

Influência de variantes farmacogenéticas na utilização de fármacos: importância do gene *DPYD* enquanto marcador preditivo de toxicidade às fluoropirimidinas

*Influence of pharmacogenetic variants on drug use: importance of the *DPYD* gene as a predictive marker of fluoropyrimidine toxicity*

Diana Alves¹, Filipa Ferreira², Célia Nogueira³, Altina Lopes², Cristina Pereira², Laura Vilarinho^{2,3}

diana.alves@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(2) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(3) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

_Resumo

A presença de determinadas variantes em genes responsáveis pela codificação de proteínas com função de transportadores ou recetores envolvidos em vias de metabolização de xenobióticos, pode condicionar a resposta individual a determinados fármacos, comprometendo a resposta terapêutica e o prognóstico clínico. Desta forma, a farmacogenética é, nos tempos atuais, uma ferramenta essencial na medicina personalizada, uma vez que estudos genéticos permitem ao clínico prever a probabilidade de eficácia e de toxicidade de determinados fármacos, podendo assim individualizar o tratamento e melhorar a segurança dos doentes. A título de exemplo, podemos referir as variantes associadas ao gene *FMO3* (Trimetilaminúria) que condicionarão a eficácia do tratamento com Sulindac, variantes no gene *CBS* (Homocistinúria clássica) que influenciarão a resposta dos doentes à terapia com Piridoxina (vitamina B6) bem como as variantes no gene *DPYD* (deficiência em dihidropirimidina desidrogenase) que originarão diferentes manifestações fenotípicas em indivíduos tratados com fluoropirimidinas (5-Fluorouracil, Capecitabina e Tegafur). O objetivo deste trabalho é alertar para a necessidade do estudo genético de indivíduos em tratamento com fármacos que sofram metabolização hepática. Pretende-se avaliar a importância de variantes já identificadas no gene *DPYD*, bem como de outras potencialmente relevantes, enquanto marcadores preditivos de toxicidade associada às fluoropirimidinas. Este estudo também contribuirá para alargar o espectro mutacional associado ao gene *DPYD*, para além das variantes incluídas nos *kits* comerciais do gene, que podem também influenciar a terapêutica/toxicidade com fluoropirimidinas.

_Abstract

The presence of certain variants in genes responsible for encoding transporters or receptors involved in xenobiotic metabolism pathways can influence an individual's response to certain drugs, compromising therapeutic efficacy and clinical prognosis. Therefore, pharmacogenetics is currently an essential tool in personalized medicine, as genetic studies allow clinicians to predict the likelihood of efficacy and toxicity of specific drugs, enabling individualized treatment and

*improving patient safety. As an example, we can mention variants associated with the *FMO3* gene (Trimethylaminuria) that affect the effectiveness of Sulindac treatment, variants in the *CBS* gene (Classical homocystinuria) that influence patients' response to Pyridoxine (vitamin B6) therapy, as well as variants in the *DPYD* gene (dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency) that result in different phenotypic manifestations in individuals treated with fluoropyrimidines (5-Fluorouracil, Capecitabine, and Tegafur). The aim of this study is to highlight the need for genetic testing of individuals undergoing treatment with drugs that undergo hepatic metabolism. Additionally, we intend to evaluate the importance of already identified variants in the *DPYD* gene, as well as other potentially relevant ones, as predictive markers for fluoropyrimidine-associated toxicity. Furthermore, we also aim to contribute to expanding the mutational spectrum associated with the *DPYD* gene, beyond the variants included in commercial gene kits, which could also influence the therapy/toxicity of fluoropyrimidines.*

_Introdução

A farmacogenética define-se como sendo a área da genética que estuda as variações genéticas presentes em cada indivíduo e o efeito dessa variabilidade na resposta a tratamentos farmacológicos (1). Associada a esta área, emerge a medicina personalizada visto que ambos os conceitos têm como principal finalidade orientar decisões clínicas na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças com base no perfil genético de um indivíduo (2). Apesar de vários fatores poderem interferir no metabolismo dos fármacos, alguns autores defendem que 20 a 95% das alterações interindividuais na resposta a fármacos são justificadas



por fatores genéticos. Assim, a análise de variantes num determinado gene, responsável pela codificação de uma proteína envolvida na metabolização de um fármaco, terá grande utilidade, uma vez que auxiliará o clínico a otimizar a eficácia e segurança desse fármaco e, conseqüentemente, da terapia medicamentosa adotada (3,4). Atualmente, vários polimorfismos genéticos (*Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs*), associados a doenças hereditárias do metabolismo, são utilizados como biomarcadores de suscetibilidade de resposta a fármacos. Exemplos disso são os polimorfismos já estudados no gene que codifica a enzima hepática flavina mono-oxigenase 3 (*FMO3*), associados ao fenótipo da trimetilaminúria (TMAu, OMIM: 602079), no gene que codifica a enzima cistationina beta-sintase (*CBS*), associado à homocistinúria clássica (HCU, OMIM: 236200) e no gene que codifica a enzima dihidropirimidina desidrogenase (*DYPD*), associado à deficiência da dihidropirimidina desidrogenase (OMIM: 274270).

No caso do gene *FMO3*, verificou-se que doentes com os polimorfismos responsáveis pela doença hereditária autossômica recessiva TMAu em homozigotia, nomeadamente os SNPs c.472G>A (p.Glu158Lys) e c.923A>G (p.Glu308Gly), não desenvolviam pólipos, o principal efeito tóxico do Sulindac, fármaco anti-inflamatório não esteroide, indicado no tratamento de doentes com polipose adenomatosa familiar (PAF) (5-8). Estes polimorfismos, ao diminuírem a atividade catalítica da enzima *FMO3*, têm assim um efeito protetor no tratamento da PAF, pela redução dos efeitos secundários tóxicos do fármaco e servem de biomarcadores relativamente à resposta terapêutica ao mesmo. Os doentes diagnosticados com homocistinúria clássica são normalmente classificados com base na resposta do indivíduo ao tratamento com a piridoxina, vulgarmente conhecida como vitamina B6. Algumas variantes presentes em homozigotia, nomeadamente a c.833T>C (p.Ile278Thr), conferem ao doente uma resposta à vitamina B6 tornando possível atingir níveis normais de homocisteína total com doses reduzidas, levando a um tipo leve de

deficiência de CBS (9). Contrariamente, demonstrou-se que a variante c.572C>T (p.Thr191Met), quando presente em homozigotia na população portuguesa, espanhola e sul-americana, causa uma forma grave da doença que não responde à piridoxina (10,11). Outro exemplo são as variantes no gene *DPYD*, que codifica a enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD), responsáveis pela deficiência de DPD, caracterizada como uma doença autossômica recessiva do metabolismo das pirimidinas. No entanto, estão descritos vários SNPs neste gene que originam uma atividade enzimática reduzida, e que, em indivíduos tratados com fluoropirimidinas (5-Fluorouracil, Capecitabina e Tegafur), levam a que estes deixem de ter a capacidade de metabolizar adequadamente estes fármacos, originando uma toxicidade grave pela acumulação de compostos citotóxicos no sangue.

Desta forma, a farmacogenética é, nos tempos atuais, uma ferramenta essencial na medicina personalizada, nomeadamente para o diagnóstico e tratamento de diversos cancros. Os estudos genéticos permitem ao clínico prever a probabilidade de eficácia e de toxicidade de determinados fármacos, podendo assim individualizar o tratamento e melhorar a segurança dos doentes.

Objetivos

Este trabalho tem como objetivos alertar para a necessidade do estudo genético de indivíduos cujos fármacos utilizados na terapêutica sejam de metabolização hepática e avaliar a importância de variantes já identificadas no gene *DPYD*, bem como de outras que poderão ter impacto enquanto marcadores preditivos de toxicidade às fluoropirimidinas. Pretende-se também contribuir para alargar o espectro mutacional associado ao gene *DPYD*, para além das variantes incluídas nos kits comerciais do gene *DPYD*, que poderão também condicionar a terapêutica/toxicidade com fluoropirimidinas.



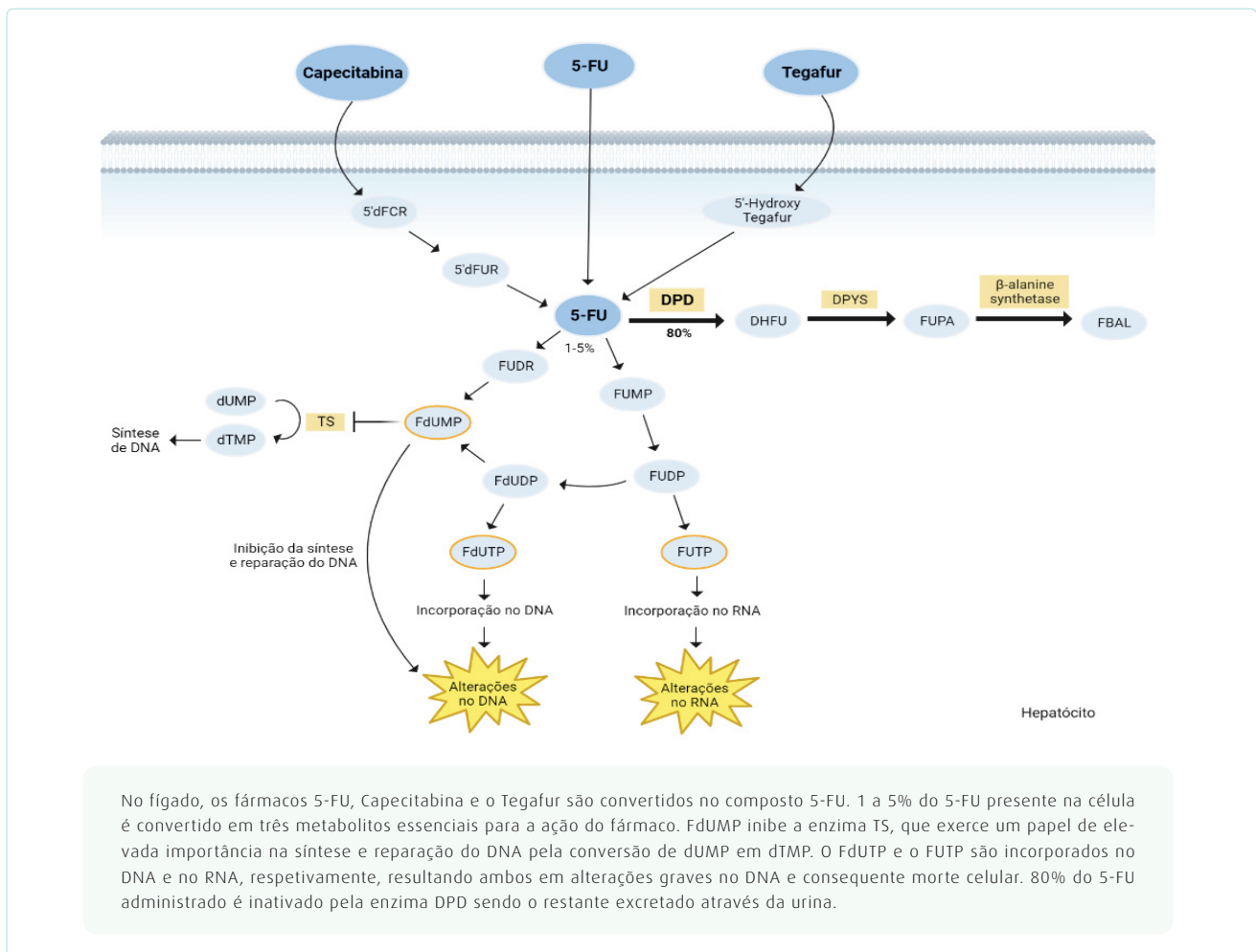
Metabolismo das fluoropirimidinas

O 5-fluorouracil (5-FU), é uma fluoropirimidina que é convertida intracelularmente para que haja formação de metabolitos citotóxicos com efeitos antitumorais. O seu principal composto ativo é o monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), que é responsável pela inibição da enzima timidilato sintetase (TS) e, conseqüentemente, inibição do processo de síntese e reparação do DNA (12,13). No entanto, grande parte do 5-FU é degradado pela via catabólica na qual a enzima DPD é responsável pelo primeiro passo e é

um fator limitante nesta via (14-16). A reduzida atividade desta enzima aumenta o risco de toxicidade às fluoropirimidinas uma vez que leva à acumulação de compostos com atividade citotóxica no sangue (17,18) (figura 1).

A enzima DPD é expressa principalmente nos hepatócitos e linfócitos (19-21). O gene *DPYD*, localizado no cromossoma 1p21.3, possui 23 exões e codifica uma proteína de 1025 aminoácidos, a enzima DPD. (22). Este gene é altamente polimórfico e, até à data, foram reportadas mais de 7600 variantes genéticas (23). Algu-

Figura 1: Representação esquemática do metabolismo das fluoropirimidinas.



DPD – Dihidropirimidina desidrogenase; DHFU – Dihidrofluorouracilo; DPYS – Dihidropirimidinase; FUPA – Ácido α -fluoroureidopropiônico; FBAL – α -fluor- β alanina; 5'dFCR – 5'-desoxi-5-fluorocitidina; 5'dFUR – 5'-desoxi-5-fluorouridina; FUDR – Fluorodeoxiuridina; FdUMP – Monofosfato de fluorodeoxiuridina; TS – enzima timidilato sintetase; dUMP – monofosfato de desoxiuridina; dTMP – monofosfato de desoxitimidina; FdUDP – Difosfato de fluorodeoxiuridina; FdUTP – Trifosfato de fluorodeoxiuridina; FUMP – Monofosfato de fluorouridina; FUDP – Difosfato de fluorouridina; FUTP – Trifosfato de fluorouridina.



mas destas variantes provocam alterações na atividade enzimática da DPD e, conseqüentemente, influenciarão a resposta metabólica do doente às fluoropirimidinas. Vários estudos têm vindo a associar variantes genéticas com efeitos de deficiência/toxicidade grave e preocupantes do ponto de vista clínico. Logo, tendo em conta o número significativo de doentes a quem são prescritos os fármacos abordados anteriormente, em termos de prognóstico e segurança, a avaliação de SNPs é crucial.

Polimorfismos no gene *DPYD*: impacto na farmacoterapia das fluoropirimidinas

As fluoropirimidinas, nomeadamente o 5-FU, Capecitabina e o Tegafur, são fármacos mundialmente utilizados na quimioterapia de cancros sólidos. Estima-se que 10% a 30% dos doentes desenvolvam toxicidade a estes fármacos, podendo ser evidente através de variados sintomas hematológicos, gastrointestinais e dermatológicos. O tratamento com fluoropirimidinas é fatal para cerca de 0,5% a 1% destes doentes (24-26). Fatores genéticos, principalmente a presença de certos SNPs no gene *DPYD*, que codifica a enzima DPD, podem alterar a atividade enzimática do metabolismo destes medicamentos. Assim, a manifestação fenotípica da resposta farmacológica dos doentes dependerá do défice parcial ou total desta enzima. Reações adversas a fármacos é um dos principais problemas no tratamento de tumores malignos por quimioterapia e, normalmente, implica redução de doses ou mesmo interrupção do tratamento, o que pode prejudicar a sua eficácia e o prognóstico da doença. Deste modo, estabelecer relações entre o genótipo e o fenótipo, poderá ser uma ferramenta de grande importância pois torna possível adequar o tratamento a cada doente em particular, garantindo a sua segurança.

Em 2020, o Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância (PRAC) adotou a recomendação da testagem genética preventiva para a deficiência de DPD tendo por base as seguintes mutações raras no gene *DPYD*:

c.1905+1G>A (IVS14+1G>A), c.1679T>G (p.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/c.1129-5923C>G (HapB3) (27). Estas estão descritas como estando associadas a um risco acrescido de toxicidade aquando da toma das fluoropirimidinas. Nesse mesmo ano, a Agência Europeia do Medicamento (EMA) e o Infarmed (Autoridade Nacional Portuguesa de Medicamentos e Produtos de Saúde) seguiram a mesma recomendação, levando a que surgissem novas normas de segurança no uso dos fármacos 5-FU, Capecitabina e Tegafur (28).

Os SNPs anteriormente referidos [c.1905+1G>A (IVS14+1G>A), c.1679T>G (p.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/ c.1129-5923C>G (HapB3)] são, até à data, os polimorfismos mais bem estudados, estando descritos como sendo “variantes funcionalmente relevantes” (tabela 1). Na população caucasiana, os genótipos heterozigóticos destas variantes apresentam frequências de 1%, de 0,07-0,1%, de 1,1% e de 2,6-6,3%, respetivamente (27). Deste modo, indivíduos que sejam portadores destas variantes têm maior probabilidade de desenvolver reações adversas graves, à 5-FU (cerca de 1,6 a 4,4 vezes mais aumentada) e têm 25% mais probabilidade de que essas reações conduzam mesmo à mortalidade (29,30). Porém, Amstutz *et al.* (24) defendem que apenas 20% dos casos de toxicidade grave após a toma de 5-FU estará relacionada com estas variantes. Quando os polimorfismos c.1905+1G>A (IVS14+1G>A) e c.1679T>G (p.Ile560Ser) estão presentes em homozigotia, os indivíduos geralmente apresentam uma atividade enzimática da DPD nula, enquanto nos indivíduos heterozigóticos a atividade da enzima está reduzida a cerca de 50%, razão pela qual deve ser evitada a prescrição de fluoropirimidinas (31,32). Assim, neste caso, doentes que possuam estes SNPs não são capazes de metabolizar o 5-FU e, portanto, estão mais expostos ao 5-FU e aos seus compostos citotóxicos. Por sua vez, as variantes c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/ c.1129-5923C>G (HapB3), levam a uma redução moderada da enzima DPD (tabela 1). Das variantes que são



Tabela 1: Caracterização de SNPs no gene *DPYD*, respetivos efeitos na atividade da DPD e fenótipo do doente.

SNP rs	cDNA	Proteína	Frequência do alelo de risco	Valor de atividade do alelo	Estado funcional do alelo	Nível de evidência	Fenótipo associado	Referências
rs3918290	c.1905+1G>A	IVS14+1G>A	0,007	0,0	Nulo	1A	Toxicidade geral	(31,32,38-41)
rs55886062	c.1679T>G	p.Ile560Ser	3×10^{-4}	0,0	Nulo	1A	Toxicidade geral	(29,31,38,42-44)
rs67376798	c.2846A>T	p.Asp949Val	0,003	0,5	Diminuído	1A	Toxicidade geral	(32,42,45)
rs75017182	c.1129-5923C>G	Variante intrónica	0,013	0,5	Diminuído	1A	Toxicidade geral	(29,33,46,47)
rs56038477	c.1236G>A	p.Glu412Glu	0,014	0,5	Diminuído	3	Toxicidade gastrointestinal e hematológica	(29)
rs115232898	c.557A>G	p.Tyr186Cys	0,002	0,5	Diminuído	1A	Neutropenia, mucosite e alopecia	(32,35,48-51)
rs72549303	c.1898del	p.Pro633fs	—	0,0	Nulo	1A	—	(37)
rs1801268	c.2983G>T	p.Val995Phe	—	0,0	Nulo	1A	—	(32)
rs78060119	c.1156G>T	p.Glu386Ter	8×10^{-6}	0,0	Nulo	1A	Leucopenia, trombocitopenia e mucosite	(32,52)
rs2297595	c.496A>G	p.Met166Val	0,085	1,0	Normal	3	Toxicidade geral	(43,53-56)
rs1801265	c.85T>C	p.Cys28Arg	0,228	1,0	Normal	3	Diarreia	(31,43,50,56-59)
rs1801159	c.1627A>G	p.Ile543Val	0,198	1,0	Normal	3	Diarreia	(31,43,59,60)
rs1801158	c.1601G>A	p.Ser534Asn	0,015	1,0	Normal	3	Toxicidade geral	(29,31,43,61)
rs17376848	c.1896T>C	p.Phe632Phe	0,051	1,0	Normal	3	Toxicidade geral	(54,62)
rs1801160	c.2194G>A	p.Val732Ile	0,048	1,0	Normal	3	Toxicidade geral	(31,32,43,47,55,63,64)

SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms; DPD – dihidropirimidina desidrogenase.

atualmente utilizadas como preditores relevantes de toxicidade, relacionada com a administração de fluoropirimidinas, a variante intrónica c.1129-5923C>G é a variante deletéria menos grave. Este SNP foi inicialmente identificado num haplótipo, o haplótipo B3 (HapB3), e, posteriormente, foi descrito que está num forte desequilíbrio de ligação com a variante sinónima c.1236G>A (p.Glu412Glu) (33).

Tendo em conta as recomendações do Infarmed e a crescente necessidade de identificar doentes com risco aumentado de desenvolver toxicidade durante o tratamento quimioterápico com fluoropirimidinas, fo-

ram desenvolvidos *kits* laboratoriais para análise farmacogenética qualitativa com base na deteção de polimorfismos informativos no gene *DPYD*. No entanto, estes *kits* só incluem a análise das variantes referidas anteriormente [(c.1905+1G>A, c.1679T>G (p.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/c.1129-5923C>G (HapB3)].

Presentemente, os SNPs acima referidos têm um nível de evidência e de utilidade clínica bem estabelecido. Para além destes SNPs, associados à redução de atividade da DPD e à toxicidade por 5-FU, a PharmGKB classifica o nível destas associações com anotações clíni-



cas de nível 1A¹ para outros SNPs: c.557A>G (p.Tyr186-Cys), c.1898del (p.Pro633fs), c.2983G>T (p.Val995Phe) e c.1156G>T (p.Glu386Ter). Deste último conjunto de polimorfismos, todos os alelos mutantes estão designados como sendo não funcionais (**tabela 1**). A variante c.557A>G (p.Tyr186Cys) é considerada uma variante de risco aumentado para a toxicidade ao 5-FU, pela *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) (35), sendo neste caso, mais prevalente na população africana. O mesmo acontece para a deleção c.1898del, uma vez que esta foi detetada em 46% dos doentes que desenvolveram toxicidade grave às fluoropirimidinas, mesmo com redução inicial de dose (36). Em alguns países, nomeadamente no Brasil, para além das variantes já referidas [c.1905+1G>A, c.1679-T>Gp.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236-G>A/c.1129-5923C>G (HapB3)], as variantes c.557A>G e c.1898del já se encontram incluídas nos *kits* comerciais utilizados na rotina clínica para a deteção de polimorfismos no gene *DPYD*. Porém, existem outras variantes, não incluídas nos *kits* comerciais, que levam igualmente ao desenvolvimento de toxicidade grave às fluoropirimidinas. São exemplo as variantes c.2983G>T (p.Val995Phe) e c.1156G>T (p.Glu386Ter) que levam à inativação da proteína DPD e, conseqüentemente, da atividade desta enzima (32,37).

Para além das variantes já mencionadas, outros SNPs no gene *DPYD* apresentam uma grande frequência alélica, nomeadamente, o c.496A>G (p.Met166Val), c.85-T>C (p.Cys28Arg), c.1627A>G (p.Ile543Val), c.1601G>A (p.Ser534Asn), c.1896T>C (p.Phe632Phe), c.2194G>A (p.Val732Ile), com frequências de 0,085, 0,228, 0,198, 0,015, 0,051 e 0,048, respetivamente. A PharmGKB

classifica o estado funcional dos alelos como normal, para estas SNPs, com anotações clínicas de nível de evidência 3². No entanto, ambas as bases de dados: *Human Gene Mutation Database* (HGMD) e *Ensembl* classificam estas variantes como sendo patogénicas associadas ao défice de DPD. Além disso, alguns autores acreditam que estas variantes poderão ter efeito tóxico ou protetor, mas ter-se-á de desenvolver mais estudos funcionais para avaliar os seus impactos nos doentes tratados com 5-FU.

Ajuste terapêutico: diretrizes de segurança

O consórcio internacional CPIC e o *Dutch Pharmacogenetics Working Group* (DPWG) desenvolveram diretrizes para ajudar a classificar o significado funcional das variantes do gene *DPYD* e seus potenciais efeitos na dosagem das fluoropirimidinas. Ambos utilizam uma escala de 0 a 2, sendo 0 – sem atividade enzimática e 2 – função normal da DPD, para prever a pontuação de atividade (PA) da DPD. Esta pontuação é a soma das atividades das duas isoformas da proteína expressas em ambos os alelos. As recomendações das doses a prescrever de acordo com o genótipo e fenótipo do indivíduo estão indicadas na **tabela 2**.

Recentemente, vários estudos têm sido feitos de modo a demonstrar o custo-benefício dos estudos moleculares do gene *DPYD* dos doentes que vão iniciar o tratamento com 5-FU e o custo dos tratamentos hospitalares daqueles que apresentam sintomas de intoxicação medicamentosa à dose padrão do 5-FU. Na Irlanda, Murphy *et al.* concluíram que o rastreio dos polimorfismos no gene *DPYD* na rotina clínica revelou ser economicamente mais rentável, sendo, por isso, de

1 As anotações clínicas de nível 1A descrevem combinações de variantes-fármacos para as quais há orientações de prescrição específicas disponíveis em diretrizes clínicas ou em rótulos de medicamentos com orientação de prescrição específica de variantes, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA). As anotações clínicas de nível 1A também devem ser apoiadas por, pelo menos, uma publicação científica. O nível 1A é o nível mais alto de anotações clínicas (34).

2 As anotações clínicas de nível 3 descrevem combinações de variantes-fármacos com baixo nível de evidência a suportar as associações estabelecidas. Essas associações podem ser baseadas num único estudo ou em estudos que falharam em replicar determinada associação. A anotação também pode ser baseada em evidências preliminares, como por exemplo, um relatório médico, estudo não significativo ou evidência de um ensaio *in vitro*, molecular ou funcional. O nível 3 é considerado um baixo nível de anotações clínicas (34).



Tabela 2: Atribuição do fenótipo com base no genótipo dos doentes, respetivo risco de toxicidade e recomendação terapêutica.

Fenótipo	Genótipo	PA da DPD	Risco de toxicidade ao 5-FU	Recomendações de dose das fluoropirimidinas
Metabolizador normal	Doente sem variantes associadas à disfunção reduzida ou completa da DPD.	2	Baixo	Não é necessário o ajuste de doses para medicamentos que são metabolizados pela DPD.
Metabolizador intermediário	Doente com uma variante associada à função normal da DPD e outra associada à funcionalidade reduzida da enzima.	1,5	Alto	É aconselhada a redução de 25% a 50% da dose padrão das fluoropirimidinas.
Metabolizador intermediário	Doente com duas variantes associadas à funcionalidade reduzida da DPD ou com uma variante associada à função normal e outra associada à não função da enzima.	1	Alto	É aconselhada a redução de 50% da dose padrão das fluoropirimidinas.
Metabolizador pobre	Doente com uma variante associada a uma funcionalidade reduzida da DPD e uma variante associada à não função da enzima.	0,5	Alto	É aconselhada a redução de 50% da dose padrão de fluoropirimidinas ou o uso de uma alternativa terapêutica.
Metabolizador pobre	Doente com duas variantes associadas com atividade de DPD totalmente disfuncional.	0	Alto	É aconselhado o uso de uma alternativa terapêutica à fluoropirimidina.

SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms; DPD – dihidropirimidina desidrogenase.

todo o interesse a caracterização genética prévia de cada doente que inicie a quimioterapia com fluoropirimidinas (65).

Em Portugal

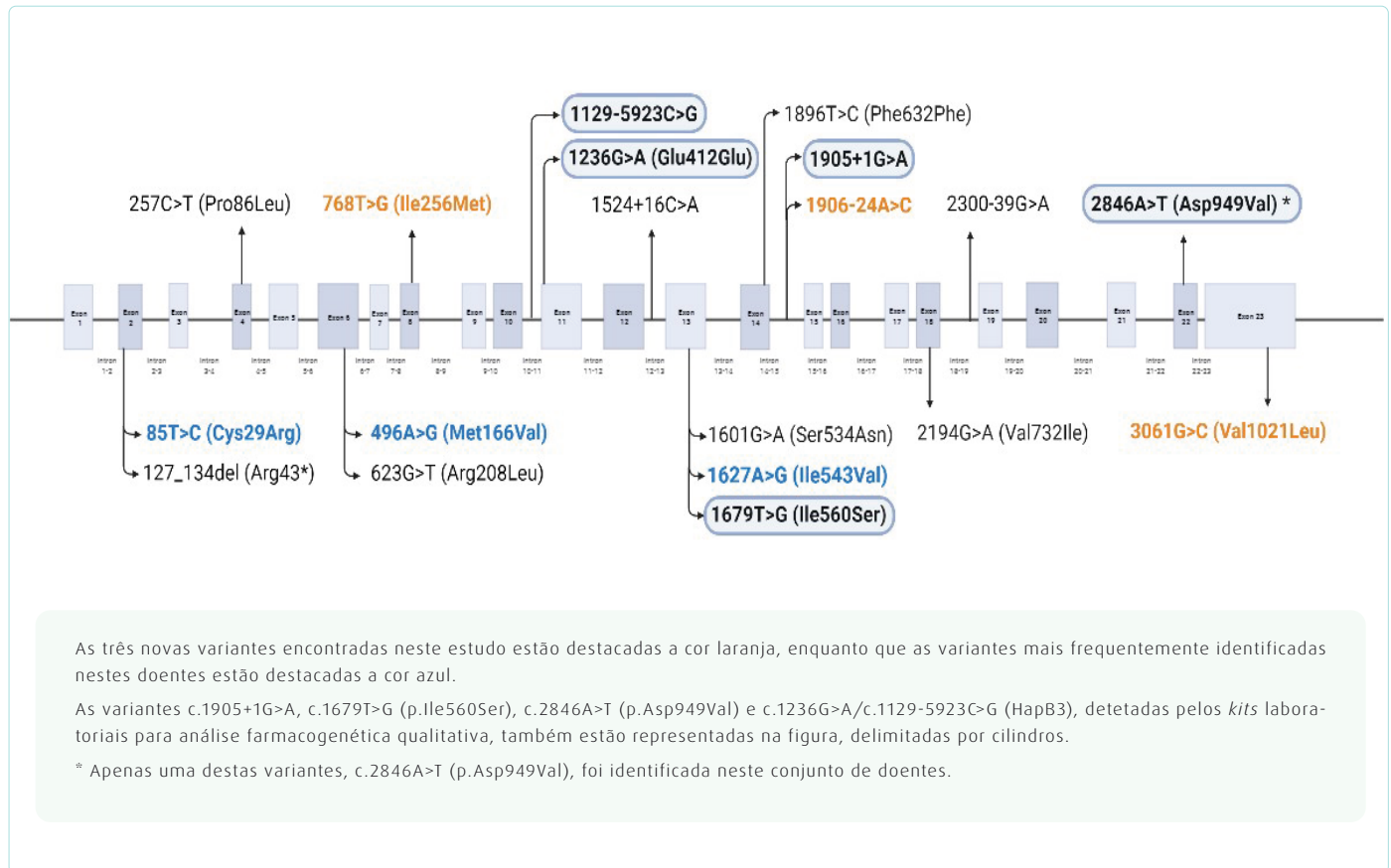
A introdução da tecnologia de sequenciação de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) para o diagnóstico de rotina na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no Porto, permitiu a realização de estudos do gene *DPYD*, úteis no rastreio destes SNPs, dando com rapidez uma resposta utilizada na terapêutica dos doentes tratados com 5-FU. 43 doentes foram caracterizados para o gene *DPYD*, dos quais 26% apresentaram um risco acrescido de toxicidade às fluoropirimidinas pela presença de duas ou mais variantes descritas como polimorfismos associados ao défice de DPD (*Human Gene Mutation Database*-HGMD e *Ensembl*). Os resultados do estudo molecular dos doentes analisados estão representados na **figura 2**.

Neste estudo, foram identificadas 3 novas variantes, desconhecendo-se, no entanto, o seu impacto na atividade catalítica da enzima. Poderá ser interessante realizar estudos enzimáticos de modo a perceber o impacto destas mutações na atividade enzimática da DPD e, consequentemente, no fenótipo dos doentes e na previsão da eficácia terapêutica. As mutações c.1524+16C>A, c.127_134del (p.Arg43*), c.257C>T (p.Pro86Leu) e c.2846A>T (p.Asp949Val), todas descritas com frequências alélicas inferiores a 0,01, e o SNP c.2300-39G>A, com frequência alélica de 0,09, encontram-se associadas ao défice de DPD (HGMD e *Ensembl*) (66-68). Deste modo, a presença destas variantes em homozigotia ou heterozigotia composta, com outra variante associada ao défice parcial ou total da atividade enzimática da DPD, tornará o doente suscetível à toxicidade das fluoropirimidinas devendo, por esta razão, o clínico necessitar de ajustar a dose do fármaco.

Nos 43 doentes estudados, as variantes c.1627A>G (p.Ile543Val), c.85T>C (p.Cys28Arg) e c.496A>G (p.Met166Val) foram as mais prevalentes, estando



Figura 2: Representação esquemática das 14 variantes identificadas nos 43 doentes estudados para a deficiência da DPD no gene *DPYD*.



presentes em 28%, 23% e 14% dos doentes, respetivamente, o que vai de encontro aos resultados esperados uma vez que estes SNPs são os que apresentam valores mais elevados da frequência alélica no gene *DPYD* (tabela 1). Vários casos clínicos reportam estes polimorfismos genéticos como estando associados a reações adversas graves ao 5-FU. No entanto, na comunidade científica há divergência de opiniões e falta de evidências conclusivas sobre as consequências metabólicas para o indivíduo (31,43,50,53-60).

Discussão

Diversos estudos populacionais demonstraram que cerca de 3% a 5% da população apresenta níveis reduzidos de atividade enzimática da DPD, pela existência de SNPs ou mutações no gene *DPYD*, apresentando assim um fator de risco acrescido para desenvolver toxicidade aquando da toma de um fármaco com 5-FU (69,70). A causa mais conhecida de intolerância às fluoropirimidinas é a deficiência de DPD, que pode resultar de polimorfismos deletérios no gene que a codifica. Deste modo, é fundamental o estudo prévio do gene *DPYD* para que o clínico possa adequar o tratamento, com o objetivo de aumentar o seu sucesso e a segurança do doente.

As variantes c.1905+1G>A (IVS14+1G>A), c.1679T>G (p.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/c.1129-5923C>G (HapB3) são as mais comumente



associadas ao fenótipo de deficiência de DPD pela severidade das reações adversas que causam no tratamento com 5-FU, razão pela qual, atualmente, estão disponíveis *kits* para a deteção precoce destes SNPs no gene *DPYD* na prática clínica. No entanto, como referido ao longo deste trabalho, encontram-se descritas na literatura outros SNPs e variantes capazes de afetar o sucesso do tratamento, uma vez que estão associados a efeitos tóxicos causados pela administração de fluoropirimidinas, devendo também ser utilizados como marcadores preditivos de toxicidade. Do nosso ponto de vista, de acordo com a revisão bibliográfica e mesmo com os dados preliminares que já dispomos, é nosso entender que para além das variantes mais conhecidas, há outras com um impacto igualmente prejudicial na atividade catalítica da enzima DPD, inclusive com frequências alélicas superiores na população portuguesa, fator que se deveria ter em conta na escolha do tratamento.

Uma vez que os *kits* comerciais não asseguram a ausência de efeitos tóxicos face ao tratamento com fluoropirimidinas pelo pequeno número de polimorfismos detetados, esta desvantagem seria ultrapassada pelo estudo completo do gene *DPYD*, evitando gastos no internamento dos doentes que venham a desenvolver toxicidade grave durante a toma da medicação. Por outro lado, a genotipagem completa do gene *DPYD* por NGS permite sequenciar rapidamente este gene e compreender os fenótipos observados durante a toma do 5-FU ou dos seus pró-fármacos, e estabelecer correlações genótipo-fenótipo essenciais na prática clínica.

Conclusão

Para doentes cujo tratamento oncológico seja a quimioterapia à base de fluoropirimidinas, a funcionalidade catalítica da enzima DPD deve ser determinada antes do início da terapia de modo a identificar doentes com maior probabilidade de desenvolverem toxicidade grave ou fatal.

O estudo molecular do gene *DPYD* é uma técnica promissora para a individualização do tratamento dos doentes, nomeadamente no ajuste de doses do 5-FU, uma vez que já há diretrizes de segurança disponíveis para muitas das variantes que afetam a DPD (16,36).

Por outro lado, o estudo do espectro da população portuguesa para o gene *DPYD* permitirá avaliar se as variantes presentemente disponíveis em *kits* comerciais são suficientes para uma prescrição terapêutica segura.

Referências bibliográficas:

- (1) Karczewski KJ, Daneshjou R, Altman RB. Chapter 7: Pharmacogenomics. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(12):e1002817. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002817>. Epub 2012 Dec 27
- (2) Brito M. A farmacogenética e a medicina personalizada. *Saúde & Tecnologia.* 2015 Nov 1;14:5-10. <https://doi.org/10.25758/set.1214>
- (3) Belle DJ, Singh H. Genetic factors in drug metabolism. *Am Fam Physician.* 2008 Jun 1;77(11):1553-60. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2008/0601/p1553.html>
- (4) Chang MT, McCarthy JJ, Shin J. Clinical application of pharmacogenetics: focusing on practical issues. *Pharmacogenomics.* 2015;16(15):1733-41. <https://doi.org/10.2217/pgs.15.112>
- (5) Cashman JR. Human flavin-containing monooxygenase (form 3): polymorphisms and variations in chemical metabolism. *Pharmacogenomics.* 2002 May;3(3):325-39. <https://doi.org/10.1517/14622416.3.3.3250>
- (6) Motika MS, Zhang J, Cashman JR. Flavin-containing monooxygenase 3 and human disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007 Dec;3(6):831-45. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.6.831>
- (7) Hisamuddin IM, Wehbi MA, Chao A, et al. Genetic polymorphisms of human flavin monooxygenase 3 in sulindac-mediated primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 15;10(24):8357-62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1073>
- (8) Hisamuddin IM, Wehbi MA, Schmotzer B, et al. Genetic polymorphisms of flavin monooxygenase 3 in sulindac-induced regression of colorectal adenomas in familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Oct;14(10):2366-9. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0312>
- (9) Skovby F, Gaustadnes M, Mudd SH. A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2010 Jan;99(1):1-3. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.09.009>
- (10) Cozar M, Urreiziti R, Vilarinho L, et al. Identification and functional analyses of CBS alleles in Spanish and Argentinian homocystinuric patients. *Hum Mutat.* 2011 Jul;32(7):835-42. <https://doi.org/10.1002/humu.21514>
- (11) Alcaide P, Krijt J, Ruiz-Sala P, et al. Enzymatic diagnosis of homocystinuria by determination of cystathionine-β-synthase activity in plasma using LC-MS/MS. *Clin Chim Acta.* 2015 Jan 1;438:261-5. Epub 2014 Sep 16. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.09.009>
- (12) Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, et al. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Apr;21(4):237-42. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833c6107>
- (13) Wigmore PM, Mustafa S, El-Beltagy M, et al. Effects of 5-FU. *Adv Exp Med Biol.* 2010;678:157-64. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6306-2_20



- (14) Kunicka T, Prochazka P, Krus I, et al. Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma. *BMC Cancer*. 2016 Oct 12;16(1):795. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2826-8>
- (15) Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*. 1989 Apr;16(4):215-37. <https://doi.org/10.2165/00003088-198916040-00002>
- (16) Mattison LK, Soong R, Diasio RB. Implications of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2002 Jul;3(4):485-92. <https://doi.org/10.1517/14622416.3.4.485>
- (17) Botticelli A, Borro M, Onesti CE, et al. Degradation Rate of 5-Fluorouracil in Metastatic Colorectal Cancer: A New Predictive Outcome Biomarker? *PLoS One*. 2016 Sep 22;11(9):e0163105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163105>
- (18) Beck A, Etienne MC, Chéradame S, et al. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer*. 1994;30A(10):1517-22. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(94\)00216-r](https://doi.org/10.1016/0959-8049(94)00216-r)
- (19) van Kuilenburg AB, van Lenthe H, van Gennip AH. Activity of pyrimidine degradation enzymes in normal tissues. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2006;25(9-11):1211-4. <https://doi.org/10.1080/15257770600894576>
- (20) Diasio RB, Lu Z. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1994 Nov;12(11):2239-42. <https://doi.org/10.1200/JCO.1994.12.11.2239>
- (21) Milano G, McLeod HL. Can dihydropyrimidine dehydrogenase impact 5-fluorouracil-based treatment? *Eur J Cancer*. 2000 Jan;36(1):37-42. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(99\)00211-7](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(99)00211-7)
- (22) Protein summary - Homo_sapiens. Ensembl genome browser 109 (online). [consult. 10/7/2023]. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSNG00000188641;r=1:97077743-97995000;t=ENST00000370192
- (23) Donadio MDS, Carraro DM, Torrezan GT, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) polymorphisms knocking on the door. *Ecancermedicalscience*. 2022 Jan 17;16:1344. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2022.1344>
- (24) Amstutz U, Froehlich TK, Largiadèr CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics*. 2011 Sep;12(9):1321-36. <https://doi.org/10.2217/pgs.11.72>
- (25) Mikhail SE, Sun JF, Marshall JL. Safety of capecitabine: a review. *Expert Opin Drug Saf*. 2010 Sep;9(5):831-41. <https://doi.org/10.1517/14740338.2010.511610>
- (26) Meta-Analysis Group In Cancer; Lévy E, Piedbois P, Buyse M, et al. 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. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.11.3537>
- (27) European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Product Information as approved by the CHMP on 30 April 2020, pending endorsement by the European Commission. Annex III - Amendments to relevant sections of the product information. (EMA/CHMP/171789/2020). https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/fluorouracil-fluorouracil-related-substances-article-31-referral-annex-iii_en.pdf
- (28) Infarmed. Circular Informativa N.º 072/CD/550.20.001, de 18/03/2020. Fluorouracilo, capecitabina, tegafur e flucitossina - novas recomendações de segurança. https://www.infarmed.pt/web/infarmed/profissionais-de-saude/-/journal_content/56/15786/3588548
- (29) Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS, et al. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2015 Dec;16(16):1639-50. <https://www.infarmed.pt/documents/15786/3464134/Fluorouracilo%2C+cap+ecitabina%2C+tegafur+e+flucitossina++novas+recomenda%3%A7%3B%25es+de+seguran%3%A7a/ddd03a4-bcc9-e300-c4ff-758af81944f5>
- (30) Sharma BB, Rai K, Blunt H, et al. Pathogenic DPYD Variants and Treatment-Related Mortality in Patients Receiving Fluoropyrimidine Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncologist*. 2021 Dec;26(12):1008-16. <https://doi.org/10.1002/onco.13967>
- (31) Offer SM, Wegner NJ, Fossum C, et al. Phenotypic profiling of DPYD variations relevant to 5-fluorouracil sensitivity using real-time cellular analysis and in vitro measurement of enzyme activity. *Cancer Res*. 2013 Mar 15;73(6):1958-68. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3858>
- (32) Offer SM, Fossum CC, Wegner NJ, et al. Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer Res*. 2014 May 1;74(9):2545-54. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2482>
- (33) Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM, et al. DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. *Lancet Oncol*. 2018 Nov;19(11):1459-67. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30686-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30686-7)
- (34) Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, et al. An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2021 Sep;110(3):563-72. <https://doi.org/10.1002/cpt.2350>
- (35) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Guideline for Fluoropyrimidines and DPYD [online]. [consult. 25/11/2022] <https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/>
- (36) de With M, Brufau G, van den Berg LA, et al. DPYD*7 as a Predictor of Severe Fluoropyrimidine-Related Adverse Events. *JCO Precis Oncol*. 2022 Jul;6:e2200180. <https://doi.org/10.1200/PO.22.00180>
- (37) Vreken P, Van Kuilenburg AB, Meinsma R, et al. Identification of novel point mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *J Inher Metab Dis*. 1997 Jul;20(3):335-8. <https://doi.org/10.1023/a:1005357307122>
- (38) van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res*. 2000 Dec;6(12):4705-12. <https://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/6/12/4705/2073972/df120044705.pdf>
- (39) Van Kuilenburg AB, Vreken P, Abeling NG, et al. Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum Genet*. 1999 Jan;104(1):1-9. <https://doi.org/10.1007/pl00008711>
- (40) Schwab M, Zanger UM, Marx C, et al.; German 5-FU Toxicity Study Group. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J Clin Oncol*. 2008 May 1;26(13):2131-8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.10.4182>
- (41) Terrazzino S, Cargnin S, Del Re M, et al. DPYD IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2013 Aug;14(11):1255-72. <https://doi.org/10.2217/pgs.13.116>
- (42) Meulendijks D, Cats A, Beijnen JH, et al. Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity - Ready for clinical practice? *Cancer Treat Rev*. 2016 Nov;50:23-34. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.08.002>
- (43) Kleibl Z, Fidlerova J, Kleiblova P, et al. Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Neoplasma*. 2009;56(4):303-16. https://doi.org/10.4149/neo_2009_04_303
- (44) van Kuilenburg AB, Haasjes J, Meinsma R, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency: novel mutations in the DPD gene. *Adv Exp Med Biol*. 2000;486:247-50. https://doi.org/10.1007/0-306-46843-3_48
- (45) Lachetta F, Bonelli C, Romagnani A, et al. The clinical relevance of multiple DPYD polymorphisms on patients candidate for fluoropyrimidine based-chemotherapy. An Italian case-control study. *Br J Cancer*. 2019 Apr;120(8):834-39. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0423-8>
- (46) 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. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0879-3>



- (47) Nie Q, Shrestha S, Tapper EE, et al. Quantitative Contribution of rs75017182 to Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Splicing and Enzyme Activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2017 Oct;102(4):662-70. <https://doi.org/10.1002/cpt.685>
- (48) Genome Aggregation Database (gnomAD). SNV:1-98165030-T-C(GRCh37) [online]. [consult. 25/11/2022]. https://gnomad.broadinstitute.org/variant/1-98165030-T-C?dataset=gnomad_r2_1
- (49) Zaanan A, Dumont LM, Lorient MA, et al. A case of 5-FU-related severe toxicity associated with the p.Y186C DPYD variant. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Feb;95(2):136. Epub 2013 Sep 13. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.183>
- (50) Saif MW, Lee AM, Offer SM, et al. A DPYD variant (Y186C) specific to individuals of African descent in a patient with life-threatening 5-FU toxic effects: potential for an individualized medicine approach. *Mayo Clin Proc.* 2014 Jan;89(1):131-36. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.09.008>
- (51) Offer SM, Diasio RB. Response to "A case of 5-FU-related severe toxicity associated with the P.Y186C DPYD variant". *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Feb;95(2):137. Epub 2013 Oct 9. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.207>
- (52) Kouwaki M, Hamajima N, Sumi S, et al. Identification of novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a Japanese patient with 5-fluorouracil toxicity. *Clin Cancer Res.* 1998 Dec;4(12):2999-3004. <https://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/4/12/2999/2069259/2999.pdf>
- (53) Gross E, Busse B, Riemenschneider M, et al. Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. *PLoS One.* 2008;3(12):e4003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004003>
- (54) Falvella FS, Cheli S, Martinetti A, et al. DPD and UGT1A1 deficiency in colorectal cancer patients receiving triplet chemotherapy with fluoropyrimidines, oxaliplatin and irinotecan. *Br J Clin Pharmacol.* 2015 Sep;80(3):581-8. <https://doi.org/10.1111/bcp.12631>
- (55) Božina N, Bilić I, Ganoci L, et al. DPYD polymorphisms c.496A>G, c.2194G>A and c.85T>C and risk of severe adverse drug reactions in patients treated with fluoropyrimidine-based protocols. *Br J Clin Pharmacol.* 2022 May;88(5):2190-2202. Epub 2021 Dec 6. <https://doi.org/10.1111/bcp.15144>
- (56) Cevik M, Namal E, Sener ND, et al. Investigation of DPYD, MTHFR and TYMS polymorphisms on 5-fluorouracil related toxicities in colorectal cancer. *Per Med.* 2022 Sep;19(5):435-44. <https://doi.org/10.2217/pme-2021-0047>
- (57) Vreken P, Van Kuilenburg AB, Meinsma R, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency: identification and expression of missense mutations C29R, R886H and R235W. *Hum Genet.* 1997 Dec;101(3):333-8. <https://doi.org/10.1007/s004390050637>
- (58) Khushman M, Patel GK, Hosein PJ, et al. Germline pharmacogenomics of DPYD*9A (c.85T>C) variant in patients with gastrointestinal malignancies treated with fluoropyrimidines. *J Gastrointest Oncol.* 2018 Jun;9(3):416-24. <https://doi.org/10.21037/jgo.2018.02.03>
- (59) Nie Q, Guo X, Liu H, et al. Effects of DPYD and TS gene polymorphisms on chemosensitivity of 5-FU in advanced colorectal cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2019;12(7):9380-6. <https://e-century.us/files/ijcem/12/7/ijcem0094380.pdf>
- (60) O'Donnell PH, Trubetskoy V, Nurhussein-Patterson A, et al.; Translational Breast Cancer Research Consortium (TBCRC). Clinical evaluation of germline polymorphisms associated with capecitabine toxicity in breast cancer: TBCRC-015. *Breast Cancer Res Treat.* 2020 Jun;181(3):623-33. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05603-8>
- (61) Seck K, Riemer S, Kates R, et al. Analysis of the DPYD gene implicated in 5-fluorouracil catabolism in a cohort of Caucasian individuals. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5886-92. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1784>
- (62) Teh LK, Hamzah S, Hashim H, et al. Potential of dihydropyrimidine dehydrogenase genotypes in personalizing 5-fluorouracil therapy among colorectal cancer patients. *Ther Drug Monit.* 2013 Oct;35(5):624-30. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318290acd2>
- (63) Kim W, Cho YA, Kim DC, et al. Elevated Risk of Fluoropyrimidine-Associated Toxicity in European Patients with DPYD Genetic Polymorphism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Pers Med.* 2022 Feb 6;12(2):225. <https://doi.org/10.3390/jpm12020225>
- (64) Zhao XQ, Cao WJ, Yang HP, et al. DPYD gene polymorphisms are associated with risk and chemotherapy prognosis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Tumour Biol.* 2016 Aug;37(8):10393-402. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4908-2>
- (65) Murphy C, Byrne S, Ahmed G, et al. Cost Implications of Reactive Versus Prospective Testing for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency in Patients With Colorectal Cancer: A Single-Institution Experience. *Dose Response.* 2018 Oct 1;16(4):1559325818803042. <https://doi.org/10.1177/1559325818803042>
- (66) Ensembl - genome browser [online]. Disponível em: <https://www.ensembl.org/index.html>
- (67) Institute of Medical Genetics in Cardiff. The Human Gene Mutation Database (HGMD) [online]. Disponível em: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/search.php>
- (68) De Luca O, Salerno G, De Bernardini D, et al. Predicting Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency and Related 5-Fluorouracil Toxicity: Opportunities and Challenges of DPYD Exon Sequencing and the Role of Phenotyping Assays. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 11;23(22):13923. <https://doi.org/10.3390/ijms232213923>
- (69) 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 1;53(22):5433-38. <https://europepmc.org/article/MED/8221682>
- (70) Etienne MC, Chatelut E, Pivrot X, Lavit M, Pujol A, Canal P, Milano G. Co-variables influencing 5-fluorouracil clearance during continuous venous infusion. A NON-MEM analysis. *Eur J Cancer.* 1998 Jan;34(1):92-7. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(97\)00345-6](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)00345-6)