

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SALERNO**  
**Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria**  
**“Scuola Medica Salernitana”**



**Corso di Dottorato di Ricerca in Medicina Traslazionale dello Sviluppo e  
dell'Invecchiamento Attivo**

**XXXIII CICLO**

**TESI DI DOTTORATO**

**ONCOVIGILANZA E COUNSELING FARMACOGENETICO: STRUMENTI PER  
MIGLIORARE L'APPROPRIATEZZA PRESCRITTIVA E LA COMPLIANCE DEI  
PAZIENTI ONCOLOGICI IN TRATTAMENTO CON FLUOROPIRIMIDINE IN  
REGIONE CAMPANIA**

Coordinatore

Ch.mo Prof. Palmiero Monteleone

Tutor

Ch.ma Prof.ssa Amelia Filippelli

Candidata

Dott.ssa Teresa Iannaccone

Matricola 8800900019

**Anno Accademico 2019/2020**

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Farmacogenetica in oncologia</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 Farmacogenetica delle Fluoropirimidine</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Polimorfismi del gene DPYD .....	6
1.2.3. Polimorfismi TYMS-TSER e MTHFR .....	12
<b>1.3. Analisi di fenotipizzazione</b> .....	<b>14</b>
1.3.1. Misurazione dell'attività enzimatica di DPD .....	14
1.3.2. Therapeutic Drug Monitoring (TDM) .....	15
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1. Popolazione dello studio</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2. Case Report Form, CRF</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3. Analisi molecolari</b> .....	<b>24</b>
3.3.1. Genotipizzazione .....	24
3.3.2. Stima del rapporto UH2/U .....	27
3.3.3. Quantizzazione dei livelli plasmatici di 5FU .....	28
<b>3.4. Analisi statistica</b> .....	<b>29</b>
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1. Caratteristiche della popolazione in studio</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2. Report delle ADR</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3. Presentazione dei pazienti eterozigoti DPYD</b> .....	<b>40</b>
<b>4.4. Associazione wild-type DPYD, grado di ADR e rapporto UH2/U</b> .....	<b>43</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSIONI</b> .....	<b>58</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>59</b>

## ABSTRACT

**Introduzione:** Le fluoropirimidine (FP) sono utilizzate nel trattamento dei tumori solidi e sono frequentemente associate a reazioni avverse (*Adverse Drug Reaction, ADR*) gravi. È raccomandata l'analisi di quattro polimorfismi (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*) del gene DPYD (*DPYD\*2A, DPYD\*13, DPYD c.2846A>T e c.1129-5923C> G*) che sono associati allo sviluppo di tossicità anche letale da FP. Le Linee Guida del Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (*CPIC*) e del Dutch Pharmacogenetics Working Group (*DPWG*) raccomandano di ridurre del 50% le dosi iniziali di FP negli eterozigoti e di somministrare farmaci alternativi negli omozigoti. Oltre alle varianti DPYD, sono stati proposti come fattori predittivi di tossicità da FP due SNPs nel gene codificante la MTHFR (*-C677T e -A1298C*) e uno SNP nella regione enhancer del gene codificante la TS (*TYMS-TSER*). La misurazione del rapporto plasmatico UH2/U e il Therapeutic Drug Monitoring (*TDM*) del 5FU possono essere esami fenotipici complementari alla genotipizzazione.

**Obiettivi:** Obiettivo primario è associare il programma di Oncovigilanza (raccolta delle ADR da FP) alla valutazione del valore predittivo di tossicità dei quattro SNPs DPYD raccomandati, dei due SNPs del gene MTHFR e di quello TYMS-TSER. Obiettivo secondario è analizzare il valore predittivo di tossicità delle analisi fenotipiche UH2/U e TDM.

**Materiali e metodi:** Soggetti in trattamento con FP sono stati reclutati da *Giugno 2017 a Gennaio 2020* presso l'UOC di Oncologia dell'AOU San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona di Salerno e sono stati monitorati per almeno quattro cicli di terapia. Le ADR sono state classificate secondo i criteri (*Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTC-AE versione 5.0.*). Presso il Laboratorio di Farmacogenetica dell'UOC di Farmacologia Clinica è stato eseguito il test farmacogenetico per le varianti DPYD mediante *Real-time PCR* con discriminazione allelica, per gli SNPs MTHFR-C677T e -A1298C mediante pirosequenziamento e per la variante TYMS-TSER mediante PCR ed elettroforesi su gel di agarosio. Inoltre, presso il Laboratorio di Farmacocinetica della suddetta UOC, è stato misurato il rapporto plasmatico UH2/U mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (*HPLC*) ed eseguito il TDM del 5FU mediante cromatografia liquida combinata con spettrometria di massa-tandem (*UHPLC-MS/MS*).

**Risultati:** Sono stati reclutati 150 pazienti (59% uomini e 41% donne, con un'età media di 64 anni) in trattamento con FP. Il carcinoma del colon era il più frequente (52,78%), seguito da quello gastrico e del retto. Le ADR di grado 3 e 4 maggiormente segnalate erano la neutropenia (13%) e diarrea (7%). I pazienti eterozigoti DPYD genotipizzati pretrattamento, dimezzata la dose iniziale di 5FU, non presentavano ADR gravi. Per MTHFR 1298, eterozigoti ed omozigoti registravano ADR gastrointestinali più severe rispetto ai wild-type (IC della differenza tra le medie al 95%: [-0,96; -0,13] p=0,0102). Per MTHFR 677, i pazienti con genotipo wild-type e omozigote presentavano gradi di tossicità più elevati rispetto agli eterozigoti (IC della differenza tra le medie al 95%: [-2,29; -0,75] p=0,0001 ADR ematologiche), (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,53; -0,76] p=0,0000 ADR gastrointestinali) e (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,58; -0,93] p=0,0000 ADR dermatologiche). Per TSER, i pazienti che manifestavano in media ADR più gravi erano quelli con genotipo 2R3R per le ADR neurologiche (IC della differenza tra le medie al 95%: [0,05; 0,44] p=0,0139) rispetto a quelli con genotipo 2R2R e 3R3R che, invece, avevano ADR gastrointestinali e dermatologiche più invalidanti (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,58; -0,85] p=0,0000) e (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,28; -0,58] p=0,0000). Per sei delle tossicità registrate (neutropenia, leucopenia, vomito, parestesia, disgeusia e mucosite) vi era evidenza di una relazione inversa tra i livelli di UH2/U e la gravità delle ADR (pazienti con valori del rapporto < 6 presentavano in media gradi di ADR più elevati).

**Conclusioni:** Questo studio sottolinea l'importanza di eseguire l'analisi farmacogenetica DPYD pretrattamento. I polimorfismi del gene MTHFR e TYM-TSER possono essere presi in considerazione come potenziali fattori predittivi di tossicità. Inoltre, un approccio combinato genotipizzazione/fenotipizzazione potrebbe essere un valido strumento per personalizzare la terapia con FP.

## ABSTRACT

**Introduction:** Fluoropyridines (FP) are used in the treatment of solid tumors and are frequently associated with severe Adverse Drug Reactions (ADR). It is recommended to analyse four Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the DPYD gene (*DPYD\*2A*, *DPYD\*13*, *DPYD c.2846A>T* and *c.1129-5923C>G*) which are associated to the development of life-threatening FP-toxicity. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) and the Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) Guidelines advise to reduce FP starting doses in heterozygotes by 50% and administer alternative drugs in homozygotes. Two SNPs of the MTHFR gene (*-C677T* and *-A1298C*) and another one in the enhancer region of the Thymidylate Synthetase gene (*TYM-TSER*) have been proposed as predictive factors of FP-toxicity. The UH2/U plasma ratio and the 5FU Therapeutic Drug Monitoring (TDM) can be complementary tests to the genotyping.

**Objectives:** The primary endpoint is the Oncovigilance action of FP-toxicity, and the analysis of the predictive toxicity value related to four DPYD, two MTHFR and another one TSER SNPs. The secondary endpoint is the evaluation of the predictive toxicity value of the UH2/U ratio and the TDM.

**Materials and methods:** The subjects treated with FP were recruited (*June 2017-January 2020*) at the Oncology Unit of San Giovanni di Dio and Ruggi d'Aragona Hospital in Salerno. ADRs have been classified according to the *Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTC-AE version 5.0*. DPYD variants were analysed by *Real-time PCR* with allelic discrimination, MTHFR-C677T and -A1298C by pyrosequencing and TYMS-TSER by PCR and agarose gel electrophoresis at the Pharmacogenetics Laboratory of the Clinical Pharmacology Unit. The UH2/U plasma ratio was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) and the 5FU-TDM by high performance liquid chromatography combined with mass-tandem spectrometry (UHPLC-MS/MS) at the Pharmacokinetics Laboratory of the Clinical Pharmacology Unit.

**Results:** 150 patients treated with FP were enrolled (59% men, 41% women, average age 64 years). Colon cancer was the most frequent disease (52,78%), followed by gastric and rectal cancer. The most common grade 3 and 4 ADR was neutropenia (13%) and diarrhea (7%). Pre-treatment genotyping DPYD heterozygous patients, after the reduction of 50% 5FU starting dose, had no serious ADRs. Regarding to MTHFR 1298, heterozygous and homozygous patients registered more severe gastrointestinal ADR compared to wild-type (CI at 95% [-0,96; -0,13] p=0,0102). Furthermore, MTHFR 677 wild-type and homo patients showed higher toxicity degree than heterozygous ones (CI at 95%: [-2,29; -0,75] p= 0,0001 haematological ADR), (CI at 95%: [-1,53; -0,76] p= 0,0000 gastrointestinal ADR) and (CI at 95%: [-1,58; -0,93] p= 0,0000 dermatological ADR). Finally, about TSER, 2R3R patients had on average more serious neurological ADR (CI at 95%: [0,05; 0,44] p= 0,0139) compared to 2R2R and 3R3R patients which affected by gastrointestinal and dermatological more debilitating ADR (CI at 95%: [-1,58; -0,85] p= 0,0000) and (CI at 95%: [-1,28; -0,58] p= 0,0000). There was an evidence of an inverse relationship among UH2/U levels and severity degree of ADR regarding to six toxicities (neutropenia, leukopenia, vomiting, paraesthesia, dysgeusia and mucositis).

**Conclusions:** This study emphasizes the importance of the DPYD pharmacogenetic analysis in patients naïve. The MTHFR and TYM-TSER SNPs should be considered as potential toxicity predictors. A combined genotyping/phenotyping approach could be a valuable tool to personalize the FP therapy.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Farmacogenetica in oncologia

L'indice terapeutico della maggior parte degli agenti citotossici è ancora oggi un elemento critico di sicurezza del trattamento perché l'attività farmacologica contro le cellule tumorali è associata quasi invariabilmente a fenomeni di tossicità nei confronti dei tessuti sani. I recenti progressi delle metodologie analitiche e il sequenziamento del genoma hanno permesso la scoperta di varianti alleliche di geni coinvolti nella farmacocinetica o nella farmacodinamica di molti antineoplastici. Queste alterazioni nel corredo genetico sono correlate alla variabilità di risposta ai chemioterapici sia in termini di efficacia ma soprattutto di tollerabilità (1). Le cause più frequenti di variabilità genetica consistono nella presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (*Single-Nucleotide Polymorphisms* o *SNPs*) cioè variazioni del materiale genico a carico di un unico nucleotide, per cui l'allele polimorfico risulta presente nella popolazione in una proporzione superiore all'1%; al di sotto di tale soglia si è soliti parlare di variante rara (1,2). Questi SNPs sono presenti in regioni 5'-UTR (*UnTranslated Region*, sequenza localizzata alle estremità 5' di un RNA messaggero che viene riconosciuta dal ribosoma che consente di iniziare la traduzione) e negli esoni (polimorfismi non sinonimi); sono state scoperte anche varianti introniche che alterano la trascrizione genica (*Figura 1*). Queste mutazioni possono determinare un'alterazione funzionale di proteine coinvolte nel metabolismo e/o nel meccanismo d'azione dei farmaci antineoplastici, modificando sensibilmente la tossicità o la risposta al trattamento. Lo studio della rilevanza clinica di queste mutazioni è affidato alla farmacogenetica, disciplina della farmacologia clinica (2).

**Fig 1 Cause di variabilità genetica**



Pharmacogenetics 2002; 12:555-8

Le analisi farmacogenetiche possono essere effettuate con un'ampia gamma di tecnologie adatte ad individuare le alterazioni del materiale genico con finalità diagnostico-terapeutiche. La scoperta di associazioni fra genotipi mutati e fenotipi clinici renderebbe possibile una scelta più razionale del tipo di terapia. Infatti, lo scopo della farmacogenetica è quello di stratificare i pazienti in base alla loro probabilità di rispondere alla chemioterapia e/o al rischio di sviluppare tossicità farmaco-correlata (2,3). Dato l'impatto sul Sistema Sanitario Nazionale delle tossicità gravi e/o letali nei pazienti trattati con fluoropirimidine (FP), lo sviluppo di un pannello di marcatori farmacogenetici rappresenta uno strumento di screening estremamente importante per una gestione appropriata dei pazienti oncologici (3,4).

## **1.2 Farmacogenetica delle Fluoropirimidine**

### **1.2.1 Polimorfismi del gene DPYD**

Le FP, come il 5-fluorouracile (5FU) e la capecitabina suo profarmaco orale, sono agenti antineoplastici appartenenti alla classe degli antimetaboliti. Sono comunemente usati per trattare le neoplasie solide come il cancro del colon-retto, della mammella e del distretto testa-collo, spesso in associazione ad altri chemioterapici, sia agenti citotossici che biologici (5). La somministrazione delle FP può causare reazioni avverse ai farmaci (ADR) gravi a carico del sistema ematologico e del tratto gastrointestinale ma anche tossicità cutanee e neurologiche. Le ADR che insorgono più frequentemente in corso di trattamento con questi farmaci sono mielosoppressione severa, diarrea, mucositi, sindrome mano-piede (*eritrodisestesia palmo-plantare*) e neuropatie (6). È stato stimato che un aumento del rischio di ADR gravi coinvolge il 10-30% dei pazienti trattati con FP. Sebbene sia necessario identificare e segnalare precocemente queste ADR, si registra un marcato fenomeno di under-reporting nella pratica clinica oncologica (7,8). Il rate-limiting step del catabolismo delle FP è la conversione del fluorouracile in diidrofluorouracile; questa reazione è catalizzata da un enzima denominato diidropirimidina deidrogenasi (DPD) che è codificato da un gene altamente polimorfico (DPYD). La sua attività è soggetta a un'ampia variabilità che si traduce in una possibile gamma di carenze enzimatiche, da una perdita parziale a una perdita completa di funzione (8). La prevalenza di carenza parziale e completa di DPD nell'intera popolazione è di circa il 3 %-8 % e lo 0,01%-0,3 %, rispettivamente. Sono stati rilevati più di 30 diversi polimorfismi del gene DPYD sia nella forma di eterozigote (*uno SNP su un solo allele*) che in quella di omozigote (*due SNPs identici sui due alleli*). La forma omozigote è associata ad una marcata deficienza dell'attività enzimatica rispetto a quella eterozigote e ad un maggior grado di tossicità da FP (9,10). Sono state identificate quattro varianti del gene DPYD: c.190511G> A (rs3918290, *DPYD\*2A*, p.IVS14), c.1679T> G (rs55886062, *DPYD\*13*, p. I560S), c.2846A> T

(rs67376798, p. D949V) e c.1129–5923C>G (rs75017182, p.IVS10, HapB3) che possono causare l'assenza o la riduzione dell'attività della DPD. L'attività enzimatica è normale per il genotipo wild-type o non mutato (DPYD\*1), ridotta dal 30% al 70% per le varianti c.2846A>T e c.1129-5923C>G e c'è perdita completa di attività per le varianti DPYD\*2A e DPYD\*13 (Figura 2). La variante più comune con una frequenza allelica del 4% è quella c.1129–5923C>G; invece, le varianti DPYD\*2A, c.2846A>T e DPYD\*13 sono presenti rispettivamente nel 2%, 1,4% e 0,1% della popolazione caucasica (8,9,10).

La mutazione DPYDc.190511G>A, nota anche come DPYD\*2A, rende conto di circa il 50% di tutte le deficienze di DPD e il suo ruolo come fattore predittivo di farmaco-tossicità è stato ampiamente dimostrato (8,11). Questa mutazione consiste nella sostituzione della guanina (G) in posizione 1986 con una adenina (A) all'estremità 5' dell'introne 14, impedendo il riconoscimento del sito durante lo splicing del pre-mRNA (trascritto primario) e causando la delezione dell'intero esone 14 con perdita di 164 paia di basi. Vengono in questo modo persi circa 55 residui amminoacidici, dal 581 al 635, nella sequenza primaria della DPD, generando una proteina tronca e cataliticamente inattiva (11). Nella condizione di eterozigosi per la mutazione nel sito di splicing si riscontra una riduzione dell'attività della DPD che diventa completa negli omozigoti, determinando lo sviluppo di grave tossicità nei soggetti trattati con 5FU (12). Una riduzione della dose iniziale di capecitabina o di 5FU pari al 50% della dose standard ha dimostrato di ridurre il rischio di una grave tossicità negli eterozigoti; in un genotipo omozigote, invece, l'uso delle FP è altamente sconsigliato (12).

La mutazione DPYD 1679T>G, nota anche come DPYD\*13, si caratterizza per la sostituzione amminoacidica Ile560Ser nel sito di legame per la flavina adenina dinucleotide (FAD), interferendo con il legame dell'enzima con questo cofattore. La conseguenza funzionale di questa variante non è ancora ben nota ma sembra determinare destabilizzazione in una regione sensibile dell'enzima (9,13). Si prevede che un genotipo eterozigote per c.1679T>G abbia una riduzione del 40-50% dell'attività della DPD mentre la variante in omozigosi comporterebbe una perdita di attività di circa il 75% con un'inattivazione enzimatica quasi completa. Questo SNP aumenta il rischio di tossicità grave globale di circa quattro volte e, di circa nove e cinque volte rispettivamente il rischio di tossicità ematologica e gastrointestinale. Per i pazienti eterozigoti si raccomanda una riduzione del dosaggio iniziale di Capecitabina o 5FU del 50% (13,14).

Il polimorfismo DPYD c.2846A>T determina un cambiamento amminoacidico Asp949Val localizzato in prossimità di un cluster ferro-zolfo della DPD, interferendo con il legame al cofattore o con il trasporto di elettroni. In omozigosi, questo SNP comporta una riduzione di circa il 50% dell'attività enzimatica rispetto alla forma wild-type, mentre in eterozigosi comporta una riduzione del 25%. Questo

suggerisce che, nonostante l'attività enzimatica sia ridotta, non è comunque paragonabile alla riduzione che si verifica nelle mutazioni DPYD\*2A e DPYD\*13 (8,9). Sebbene ci siano meno dati disponibili, è stata dimostrata una correlazione tra questa variante polimorfica e tossicità grave da FP. Pertanto, negli eterozigoti devono essere analizzate le condizioni cliniche del singolo paziente, per ridurre la dose del 25% o se, c'è un alto rischio di tossicità, del 50% (10,14).

Le varianti del gene DPYD che possono predire la tossicità da FP possono essere localizzate in regioni non codificanti come l'aplotipo (*Haplotype, Hap*) B3 legato ad una variante nell'introne 10 nota come DPYD c.1129-5923C>G (*rs75017182*). Lo splicing aberrante sul pre-mRNA determina l'inserimento di un frammento di 44 paia di basi all'interno di un mRNA maturo, con la formazione di un codone di stop precoce (8,15). Tale SNP costituisce l'assetto genotipico HapB3 insieme al polimorfismo c.1236G>A (*rs56038477*); quest'ultimo si verifica nell'esone 11 sotto forma di una variante in linkage completo con il polimorfismo c.1129-5923C>G nell'introne 10 (15). La produzione di mRNA normale non è stata completamente abolita, indicando che l'efficacia di splicing per produrre mRNA di tipo wild-type è ridotta ma non del tutto assente. Nei pazienti eterozigoti, una riduzione della dose del 50% sarebbe eccessiva poiché la presenza di c.1236G>A/HapB3 non causa la produzione di un enzima completamente disfunzionante. Una riduzione del dosaggio iniziale del 25% sembra ragionevole per evitare sia l'aumentato rischio di tossicità sia per prevenire il sotto-dosaggio; nei pazienti che non tollerano la dose iniziale la posologia deve essere ridotta del 50% (14,15).



**Fig 2 Varianti DPYD note stratificate in base al livello di evidenza sull'associazione dell'attività enzimatica DPD con la tossicità da FP**

Level of evidence DPD enzyme activity	Sufficient evidence <sup>a</sup>	Insufficient evidence <sup>b</sup>
Fully functional <sup>c</sup>	<i>DPYD</i> *5 = c.1627A>G <i>DPYD</i> *9A = c.85T>C	<i>DPYD</i> *4 = c.1601G>A <i>DPYD</i> *6 = c.2194G>A <i>DPYD</i> *9B = c.[85T>C;2657G>A] <i>DPYD</i> *11 = c.1003 G > T c.496A>G c.1896T>C c.1129-15T>C (IVS10-15T>C)
Reduced functionality <sup>d</sup>	c.2846A>T c.[1236G>A;1129-5923C>G] (hapB3) <sup>e</sup>	
Fully dysfunctional <sup>f</sup>	<i>DPYD</i> *2A = c.1905 + 1G>A <i>DPYD</i> *13 = c.1679T>G	<i>DPYD</i> *3 = c.1898del <i>DPYD</i> *7 = c.299_302del <i>DPYD</i> *8 = c.703C>T <i>DPYD</i> *10 = c.2983G>T <i>DPYD</i> *12 = c.[62 G > A;1156 G > T] c.1651G>A c.300 C>A <sup>g</sup> c.1024 G>A <sup>g</sup> c.1025 A>G <sup>g</sup> c.1475 C>T <sup>g</sup> c.1774C>T <sup>g</sup> c.(2058+1_2059-1)_(2299+1_2300-1) dup c.257C>T <sup>g</sup>

The variants in this table were selected based on literature in Supplementary Table 1 and 2. However high allele frequency variants reported only in case reports with fluoropyrimidine toxicity were excluded. For these variants the association with DPD enzyme activity, and resulting severe fluoropyrimidine-induced toxicity, cannot be determined.

<sup>a</sup>DPWG has concluded an association between fully functional variants and no resulting toxicity, and an association between reduced functionality variants or fully dysfunctional variants and association with the onset of severe fluoropyrimidine-induced toxicity

<sup>b</sup>DPWG has concluded there is insufficient evidence to associate a predicted DPD enzyme activity for these variants and the onset of severe fluoropyrimidine-induced toxicity

<sup>c</sup>These variants are not included in the prospective *DPYD* genotyping panel, as there is no effect on predicted DPD enzyme activity, and therefore there is no association with the onset of severe fluoropyrimidine-induced toxicity

<sup>d</sup>The effect of the variant on the protein sequence suggests that the protein may still be partially functional. Therefore residual metabolic DPD capacity may be present

<sup>e</sup>Variant c.1236G>A, which does not lead to an alternative amino acid, is in complete linkage disequilibrium with variant c.1129-5923C>G, which leads to aberrant splicing in mRNA, which leads to a premature stop codon as a result. The resulting DPD enzyme activity is 50% of the normal activity. Both variants are part of haplotype B3

<sup>f</sup>The effect of the variant on the protein sequence suggests that the protein may be fully dysfunctional

<sup>g</sup>These variants have decreased in vitro enzyme activity

*Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene–drug interaction of DPYD and fluoropyrimidines, European Journal of Human Genetics*2020: 28, 508–517.

### 1.2.2. Linee Guida CPIC e DPWG

Il Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) e il Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) hanno pubblicato delle linee guida per il dosaggio delle FP basate sullo screening farmacogenetico dei quattro polimorfismi sopramenzionati; l'associazione genotipo DPYD/fenotipo DPD ha lo scopo di ridurre il rischio di grave tossicità da FP. Il fenotipo DPD viene assegnato utilizzando un punteggio di attività genica (*DPYD-Activity Score, AS*) basato sulla funzionalità degli alleli DPYD e calcolato come la somma dei due punteggi più bassi della singola variante genica (16,17).

I portatori di due varianti senza funzione o di una variante senza funzione e una con funzione ridotta sono classificati come *metabolizzatori lenti o poveri (DPYD-AS:0 o 0.5)*; i portatori di una variante normale con una senza funzione o una con funzione ridotta sono considerati *metabolizzatori intermedi (DPYD-AS: 1 o 1.5)* e quelli con le sole varianti a funzione normale (*DPYD-AS: 2*) sono identificati come *metabolizzatori normali o estensivi (16,17) (Figura 3)*.

**Fig 3 Assegnazione dei fenotipi DPD sulla base dei genotipi DPYD**

Likely phenotype	Activity score <sup>a</sup>	Genotypes <sup>b</sup>	Examples of genotypes <sup>c</sup>
DPYD normal metabolizer	2	An individual carrying two normal function alleles.	c.[ = ]:[ = ], c.[85T>C];[ = ], c.[1627A>G];[ = ]
DPYD intermediate metabolizer	1 or 1.5	An individual carrying one normal function allele plus one no function allele or one decreased function allele, or an individual carrying two decreased function alleles.	c.[1905+1G>A];[ = ], c.[1679T>G];[ = ], c.[2846A>T];[ = ]; c.[1129-5923C>G];[ = ] <sup>d</sup> ; c.[1129-5923C>G];[1129-5923C>G] <sup>d</sup> ; c.[2846A>T];[2846A>T]
DPYD poor metabolizer	0 or 0.5	An individual carrying two no function alleles or an individual carrying one no function plus one decreased function allele.	c.[1905+1G>A];[1905+1G>A], c.[1679T>G];[1679T>G], c.[1905+1G>A];[2846A>T] c.[1905+1G>A]; [1129-5923C>G]

<sup>a</sup>Calculated as the sum of the two lowest individual variant activity scores. See text for further information. <sup>b</sup>Allele definitions, assignment of allele function and references can be found on the CPIC website (*DPYD Allele Functionality Table* available at [ref 4]) <sup>c</sup>HGVS nomenclature using the reference sequence NM\_000110.3 <sup>d</sup>Likely HapB3 causal variant. See *DPYD Allele Functionality Table* available at [ref 4] for other HapB3 proxy SNPs.

[https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/Update february 2020](https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/Update%20february%2020)

Il CPIC, in accordo con il DPWG, ha fornito delle raccomandazioni sulle dosi di FP sulla base del fenotipo DPD (*Figura 4*).

**Fig 4 Dosi delle FP raccomandate in rapporto al fenotipo DPD**

Phenotype	Implications for phenotypic measures	Dosing recommendations	Classification of recommendations <sup>b</sup>
DPYD normal metabolizer	Normal DPD activity and "normal" risk for fluoropyrimidine toxicity.	Based on genotype, there is no indication to change dose or therapy. Use label-recommended dosage and administration.	Strong
DPYD intermediate metabolizer	Decreased DPD activity (leukocyte DPD activity at 30% to 70% that of the normal population) and increased risk for severe or even fatal drug toxicity when treated with fluoropyrimidine drugs.	Reduce starting dose based on activity score followed by titration of dose based on toxicity <sup>c</sup> or therapeutic drug monitoring (if available). <b>Activity score 1:</b> Reduce dose by 50% <b>Activity score 1.5:</b> Reduce dose by 25% to 50%	<b>Activity score 1:</b> Strong <b>Activity score 1.5:</b> Moderate
DPYD poor metabolizer	Complete DPD deficiency and increased risk for severe or even fatal drug toxicity when treated with fluoropyrimidine drugs.	<b>Activity score 0.5:</b> Avoid use of 5-fluorouracil or 5-fluorouracil prodrug-based regimens. In the event, based on clinical advice, alternative agents are not considered a suitable therapeutic option, 5-fluorouracil should be administered at a strongly reduced dose <sup>d</sup> with early therapeutic drug monitoring. <sup>e</sup> <b>Activity score 0:</b> Avoid use of 5-fluorouracil or 5-fluorouracil prodrug-based regimens.	Strong

<sup>a</sup>5-fluorouracil or capecitabine. <sup>b</sup>Rating scheme described in Supplement. <sup>c</sup>Increase the dose in patients experiencing no or clinically tolerable toxicity in the first two cycles to maintain efficacy; decrease the dose in patients who do not tolerate the starting dose to minimize toxicities. <sup>d</sup>If available, a phenotyping test (see main text for further details) should be considered to estimate the starting dose. In the absence of phenotyping data, a dose of <25% of the normal starting dose is estimated assuming additive effects of alleles on 5-FU clearance. <sup>e</sup>Therapeutic drug monitoring should be done at the earliest timepoint possible (e.g., minimum timepoint in steady state) in order to immediately discontinue therapy if the drug level is too high.

[https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/Update february 2020](https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/Update%20february%2020)

I *metabolizzatori intermedi* devono ricevere dosi iniziali ridotte, con titolazione della dose e monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche di farmaco (*Therapeutic Drug Monitoring, TDM*). Negli eterozigoti di varianti senza funzione (*DPYD-AS di 1*) va ridotta la dose iniziale del 50%; in quelli con varianti a ridotta funzione (*DPYD-AS di 1.5*), si può ridurre la dose iniziale del 25% o, in caso di alto rischio di tossicità, del 50% (16,17,18).

Nei *metabolizzatori lenti* (*DPYD-AS di 0,5 o 0*) con un alto rischio di tossicità anche letale è fortemente raccomandato di evitare l'uso delle FP. Tuttavia, se altri regimi chemioterapici non sono considerati un'opzione adeguata, le FP vanno somministrate ad una dose fortemente ridotta, inferiore al 25%. In questi casi, il TDM deve essere effettuato il più presto possibile e la terapia deve essere interrotta immediatamente se il livello plasmatico del farmaco è troppo elevato. Per questi pazienti un test fenotipico dovrebbe essere preso in considerazione per personalizzare la dose iniziale (16,17,19).

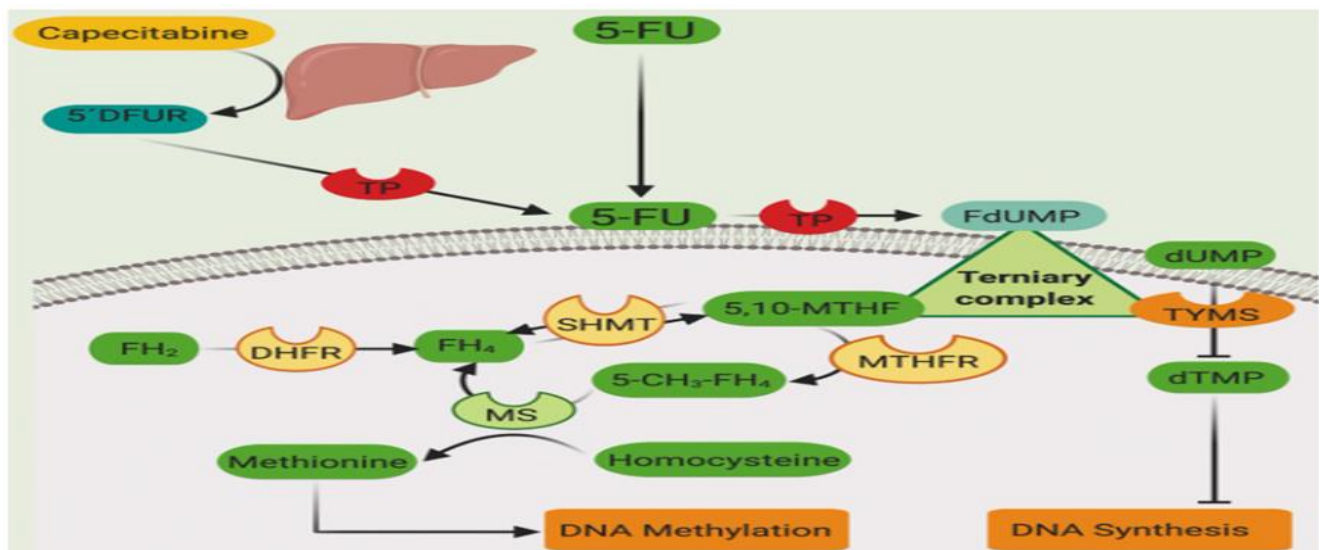
Il Comitato di Valutazione dei Rischi per la Farmacovigilanza (PRAC) dell'European Medicines Agency (EMA) il 30 aprile 2020 ha comunicato che i pazienti, prima di iniziare la terapia con il 5FU o con capecitabina e tegafur, vanno sottoposti al test farmacogenetico DPYD (20,21); il 7 luglio 2020 è stato definitivamente raccomandato di effettuare il test del genotipo e/o fenotipo pretrattamento con 5FU. Pertanto, l'uso delle FP è controindicato in pazienti con deficit completo noto di DPD, in quelli

con deficit parziale noto di DPD va presa in considerazione una dose iniziale di 5FU ridotta secondo le Linee Guida (20,21).

### 1.2.3. Polimorfismi *TYMS-TSER* e *MTHFR*

Non tutti i pazienti portatori di una delle quattro varianti *DPYD* raccomandate sviluppa gravi ADR; la tossicità farmaco-correlata può essere legata anche alla presenza di polimorfismi in altri geni coinvolti nel pathway del 5FU (Figura 5). Due polimorfismi nel gene della 5,10-Metilenetetraidrofolato Reduttasi (*MTHFR*) e una ripetizione in tandem nella regione di potenziamento del gene della Timidilato Sintasi (*TYMS*) potrebbero concorrere nel predire la tossicità correlata a questi chemioterapici (22).

**Fig 5 Geni coinvolti nel pathway del 5FU**



*Anticancer Research August 2020, 40 (8) 4263-4270; DOI: <https://doi.org/10.21873/anticancerres.14428>*

### *Timidilato Sintasi (TS)*

La TS è un enzima chiave nella sintesi dei nucleotidi ed è il bersaglio del 5FU. La sua espressione può essere influenzata da diverse varianti geniche ma soltanto una è fortemente connessa alla risposta alla terapia con FP; questa variante è caratterizzata da una variazione nel numero di ripetizioni (2 o 3) di una sequenza di 28 basi situata nel promotore del gene *TYMS* chiamata *TSER 28bp VNTR* (rs45445694), dove per *TSER* si intende *Thymidylate Synthase promoter Enhancer Region* e per *VNTR* *Variable Number of Tandem Repeats* (23). I livelli di espressione del gene *TYMS* nei tessuti tumorali sono associati alla risposta in termini di efficacia ma soprattutto di tollerabilità al 5FU. Pazienti con

genotipo TSER 2R/2R (omozigote wild-type) presentano tossicità grave di tipo ematologico e gastroenterologico anche a basse dosi di FP; in questi soggetti si registra la percentuale più alta di anemia e diarrea di grado 3 rispetto ai genotipi TSER 2R/3R (eterozigote) e TSER 3R/3R (omozigote mutato) (24). Sebbene a rischio di gravi ADR, gli omozigoti per la variante caratterizzata da 2 sequenze ripetute rispetto a quelli con 3 ripetizioni tandem sembrano rispondere meglio al trattamento con 5FU, presentando livelli più bassi dell'enzima TS. Pazienti eterozigoti e omozigoti mutati, invece, presentando un livello più alto di espressione dell'mRNA e dell'enzima, sembrano mostrare una scarsa risposta alle FP ma minore farmaco-tossicità (25,26).

#### *Metilenetetraidrofolato Reduttasi (MTHFR)*

MTHFR è il principale enzima coinvolto nella conversione del 5,10-metilenetetraidrofolato a 5-metilenetetraidrofolato; quest'ultimo permette la rimetilazione dell'omocisteina a metionina richiesta per la metilazione dell'acido nucleico. Il 5,10-metilenetetraidrofolato è anche uno dei componenti del complesso ternario di inibizione della TS insieme al deossiridilmonofosfato (5-dUMP). Pertanto, le varianti del gene MTHFR sono responsabili dei livelli di 5,10-metilenetetraidrofolato e possono svolgere un ruolo importante nell'attività citotossica del 5FU (22,27). Sono stati identificati due polimorfismi responsabili dell'alterazione dell'attività enzimatica di MTHFR: 677C>T e 1298A>C. La variante 677C>T consiste in una sostituzione della citosina con la timina alla posizione 677, determinando lo scambio di alanina con valina al residuo 222 del sito catalitico dell'enzima. La variante 1298A>C è caratterizzata dalla sostituzione di glutammina con alanina nel codone 429 del dominio di regolazione enzimatico (27). Entrambi i polimorfismi sono stati associati ad una ridotta attività dell'enzima MTHFR, con conseguente incremento dei livelli di omocisteina ed alterazione della distribuzione intracellulare dei folati. Essendo i folati target del trattamento con FP, tali polimorfismi possono alterare il risultato clinico di una terapia con questi farmaci. Inoltre, queste due varianti di MTHFR possono aumentare la tossicità di 5FU incrementando i livelli intracellulari di 5,10-metilenetetraidrofolato e rendendo maggiormente stabile il complesso ternario (28,29).

### **1.3. Analisi di fenotipizzazione**

#### ***1.3.1. Misurazione dell'attività enzimatica di DPD***

Il genotipo DPYD e l'attività enzimatica della DPD sono solo moderatamente correlati; molti pazienti eterozigoti DPYD possono presentare una normale attività della DPD e possono essere diagnosticati come falsi positivi. Il test di genotipizzazione DPYD può quindi predire un deficit enzimatico ma soltanto un test di fenotipizzazione può misurare l'attività di DPD in vivo (9,10). Infatti, il deficit enzimatico può essere causato anche da fattori che non modificano i livelli di espressione genica come i polimorfismi non sinonimi e le interazioni con farmaci inibitori della DPD come la sorivudina e brivudina (30). Una carenza completa o parziale della DPD può essere valutata misurando l'attività enzimatica tissutale o cellulare oppure tramite il dosaggio dei livelli plasmatici di prodotti del metabolismo del 5FU. La valutazione dell'attività della DPD nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) è stata impiegata come parametro indicativo della tollerabilità al 5FU, in quanto correlata all'attività enzimatica nel tessuto epatico (31). L'impiego di questo metodo nella pratica clinica risulta piuttosto complesso in quanto prevede l'incubazione ex vivo delle PBMCs con 5FU radiomarcato e la successiva determinazione del catabolita risultante mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) (31,32). Numerosi fattori possono ridurre l'accuratezza dei risultati di questo test, quali la manipolazione ed il processamento del campione, l'instabilità in ambiente acquoso del prodotto di reazione e l'eterogeneità cellulare in quanto l'attività enzimatica varia tra monociti, linfociti e neutrofili (32). La misurazione dei livelli endogeni di 5,6-diidrouracile (UH2) e uracile (U) nel plasma mediante HPLC risulta, invece, un metodo di fenotipizzazione più affidabile; l'U è fisiologicamente metabolizzato a UH2 ad opera della DPD e la valutazione del rapporto UH2/U misura indirettamente l'attività dell'enzima (33). Si ritiene che soltanto un basso rapporto plasmatico possa essere un buon fattore predittivo di tossicità, in quanto il valore diminuirebbe con il numero di alleli non funzionali, determinando un completo deficit della DPD. Un valore di tale rapporto inferiore a 1,8 aiuterebbe a identificare i pazienti a più alto rischio di tossicità da FP, tuttavia non è ancora stata fissata una soglia cut-off (33,34). È dimostrato che l'associazione del rapporto UH2/U con la genotipizzazione DPYD può essere un approccio più accurato rispetto al singolo test farmacogenetico (35).

### 1.3.2. Therapeutic Drug Monitoring (TDM)

Il monitoraggio plasmatico delle FP è un ulteriore metodo di fenotipizzazione utilizzato per ottimizzare la dose di 5FU con lo scopo di ridurre le tossicità. Le FP hanno una significativa variabilità farmacocinetica interindividuale in quanto la loro clearance è in funzione della superficie corporea e del peso del soggetto (36,37). Il TDM misura l'area sottesa alla curva (AUC, area under the time/concentration curve) allo stato stazionario (circa 2 ore dopo la somministrazione del 5FU) e richiede la raccolta di campioni di sangue a tempi diversi (37,38). I livelli plasmatici di 5FU allo stato stazionario per una AUC da 20 a <24 mgxhxL<sup>-1</sup> (Figura 6) dovrebbero essere compresi tra 2500-3000 µg/L; concentrazioni più basse o più alte richiedono un aggiustamento della dose (37,38).

**Fig 6 Aggiustamento della dose in base ai livelli plasmatici di 5-FU**

<b>5-FU Plasma Concentration (µg/L)</b>	<b>AUC (mg×h×L<sup>-1</sup>)</b>	<b>5-FU Dose Adjustment (± % of previous dose)</b>
< 500	<4	70
500-1000	4 to < 8	50
1000-1200	8 to < 10	40
1200-1500	10 to < 12	30
1500-1800	12 to < 15	20
1800-2200	15 to < 18	10
2200-2500	18 to < 20	5
2500-3000	20 to < 24	Unchanged
3000-3500	24 to < 28	-5
3500-3700	28 to < 31	-10
>3700	> 31	-15

Per i pazienti genotipizzati DPYD in trattamento con FP è raccomandato il TDM perché questa metodica può fornire ulteriori informazioni sulla efficacia e sulla sicurezza della dose iniziale (39,40).

## 2. OBIETTIVI

- Analizzare la frequenza dei quattro polimorfismi *DPYD* raccomandati dalle Linee Guida per valutarne la correlazione con le tossicità da fluoropirimidine registrate nella nostra casistica.
- Ricercare nei pazienti wild-type (non portatori delle quattro varianti *DPYD*) la potenziale predittività di altri polimorfismi nei geni *MTHFR* e *TYMS-TSER* in termini di tossicità da fluoropirimidine.
- Verificare l'utilità di associare ai test genotipici analisi di fenotipizzazione come il rapporto *UH2/U* e il *TDM*.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Popolazione dello studio

Presso il Laboratorio di Farmacogenetica dell'UOC di Farmacologia Clinica dell'AOU San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona di Salerno da *giugno 2017* sono stati screenati per i quattro polimorfismi DPYD raccomandati più di 400 pazienti. Di questi, 150 sono stati monitorati costantemente per almeno quattro cicli di chemioterapia (*fino a gennaio 2020*) e rappresentano il nostro campione. Questo studio, approvato dal Comitato Etico Campania Sud con Parere Unico N.65 r.p.s.o., è ancora in corso.

Sono stati reclutati soggetti naïve o già in trattamento con le FP (in monoterapia o in associazione con altri farmaci citotossici e/o biologici) con un'età superiore a 18 anni ed afferenti all'UOC di Oncologia della suddetta AOU. Sono stati esclusi i malati oncologici eleggibili al trattamento con questi chemioterapici che non hanno firmato il consenso o che presentavano al momento dell'arruolamento una grave insufficienza epatica e/o renale che ne comprometteva le capacità metaboliche e/o escretive. Tutti i soggetti sono stati informati sugli obiettivi e sulle procedure di analisi dei quattro polimorfismi DPYD raccomandati ed hanno firmato un apposito modulo di consenso informato per lo screening farmacogenetico (*Figura 7*) e per la registrazione, in forma anonima, dei dati demografici, anamnestici e clinici.

**Fig 7 Modulo di acquisizione del consenso informato per lo screening dei polimorfismi del gene DPYD**

**Azienda Ospedaliera Universitaria  
San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona – Salerno**

UOC di Farmacologia Clinica  
Laboratorio di Farmacogenetica  
Resp. Prof.ssa Amelia Filippelli

**MODULO DI ACQUISIZIONE DEL CONSENSO INFORMATO PER LO SCREENING DEI POLIMORFISMI:  
DPYD\*18, DPYD\*2A, o.2848A\*T e o.1128-6825C>0 per il dosaggio della chemioterapia con fluoropirimidine**

**DATI RELATIVI ALLA PAZIENTE**

COGNOME \_\_\_\_\_ NOME \_\_\_\_\_  
DATA DI NASCITA \_\_\_\_\_ LUOGO DI NASCITA \_\_\_\_\_  
Diagnosi o indirizzo diagnostico: \_\_\_\_\_

**INFORMAZIONI FORNITE**

**Sono stata fornita tutte le informazioni relative a:**

1) - Diagnosi ed orientamento diagnostico
2) - Prognosi e aspettative migliorative del trattamento
3) - Modalità di esecuzione dell'atto terapeutico e/o diagnostico e/o riabilitativo
4) - Eventuali rischi e/o complicanze (anche in riferimento all'eventuale concomitanza di altre patologie)
5) - Eventuali alternative diagnostico-terapeutiche al trattamento proposto (comprese loro aspettative migliorative e rischi e complicanze)
6) - Conseguenze prevedibili alla mancata esecuzione dell'atto diagnostico e/o terapeutico e/o riabilitativo proposto

Inoltre,  
 Sono state trasmesse verbalmente alla paziente - ovvero a chi esercita la potestà genitoriale - ovvero al rappresentante legale (amministratore di sostegno, tutore, curatore) - informazioni sulla procedura proposta (identificazione dei quattro polimorfismi raccomandati finalizzata a stabilire il dosaggio più appropriato per la chemioterapia con fluoropirimidine.

Si fa firmare per presa visione sul modulo predisposto dall'Unità Operativa, del quale viene trattenuta copia controllata della paziente.

EVENTUALI ANNOTAZIONI: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Firma e timbro del Medico (oppure richiesta medica allegata) \_\_\_\_\_

Verificato comunque che l'ita destinataria dell'informazione ha compreso il significato delle informazioni ed è consapevole dei rischi e dei benefici dell'atto terapeutico e/o diagnostico e/o riabilitativo proposto, si procede ad acquisire il consenso.

HO BEN COMPRESO QUANTO MI È STATO SPIEGATO DAL DOTT./DOTT.SSA \_\_\_\_\_

**QUINDI ACCONSENTO**  
ALL'EFFETTUAZIONE PRESSO QUESTA STRUTTURA DELL'ATTO TERAPEUTICO  
E/O DIAGNOSTICO E/O RIABILITATIVO PROPOSTO

Che verrà effettuato da Cognome e Nome (stampatello): \_\_\_\_\_

Firma della paziente (se maggiorenne e capace di intendere e volere) \_\_\_\_\_

Firma dei genitori o di chi esercita la tutela, verificata la loro identità (in caso di pu minorenni) \_\_\_\_\_

Firma del tutore o curatore o amministratore di sostegno (verificata la sua identità ed acquisita copia del provvedimento di tutela, curatela o amministrazione di sostegno) \_\_\_\_\_

Eventuale firma della paziente (in caso di curatela o amministrazione) \_\_\_\_\_

**NOTA:** Il trattamento dei dati personali sensibili è conforme a quanto previsto dal D.Lgs. 30/06/2003 n. 196 "Codice dei dati personali sensibili" e, in particolare, a quanto previsto nella autorizzazione generale del Garante al trattamento dei dati genetici (GU n.65 del 19-3-2007).  
Copia del presente consenso informato e della Informativa trattamento dati personali mi viene consegnata.

Data: \_\_\_\_\_ Firma della paziente \_\_\_\_\_

### 3.2. Case Report Form, CRF

I dati demografici, anamnestici e clinici dei pazienti reclutati sono stati registrati in una scheda di raccolta dati (*Case Report Form, CRF*) redatta ad hoc per il progetto (*Figura 8*) e sono stati collezionati in un database dedicato e costantemente aggiornato ad ogni ciclo chemioterapico dal personale dell'UOC di Farmacologia Clinica della suddetta AOU. I pazienti sono stati seguiti per almeno quattro cicli di chemioterapia, in sinergia con gli oncologi di reparto. Per rispettare la privacy dei soggetti, sono stati utilizzati esclusivamente codici identificativi numerici.

La scheda CRF ha previsto una sezione dedicata alle *caratteristiche basali*; sono state registrate le informazioni sullo stato sociodemografico, genere, età, altezza, peso, abitudine al fumo, uso di alcool e/o droghe e sulla condizione clinica (tipo di neoplasia, stadiazione, fase di malattia, patologie concomitanti e l'anamnesi familiare dei fattori di rischio e/o di neoplasie). È stata raccolta una dettagliata *anamnesi farmacologica*: schemi chemioterapeutici a base di FP utilizzati, durata e numero di cicli, posologia e tempi di somministrazione, farmaci non oncologici assunti per comorbidità, uso di integratori e l'eventuale assunzione di cibi e/o bevande in concomitanza del trattamento. I *parametri laboratoristici* pretrattamento rilevati in questa sezione sono poi stati confrontati con quelli post-terapia, opportunamente riportati nella scheda di Follow-up.

Nella CRF, particolare attenzione è stata dedicata alla registrazione delle ADR secondo i criteri *CTCAE (Common Toxicity Criteria for Adverse Events, Version 5.0.)* (41).

Il CTCAE è strutturato secondo una scala da 1 a 5, con una descrizione clinica univoca della severità di ogni ADR basata sulle seguenti linee guida:

Grado 1 Lieve; asintomatico o lievi sintomi; solo osservazione clinica o diagnostica; non è indicato un intervento specifico.

Grado 2 Moderato; indicato intervento minimo, locale o non invasivo; evento che comporta una limitazione delle ADL (attività della vita quotidiana) strumentali età-correlate.

Grado 3 Grave o significativo dal punto di vista clinico, ma non immediatamente pericoloso per la vita; indicata l'ospedalizzazione o il prolungamento del ricovero; invalidante; limitativo delle ADL relative alla cura della persona.

Grado 4 Conseguenze potenzialmente letali; indicato intervento urgente.

Grado 5 Morte correlata all'ADR.

Di seguito un estratto dei CTCAE per l'analisi di una ADR "diarrea", secondo la categorizzazione per gradi di gravità.

Disturbi gastrointestinal					
Evento avverso	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Diarrea	Aumento <a 4 evacuazioni al giorno rispetto alla norma; lieve aumento nella evacuazione dalla stomia rispetto alla norma	Aumento della frequenza di evacuazione di 4-6 volte al giorno rispetto alla norma; moderato aumento nella evacuazione dalla stomia rispetto alla norma	Aumento ≥a 7 evacuazioni al giorno rispetto alla norma; incontinenza; indicata l'ospedalizzazione; importante aumento nell'evacuazione dalla stomia rispetto alla norma; limitazione delle attività quotidiane di cura della persona	Conseguenze potenzialmente letali; è indicato un intervento urgente	Decesso

*Criteri CTCAE traduzione a cura dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica, AIOM*

La scheda CRF ha previsto, infine, una sezione per la valutazione della risposta oggettiva al trattamento sulla base dei criteri RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Version 1.1*) (42). Tale sezione è compilata dall'oncologo di reparto.

Fig 8 Case Report Form, CRF

**CARATTERISTICHE BASALI (1)**

<p><b>Centro:</b> Oncologia Prof.: ..... 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/></p>	<p style="text-align: center;"><b>Indicazione all'uso di Fluoropirimidina e trattamento chemioterapico:</b></p> <p>Tipo di tumore: .....</p> <p>Posologia fluoropirimidina: m<sup>2</sup>..... Dose Totale..... Riduzione di dose (%). ....</p> <p>Farmaci oncologici in co-somministrazione con fluoropirimidina:</p> <p>1)..... Posologia..... m<sup>2</sup>..... Dose totale..... Riduzione di dose (%). ....</p> <p>2)..... Posologia..... m<sup>2</sup>..... Dose totale.....</p>
<p><b>Paziente:</b> Nome e cognome (solo iniziali) ..... Data di nascita ...../...../..... Comune di Nascita.....</p>	

<p><b>Fumo:</b> Mai fumatore <input type="checkbox"/> Ex fumatore (anni.....) <input type="checkbox"/> Fumatore (anni.....) <input type="checkbox"/> Non noto <input type="checkbox"/></p>	<p><b>Alcool:</b> Astemio <input type="checkbox"/> No, in passato (anni.....) <input type="checkbox"/> SI, moderato <input type="checkbox"/> SI, alto* <input type="checkbox"/> Non noto <input type="checkbox"/> <small>*uomini (&gt;30g/die); donne (&gt; 20 g/die)</small></p>
--	---

<b>Criteri di inclusione</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pazienti oncologici in trattamento con fluoropirimidine</li> <li>• consenso informato al trattamento dei dati</li> </ul>	

<b>Criteri di esclusione</b>	
Insufficienza epatica di grado severo: 1) criteri CTC*: Grade 4 2) Classificazione di Child-Pugh: classe C	

<b>Codice del paziente</b> _ _ _ _ _	<b>N° c.c.</b> _ _ _ _ _
--------------------------------------	--------------------------

<b>Cognome e nome (iniziali):</b> .....	<b>Data di nascita (gg/mm/aaaa):</b> _ _ / _ _ / _ _ _ _
--	---

**Residenza:** .....

**Tel.** \_ \_ \_ \_ \_

## CARATTERISTICHE BASALI (2)

<p><b>Sesso:</b> Maschile 1 <input type="checkbox"/> Femminile 2 <input type="checkbox"/></p> <p><b>Età:</b>                    — — —</p> <p><b>Altezza (m):</b>           — , — —</p> <p><b>Peso (kg):</b>             — — —</p> <p><b>Superficie corporea (m<sup>2</sup>):</b> —</p>	<p><b>Etnia:</b> Caucasica <input type="checkbox"/> Africana o afroamericana <input type="checkbox"/> Asiatica <input type="checkbox"/> Altro <input type="checkbox"/> Non noto <input type="checkbox"/></p>
<p><b>Titolo di studio:</b> Nessuno <input type="checkbox"/> Elementare <input type="checkbox"/> Media inferiore <input type="checkbox"/> Media superiore <input type="checkbox"/> Laurea <input type="checkbox"/></p> <p><b>Attività lavorativa:</b> _____</p>	<p><b>Vive:</b> solo/a <input type="checkbox"/> con badante <input type="checkbox"/> con coniuge anziano/a <input type="checkbox"/> in famiglia <input type="checkbox"/> in casa di riposo <input type="checkbox"/></p>

## CARATTERISTICHE BASALI (3)

<p><b>Parametri pre-trattamento</b></p> <p>PAS (mm Hg):                   — — —</p> <p>PAD (mm Hg):                   — — —</p> <p>GB: _____</p> <p>GR: _____</p> <p>Hb: _____</p> <p>% NEU: _____</p> <p>Conta piastrinica (x1000):   — — —</p> <p>Creatininemia (mg/dL):       — — —</p> <p>Ecocardiogramma:           SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/></p> <p style="padding-left: 20px;">F.E. eco:                       — — %</p> <p>AST: — — —</p> <p>ALT: — — —</p> <p>Bilirubina totale: — — —</p> <p>Bilirubina diretta: — — —</p> <p>gammaGT: — — —</p> <p>Albumina: — — —</p> <p>Pseudocolinesterasi: — — —</p>	<p><b>Notizie anamnestiche</b></p> <p>Epatopatie:</p> <p>HCV <b>SI</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/></p> <p>HBV <b>SI</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/></p> <p>Patologie autoimmuni:</p> <p>Patologie eredo-familiari oncologiche: .....</p> <p>Patologie concomitanti:.....</p> <p>Allergie/intolleranze:.....</p>
---	---

## CARATTERISTICHE BASALI (4) SCHEDE FARMACI CONCOMITANTI (NON ONCOLOGICI)

<p><b>Farmaci (non-oncologici):</b> _____</p>	<p>posologia: _____</p>
<p>_____</p>	<p>posologia: _____</p>
<p>_____</p>	<p>posologia: _____</p>
<p>_____</p>	<p>posologia: _____</p>
<p>_____</p>	<p>posologia: _____</p>



### SCHEDA FOLLOW UP (RISPOSTA OGGETTIVA) (3)

Nome e cognome (solo iniziali) .....

Data di nascita ...../...../.....

Data...../...../.....

NUMERO DEL CICLO TERAPEUTICO (ES. GIORNO 1- CICLO TERZO): \_ \_ \_ \_ \_

<b>RISPOSTA*</b>	CR	PR	SD	PD
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Decesso</b>	<b>SI</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/>			
<b>Nuovo trattamento chemioterapico (in caso di progressione):</b>	_ _ _ _ _			

\*

CR=risposta completa

PR=risposta parziale

SD=stabilizzazione

PD=progressione

\*Risposta oggettiva al trattamento (criteri RECIST, *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*)

CR	Disappearance of all known disease for at least 4 wk	Disappearance of all target lesions (including reduction in short-axis diameter of lymph nodes to <10 mm) Disappearance of all nontarget lesions and normalization of tumor marker level
PR	≥50% decrease in the total tumor size of lesions at two observations at least 4 wk apart	≥30% decrease in the sum of maximum diameters of target lesions from baseline Persistence of one or more nontarget lesions and/or the maintenance of tumor marker level above the normal limits
PD	≥25% increase in size of one or more measurable lesions or appearance of new lesions	≥20% increase in the sum of maximum diameters of target lesions from nadir (i.e., from when the smallest sum of diameters is achieved) or appearance of one or more new lesions Unequivocal progression of existing nontarget lesions or appearance of one or more new sites of disease
SD	Neither a ≥50% decrease nor a ≥25% increase in lesions' size has been demonstrated	Neither PR or PD

Abbreviations: CR, complete response; PD, progressive disease; PR, partial response; RECIST, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; SD, stable disease; WHO, World Health Organization.

Schwartz LH, Seymour L, Litière S. et al. RECIST 1.1—standardisation and disease-specific adaptations: perspectives from the RECIST Working Group. *Eur J Cancer* 2016; 62:138-145

### 3.3. Analisi molecolari

Nella CRF e nel database sono stati inseriti i risultati delle analisi molecolari che sono state eseguite presso l'UOC di Farmacologia Clinica, responsabile del progetto. Tutti i campioni ematici sono stati consegnati al Laboratorio di Farmacogenetica per le analisi di genotipizzazione e a quello di Farmacocinetica per le analisi di fenotipizzazione.

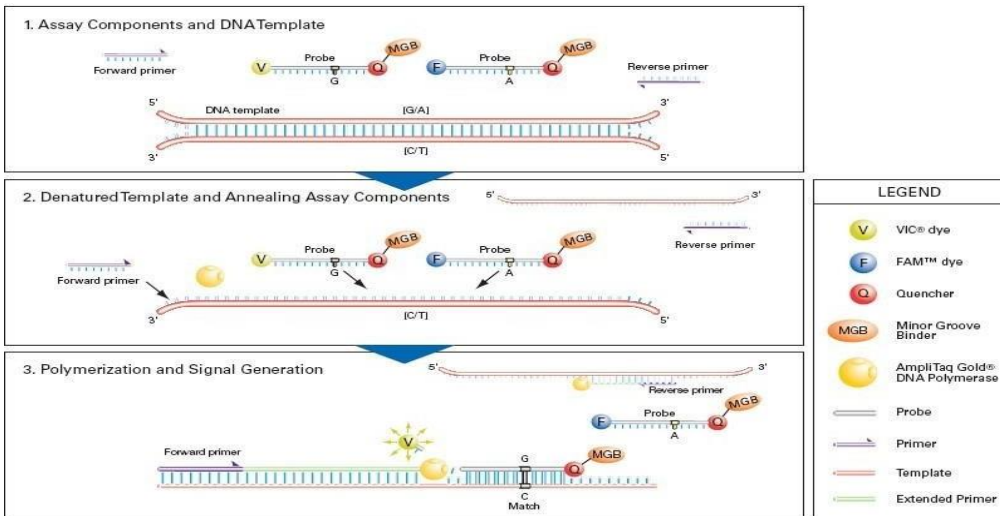
#### 3.3.1. Genotipizzazione

- Da un prelievo di sangue periferico di circa 6 ml si è provveduto ad estrarre il DNA genomico destinato all'esecuzione degli screening farmacogenetici per verificare la presenza di polimorfismi del gene DPYD raccomandati (*DPYD\*2A*, *DPYD\*13*, *c.2846A>T* e *c.1129-5923C>G*).
- È stato effettuato dallo stesso prelievo per l'analisi DPYD anche lo screening degli SNPs MTHFR-C677T e -A1298C mediante pirosequenziamento e quello della variante TYMS-TSER mediante PCR con elettroforesi su gel di agarosio.

L'analisi delle varianti DPYD è stata realizzata tramite PCR quantitativa (*Real-Time PCR*) con saggio di discriminazione allelica. È stato utilizzato il kit *CE-IVD Easy PGX Diatech DPYD* e il *Real-Time PCR System, QuantStudio™ (Applied Biosystem)*. La tecnica della Real Time PCR (43) prevede l'utilizzo di una *sonda complementare al DNA* da amplificare, la quale è marcata ad una estremità con un *fluoroforo* e all'estremità opposta porta un *quencher*, una molecola che, quando è vicina al fluoroforo, è in grado di inibirne la fluorescenza. *Il parametro misurato nella Real Time PCR è l'aumento di fluorescenza.* Col procedere della reazione di amplificazione della sequenza stampo, la sonda viene gradualmente degradata nei suoi singoli nucleotidi ad opera dell'*enzima AmpliTaq Gold DNA polimerasi*, che possiede attività esonucleasica 5'-3'; questo determina il progressivo allontanamento del quencher che non si troverà più sufficientemente vicino al fluoroforo per assorbirne l'emissione. Si osserverà un aumento della fluorescenza, che sarà proporzionale alla quantità di DNA stampo contenuto nel campione; in questo caso sono state usate 2 sonde marcate con 2 diversi fluorofori (*VIC e FAM*), ciascuna specifica per uno dei due alleli dello SNP da analizzare (*Figura 10*).

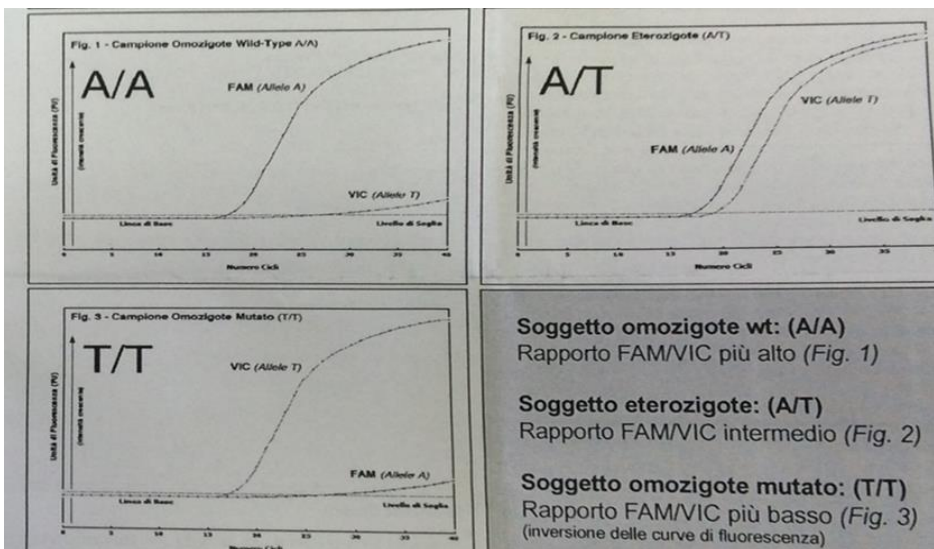


**Fig 10 PCR real-time**



Dopo ogni rilevamento, i segnali di fluorescenza sono processati da un software e la cinetica di formazione dell'amplificato è stata visualizzata graficamente come incremento dei segnali di fluorescenza in ordinata e per cicli di reazione in ascissa. Per interpretare i risultati è stato necessario valutare i rapporti tra le fluorescenze osservate nei due canali di analisi VIC e FAM. Nella ricerca di *DPYD c.2846A> T (rs67376798, p.D949V)*, la sonda wild type ha riconosciuto l'allele A legandosi al fluorocromo VIC, mentre la sonda mutata ha riconosciuto l'allele T legandosi al fluorocromo FAM. Nei campioni omozigoti per l'allele wild type (A/A) è stato osservato il massimo rapporto FAM/VIC, con un solo picco FAM; nei campioni eterozigoti il rapporto era intermedio al precedente e sono stati rilevati due picchi; nei campioni omozigoti per l'allele mutato (T/T) è stato osservato il rapporto più basso FAM/VIC, con un solo picco VIC (Figura 11). La stessa metodologia (44) è stata applicata per le altre tre mutazioni di *DPYD* ricercate.

**Fig 11 Guida all'interpretazione dei possibili genotipi di *DPYD c.2846A> T***



Entro sette giorni dal prelievo, ottenuto l'esito della genotipizzazione DPYD, si è provveduto ad informare l'oncologo di riferimento tramite refertazione del risultato del test (Figura 12) per le eventuali modifiche di terapia in accordo con le Linee Guida (16,17).

**Fig 12 Refertazione del test farmacogenetico DPYD**



**AOU San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona  
Università degli Studi di Salerno**

**Prof.ssa Amelia Filippelli**  
Direttore Servizio di Farmacologia Clinica e Farmacogenetica



**Laboratorio di  
Farmacologia Clinica e  
Farmacogenetica**  
amelia.filippelli@sanjovanniruggi.it

Salerno, 25/03/2020

**Analisi Farmacogenetica di risposta alle fluoropirimidine  
basata sulla genotipizzazione del gene della Diidropirimidina deidrogenasi  
(DPYD)**

Riferita come appartenente a:

**Nome e Cognome:** LA

F M x

**CC (se disponibile):** 17866

**Data di nascita:** 06/10/1952

**Analisi genetica:**

ID diagnosi: DPYD

Materiale esaminato: DNA estratto da leucociti

Inviato da: Dr.ssa Busto

Indicazione all'indagine: chemioterapia con fluoropirimidine

**Metodica di screening utilizzata:**

discriminazione allelica in rtq-PCR tramite kit CE-IVD EasyPGX Diatech

**Genotipo analizzato:**

DPYD\*13; DPYD c.2846A>T; DPYD\*2A; DPYD c.1129-5923C>G (HapB3)

**Genotipo rilevato:**

eterozigote per DPYD\*2A

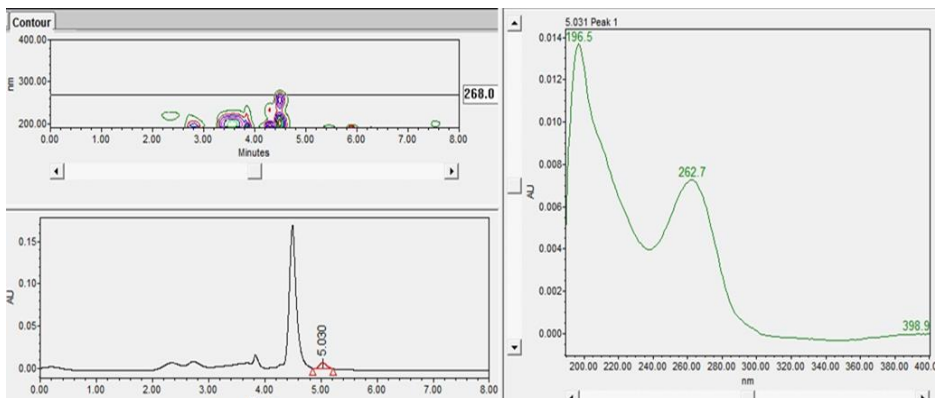
### 3.3.2. Stima del rapporto UH2/U

Per tutti i pazienti reclutati, in associazione alla genotipizzazione, come misura indiretta dell'attività dell'enzima DPD, è stato calcolato il rapporto dei due metaboliti UH2 e U mediante HPLC (45,46).

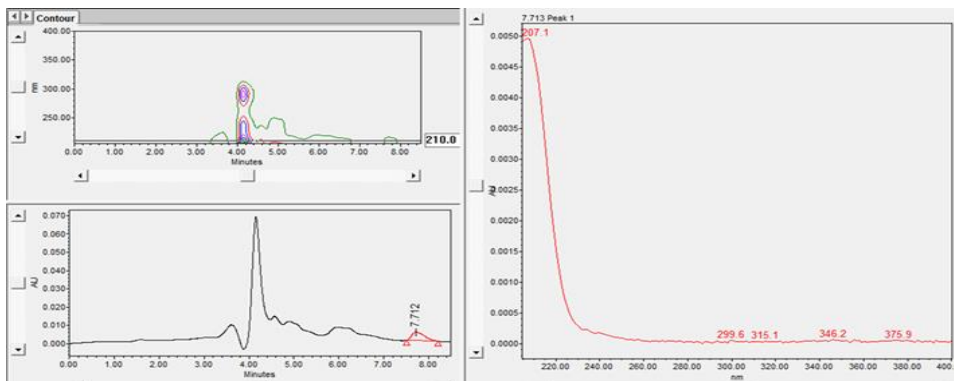
*Fase preanalitica:* per la stima del rapporto della concentrazione plasmatica Diidrouracile/Uracile, che potrebbe essere predittiva dell'attività in vivo dell'enzima DPD, è stato utilizzato lo stesso campione di sangue (EDTA come anticoagulante) prelevato per lo screening farmacogenetico. La provetta è stata centrifugata a 3000g per 6 minuti e 500 µl di plasma sono stati prelevati; dopo precipitazione proteica con ammonio solfato solido sono stati estratti gli analiti con una soluzione di acetato di etile/alcool isopropilico (85:15 %v/v).

*Fase analitica:* per l'analisi della concentrazione plasmatica dei metaboliti, 50 µl di estratto sono stati iniettati in un sistema HPLC accoppiato ad un detector UV. Dato il diverso assorbimento delle due molecole in esame e per ridurre al minimo l'interferenza con altre sostanze, la concentrazione di Uracile è stata letta a 268 nm (*Figura 13*), mentre quella del Diidrouracile a 210 nm (*Figura 14*).

**Fig 13 Cromatogramma Uracile (U) da campione di plasma**



**Fig 14 Cromatogramma Diidrouracile (UH2) da campione di plasma**



### 3.3.3. Quantizzazione dei livelli plasmatici di 5FU

In pazienti genotipizzati DPYD già in trattamento con FP è stata anche eseguita la quantizzazione della concentrazione plasmatica di farmaco. Ogni paziente, dopo essere stato informato, ha firmato apposito modulo di consenso redatto ad hoc per le analisi farmacocinetiche.

Secondo il nostro protocollo lo schema dei tempi per eseguire il TDM (*Figura 15*) ha previsto un prelievo prima dell'infusione di 5FU (T0); uno da 3 a 18 minuti (T1) dopo l'iniezione rapida o bolo durante la cinetica di picco; uno a 45 minuti (T2) dopo l'avvio dell'infusione o cinetica di valle. Inoltre, l'AUC funzionale a stimare la minima concentrazione efficace del 5-FU è stata fissata a 20-30 mgxL/h e la concentrazione plasmatica di 5FU ricade in un intervallo di 400-500 ng/ml (range di normalità) allo stadio stazionario di 45 minuti (47,48).

**Fig 15 Schema dei tempi dei prelievi per l'analisi farmacocinetica del 5FU**



Il plasma, ottenuto in seguito a centrifugazione dei prelievi di sangue intero (provette da 6ml con eparina come anticoagulante), è stato processato ed etichettato con lo stesso codice alfanumerico utilizzato per la genotipizzazione al fine di evitare confondimenti. Le proteine sono state fatte precipitare mediante aggiunta di metanolo 1:4 (%v/v); l'analisi tramite UHPLC-MS/MS ha permesso di ottenere la misurazione della concentrazione plasmatica di 5FU (49,50).

### 3.4. Analisi statistica

Le differenze tra i genotipi nel grado medio di gravità delle ADR sono state inizialmente valutate attraverso l'ANOVA (*Analisi della Varianza*) ad una via considerando, per ogni polimorfismo (MTHFR 677, MTHFR 1298, TYMS-TSER) e per ogni categoria patologica (TOSSICITA' EMATOLOGICHE, GASTROENTEROLOGICHE, NEUROLOGICHE, DERMATOLOGICHE) il grado di ADR come variabile dipendente e i genotipi (WILD-TYPE, ETERO,OMO) come gruppi (variabile categoriale indipendente).<sup>1</sup> Una delle ipotesi dell'ANOVA è che le varianze delle popolazioni (indipendenti) dai cui sono stati estratti i campioni (uno per ciascun gruppo) siano uguali (ipotesi di omoschedasticità).<sup>2</sup> Sfortunatamente, tale ipotesi valutata sulla base del *test* di omogeneità delle varianze di Bartlett<sup>3</sup> è stata costantemente rigettata dai dati. Per tale motivo, si è deciso di utilizzare il *test t* sulla differenza tra medie, il quale non richiede necessariamente l'ipotesi di omoschedasticità delle popolazioni. Esso, tuttavia, può essere applicato solo se i gruppi sono due. A tal fine, dunque, per ogni polimorfismo si è proceduto ad aggregare i due genotipi meno numerosi; più precisamente:<sup>4</sup>

- per MTHFR1298 sono stati aggregati i gruppi *ETERO* e *OMO* e dunque il confronto è stato effettuato tra i gruppi *WT* ed *ETERO+OMO*;
- per MTHFR677 sono stati aggregati i gruppi *WT* e *OMO* e dunque il confronto è stato effettuato tra i gruppi *ETERO* e *WT+OMO*;
- per TSER sono stati aggregati i gruppi *2R2R* e *3R3R* e dunque il confronto è stato effettuato tra i gruppi *2R3R* e *2R2R+3R3R*.

Lo stesso tipo di *test* è stato utilizzato per l'analisi del rapporto UH2/U. In questo caso i gruppi sono i due livelli di UH2/U (*Basso* e *Alto*) e lo scopo è stato quello di valutare le differenze nel grado (medio) di ADR delle singole tossicità, anziché delle categorie patologiche.

Tutte le elaborazioni sono state realizzate con il software statistico Stata.

---

<sup>1</sup> Nel complesso, dunque sono state realizzate 3 (polimorfismi) x 4 (categorie patologiche) = 12 analisi ANOVA.

<sup>2</sup> Si veda Norman, G. e Streiner, D. (2015), *Biostatistica*, II ed., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, p. 91.

<sup>3</sup> Bartlett, M.S. (1937), Properties of sufficiency and statistical tests, *Proceedings of the Royal Society*, A 160, 268–282.

<sup>4</sup> Si vedano le Figure 1-3 nei risultati.

## 4. RISULTATI

Sono stati reclutati *150 pazienti* in trattamento con FP, afferenti all' UOC di Oncologia della suddetta AOU. Tutti i pazienti sono stati monitorati costantemente per almeno quattro cicli di chemioterapia; hanno firmato il consenso per partecipare al progetto e per la pubblicazione dei dati.

### 4.1. Caratteristiche della popolazione in studio

La popolazione in esame era rappresentata da uomini per il 59% e da donne per il 41%, con un'età media di 64 anni; il paziente più giovane reclutato aveva 43 anni, il più anziano 85 anni. Come da *Tabella 1*, il 54% dei soggetti possedeva un diploma di scuola media inferiore, seguito da un 42% con licenza elementare, da un 33% con diploma di scuola superiore e da un 14% di laureati. Il 40% dei pazienti reclutati non aveva mai fumato, il 34% era fumatore, con un consumo medio di 20 sigarette/die, mentre il 26% era ex fumatore; il 60% dei soggetti screenati aveva o aveva avuto quindi un'esposizione al fumo di sigaretta. Per quanto riguarda il consumo di alcool, il 56% dei soggetti aveva dichiarato di essere astemio, mentre il 44% assumeva una quantità di alcool inferiore a 29,9 g/die per gli uomini e inferiore a 19,9 g/die per le donne. Dall'anamnesi si è evinto che il 20% dei pazienti aveva patologie autoimmuni (6 pazienti affetti da tiroidite di Hashimoto, 14 da artrite reumatoide, 7 da LES e 3 da Spondilite); nessun soggetto tra quelli reclutati aveva epatopatie quali epatite B e C; il 52% dei pazienti era iperteso (P.A. >140/90); il 14% era affetto da diabete mellito di tipo 2. Il 46% (69) dei pazienti reclutati aveva familiarità per malattie oncologiche: il numero di parenti di primo grado presentanti neoplasie in passato o in atto andava da 1 a 3 per ciascun paziente reclutato. I tumori riguardavano nel 31% dei casi lo stesso organo coinvolto nel paziente, nel 69% dei casi invece erano presenti in sedi diverse.

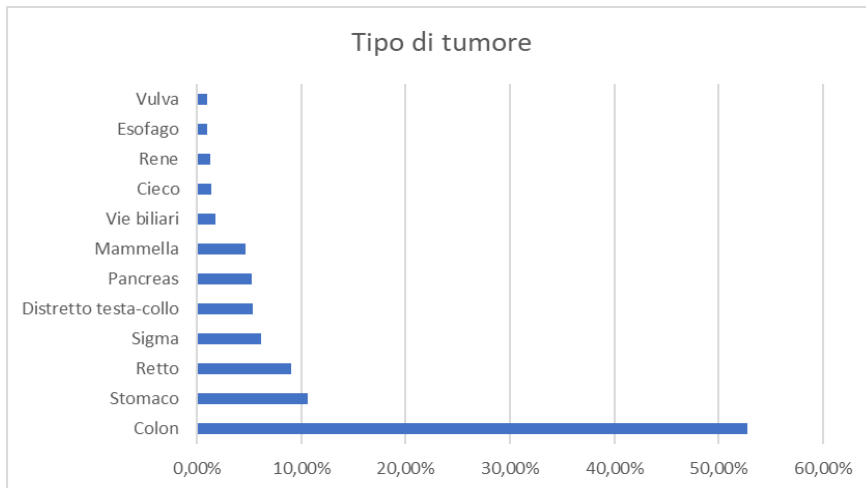
**Tab 1 Popolazione in studio: informazioni di base**

		Numero	%
<i>Genere</i>	Maschio	89	59
	Femmina	61	41
<i>Età</i>	Minima	43	
	Massima	85	
	Media	64	
<i>Titolo di studio</i>	Elementare	42	28
	Diploma scuola media	54	36
	Diploma scuola superiore	33	22
	Laurea	21	14
<i>Attività lavorativa</i>	Pensionato/a	72	48
	Casalinga	36	24
	Impiegato/a	33	22
	Disoccupato/a	9	6
<i>Abitudine al fumo</i>	Fumatore	51	34
	Ex fumatore	39	26
	Mai fumatore	60	40
<i>Consumo di alcool</i>	0,1-29,9 g/die	66	44
	>30 g/die		0
	assente	84	56
<i>Malattie autoimmuni</i>	Tiroidite di Hashimoto, Artrite Reumatoide, Spondilite, LES	30	20
<i>Epatopatie</i>	HBV, HCV	0	0
<i>Iperensione arteriosa</i>	>140/90	78	52
<i>Diabete di tipo II</i>		21	14
<i>Familiarità per malattie oncologiche</i>		69	46

Il 16% (24) dei soggetti presentava alterazioni di alcuni parametri laboratoristici prima dell'inizio del trattamento: 6 pazienti con anemia ipocromica carenziale (MCH >27-33 pg/cellule e MCHC >33-36 g/dl), 4 con leucopenia (>4000 U/ml), 8 con leucocitosi neutrofila (>4300-10.000 U/ml), 2 con iperbilirubinemia (>5,1-17,0 mmol/l) e 4 con ipertransaminemia (>50 U/l). Di ciò si è tenuto conto nella successiva valutazione dei dati di laboratorio durante il follow-up. In quattro pazienti è stata rinviata la somministrazione del primo ciclo di chemioterapia a causa della necessità di trasfusioni.

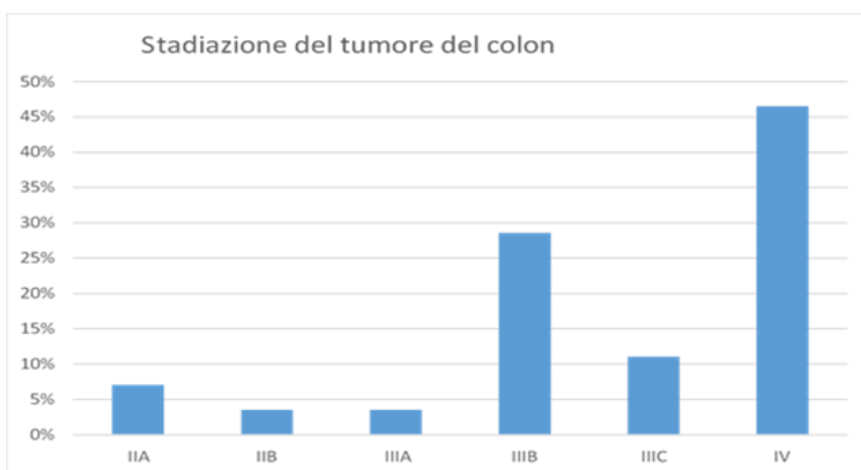
I pazienti erano affetti dalle seguenti neoplasie, come rappresentato in *Figura 16*: il 52,78% (79) avevano un tumore al colon, il 10,61% (16) allo stomaco, il 9% (14) al retto, il 6,15% (9) al sigma, il 5,29% (8) a carico del distretto testa-collo, il 5,25% (8) al pancreas, il 4,60% (7) alla mammella, l'1,73% (3) alle vie biliari, l'1,37% (2) al cieco, l'1,24% (2) al rene, l'1% (1) all'esofago e lo 0,98% (1) alla vulva.

**Fig 16 Neoplasie rappresentate nella popolazione in studio**



Per la neoplasia del colon, la più rappresentata nella popolazione in studio, è stata analizzata la stadiazione, come in *Figura 17*. Il 46,5% (37) dei pazienti era allo stadio IV. I pazienti allo stadio III erano il 28,5% (22) allo stadio IIIB, l'11% (9) allo stadio IIIC e il 3,5% allo stadio IIIA. Allo stadio IIA il 7% (6) e allo stadio IIB il 3% (2).

**Fig 17 Stadiazione del tumore del colon nella popolazione in studio**

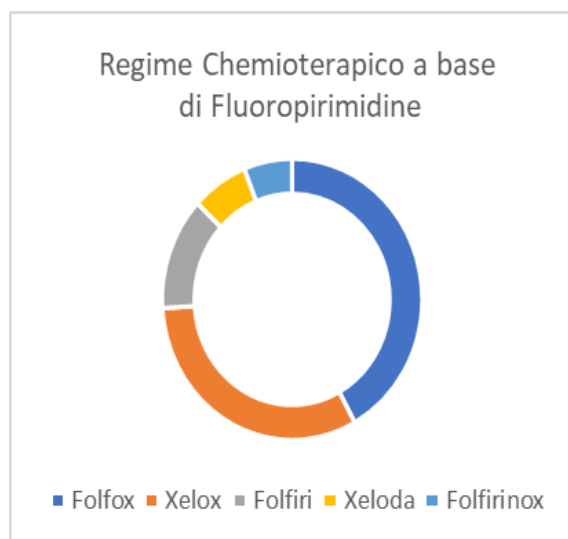


I regimi chemioterapici a base di fluoropirimidine registrati nella popolazione in studio erano i seguenti, come mostrato nella *Figura 18*: Folfox (5 FU/Leuvocorina + oxaliplatino) 42% (63), Xelox



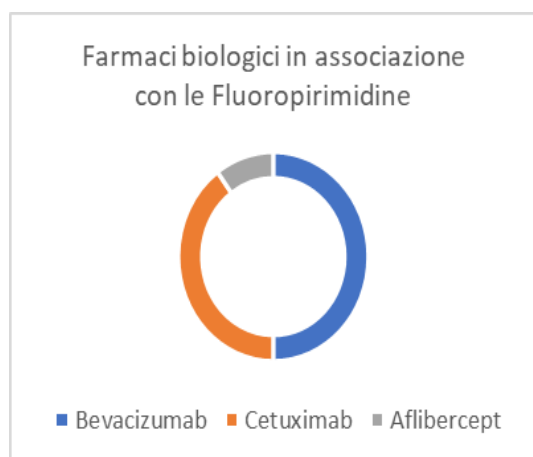
(Capecitabina + Oxaliplatino) 32% (48), Folfori (5-FU/Leuovorina + Irinotecano) 13% (20), Xeloda (Capecitabina) 7% (10) e Folfirinox (5FU+Leuovorina+Irinotecano+Oxaliplatino) 6% (9).

**Fig 18 Regimi chemioterapici a base di Fluoropirimidine registrati nella popolazione in studio**



I farmaci biologici somministrati in associazione alle FP nella popolazione in studio sono illustrati nella *Figura 19*. Di 150 pazienti reclutati il 40% (60) ha assunto farmaci biologici: Bevacizumab 20% (30), Cetuximab 16% (24) e Aflibercept 4% (6).

**Fig 19 Farmaci biologici assunti nella popolazione in studio**

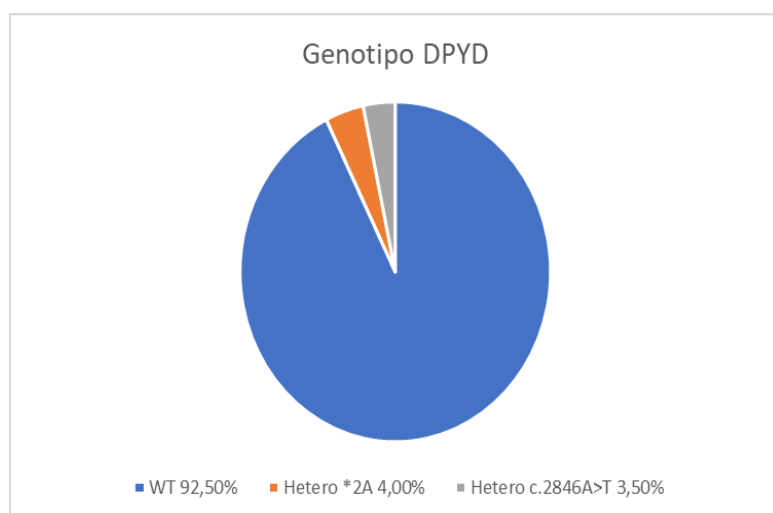


L'86% (129) dei pazienti ha ricevuto tali regimi di chemioterapia in modalità adiuvante, il 14% (21) di essi non è mai stato invece sottoposto a trattamento chirurgico a causa della inoperabilità della neoplasia.

La **genotipizzazione DPYD** è stata eseguita su tutti i 150 pazienti reclutati (*Figura 20*).

- 139 soggetti (92,5%) sono wild type per ciascuno dei quattro polimorfismi DPYD investigati (DPYD\*2A, DPYD\*13, DPYD c.2846 A>T e c.1129-5923C>G). Di questi 139 pazienti a fenotipo non mutato 59 (39,2%) sono donne e 80 (53,3%) sono uomini.
- 11 pazienti (7,5%) sono portatori in eterozigosi di una variante del gene DPYD, nello specifico 6 (4%) per la variante DPYD\*2A e 5 (3,5%) per quella DPYD c.2846 A>T.  
Due pazienti di sesso femminile sono eterozigoti per la variante DPYD\*2A.  
Nove pazienti di sesso maschile: quattro sono eterozigoti per la variante DPYD\*2A e cinque per la variante DPYD c.2846 A>T.
- Nessun paziente era portatore delle varianti DPYD\*13 e c.1129-5923C>G.

**Fig 20 Genotipi DPYD riscontrati nella popolazione in studio**



Tre di questi undici pazienti eterozigoti sono stati reclutati nello studio a posteriori rispetto allo sviluppo di tossicità di grado uguale o superiore al 3 (*Test farmacogenetico post-trattamento*). Questi soggetti erano in trattamento con i seguenti regimi di chemioterapia: folfiri + bevacizumab, folfox + cetuximab e folfox.

La misurazione del rapporto  $UH_2/U$  è stata effettuata su tutti i 150 pazienti reclutati, il valore minimo rilevato era di 1,77 e il massimo di 13,65 con un valore medio di 5,8.

- Il 31% (47) dei soggetti aveva un rapporto  $UH_2/U$  inferiore a 4, il 29% (43) un rapporto tra 4 e 6 e il 40% (60) superiore a 6.
- Per gli undici soggetti eterozigoti DPYD, il valore minimo era 1,77 e il massimo era 7,38 con un valore medio di 4,5.

Il *TDM del 5FU* è stato eseguito solo su tre degli undici eterozigoti DPYD che hanno firmato il consenso a prelievi seriati per l'analisi farmacocinetica durante almeno due cicli di terapia (Tabella 2).

**Tab 2 Pazienti eterozigoti DPYD e corrispondenti livelli plasmatici di 5FU ad ogni ciclo di chemioterapia a T2 45 min (ng/ml)**

CICLI DI CHEMIOTERAPIA					
	1	2	3	4	5
pz 1				950	400
pz 2	474	372	342		
pz 3		811	1093	1048	934

- Per il paziente 1, il TDM è stato eseguito al quarto ciclo presentando livelli di farmaco elevati.
- Per il paziente 2, il TDM è stato eseguito dal primo ciclo mostrando livelli plasmatici nei range di normalità.
- Per il paziente 3, il TDM ha rilevato livelli plasmatici di 5FU elevati ad ogni ciclo di terapia.

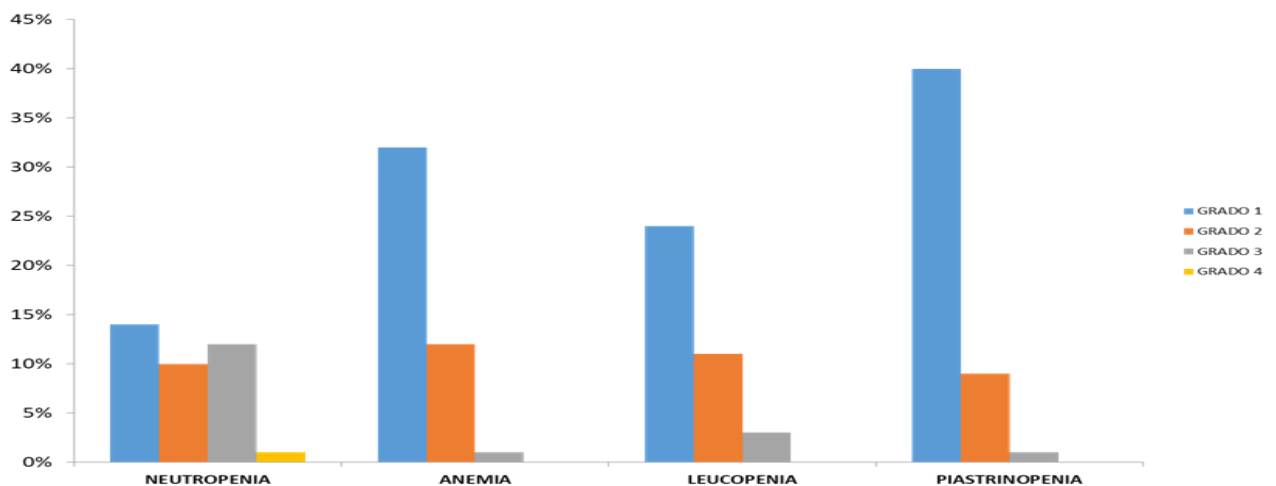
## 4.2. Report delle ADR

I pazienti reclutati hanno presentato un totale di circa 642 ADR. Va precisato che in corso di trattamento con i farmaci in studio un soggetto ha sviluppato quanto meno tre ADR per ciclo di terapia. Inoltre, tutte le tossicità registrate sono state poi monitorate per almeno quattro cicli.

Le singole ADR sono state suddivise per tipo di categoria patologica rilevata (ematologica, gastroenterologica, neurologica e dermatologica) e poi sono state categorizzate, secondo i Criteri CTCAE (41), in rapporto alla loro gravità in quattro gradi.

La frequenza delle ADR ematologiche suddivise per grado di severità è riportata nella *Figura 21*.

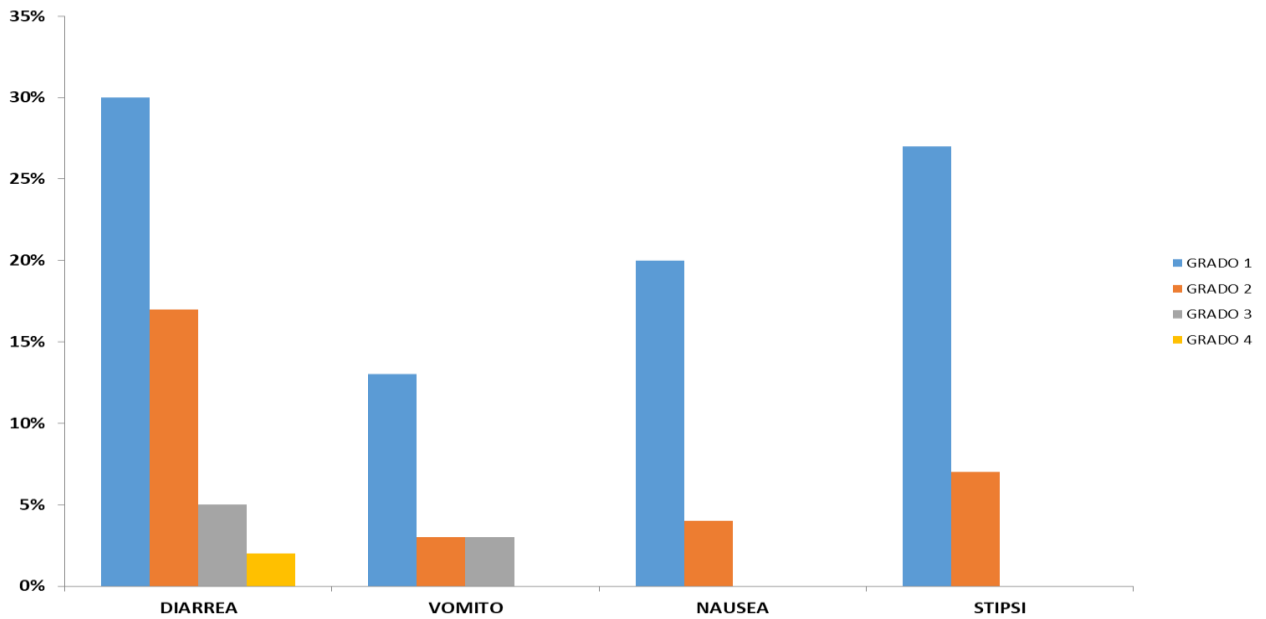
**Fig 21 ADR Ematologiche**



- Per il grado 1 si registra per la neutropenia una frequenza del 14% (21), per l'anemia una del 32% (48), per la leucopenia una del 24% (36) e per la piastrinopenia una del 40% (60).
- Per il grado 2 si registra per la neutropenia una frequenza del 10% (15), per l'anemia una del 12% (18), per la leucopenia una dell'11% (17) e per la piastrinopenia una del 9% (13).
- Per il grado 3 si registra per la neutropenia una frequenza del 12% (18), per l'anemia una dell'1% (1), per la leucopenia una del 3% (4) e per la piastrinopenia una dell'1% (1).
- Per il grado 4 si registra solo per la neutropenia una frequenza del 1% (1).

La frequenza delle ADR gastroenterologiche suddivise per grado di severità è riportata nella *Figura 22*.

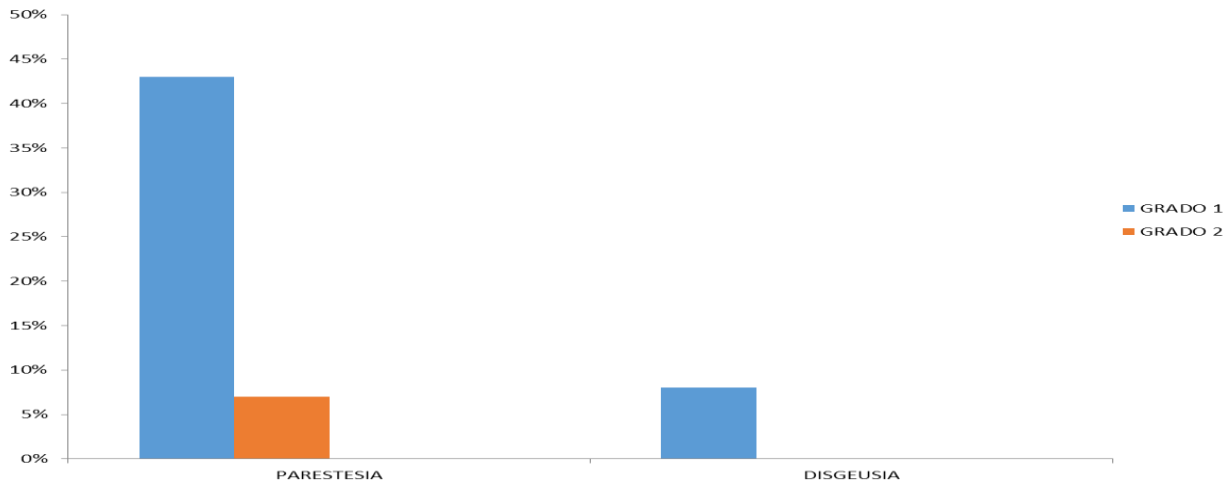
**Fig 22 ADR Gastroenterologiche**



- Per il grado 1 si registra per la diarrea una frequenza del 30% (45), per il vomito una del 13% (19), per la nausea una del 20% (30) e per la stipsi una del 27% (40).
- Per il grado 2 si registra per la diarrea una frequenza del 17% (25), per il vomito una del 3% (4), per la nausea una del 4% (6) e per la stipsi una del 7% (10).
- Per il grado 3 si registra per la diarrea una frequenza del 5% (8) e per il vomito una del 3% (4).
- Per il grado 4 si registra solo per la diarrea una frequenza del 2% (3).

La frequenza delle ADR neurologiche suddivise per grado di severità è riportata nella *Figura 23*.

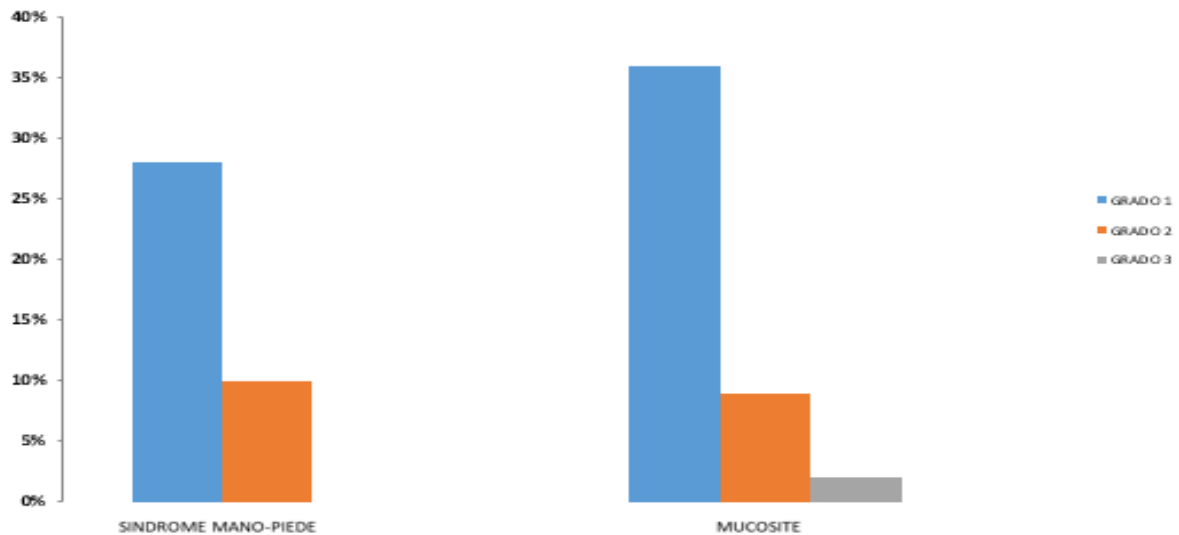
**Fig 23 ADR Neurologiche**



- Per il grado 1 si registra per la parestesia una frequenza del 43% (65) e per la disgeusia una dell'8% (12).
- Per il grado 2 si registra solo per la parestesia una frequenza del 7% (10).
- Per il grado 3 e 4 non si registrano ADR.

La frequenza delle ADR dermatologiche suddivise per grado di severità è riportata nella *Figura 24*.

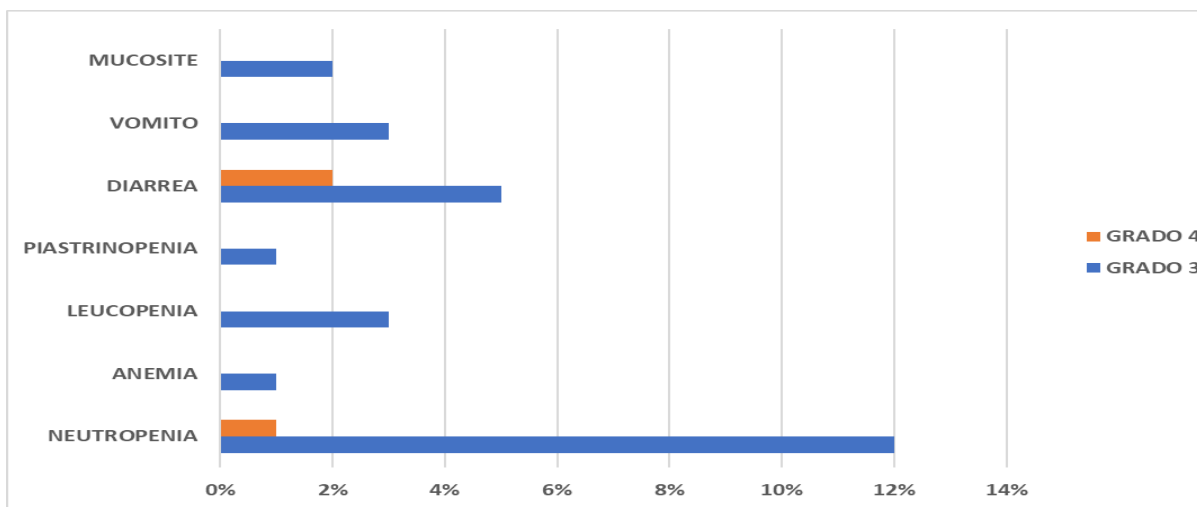
**Fig 24 ADR Dermatologiche**



- Per il grado 1 si registra per la sindrome mano-piede una frequenza del 28% (42) e per la mucosite il 36% (54).
- Per il grado 2 si registra per la sindrome mano-piede una frequenza del 10% (15) e per la mucosite il 9% (13).
- Per il grado 3 si registra solo per la mucosite una frequenza del 2% (3).
- Per il grado 4 non si registrano ADR.

Nello specifico, le tossicità di grado 3 e 4 sono riportate in *Figura 25*.

**Fig 25 ADR gravi e potenzialmente fatali nella popolazione in studio**



- Per le ADR di grado 3 e 4 nella popolazione in studio si registra una frequenza del 28,6% (43).
- Per le ADR di grado 3 (mucosite, vomito, piastrinopenia, leucopenia, anemia e neutropenia) si registra una frequenza del 26% (39); per le ADR di grado 4 (diarrea e neutropenia) si registra una frequenza del 2,6% (4).
- La neutropenia e la diarrea sono le ADR più segnalate per entrambi i gradi di severità.

### 4.3. Presentazione dei pazienti eterozigoti DPYD

Di 150 pazienti reclutati 11 sono risultati eterozigoti DPYD (*Tabelle 3 e 4*).

ADR di grado 3 e 4 si registrano in 4 degli 11 pazienti eterozigoti DPYD.

**Tab 3 Caratteristiche principali dei 3 pazienti eterozigoti DPYD in cui è stato possibile effettuare il anche il TDM**

Pz	Tipo di tumore e stadio	Trattamento chemioterapico	Pre-terapeutico DPYD-PGx	Post-terapeutico DPYD-PGx	Genotipo DPYD	Rapporto UH2/U	Concentrazione Plasmatica 5-FU	ADR ≥3 (di grado severo)
1	CRC (metastatico)	Folfox+cetuximab	/	SI	Eterozigote per DPYD*2A	4.52	950 ng/ml (C4) 400 ng/ml (C6)	G3 mucosite (C3) G3 neutropenia (C3)
2	CRC (metastatico)	Folfox+bevacizumab	si	/	Eterozigote per DPYD*2A	3.22	474 ng/ml (C1)	/
3	Cancro rettale (metastatico)	Folfox+cetuximab	si	/	Eterozigote per c.2846A>T	1.77	811 ng/ml (C2) 1093 ng/ml (C3) 1048 ng/ml (C4) 934 ng/ml (C5)	G3 diarrea (C3) G4 diarrea (C4) G3 diarrea (C5)

*Pz, paziente; CRC, cancro coloretale; FOLFOX, 5-fluorouracile + leucovorina + oxaliplatino; DPYD-PGx, Test Farmacogenetico DPYD; C, ciclo; UH2/U RATIO, rapporto diidrouacile/uracile; 5-FU, 5-fluorouracile; ADR, reazione avversa a farmaco; G, grado di tossicità secondo i Criteri CTCAE.*

Il **paziente 1** di 55 anni affetto da adenocarcinoma del colon retto allo stadio IV con metastasi linfonodali, ai polmoni, al fegato e ai reni, è stato trattato con lo schema folfox e cetuximab. Dopo tre cicli di chemioterapia ha riportato neutropenia ( $neutr: 830.58/mm^3$ ) e mucosite di grado 3; al quarto ciclo il test DPYD ha rivelato una eterozigosi DPYD\*2A e il TDM ha evidenziato una elevata concentrazione plasmatica di 5FU di 950 ng/ml. Il rapporto UH2/U era di 4,52. Alla luce di questi risultati è stato necessario ridurre la posologia di 5FU e cetuximab. La TAC non ha rivelato una progressione di malattia in accordo con i criteri RECIST v1.1. Al sesto ciclo di terapia la concentrazione plasmatica di 5-FU era di 400 ng/ml (nella norma), non registrando ADR di grado severo.

Per il **paziente 2** di 48 anni, affetto da un adenocarcinoma del colon retto allo stadio IV con metastasi linfonodali e al fegato, è stato scelto lo schema folfox con bevacizumab. L'analisi DPYD pretrattamento ha identificato una eterozigosi DPYD\*2A ed il rapporto plasmatico UH2/U era di 3,22. Dopo il primo ciclo di terapia, ridotta la dose iniziale di 5FU del 50%, non ha presentato ADR di grado severo con una concentrazione plasmatica di 474 ng/ml, nella norma. Al quarto ciclo effettuata una TAC non si è evidenziata progressione di malattia in accordo con i criteri RECIST v1.1.; è stata effettuata una terapia di mantenimento con capecitabina e bevacizumab per altri sei cicli con assenza di ADR di grado severo.



Per il *paziente 3* di 60 anni affetto da un adenocarcinoma del retto allo stadio IV con metastasi epatiche è stato programmato un regime chemioterapeutico secondo lo schema folfox più cetuximab. Lo screening pre-terapeutico del gene DPYD ha rivelato un'eterozigosi c2846A>T, è stata dimezzata la dose iniziale del 5FU e il rapporto UH2/U era molto basso di 1,77, il più basso registrato nel nostro studio. Al secondo ciclo di terapia la concentrazione plasmatica di 5FU era 811 ng/ml, un valore alto nonostante la riduzione della dose. Al terzo ciclo il livello plasmatico di farmaco era ancora elevato, 1093 ng/ml, con la comparsa di diarrea di grado 3; per cui è stato necessario ridurre ulteriormente la dose del 10%. Ciononostante, al quarto ciclo la concentrazione plasmatica rimaneva comunque alta (1048 ng/ml) con la comparsa di diarrea di grado 4. Al quinto ciclo la concentrazione plasmatica era lievemente ridotta 934 ng/ml con una diarrea di grado 3. La TAC mostrava una riduzione delle lesioni epatiche, una risposta parziale alla terapia secondo i criteri RECIST v1.1. Dopo un mese dall'intervento chirurgico per la rimozione delle lesioni epatiche, la TAC ha mostrato una nuova lesione per cui è stato necessario ricorrere a un nuovo protocollo folfiri in cui la dose di 5FU era ridotta del 50%. Dopo sei cicli di terapia per la comparsa di diarrea di grado 3 si è deciso di continuare soltanto con irinotecano e bevacizumab.

**Tab 4 Caratteristiche principali degli 8 pazienti eterozigoti DPYD in rapporto alla tempistica con cui è stato eseguito il test di genotipizzazione**

PZ	Tipo di tumore e stadio	Trattamento chemioterapico	Pre-terapeutico DPYD-PGx	Post-terapeutico DPYD-PGx	Genotipo DPYD	Rapporto UH2/U	ADR ≥3 (di grado severo)
4	Cancro dello stomaco (localmente avanzato)	Folfox	/	si	Eterozigote per DPYD*2A	7.09	G3 vomito (C2)
5	CRC (metastatico)	Folfiri + bevacizumab	/	si	Eterozigote per c.2846A>T	3.88	G3 vomito (C8)
6	Cancro renale (metastatico)	Xeloda	si	/	Eterozigote per c.2846A>T	6.57	/
7	CRC (metastatico)	Xelox	si	/	Eterozigote per c.2846A>T	4.4	/
8	CRC (locale)	Xelox	si	/	Eterozigote per c.2846A>T	3.37	/
9	CRC (localmente avanzato)	Xelox	si	/	Eterozigote per DPYD*2A	5.15	/
10	Carcinoma della vulva (locale)	Xeloda + cisplatino	si	/	Eterozigote per DPYD*2A	7.38	/
11	Cancro al retto-sigma (localmente avanzato)	Folfox	si	/	Eterozigote per DPYD*2A	2.44	/

Pz, paziente; CRC, cancro colon rettale; FOLFOX, 5-fluorouracile + leucovorina + oxaliplatino; FOLFIRI, 5-fluorouracile + leucovorina irinotecano; XELOX, capecitabina più oxaliplatino; XELODA, Capecitabina; DPYD-PGx, Test farmacogenetico DPYD; UH2/U RATIO, rapporto diidrouracile/uracile; ADR, reazione avversa al farmaco; C, ciclo; G, grado di tossicità secondo i Criteri CTCAE.

Il *paziente 4*, affetto da carcinoma gastrico allo stadio III, in terapia secondo lo schema folfox, ha avuto vomito di grado 3 al secondo ciclo ed è stato identificato come portatore della variante DPYD\*2A dopo il trattamento, proseguendo poi con il solo oxaliplatino.

Il *paziente 5*, con un adenocarcinoma del colon di stadio IV, trattato secondo lo schema folfiri più bevacizumab, ha manifestato vomito di grado 3 all'ottavo ciclo di chemioterapia ed è stato identificato post-trattamento come portatore eterozigote della variante c.2846A>T. Gli è stata dimezzata la dose di 5-FU e non ha più ripresentato l'ADR.

Ai *pazienti da 6 a 11* sottoposti al test farmacogenetico pretrattamento la dose di 5FU è stata dimezzata e fin dal primo ciclo non hanno sofferto di ADR di grado severo.

Il paziente 6 è stato identificato come eterozigote DPYD c.2846A>T e trattato con capecitabina (1000 mg/die); il paziente 7 è stato identificato come eterozigote DPYD c.2846A>T e trattato con capecitabina (2000 mg/die) e oxaliplatino (170 mg ev); il paziente 8 è stato identificato come eterozigote DPYD c.2846A>T e trattato con capecitabina (1500 mg/die) e oxaliplatino (130 mg ev); il paziente 9 è stato identificato come eterozigote per DPYD\*2A e trattato con capecitabina (2000 mg/die) e oxaliplatino (150 mg ev); il paziente 10 è stato identificato come eterozigote per DPYD\*2A e trattato con capecitabina (1000 mg/die) e cisplatino (60 mg ev); il paziente 11 è stato identificato come eterozigote per DPYD\*2A e trattato con 5-FU (340 mg in bolo seguito da 2000 mg per 46 ore di infusione continua) e oxaliplatino (100 mg ev).

#### 4.4. Associazione wild-type DPYD, grado di ADR e rapporto UH2/U

Il *dataset* su cui si basa lo studio<sup>5</sup> contiene informazioni su 150 pazienti di cui 11 sono soggetti eterozigoti DPYD.

Per ciascun paziente si dispone:

- 1) del genotipo dei seguenti tre polimorfismi: i) MTHFR1298 (*WT*, *ETERO*, *OMO*), ii) MTHFR677 (*WT*, *ETERO*, *OMO*), iii) TSER (*2R2R*, *2R3R*, *3R3R*);
- 2) del valore del rapporto UH2/U; ai fini dell'analisi questa variabile è stata categorizzata in due modalità: *Basso* ( $UH2/U < 6$ ) e *Alto* ( $UH2/U \geq 6$ ).
- 3) del grado di reazione avversa (ADR), misurato su una scala discreta da 0 (assenza di reazione) a 4 (massima gravità), per ciascuna delle 12 tossicità raggruppate ai fini dell'analisi nelle seguenti quattro categorie patologiche (variabili):
  - i) *EMATOLOGICHE*: Neutropenia, Anemia, Leucopenia, Piastrinopenia;
  - ii) *GASTROINTESTINALI*: Diarrea, Vomito, Nausea, Stipsi;
  - iii) *NEUROLOGICHE*: Parestesia, Disgeusia;
  - iv) *DERMATOLOGICHE*: Sindrome mano-piede, Mucosite.

Per ogni categoria è stata calcolata la somma dei gradi di ADR associati a ciascuna delle tossicità ricomprese nella categoria stessa.

Le domande di ricerca sono le seguenti:

- 1) per ciascun polimorfismo, il grado totale di ADR di ciascuna delle quattro categorie patologiche di cui sopra dipende dal genotipo del paziente? In altri termini, esiste una differenza statisticamente significativa tra il grado di ADR medio di ciascun genotipo (gruppo)?
- 2) per ciascuna delle 12 tossicità rilevate, il grado di ADR dipende dal livello di UH2/U? Più precisamente, esiste una differenza statisticamente significativa tra il grado di ADR medio dei due gruppi (*Basso* o *Alto*) di UH2/U?

Nel caso della 1) l'analisi è stata condotta sui 139 pazienti wild-type DPYD mentre per la 2) si è fatto uso del campione completo di 150 soggetti reclutati.

---

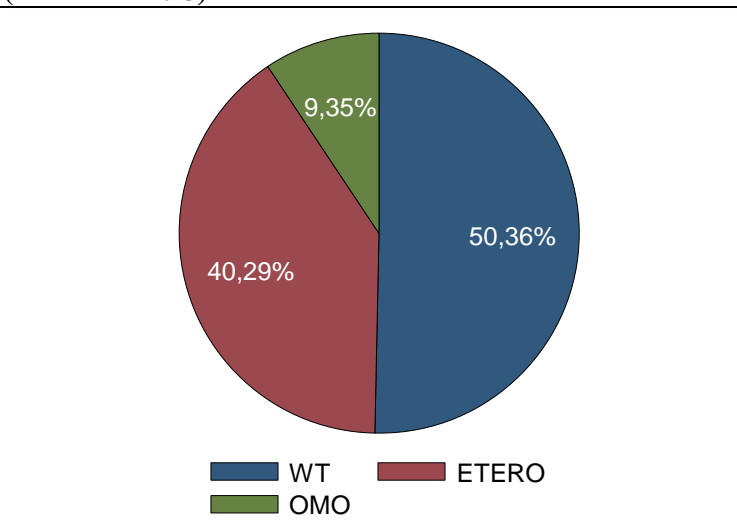
<sup>5</sup> Tutte le elaborazioni sono state realizzate con il software statistico Stata.

Nelle Figure 1-3 è riportata, per ogni polimorfismo, la distribuzione dei pazienti per genotipo. Nel caso di *MTHFR1298* circa la metà dei pazienti ha genotipo *WT*, segue il genotipo *ETERO* con poco più del 40%, mentre il genotipo *OMO* sia attestata al 9,35%. Per *MTHFR677*, invece, il genotipo prevalente è *ETERO* che caratterizza più della metà dei pazienti, mentre l'altra metà è quasi equamente divisa tra i genotipi *WT* (25,90%) e *OMO* (23,02%). Infine, nel caso di *TSER*, prevalente è il genotipo *2R3R* (circa 49% dei pazienti), seguito dal *3R3R* con circa il 28% e dal *2R2R* con il 23%.

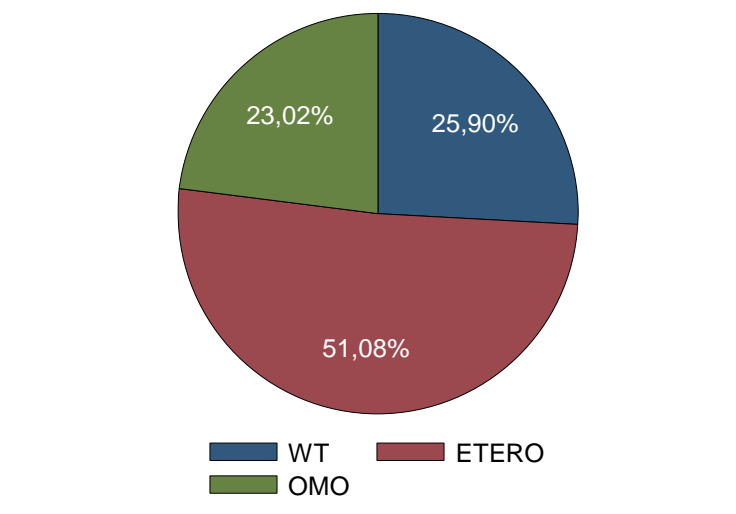
---

**Figura 1 – Distribuzione dei pazienti per genotipo (MTHFR1298)**

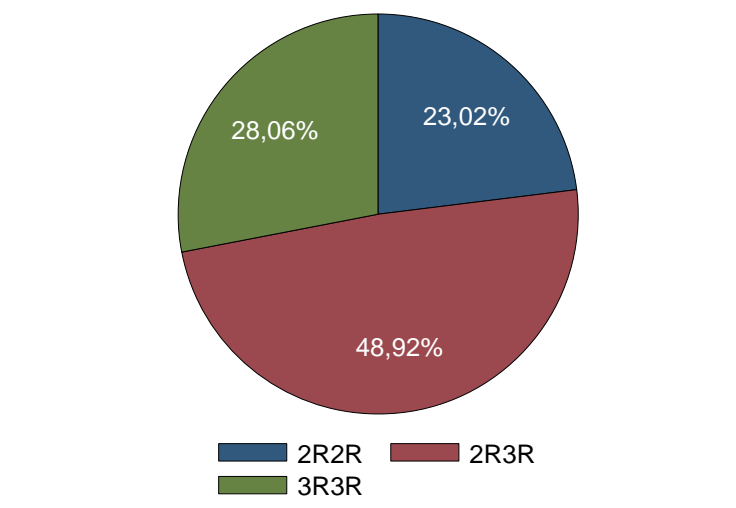
---



**Figura 2 – Distribuzione dei pazienti per genotipo (MTHFR677)**



**Figura 3 – Distribuzione dei pazienti per genotipo (TSER)**



Le Figure 4-6 riportano, invece, il *grado medio di ADR per genotipo e categoria patologica*.

Da esse emerge che in molti casi il grado di ADR medio per un dato polimorfismo e una data categoria patologica risulta diverso a seconda del genotipo considerato. Ad esempio, nel caso di MTHFR1298 (Figura 4) e delle tossicità *EMATOLOGICHE*, mentre i genotipi *WT* e *OMO* presentano un grado medio di ADR (calcolato sui pazienti del gruppo corrispondente) di circa 4, per i pazienti caratterizzati

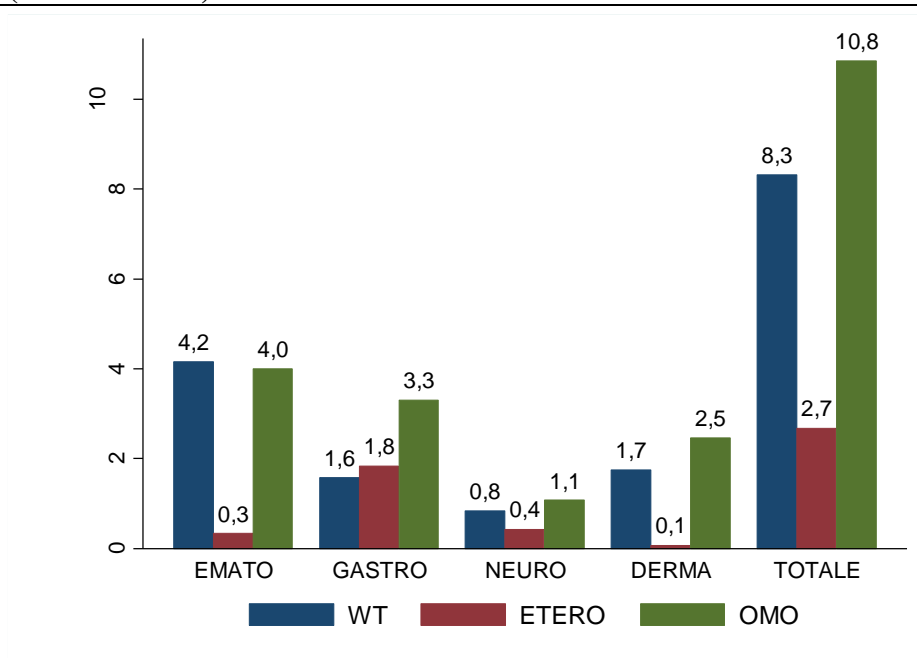
dal genotipo *ETERO* la gravità media risulta di appena 0,3. Analogamente, i pazienti caratterizzati dal genotipo *OMO* sperimentano ADR *GASTROINTESTINALI* con una gravità media pari a 3,3, e quindi superiore a quella dei genotipi *WT* ed *ETERO* per i quali tale valore è pari, rispettivamente, a 1,6 e 1,8.

Una categoria patologica nella quale sembra non vi siano differenze di gravità tra i diversi genotipi è quella delle ADR *NEUROLOGICHE*: a prescindere dal tipo di polimorfismo considerato il grado medio di ADR si mantiene quasi sempre al di sotto di 1.<sup>6</sup>

Se si guarda al complesso delle categorie patologiche (TOTALE) i genotipi che risultano caratterizzati da una gravità media più elevata sono *OMO* (10,8) per MTHFR1298, *WT* (9,4) per MTHFR677 e *2R2R* (9,2) per TSER. I genotipi caratterizzati, invece da ADR meno gravi sono *ETERO* (2,7) per MTHFR1298, *ETERO* (4,4) per MTHFR677 e *2R3R* (5) per TSER.

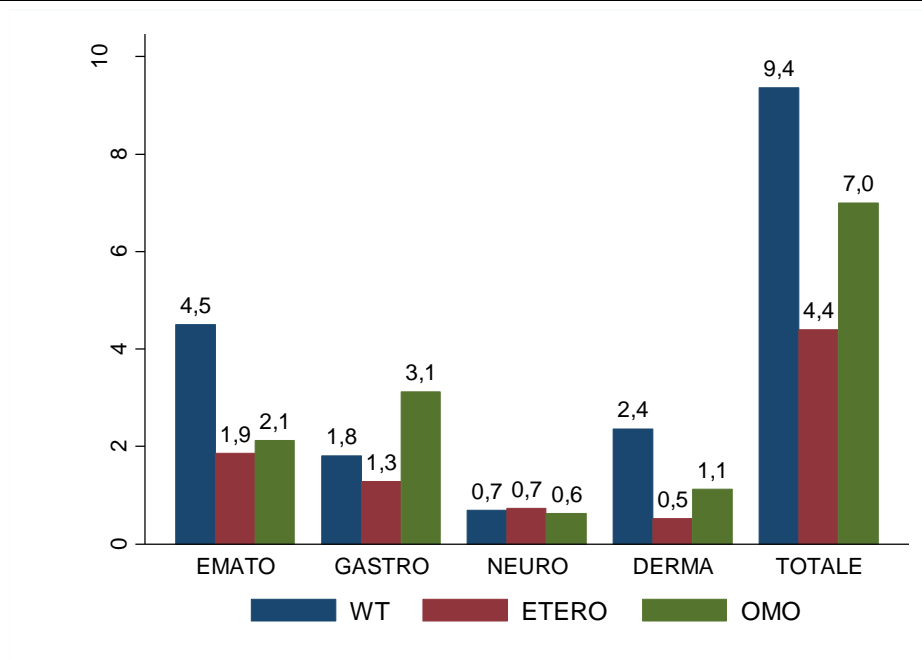
Ovviamente, le differenze riscontrate tra i vari genotipi potrebbero essere dovute all'errore campionario. Un giudizio definitivo sulla significatività statistica delle stesse può essere fornito solo valutandole in un contesto inferenziale, cioè attraverso un *test*. La metodologia a tal fine utilizzata è descritta nel prossimo paragrafo.

**Figura 4 – Grado medio di ADR per genotipo e categoria patologica (MTHFR1298)**

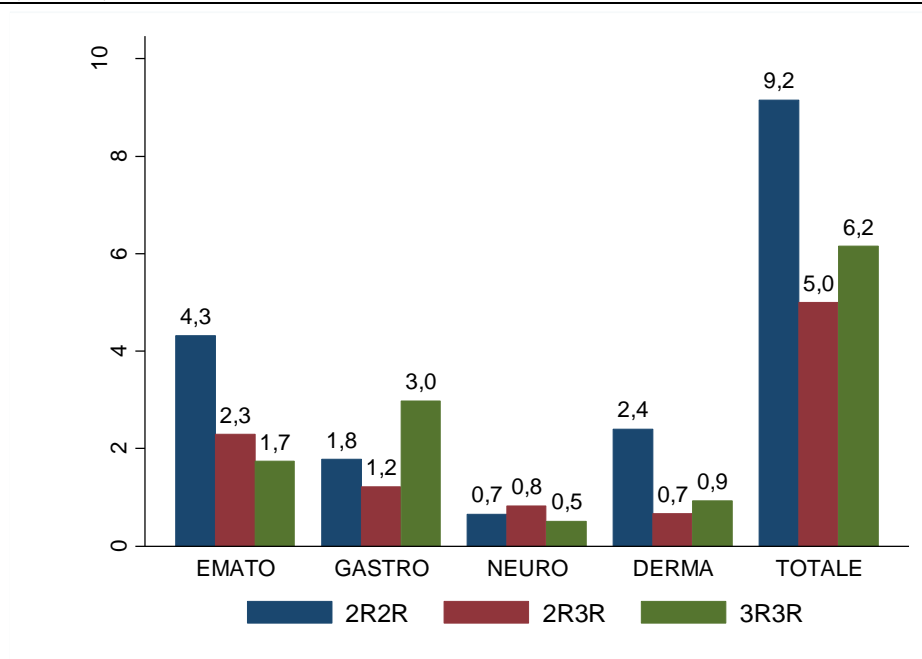


<sup>6</sup> Tranne che per il genotipo *OMO* del gene MTHFR1298 nel quale la gravità media è pari a 1,1 (Figura 4).

**Figura 5 – Grado medio di ADR per genotipo e categoria patologica (MTHFR677)**



**Figura 6 – Grado medio di ADR per genotipo e categoria patologica (TSER)**



La *Tabella 1* riporta i risultati del *test t* per ogni combinazione *polimorfismo-categoria patologica*. Più precisamente essa contiene: il valore della statistica *test*, il *p-value* per l'ipotesi alternativa che le medie dei gruppi (genotipi) siano diverse e l'intervallo al 95% della differenza tra le due medie. Come si nota le medie risultano sempre significativamente diverse ad un livello di almeno il 5%, ad eccezione dei due casi *MTHFR677-NEURO* e *TSER-EMATO*.

Per i casi di differenza significativa tra le medie dei due gruppi, un intervallo di confidenza con limiti positivi denota il fatto che il grado medio di ADR del primo genotipo (gruppo) risulta significativamente superiore a quello del secondo.

Nel caso di *MTHFR1298* e delle ADR Ematologiche, il grado medio di ADR del genotipo *WT* è superiore a quello del gruppo costituito dai genotipi *ETERO +OMO*; la differenza tra la prima media e la seconda è, con una probabilità del 95%, compresa tra 2,51 e 3,75. In altri termini, i pazienti caratterizzati dal primo genotipo si ammalano più gravemente di quelli caratterizzati dai genotipi *ETERO +OMO*. Sempre con riferimento a *MTHFR1298*, lo stesso vale per le ADR Neurologiche e Dermatologiche sia pure con differenze di grado più contenute. Viceversa, per le ADR Gastrointestinali sono i pazienti *ETERO+OMO* ad ammalarsi più gravemente (IC della differenza tra le medie al 95%: [-0,96; -0,13]  $p=0,0102$ ).

Nel caso di *MTHFR677*, gli intervalli di confidenza relativi ai casi di significatività statistica della differenza (*EMATO*, *GASTRO*, *DERMATO*) hanno tutti limiti negativi e ciò implica che i pazienti del secondo gruppo cioè con genotipo *WT+OMO* si ammalano più gravemente di quelli *ETERO* a prescindere dalla categoria patologica considerata (IC della differenza tra le medie al 95%: [-2,29; -0,75]  $p= 0,0001$  *EMATO*), (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,53; -0,76]  $p= 0,0000$  *GASTRO*) e (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,58; -0,93]  $p= 0,0000$  *DERMATO*). Per le ADR Neurologiche, come già rilevato, la differenza tra i livelli di gravità non è significativa e dunque il genotipo sembra non essere un buon predittore del grado di ADR.

Infine, nel caso di *TSER*, quelli che si ammalano più gravemente (rispetto all'altro gruppo) sono i pazienti con genotipo *2R3R* se si considerano le ADR Neurologiche (IC della differenza tra le medie al 95%: [0,05; 0,44]  $p= 0,0139$ ), mentre sono i pazienti *2R2R+3R3R* se si considerano le ADR Gastrointestinali e Dermatologiche (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,58; -0,85]  $p= 0,0000$  *GASTRO*) e (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,28; -0,58]  $p= 0,0000$  *DERMATO*). Non vi è differenza significativa, invece, rispetto alle ADR Ematologiche.



Questi risultati sono evidenti anche nella Figura 7 che contiene *i Box plot del grado medio di ADR per i tre polimorfismi e per le due categorie patologiche (Ematologiche e Gastrointestinali) in rapporto ai diversi genotipi.*

Questo tipo di analisi può, ovviamente, trovare applicazione anche con riferimento alle singole tossicità piuttosto che alle categorie patologiche. Ciò, se da un lato comporta una proliferazione dei possibili confronti (in questo caso i possibili confronti sarebbero 3 polimorfismi x 12 tossicità = 36 anziché 12), dall'altro consente di indagare in modo più specifico quali sono le ADR che contribuiscono maggiormente alle evidenze sopra discusse. A titolo di esempio, si riportano nella *Tabella 2* i risultati ottenuti per la Neutropenia e la Diarrea, le tossicità che hanno registrato i più alti gradi di severità. Con la sola eccezione della combinazione TSER-Neutropenia, le differenze risultano sempre statisticamente significative, almeno al 10%. I casi significativi all'1% riguardano la Neutropenia per MTHFR1298 dove i pazienti di genotipo *WT* presentano livelli di gravità più marcati rispetto al gruppo *ETERO+OMO*, e la Diarrea nel caso di MTHFR677 e TSER, rispetto ai quali i pazienti del secondo gruppo cioè *WT+OMO* per MTHFR 677 e *2R2R+3R3R* per TSER si ammalano più gravemente degli altri (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,33; -0,79]  $p=0,0000$ ) e (IC della differenza tra le medie al 95%: [-1,15; -0,59]  $p=0,0000$ ).

Infine, la *Tabella 3* contiene i risultati dell'analisi finalizzata a rispondere alla domanda di ricerca 2). In questo caso lo scopo è stato quello di verificare se i due gruppi di pazienti caratterizzati da un livello Basso (<6) /Alto ( $\geq 6$ ) di UH2/U, presentino gradi di ADR medi significativamente diversi e dunque se l'UH2/U costituisca un valido predittore del livello di gravità delle singole tossicità. Come mostrato nella tabella, le differenze risultano significative per 8 tossicità (Neutropenia, Leucopenia, Vomito, Nausea, Stipsi, Parestesia, Disgeusia, Mucosite) su 12 registrate nello studio. In 6 degli otto casi significativi, l'intervallo di confidenza della differenza tra le medie presenta limiti positivi cioè il primo gruppo di pazienti (livello di UH2/U *Basso*) presenta gradi di ADR in media più elevati rispetto al secondo (livello di UH2/U *Alto*). Solo Nausea e Stipsi fanno eccezione (IC della differenza tra le medie al 95%: [-0,85; -0,52]  $p=0,0000$ ) e (IC della differenza tra le medie al 95%: [-0,72; -0,31]  $p=0,0000$ ). Nel complesso vi è quindi evidenza di una relazione inversa tra livelli di UH2/U e gravità delle ADR.

**Tabella 1 – Risultati del test t per i tre polimorfismi - Categorie patologiche**

Polimorfismi	Categoria patologica	Statistica test	p-value $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	Intervallo di confidenza al 95% ( $\mu_1 - \mu_2$ )	
				lim. inf.	lim. sup.
MTHFR1298 (gruppi: WT; ETERO+OMO)	EMATO***	9,98	0,0000	2,51	3,75
	GASTRO**	-2,61	0,0102	-0,96	-0,13
	NEURO***	2,95	0,0040	0,10	0,49
	DERMA***	7,41	0,0000	0,90	1,55
MTHFR677 (gruppi: ETERO; WT+OMO)	EMATO***	-3,90	0,0001	-2,29	-0,75
	GASTRO***	-5,91	0,0000	-1,53	-0,76
	NEURO	0,69	0,4927	-0,13	0,27
	DERMA***	-7,66	0,0000	-1,58	-0,93
TSER (gruppi: 2R3R; 2R2R+3R3R)	EMATO	-1,48	0,1414	-1,42	0,20
	GASTRO***	-6,60	0,0000	-1,58	-0,85
	NEURO**	2,50	0,0139	0,05	0,44
	DERMA***	-5,29	0,0000	-1,28	-0,58

\*\*\*, \*\*, \* = differenza tra le medie significativa rispettivamente all'1%, al 5% e al 10%.

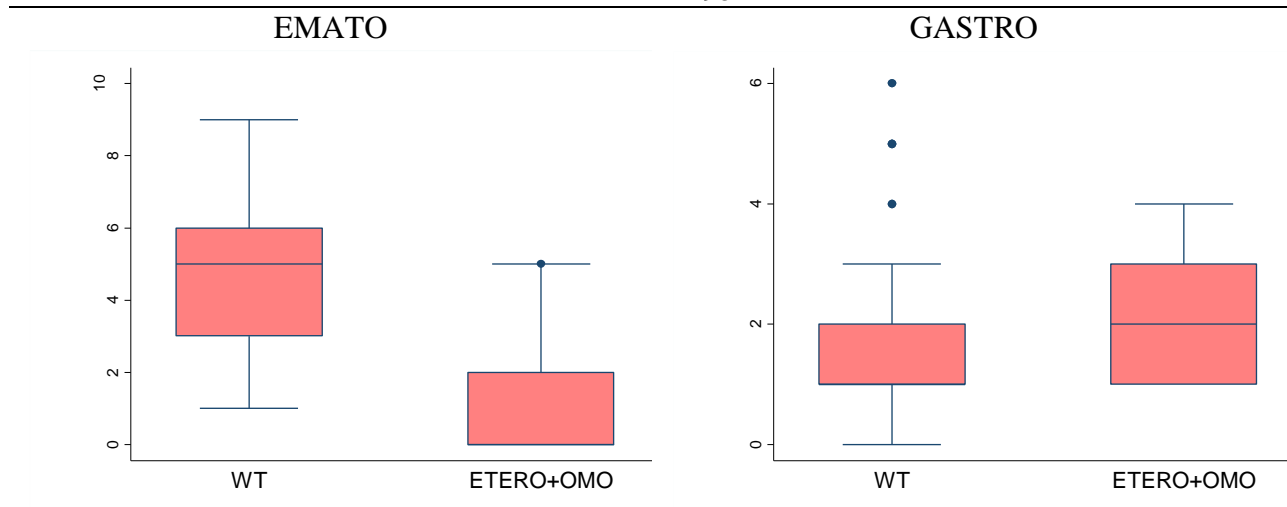
**Tabella 2 – Risultati del test t per i tre polimorfismi - Neutropenia e Diarrea**

Polimorfismi	ADR	Statistica test	p-value $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	Intervallo di confidenza al 95% ( $\mu_1 - \mu_2$ )	
				lim. inf.	lim. sup.
MTHFR1298 (gruppi: WT; ETERO+OMO)	Neutropenia***	11,13	0,0000	1,24	1,79
	Diarrea*	1,80	0,0736	-0,03	0,61
MTHFR677 (gruppi: ETERO; WT+OMO)	Neutropenia*	-1,87	0,0635	-0,72	0,02
	Diarrea***	-7,74	0,0000	-1,33	-0,79
TSER (gruppi: 2R3R; 2R2R+3R3R)	Neutropenia	0,33	0,7442	-0,31	0,44
	Diarrea***	-6,10	0,0000	-1,15	-0,59

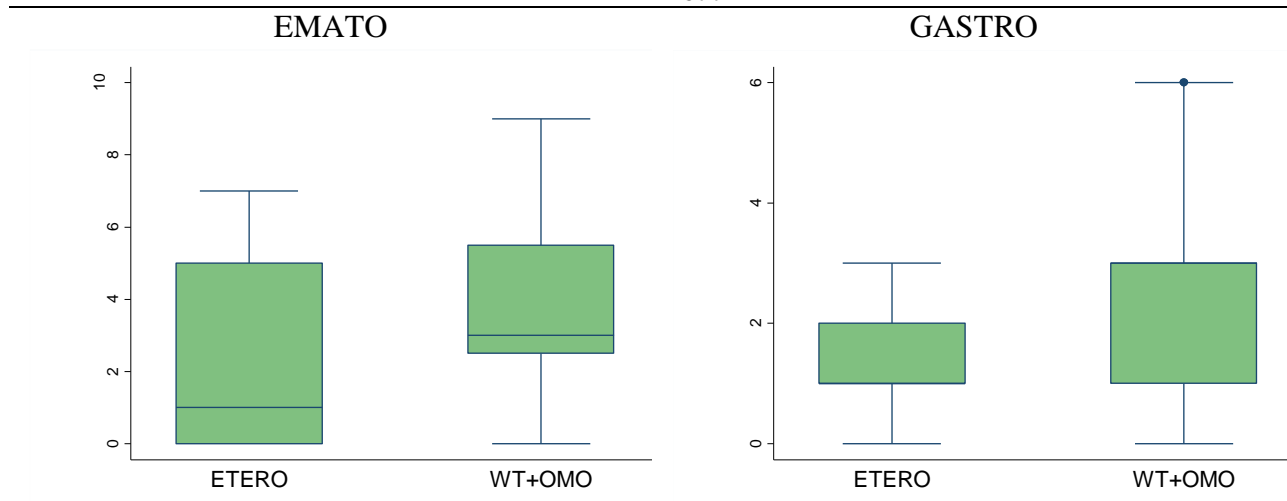
\*\*\*, \*\*, \* = differenza tra le medie significativa rispettivamente all'1%, al 5% e al 10%.

**Figura 7 – Box plot del grado medio di ADR per i tre polimorfismi e per le due categorie patologiche (Ematologiche e Gastrointestinali) in rapporto ai diversi genotipi**

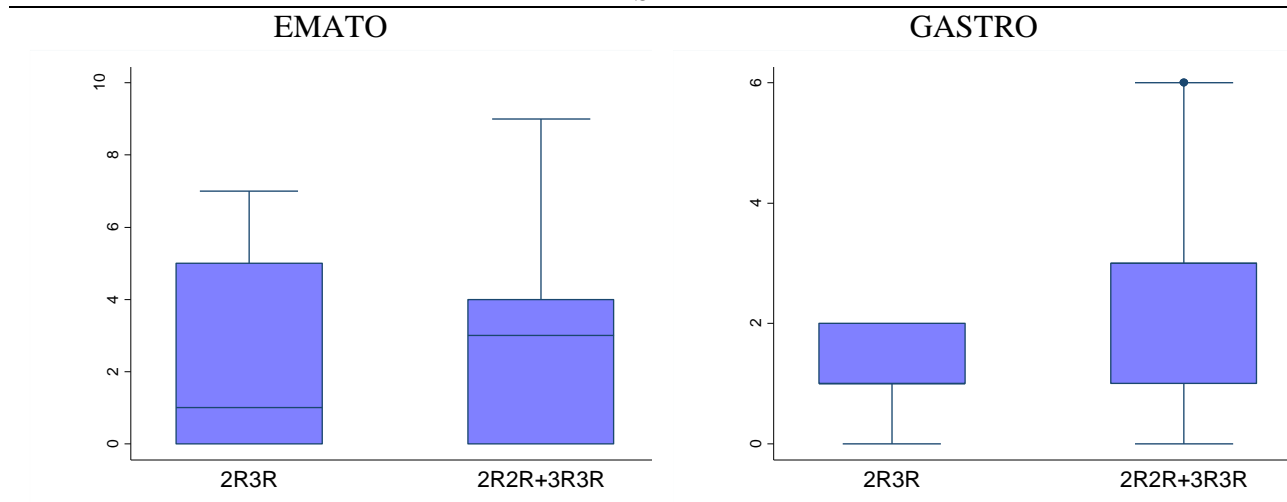
MTHFR1298



MTHFR677



TSER



**Tabella 3 – Risultati del *test t* su UH2/U (gruppi: BASSO-ALTO) – Tutte le tossicità rilevate**

ADR	Statistica <i>test</i>	<i>p-value</i> $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	Intervallo di confidenza al 95%	
			$(\mu_1 - \mu_2)$	
			<i>lim. inf.</i>	<i>lim. sup.</i>
Neutropenia ***	9,67	0,0000	0,97	1,48
Anemia	-0,74	0,4599	-0,37	0,17
Leucopenia ***	10,16	0,0000	0,74	1,10
Piastrinopenia	1,60	0,1130	-0,05	0,45
Diarrea	0,04	0,9643	-0,33	0,34
Vomito ***	3,86	0,0002	0,17	0,54
Nausea ***	-8,32	0,0000	-0,85	-0,52
Stipsi ***	-4,97	0,0000	-0,72	-0,31
Parestesia *	1,90	0,0611	-0,01	0,43
Disgeusia ***	3,70	0,0004	0,06	0,21
Sindrome mano-piede	-0,16	0,8722	-0,26	0,23
Mucosite ***	8,53	0,0000	0,64	1,03

\*\*\*, \*\*, \* = differenza tra le medie significativa rispettivamente all'1%, al 5% e al 10%.

## 5. DISCUSSIONE

Le fluoropirimidine sono i farmaci antineoplastici più prescritti al mondo e rappresentano la terapia maggiormente utilizzata per il cancro del colon-retto. Tuttavia, circa il 10-30% dei pazienti trattati soffre di tossicità dose-limitante e nel 4% di questi può essere letale (51). Nel nostro studio ADR di grado 3 e 4, rispettivamente gravi e potenzialmente letali, si sono verificate con una frequenza del 29%. Un ridotto metabolismo del 5FU può determinare l'accumulo di metaboliti intermedi con la comparsa di reazioni avverse gravi, soprattutto ematologiche e gastrointestinali (52); la neutropenia e la diarrea sono le tossicità per il grado 3 e 4 maggiormente registrate nel nostro campione. La carenza di DPD rappresenta una parte sostanziale della tossicità indotta dalle FP (8,53,54); quattro polimorfismi nel gene DPYD, c.190511G> A (rs3918290, DPYD\*2A, p.IVS14), c.1679T> G (rs55886062, DPYD\*13, p.I560S), c.2846A> T (rs67376798, p.D949V) e c.1129-5923C>G (rs75017182, p.IVS10, HapB3) possono causare una carenza parziale o completa di DPD con lo sviluppo di tossicità severa (9,54,55). Quattro degli undici eterozigoti DPYD hanno mostrato ADR gravi; tre di questi pazienti sono stati sottoposti al test farmacogenetico post-trattamento, sebbene l'EMA ne abbia raccomandato l'esecuzione prima di iniziare la terapia con FP (20,21). Il *paziente 1* ha presentato neutropenia e mucosite di grado 3 risultando poi eterozigote DPYD\*2A e, dimezzata la dose di 5FU, dal quarto ciclo non ha sofferto di ADR di grado severo. I pazienti 4 e 5 hanno avuto tossicità gastrointestinale (vomito) di grado 3 risultando poi eterozigoti DPYD\*2A e DPYD c.2846 A>T. In questi due pazienti l'ADR di grado severo si è manifestata in tempi diversi; nel paziente 4 dopo il secondo ciclo e nel paziente 5 dopo l'ottavo ciclo. Al paziente 4 eterozigote DPYD\*2A è stata sospesa la terapia con 5FU perché portatore di una variante non funzionale (deficit enzimatico completo); al paziente 5 eterozigote DPYD c.2846 A>T sono state dimezzate le dosi di 5FU perché portatore di una variante ipofunzionale (deficit enzimatico parziale) non ripresentando più ADR gravi. Il *paziente 3* eterozigote DPYD c.2846 A>T, sebbene sottoposto al test farmacogenetico pretrattamento ha continuato ad avere tossicità gastrointestinale di grado 3 (diarrea). I restanti sette degli undici eterozigoti DPYD sono stati sottoposti, invece, al test farmacogenetico pretrattamento. Il *paziente 2* eterozigote DPYD\*2A e i *pazienti da 6 a 11* (tre eterozigoti DPYD c.2846 A>T e tre eterozigoti DPYD\*2A), ridotta la dose iniziale di 5FU, non hanno presentato ADR di grado severo. Risulta quindi necessario implementare nella pratica clinica oncologica l'esecuzione dello screening DPYD perché può prevenire il 20-30% delle tossicità precoci gravi con riduzione dei costi sanitari associati (56,57).

Tuttavia, non solo i pazienti portatori di una delle quattro varianti DPYD raccomandate sviluppano ADR gravi da FP (28,29). È stato dimostrato che possono essere coinvolti altri polimorfismi a carico del gene MTHFR e TYMS-TSER, come marker predittivi di tossicità (58,59,60). L'MTHFR è un

enzima coinvolto nella sintesi delle purine, delle timidine e nell'omeostasi dei folati; due polimorfismi -C677T e -A1298C nel gene che codifica questo enzima possono esercitare un effetto sinergico sulla diminuzione dell'attività della MTHFR nella popolazione caucasica e sono stati proposti come potenziali fattori predittivi di tossicità da FP, da raltitrexed e da metotrexato (61). Xiong-wei et al. hanno mostrato che l'allele mutato C a carico del polimorfismo MTHFR 1298 nel 56% dei pazienti era associato ad una ridotta attività dell'enzima MTHFR e ad un aumento del rischio di tossicità gastrointestinale ma non di altri tipi di ADR (62). Anche nel nostro studio gli eterozigoti (AC) e gli omozigoti (CC) per il gene MTHFR1298 presentavano ADR gastrointestinali più gravi rispetto ai wild-type (AA). Nel caso del polimorfismo MTHFR677, i pazienti con genotipo wild-type (CC) e omozigote (TT) mostravano in media gradi di ADR più gravi rispetto agli eterozigoti (CT), a prescindere dal tipo di tossicità rilevata (ematologica, gastroenterologica o dermatologica). Ramos-Esquivel et al., invece, hanno dimostrato che solo gli individui portatori di almeno un allele mutato (T) del polimorfismo MTHFR C677T avevano un aumento del rischio di sviluppare anemia, neutropenia, trombocitopenia, diarrea e sindrome mano-piede rispetto ai pazienti portatori degli alleli wild-type (63). Inoltre, Nahid et al. hanno evidenziato che gli omozigoti MTHFR677 presentavano tossicità di grado 3 e 4 ma erano anche quelli che rispondevano meglio al trattamento (64). Tuttavia, Campbell et al. in una recente metanalisi non hanno trovato alcuna correlazione statisticamente significativa tra questi due polimorfismi e la tossicità da FP (65). De Mattia et al., hanno sostenuto che è difficile stabilire una correlazione tra i due polimorfismi MTHFR e la tossicità da FP per la variabilità della quantità di folati introdotti con la dieta e dei livelli di saturazione dell'enzima in rapporto ai diversi regimi chemioterapici utilizzati (66).

L'altro polimorfismo proposto come fattore genetico responsabile di tossicità da FP è nella regione enhancer TSER del gene TYMS che codifica l'enzima timidilato sintasi (TS). È stato dimostrato che i pazienti portatori dell'allele a doppia ripetizione (2R) avevano una maggiore probabilità di sviluppare tossicità gravi da FP rispetto agli eterozigoti 2R/3R e all'omozigote mutato 3R/3R. Ciò potrebbe essere correlato a una diminuzione dell'espressione genica di TYMS nel tessuto normale dei pazienti a genotipo 2R/2R con aumento dell'inibizione enzimatica quando assumono le FP (23,24,25). Se si fa riferimento al complesso delle ADR registrate nei soggetti wild-type DPYD, uno dei genotipi che risultava caratterizzato da una gravità media più elevata era quello 2R/2R. In particolare, pazienti con genotipo 2R/2R e 3R/3R presentavano ADR gastrointestinali e dermatologiche più gravi rispetto agli eterozigoti 2R/3R. Meulendijks et al. hanno mostrato che pazienti con genotipo 2R/2R avevano avuto nuove ospedalizzazioni o ricoveri prolungati a causa della comparsa di grave neutropenia febbrile, sindrome mano-piede e diarrea (67). Inoltre, Schwab et al. hanno dimostrato che la presenza in omozigosi dell'allele 2R nella regione enhancer del gene

TYMS raddoppiava il rischio di diarrea rispetto ai pazienti eterozigoti DPYD (68). Nel nostro campione i pazienti con genotipo 2R/2R e 3R/3R presentavano in media i casi più gravi di diarrea rispetto agli eterozigoti. Una recente metanalisi di Hamzic et al. ha evidenziato che erano gli eterozigoti a mostrare un rischio tre volte maggiore di sviluppare una grave sindrome mano-piede rispetto agli omozigoti mutati (69). Un dato interessante, invece, emerso dalla nostra casistica è che i genotipi 2R/3R si ammalavano più gravemente di ADR neurologiche rispetto agli altri due. Gallegos-Arreola et al hanno identificato che la presenza del genotipo eterozigote e di quello omozigote per l'allele 2R era associata ad un alto rischio di sviluppare ADR ematologiche in pazienti fumatori affetti da tumore del colon-retto allo stadio III e IV (70). Invece, nel nostro studio non è stata registrata differenza significativa rispetto alle ADR ematologiche per i tre genotipi di TSER. A causa di risultati discordanti la variante germinale di TSER non è ancora considerata di rilevanza clinica dalle Linee Guida.

Risulta prioritario quindi individuare un quadro più ampio di possibili varianti geniche ma gli sforzi dei ricercatori sono indirizzati anche a trovare i migliori metodi di fenotipizzazione del deficit di DPD da integrare con successo alla genotipizzazione DPYD. Tra i diversi approcci proposti finora, l'analisi dei parametri farmacocinetici del 5-FU è stata presa in considerazione prima dell'introduzione della farmacogenetica. Dagli anni 80 è stata dimostrata l'esistenza di una correlazione tra i livelli di 5FU e la tossicità da FP; oggi è possibile determinare i livelli plasmatici di farmaco utilizzando l'HPLC-MS/MS (37,38,50). Nel nostro studio solo tre pazienti eterozigoti DPYD (pazienti 1, 2 e 3) hanno firmato il consenso a prelievi seriati per effettuare il TDM del 5FU durante il ciclo di terapia. Solo per il paziente 1, il TDM è stato eseguito contestualmente alla genotipizzazione post-trattamento quando il soggetto aveva già presentato ADR gravi. Poi dimezzata la dose, è stato rieseguito il TDM e le concentrazioni di farmaco erano nel range di normalità in assenza di ADR di grado severo. Per il paziente 2, il TDM è stato eseguito contestualmente alla genotipizzazione pretrattamento. Ridotta la dose iniziale di farmaco, nei cicli successivi i livelli plasmatici di 5FU erano nel range di normalità con assenza di ADR gravi. Per il paziente 3, il TDM è stato eseguito dopo genotipizzazione pretrattamento; nonostante la riduzione della dose iniziale il paziente ha continuato a presentare tossicità gastrointestinale grave e livelli di farmaco costantemente elevati tali da dover interrompere la terapia con FP. Per gli eterozigoti DPYD il TDM permette di acquisire informazioni sulla sicurezza della dose iniziale minimizzando il rischio di tossicità da farmaco-accumulo (40,71,72). Tuttavia, questa metodica non sempre è fattibile nelle strutture ospedaliere per ragioni tecnico-laboratoristiche e perché non è in grado di rilevare un deficit di DPD pretrattamento.

È necessario un metodo di fenotipizzazione meno invasivo e soprattutto predittivo di tossicità rispetto al TDM; a tal proposito viene presa in considerazione la misurazione del rapporto plasmatico UH2/U.

Nei nostri pazienti, dallo stesso campione di sangue utilizzato per la genotipizzazione sono state dosate le concentrazioni plasmatiche dei due metaboliti UH2 e U per valutare indirettamente l'attività dell'enzima DPD. È stato dimostrato che in pazienti trattati con 5-FU, livelli plasmatici di uracile elevati erano correlati con una diminuzione della clearance del farmaco e la comparsa di tossicità (73,74). Secondo Zhou et al. non vi era un'associazione statisticamente significativa tra il rapporto UH2/U, la concentrazione plasmatica di 5FU e la tossicità da FP (75). Kobuchi et al. hanno dimostrato in modelli animali che questo rapporto può avere una sua validità solo dopo somministrazione delle FP perché l'attività della DPD subisce variazioni all'assunzione del farmaco (76). Kristensen et al., invece, hanno evidenziato che questo rapporto UH2/U può avere valore predittivo di tossicità pretrattamento solo se in associazione alla genotipizzazione DPYD (77). È stato dimostrato che solo un basso rapporto UH2/U plasmatico sia un buon fattore predittivo di tossicità; Gamelin et al. hanno suggerito che un valore inferiore a 1,8 identificerebbe i pazienti a più alto rischio di tossicità (78). Kristensen et al. hanno studiato 24 pazienti trattati con FP che hanno sperimentato tossicità grave, di cui 21 avevano un rapporto UH2/U di 4 (proposto come cut-off) con un valore medio che diminuiva con il grado di tossicità (78). Thomas et al. hanno fissato, invece, il valore di cut-off a 6, specificando che i pazienti che trasportano un allele funzionale e uno non funzionale di DPYD (eterozigoti) avevano un rapporto UH2/U che variava da 1,5 a 6, mentre quelli che erano portatori di due alleli non funzionali (omozigoti) mostravano un valore vicino a 0, corrispondente a una carenza completa di DPD (79). Nei nostri 11 pazienti eterozigoti DPYD il rapporto UH2/U variava da 1,77 a 7,38; la fluttuazione dei valori del rapporto potrebbe riflettere la variabilità del deficit di DPD in un range tra il 30% e il 70% nei pazienti eterozigoti. Nondimeno, il rapporto UH2/U plasmatico potrebbe contribuire a identificare pretrattamento in associazione alla genotipizzazione, i soggetti che sono più a rischio di sviluppare ADR di grado severo. Il paziente 3, infatti, è un chiaro esempio della complessità della gestione della terapia a base di FP. Il soggetto, genotipizzato pretrattamento come eterozigote DPYD c.2846A>T, mostrava il valore del rapporto plasmatico UH2/U più basso registrato nello studio (1,77). Nonostante il dimezzamento della dose iniziale e una ulteriore riduzione del dosaggio del 10%, ha continuato ad avere tossicità di grado 3 e 4 con livelli costantemente alti di farmaco al TDM per cui è stato necessario interrompere la terapia con FP. Valutando i valori del rapporto UH2/U sul totale del campione, pazienti con un livello basso (<6) presentavano gradi di ADR medi significativamente diversi rispetto a quelli con un livello alto ( $\geq 6$ ) di UH2/U. Le differenze risultavano significative per 8 tossicità (Neutropenia, Leucopenia, Vomito, Nausea, Stipsi, Parestesia, Disgeusia e Mucosite) su 12 registrate. In 6 degli otto casi significativi, l'intervallo di confidenza della differenza tra le medie presentava limiti positivi cioè il primo gruppo di pazienti (livello di UH2/U Basso) mostrava gradi di ADR in media più elevati rispetto al secondo (livello di UH2/U



Alto). Solo le tossicità nausea e stipsi facevano eccezione. Nel complesso vi è evidenza nel nostro campione di una relazione inversa tra livelli di UH2/U e la gravità delle ADR. Pertanto, va precisato che il rapporto UH2/U da solo rimane un marcatore non sempre affidabile per le diverse variabili che potrebbero influenzarlo come l'assunzione contemporanea di farmaci inibenti l'attività enzimatica e la presenza di altri polimorfismi rari o poco noti (30,35).

### **Limiti dello studio**

Trovare una correlazione tra l'impiego delle FP e una specifica ADR può essere un compito difficile perché questi farmaci sono usati in associazione con altri chemioterapici, come oxaliplatino ed irinotecano; quest'ultimi possono essere causa di tossicità gravi come le FP (80). Queste ADR sono associate a polimorfismi farmacogenetici, come la mutazione del gene della Glutazione S-Transferasi P1 (GSTP1 Ile105val, rs1695) per l'oxaliplatino (81,82) e del gene della UDP-Glucosil-Transferasi (UGT1A1\*28, rs34815109) per l'irinotecano (83,84). Questi SNPs e altri a carico del gene DPYD introdotti di recente nelle linee guida (85,86) non sono stati presi in considerazione nella nostra popolazione. Studi più ampi, con un follow-up più lungo e che includano tutte le varianti geniche coinvolte sono necessari.

## **6. CONCLUSIONI**

I risultati riportati nella nostra casistica confermano la rilevanza clinica dello screening farmacogenetico delle varianti DPYD come indagine di primo livello nei pazienti naïve.

Tuttavia, la tossicità da 5FU si può manifestare anche nei soggetti wild-type DPYD. Pertanto, la genotipizzazione di altri polimorfismi in geni che codificano la MTHFR e la TS può essere presa in considerazione come screening farmacogenetico di secondo livello.

Inoltre, un approccio combinato genotipizzazione-fenotipizzazione potrebbe rappresentare un ulteriore valido strumento per la personalizzazione della terapia nei pazienti oncologici che assumono FP.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Rodríguez-Vicente AE, Lumbreras E, Hernández JM, Martín M, Calles A, Otín CL, Algarra SM, Páez D, Taron M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics as tools in cancer therapy. *Drug Metab Pers Ther.* 2016;31(1):25-34.
2. Miller CR, McLeod HL. Pharmacogenomics of cancer chemotherapy-induced toxicity. *J Support Oncol.* 2007;5(1):9-14.
3. Innocenti F. Challenges in the development and use of pharmacogenomic markers in oncology. *J Support Oncol.* 2007 ;5(1):15-6.
4. Saadeh C, Bright D, Rustem D. Precision Medicine in Oncology Pharmacy Practice. *Acta Med Acad.* 2019;48(1):90-104.
5. Hernando-Cubero J, Matos-García I, Alonso-Orduña V, Capdevila J. The Role of Fluoropyrimidines in Gastrointestinal Tumours: from the Bench to the Bed. *J Gastrointest Cancer.* 2017;48(2):135-147.
6. Barin-Le Guellec C, Lafay-Chebassier C, Ingrand I, Tournamille JF, Boudet A, Lanoue MC, Defossez G, Ingrand P, Perault-Pochat MC, Etienne-Grimaldi MC. Toxicities associated with chemotherapy regimens containing a fluoropyrimidine: A real-life evaluation in France. *Eur J Cancer.* 2020; 124:37-46.
7. Baldo P, Fornasier G, Ciolfi L, Sartor I, Francescon S. Pharmacovigilance in oncology. *Int J Clin Pharm.* 2018;40(4):832-841.
8. Wigle TJ, Tsvetkova EV, Welch SA, Kim RB. DPYD and Fluorouracil-Based Chemotherapy: Mini Review and Case Report. *Pharmaceutics.* 2019;11(5):199.
9. Henricks LM, Opdam FL, Beijnen JH, Cats A, Schellens JHM. DPYD genotype-guided dose individualization to improve patient safety of fluoropyrimidine therapy: call for a drug label update. *Ann Oncol.* 2017;1;28(12):2915-2922.
10. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-conclusion/xeloda-h-c-316-a31-1481-epar-scientific-conclusions-article-31\\_it.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-conclusion/xeloda-h-c-316-a31-1481-epar-scientific-conclusions-article-31_it.pdf)
11. Saif, M.W., Ezzeldin, H., Vance, K. et al. DPYD\*2A mutation: the most common mutation associated with DPD deficiency. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 60, 503–507.
12. Henricks LM, van Merendonk LN, Meulendijks D, Deenen MJ, Beijnen JH, de Boer A, Cats A, Schellens JHM. Effectiveness and safety of reduced dose fluoropyrimidine therapy in patients carrying the DPYD\*2A variant: A matched pair analysis. *Int J Cancer.* 2019; 1;144(9):2347-2354.

13. Dean L, Kane M. Fluorouracil Therapy and DPYD Genotype. 2016 Nov 3 [updated 2021 Jan 11]. In: Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, Esquivel B, Kane MS, Kattman BL, Malheiro AJ, editors. Medical Genetics Summaries. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012–. PMID: 28520376.
14. Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM, Meulendijks D, Frederix GWJ, Kienhuis E, Creemers GJ, Baars A, Dezentjé VO, Imholz ALT, Jeurissen FJF, Portielje JEA, Jansen RLH, Hamberg P, TenTije AJ, Droogendijk HJ, Koopman M, Nieboer P, van de Poel MHW, Mandigers CMPW, Rosing H, Beijnen JH, Werkhoven EV, van Kuilenburg ABP, van Schaik RHN, Mathijssen RHJ, Swen JJ, Gelderblom H, Cats A, Guchelaar HJ, Schellens JHM. DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. *Lancet Oncol.* 2018;19(11):1459-1467.
15. Meulendijks D, Henricks LM, van Kuilenburg AB, Jacobs BA, Aliev A, Rozeman L, Meijer J, Beijnen JH, de Graaf H, Cats A, Schellens JH. Patients homozygous for DPYD c.1129-5923C>G/haplotype B3 have partial DPD deficiency and require a dose reduction when treated with fluoropyrimidines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78(4):875-80.
16. Amstutz, U.; Henricks, L. M.; Offer, S. M.; Barbarino, J.; Schellens, J. H. M.; Swen, J. J.; Klein, T. E.; McLeod, H. L.; Caudle, K. E.; Diasio, R. B.; Schwab, M. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2018;103 (2), 210–216.
17. Lunenburg, C. A. T. C.; van derWouden, C. H.; Nijenhuis, M.; Crommentuijn-van Rhenen, M. H.; de Boer-Veger, N. J.; Buunk, A. M.; Houwink, E. J. F.; Mulder, H.; Rongen, G. A.; van Schaik, R. H. N.; van derWeide, J.; Wilffert, B.; Deneer, V. H. M.; Swen, J. J.; Guchelaar, H.-J. Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) Guideline for the Gene–Drug Interaction of DPYD and Fluoropyrimidines. *Eur. J. Hum. Genet.* 2020; 28 (4), 508–517.
18. <https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/Update> february 2020
19. Lorient MA, Ciccolini J, Thomas F, Barin-Le-Guellec C, Royer B, Milano G, Picard N, Becquemont L, Verstuyft C, Narjoz C, Schmitt A, Bobin-Dubigeon C, Harle A, Paci A, Poinsignon V, Quaranta S, Evrard A, Hennart B, Broly F, Fonrose X, Lafay-Chebassier C, Wozny AS, Masskouri F, Boyer JC, Etienne-Grimaldi MC. Dihydropyrimidine déhydrogenase (DPD) deficiency screening and securing of fluoropyrimidine-based chemotherapies: Update and recommendations of the French GPCO-Unicancer and RNPgX networks. *Bull Cancer.* 2018;105(4):397-407.

20. EMA recommendations on DPD testing prior to treatment with fluorouracil, capecitabine, tegafur and flucytosine. 30 april 2020
21. <https://www.aifa.gov.it/en/-/comunicazione-ema-sui-medicinali-fluorouracile-capecitabina-tegafur-e-flucitosina>
22. Palmirotta R, Carella C, Silvestris E, Cives M, Stucci SL, Tucci M, Lovero D, Silvestris F. SNPs in predicting clinical efficacy and toxicity of chemotherapy: walking through the quicksand. *Onco target*. 2018;18;9(38):25355-25382.
23. Schaerer D, Froehlich TK, Hamzic S, Offer SM, Diasio RB, Joerger M, Amstutz U, Largiadèr CR. A Novel Nomenclature for Repeat Motifs in the Thymidylate Synthase Enhancer Region and Its Relevance for Pharmacogenetic Studies. *J Pers Med*. 2020;19;10(4):181.
24. Romiti A, Roberto M, D'Antonio C, Onesti CE, Barucca V, Milano A, Gentile G, Lionetto L, Medda E, Mazzuca F, Botticelli A, Falcone R, Simmaco M, Marchetti P. The TYMS-TSER polymorphisms associated with toxicity of low-dose capecitabine in patients with advanced gastrointestinal cancer. *Anticancer Drugs*. 2016;27(10):1044-9.
25. Abbasian MH, Ansarinejad N, Abbasi B, Iravani M, Ramim T, Hamed F, Ardekani AM. The Role of Dihydropyrimidine Dehydrogenase and Thymidylate Synthase Polymorphisms in Fluoropyrimidine-Based Cancer Chemotherapy in an Iranian Population. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2020;12(3):157-164.
26. Marsh S, McLeod HL. Thymidylate synthase pharmacogenetics in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2001;1(3):175-8; 179-81.
27. Ulvik, A.; Ueland, P. M.; Fredriksen, A.; Meyer, K.; Vollset, S. E.; Hoff, G.; Schneede, J. Functional Inference of the Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C > T and 1298A > C Polymorphisms from a Large-Scale Epidemiological Study. *Hum. Genet*. 2007;121 (1), 57–64.
28. Amirfallah A, Kocal GC, Unal OU, Ellidokuz H, Oztop I, Basbinar Y. DPYD, TYMS and MTHFR Genes Polymorphism Frequencies in a Series of Turkish Colorectal Cancer Patients. *J Pers Med*. 2018;13;8(4):45.
29. Loganayagam A, Arenas Hernandez M, Corrigan A, Fairbanks L, Lewis CM, Harper P, Maisey N, Ross P, Sanderson JD, Marinaki AM. Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. *Br J Cancer*. 2013;25;108(12):2505-15.
30. Etienne-Grimaldi MC, Boyer JC, Beroud C, Mbatchi L, van Kuilenburg A, Bobin-Dubigeon C, Thomas F, Chatelut E, Merlin JL, Pinguet F, Ferrand C, Meijer J, Evrard A, Llorca L, Romieu G, Follana P, Bachelot T, Chaigneau L, Pivot X, Dieras V, Lartigand R, Mousseau

- M, Goncalves A, Roché H, Bonnetterre J, Servent V, Dohollou N, Château Y, Chamorey E, Desvignes JP, Salgado D, Ferrero JM, Milano G. New advances in DPYD genotype and risk of severe toxicity under capecitabine. *PLoS One*. 2017;8;12(5): e0175998.
31. Chazal M, Etienne MC, Renee N, et al. Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. *Clin Cancer Res* 1996; 2:507-510.
  32. Van Kuilenburg ABP, Van Lenthe H, Wanders RJ, Van Gennip AH. Subcellular localization of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Biol Chem* 1997, 378: 1047-1053.
  33. Neto OV, Raymundo S, Franzoi MA, do Carmo Artmann A, Tegner M, Müller VV, Hahn RZ, Alves GV, Schwartzmann G, Linden R, Antunes MV. DPD functional tests in plasma, fresh saliva and dried saliva samples as predictors of 5-fluorouracil exposure and occurrence of drug-related severe toxicity. *Clin Biochem*. 2018; 56:18-25.
  34. Galarza AF, Linden R, Antunes MV, Hahn RZ, Raymundo S, da Silva AC, Staggemeier R, Spilki FR, Schwartzmann G. Endogenous plasma and salivary uracil to dihydrouracil ratio and DPYD genotyping as predictors of severe fluoropyrimidine toxicity in patients with gastrointestinal malignancies. *Clin Biochem*. 2016;49(16-17):1221-1226.
  35. Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S, Poirier AL, Gamelin L, Morel A, Gamelin E. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett*. 2007; 8;249(2):271-82.
  36. Masson E, Zamboni WC. Pharmacokinetic optimisation of cancer chemotherapy. Effect on outcomes. *Clin Pharmacokinet*. 1997;32(4):324-43.
  37. Paci A, Veal G, Bardin C, Levêque D, Widmer N et al. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1-cytotoxics. *Eur J Cancer*. 2014;50(12):2010-9.
  38. Mindt S, Aida S, Merx K, Müller A, Gutting T, Hedtke M, Neumaier M, Hofheinz RD. Therapeutic drug monitoring (TDM) of 5-fluorouracil (5-FU): new preanalytic aspects. *Clin Chem Lab Med*. 2019;26;57(7):1012-1016.
  39. Hamzic S, Aebi S, Joerger M, Montemurro M, Ansari M, Amstutz U, Largiadèr C. Fluoropyrimidine chemotherapy: recommendations for DPYD genotyping and therapeutic drug monitoring of the Swiss Group of Pharmacogenomics and Personalised Therapy. *Swiss Med Wkly*. 2020;24;150: w20375.
  40. Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E. Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes. *J Natl Cancer Inst*. 2009;18;101(22):1543-52.

41. [https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/CTCAE\\_v5\\_Quick\\_Reference\\_5x7.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf).
42. Eisenhauer, E. A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L. H.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; Rubinstein, L.; Shankar, L.; Dodd, L.; Kaplan, R.; Lacombe, D.; Verweij, J. New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (Version 1.1). *Eur. J. Cancer* 2009; 45 (2), 228–247.
43. Singh C, Roy-Chowdhuri S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods Mol Biol.* 2016; 1392:161-76.
44. Johnson MR, Wang K, Smith JB, Heslin MJ, Diasio RB. Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 2000; 15;278(2):175-84.
45. Svobaite, R.; Solassol, I.; Pinguet, F.; Ivanauskas, L.; Brès, J.; Bressolle, F. M. M. HPLC with UV or Mass Spectrometric Detection for Quantifying Endogenous Uracil and Dihydrouracil in Human Plasma. *Clin. Chem.* 2008;54 (9), 1463–1472.
46. Robin T, Saint-Marcoux F, Toinon D, Tafzi N, Marquet P, El Balkhi S. Automatic quantification of uracil and dihydrouracil in plasma. *J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020;1; 1142:122038.
47. Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78(3):447-64.
48. Widmer N, Bardin C, Chatelut E, Paci A, Beijnen J, Levêque D, Veal G, Astier A. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two-targeted therapies. *Eur J Cancer.* 2014;50(12):2020-36.
49. Farkouh A, Ettlinger D, Schueller J, Georgopoulos A, Scheithauer W, Czejka M: A rapid and simple HPLC assay for quantification of capecitabine for drug monitoring purposes. *Anticancer Res* 2010;30(12): 5207-5211.
50. Thorat SG, Chikhale RV, Tajne MR: Development and validation of HPLC and HPTLC methods for therapeutic drug monitoring of capecitabine in colorectal cancer patients. *J Chromatogr Sci* 2020;57(10): 892-900.
51. Giorgio, E., Caroti, C., Mattioli, F. et al. Severe fluoropyrimidine-related toxicity: clinical implications of DPYD analysis and UH2/U ratio evaluation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68, 1355–1361.
52. Papanastasopoulos P, Stebbing J. Molecular basis of 5-fluorouracil-related toxicity: lessons from clinical practice. *Anticancer Res.* 2014;34(4):1531-5.

53. Ciccolini J, Mercier C, Dahan L et al. Toxic death-case after capecitabine + oxaliplatin (XELOX) administration: probable implication of dihydropyrimidine deshydrogenase deficiency. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58(2):272–275.
54. Largillier R, Etienne-Grimaldi MC, Formento JL et al. Pharmacogenetics of capecitabine in advanced breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5496–5502.
55. Shakeel F, Fang F, Kwon JW, Koo K, Pasternak AL, Henry NL, Sahai V, Kidwell KM, Hertz DL. Patients carrying DPYD variant alleles have increased risk of severe toxicity and related treatment modifications during fluoropyrimidine chemotherapy. *Pharmacogenomics*. 2021 ;22(3):145-155.
56. Henricks LM, van Merendonk LN, Meulendijks D, Deenen MJ, Beijnen JH, de Boer A, Cats A, Schellens JHM. Effectiveness and safety of reduced dose fluoropyrimidine therapy in patients carrying the DPYD\*2A variant: A matched pair analysis. *Int J Cancer*. 2019; 1;144(9):2347-2354.
57. Froehlich, T. K.; Amstutz, U.; Aebi, S.; Joerger, M.; Largiadèr, C. R. Clinical Importance of Risk Variants in the Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene for the Prediction of Early-Onset Fluoropyrimidine Toxicity. *Int. J. Cancer* 2015, 136 (3), 730–739.
58. Lin S, Yue J, Guan X, Yuan P, Wang J, Luo Y, Fan Y, Cai R, Li Q, Chen S, Zhang P, Li Q, Ma F, Xu B. Polymorphisms of MTHFR and TYMS predict capecitabine-induced hand-foot syndrome in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2019;11;39(1):57.
59. Conti V, De Bellis E, Manzo V, Sabbatino F, Iannello F, Dal Piaz F, Izzo V, Charlier B, Stefanelli B, Torsiello M, Iannaccone T, Coglianese A, Colucci F, Pepe S, Filippelli A. A Genotyping/Phenotyping Approach with Careful Clinical Monitoring to Manage the Fluoropyrimidines-Based Therapy: Clinical Cases and Systematic Review of the Literature. *J Pers Med*. 2020; 3;10(3):113.
60. Lam SW, Guchelaar HJ, Boven E. The role of pharmacogenetics in capecitabine efficacy and toxicity. *Cancer Treat Rev*. 2016; 50:9-22. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.08.001.
61. Kim YI. Role of the MTHFR polymorphisms in cancer risk modification and treatment. *Future Oncol*. 2009;5(4):523-42.
62. Xiong-wei Xie, Mao-ren Wang and Yong-lian Zhang. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism and capecitabine-induced toxicity in patients with gastric cancer. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2020; 19 (1): 195-199.



63. Ramos-Esquivel A, Chinchilla R, Valle M. Association of C677T and A1298C MTHFR Polymorphisms and Fluoropyrimidine-induced Toxicity in Mestizo Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2020;40(8):4263-4270.
64. Nahid NA, Apu MNH, Islam MR, Shabnaz S, Chowdhury SM, Ahmed MU, Nahar Z, Islam MS, Islam MS, Hasnat A. DPYD\*2A and MTHFR C677T predict toxicity and efficacy, respectively, in patients on chemotherapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018;81(1):119-129.
65. Campbell JM, Bateman E, Peters MDj, Bowen JM, Keefe DM, Stephenson MD. Fluoropyrimidine and platinum toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Pharmacogenomics.* 2016;17(4):435-51.
66. De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur J Cancer.* 2009;45(8):1333-51.
67. Meulendijks, D.; Jacobs, B.A.W.; Aliev, A.; Pluim, D.; vanWerkhoven, E.; Deenen, M.J.; Beijnen, J.H.; Cats, A; Schellens, J.H.M. Increased Risk of Severe Fluoropyrimidine-Associated Toxicity in Patients Carrying a G to C Substitution in the First 28-Bp Tandem Repeat of the Thymidylate Synthase 2R Allele. *Int. J. Cancer* 2016,138, 245–253.
68. Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, Kerb R, Bliedernicht J, Fischer J, Hofmann U, Bokemeyer C, Eichelbaum M; 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;1;26(13):2131-8.
69. Hamzic, S.; Kummer, D.; Froehlich, T.K.; Joerger, M.; Aebi, S.; Palles, C.; Thomlinson, I.; Meulendijks, D.; Schellens, J.H.M.; García-González, X.; et al. Evaluating the Role of ENOSF1 and TYMS Variants as Predictors in Fluoropyrimidine-Related Toxicities: An IPD Meta-Analysis. *Pharmacol. Res.* 2020, 152, 104594.
70. Gallegos-Arreola MP, Zúñiga-González GM, Sánchez-López JY, Cruz AYN, Peralta-Leal V, Figuera LE, Puebla-Pérez AM, Ronquillo-Carreón CA, Puebla-Mora AG. TYMS 2R3R polymorphism and DPYD [IVS]14+1G>A gene mutation in Mexican colorectal cancer patients. *Acta Biochim Pol.* 2018;65(2):227-234.
71. Chavani O. 5-Fluorouracil Response Prediction and Blood Level-Guided Therapy in Oncology: Existing Evidence Fundamentally Supports Instigation. *Ther Drug Monit.* 2020;42(5):660-664.

72. Gamelin, E.C.; Danquechin-Dorval, E.M.; Dumesnil, Y.F.; Maillart, P.J.; Goudier, M.J.; Burtin, P.C.; Delva, R.G.; Lortholary, A.H.; Gesta, P.H.; Larra, F.G. Relationship between 5-Fluorouracil (5-FU) Dose Intensity and Therapeutic Response in Patients with Advanced Colorectal Cancer Receiving Infusional Therapy Containing 5-FU. *Cancer* 1996, 77, 441–451.
73. Jiang H, Lu J, Jiang J, Hu P. Important role of the dihydrouracil/uracil ratio in marked interpatient variations of fluoropyrimidine pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Clin Pharmacol* 2004, 44:1260-1272.
74. Garg M, Sevester JC, Sakoff JA, Ackland SP. Simple liquid chromatographic method for the determination of uracil and dihydrouracil plasma levels: a potential pretreatment predictor of 5-fluorouracil toxicity. *J Chromatogr B* 2002, 774:223-230.
75. Zhou ZW, Wang GQ, Wan de S, Lu ZH, Chen YB, Li S, Chen G, Pan ZZ. The dihydrouracil/uracil ratio in plasma and toxicities of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. *Chemotherapy*. 2007;53(2):127-31.
76. Kobuchi S, Akutagawa M, Ito Y, Sakaeda T. Association between the pharmacokinetics of capecitabine and the plasma dihydrouracil to uracil ratio in rat: A surrogate biomarker for dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Biopharm Drug Dispos*. 2019 Jan;40(1):44-48.
77. Kristensen, M.H.; Pedersen, P.; Mejer, J. The Value of Dihydrouracil/Uracyl Plasma Ratios in Predicting 5-Fluorouracil-related Toxicity in Colorectal Cancer Patients. *J. Int. Med. Res*. 2010, 38, 1313–1323.
78. Gamelin, E.; Boisdrion-Celle, M.; Guérin-Meyer, V.; Delva, R.; Lortholary, A.; Genevieve, F.; Larra, F.; Ifrah, N.; Robert, J. Correlation between Uracyl 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.
79. Thomas, F.; Hennebelle, I.; Delmas, C.; Lochon, I.; Dhelens, C.; Tixidre, C.G.; Bonadona, A.; Penel, N.; Goncalves, A.; Delord, J.P.; et al. Genotyping of a Family with a Novel Deleterious DPYD Mutation Supports the Pretherapeutic Screening of DPD Deficiency with Dihydrouracil/Uracyl Ratio. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2016, 99, 235–241.
80. McLeod, H. L.; Sargent, D. J.; Marsh, S.; Green, E. M.; King, C. R.; Fuchs, C. S.; Ramanathan, R. K.; Williamson, S. K.; Findlay, B. P.; Thibodeau, S. N.; Grothey, A.; Morton, R. F.; Goldberg, R. M. Pharmacogenetic Predictors of Adverse Events and Response to Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer: Results from North American

- Gastrointestinal Intergroup Trial N9741. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2010, 28 (20), 3227–3233.
81. Deng X, Hou J, Deng Q, Zhong Z. Predictive value of clinical toxicities of chemotherapy with fluoropyrimidines and oxaliplatin in colorectal cancer by DPYD and GSTP1 gene polymorphisms. *World J Surg Oncol.* 2020;6;18(1):321.
  82. Shen X, Wang J, Yan X, Ren X, Wang F, Chen X, Xu Y. Predictive value of GSTP1 Ile105Val polymorphism in clinical outcomes of chemotherapy in gastric and colorectal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;77(6):1285-302.
  83. Li GY, Duan JF, Li WJ, Liu T. DPYD\*2A/\*5A/\*9A and UGT1A1\*6/\*28 polymorphisms in Chinese colorectal cancer patients. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):782-6.
  84. Falvella FS, Cheli S, Martinetti A, Mazzali C, Iacovelli R, Maggi C, Gariboldi M, Pierotti MA, Di Bartolomeo M, Sottotetti E, Mennitto R, Bossi I, de Braud F, Clementi E, Pietrantonio F. DPD and UGT1A1 deficiency in colorectal cancer patients receiving triplet chemotherapy with fluoropyrimidines, oxaliplatin and irinotecan. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;80(3):581-8.
  85. Del Re M, Cinieri S, Michelucci A, Salvadori S, Loupakis F, Schirripa M, Cremolini C, Crucitta S, Barbara C, Di Leo A, Latiano TP, Pietrantonio F, Di Donato S, Simi P, Passardi A, De Braud F, Altavilla G, Zamagni C, Bordonaro R, Butera A, Maiello E, Pinto C, Falcone A, Mazzotti V, Morganti R, Danesi R. DPYD\*6 plays an important role in fluoropyrimidine toxicity in addition to DPYD\*2A and c.2846A>T: a comprehensive analysis in 1254 patients. *Pharmacogenomics J.* 2019;19(6):556-563.
  86. Varma K A, Jayanthi M, Dubashi B, Shewade DG. Influence of DPYD\*9A, DPYD\*6 and GSTP1 ile105val Genetic Polymorphisms on Capecitabine and Oxaliplatin (CAPOX) Associated Toxicities in Colorectal Cancer (CRC) Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019.1;20(10):3093-3100.