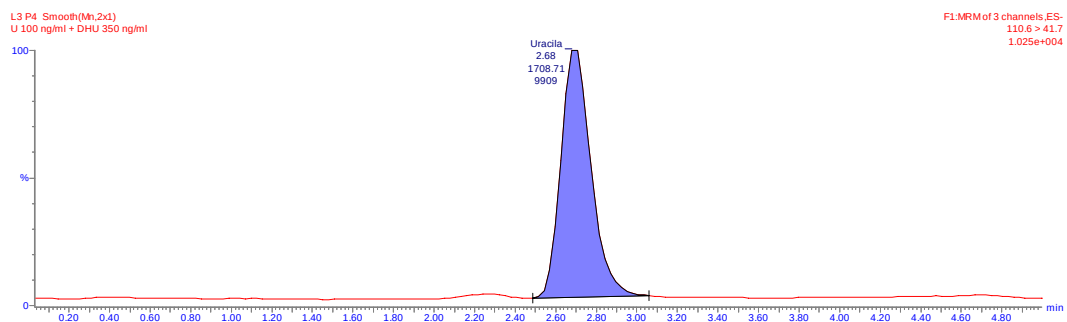


Figura 7: Cromatograma obtido por LC-MS/MS para uracila.

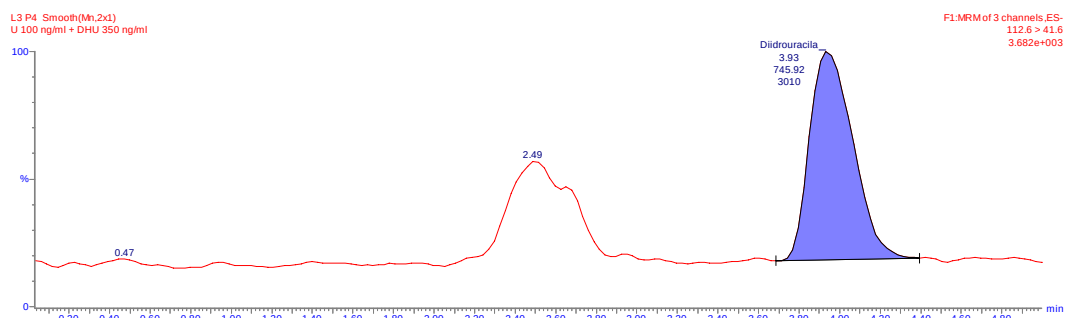


Figura 8: Cromatograma obtido por LC-MS/MS para diidrouracila.

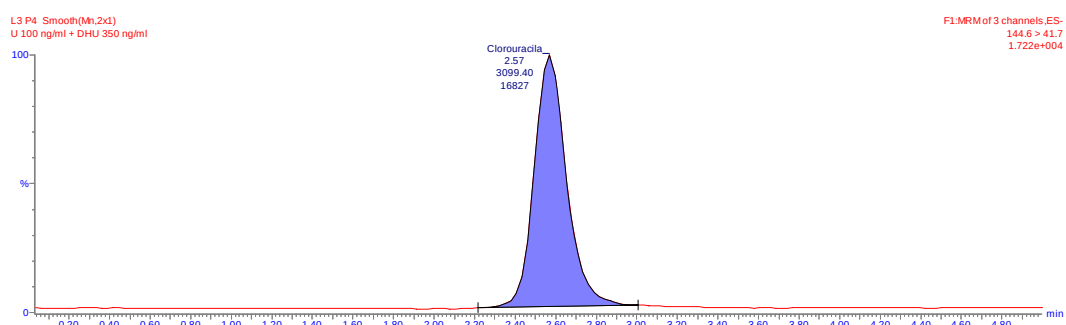


Figura 9: Cromatograma obtido por LC-MS/MS para 5-clorouracila.

ADENDO 3 - Tabelas com resultados da validação do método

LINEARIDADE – CURVAS ANALÍTICAS

URACILA						
Ident. Corrida	22/03		23/03		24/03	
Conteúdo	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
Conc. teórica	Obtida	%Desvio	Obtida	%Desvio	Obtida	%Desvio
5	4.566	-8.7	5.333	6.7	4.975	-0.5
25	-	-	23.765	-4.9	24.464	-2.1
50	52.912	5.8	47.649	-4.7	50.307	0.6
100	107.092	7.1	102.906	2.9	103.005	3
150	153.298	2.2	149.378	-0.4	152.422	1.6
200	187.131	-6.4	200.969	0.5	194.827	-2.6

DIIDROURACILA						
Ident. Corrida	22/03		23/03		24/03	
Conteúdo	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
Conc. teórica	Obtida	%Desvio	Obtida	%Desvio	Obtida	%Desvio
10	8.921	-10.8	-	-	8.744	-12.6
50	51.328	2.7	54.048	8.1	56.016	12
100	105.966	6	98.585	-1.4	103.978	4
200	219.474	9.7	182.86	-8.6	179.427	-10.3
350	321.6	-8.1	338.193	-3.4	402.128	14.9
500	502.711	0.5	526.315	5.3	459.707	-8.1

EQUAÇÕES DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

URACILA		
Corrida Analítica	Equação da Curva de Calibração	Coefficiente de Correlação
Lote 1	$Y = 0.00613388 * X + 0.03886669$	0.99800
Lote 2	$Y = 0.00419987 * X + 0.0208756$	0.99965
Lote 3	$Y = 0.00481296 * X + 0.0398551$	0.99966

DIIDROURACILA		
Corrida Analítica	Equação da Curva de Calibração	Coefficiente de Determinação
Lote 1	$Y = 0.00220686 * X - 0.00352585$	0.99753
Lote 2	$Y = 0.00126894 * X - 0.00307589$	0.99687
Lote 3	$Y = 0.00134375 * X + 0.00704296$	0.99266

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Uracila	
Amostra	5 ng/mL
1	4.08
2	4.44
3	4.41
Média	4.31
CV%	4.66
Exatidão	86.17

Diidrouracila	
Amostra	10 ng/mL
1	11.65
2	11.95
3	11.66
Média	11.75
CV%	1.43
Exatidão	117.51

PRECISÃO E EXATIDÃO

Corrida Analítica 1 (Uracila)			
Amostra	15 ng/mL	75 ng/mL	175 ng/mL
1	-	66.86	163.59
2	12.91	74.26	155.76
3	12.86	68.47	169.36
4	14.86	64.11	167.42
5	12.98	64.24	167.45
Média	13.40	67.59	164.72
CV%	7.24	6.15	3.30
Exatidão	89.34	90.12	94.12

Corrida Analítica 2 (Uracila)			
Amostra	15 ng/mL	75 ng/mL	175 ng/mL
1	16.60	76.68	175.57
2	-	78.11	170.37
3	16.08	78.79	183.25
4	17.21	78.89	177.85
5	15.75	80.57	179.25
Média	16.41	78.61	177.26
CV%	3.88	1.79	2.68
Exatidão	109.41	104.81	101.29

Corrida Analítica 1 (Diidrouracila)			
Amostra	30 ng/mL	180 ng/mL	400 ng/mL
1	-	167.83	344.06
2	32.58	169.94	360.13
3	31.40	193.07	356.28
4	33.62	173.52	341.91
5	30.99	153.30	393.22
Média	32.15	171.53	359.12
CV%	3.70	8.33	5.73
Exatidão	107.16	95.30	89.78

Corrida Analítica 2 (Diidrouracila)			
Amostra	30 ng/mL	180 ng/mL	400 ng/mL
1	26.19	180.23	351.49
2	34.18	179.61	372.37
3	32.71	204.96	409.76
4	35.70	184.39	420.95
5	29.14	199.23	351.09
Média	31.58	189.68	381.13
CV%	12.26	6.15	8.57
Exatidão	105.28	105.38	95.28

Corrida Analítica 3 (Uracila)			
Amostra	15 ng/mL	75 ng/mL	175 ng/mL
1	15.04	75.84	178.88
2	16.41	71.48	174.76
3	12.61	76.36	188.24
4	13.84	83.56	175.19
5	13.48	74.05	177.48
Média	14.27	76.26	178.91
CV%	10.35	5.91	3.06
Exatidão	95.16	101.68	102.23

Corrida Analítica 3 (Diidrouracila)			
Amostra	30 ng/mL	180 ng/mL	400 ng/mL
1	27.16	184.15	397.56
2	32.50	151.85	348.92
3	33.66	201.15	440.88
4	32.72	174.06	378.23
5	33.79	204.74	438.77
Média	31.97	183.19	400.87
CV%	8.58	11.75	9.87
Exatidão	106.56	101.77	100.22

Inter-corrida			
Amostra	15 ng/mL	75 ng/mL	175 ng/mL
Média	14.66	74.15	173.63
CV%	11.16	8.02	4.70
Exatidão	97.75	98.87	99.22

Inter-corrida			
Amostra	30 ng/mL	180 ng/mL	400 ng/mL
Média	31.88	181.47	380.37
CV%	8.48	9.38	9.05
Exatidão	106.27	100.82	95.09

RECUPERAÇÃO

Recuperação (Uracila)						
Amostra	CQA (175 ng/mL)		CQM (75 ng/mL)		CQB (15 ng/mL)	
	Não extraído	Extraído	Não extraído	Extraído	Não extraído	Extraído
2	6387.7	2352.1	3067.3	1174.9	635.4	230.5
3	6470.0	2511.2	2958.9	1016.1	637.4	257.4
4	6237.2	2261.0	2995.1	917.9	632.5	278.8
5	6407.3	2443.5	2912.7	1015.0	642.5	232.2
Média	6368.4	2411.1	2988.4	1034.6	633.7	249.7
CV%	1.37	4.30	1.93	8.94	1.29	9.19
Recup	37.86		34.62		39.41	
Rec Média	37.30					

Recuperação (Diidrouracila)						
Amostra	CQA (400 ng/mL)		CQM (180 ng/mL)		CQB (30 ng/mL)	
	Não extraído	Extraído	Não extraído	Extraído	Não extraído	Extraído
1						
2	5144.8	1871.8	2484.3	882.9	407.5	145.5
3	5295.1	1823.9	2401.4	935.7	456.3	168.4
4	5266.3	1539.9	2474.5	863.2	430.7	151.5
5	5022.7	1981.1	2350.0	785.0	430.1	130.7
Média	5220.6	1804.1	2434.3	864.8	437.6	156.2
CV%	2.64	9.03	2.34	6.28	5.15	13.37
Recup	34.56		35.53		35.68	
Rec Média	35.26					

Recuperação (5-Clorouracila)		
Amostra	Não extraído	Extraído
1	3561.7	1639.6
2	3477.3	1648.8
3	3583.1	1900.5
4	3706.9	1787.3
5	3710.2	1679.3
6	3604.6	1947.6
7	3676.6	1980.4
8	3568.6	1845.3
9	3635.7	1895.9
10	3551.3	1954.0
11	3665.1	1988.8
12	3675.2	1971.4
13	3327.7	1941.8
14	3554.0	1767.8
15	3592.9	1910.2
Média	3592.7	1857.3
CV%	2.75	6.62
Recup	51.69	

EFEITO MATRIZ

EFEITO MATRIZ (Uracila)						
Amostra	CQA (175 ng/mL)			CQB (15 ng/mL)		
	BSA	SOLUÇÃO	DESVIO	BSA	SOLUÇÃO	DESVIO
1	6010.5	6368.4	2.97	611.59	633.68	0.14
2	6359.2			654.0		
Média	6184.8215			632.8		

EFEITO MATRIZ (Diidrouacila)						
Amostra	CQA (400 ng/mL)			CQB (30 ng/mL)		
	BSA	SOLUÇÃO	DESVIO	BSA	SOLUÇÃO	DESVIO
1	5592.7	5220.6	-6.90	436.4	437.6	-7.49
2	5622.1			509.7		
Média	5607.4			473.0		

EFEITO MATRIZ (5-Clorouracila)						
Amostra	BSA (20 ng/mL)			Plasma (20 ng/mL)		
	BSA	SOLUÇÃO	DESVIO	Plasma	SOLUÇÃO	DESVIO
1	1688.6	1863.6	11.67	1830.9	1863.6	4.98
2	1649.2			1719.4		
Média	1668.9			1775.2		

ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO

ECD (Uracila)					ECD (Diidrouracila)				
Amostra	CQB (15 ng/mL)		CQA (175 ng/mL)		Amostra	CQB (30 ng/mL)		CQA (400 ng/mL)	
	Recente	ECD	Recente	ECD		Recente	ECD	Recente	ECD
1	15.04	13.10	178.88	167.15	1	27.16	34.42	397.56	460.32
2	16.41	13.27	174.76	164.36	2	32.50	37.09	348.92	440.03
3	12.61	13.71	188.24	163.88	3	33.66	30.48	440.88	446.56
Média	14.69	13.36	180.63	165.13	Média	31.11	34.00	395.79	448.97
CV%	13.09	2.38	3.82	1.07	CV%	11.14	9.78	11.62	2.31
Exatidão	97.90	89.06	103.21	94.36	Exatidão	103.69	113.32	98.95	112.24
Variação	-9.03		-8.58		Variação	9.29		13.44	

ECD Plasma				
Amostra	Uracila		Diidrouracila	
	Recente	ECCD	Recente	ECCD
1	21.71	18.97	84.54	95.86
2	18.57	20.72	83.19	84.48
3	24.90	-	104.21	-
Média	21.73	19.84	90.65	90.17
CV%	14.57	6.27	12.97	8.92
Variação	-8.67		-0.53	

ESTABILIDADE APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

ECCD (Uracila) - BSA				
Amostra	CQB (15 ng/mL)		CQA (175 ng/mL)	
	Recente	ECCD	Recente	ECCD
1	15.04	12.765	178.88	162.58
2	16.41	12.908	174.76	161.86
3	12.61	12.662	188.24	148.70
Média	14.69	12.78	180.63	157.71
CV%	13.09	0.97	3.82	4.95
Exatidão	97.90	85.19	103.21	90.12
Variação	-12.98		-12.69	

ECCD (Diidrouracila) - BSA				
Amostra	CQB (30 ng/mL)		CQA (400 ng/mL)	
	Recente	ECCD	Recente	ECCD
1	27.16	33.131	397.56	375.25
2	32.50	34.95	348.92	448.71
3	33.66	30.3	440.88	368.18
Média	31.11	32.79	395.79	397.38
CV%	11.14	7.15	11.62	11.22
Exatidão	103.69	109.31	98.95	99.35
Variação	5.42		0.40	

ECCD Plasma				
Amostra	Uracila		Diidrouracila	
	Recente	ECCD	Recente	ECCD
1	21.71	23.951	84.54	85.48
2	18.57	20.725	83.19	79.87
3	24.90	23.521	104.21	81.51
Média	21.73	22.73	90.65	82.29
CV%	14.57	7.71	12.97	3.51
Variação	4.62		-9.22	

ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO

EPP (Uracila)				
Amostra	CQB (15 ng/mL)		CQA (175 ng/mL)	
	Recente	EPP	Recente	EPP
1	16.08	15.65	175.57	188.26
2	17.21	17.27	170.37	192.00
3	15.75	18.62	183.25	197.03
Média	16.35	17.18	176.40	192.43
CV%	4.67	8.66	3.67	2.29
Exatidão	108.98	114.54	100.80	109.96
Variação	5.10		9.09	

EPP (Diidrouracila)				
Amostra	CQB (30 ng/mL)		CQA (400 ng/mL)	
	Recente	EPP	Recente	EPP
1	34.18	32.28	372.37	468.54
2	32.71	35.09	409.76	446.95
3	35.70	35.33	420.95	451.56
Média	34.20	34.23	401.03	455.68
CV%	4.37	4.94	6.34	2.50
Exatidão	113.98	114.11	100.26	113.92
Variação	0.11		13.63	

EPP (5-Clorouracila)		
Amostra	Recente (área)	EPP (área)
2	389.81	415.64
3	414.05	424.49
4	410.13	414.43
5	428.57	403.19
6	380.39	415.74
Média	410.24	417.61
CV%	5.40	2.36
Variação	1.80	

EPP Plasma				
Amostra	Uracila		Diidrouracila	
	Recente	ECCD	Recente	ECCD
1	33.85	34.49	84.29	102.59
2	35.75	28.32	97.08	79.72
3	34.05	31.22	92.89	101.50
Média	34.55	31.34	91.42	94.60
CV%	3.03	9.84	7.13	13.63
Variação	-9.28		3.48	

ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO 51 dias

ELD (Uracila)				
Amostra	CQB (15 ng/mL)		CQA (175 ng/mL)	
	Recente	ELD	Recente	ELD
1	15.26	14.23	178.96	174.12
2	16.56	13.56	180.36	173.69
3	15.98	14.56	177.85	178.23
Média	15.93	14.12	179.06	175.35
CV%	4.09	3.61	0.70	1.43
Exatidão	106.22	94.11	102.32	100.20
Variação	-11.40		-2.07	

ELD (Diidrouracila)				
Amostra	CQB (30 ng/mL)		CQA (400 ng/mL)	
	Recente	ELD	Recente	ELD
1	32.96	34.56	408.56	415.96
2	33.45	36.07	402.36	418.97
3	32.02	32.79	407.23	422.36
Média	32.81	34.47	406.05	419.10
CV%	2.21	4.76	0.80	0.76
Exatidão	109.37	114.91	101.51	104.77
Variação	5.07		3.21	

APÊNDICE F

ARTICLE 1 - A rapid HPLC-ESI-MS/MS method for determination of Dihydrouracil/Uracil ratio in plasma: correlation with toxicity to 5-Fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer

*Manuscript (All Manuscript Text Pages, including Title Page, References and Figure Legends)

[Click here to download Manuscript \(All Manuscript Text Pages, including Title Page, References and Figure Legends\): Article UH2-U1](#)

A RAPID HPLC-ESI-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF DIHYDROURACIL/URACIL RATIO IN PLASMA: EVALUATION OF TOXICITY TO 5-FLUOROURACIL IN GASTROINTESTINAL CANCER PATIENTS

Isabela Costa César^{a*}, Geraldo Felício Cunha-Júnior^b, Ricardo Martins Duarte Byrro^a,
Luiz Gonzaga Coelho^b, Gerson Antônio Pianetti^a

^a Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^b Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Professor Alfredo Balena, 190, CEP 30130-100, Belo Horizonte, MG, Brazil.

* Corresponding author: Isabela Costa César

Corresponding adress: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Tel: +55 31 34096966; *fax:* +55 31 34096976

E-mail address: isaccesar@bol.com.br

Running head: **Determination of dihydrouracil/uracil ratio in plasma**

ABSTRACT

Background: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitation of endogenous Uracil (U) and Dihydrouracil (UH₂) was developed and tested in a Brazilian population of gastrointestinal cancer patients previously exposed to 5-Fluorouracil (5FU).

Methods: The analytes were extracted by a liquid-liquid method using 5-clorouracil as internal standard. The separation was performed on a reversed-phase XTerra C₁₈ column with a mobile phase composed of methanol and aqueous 0.1% ammonium hydroxide (15:85). Mass spectrometry detection was carried out using negative electrospray ionization and Selected Reaction Monitoring. Bovine serum albumin was employed as an alternative matrix to prepare the calibration standards, aiming to avoid the measurement of physiologic U and UH₂. Calibration curves were constructed over the range of 5-200 ng/mL for U and 10-500 ng/mL for UH₂.

Results: The mean R.S.D. values in the intra-run precision were 6.5% and 10.0% and in the inter-run precision were 7.8% and 9.0% for U and UH₂, respectively. The mean accuracy values were within the range of 90% to 110% for both analytes. The analytes were stable in plasma under different conditions of temperature and time. The validated method was successfully applied to determine the plasma concentrations of U and UH₂ in patients with gastrointestinal cancer (n=32) previously treated with 5FU and for whom clinical toxicity was well documented. U concentrations varied from 21.8 to 56.6 ng/mL, while UH₂ concentrations were from 57.7 to 271.5 ng/mL. UH₂/U ratio ranged from 1.56 to 6.18.

Conclusions: The method has proved to provide a quick, reliable and reproducible quantitation of the plasma concentrations of U and its metabolite UH₂. UH₂/U ratios did not discriminate patients previously exposed to 5FU with and without severe toxicities, possibly due to the small sample. Further studies in a larger population are desirable.

Keywords: Uracil; dihydrouracil; HPLC-ESI-MS/MS; 5-fluorouracil toxicity; DPD.

Introduction

The antimetabolic drug 5-Fluorouracil (5FU) was first synthesized in 1957 and remains one of the most important chemotherapeutic drugs, particularly in treatment of colorectal and upper digestive cancer [1,2]. About 30% of patients receiving 5FU experience grade 3-4 toxicity, mainly diarrhea, febrile neutropenia and stomatitis, leading to prolonged and costly hospitalizations, with toxic death rates approaching 1% in many series [3]. Toxicity is more frequent in women and older patients, but it is otherwise unpredictable based on clinical characteristics [4,5]. Although 5FU exerts its antitumoral effect by its anabolic route (inhibition of thymidylate-synthase and incorporation into genomic DNA and RNA), its toxicity is dictated by the rate of catabolic clearance.

Dihydropyrimidine-dehydrogenase (DPD, E1.2.3) is the enzyme responsible for the first and rate-limiting of the 3-step catabolic pathway of pyrimidines and also its fluorinated analogue 5FU [6-7]. Hepatic DPD immediately catabolizes 80-85% of infused drug, leading to a plasma half-life of approximately 15 minutes [8].

Congenital deficiency in DPD activity is the main cause of thymine-uraciluria, a condition with variable clinical expression, causing seizures and mental retardation in roughly half of carriers [9-10]. It also has been implicated as the cause of serious and sometimes lethal 5FU toxicity [11]. This pharmacogenetic syndrome is consistent with an autosomic recessive transmission pattern [12].

An approach based on detection of mutations in the gene encoding DPD, *DPYD*, is hampered by its length, the knowledge of more than 50 different mutations so far and the role of epigenetic determinants of its expression, so that only 50% of severe toxicities to 5FU are explained by current genetic analysis [13-21].

Several ways to clinically determine DPD enzymatic activity *in vivo* have been developed. The most classical technique is a radioenzymatic assay in peripheral mononuclear white blood cells. However, this method requires dealing with radioactive compounds, is time-consuming and labour-intensive, and DPD activity is only weakly correlated to plasma 5FU levels [22-26].

Respiratory test consists of measuring $^{13}\text{CO}_2$ levels in exhaled breath after ingestion of an aqueous solution of 2- ^{13}C -Uracil [27]. Although non-invasive and

capable to evaluate the global catalytic pathway, it requires special equipment and validation by other groups is lacking.

Plasma measurement of uracil (U) and its metabolite dihydrouracil (UH₂) has been considered a surrogate marker of global pyrimidine (and consequently of 5FU) catabolism and correlates well to plasma DPD activity and 5FU levels [28-30]. High-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ultraviolet spectrophotometry is the most described technique [31-36], whereas mass spectrometry was explored in only few works [37-38]. In the last years, liquid chromatography coupled to mass spectrometric detection has almost completely replaced ultraviolet, electrochemical or fluorescence detection in the bioanalytical field, due to its unmatched sensitivity and extraordinary selectivity [39-40]. In addition, its more widespread availability and shortening run times have made this analytical method more feasible in community practice.

The aim of this work was to develop and validate a rapid and simple HPLC-ESI-MS/MS method for determination of dihydrouracil/uracil ratio in human plasma. The obtained results were correlated with the occurrence of toxicity in a population previously exposed to therapeutic doses of 5FU.

Experimental

Chemicals and reagents

Uracil, dihydrouracil, 5-chlorouracil (internal standard - IS) (Fig. 1) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ultra-pure water was obtained from a Millipore system (Bedford, MA, USA). Methanol (HPLC grade) was purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA) and ammonium hydroxide, phosphoric acid, methylene chloride, ethyl acetate and methyl-*t*-butyl ether (analytical grade) were obtained from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Instrumentation and analytical conditions

The HPLC-ESI-MS/MS analyses were carried out on a Waters system (Milford, MA, USA), composed of a 1525μ binary pump, a 2777 sample manager, a TCM/CHM

column oven and a Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer, equipped with an electrospray ion source. MassLynx v.4.1 software was used for data acquisition and analysis (Waters Corporation, Milford, MA, USA). LC separation was performed on a reversed-phase XTerra C₁₈ column (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size) from Waters (Milford, MA, USA), maintained at 40°C. The mobile phase consisted of methanol and aqueous 0.1% ammonium hydroxide pH 10 (15:85), at a flow rate of 0.8 mL/min. The injection volume was 50 µL.

Mass spectrometric detection was performed using an electrospray ion source in the negative ionization mode. Nitrogen was used as both the nebulizing and the desolvation gas, and argon was used as the collision gas (1.8×10^{-3} to 2.0×10^{-3} mbar). The ion source parameters were: capillary 2.5 kV, extractor 2 V, RF lens 0.5 V, source temperature 100°C, desolvation temperature 350°C, U cone 20 V, UH₂ cone 10 V and IS cone 25 V. The multiplier was set at 650 V. The collision energies were optimized at 20 eV for U, 10 eV for UH₂ and 20 eV for IS. Selected reactions monitoring (SRM) were employed for the data acquisition. The SRM transitions were m/z 110.6 → m/z 41.7, m/z 112.6 → m/z 41.7 and m/z 144.6 → m/z 41.7 for U, UH₂ and IS, respectively. The scan dwell time was set at 0.5 s for each channel.

Preparation of standard solutions

BSA aqueous solution (80 mg/mL) was employed as an alternative matrix to prepare the calibration standards, aiming to avoid the measurement of physiologic U and UH₂.

Stock solutions of U, UH₂ and IS were prepared by dissolving the accurately weighed substances with water and methanol (1:1). Working solutions of U and UH₂ were prepared by diluting the stock solutions with the same solvent.

The working solution of 5-chlorouracil (IS) was prepared by diluting the stock solution with methanol to a final concentration of 240 ng/mL. All stock solutions were prepared immediately before the use.

Preparation of calibration and quality control samples

Six calibration samples were prepared by spiking appropriate amounts of the working solutions of U and UH₂ in BSA (80 mg/mL). The concentration of the calibration samples were 5, 25, 50, 100, 150 and 200 ng/mL of U and 10, 50, 100, 200, 350 and 500 of UH₂. Quality control (QC) samples were prepared in a similar way, at low, middle and high concentrations: 15, 75 and 175 ng/mL for U and 30, 180 and 400 ng/mL for UH₂.

Sample preparation

A 50 µL aliquot of the IS solution (240 ng/mL of 5-chlorouracil in methanol) and a 50 µL aliquot of 5% aqueous phosphoric acid were added to 500 µL of BSA or plasma samples. The samples were vortex mixed for 10 s. A 2 mL aliquot of ethyl acetate, methylene chloride and methyl-*t*-butyl ether (4:3:3) was added and vortex mixed for 60 s. Then, the samples were centrifuged at 3500 rpm for 5 min, at 4°C. A 1.6 mL of the organic layer was transferred and evaporated to dryness using an evaporator at 60°C. The dried extract was reconstituted in 100 µL of methanol and water (15:85) and injected into the chromatographic system.

Method validation

The validation process was carried out according to Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, recommended by U.S. Food and Drug Administration [41].

Selectivity of the method was evaluated by assaying six BSA samples before spiking U and UH₂. In addition, plasma samples obtained from six different subjects were assayed aiming to verify possible interferences at IS transition.

Linearity was assessed by six-point calibration curves in BSA in duplicate on 3 consecutive days. The curves were constructed by plotting the peak area ratio of the analytes to the IS versus the concentration of U and UH₂. The concentration range evaluated was 5-200 ng/mL for U and 10-500 ng/mL for UH₂. The curves were evaluated by residuals and fitted by weighted linear regression. The LLOQ was established as the lowest concentration of calibration curve at which precision and

accuracy was within 20%, by means of the analyses of 5 replicates. In addition, the analyte responses at this concentration should be at least 5 times the baseline noise.

To evaluate the precision and accuracy of the method, QC samples in BSA at 3 concentration levels (15, 75 and 175 ng/mL for U and 30, 180 and 400 ng/mL for UH₂) were analyzed in 5 replicates on 3 different days. Intra-run ($n = 5$) and inter-run ($n = 15$) precisions were calculated and expressed as relative standard deviation (RSD%).

The extraction recovery was determined by comparing the peak areas obtained from the extracted samples in BSA with those of direct injected standards, at the same concentrations. It was evaluated by analyzing five replicates, at the three QC concentrations. The recovery of IS was also determined, in both BSA and plasma samples, at the working concentration.

The matrix effect was evaluated to verify whether the potential ion suppression or enhancement due to the co-elution matrix components existed in the analysis. The peak areas of the analytes from the spike-after-extraction samples were compared with those of the standard solutions in the mobile phase, at the same concentrations. U and UH₂ experiments were performed using BSA ($n = 6$) and the matrix effect of IS was determined in normal plasma samples obtained from six different subjects. This experiment was carried out at low and high QC concentrations of U and UH₂ and working concentration of IS.

Stability study in plasma

The stability of U and UH₂ was investigated in plasma samples. Two plasma samples freshly collected were adopted as reference and the stability of the analytes was evaluated under a variety of storage and handling conditions, in 5 replicates. Freeze-thaw stability was evaluated after 3 complete freeze/thaw cycles (-70 to 23°C) on consecutive days. Short-term temperature stability was assessed by analyzing samples that were kept at ambient temperature (23°C) for 6 h. Long term stability was performed at plasma samples stored at -20°C, for 51 days. To evaluate the post-preparative stability, QC samples were extracted and kept in the autosampler (8°C) for 20 h before the injection. The analytes were considered stable when 85-115% of the initial concentrations were found.

Application to a group of cancer patients

Thirty-two patients previously diagnosed with gastrointestinal cancer were selected based upon previous exposure to 5FU and precise knowledge of toxicities as described in clinical files according to Common Toxicity Criteria Adverse Events (CTCAE) version 3.0 [42]. Patients were referred from many oncology institutions around the state through collaboration with clinical oncologists who had to fill a case report file. Clinical characteristics were summarized in Table 1. Twelve patients had grade 3-4 toxicity after first and/or second cycle. The most common toxicities were diarrhea in 9/12 (75%), stomatitis in 10/12 (83%) and febrile neutropenia in 10/12 (83%). Twenty patients with similar clinical characteristics and cancer treatments had toxicities grade ≤ 1 and served as controls. At the time of recruitment, all patients were fully recovered from toxicities and had an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance-status of 0-1 and normal renal, hepatic and hematologic tests. For those still being treated for their malignancy, an interval of at least 2 weeks free of any chemotherapy was required. The protocol was approved by Universidade Federal de Minas Gerais in Brazil and informed consent was obtained from each volunteer.

After a 8 h-fasting period, and between 8-9 a.m. to avoid variations related to circadian pattern of DPD activity [22], a 5 mL blood sample was drawn from a peripheral vein into a heparinized tube and immediately centrifuged at room temperature at 9000 rpm for 10 min. Plasma was then frozen at -20°C until analysis, which was done 1-28 days later, since it was shown that plasma storage at -20°C for 2 months or at -30°C for 6 months did not modify U and UH_2 recuperation [31,38].

Results and discussion

Conditions for HPLC-ESI-MS/MS

In order to develop a method with high sensitivity and selectivity, liquid chromatography with tandem mass spectrometry was selected for the quantitation of U and UH_2 in plasma. Previous works about U and UH_2 quantitation in plasma by HPLC-MS/MS reported electrospray ionization in either positive [37] or negative [38] mode. We have evaluated the ionization in both modes and although the positive ion mode

provided higher signal intensities for U and UH₂, significant interferences from endogenous matrix compounds were observed. On the other hand, electrospray ionization in negative mode provided clean chromatograms, with high selectivity and absence of matrix effects. [M-H]⁻ was the predominant ion in the Q1 spectrum for both analytes and IS, and was used as the precursor to obtain product ion spectra. The most sensitive and selective mass transitions were m/z 110.6 $\rightarrow$ m/z 41.7, m/z 112.6 $\rightarrow$ m/z 41.7 and m/z 144.6 $\rightarrow$ m/z 41.7 to U, UH₂ and IS, respectively, obtained after the optimization of collision energy. Figure 2 illustrates the product ion mass spectra of U and UH₂.

The addition of ammonium hydroxide in the mobile phase was important to improve the signal intensities in negative ion mode. In view of employing an aqueous solution containing 0.1% ammonium hydroxide (pH 10) in mobile phase, the use of a chromatographic column with high pH resistance was essential. A reversed-phase XTerra C₁₈ column proved to be adequate for the analysis, providing excellent peak symmetry and short run time. The other HPLC conditions were optimized so that the retention time was kept at 5.0 min. Hence, the developed method exhibits a major advantage compared with most of the assays for U and UH₂ in plasma [31-33,35,37], when considering its short run time. The retention times of U, UH₂ and IS were 2.7 min, 4.1 min and 2.5 min, respectively (Fig. 3). The short run time and additional advantages such as the low solvent consumption and low cost analysis clearly allow the application of the method to high-throughput assays.

Method validation

In order to evaluate the suitability of the use of BSA as an alternative matrix for the plasma, calibration curves were constructed using 5, 50, 100 and 200 ng/mL of U and 10, 100, 300 and 500 ng/mL of UH₂, in both BSA and plasma matrices. The samples were extracted according to described procedure in *Sample preparation*. The linear slopes of the curves in BSA (4.80×10^{-3} for U and 1.51×10^{-3} for UH₂) and plasma (4.20×10^{-3} for U and 1.27×10^{-3} for UH₂), obtained plotting the peak area ratio of the analytes to the IS versus the concentration of U and UH₂, showed no statistical difference in two matrices ($p > 0.05$). The recovery rates of U, UH₂ and IS in BSA

(37.3%, 35.3% and 51.7%, respectively), were slightly higher than those found in plasma (33.3%, 30.8% and 48.1%, respectively). However, using the peak area ratio of analyte/IS, the same relation and slope were obtained in both BSA and plasma samples. Hence, BSA at 80 mg/mL showed to be a reliable alternative matrix for preparing the standard curves and quality control samples for U and UH₂ quantitation. Similar results were obtained by Jiang *et al.* [30] and Deporte *et al.* [32], who also employed BSA for the determination of U and UH₂ in plasma.

The selectivity study confirmed that no interfering peaks were found at the retention time of either U or UH₂ in BSA samples, nor there were significant interferences from endogenous plasma compounds at the retention time of IS.

The calibration curves were shown to be linear over the range of 5-200 ng/mL for U and 10-500 ng/mL for UH₂. A weighted (1/x) linear regression model provided regression coefficients higher than 0.99 for both analytes. Typical standard curves were $y = 6.13 \times 10^{-3} x + 38.87 \times 10^{-3}$ and $y = 2.21 \times 10^{-3} x + 3.53 \times 10^{-3}$ for U and UH₂, respectively. All back-calculated standard concentrations were within 15% deviation from the nominal value, except at the LLOQ, for which the maximum acceptable deviation was set at 20%. The residuals had no tendency of variation with concentration. The obtained LLOQ were 5 ng/mL and 10 ng/mL for U and UH₂, respectively.

The intra-run and inter-run precision and accuracy were calculated by analyzing five replicates of QC samples at three concentration levels, in three different days. The obtained data are shown in Table 2. The mean RSD values for the intra-run precision were 6.5% and 10.0% and in the inter-run precision were 7.8% and 9.0% for U and UH₂, respectively. The mean accuracy values were 98.7% and 100.7% for U and UH₂, respectively. These data indicated reproducible results, and that the assay was accurate and reliable. The mean recovery rates of U and UH₂ ($n = 15$), determined at 3 concentrations, were 37.3% and 35.3%, respectively. The recovery of the IS was shown to be 51.7% ($n = 15$). The hydrophilicity of the analytes may explain the relatively low recovery rates obtained by liquid-liquid extraction; however, the analytes signal showed to be adequate to quantify U and UH₂ with the good sensitivity required for the assay.

The matrix effect was evaluated by comparing the mean peak areas of U and UH₂ from the spike-after-extraction samples in BSA with those of the standard solutions in the mobile phase. In a similar way, matrix effect for IS was also evaluated in plasma samples. The observed variation did not exceed the range 85-115%, so that in the present method, the matrix effects for the analytes in BSA and IS in plasma were not significant.

Stability study in plasma

In the stability studies performed in plasma, there was no significant difference between the analyte responses at time zero and after 6 h at room temperature (23°C), indicating adequate short-term stability for U and UH₂. Moreover, the analytes were found to be stable for 20 h in the autosampler, at 8°C. QC samples stored at -20°C were analyzed after 51 days and there were no significant deviation with respect to the immediately assayed samples. Both U and UH₂ were stable in plasma after 3 complete freeze/thaw cycles on consecutive days, as the mean changes in analyte content were within $\pm 15\%$ of initial concentration. The stability results are shown in Table 3.

Results in the population of cancer patients

The validated method was successfully applied to determine the plasma concentrations of U and UH₂ in patients with gastrointestinal cancer ($n = 32$) previously treated with 5FU and for whom clinical toxicity was well documented. Statistics were calculated using Minitab statistical software (Minitab Inc., USA) version 16.

UH₂/U ratios showed a normal distribution (p -value > 0.10 , Ray-Joiner test), ranging from 1.56 to 6.18 (mean = 3.932; standard deviation = 1.103). U and UH₂ did not fit a normal distribution (data not shown). Mean UH₂/U ratio was 4.15 for patients with none or mild previous toxicity and 3.58 for patients with previous severe toxicity. This difference didn't reach statistical significance ($p = 0.148$) (Table 4). The wide distribution of UH₂/U ratios among patients with and without toxicity precluded the determination of cut-off values.

To test the method for repeatability, a new blood sample was drawn from 7 volunteers 3 months apart from first exam. Results were compared as reported by Bland and Altman [43]; coefficient of repeatability for UH_2/U was low (0.91) and the mean difference was 0.08, which is considered acceptable for clinical purposes. The maximal difference between two paired samples for UH_2/U was 0.67. Application of paired *t*-test for differences between results from the same patient showed confidence intervals at 95% for mean difference (-0.369, 0.523), with a *p*-value of 0.687, corroborating the hypothesis that differences are not significant.

Discussion

Patients with known DPD-deficiency have markedly high plasma levels of U [11-12]. Nonetheless, U concentration is influenced by other factors, including diet, which may preclude identification of subtle yet clinically significant variations in DPD activity [44]. In fact, DPD activity and 5FU clearance were found to be poorly correlated to plasma uracil concentrations [22]. Determining U and its direct metabolite, UH_2 , could lead to an indirect although more accurate estimative of global pyrimidine catabolism. In the case of DPD deficiency, low levels of UH_2 and high accumulated levels of U would translate in a lower UH_2/U ratio [28-30].

In most studies of unselected or cancer population, UH_2/U ratios have a Gaussian distribution [28,33,38]. This could be demonstrated in our study with gastrointestinal cancer patients.

Studies from different countries have demonstrated high variability for UH_2/U mean values and range. This may reflect differences related to ethnic and dietary issues as well as differences in methodology used for quantitation [28,40]. Nonetheless, our results are similar to the described by Gamelin, Jiang and Zhou [29,30,34].

It has been advocated that a cut-off point of 70% of mean DPD activity in a reference population could identify 90% of patients prone to toxicity [45-46]. However, for UH_2/U ratio, this threshold ranges from 1.8 to 4.0 in different studies, with sensitivity of 70-87% [29,36]. We were not able to define a cut-off point with good

sensitivity and specificity. A larger cohort of healthy Brazilians should be tested in order to determine reference values in this population.

It is clear that causes other than DPD deficiency can predispose to 5FU toxicity; these may include impaired liver function [47], altered nutritional status [48-49] and mutation in other enzymes of pyrimidine metabolism downstream of DPD [50-52]. Indeed, in many series DPD deficiency could be demonstrated in only 30-60% of patients with severe toxicity to 5FU by different methods [18,21,53]. This fact, along with the low number of patients, may explain why UH_2/U levels did not discriminate individuals with and without severe toxicities in this study. Furthermore, a limitation of a retrospective study such as ours is the lack of samples from patients who have had grade V toxicity (death), who would presumably be the more deeply DPD-deficient ones. Also, we did not have any patient with neurological toxicity, which is thought to be frequently present in profound DPD deficiency.

Conclusion

A rapid and simple HPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantitation in plasma of U and its metabolite UH_2 was developed and fully validated. Considering the short run time, the developed method may be successfully applied to high-throughput assays, besides provide simple sample processing technique and high sensitivity and selectivity guaranteed by the MS/MS detection. The UH_2/U ratio determined in 32 oncologic patients did not correlate with previous clinical toxicity to 5FU chemotherapy. Larger number of patients is necessary to better evaluate this relationship, as well as determination of UH_2/U distribution in the healthy Brazilian population in order to determine cut-off values that could be applied prospectively to identify patients at risk of toxicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

(FAPEMIG), for financial support. We also thank to Prof. Maria de Lourdes Moreira Fernandes for statistical support.

REFERENCES

- (1) Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs*. 2000;18:299-313.
- (2) Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:330-338.
- (3) 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;16:3537-3541.
- (4) Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, et al. Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:1491-1498.
- (5) Chansky K, Benedetti J, Macdonald JS. Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer*. 2005;103:1165-1171.
- (6) Canellakis ES. Pyrimidine metabolism. I. Enzymatic pathways of uracil and thymine degradation. *J Biol Chem*. 1956;221:315-322.
- (7) Lu ZH, Zhang R, Diasio RB. Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver. *J Biol Chem*. 1992;267:17102-17109.
- (8) Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, et al. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res*. 1987;47:2203-2206.
- (9) Berger R, Stoker-de Vries SA, Wadman SK, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency leading to thymine-uraciluria: an inborn error of pyrimidine metabolism. *Clin Chim Acta*. 1984;141:227-234.
- (10) van Gennip AH, Abeling NG, Vreken P, et al. Inborn errors of pyrimidine degradation: clinical, biochemical and molecular aspects. *J Inherit Metab Dis*. 1997;20:203-213.

- (11) Tuchman M, Stoeckeler JS, Kiang DT, et al. Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *N Engl J Med*. 1985;313:245-249.
- (12) Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest*. 1988;81:47-51.
- (13) Yokota H, Fernandez-Salguero P, Furuya H, et al. cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, an enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J Biol Chem*. 1994;269:23192-23196.
- (14) Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, et al. Structural organization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Cancer Res*. 1997;57:1660-1663.
- (15) Wei X, Elizondo G, Sapone A, et al. Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics*. 1998;51:391-400.
- (16) van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer*. 2004;40:939-590.
- (17) Collie-Duguid ES, Johnston SJ, Powrie RH, et al. Cloning and initial characterization of the human DPYD gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;271:28-35.
- (18) Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, et al. Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics*. 2000;10:217-223.
- (19) Noguchi T, Tanimoto K, Shimokuni T, et al. Aberrant methylation of DPYD promoter, DPYD expression, and cellular sensitivity to 5-fluorouracil in cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7100-7107.
- (20) van Kuilenburg AB, Meijer J, Mul AN, et al. Intragenic deletions and a deep intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene as novel mechanisms causing 5-fluorouracil toxicity. *Hum Genet*. 2010;128:529-538.
- (21) Ciccolini J, Gross E, Dahan L, et al. Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin Colorectal Cancer*. 2010;9:224-228.

- (22) Harris BE, Song R, Soong SJ, et al. Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res.* 1990;50:197-201.
- (23) Fleming RA, Milano G, Thyss A, et al. Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res.* 1992;52:2899-2902.
- (24) Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res.* 1993;53:5433-5438.
- (25) Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, et al. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol.* 1994;12:2248-2253.
- (26) Van Kuilenburg AB, van Lenthe H, Blom MJ, et al. Profound variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human blood cells: major implications for the detection of partly deficient patients. *Br J Cancer.* 1999;79:620-626.
- (27) Mattison LK, Ezzeldin H, Carpenter M, et al. Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency by using a novel 2-¹³C-uracil breath test. *Clin Cancer Res.* 2004;10:2652-2658.
- (28) Gamelin E, Boisdron-Celle M, Larra F, et al. A simple chromatographic method for the analysis of pyrimidines and their dehydrogenated metabolites. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 1997;20:3155-3172.
- (29) Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, et al. Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol.* 1999;17:1105-1110.

- (30) Jiang H, Lu J, Ji J. Circadian rhythm of dihydrouracil/uracil ratios in biological fluids: a potential biomarker for dihydropyrimidine dehydrogenase levels. *Br J Pharmacol*. 2004;141:616-623.
- (31) Garg MB, Sevester JC, Sakoff JA, et al. Simple liquid chromatographic method for the determination of uracil and dihydrouracil plasma levels: a potential pretreatment predictor of 5-fluorouracil toxicity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;774:223-230.
- (32) Déporte R, Amiand M, Moreau A, et al. High-performance liquid chromatographic assay with UV detection for measurement of dihydrouracil/uracil ratio in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006;834:170-177.
- (33) Ciccolini J, Mercier C, Evrard A, et al. A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. *Ther Drug Monit*. 2006;28:678-685.
- (34) Zhou ZW, Wang GQ, Wan S, et al. The dihydrouracil/uracil ratios in plasma and toxicities of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. *Chemotherapy*. 2007;53:127-131.
- (35) Ben Fredj R, Gross E, Ben Ahmed S, et al. The dihydrouracil/uracil ratio in plasma, clinical and genetic analysis for screening of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57:470-476.
- (36) Kristensen MH, Pedersen P, Mejer J. The value of dihydrouracil/uracil plasma ratios in predicting 5-fluorouracil-related toxicity in colorectal cancer patients. *J Int Med Res*. 2010;38:1313-1323.
- (37) Svobaite R, Solassol I, Pinguet F, et al. HPLC with UV or mass spectrometric detection for quantifying endogenous uracil and dihydrouracil in human plasma. *Clin Chem*. 2008;54:1463-1472.
- (38) Jiang H, Jiang J, Hu P, et al. Measurement of endogenous uracil and dihydrouracil in plasma and urine of normal subjects by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;769:169-176.
- (39) Hopfgartner G, Bourgogne E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2003;22:195-214.

- (40) Zhou S, Song Q, Tang Y, et al. Critical review of development, validation and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. *Current pharmaceutical analysis*. 2005;1:3-14.
- (41) Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research; 2001.
- (42) Cancer Therapy Evaluation Program. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*, Version 3.0, DCTD, NCI, NIH, DHHS. [National Cancer Institute web site]. August 9, 2006. Available at: http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf. Accessed June 15th, 2011.
- (43) Altman DG, Bland JM. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician*, 1983;32:307-317.
- (44) Heaf DJ, Davies JI. The effect of RNA supplementation of rat diets on the composition of body fluids. *Br J Nutr*. 1976;36:381-402.
- (45) Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer*. 1999;79:627-630.
- (46) Van Kuilenburg AB, Van Lenthe H, Van Gennip AH. Radiochemical assay for determination of dihydropyrimidinase activity using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;729:307-314.
- (47) Floyd RA, Hornbeck CL, Byfield JE, et al. Clearance of continuously infused 5-fluorouracil in adults having lung or gastrointestinal carcinoma with or without hepatic metastases. *Drug Intell Clin Pharm*. 1982;16:665-667.
- (48) Davis LE, Lenkinski RE, Shinkwin MA, et al. The effect of dietary protein depletion on hepatic 5-fluorouracil metabolism. *Cancer*. 1993;72:3715-3722.
- (49) Christensen ML. The effect of dietary protein depletion on hepatic 5-fluorouracil metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1995;19:88-89.
- (50) Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, et al. Genetic regulation of beta-ureidopropionase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18:25-35.

- (51) Pullarkat ST, Stoecklacher J, Ghaderi V, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J*. 2001;1:65-70.
- (52) Ichikawa W, Takahashi T, Suto K, et al. Orotate phosphoribosyltransferase gene polymorphism predicts toxicity in patients treated with bolus 5-fluorouracil regimen. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3928-3934.
- (53) McLeod HL, Sludden J, Hardy SC, et al. Autoregulation of 5-fluorouracil metabolism. *Eur J Cancer*. 1998;34:1623-1627.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Chemical structures of uracil (U), dihydrouracil (UH₂) and 5-chlorouracil, the internal standard (IS).

Figure 2: Product ion mass spectra of uracil (U) and dihydrouracil (UH₂), obtained by electrospray ionization in negative ion mode.

Figure 3: SRM chromatograms of (A) BSA spiked with uracil (U), dihydrouracil (UH₂) and IS at LLOQ (B) plasma of patient n° 20. Retention times: 2.7 min (U), 4.1 min (UH₂) and 2.5 min (IS).

Table 1

Table 1: Characteristics of the 32 patients included in the study.

	Characteristics	Grade 0-1 toxicity* (n = 20)	Grade 3-4 toxicity* (n = 12)
Age (years)	Mean	59.5	60.4
	Median	59.5	57.5
	Range	37-81	46-89
		<i>p</i> -value = 0.835 ^a	
Gender (n, %)	Males	7 (35%)	4 (33%)
	Females	13 (65%)	8 (67%)
		<i>p</i> -value = 0.923 ^b	
Ethnicity (n, %)	Caucasian	9 (45%)	8 (67%)
	Non-Caucasian	11 (55%)	4 (33%)
		<i>p</i> -value = 0.234 ^b	
Type of cancer (n, %)	Colorectum	17 (85%)	12 (100%)
	Other	3 (15%)	0 (0%)
		<i>p</i> -value = 0.159 ^b	
Chemotherapy type (n, %)	Bolus 5FU, multi-day ^c	13 (65%)	12 (100%)
	Other (FOLFOX ^f /Al-Sarraf ^g)	7 (35%)	0 (0%)
		<i>p</i> -value = 0.068 ^b	
Treatment setting (n, %)	Neoadjuvant	4 (20%)	3 (25%)
	Adjuvant	15 (75%)	9 (75%)
	Palliative	1 (5%)	0 (0%)
		<i>p</i> -value = 1.000 ^b	
Concurrent radiotherapy (n, %)	Yes	5 (25%)	4 (33%)
	No	15 (75%)	8 (66%)
		<i>p</i> -value = 0.612 ^b	

*According to Common Toxicity Criteria Adverse Events (CTCAE) v 3.0 (Ref. 42).

^a "t" test.

^b "χ²" test.

^c All patients are Afro-Brazilians or mixed race; there were no Indians or Asiatics.

^d Other: Esophagus or Anal Canal.

^e Bolus 5FU, multi-day: 350-425mg/m² for 4-5 consecutive days each 4 weeks.

^f FOLFOX: Oxaliplatin 80mg/m² day 1 + Folinic Acid 400mg/m² day 1 + 5FU 400mg/m² bolus day 1 + 5FU 2400mg/m² in 46h (continuous infusion).

^g Al-Sarraf: Cisplatin 70-100mg/m² D1 + 5FU 3000-4000mg/m² in 96h (continuous infusion).

Table

Table 2: Precision and accuracy data for uracil and dihydrouracil by HPLC-ESI-MS/MS.

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Intra-run (<i>n</i> = 5)			Inter-run (<i>n</i> = 15)		
		Measured concentration (mean ± S.D.)	R.S.D. (%)	Accuracy (%)	Measured concentration (mean ± S.D.)	R.S.D. (%)	Accuracy (%)
Uracil	15	14.3 ± 1.5	10.4	95.3	14.7 ± 1.6	10.9	98.0
	75	76.3 ± 4.5	5.9	101.7	74.2 ± 5.8	7.8	98.9
	175	178.9 ± 5.5	3.1	102.2	173.6 ± 8.0	4.6	99.2
Dihydrouracil	30	32.0 ± 2.7	8.4	106.6	31.9 ± 2.7	8.5	106.3
	180	183.2 ± 21.5	11.7	101.8	181.5 ± 17.2	9.5	100.8
	400	400.9 ± 39.6	9.9	100.2	380.4 ± 34.2	9.0	95.1

R.S.D. = Relative standard deviation.

S.D. = Standard deviation.

Table

Table 3: Stability data for uracil and dihydrouracil in plasma ($n = 5$).

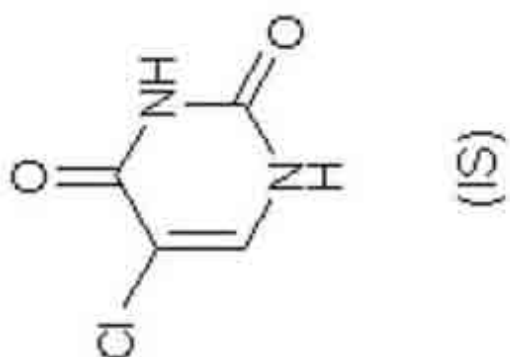
Conditions	% of Uracil initial concentration	% of Dihydrouracil initial concentration
6 h at 23°C	91.3	99.5
20 h in autosampler (8°C)	90.7	103.5
51 days at -70°C	97.9	103.2
after 3 freeze/thaw cycles	104.6	90.8

Table 4

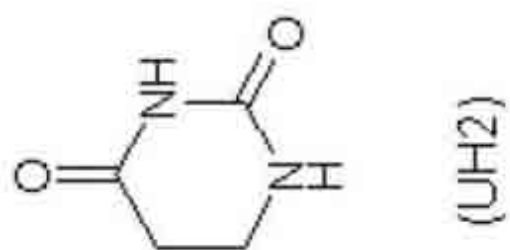
Table 4: UH₂, U and UH₂/U ratio according to toxicity.

Variables		Grade 0-1 toxicity* (n = 20)	Grade 3-4 toxicity* (n = 12)
UH ₂ (ng/mL)	Mean	141.8	112.7
	Median	128.8	108.2
	Range	81.2 - 271.4	57.7 - 176.9
<i>p</i> -value =0.083 ^a			
U (ng/mL)	Mean	35.4	32.7
	Median	36.6	33.8
	Range	21.5 - 65.9	20.4 - 58.2
<i>p</i> -value =0.521 ^a			
UH ₂ /U ratio	Mean	4.15	3.58
	Median	4.11	3.54
	Range	2.55 - 6.18	1.56 - 5.11
<i>p</i> -value =0.148 ^b			

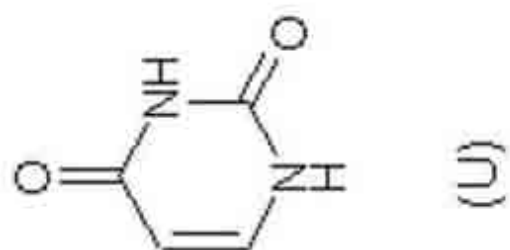
*According to Common Toxicity Criteria Adverse Events (CTCAE) v 3.0 (Ref. 42); ^a Mann-Whitney Test; ^b "t" Test;



(S)



(UH2)



(U)

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 2
[Click here to download Figure: Fig 2.ppt](#)

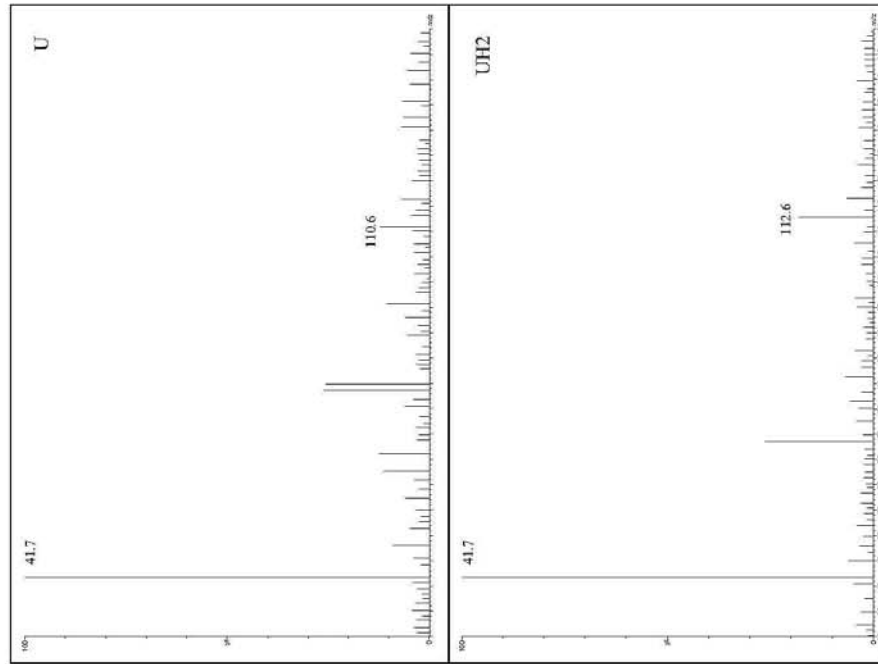
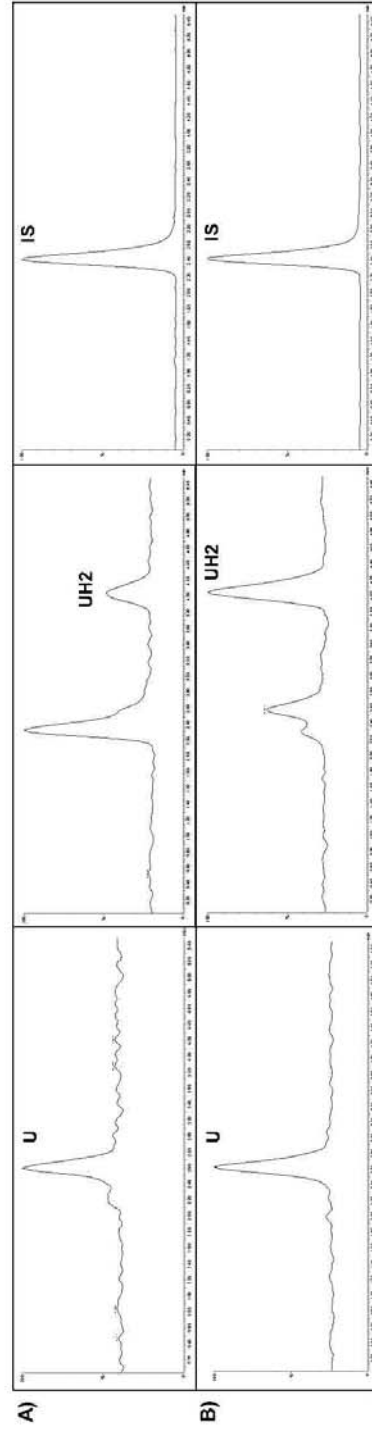


Figure
[Click here to download Figure: Fig 3 reviewed.doc](#)



APÊNDICE G
**ARTICLE 2 - ^{13}C -Uracil breath test to predict 5-Fluorouracil toxicity in
gastrointestinal cancer patients**

**^{13}C -URACIL BREATH TEST TO PREDICT 5-FLUOROURACIL
TOXICITY IN GASTROINTESTINAL CANCER PATIENTS**

Geraldo Felício Cunha-Júnior^{1*}, Luiz Armando de Marco², Luciana Bastos-Rodrigues²,
Marina Borges Bolina², Flávia Linhares¹, Gerson Antônio Pianetti³, Isabela Costa César³,
Luiz Gonzaga Coelho^{1*}

¹ Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Professor Alfredo Balena, 110, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil. ² Laboratório de Genética Molecular, Faculdade de Medicina da Federal de Minas Gerais. Av. Professor Alfredo Balena, 110, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil. ³ Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

* Correspondence: G.F. Cunha-Júnior; email: geraldo.onco@gmail.com or L.G. Coelho; email: lcoelho@gold.com.br. Tel: +55 31 3409 9403; fax: +55 31 3409-3406.

ABSTRACT

BACKGROUND: Up to 30% of patients undergoing 5-Fluorouracil (5FU)-based chemotherapy experience severe toxicity. Dihydropyrimidine-dehydrogenase (DPD) deficiency explains 36-61% of cases. Predicting toxicity is an unmet challenge. Uracil breath test (UraBT) consists of measuring $^{13}\text{CO}_2$ in exhaled breath after ingestion of 2- ^{13}C -uracil to evaluate pyrimidine (and 5FU) catabolism.

METHODS: We studied 33 gastrointestinal cancer patients previously exposed to 5FU: thirteen had grade 3-4 and 20, grade 0-1 toxicity. Tests used to evaluate pyrimidine catabolism: (1) sequencing of three exons of *DPYD*; (2) plasma dihydrouracil/uracil ratio (UH_2/U); (3) UraBT. We tested the performance of UraBT to discriminate patients who had grade 0-1 toxicity *versus* grade 3-4 toxicity and patients with and without proven DPD-deficiency.

RESULTS: 4/13 grade 3-4 toxicity patients proved to be DPD-deficient: three had deleterious mutations (IVS14+1G>A in one; SNP 2846A>T in two), and one had low UH_2/U ratio. Mean delta over baseline in 50 minutes (DOB_{50}) significantly differed between groups. $\text{DOB}_{50} \leq 161.4$ discriminated individuals with grade 3-4 *versus* grade 0-1 toxicity (sensitivity= 61.5%; specificity= 85%) and DPD-deficient *versus* non DPD-deficient (sensitivity= 75%; specificity= 85%).

CONCLUSION: UraBT has moderate accuracy in discriminating individuals who manifested severe toxicity from those who had mild or no toxicity to 5FU.

Keywords: Breath test, ^{13}C -Uracil, UH_2/U , DPD deficiency, 5-Fluorouracil toxicity.

INTRODUCTION

5-Fluorouracil (5FU) is the backbone of treatment of most gastrointestinal cancers. Up to 31% of patients receiving multiple-day bolus doses and 5-10% of those treated with continuous infusion experience severe toxicities, mainly neutropenia, stomatitis, diarrhea and, less commonly, neurotoxicity (Meta-Analysis Group In Cancer, 1998). The consequences are costly and prolonged hospitalizations and even death. Although elderly, women and African-American are particularly prone to side effects (Stein *et al*, 1995; Mattison *et al*, 2006a), there are no other reliable clinical predictors of toxicity.

Dihydropyrimidine-dehydrogenase (DPD) is the first and rate-limiting enzyme in catabolism of pyrimidines and also 5FU (Diasio and Harris, 1989). More than 80% of infused 5FU is rapidly catabolized by DPD (Woodcock *et al*, 1980), with mean plasma half-life of 13 minutes (Heggie *et al*, 1987). Pharmacological competitive inhibitors of this enzyme increase blood levels and toxicity of 5FU (Diasio, 1998). A relationship between DPD deficiency and severe toxicity to 5FU is well characterized (Tuchman *et al*, 1985). Family studies suggest an autosomal recessive pattern of inheritance for DPD deficiency (Diasio *et al*, 1988; Harris *et al*, 1991; Meinsma *et al*, 1995). The frequency of partially deficient (heterozygous) is 3% and homozygous-deficient subjects account for 0.1% of general population (Lu *et al*, 1993; Lu *et al*, 1995; Etienne *et al*, 1994).

Taking into account the high number of patients treated with 5FU worldwide and the clinically unpredictable toxicity, screening patients for DPD deficiency previously to treatment is warranted (van Kuilenburg *et al*, 2004).

Genotyping DPD gene, *DPYD*, seems appealing since its structure is well characterized (Wei *et al*, 1998) and at least 40 deleterious mutations have been described (Ciccolini *et al*, 2010). However, sequencing of the coding part of *DPYD* can only predict about 10-40% of cases of severe toxicity to 5FU (Collie-Duguid *et al*, 2000; Amstutz *et al*, 2011), probably due to interplay of epigenetic factors, deep intronic mutations or mutations in enzymes downstream DPD.

The most classical method of measuring DPD activity is a radioenzymatic assay in peripheral mononuclear blood cells (Fleming *et al*, 1992), which detects DPD deficiency in 36-61% of individuals suffering from severe 5FU toxicity (Lu *et al*, 1993; Milano *et al*, 1999; van Kuilenburg *et al*, 2002a). However, it is time-consuming, labor-intensive and requires dealing with radioactive material. Determination of plasma levels of uracil (U) and its metabolite dihydrouracil (UH₂) by high-performance liquid chromatography (HPLC) provides an indirect measurement of DPD activity. A low UH₂/U ratio indicates low DPD activity, and predicts high 5FU plasma levels (Gamelin *et al*, 1999) and severe toxicity (Kristensen *et al*, 2010). Its main drawbacks are the need of expensive laboratory facilities and that (like radioassay) it only tests DPD activity.

More recently, Mattison *et al* (2004) and Mattison *et al* (2006a, 2006b) developed a non-invasive, easy to perform breath test which exploits the difference in 2-¹³C-uracil catabolism between normal and catalytic-deficient individuals. Its principle is based on measurement of ¹³CO₂ in exhaled breath after ingestion of a defined amount of ¹³C-Uracil (UraBT). Since CO₂ is one of the final metabolites of pyrimidine catabolism (Fig. 1), its availability in breath reflects the rate of catabolism of uracil (and consequently 5FU) by the whole pyrimidine catalytic pathway. This test did

discriminate individuals with previously proven DPD deficiency from healthy controls, with sensitivity of 100% and specificity of 96%. However, in clinical practice predicting toxicity is more relevant than discriminating DPD-deficient from non DPD-deficient patients.

Our main objective was to test the accuracy of UraBT in discriminating gastrointestinal cancer patients who had suffered grade 3-4 toxicity after exposure to 5FU from controls with grade 0-1 toxicity. Our secondary objectives were: (1) to test patients for DPD deficiency through genetic sequencing and UH₂/U ratios in order to prove DPD deficiency and then evaluate UraBT to discriminate individuals with DPD-deficiency from those without DPD-deficiency; (2) to test repeatability of UraBT; (3) to test integrity of bag in retaining ¹³C after storage at room temperature for 14 days.

PATIENTS AND METHODS

Selection and recruitment of patients

We collaborated with regional oncology institutions in Minas Gerais State, Brazil, to recruit patients with gastrointestinal cancer previously treated with 5FU and for whom clinical toxicity was well documented according to CTCAE version 3.0. Before referral procedure, medical oncologists fulfilled case report forms with demographics, histopathological data, stage, chemotherapy regimens and toxicities. Those were sent to the investigators who did preliminar evaluation. Inclusion criteria were previous (fully recovered) grade 3-4 toxicity attributable to 5FU or grade 0-1 toxicity after 5FU exposure, performance-status of 0-1, capacity to take oral fluids, normal haematological and biochemical tests and last chemotherapy at least two weeks

before. Exclusion criteria were concomitant use of irinotecan, previous gastrectomy, moderate to severe COPD, liver insufficiency and active infection. The protocol was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Informed consent was obtained from all volunteers before participating in study.

Study procedures

After a 8 h-fasting period, and between 8:00-9:00AM to avoid circadian variations of DPD activity (Harris *et al*, 1990), two aliquots of 5 mL of blood were drawn from a peripheral vein into heparinized tubes and immediately centrifuged at room temperature at 9.000 rpm for 10 min. Plasma was then frozen at -20°C until analysis for UH₂ and U, which was done 1-28 days later (Gamelin *et al*, 1999). Another 5mL of blood was collected in an EDTA-coated tube and served for DNA extraction. Then, patients' height and weight were measured and breath test started.

Determination of UH₂/U ratios

Liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) was employed for the quantitation of U and UH₂ in plasma. Analyses were carried out on a Waters system (Milford, MA, USA), composed of a 1525µ binary pump, a 2777 sample manager, a TCM/CHM column oven and a Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer. LC separation was performed on a reversed-phase XTerra C₁₈ column (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size) from Waters (Milford, MA, USA), maintained at 40°C. The mobile phase consisted of methanol and aqueous 0.1% ammonium hydroxide pH 10 (15:85), at a flow rate of 0.8 mL/min. The injection volume was 50 µL. The analytes were extracted by a liquid-liquid method, using 5-chlorouracil as internal

standard (IS). Mass spectrometric detection was performed using an electrospray ion source in the negative ionization mode. The mass transitions employed were m/z 110.6 $\rightarrow$ m/z 41.7, m/z 112.6 $\rightarrow$ m/z 41.7 and m/z 144.6 $\rightarrow$ m/z 41.7 to U, UH₂ and IS, respectively. Calibration standards were prepared in bovine serum albumin aqueous solution (80 mg/ml). The dynamic linear ranges were 5-200 ng/ml and 10-500 ng/ml for U and UH₂, respectively. Cut-off points for DPD-deficiency were established as mean minus two standard deviations (assuming normal distribution).

Genetic testing for *DPYD*

DNA was isolated from blood samples by high salt method (Lahiri and Nurnberger, 1991). DNA of the hot spot region in exons 13, 14 and 22 from all patients was amplified by PCR. Primers used were: Exon 13 (5'-GGACAATTTAGATGTAATATGAAACCA-3', 5'-AATGTGTAATGATAGGTCTTGCAAA-3'), Exon 14 (5'-GTGAGAAGGACCTCATAAAATATTGTC-3', 5'-GAATTGGATGTTTAAATAAACATTACCAAC-3'), Exon 22 (5'-TGAGCTTGCTAAGTAATTCAGTGG-3', 5'-CAGAAAATGCTTCTGCCGTA-3'). PCR protocol was performed in a 25 μ l final volume of the following: 1 X PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 40 mM NaCl, Triton X-100 0.1%, 1.5 mM MgCl₂), 500 μ M dNTPs, 1.0 U of Taq DNA polymerase, 20 ng of genomic DNA, 0.4 μ M of each forward and reverse primer. A direct sequencing was performed twice with different PCR products on automated DNA sequencer (ABI 3130 Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences were analyzed by *Sequencher 4.9* software.

¹³C-Uracil breath test

Between 8:30-9:00AM, all participants breath into a 1.3-liter aluminum bag for baseline measurements. Then a dose of 6mg/kg of 2- ¹³C-Uracil 99.9% (*Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, EUA*) was diluted in 150ml of warm sugar-free tea and immediately ingested in 30 seconds. Exhaled air samples were taken every 5 minutes for the first 30 minutes and then each 10 minutes for the subsequent 150 minutes (total = 22 samples). Samples were analysed using the infrared spectrometry device IRIS-2 (*IRIS ¹³C Stable Isotope Breath Analysers - Wagner Analysen Technik GmbH, Bremen - Germany*).

The results were expressed according to the following indices (Amarri and Weaver, 1995; Ezzeldin *et al*, 2009):

- **DOB** (*delta over baseline*): a change in ratio of ¹³CO₂/¹²CO₂ in breath samples related to the baseline content before tracer ingestion; it expresses the recovery of ¹³C in breath samples for single time points following its ingestion. **Formula:** DOB = $\delta\text{Sample} - \delta\text{basal value}$;
- **C_{max}**: maximum concentration found;
- **T_{max}**: time in which maximum concentration was reached;
- **PDR** (cumulative percentage of ¹³C dose recovered in breath): an analysis of how much of the ingested ¹³C-Uracil is recovered in breath over the time, calculated for each time interval; a cumulative PDR can be obtained for the complete test duration.

Statistical analysis

The differences in clinical characteristics (age, gender, ethnicity and chemotherapy regimens) between the groups were analyzed by either *t* test or *chi-square* test (if either continuous or dichotomic variable). The *Mann-Whitney* test was used to compare body mass index (BMI) as this variable didn't have a Gaussian distribution.

Distribution patterns of breath test indices were tested for normality by Ray-Joiner test. Means and standard deviations were calculated for all subgroups. Differences between the mean results for each index were calculated by *t* test.

The UraBT indices (DOB_{50} , C_{max} , T_{max} , PDR) were compared regarding performance and then combined to each other and with clinical characteristics using linear discriminant functions aiming at maximum accuracy. Sensitivity and specificity of different cut-off points for each index were determined.

To test bag capacity in retaining ^{13}C over time, we compared breath analysis done immediately and after storage for 14 days from seven patients as described by Altman and Bland, 1983.

Repeatability was tested comparing DOB_{50} among three consecutive tests from five patients, 3-6 months apart, using *Friedman* test.

All statistical analyses were carried out using the MINITAB software (Minitab Inc., USA) version 16.

RESULTS

Patients

A total of 33 patients were recruited. Of those, 13 had grade 3-4 toxicity after cycles 1-2 that could not be explained by concurrent radiation or use of other chemotherapeutic agents. The most common toxicities were febrile neutropenia in 11/13 (85%); stomatitis in 11/13 (85%) and diarrhea in 10/13 (77%). Our control group (n=20) had grade 0-1 toxicity and similar baseline characteristics except for higher BMI (Table 1).

Determination of UH_2/U ratios

UH_2/U ratios were normally distributed (p -value > 0.10, *Ray-Joiner test*), ranging from 1.56 to 6.18 (mean = 3.932; standard deviation = 1.103). Mean UH_2/U ratio was 4.15 for patients with grade 0-1 toxicity and 3.58 for patients with grade 3-4 toxicity. This difference didn't reach statistical significance (p = 0.148, t test). Mean minus 2 standard deviations was 1.726. Based on this, we classified 1/13 patients with grade 3-4 toxicity as DPD-deficient. None of the patients with grade 0-1 toxicity had UH_2/U ratios below this value.

Genetic testing

After sequencing exons 13, 14 and 22, we found five single nucleotide polymorphisms (SNPs) (c.1627A>G, c.1678C>G, c.1896T>C, c.2846A>T, IVS14+1G>A) in 15/33 patients. The SNP 2846A>T, located in exon 22, was found in heterozygous form in two patients (both with grade 3-4 toxicity). This SNP causes DPD-deficiency (van Kuilenburg *et al*, 2002b; Gross *et al*, 2008). The SNP (IVS14+1G>A), which also explains

DPD-deficiency (Meinsma *et al*, 1995) was found in form of heterozygosity in one patient with grade 3-4 toxicity. Thus, in 3/13 patients with severe toxicity a deleterious mutation in heterozygous form was found and thus they were classified as DPD-deficient. Among patients with grade 0-1 toxicity, none had deleterious mutations.

¹³C-Uracil breath test

The UraBT indices (DOB_{50} , C_{max} , T_{max} and PDR) fitted normal distribution. Mean and standard deviations were calculated for each group (Table 2). All patients with grade 0-1 toxicity were also considered non DPD-deficient as UH_2/U ratios and genetic tests were normal. Figure 2 shows mean DOBs for each time point for the three subgroups.

Discrimination between the group with grade 3-4 toxicity (n = 13) versus grade 0-1 toxicity (n = 20)

The mean values for DOB_{50} and C_{max} were statistically different between the group with grade 0-1 versus grade 3-4 toxicity ($p=0.008$ for both, t test). Differences in mean T_{max} and PDR didn't reach statistical significance. Confidence intervals at 95% for DOB_{50} difference were [8.6, 52.5] and for C_{max} difference [7.9, 49.1].

The accuracy for different cut-off points was tested for DOB_{50} and C_{max} . For $DOB_{50} \leq 161.4$ as diagnostic of toxicity, 8/13 patients with grade 3-4 and 17/20 patients with grade 0-1 toxicity would be correctly identified (sensitivity = 61.5%; specificity = 85%). For $C_{max} \leq 178.8$ as diagnostic of toxicity, 9/13 patients with grade 3-4 and 17/20 patients with grade 0-1 toxicity would be correctly identified (sensitivity = 69%; specificity = 85%).

Fisher linear discriminant function analysis was done testing interactions between DOB_{50} , C_{max} , T_{max} and PDR, and crossing each UraBT parameter with clinical characteristics such as age, gender and body mass index (BMI). No combinations of UraBT indices were better than DOB or C_{max} alone. Curiously, the combination of BMI and DOB_{50} was able to discriminate patients with previous grade 3-4 toxicity from patients with grade 0-1 toxicity with sensitivity of 83,3% and specificity of 80% [Discriminant function: $(DOB_{50}) = -7.28(BMI) + 364.84$].

Discrimination between the group with proven DPD-deficiency (n = 4) versus non DPD-deficiency (n = 20)

Significant differences in mean values of DOB_{50} and C_{max} were found between groups ($p = 0.021$ and 0.011 , respectively). Confidence intervals at 95% for DOB_{50} difference were [7.1, 78.3] and for C_{max} difference were [10.4, 70.7]. T_{max} and PDR didn't show significant differences between groups.

Accuracy was tested for DOB_{50} and C_{max} . A cut-off point of $DOB_{50} \leq 161.4$ discriminated 3/4 DPD-deficients and 17/20 non DPD-deficients (sensitivity = 75%; specificity = 85%). $C_{max} \leq 168.6$ discriminated 3/4 DPD-deficients and 19/20 non DPD-deficients (sensitivity = 75%; specificity = 95%).

Assessment of capacity of breath collection bag in retaining ^{13}C over time.

The integrity of the breath collection bags in retaining ^{13}C was evaluated comparing DOBs from seven patients (154 breath samples) before and after storage at room temperature for 14 days. Calculating the differences between the measurements

against their means, it is shown with 95% of confidence that results of two tests varies between [-20.72, 11.62] (Fig. 3).

Repeatability

Repeatability was examined comparing the results of UraBT from five patients who did the test three times, 3 to 6 months apart. Using Friedman test, there were no statistically significant differences for DOB_{50} , C_{max} , T_{max} or PDR among the three tests for each patient, which suggest good repeatability for the group.

DISCUSSION

Colorectal cancer is the third most common malignancy in men and the second in women, accounting for 1.2 million new cases each year (IARC, 2008). 5FU and its oral derivatives are the mainstay of treatment. Since severe toxicity develops in 10-31% of patients depending on treatment schedule, predictive tests are warranted. In cases of strongly suspected deficiency in catalytic pathway, one could change treatment strategy by either tailoring 5FU dose or schedule (reduced initial doses, oral fluoropyrimidines, weekly doses or protracted infusions) or avoiding 5FU whenever possible.

Sequencing *DPYD* is expensive and requires complex laboratory facilities and highly qualified personnel. Deleterious mutations are found in less than 50% of patients with severe toxicity. Taking into account that we sequenced only 3/23 exons of *DPYD*, our ability to find deleterious mutation in 3/13 individuals with severe toxicity

(20%) is in line with literature. Also, the mutations found are well described in European populations.

UH₂/U ratios show high variability in range and mean values among studies, probably reflecting ethnic and methodological differences. Also, the cut-off points for toxicity could vary depending on the 5FU regimens employed. Although we did not find a significant difference for mean UH₂/U ratios between the groups, our values for U, UH₂ and UH₂/U were similar to that originally found by Gamelin *et al* (1999). The limited number of patients may have precluded finding small yet statistically significant differences. Our adopted cut-off point for diagnosis of DPD-deficiency was similar to the 1.8 value described by that author. This value was 100% specific for toxicity which met our purpose to prove DPD deficiency. Nevertheless, no cut-off point for severe toxicity could be found in our work.

The fact that the four DPD-deficient patients in our study were women may reflect the possible more susceptibility of female gender to DPD deficiency and 5FU-related toxicity, as previously described (Milano *et al*, 1999).

Recently, the difficulties in predicting toxicity to 5FU were further disclosed by a prospective German study comprising 683 patients (Schwab *et al*, 2008) that proposed a complex predictive nomogram based on genetic (full *DPYD*, thymidilate-synthase and methylene tetrahydrofolate reductase sequencing, and DPD promoter metilation) and non-genetic characteristics (gender, use of folinic acid and mode of administration) with maximum predictive positive value of 90% in men but only 46% in women.

Breath test has the theoretical advantage of providing a fast and non-invasive approach to the whole 5FU catalytic pathway (DPD, dihydropyrimidinase and β -ureidopropionase) (Thomas *et al*, 2007; Thomas *et al*, 2008) and other parameters that can interfere with 5-FU kinetics in plasma, such as the anabolic pathway. ^{13}C -Uracil is a stable and non-radioactive isotope, presenting as an inodorous and insipidus white powder, barely soluble in water, easy to store and manage and with no adverse effects. As the breath samples can be stored at room temperature to be sent to analytical centers, breath test can be easily performed in community care settings.

In the first UraBT published study, Mattison *et al* (2004) found DOB_{50} to be the best discriminatory parameter among DPD-deficient and normal subjects. Applying the cut-off value of 128.9 they found 100% sensitivity and 96% specificity. In a subsequent study, the same authors (Mattison *et al*. 2006b) showed significant correlations between DPD activity and either plasma 2- ^{13}C -uracil clearance, 2- ^{13}C -dihydrouracil formation, and $^{13}\text{CO}_2$ breath concentrations, providing further support that UraBT reflects uracil catabolism. However, in spite of excellent performance of, there are many drawbacks in implementing this test in clinical practice. First, those studies compared DPD-deficients *versus* non DPD-deficients diagnosed based on genetic and/or radioassay tests, which are abnormal in only 50% of patients with severe toxicity. They do not directly assess the accuracy of UraBT in predicting toxicity to 5FU. Second, positive and negative predictive values (PPV and NPV) are the most relevant characteristics for a diagnostic test in clinical practice. Assuming sensitivity of 100%, specificity of 96% and a pre-test probability for partial DPD-deficiency of 3%, and using Bayes' theorem to estimate PPV and NPV, these values are respectively 0.43 and 1.0.

In other words, a positive UraBT ($DOB_{50} \leq 128.9$) would predict for DPD-deficiency in only 43% of cases. In our study, for $DOB_{50} \leq 161.4$, sensitivity of UraBT was 61.5% and specificity, 85%. Assuming a pre-test probability of grade 3-4 toxicity of 31% for bolus 5FU (Meta-Analysis Group In Cancer, 1998), according to Bayes' theorem, PPV is 0.65 and NPV, 0.83. In other words, if a patient undergoes UraBT before initiating chemotherapy with multiple bolus doses of 5FU, a $DOB_{50} \leq 161.4$ would indicate a 65% chance of severe toxicity.

Although our results indicate statistically significant differences in the UraBT indices DOB_{50} and C_{max} between the groups with grade 3-4 toxicity and grade 0-1 toxicity, and between DPD-deficient and non DPD-deficient patients, we found wide confidence intervals at 95% for DOB_{50} and C_{max} for all comparisons. This may reflect variability of data due to small sample size. Both indices performed similar but DOB_{50} is more practical as it reflects an single-time point, whereas C_{max} was reached anytime from 30 to 90 min, requiring analysis of many breath samples. Our mean and cut-off values for DOB_{50} and C_{max} were higher than previously described (Mattison et al., 2004) which might reflect differences in detection of ^{13}C between the two infrared-spectrometry devices or populational differences. This raises the question about the need to establish local validation before implementing UraBT. In contrast with the findings of Mattison *et al* (2004), the differences in mean T_{max} and PDR didn't reach statistical significance between the groups.

We found that combination of BMI and DOB_{50} had sensitivity of 83% and specificity of 80% in discriminating patients with grade 3-4 toxicity and grade 0-1 toxicity. Preclinical data demonstrated that protein malnutrition led to impaired 5FU

clearance, low hepatic DPD activity and excessive toxicity and deaths in rats after 5FU administration (Davis *et al*, 1993). Also, Kaneko *et al* (1991) found that activity of DPD and beta-ureidopropionase in the livers of rats fed with a protein-free diet were significantly decreased. Although the effect of nutritional status on risk of toxicity was not studied in the meta-analysis of toxicity of fluorouracil in cancer patients, patients with low performance-status did have more hematological toxicity. We can speculate that a significant part of those patients suffered from malnutrition. However, as BMI was significantly lower in the group of grade 3-4 toxicity (which could reflect weight loss caused by toxicity), we can not assume that BMI has impact in predicting 5FU toxicity based on this retrospective toxicity data. Only a prospective study can confirm those findings.

Limitations of our study include the small number of patients and the lack of patients with grade 5 toxicity (death), or neurotoxicity, who would probably be the more DPD-deficient ones (Milano *et al*, 1999). However, it must be emphasized that deeply deficient patients are rare in clinical practice, accounting for no more than 0.1% of population. The grade 3-4 toxicities found in our patients reflect that encountered in clinical practice, and had strong clinical impact in our patients: hospitalization occurred in 12/13, interruption of treatment in 6/13 and changes in dose or schedule in the remaining. Detecting those not rare partially deficient patients with common but still clinically relevant toxicity is warranted.

In conclusion, we demonstrated that UraBT discriminates patients with grade 3-4 toxicity from that with grade 0-1 toxicity, with sensitivity of 61.5% and specificity of 85%. Accuracy is similar or slightly better compared to other methods, with advantage

of being simpler, faster and less expensive. Prospective studies should be done to confirm the role of UraBT in clinical practice.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), for financial support. We also thank Prof. Maria de Lourdes Moreira Fernandes for statistical support.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest regarding this work.

REFERENCES

- Altman DG, Bland JM (1983) Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician* **32**: 307 - 317.
- Amarri S, Weaver LT (1995) ¹³C-breath tests to measure fat and carbohydrate digestion in clinical practice. *Clin Nutr* **14**: 149 - 54
- Amstutz U, Froehlich TK & Largiadèr CR (2011) Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics* **12**: 1321 - 1336
- Ciccolini J, Gross E, Dahan L, Lacarelle B, Mercier C (2010) Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin Colorectal Cancer* **9**: 224 - 228.

Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, McLeod HL (2000) Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* **10**: 217 - 223.

Davis LE, Lenkinski RE, Shinkwin MA, Kressel, HY, Dal JM (1993) The Effect of Dietary Protein Depletion on Hepatic 5-Fluorouracil Metabolism. *Cancer* **72**: 3715 - 22.

Diasio RB (1998) The role of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) modulation in 5-FU pharmacology. *Oncology* **12**: 23 - 27.

Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT (1988) Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest* **81**: 47 - 51.

Diasio RB, Harris BE (1989) Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* **16**: 215 - 237.

Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renée N, Schneider M, Demard F, Milano G (1994) Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* **12**: 2248 - 2253.

Ezzeldin HH, Acosta EP, Mattison LK, Fourie J, Modak A, Diasio RB (2009) (13)C-5-FU breath test current status and future directions: a comprehensive review. *J Breath Res* **3**: 047002.

Fleming RA, Milano G, Thyss A, Etienne MC, Renée N, Schneider M, Demard F (1992) Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res* **52**: 2899 - 2902.

Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, Larra F, Ifrah N, Robert J (1999) Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol* **17**: 1105.

Gross E, Busse B, Riemenschneider M, Neubauer S, Seck K, Klein HG, Kiechle M, Lordick F, Meindl A (2008) Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. *PLoS One* **3**: e4003

Harris BE, Carpenter JT, Diasio RB (1991) Severe 5-fluorouracil toxicity secondary to dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. A potentially more common pharmacogenetic syndrome. *Cancer* **68**: 499 - 501.

Harris BE, Song R, Soong SJ, Diasio RB (1990) Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res* **50**: 197 - 201.

Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB (1987) Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* **47**: 2203 - 2206.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2011) Colorectal Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008: Summary. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp>. Last assessed in August 15th, 2011.

Kaneko M, Fujimoto S, Kikugawa M, Kontani Y, Tamaki N (1991) Effect of dietary protein on pyrimidine-metabolizing enzymes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **37**: 517-28.

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

Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* **19**: 5444.

Lu Z, Zhang R, Diasio RB (1993) Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly

identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res.* **53**: 5433 - 5438.

Lu Z, Zhang R, Diasio RB (1995) Population characteristics of hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity, a key metabolic enzyme in 5-fluorouracil chemotherapy. *Clin Pharmacol Ther* **58**: 512 - 522.

Mattison LK, Ezzeldin H, Carpenter M, Modak A, Johnson MR, Diasio RB (2004) Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency by using a novel 2-¹³C-uracil breath test. *Clin Cancer Res* **10**: 2652 - 2658.

Mattison LK, Fourie J, Desmond RA, Modak A, Saif MW, Diasio RB (2006a) Increased prevalence of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in African-Americans compared with Caucasians. *Clin Cancer Res* **12**: 5491 - 5495.

Mattison LK, Fourie J, Hirao Y, Koga T, Desmond RA, King JR, Shimizu T, Diasio RB. (2006b) The uracil breath test in the assessment of dihydropyrimidine dehydrogenase activity: pharmacokinetic relationship between expired ¹³CO₂ and plasma [2-¹³C]dihydrouracil. *Clin Cancer Res* **12**: 549 - 555.

Meinsma R, Fernandez-Salguero P, Van Kuilenburg AB, Van Gennip AH, Gonzalez FJ (1995) Human polymorphism in drug metabolism: mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene results in exon skipping and thymine uracilurea. *DNA Cell Biol* **14**: 1 - 6.

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

Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renée N (1999) Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer* **79**: 627 - 630.

Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, Kerb R, Blievernicht J, Fischer J, Hofmann U, Bokemeyer C, Eichelbaum M (2008). 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**: 2131 - 2138.

Stein BN, Petrelli NJ, Douglass HO, Driscoll DL, Arcangeli G, Meropol NJ (1995) Age and Sex Are Independent Predictors of 5-Fluorouracil Toxicity: Analysis of a Large Scale Phase III Trial. *Cancer* **75**: 11 - 17.

Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, Mattison LK, Fridley BL, Diasio RB (2008) Genetic regulation of beta-ureidopropionase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenet Genomics* **18**: 25 - 35.

Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, Mattison LK, Fridley BL, Diasio RB (2007) Genetic regulation of dihydropyrimidinase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenet Genomics* **17**: 973 - 987.

Tuchman M, Stoeckeler JS, Kiang DT, O'Dea RF, Ramnaraine ML, Mirkin BL (1985) Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *N Engl J Med* **313**: 245 - 249.

van Kuilenburg AB (2004) Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* **40**: 939 - 950.

van Kuilenburg AB, Dobritzsch D, Meinsma R, Haasjes J, Waterham HR, Nowaczyk MJ, Maropoulos GD, Hein G, Kalhoff H, Kirk JM, Baaske H, Aukett A, Duley JA, Ward KP, Lindqvist Y, van Gennip AH (2002b) Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochem J* **364**: 157 - 163.

van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, Van Gennip AH (2002a) Increased risk of grade IV neutropenia after administration of 5-fluorouracil due to a dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: high prevalence of the IVS14+1g>a mutation. *Int J Cancer* **101**: 253 - 258.

Wagner Analysen Technik GmbH. <http://www.wagner-bremen.de>. Last assessed in August 15th, 2011.

Wei X, Elizondo G, Sapone A, McLeod HL, Raunio H, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ (1998) Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics* **51**: 391 - 400.

Woodcock TM, Martin DS, Damin LA, Kemeny NE, Young CW (1980) Combination clinical trials with thymidine and fluorouracil: a phase I and clinical pharmacologic evaluation. *Cancer* **45**: 1135 - 1143.

Table 1: Characteristics of the 33 patients included in the study.

Characteristics		Grade 0-1 toxicity * (n = 20)	Grade 3-4 toxicity* (n = 13)
Age (years)	Mean	59,5	60,4
	Median	59,5	57,5
	Range	37-81	46-89
	p - valor = 0,835 ^a		
Gender (n, %)	Males	7 (35%)	4 (31%)
	Females	13 (65%)	6 (69%)
	p - valor = 0,923 ^b		
BMI	Median	25,6	21,7
	p - valor = 0,028 ^c		
Ethnicity (n, %)	Caucasian	9 (45%)	9 (69%)
	Non-caucasian ^d	11 (55%)	4 (31%)
	p - valor = 0,234 ^b		
Type of cancer (n, %)	Colorrectum	17 (85%)	13 (100%)
	Other ^e	3 (15%)	0 (0%)
	p - valor = 0,159 ^b		
Chemotherapy type (N)	Bolus 5FU, multi-day ^f	13 (65%)	12 (92%)
	Other (Weekly bolus/FOLFOX ^g /Al-Sarraf ^h)	7 (35%)	1 (8%)
	p - valor = 0,068 ^b		
Treatment setting (n, %)	Neoadjuvant	4 (20%)	3 (23%)
	Adjuvant	15 (75%)	10 (77%)
	Palliative	1 (5%)	0 (0%)
	p - valor = 1,000 ^b		
Concurrent radiotherapy (n, %)	Yes	5 (25%)	4 (31%)
	No	15 (75%)	9 (69%)
	p - valor = 0,612 ^b		

Legend: (*) According to Common Toxicity Criteria Adverse Events (CTCAE) v 3.0; ^a "t" test; ^b "χ²" test; ^c Mann-Whitney test; ^d All patients are Afro-Brazilians or mixed race; there were no Indians or Asiatics; ^e Other: Esophagus or Anal Canal; ^f Bolus 5FU, multi-day: 350-425 mg/m² for 4-5 consecutive days each 4 weeks; ^g FOLFOX: Oxaliplatin 80 mg/m² day 1 + Folinic Acid 400 mg/m² day 1 + 5FU 400 mg/m² bolus day 1 + 5FU 2400mg/m² in 46h (continuous infusion); ^h Al-Sarraf: Cisplatin 70-100 mg/m² D1 + 5FU 3000-4000 mg/m² in 96h (continuous infusion).

Table 2: Comparisons of UraBT indices for patients with grade 0-1 toxicity, grade 3-4 toxicity and proven DPD-deficients.

Patients		DOB ₅₀	C _{max}	T _{max}	PDR
Grade 0-1 toxicity (n=20)	Mean(SD)	193.5 (31.0)	206.5 (27.4)	50.5 (15.4)	61.5 (7.1)
Grade 3-4 toxicity (n = 13)	Mean(SD)	162.9 (28.8)	179.0 (29.7)	54.6 (19.4)	61.1 (5.3)
	*p-value	0.008	0.008	0.503	0.871
	95% CI difference	(8.6, 52.5)	(7.9, 49.1)	(-16.5, 8.3)	(-4.3, 5.1)
DPD-deficients (n = 4)	Mean(SD)	150.8 (33.1)	166.0 (20.1)	65.0 (17.3)	63.0 (3.7)
	*p-value	0.021	0.011	0.105	0.68
	95% CI difference	(7.1, 78.3)	(10.4, 70.7)	(-30.3, 3.3)	(-9.2, 6.1)

Legend: (*) "t" test for difference with Grade 0-1 toxicity patients.

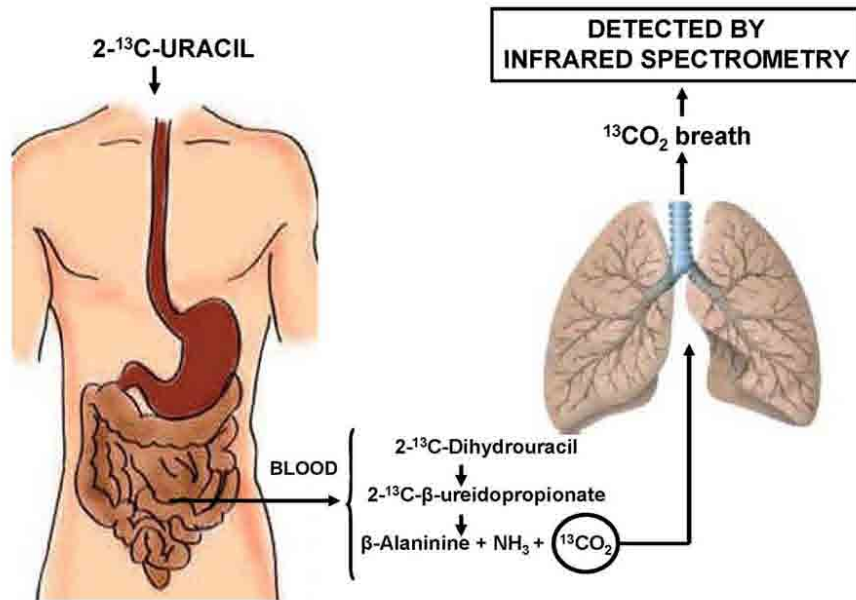


Figure 1: Principle of ^{13}C -uracil breath test.

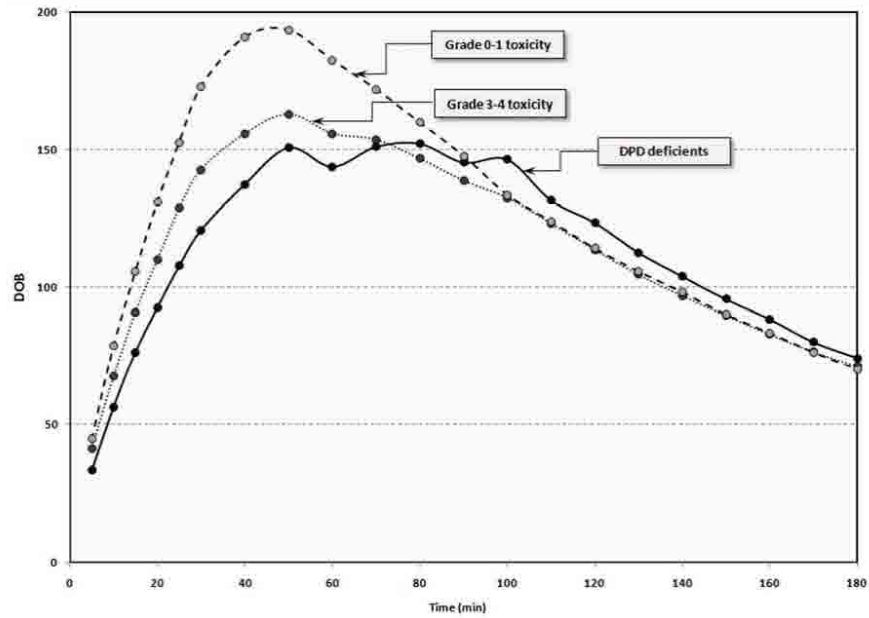


Figure 2: Mean delta over baseline (DOB) for each time point (0-180 min) from patients with grade 0-1 toxicity (n = 20); patients with grade 3-4 toxicity (n = 13); and the subgroup of patients with grade 3-4 toxicity with proven DPD-deficiency (n = 4).

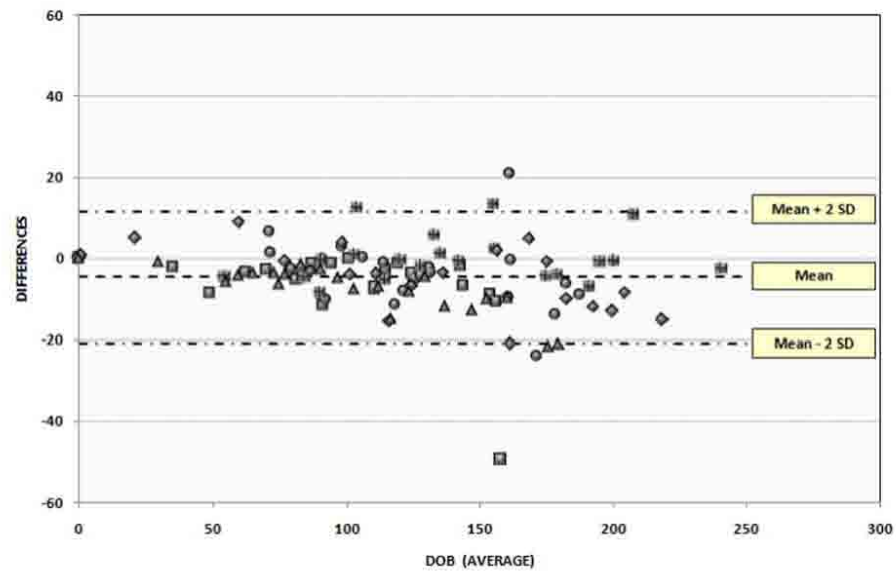


Figure 3: Difference of values against their means for Delta Over Baseline (DOB) in seven patients before and after 14-day storage.

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG - FR-286040

423/09

Título: Papel do teste respiratório com uracila marcada com carbono-13 na predição de risco de toxicidade ao quimioterápico 5-fluorouracil em pacientes portadores de câncer de via aerodigestiva.

Área do conhecimento: Ciências da Saúde – Medicina – Diag.

Pesquisadores Responsáveis: Luiz Gonzaga Vaz Coelho (orientador)
Geraldo Felício da Cunha Jr. (orientando)

Instituição responsável pelo projeto: Faculdade de Medicina/UFMG

Datas: Data de entrega no COEP: 11/09/2009

Data prevista para início do projeto: 19/10/2009

Data prevista para término do projeto: **1ª. Fase:** 30/11/2010; **2ª. Fase:** 28/02/2013

Documentos: O projeto foi aprovado pelo Departamento de Clínica Médica e pelo Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica com base em parecer consubstanciado e pelo Diretor da Faculdade de Medicina da UFMG. São apresentados: folha de rosto datada e assinada, declaração de registro na DEPE, protocolo de pesquisa com declaração de apoio institucional assinado pelo Diretor da Faculdade de Medicina da UFMG, TCLE, anuência dos colaboradores Prof. Luiz Armando de Marco e Prof. Gerson Antonio Pianetti, do Instituto Alfa de Gastroenterologia do HC-UFMG, anuência do Hospital da Baleia. O Protocolo de pesquisa contém informações dos pesquisadores, antecedentes, justificativa, objetivos, metodologia, bibliografia, declaração que os gastos serão cobertos pela verba de bancada do orientador, declaração de divulgação de resultados, termo de compromisso assinado pelos pesquisadores, CV dos pesquisadores disponíveis na plataforma Lattes. Está anexada ficha de coleta das informações.

Sumário do Projeto: O 5-fluorouracil (5FU) é um quimioterápico antimetabólito que imita bioquimicamente a base nitrogenada Uracila, inibindo a síntese da DNA e RNA, sendo a base do tratamento da maioria dos cânceres do aparelho digestivo. É bem tolerado pela maioria das pessoas, porém apresenta toxicidade para alguns, podendo ser fatal. Tal toxicidade na maioria das vezes é causada por variação no metabolismo da droga decorrente do polimorfismo do gene DPYD. Testes genotípicos e fenotípicos são caros e pouco disponíveis para a clínica. Estudos preliminares comprovaram que o Teste Respiratório após ingestão de Uracila marcada com carbono-13 se correlacionou com a atividade da via catabólica do 5FU, sendo menos oneroso e de fácil realização.

Metodologia: Estudo comparativo, em que se pretende comparar dois grupos de pacientes portadores de câncer de vias aerodigestivas, entre indivíduos previamente tratados com 5FU: (1) Grupo Experimental (deficientes enzimáticos) – pacientes que tiveram toxicidade grave ao 5FU e que tenham o teste genético ou teste sérico compatível com deficiência; (2) Grupo Controle (não deficiente enzimático) – pacientes que não apresentaram toxicidade ao 5FU e que tenham teste sérico compatível com a normalidade no que se refere à via catabólica do Uracil. Determinados os grupos, aplicar e comparar os resultados do Teste Respiratório avaliando a hipótese que o teste discrimina os dois grupos (Fase1). Determinar a dose mínima efetiva do substrato Carbono-13 para se realizar o teste com o equipamento disponível no HC/UFMG e avaliar a reprodutibilidade intra-paciente e intra-teste em amostras de ar expirados colhidas no início do estudo e três meses depois (Fase2). Espera-se 8 indivíduos no Grupo 1 e 30 no Grupo 2, na 1ª. Fase. Na 2ª. Fase, serão necessários, 18 e 98, respectivamente.

Critérios de inclusão/exclusão: **Inclusão:** Pacientes com câncer de via aerodigestiva em diversos estádios já submetidos a quimioterapia a base de 5FU, sendo que parte deles terá apresentado toxicidade leve e parte toxicidade grave ao 5FU. Os pacientes podem ser de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos, com função medular, renal e hepática normais e índice de desempenho clínico 0 a 2. **Exclusão:** Ter realizado conjuntamente quimioterapia e radioterapia; ter utilizado outro agente quimioterápico associado ao 5FU; apresentar DPOC; ter sido submetido a cirurgia gástrica ou do intestino delgado.

Análise de riscos e benefícios: Segundo os pesquisadores, os únicos riscos para os pacientes são os inerentes a coleta de sangue e consta do TCLE. Não há benefícios diretos para os sujeitos de pesquisa.

Voto: Salvo melhor juízo, sou pela aprovação do projeto.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 0423.0.203.000-09

**Interessado(a): Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 07 de outubro de 2009, o projeto de pesquisa intitulado **"Papel do teste respiratório com uracila marcada com carbono-13 na predição de risco de toxicidade ao quimioterápico 5-fluorouracil em pacientes portadores de câncer de via aerodigestiva"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B
Carta de aceite para publicação do Artigo 1 no
periódico Therapeutic Drug Monitoring

[View Letter](#)

Page 1 of 1

View Letter

[Close](#)

Date: 03 Nov 2011
To: "Isabela César" isaccesar@bol.com.br
From: "Gideon Koren" tdm.journal@sickkids.ca
Subject: TDM Decision

Therapeutic Drug Monitoring
03 Nov 2011

RE: TDM 011-037R2 , entitled "A RAPID HPLC-ESI-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF DIHYDROURACIL/URACIL RATIO IN PLASMA: EVALUATION OF TOXICITY TO 5-FLUOROURACIL IN GASTROINTESTINAL CANCER PATIENTS"

Dear Dra. Isabela César,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in Therapeutic Drug Monitoring. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

If you have not already done so, please complete the required "copyright transfer agreement" which has to be signed by all authors of the manuscript and return it by fax or conventional mail to the editorial office in charge of handling your manuscript. A pdf copy of the form is available from the Journal's homepage.

Thank you for submitting your interesting and important work to the journal.

<http://tdm.edmgr.com/>

Your username is: *****
Your password is: *****

With Kind Regards,

Gideon Koren
Editor-in-Chief (North America)
Therapeutic Drug Monitoring

[Close](#)