

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

**AVALIAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DA
FARMACOCINÉTICA DO IRINOTECANO E SUA RELAÇÃO COM A
OCORRÊNCIA DE TOXICIDADE NO TRATAMENTO DO CÂNCER**

JEZIEL BASSO

Porto Alegre

2021

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DA
FARMACOCINÉTICA DO IRINOTECANO E SUA RELAÇÃO COM A
OCORRÊNCIA DE TOXICIDADE NO TRATAMENTO DO CÂNCER**

Jeziel Basso

Orientador: Prof. PhD, Dr. Gilberto Schwartzmann

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências
Médicas, pela Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências
Médicas

Porto Alegre
2021

Porto Alegre

2021

Ficha de identificação da obra

Basso, Jeziel

Avaliação genotípica e fenotípica da farmacocinética do irinotecano e sua relação com a ocorrência de toxicidade no tratamento do câncer / Jeziel Basso. -- 2021.

55 f.

Orientador: Gilberto Schwartzmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Irinotecano. 2. Farmacogenômica. 3. Farmacocinética. 4. UGT1A1. 5. CYP3A. I. Schwartzmann, Gilberto, orient. II. Título.

Banca examinadora

Prof., Dr. Daniel Damin

Instituição Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof, Dr. Rafael Roessler

Instituição Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.(a), Dr.(a) Daniela Dornelles Rosa

Instituição Hospital Moinhos de Vento

Porto Alegre, 2021.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial a minha noiva Walkíria por todo amor e apoio diário.

Aos meus pais pelo carinho e educação.

Ao meu orientador, Gilberto Schwartzmann, agradeço pela oportunidade e pelos ensinamentos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao serviço de Oncologia do Hospital de Clínicas, em especial a equipe de Enfermagem por todo auxílio e disposição.

A equipe do Laboratório de Oncologia do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas pela ajuda.

RESUMO

Introdução:

Irinotecano (IRI) é um pró-fármaco convertido em seu metabólito ativo SN-38 pela ação das carboxilesterases hepáticas. O SN-38 é o principal responsável pela resposta antitumoral do IRI e também pelas toxicidades limitantes da dose, neutropenia e diarreia. O polimorfismo UGT1A1 * 28 está associado a neutropenia grave e / ou diarreia. CYP3A também desempenha um papel na inativação de IRI. Nosso objetivo é caracterizar a biotransformação do IRI e SN-38 no grupo estudado, estabelecendo sua relação com as variáveis genéticas, bioquímicas e demográficas avaliadas, bem como com a ocorrência de efeitos tóxicos associados à quimioterapia.

Métodos:

Foram incluídos pacientes com indicação oncológica para tratamento com protocolos com IRI. Uma amostra de sangue foi coletada 15 minutos após a infusão para determinar as concentrações de IRI, SN-38 e SN-38G. Os dados de eventos adversos foram analisados e classificados a partir de consultas clínicas. As concentrações de IRI, SN-38 e SN-38G no plasma foram medidas por cromatografia líquida de alta eficiência. Os polimorfismos de UGT1A1, CYP3A e DPYD foram avaliados. As razões farmacocinéticas foram comparadas entre grupos de toxicidade e genótipos pelo teste de Mann-Whitney. Variáveis quantitativas foram associadas à análise de correlação de Spearman. As associações entre grupos de toxicidade e genótipos e fenótipos UGT1A1, CYP3A e DPYD foram examinadas por meio de testes de qui-quadrado ou exato de Fisher. A avaliação dos pontos de corte da razão de dose [SN38] / IRI para identificar qualquer evento adverso grave e diarreia foi definida usando a área sob a análise da curva característica operada pelo receptor (ROC). Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Quarenta e três pacientes foram incluídos neste estudo de janeiro de 2019 a janeiro de 2020. A frequência de eventos adversos de grau 3 ou 4 (G3 / 4) foi de 39,5%. Os principais eventos adversos G3 / 4 foram: diarreia (30,2%) e neutropenia (27,9%). Detectou-se que 9,3% dos pacientes apresentavam o genótipo UGT1A1 * 28 / * 28. Considerando a graduação da atividade do UGT1A1 prevista a partir do genótipo, 34,9% apresentaram atividade metabólica extensa, 51,2% intermediária e 9,3% reduzida. A pontuação da atividade do CYP3A foi: 4,7% eram metabolizadores lentos, 58,1% eram metabolizadores intermediários e 34,9% eram metabolizadores extensos. A relação de dose SN 38 / IRI foi maior em pacientes com eventos adversos graves, com uma mediana de 0,1 (0,075-0,12) versus 0,049 (0,038-0,076) no grupo sem toxicidade grave, $p < 0,00001$. A relação de dose [SN38] / IRI teve uma área sob a curva ROC de 0,823 (IC 95% 0,69-0,956) para detectar qualquer evento adverso grave e 0,833 (IC 95% 0,694 - 0,973) para detectar diarreia grave. Os pacientes com atividade UGT1A1 reduzida, encontramos que 75% tinham diarreia grave, comparando com 5% e 13,3% nos grupos de atividade intermediária e extensa, respectivamente.

Conclusão

Uma população brasileira com dados farmacogenéticos e farmacocinéticos foi caracterizada. A medida da dose SN38 / IRI apresentou correlação significativa com eventos adversos graves e apresentou bons resultados como ferramenta diagnóstica, com alta sensibilidade e especificidade. A atividade reduzida de UGT1A1 foi relacionada a diarreia grave.

Palavras-chave: irinotecano, farmacogenômica, farmacocinética, UGT1A1, CYP3A, eventos adverso

ABSTRACT

Introduction:

IRI is a prodrug converted to its active metabolite SN-38 through the action of liver carboxylesterases. SN-38 is the main responsible for the antitumor response of IRI, and also for the dose-limiting toxicities, neutropenia and diarrhea. *UGT1A1**28 polymorphism is associated with severe neutropenia and/or diarrhea. *CYP3A* also plays a role in the inactivation of IRI. We aim to characterize the biotransformation of IRI and SN-38 in the studied group, establishing its relationship with the genetic, biochemical and demographic variables evaluated, as well as with the occurrence of toxic effects associated with chemotherapy.

Methods:

Patients with oncologic indication to treatment with protocols with IRI were included. A blood sample was collected 15 min after the infusion to determine concentrations of IRI, SN-38, and SN-38G. Adverse event data were analyzed and graded from clinical consultations. IRI, SN-38 and SN-38G concentrations in plasma were measured by high-performance liquid chromatography. The polymorphisms of *UGT1A1*, *CYP3A* and *DYPD* were assessed. Pharmacokinetics ratios were compared between toxicity groups and genotypes by Mann-Whitney test. Quantitative variables were associated with Spearman correlation analysis. Associations among groups of toxicity and *UGT1A1*, *CYP3A*, and *DYPD* genotypes and phenotypes were examined through Chi-square or Fisher exact tests. The evaluation of [SN38]/IRI dose ratio cut-offs for identifying any severe adverse event and diarrhea was set using area under the receiver operated characteristic (ROC) curve analysis. A P-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Forty-three patients were included in this study from January of 2019 to January of 2020. The frequency of grade 3 or 4 (G3/4) adverse events was 39.5%. The main adverse events G3/4 were: diarrhea (30.2%) and neutropenia (27.9%). It was detected that 9.3% of patients showed the *UGT1A1**28/*28 genotype. Considering the graduation of *UGT1A1* activity predicted from genotype, 34.9% had extensive, 51.2% intermediate and 9.3% reduced metabolic activity. *CYP3A* activity score was: 4,7% were slow metabolizers, 58,1% were intermediate metabolizers and 34,9% were extensive metabolizers. The SN 38/IRI dose ratio was higher in patients with serious adverse events, with a median of 0.1 (0.075-0.12) versus 0.049 (0.038-0.076) in the group without severe toxicity, $p < 0.00001$. [SN38]/IRI dose ratio had an area under the ROC curve of 0.823 (95% CI 0.69-0.956) to detect any severe adverse event and 0.833 (95%CI 0.694 – 0.973) to detect severe diarrhea. the patients with reduced *UGT1A1* activity, we found that 75% had severe diarrhea, comparing to 5% and 13.3% in the groups of intermediate and extensive activity, respectively.

Conclusion

A Brazilian population with pharmacogenetic, and pharmacokinetic data was characterized. The measurement of the SN38/IRI dose showed a significant correlation with serious adverse events and showed good results as a diagnostic tool, with high sensitivity and specificity. Reduced *UGT1A1* activity was related to severe diarrhea.

Key-words: irinotecan, pharmacogenomics, pharmacokinetics, *UGT1A1*, *CYP3A*, adverse events

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

Figura 2. Metabolismo do irinotecano

Figura 3. Marco conceitual

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4 β -HC - 4 β -hidroxicolesterol

5FU - 5-fluorouracil

APC - 7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]carboniloxicamptotecina

ASC Área sobre a curva

CTCAE - Critérios Comuns de Toxicidade

DPD - dihydropyrimidine dehydrogenase

FDA - Food and Drug Administration

FOL - ácido folínico

FUH2 dihidrofluoracil

Gama-GT - gama-glutamyl transferase

INCA - Instituto Nacional de Câncer

Irinotecano - (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina / CPT-11 /

IRI

OX - oxaliplatina

SN-38 - 7-etil-10-hidroxicamptotecina

FOLFIRI – 5FU, Irinotecano, ácido folínico

FOLFIRINOX – 5FU, irinotecano, oxaliplatina, ácido folínico

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 INTRODUÇÃO.....	12
1.2 ESTRATÉGIAS DE BUSCA E SELEÇÃO DE REFERÊNCIAS.....	13
1.3 IRINOTECANO.....	13
2. MARCO CONCEITUAL	20
3. JUSTIFICATIVA	20
4. OBJETIVOS	22
4.1 GERAL	22
4.2 ESPECÍFICOS.....	22
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.1 CLASSIFICAÇÃO DO ESTUDO	22
5.2 PACIENTES E TRATAMENTOS	22
5.3 ASPECTOS ÉTICOS	23
5.4 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL	23
5.5 AVALIAÇÕES CLÍNICA E LABORATORIAL.....	23
5.6 AVALIAÇÃO DE EFEITOS ADVERSOS	24
5.7 GENOTIPAGEM DE CYP3A4, CYP3A5 E UGT1A1	24
5.8 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IRINOTECANO E SN-38 EM PLASMA.....	24
5.9 DETERMINAÇÃO DAS RAZOES METABOLICAS DE IRINOTECANO E SN-38....	25
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
6.1 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	26
7. ARTIGO.....	30
8. CONSIDERACOES FINAIS.....	53
9. PERPECTIVAS FUTURAS.....	53
10. ANEXO	54

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Introdução

O câncer é uma doença de incidência crescente em todo o mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2011, o câncer já provoca mais mortes do que todas as doenças cardiovasculares. Os dados globais demográficos e epidemiológicos sinalizam uma incidência da doença cada vez maior nas próximas décadas, particularmente em países de baixa e média renda, com mais de 20 milhões de novos casos de câncer esperados para 2025 (1).

No projeto Globocan 2012 da Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), foi estimada a ocorrência de 14,1 milhões de novos casos de câncer, 8,2 milhões de mortes por câncer e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer (dentro de 5 anos após o diagnóstico) no ano de 2012 em todo o mundo. Os países em desenvolvimento são desproporcionalmente afetados pelo crescimento da doença, sendo que 57% (8 milhões) desses novos casos de câncer, 65% (5,3 milhões) dessas mortes por câncer e 48% (15,6 milhões) dos casos de câncer prevalentes por 5 anos ocorreram nas regiões menos desenvolvidas. Segundo o mesmo estudo, o câncer de pulmão foi o mais comum no mundo, tanto em termos de novos casos (1,8 milhões de casos, 12,9% do total) e mortes (1,6 milhões de mortes, 19,4%). O câncer de mama é o segundo câncer mais comum no geral (1,7 milhões de casos, 11,9%), mas ocupa a 5ª posição como causa de morte (522.000, 6,4%) devido ao prognóstico relativamente favorável. Estes cânceres são seguidos, em termos de incidência, pelo câncer colorretal (1,4 milhões de casos, 694.000 mortes) e pelo câncer de próstata (1,1 milhões de casos, 307.000 mortes). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%). O Globocan 2012 também apresentou o câncer de pâncreas como o responsável por 331 mil mortes por ano, e a sétima causa mais comum de morte por câncer em ambos os sexos, uma posição relativa mais elevada do que visto de incidência (12º) dado o prognóstico muito ruim desta doença.(1)

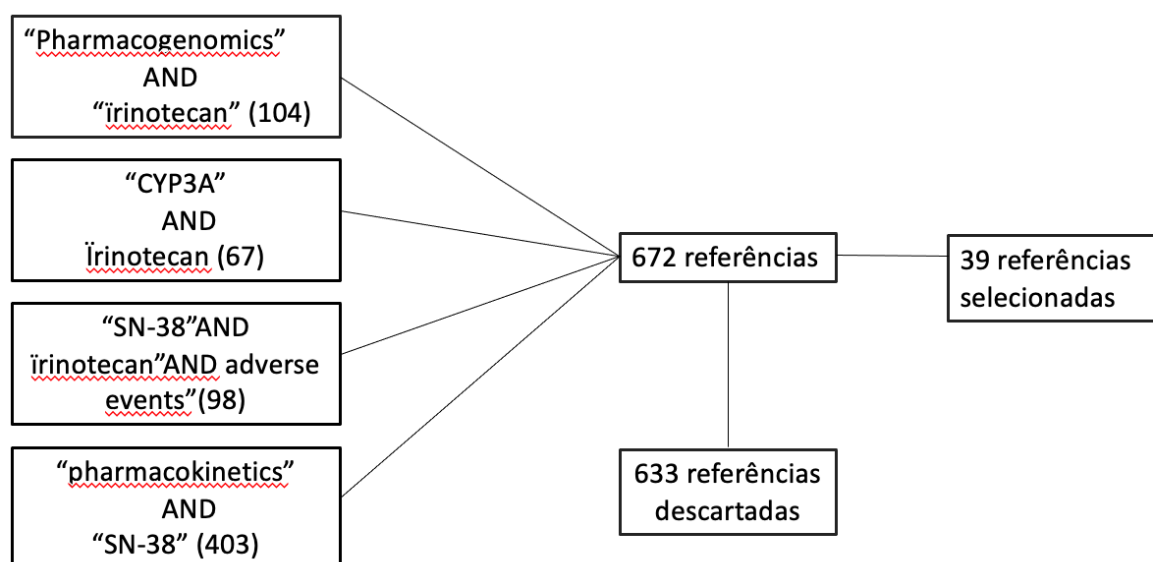
A estimativa de câncer no Brasil no biênio 2016-2017, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer neste período, dentre estes, os tipos mais frequentes em homens serão

próstata (61 mil casos, 28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (58 mil casos, 28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%). Desta forma, evidenciando a extrema relevância do impacto desta doença crônica de alta incidência sobre a saúde no país (2).

1.2 Estratégias de busca e seleção de referências

Esta revisão de literatura tem foco nos aspectos de farmacocinética e farmacogenética relacionados ao metabolismo do irinotecano. Particularmente na contribuição das enzimas UGT1A1 e CYP3A e no metabolito SN-38. A estratégia de busca foi realizado no banco de dados do PUBMED, levando em conta o período de 1995 a 2018. Os descritores usados foram “irinotecan”, “SN-38“, “pharmacogenomics”, “pharmacokinetics”, “UGT1A1”, “CYP3A”, “adverse events”. As expressões de busca foram (pharmacokinetics AND irinotecan), (CYP3A AND irinotecan), (SN-38 AND irinotecan AND adverse events), (pharmacokinetics AND SN-38). De 672 referências foram descartadas 633 que não se relacionaram ao tema em foco.

Figura 1. Estratégias para localizar e selecionar as informações



1.3 Irinotecano

A farmacoterapia quimioterápica é um dos fundamentos do tratamento do câncer. Dentre os diversos fármacos disponíveis, o quimioterápico irinotecano (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina, CPT-11, IRI) é um derivado pentacíclico semissintético da camptotecina que foi isolada a partir da casca de uma árvore chamada *Camptotheca acuminado* em 1966, sendo aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA)

em 1996 (3). O IRI foi usado inicialmente de forma isolada e com o passar dos anos passou a ser utilizado em diferentes esquemas de combinações, melhorando assim a resposta clínica dos pacientes (4–6). Atualmente, IRI é um importante componente dos regimes combinados de quimioterapia FOLFIRI e FOLFIRINOX, que são utilizados como tratamento de primeira linha contra o câncer colorretal (3,7) e câncer de pâncreas avançado; (3,5). IRI também apresenta atividade clínica contra outros tipos de neoplasias tais como a de pulmão, de ovário, cervical, gástrico, linfoma refratário e leucemia (3).

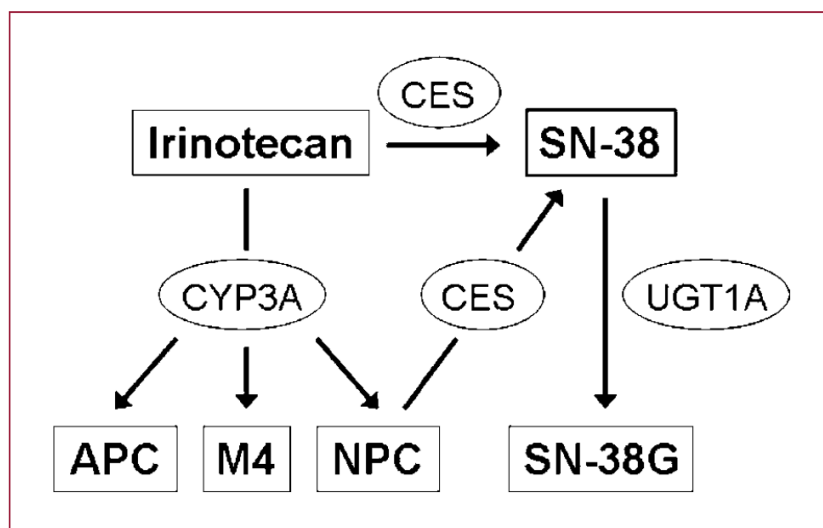
FOLFIRI é um regime de quimioterapia para o tratamento do câncer colorretal metastático não tratado previamente ou que tenha recorrido ou progredido após terapia anterior com 5-fluorouracil (5-FU). Ele é composto por ácido folínico (FOL), 5-fluorouracil (F) e irinotecano (IRI) (7). FOLFIRINOX é um protocolo quimioterápico de referência para o tratamento de câncer de pâncreas metastático para pacientes com bom *performance status*, devido a sua elevada toxicidade. É composto por quatro fármacos: ácido folínico (FOL), 5-fluorouracil (F), irinotecano (IRI) e oxaliplatina (OX) (5,6). No regime FOLFIRI, a dose e a administração podem ser na seguinte forma: IRI 180 mg/m² por infusão via intravenosa por 90 minutos nos dias 1, 15, 29; com FOL 200 mg/m² por infusão via intravenosa por 2 horas nos dias 1, 2, 15, 16, 29, 30; seguido de 5-FU 400 mg/m² por infusão via intravenosa em *bolus* nos dias 1, 2, 15, 16, 29, 30; seguido de 5-FU 600 mg/m² por infusão via intravenosa por 22 horas nos dias 1, 2, 15, 16, 29, 30. O ciclo de terapia é repetido a cada 6 semanas (7). No regime FOLFIRINOX, a dose e administração podem ser na seguinte forma: OX 85 mg/m² por infusão via intravenosa durante 2 horas, em seguida, IRI 180 mg/m² por infusão via intravenosa por 90 minutos e FOL 400 mg/m² por infusão via intravenosa por 2 horas, seguido de *bolus* de 5-FU 400 mg/m² e infusão contínua de 5-FU 2400 mg/m² por 46 horas. O ciclo de terapia é repetido a cada 14 dias (5).

Apesar da conhecida variabilidade interindividual na exposição ao IRI, o fármaco ainda é prescrito de acordo com a área de superfície corporal, uma estratégia sem lógica farmacológica (8). Esta prática pode resultar em subdosagem em alguns pacientes, assim como exposições excessivas e toxicidade severa em outros (9).

IRI é um pró-fármaco convertido no seu metabolito ativo SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina) através da ação das carboxilesterases do fígado. (Figura 1) O SN-38 é 100 a 1.000 vezes mais potente/citotóxico que o IRI. A atividade antineoplásica do IRI é atribuída ao efeito inibitório do SN-38 sobre a DNA topoisomerase I, que desempenha um papel importante na replicação e transcrição do DNA (3,10). O SN-38 é metabolizado pela uridina difosfato glicuroniltransferase (UGT), especialmente UGT1A1, para formar o

glicuronideo inativo SN-38G (11). O IRI também é metabolizado pela CYP3A4 em vários metabólitos inativos, incluindo a 7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]carboniloxicamptotecina (APC) (12), sendo também biotransformado em menor extensão pela CYP3A5 (13). Variações na atividade destas enzimas estão relacionadas a diferenças na exposição sistêmica ao metabolito ativo SN-38 (14,15).

Figura 2 – Metabolismo do irinotecano



O SN-38 é o principal responsável pela resposta antitumoral, e também pelas toxicidades dose-limitantes neutropenia e diarreia tardia(7,8,16). A diarreia está relacionada com concentrações de SN-38 no lúmen intestinal resultado da excreção biliar de SN-38 e potencialmente reforçada pela conversão intraluminal de SN-38G por glicuronidases bacterianas. Além disso, o IRI é detoxificado pela CYP3A4 a APC, que não tem atividade farmacológica conhecida. (17). As reações adversas mais comuns ($\geq 30\%$) observadas em estudos clínicos de terapia de combinação são: náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, constipação, anorexia, mucosite, neutropenia, leucopenia (incluindo linfocitopenia), anemia, trombocitopenia, astenia, dor, febre, infecção, bilirrubina anormal e alopecia (7).

O IRI apresenta tempo de meia-vida média de cerca de 6 a 12 horas. E o metabolito ativo SN-38 apresenta tempo de meia-vida médio de cerca de 10 a 20 horas. Após uma administração de 340 mg/m² por infusão intravenosa de 90 minutos, a área sob a curva de concentração plasmática vs. tempo (ASC), volume de distribuição, *clearance* e tempo de meia-vida médio para o IRI foram de 20.604 ng.h/mL; 234 L/m²; 13,9 L/h.m² e 11,7 horas, respectivamente. Nestas condições, o SN-38 apresentou ASC e tempo de meia-vida de 474 ng.h/mL e 21 horas, respectivamente (7). No estudo farmacocinético de Canal et al. (1996), após a administração intravenosa de 350 mg/m² de IRI por 30 minutos em 47 pacientes com câncer colorretal metastático, o *clearance* médio foi de 15,2 L/h.m² e a ASC média foi de

24.769 ng.h/mL. O SN-38 e o SN-38G tiveram ASC média de 559 e 2.283 ng.h/mL, respectivamente.

Como a maioria dos fármacos oncológicos, IRI tem uma janela terapêutica estreita (9). Portanto, uma limitação importante associada ao seu uso é a ampla variabilidade interindividual na tolerabilidade com ocorrência de toxicidade grave, especialmente neutropenia, e na eficácia, em parte devido ao metabolismo complexo deste fármaco (4). Esta variabilidade está relacionada parcialmente a diferenças farmacocinéticas e farmacogenéticas interindividuais, especialmente na glicuronidação do metabólito ativo através da ação da UGT. Como consequência, são observadas grandes diferenças na exposição ao fármaco e metabólito ativo quando avaliadas através da ASC (8,18).

A atividade da enzima CYP3A4 também influencia significativamente as concentrações plasmáticas e a ocorrência de toxicidade no tratamento com IRI (12). CYP3A4 é a enzima mais abundante do complexo CYP450 no fígado e no intestino humano, sendo responsável pelo metabolismo oxidativo de 45-60% dos medicamentos prescritos e sua atividade pode variar de 10-100 vezes entre indivíduos (19). A partir de estudos de interações medicamentosas envolvendo compostos indutores e inibidores da CYP3A4, como a erva de São João (15) e cetoconazol (14), soube-se que a via da CYP3A4 desempenha um papel crucial na inativação do IRI em vários metabólitos inativos. Como a atividade da CYP3A4 pode ser influenciada por muitos fatores, e apresenta ampla variabilidade interindividual, tem sido proposto que uma avaliação *a priori* da atividade da CYP3A4 pelo uso de um fármaco sonda ou substância endógena, poderia prever a farmacocinética de fármacos que utilizam esta via e ajudar no ajuste de dose (19–21). Com base nesta observação, Van der Bol et al. (2010)(9) avaliaram a utilidade de um algoritmo para calcular *a priori* uma dose individualizada para IRI baseada na fenotipagem da CYP3A4 através do *clearance* do midazolam. Para a construção do modelo matemático foram levados em consideração fatores que poderiam afetar o *clearance* do IRI, como características demográficas dos pacientes, fatores patofisiológicos e variações genéticas envolvidas na metabolização do fármaco. A equação final do *clearance* do IRI levou em conta a altura, dosagem de gama-glutamil transferase (gama-GT) e *clearance* do midazolam medido no paciente (22). A dose para os pacientes foi calculada multiplicando o *clearance* previsto do IRI por 22,157 (ug.h/mL), que foi a ASC média de IRI observada no estudo de Mathijssen e col (2004), que foi atribuída arbitrariamente como o alvo de exposição sistêmica ao IRI. O uso de doses individualizadas com o algoritmo resultou em melhor previsibilidade na farmacocinética e perfil de toxicidade ao IRI em comparação com a dose calculada pela área da superfície corporal, reduzindo mais de quatro vezes a incidência de neutropenia grave ($P =$

0.013) (9). No entanto, a aplicação sistemática destes testes requer atendimento de pacientes em um centro com funcionários treinados devido administração de midazolam e após coleta de múltiplas amostras de sangue, ao curso de várias horas, o que limita sua aplicação prática. Em vista disso, explorar marcadores genéticos e sondas endógenas de fenotipagem que permitam prever a atividade da CYP3A pode ser de grande valor clínico. Mais recentemente foi descrito que a presença do alelo *22 do gene *CYP3A4* está associado à diminuição da atividade da CYP3A4, como verificado pelas sondas de fenotipagem midazolam e eritromicina (19). Até o momento não existem estudos que avaliam o genótipo da *CYP3A4* para personalização de dose para o IRI.

CYP3A5 é um membro da família da CYP3A que é expressa em apenas 10-40% dos caucasianos, sendo sua não expressão atribuída a presença do alelo *CYP3A5*3*. Aparentemente, 80% da população caucasiana e 30% dos afro-americanos são homozigóticos para *CYP3A5*3* e são, portanto, deficientes para a atividade CYP3A5. Como a CYP3A4 e CYP3A5 têm especificidades sobrepostas por substratos, é difícil estimar a contribuição de cada membro ao metabolismo total de CYP3A (12). Apesar da sua proporção no conjunto enzimático ser significativamente inferior em relação à CYP3A4, a alta frequência de variantes nulas de *CYP3A5* pode estar envolvida no metabolismo de diversos fármacos. Desta forma, é relevante a avaliação conjunta de polimorfismos de *CYP3A4* e *CYP3A5* para fármacos substratos de CYP3A, tal como o IRI.

Recentemente foram propostos marcadores endógenos para caracterizar a atividade das enzimas CYP3A4/5. O metabolito 4β-hidroxicolesterol (4β-HC), que é formado pelo metabolismo do colesterol pela CYP3A4/5, foi sugerido como um marcador para a atividade da CYP3A (23,24). Como o nível de 4β-HC no plasma não depende só da atividade da CYP3A4/5, mas também da concentração de colesterol, a proporção [4β-HC]/[colesterol] é utilizada como marcador de atividade enzimática(21,25). 4β-HC e a relação [4β-HC]/[colesterol] parecem ser úteis como marcadores de indução da CYP3A (24,25). A utilização de um biomarcador endógeno, tal como 4β-HC, é mais seguro e operacionalmente mais simples do que a utilização de fármacos sonda para fenotipagem metabólica (21). Cabe destacar que não existe relato do uso da razão endógena [4β-HC]/[colesterol] para determinar os fenótipos dos pacientes para a enzima CYP3A4/5 para prever *a priori* os pacientes mais suscetíveis a toxicidade no tratamento com IRI.

O risco de neutropenia grave associada ao tratamento com IRI está relacionado, também, com a presença do alelo *UGT1A1*28*, uma variante que reduz a eliminação de SN-38, o metabolito ativo do IRI (8,26). A presença do alelo *UGT1A1*28* é um biomarcador da

neutropenia mencionado na bula do IRI. Em vários estudos, a variabilidade da exposição sistêmica ao SN-38 tem sido associada com o risco de neutropenia(8,27). Desta forma, a presença de *UGT1A1**28 poderia ser um indicador de risco de mielosupressão (8). De acordo com a bula (7), uma redução na primeira dose de IRI deve ser considerada em pacientes homozigóticos para o alelo (*28/*28), mas a extensão da redução de dose não é informada. Desta forma, a identificação da presença deste alelo variante pode contribuir para identificar pacientes com maior risco de toxicidade no tratamento com IRI e o genótipo *UGT1A1**28 pode ser utilizado para dosagem individualizada de IRI. Innocenti et al. (2014)(8) observaram que a ASC do IRI aumentou de acordo com o aumento das doses máximas toleradas (DMT) em cada grupo de genótipo *UGT1A1* (*1/*1; *1/*28; *28/*28), mas a média da ASC do SN-38 foi comparável entre as diferentes DMT em cada grupo de genótipo. Esta normalização da ASC do SN-38 pela dosagem dirigida pelo genótipo talvez seja a chave para preservar a eficácia antitumoral, mesmo em pacientes com o genótipo *28/*28, os quais seriam tratados com doses menores. Toffoli et al. (2010)(26) constataram que a dose recomendada de 180 mg/m² de IRI no uso FOLFIRI é consideravelmente mais baixa do que a dose que pode ser tolerada quando os pacientes com o genótipo *UGT1A1**28/*28 (em média 10% dos pacientes com descendência europeia) são excluídos. Este estudo identificou as doses seguras quando os pacientes submetidos a tratamento com FOLFIRI são separados pelo genótipo *UGT1A1**28. O aumento de dose para 370 mg/m² para o genótipo selvagem (*1/*1) e para 310 mg/m² para os heterozigotos (*1/*28) pode ser administrado com segurança a cada 2 semanas em pacientes submetidos ao tratamento de primeira linha FOLFIRI para o câncer colorretal metastático (TOFFOLI et al., 2010)(26). As concentrações séricas de bilirrubina têm sido utilizadas como indicativo da atividade de glicuronidação no fígado (18) uma vez que seus níveis estão mais elevados nos pacientes homozigotos para o alelo *UGT1A1**28 em comparação com homozigotos e heterozigotos (28). No estudo de Hirose et al. (29), foi demonstrado que os pacientes homozigotos para alelos não funcionais apresentam os maiores níveis de bilirrubina total. Além disso, os pacientes com razão SN-38G/SN-38 menores expressam níveis mais elevados de bilirrubina total, com maior risco de neutropenia. Estes resultados indicam que o nível de bilirrubina total pode ser um marcador de eventos adversos. Desta forma, é relevante explorarmos a avaliação em combinação do genótipo *UGT1A1**28, níveis de bilirrubina total e do genótipo/fenótipo *CYP3A4**22 e *CYP3A5**3 como estratégia para ajuste de dose do IRI.

A determinação das concentrações plasmáticas do fármaco e sua utilização para a individualização da farmacoterapia é o fundamento do monitoramento terapêutico de fármacos (MTF). Embora amplamente utilizado em outras áreas da medicina, a aplicação do MTF é

limitada na oncologia, mesmo considerando que os fármacos utilizados são tóxicos. Um requisito importante para a implementação de MTF para uso clínico na rotina laboratorial é a disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e precisos (30). Assim, o desenvolvimento de estratégias de amostragem limitadas (31,32), combinadas a modelos farmacocinéticos populacionais, análise bayesiana e a disponibilidade de métodos analíticos de elevada sensibilidade para prever medidas de exposição sistêmica ao IRI e seus metabólitos (10), pode permitir um uso mais disseminado do MTF na farmacoterapia oncológica, com benefícios marcantes para os pacientes e para o sistema de saúde, através do uso de uma quimioterapia mais racional e seletiva.

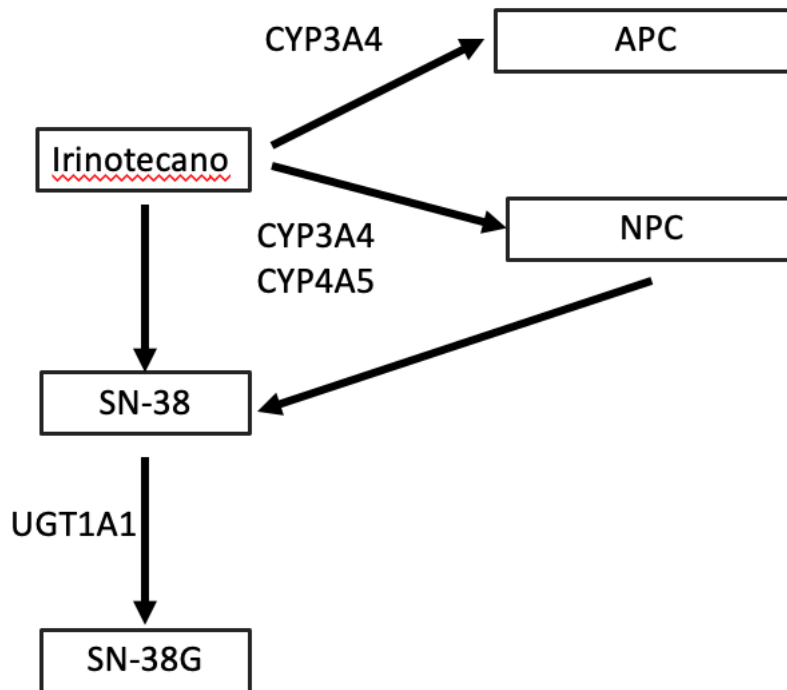
O IRI é comumente associado ao 5FU, este também associado a toxicidades significativas, principalmente em pacientes com deficiência da enzima dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), responsável por converter o 5FU no seu metabólito inativo dihidrofluoracil (FUH2). Recentemente um estudo demonstrou que a presença dessa deficiência detectada na saliva apresentou forte correlação com toxicidades relacionadas ao fármaco. (NETO, Olavo Vicente et al, 2018)(33)

Nesta perspectiva, o presente estudo busca contribuir para a individualização do tratamento oncológico do IRI ao avaliar os polimorfismos genéticos já descritos isoladamente como relevantes para a sua farmacocinética, analisar os fenótipos e utilizar as dosagens do IRI e SN-38 em um modelo matemático para estimar as suas respectivas ASC no primeiro ciclo de infusão. Adicionalmente, o estudo objetiva relacionar, também, os resultados de testes bioquímicos e de características demográficas com os efeitos clínicos do IRI e a exposição sistêmica ao fármaco.

2. MARCO CONCEITUAL

O marco conceitual do estudo destaca a relação entre o irinotecano, os metabolitos SN-38 e SN-38G mensurados pela análise em sangue periférico, com as enzimas UGT1A1 e CYP3A4 e CYP3A5, mensuradas pela análise genômica em nosso estudo.

Figura 3: Marco conceitual



3. JUSTIFICATIVA

O IRI é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversas neoplasias, com doses determinadas apenas na área de superfície corporal do paciente. Mesmo com o emprego de esquemas terapêuticos combinados, diversos estudos indicam uma ampla variabilidade na resposta ao tratamento quimioterápico com IRI, principalmente na imprevisibilidade da ocorrência de efeitos tóxicos severos. A farmacocinética do IRI desempenha papel importante na determinação de sua eficácia e toxicidade, com variações interindividuais relacionadas a polimorfismos nos genes *UGT1A1* e *CYP3A4/5*. Além disso, outros fatores farmacocinéticos, patofisiológicos e demográficos também são responsáveis, em parte, pelas variações nos níveis plasmáticos de IRI e SN-38, o que pode requerer estratégias para a individualização das doses. Novas estratégias de dosagem que prevejam o perfil

farmacocinético do IRI no paciente e que permitam reduzir a variabilidade farmacocinética individual podem potencialmente substituir a dosagem baseada na área de superfície corporal. Desta forma, o presente estudo visa obter dados que permitam caracterizar preditores farmacogenéticos e bioquímicos da farmacocinética do IRI, os quais poderão ser utilizados para estabelecer esquemas posológicos personalizados, aumentando a segurança e a eficácia deste fármaco na quimioterapia do câncer. Cabe destacar que não existe relato de um modelo farmacocinético para o IRI que englobe dados farmacogenéticos, patofisiológicos, farmacocinéticos e demográficos dos pacientes, o qual representa uma inovação significativa.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a capacidade preditiva de parâmetros farmacocinéticos, demográficos, patofisiológicos, atividade enzimática e dos polimorfismos genéticos, com relação a ocorrência de efeitos adversos grau 3 e 4 na quimioterapia com IRI, relacionando-os com a exposição sistêmica ao fármaco.

4.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar um grupo de pacientes brasileiros em tratamento quimioterápico com IRI, em termos de variáveis demográficas e patofisiológicas.
- Determinar a presença e a frequência dos polimorfismos dos alelos *UGT1A1*28*, *CYP3A4*22* e *CYP3A5*3* na população estudada.
- Determinar os níveis plasmáticos de IRI, SN-38 e SN-38G para determinação de razões metabólicas
- Caracterizar a biotransformação do IRI e ao SN-38 no grupo estudado, estabelecendo sua relação com as variáveis genéticas, bioquímicas e demográficas avaliadas, bem como com a ocorrência de efeitos tóxicos associados à quimioterapia.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CLASSIFICAÇÃO DO ESTUDO

Estudo transversal.

5.2 PACIENTES E TRATAMENTOS

Foram convidados a participar no estudo pacientes de ambos os sexos com câncer, com idade maior que 18 anos e com indicação de uso de IRI nos regimes IRI, FOLFIRI ou FOLFIRINOX, conforme protocolos do Serviço de Oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os critérios de exclusão são: contagem de leucócitos inferior a 3.000/mcL, contagem

de plaquetas inferior a 100.000/mcL, bilirrubina total superior a 1,5 mg/dL, transaminases superiores a 150 U/L e creatinina sérica superior a 1,4 mg/dL.

5.3 ASPECTOS ÉTICOS

Os pacientes receberam esclarecimentos com relação ao estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, anexo I). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre assim como do Hospital Militar de Área de Porto Alegre

5.4 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

Para o cálculo do tamanho amostral foi levado em consideração o número de pacientes com câncer colorretal e pacientes com câncer de pâncreas que utilizam IRI em combinação, atendidos no serviço de Oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo N= 100 além de 45% a frequência de pacientes que apresentaram efeitos adversos graves durante terapia com o IRI determinada por Van de Bol et al. (2010)(9), sendo P = 0,40. Considerou-se um intervalo de confiança de 95 % (z = 1,96) e erro máximo permissível de 5 % (e = 0,05), e Q = 0,60 (1-P). O tamanho da amostra foi calculado a partir de equação de amostragem aleatória simples, conforme Mundstock (2005). Com base nesta estimativa, o número de pacientes a ser incluído no estudo é de 45 a 65. O tamanho amostral foi calculado com base na ocorrência de efeitos adversos, que derivam das variações farmacocinéticas entre os pacientes. Cabe destacar que estudos anteriores que relacionaram exposições sistêmicas ao irinotecano e a ocorrência de eventos adversos, publicadas em periódicos qualificados, tiveram tamanhos amostrais similares, como 40 pacientes do estudo de Van de Bol et al. (2010).

$$n_0 = \left(\frac{z^2 * P * Q}{e^2} \right) n = \left(\frac{N * n_0}{N + n_0} \right)$$

5.5 AVALIAÇÕES CLÍNICA E LABORATORIAL

Os eventos adversos dose limitantes foram classificados e graduados conforme dados obtidos em consultas clínicas de seguimento após o tratamento e confirmadas por ligações telefônicas. Antes do início do tratamento, foram colhidas amostras de sangue para avaliação dos polimorfismos nos genes *UGT1A1* e *CYP3A4/5*. Foram colhidas amostras de sangue venoso

no primeiro ciclo de infusão para a determinação das concentrações plasmáticas de IRI e SN-38, no tempo 15 minutos após o término da infusão do irinotecano.

5.6 AVALIAÇÃO DE EFEITOS ADVERSOS

A ocorrência de eventos adversos foi reportada segundo os Critérios Comuns de Toxicidade (CTCAE) do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, versão 4.03 (NCI, 2010)(34). Os eventos adversos mais importantes avaliados no estudo foram a presença de neutropenia e/ou diarreia, sendo a severidade da neutropenia classificada de acordo com o número de neutrófilos (células/mm³) em grau 1: < limite inferior normalidade - 1500 células/mm³, grau 2: < 1500 - 1000 células/mm³, grau 3: < 1000 - 500 células/mm³ e grau 4: < 500 células/mm³. A diarreia também foi classificada em graus de acordo com o número de evacuações diárias, grau 1: 2 - 3 evacuações diárias, grau 2: 4 - 6 evacuações diárias, grau 3: \geq 7 evacuações diárias; incontinência; hospitalização indicada e grau 4: consequências fatais; intervenção urgente indicada. Além destes, serão também avaliados outros eventos adversos descritos no CTCAE como náuseas, vômitos, leucopenia, aumento de bilirrubina, trombocitopenia, alopecia, entre outros. Será avaliado teste funcional de DPD em pacientes em uso de 5FU, e em caso de deficiência correlacionando toxicidades a este quimioterápico.

5.7 GENOTIPAGEM DE *CYP3A4*, *CYP3A5* E *UGT1A1*

O DNA foi extraído das amostras de sangue total para a determinação da presença de alelos mutantes relacionados à farmacocinética do IRI. Após extração do DNA, foram analisados os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes *CYP3A4**22, *CYP3A5**3 e *UGT1A1**28, através de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR tempo real).

5.8 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IRINOTECANO E SN-38 EM PLASMA

Foi obtido plasma a partir de sangue periférico colhido em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Os tubos foram centrifugados e o plasma separado armazenado a -20 °C até a análise. A quantificação plasmática do IRI e SN-38 foi determinada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL), conforme

descrito por Poujol et al. (2003)(35), com modificações. Para a preparação das amostras, 500 µL de plasma foram precipitados com 1 mL da mistura metanol:acetonitrila (50:50, v/v). Uma segunda alíquota de plasma foi submetida a hidrólise com β-glucuronidase e submetida a nova análise. As concentrações de SN-38G foram determinadas pela diferença entre as concentrações de SN-38 obtidas com e sem hidrólise. O método foi validado de acordo com as recomendações de validação de métodos bioanalíticos do *Food and Drug Administration* (FDA, 2001).

5.9 DETERMINAÇÃO DAS RAZÕES METABÓLICAS DE IRINOTECANO E SN-38

As razões metabólicas de esterificação do IRI e de glucuronidação do SN-38 foram calculadas a partir de concentrações de IRI, SN-38 e SN-38G determinadas em plasma obtido de uma amostra de sangue venoso colhido 15 min após a infusão de IRI (29). A razão de esterificação foi determinada como a razão entre as concentrações de IRI e SN-38 e a razão de glucuronidação foi determinada como a razão entre as concentrações de SN-38 e SN-38G. Foi coletada amostra de sangue 15 minutos após a infusão de irinotecano e a farmacocinética calculada conforme publicado por HIROSE et al, 2014.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

IBM SPSS 25.0 foi usado para análise estatística. As características sociodemográficas e clínicas foram apresentadas em percentagens, médias ou medianas. As concentrações de SN-38 foram normalizadas pela dose de IRI. As concentrações de SN-38, [bilirrubina direta] / [bilirrubina total], dose de [SN38] / IRI e proporções [SN38G] / [SN38] foram comparadas entre grupos de toxicidade e genótipos pelo teste de Mann-Whitney. Variáveis quantitativas foram associadas à análise de correlação de Spearman. As associações entre grupos de toxicidade e genótipos e fenótipos UGT1A1, CYP3A e DPYD foram examinadas por meio de testes de qui-quadrado ou exato de Fisher. A avaliação dos pontos de corte da razão de dose [SN38] / IRI para identificar qualquer evento adverso grave e diarreia foi definida usando a área sob a curva “receiver operated characteristic” (ROC). Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. REFERÊNCIAS

- 1- ANTUNES, Marina Venzon; CHARÃO, Mariele Feiffer; LINDEN, Rafael. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. **Clinical Biochemistry**, 2016. *Article in Press*
doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.05.004
- 2- BASU, Sumit et al. Development and validation of an UPLC–MS/MS method for the quantification of irinotecan, SN-38 and SN-38 glucuronide in plasma, urine, feces, liver and kidney: Application to a pharmacokinetic study of irinotecan in rats. **Journal of Chromatography B**, v. 1015, p. 34-41, 2016.
- 3- BJÖRKHEM-BERGMAN, Linda et al. Comparison of endogenous 4 β -hydroxycholesterol with midazolam as markers for CYP3A4 induction by rifampicin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41, n. 8, p. 1488-1493, 2013.
- 4- BODIN, Karl et al. Antiepileptic Drugs Increase Plasma Levels of 4 β -Hydroxycholesterol in Humans EVIDENCE FOR INVOLVEMENT OF CYTOCHROME P450 3A4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38685-38689, 2001.
- 5- CAMPTOSAR PRESCRIBING INFORMATION, 2014. Disponível em:
<<http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=533>> Acesso em maio 2016.
- 6- CANAL, PCAJYRRAPFA et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan during a phase II clinical trial in colorectal cancer. Pharmacology and Molecular Mechanisms Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 14, n. 10, p. 2688-2695, 1996.
- 7- CONROY, Thierry et al. The role of the FOLFIRINOX regimen for advanced pancreatic cancer. **Current oncology reports**, v. 15, n. 2, p. 182-189, 2013.
- 8- DICZFALUSY, Ulf et al. 4 β -hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. **British journal of clinical pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 183-189, 2011.
- 9- DI PAOLO, Antonello et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic predictive markers of irinotecan activity and toxicity. **Current drug metabolism**, v. 12, n. 10, p. 932-943, 2011.
- 10- ELENS, Laure et al. CYP3A4 intron 6 C> T SNP (CYP3A4* 22) encodes lower CYP3A4 activity in cancer patients, as measured with probes midazolam and erythromycin. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 2, p. 137-149, 2013.
- 11- FDA, Food and Drug Administration. Guidelines on Bioanalytical Method Validation, 2001. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acesso em Maio 2016.

- 12- FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.
- 13- GUNTURU, Krishna S. et al. FOLFIRINOX for locally advanced and metastatic pancreatic cancer: single institution retrospective review of efficacy and toxicity. **Medical oncology**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2013.
- 14- HIROSE, Kouichi et al. Usefulness of one-point plasma SN-38G/SN-38 concentration ratios as a substitute for UGT1A1 genetic information after irinotecan administration. **International journal of clinical oncology**, v. 19, n. 2, p. 397-402, 2014.
- 15- INCA, Instituto Nacional do Câncer. Brasil. Ministério da Saúde [Internet]. Rio de Janeiro: INCA. Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. Acesso em maio 2016.
- 16- INNOCENTI, Federico et al. Dose-finding and pharmacokinetic study to optimize the dosing of irinotecan according to the UGT1A1 genotype of patients with cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 22, p. 2328-2334, 2014.
- 17- KEHRER, Diederik FS et al. Modulation of irinotecan metabolism by ketoconazole. **Journal of clinical oncology**, v. 20, n. 14, p. 3122-3129, 2002.
- 18- MATHIJSEN, Ron HJ et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). **Clinical cancer research**, v. 7, n. 8, p. 2182-2194, 2001.
- 19- MATHIJSEN, Ron HJ et al. Effects of St. John's wort on irinotecan metabolism. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 16, p. 1247-1249, 2002.
- 20- MATHIJSEN, Ron HJ et al. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 21, p. 1585-1592, 2004.
- 21- MEYERHARDT, Jeffrey A.; MAYER, Robert J. Systemic therapy for colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 5, p. 476-487, 2005.
- 22- MICK, Rosemarie et al. Limited-sampling models for irinotecan pharmacokinetics-pharmacodynamics: prediction of biliary index and intestinal toxicity. **Journal of clinical oncology**, v. 14, n. 7, p. 2012-2019, 1996.
- 23- MUNDSTOCK, EC. Amostragem I. Cadernos de matemática e estatística – UFRGS, série B, nº 45, Porto Alegre, 2005.
- 24- NAKASHIMA, Hajime et al. Efficient sampling strategies for forecasting pharmacokinetic parameters of irinotecan (CPT-11): implication for area under the concentration-time curve monitoring. **Therapeutic drug monitoring**, v. 17, n. 3, p. 221-229, 1995.

- 25- NCI, NATIONAL CANCER INSTITUTE (US). Division of Cancer Treatment and Diagnosis. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Version 4.03. NCI; 2010.
- 26- OMS, Organização Mundial da Saúde. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em maio 2016.
- 27- POUJOL, Sylvain et al. Sensitive HPLC-fluorescence method for irinotecan and four major metabolites in human plasma and saliva: application to pharmacokinetic studies. **Clinical chemistry**, v. 49, n. 11, p. 1900-1908, 2003.
- 28- POUJOL, Sylvain et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan and its metabolites from plasma and saliva data in patients with metastatic digestive cancer receiving Folfiri regimen. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 292-305, 2006.
- 29- POUJOL, Sylvain et al. A limited sampling strategy to estimate the pharmacokinetic parameters of irinotecan and its active metabolite, SN-38, in patients with metastatic digestive cancer receiving the FOLFIRI regimen. **Oncology reports**, v. 18, n. 6, p. 1613-1622, 2007.
- 30- RAMCHANDANI, Roshni P. et al. The Role of SN-38 Exposure, UGT1A1* 28 Polymorphism, and Baseline Bilirubin Level in Predicting Severe Irinotecan Toxicity. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 78-86, 2007.
- 31- RATAIN, Mark J.; INNOCENTI, Federico. Individualizing dosing of irinotecan. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 371-372, 2010.
- 32- ROUITS, E. et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. **British journal of cancer**, v. 99, n. 8, p. 1239-1245, 2008.
- 33- SALEEM, Mohamed et al. Target concentration intervention in oncology: where are we at?. **Therapeutic drug monitoring**, v. 34, n. 3, p. 257-265, 2012.
- 34- SANTOS, Alexandre et al. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 5, p. 2012-2020, 2000.
- 35- SLOAN, Jeff A. et al. Limited sampling models for CPT-11, SN-38, and SN-38 glucuronide. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 241-249, 2001.
- 36- TOMALIK-SCHARTE, D. et al. Plasma 4 β -hydroxycholesterol: an endogenous CYP3A metric?. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n. 2, 2009.
- 37- TOFFOLI, Giuseppe et al. Genotype-driven phase I study of irinotecan administered in combination with fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 5, p. 866-871, 2010.

- 38- VAN DER BOL, Jessica M. et al. A CYP3A4 phenotype–based dosing algorithm for individualized treatment of irinotecan. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 736-742, 2010.
- 39- VAN SCHAİK, Ron HN. Implications of cytochrome P450 genetic polymorphisms on the toxicity of antitumor agents. **Therapeutic drug monitoring**, v. 26, n. 2, p. 236-240, 2004.
- 40- YANG, Zheng; RODRIGUES, A. David. Does the Long Plasma Half-Life of 4 β -Hydroxycholesterol Impact Its Utility as a Cytochrome P450 3A (CYP3A) Metric? **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, n. 11, p. 1330-1338, 2010.
- 41- NETO, Olavo Vicente et al. 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 Jun;56:18-25.

7. ARTIGO

Evaluation of UGT1A1 and CYP3A genotyping and single-point irinotecan and metabolite concentrations as predictors of the occurrence of adverse events in cancer treatment

Jeziel Basso³, Gilberto Schwartzmann³, Mariana Rodrigues Ibaldi⁴, Vitoria Daniela Schaefer^{1,2}, Carla Casagrande Pavei,⁴ Roberta Zilles Hahn¹, Marina Venzon Antunes^{1,2}, Rafael Linden^{1,2*}

¹Analytical Toxicology Laboratory, Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, Brazil

²Graduate Program on Toxicology and Analytical Toxicology, Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, Brazil

³ Postgraduate program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brazil

⁴ Medical residency in oncology of Hospital de Clinicas de Porto Alegre-RS, Brazil

*Corresponding author rafael.linden@feevale.br

ABSTRACT

Purpose: The variability on irinotecan (IRI) pharmacokinetics and toxicity has been attributed mostly to genetic variations in the *UGT1A1* gene, responsible for conjugation of the

active metabolite SN-38. Also, CYP3A plays mediates the formation of inactive oxidative metabolites of IRI. The association between the occurrence of severe adverse events, pharmacokinetics parameters, and UGT1A1 and CYP3A4 predicted phenotypes was examine, as the evaluation of [SN38]/IRI dose ratio as predictor of severe adverse events.

Methods: Forty-one patients undergoing IRI therapy were enrolled in the study. Blood samples were collected 15 min after the end of drug the infusion, for IRI, SN-38, SN-38G, bilirubin concentrations measurements, and *UGT1A1* and *CYP3A* genotypes estimation. Data on adverse event was reported.

Results: 36.5% of the patients developed grade 3/4 adverse events. A total of 9.3% of the patients had UGT1A1 and 4.7% CYP3A reduced activities phenotypes. Severe neutropenia and diarrhea were more prevalent in patients with reduced UGT1A1 in comparison with functional metabolism (50% and 75% versus 0% and 13%, respectively). SN-38 levels and its concentrations adjusted by IRI dose were significantly correlated to toxicity ($r_s=0.31$, $p=0.05$ and $r_s=0.425$, $p<0.01$). The [SN38]/IRI dose ratio had a ROC curve of 0.823 (95% CI 0.69-0.956) to detect global severe adverse event and 0.833 (95% CI 0.694-0.973) to detect severe diarrhea.

Conclusion: We characterize a Brazilian population with pharmacogenetic and pharmacokinetic data related to IRI and confirmed the relevance of the pre-emptive genotypic information of *UGT1A1*. The [SN-38]/IRI ratio, measured 15 min after the end of the IRI infusion, was a strong predictor of severe toxicity and could be applied to minimize the burden of patients after IRI administration.

Keywords: Irinotecan; pharmacogenomics; pharmacokinetics; UGT1A1; CYP3A; adverse events.

Introduction

Irinotecan (IRI) is a semi-synthetic derivative of camptothecin and it is a prodrug converted to its active metabolite SN-38 through the action of liver carboxylesterases. The antineoplastic activity of IRI is attributed to the inhibitory effect of SN-38 on DNA topoisomerase I, which plays an important role in DNA replication and transcription [1]. Currently, IRI is an important component of the combined chemotherapy regimens FOLFIRI

and FOLFIRINOX, which are used as first-line treatment against colorectal cancer [2] and advanced pancreatic cancer [3].

The occurrence of severe toxicity due to IRI is dependent of the specific regimen and dosage schedule, also being affected by clinical variables such as age, body weight, gender, and co-medication, as well as pharmacogenetic variations [1]. SN-38 is the main responsible for the antitumor response of IRI, and also for the dose-limiting toxicities, namely neutropenia and diarrhea. Diarrhea is related to concentrations of SN-38 at the intestinal lumen resulting from the biliary excretion of SN-38 and potentially enhanced by the intraluminal conversion of SN-38G to SN-38 by bacterial glucuronidases [4]. Since SN-38 is much more cytotoxic than IRI, plasma levels of SN-38, clearance of SN-38 have clinical relevance [5]. The clearance ability of SN-38 can be predicted by determining [SN-38G]/[SN-38] plasma concentration ratios [6]. It was suggested a one-point plasma [SN-38G]/[SN-38] concentration ratio to define IRI induced neutropenia and to guide IRI dose adjustments [7].

The conventional dose calculation of IRI is based on an individual's body surface area (BSA), although this approach does not result in reduced pharmacokinetic variability compared with a flat-fixed dose [4]. New dosing strategies that take the pharmacologic profile of IRI in the individual patient into account could potentially replace BSA-based dosing, if this would lead to a reduction in the pharmacokinetic variability. Ideally, this should prevent the occurrence of highly unpredictable severe toxicities associated with IRI administration, such as neutropenia and late-onset diarrhea, and should result in a maximal antitumor response in each patient [5].

The interindividual variability on IRI pharmacokinetics has been attributed mostly to genetic variations in the *UGT1A1* gene, which encodes for UGT1A1, a strategic enzyme in IRI metabolism [9]. Carriers of the *UGT1A1*28* allele have consistently shown lower glucuronidation ratio, with decreased [SN-38G]/[SN-38] ratios. Several studies have found a significant association between the *UGT1A1*28* polymorphism and severe neutropenia and/or diarrhea [10]. It is also known that the CYP3A4 pathway plays a crucial role in the inactivation of IRI into a number of inactive, oxidative metabolites [11, 12]. Because CYP3A4 activity can be influenced by many factors, and is largely variable between patients [13], it has been proposed a priori assessment of the functional activity of CYP3A4 before IRI therapy [14]. However, genotyping is not always available due to high cost, especially in developing countries.

The present study aims to contribute to the individualization of the oncological treatment with IRI through a pharmacogenetic evaluation of UGT1A1 and CYP3A activities,

evaluating its relation to the pharmacokinetics of IRI and the presence of serious adverse reactions. We also report for the first time the distribution of IRI and SN-38 plasma concentrations in Brazilian patients.

Materials and methods

Patients, treatments and clinical evaluations

Inclusion criteria were: patients over 18 years old, with oncologic indication to treatment with IRI in monotherapy, FOLFIRI or FOLFIRINOX. All protocols of chemotherapy and indications of treatment were according to the Oncology Services of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the Hospital Militar de Área de Porto Alegre. Exclusion criteria were: leukocyte count below $3,000 \mu\text{L}^{-1}$, platelet count below $100,000 \mu\text{L}^{-1}$, total bilirubin greater than 1.5 mg dL^{-1} , transaminases greater than 150 U L^{-1} , and serum creatinine greater than 1.4 mg dL^{-1} . Patients were evaluated before starting chemotherapy. Demographic data, comorbidities, medications in use, treatment history, among others were described. Pre-treatment blood collection was performed to assess genetic polymorphism and biomarker concentrations. A venous blood sample was collected in EDTA tubes during the first IRI administration cycle, 15 min after completing the infusion, to determine the plasma concentrations of IRI, SN-38, and SN-38G. The occurrence of adverse events was reported during follow-up clinical consultations and via telephone contact, graded according to Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5 [15]. Patients with grade 3 or 4 adverse events were classified into a group with severe IRI toxicity. Data on suspension of treatment, dose reduction, and need for hospitalization were recorded. Patients received clarifications regarding the study and signed a free and informed consent form. The study was approved by the ethics committees of the participating institutions (CAAE: 58889516.8.0000.5327).

Pharmacokinetic and metabolic testing

The ratio of SN-38G to SN-38 concentrations was used as a marker of IRI glucuronidation [7]. IRI, SN-38 and SN-38G concentrations in plasma were measured by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, as previously described [16]. The [Direct bilirubin]/[Total bilirubin] ratio was used as a biochemical marker of UGT activity. In addition, as most of the patients were treated in combination with fluorouracil, basal uracil (U) to dihydrouracil (UH₂) concentration ratio was used as an indicator of DPD activity, measured by (LC-MS/MS) [18]. [UH₂]/[U] ratios < 4.0 indicated risk for severe fluorouracil-related toxicity [17].

Pharmacogenetic testing and classification

Genomic DNA was extracted from whole blood and the polymorphisms were genotyped by real-time polymerase chain reaction using allelic discrimination with hydrolysis probes (TaqMan SNP genotyping assays, Applied Biosystems, Foster City, CA) in a Step One Plus thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). The presence of the following polymorphisms was assessed: *CYP3A4**22 (rs35599367), *CYP3A5**3 (rs776746), *DPYD**2A (rs3918290), *DPYD**13 (rs55886062), *DPYD c.2846 A>T* (rs67376798), and *DPYD c.1236G>A/HapB3* (rs56038477). The fragment containing the *UGT1A1**28 variant (rs8175347) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers described by Smiderle *et al.* [19]. The number of TA repeats was determined by capillary electrophoresis on the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

UGT1A1 activity was classified as extensive when two *UGT1A1**1 or one *UGT1A1**1 together with one *UGT1A1**36 allele were present, intermediate when one *UGT1A1**28 was detected, and reduced when two *UGT1A1**28 were identified [22]. Predicted phenotypes from *CYP3A4* genotypes were defined according to Moes *et al.* [20]. Slow metabolizers (*CYP3A* activity score of 0) with two *CYP3A5**3 alleles and at least one *CYP3A4**22 allele. Intermediate metabolizers (*CYP3A* activity score of 1) presented one of the following genotype combinations: two *CYP3A5**3 alleles and two *CYP3A4**1 alleles, at least one *CYP3A5**1 and at least one *CYP3A4**22 allele. Extensive metabolizers (*CYP3A* activity score of 2) had at least one *CYP3A5**1 allele and two *CYP3A4**1 alleles. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) phenotypes were determined according to the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). Each *DPYD* allele received a score and the phenotypes calculated as the sum of the two lowest individual variant activity scores (score 0 for *DPYD**2A and *DPYD**13, score 0.5 for *DPYD c.2846 A>T* and *DPYD c.1236G>A/HapB3*, and score 1 when none of the tested polymorphisms were detected). The individuals were classified as normal metabolizers (activity score 2), intermediate metabolizers (activity score 1 or 1.5), and poor metabolizers (activity score 0 or 0.5) [21].

Statistical analysis

IBM SPSS 25.0 was used for statistical analysis. Sociodemographic and clinical characteristics were presented as counts, percentages, means or medians. SN-38 concentrations were normalized by IRI dose. SN-38 concentrations, [Direct bilirubin]/[Total bilirubin],

[SN38]/IRI dose, and [SN38G]/[SN38] ratios were compared between toxicity groups and genotypes by Mann-Whitney test. Quantitative variables were associated with Spearman correlation analysis. Associations among groups of toxicity and *UGT1A1*, *CYP3A*, and *DPYD* genotypes and phenotypes were examined through Chi-square or Fisher exact tests. The evaluation of [SN38]/IRI dose ratio cut-offs for identifying any severe adverse event and diarrhea was set using area under the receiver operated characteristic (ROC) curve analysis. A P-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Forty-one patients were included in the study from January 2019 to January 2020. Patient's demographic and clinical characteristics are shown in table 1. Most of the patients were women, mean age was 56 years. Colorectal accounted for 43.9% of the tumors and hypertension was the most frequent comorbidity (34.1%). Four patients reported occasional alcohol consumption and 32% were active smokers. Mean pre-chemotherapy direct bilirubin was 0.36 (0.1 to 3.2) and total bilirubin 0.58 (0.3 to 3.3).

The minimum absolute IRI dose was 77.5 mg, and the maximum dose 637 mg, with mean mg/m^2 dose of 187 (from 50 to 350 mg/m^2). About 51% of the patients were treated with the FOLFIRI protocol, 27.9% with FOLFIRINOX, and 20.9% with IRI monotherapy. The frequency of grade 3 or 4 adverse events was 36.5%. Neutropenia was the most frequent (24.4%) adverse event in patients with severe toxicity, followed by diarrhea (14.6%). Global toxicity score, defined as the sum of all adverse events scores, ranged from 0 to 21, with a median of 4.

Table 1.

The pharmacogenomics results are shown in table 2. Genotype frequencies showed no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. A significant number of patients carried the decreased activity *UGT1A1**28 allele, translating into 9.8% of reduced and 53.6% intermediate UGT metabolizers. Regarding the *CYP3A* genes, only 7.3% carried the reduced activity *CYP3A4**22 allele, with heterozygous presence, while 60.9% presented the homozygous reduced activity *CYP3A5**3 allele. Thus, the predicted *CYP3A* phenotypes, considering both genes, indicated a total of 63.4% of patients with impaired biotransformation capability.

Since most of the patients received IRI in combination with 5-fluoruracil (5-FU), the pharmacogenetics of DPD metabolism was also evaluated. None of the patients presented severe DPD activity deficiency according to *DPYD* genotyping, while DPD phenotype analysis, measured as the ratio of [UH₂]/[U] concentrations, indicated one patient at risk for fluorouracil-related severe toxicity (range 3.9 to 25.8). The patient was a 58-year-old woman treated with FOLFIRI, who was also intermediate CYP3A metabolizer (*CYP3A4**1/*1, *CYP3A5**3/*3) and had intermediary activity for UGT1A1 (*UGT1A1**1/*28). The patient died after the first chemotherapy cycle from fatal treatment-related toxicity, with severe neutropenia, abdominal pain, nausea, and vomit. In addition, four patients (9.8%) carried the *DPYD* c.1236G>A/HapB3 polymorphism and were classified as intermediate metabolizers according to the *DPYD* genotyping but expressing normal [UH₂]/[U] ratios.

Table 2

The prevalence of severe toxicity, neutropenia, and diarrhea was higher within the patients with reduced UGT1A1 activity. However, Chi-square analysis showed no significant association between *UGT1A1* and *CYP3A4* genotypes with the overall occurrence of severe adverse event or severe neutropenia (Table 3).

Differently, the suppressed UGT1A1 activity was significantly associated with the incidence of severe diarrhea (p=0.002), being present in 75% of the *UGT1A1**28/*28 patients (Figure 1). An evaluation of the homozygous presence of the mutant *UGT1A1**28 allele as criteria for predicting IRI-related toxicity revealed a 75% positive predicted value (PPV) and 91.4 % negative predicted value (NPV) to identify the risk for severe diarrhea.

Of notice, only one patient with the *UGT1A1**28/*28 genotype was treated with IRI monotherapy (350 mg m⁻²). The patient was a 72-year-old man with SN-38 level of 35.8 ng mL⁻¹ and [SN-38]/IRI dose ratio of 0.10 (blood samples collected 15 min after the end of the infusion). The patient developed IRI-related toxicity (grade 3 neutropenia/diarrhea, and grade 2 nausea/vomit) and needed a 25% dose reduction.

Table 3

The association between the occurrence of severe adverse events and IRI pharmacokinetic, with one-point blood samples collected 15 min after the end of the infusion, was also evaluated. IRI plasma concentrations ranged from 319.9 to 3383.9 ng mL⁻¹ (median

1992.2 ng mL⁻¹) and SN-38 levels from 3.79 to 54.62 ng mL⁻¹ (median 11.11 ng mL⁻¹). The active metabolite levels and its concentrations adjusted by the IRI dose were significantly correlated to global toxicity, assessed as patient's sum of adverse events scores (rs=0.31, p=0.05 for SN-3,8 and rs=0.425, p<0.01 for [SN-38]/IRI dose). However, the % of neutrophil reduction was not significantly correlated with SN-38 plasma levels (p=0.25) or [SN-38]/IRI dose (p=0.48).

A comparison of pharmacokinetic and biochemical parameters according to the presence of severe adverse events and UGT1A and CYP3A predicted phenotypes is presented in table 4. The [SN-38]/IRI dose values were significantly higher in patients with severe toxicity (p=0.0001), as well as in patients presenting severe diarrhea (p=0.008) (Figure 1). Also, SN-38 plasma levels (p=0.04) and direct to total bilirubin ratio (p=0.04) were higher in patients with severe adverse events. However, the [direct bilirubin]/[total bilirubin] ratio showed no significant correlation with the SN-38 glucuronidation ratio (rs=0.07, p=0.663) or with global toxicity score (rs=-0.053, p=0.748).

There was a 13.3 times difference between the lowest (2.12) and the highest (28.11) SN-38 glucuronidation ratios, measured as [SN38G]/[SN38]. The ratios did not differ according to the overall presence of severe adverse events (p=0.11), neither correlated with the sum of the adverse events scores (rs=-0.19, p=0.24). However, our data indicated a trend to patients with severe neutropenia to have lower [SN38G]/[SN38] values, but although without statistical significance (p=0.06). The pharmacokinetics and biochemical variables were also compared among groups of predicted UGT1A1 and CYP3A phenotypes. Neither bilirubin nor [SN-38G]/[SN-38], [SN-38]/IRI dose, [IRI]/IRI dose, and [SN-38] presented differences among patient groups classified considering the predicted UGT1A1 and CYP3A phenotypes.

Table 4

Figure 1

The diagnostic capability of [SN38]/IRI dose ratios to identify patients predisposed to IRI-related severe toxicity was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curves (Figure 2). [SN38]/IRI dose ratio had an area under the ROC curve of 0.823 (95% CI 0.69-0.956) to detect global severe adverse event and 0.833 (95%CI 0.694-0.973) to detect severe

diarrhea (Figure 3). The cut-off value for [SN38]/IRI dose ratio was chosen according to the highest Youden's index (J), with higher results indicating a more positive test. The cut-off of 0.075 ng mL⁻¹ mg⁻¹ showed 80% of sensitivity and 76.9% of specificity to predict any severe event, with PPV of 63.2% and NPV of 86.4%. The same cut-off value resulted in 100% sensitivity and 65.7% specificity to predict severe diarrhea, with PPV of 31.6% and NPV of 100%.

Figure 2

Discussion

The study population was most self-reported white (80.5%). Participants also self-reported themselves as black (12.2%) and brown (7.3%). Most patients were women (61%), and the most prevalent neoplasia etiology was colorectal (43.9%). The majority of the patients received a FOLFIRI regimen (51.2%). Among all patients, 90.2% had adverse events of any grade and 36.5% had serious adverse events.

Our data indicated a frequency of homozygous *UGT1A1**28 variant of 9.3% and the presence of the *UGT1A1**36 allele in one patient (2.3%). Another Brazilian study, which involved a population mostly from the states of Sao Paulo and Bahia, found a general frequency of the *UGT1A1**28 allele of 12.1% (25). The study also compared three different ethnic groups, namely Caucasian, African-derived, and Parakanã indians. The frequency of *UGT1A1**36 was higher in the African-derived population, while the frequency of *UGT1A1**28 was similar between the Caucasian and African populations. (25).

Several studies have previously demonstrated the association between the presence of the *UGT1A1**28 polymorphism and occurrence of severe neutropenia and/or diarrhea. In the present study, besides the higher prevalence of severe adverse events within patients homozygous for the *UGT1A1**28 allele, we were not able to demonstrate the association of *UGT1A1* genotypes with the overall occurrence of severe adverse events or severe neutropenia. This might probably be attributed to the limited number of patients in the reduced *UGT1A1* activity group (n=4). However, the *UGT1A1* genotypes were significantly associated with the incidence of severe diarrhea, with 75% of patients with the *UGT1A1**28/*28 genotype presenting severe diarrhea, in contrast to 13.3% of severe diarrhea in the *UGT1A1**1/*1 group.

The first study showing the clinical significance of UGT1A1 was published by Innocenti et al (27). Grade 4 neutropenia was more common in patients with the *UGT1A1**28/*28 genotype (3 of 6 patients; 50%) compared with the *UGT1A1**1/*28 (3 of 24 patients; 12.5%) and the *UGT1A1**1/*1 genotypes (0 of 29 patients; 0%) (P.001). A recently published umbrella assessment of systematic reviews and meta-analyses on IRI-induced toxicity and pharmacogenetics reports that Caucasians with the *UGT1A1**28/*28 genotype had increased odds of severe diarrhea. This effect was restricted to patients receiving medium- or high-dose IRI, but not low-dose IRI (125-150 mg m⁻²). The association with neutropenia was confirmed independently of the IRI dose (10).

It is also interesting to report a study that aimed to define the maximum-tolerated dose (MTD) of IRI in patients with different *UGT1A1* genotypes. Sixty-eight patients were included to receive IRI every three weeks and 13% had the *UGT1A1**28/*28 genotype. The MTD for patients with the *UGT1A1**1/*1 genotype was 850 mg, The MTD for *UGT1A1**1/*28 patients was 700 mg, and the MTD for *UGT1A1**28/*28 patients was 400 mg. These findings indicated that for the standard dose of 350 mg m², *UGT1A1**28/*28 patients required dose reductions of ~40%, whereas *UGT1A1**28/*1 and *UGT1A1**1/*1 patients were being under dosed by ~10% and 34%, respectively (28). In our study, only one *UGT1A1**28/*28 patient received IRI at 350 mg m² and developed severe adverse events, benefiting from dose reduction. In fact, the patient had [SN-38]/IRI dose ratio above the proposed cut-off for predicting IRI-related severe toxicity.

The recent review “Irinotecan Therapy and *UGT1A1* genotype” shows the recommendations of the main guidelines including FDA, Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG), and the French National Network of Pharmacogenetics (RNPGx). The guidelines recommend a dose reduction when a genotype of *UGT1A1**28/28 is diagnosed. However, there is no consensus of which dose reduction is the most appropriate (26).

As CYP3A4 and CYP3A5 also contributes for IRI biotransformation and detoxification, we also evaluated their genotypes. We found that 60.5% of our population had a *CYP3A5**3/*3 genotype and 7% had a *CYP3A4**1/*22 genotype. CYP3A5 is a member of the CYP3A family that is expressed in only 10-40% of whites. Approximately 80% of the white population and 30% of the African-American population are homozygous for this inactive *CYP3A5* allele and are thus deficient in CYP3A5 activity (30). Because CYP3A4 and CYP3A5 have overlapping substrate specificities, it is difficult to estimate the contribution of each member to the CYP3A total metabolism. (29).

CYP3A4 and CYP3A5 enzymes are also involved in the metabolic elimination of IRI (29). We found no statistical correlation between the predicted activities from genotypes of CYP3A and the occurrence of adverse events after treatment with IRI. We also found no statistical correlation with the pharmacokinetics and biochemical parameters. The low number of patients with reduced activity of CYP3A may be related to this lack of statistical correlation. Also, the genotypic evaluation does not include environment aspects that could interfere in the metabolism once this group of enzymes is also commonly subject to drug and food interactions.

We also evaluated the association of one-point plasma IRI and metabolite concentrations with IRI-related severe adverse events. The contribution of plasma SN-38 concentrations on IRI-related side-effects is well recognized (23,24). In a previous study, the association between the area under the curve (AUC) of SN-38 concentration vs. time ratio and occurrence of severe neutropenia was shown. A greater AUC for SN-38 was also demonstrated in patients homozygous *UGT1A1**28*28 and *UGT1A1**6*6 (31). AUC is the most meaningful pharmacokinetic parameter to express exposure to a drug. However, there are technical difficulties for its application in clinical practice. For instance, in the study cited above, author collected 7 blood samples after the start of the infusion of irinotecan, in a span of several hours, to calculate the AUC. Another study analyzed the correlation between [SN-38G]/[SN-38] with the induction of neutropenia in patients homozygous *UGT1A1**1*1. The concentrations of IRI, SN-38 and SN-38G were measured in a single-point plasma specimen obtained from blood collected 15 minutes after the end of the IRI infusion. Authors found a median ratio [SN-38G]/[SN-38] of 4.25 (range 1.03 to 7.09), indicating that UGT1A1 activity is variable among wild-type patients. High concentrations of SN-38 and [SN-38G]/[SN-38] were correlated with neutropenia (6). Another study evaluated the importance of single-point [SN-38G]/[SN-38] in samples collected 15 min after the end of IRI infusion in both wild-type and mutated *UGT1A1* patients. The [SN-38G]/[SN-38] ratio was lower in homozygous patients for *UGT1A1**28 compared to the wild-type individuals and there was a positive correlation with neutropenia (7). In our study, a trend for decreased [SN-38G]/[SN-38] in patients with severe toxicity was observed, but without statistical significance ($p=0.06$).

Differently from previous studies, we found a significant difference in [SN-38]/IRI dose, obtained from plasma collected 15 min after the end of the IRI infusion, between patients with and without severe adverse effects and severe neutropenia. Using a cut-off value of 0.075 $\text{ng mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$ for [SN-38]/IRI dose, occurrence of toxicity can be predicted with high sensitivity and specificity. The pharmacokinetic data collected in a one-point blood sample collected only

15 minutes after the end of IRI infusion may be a useful alternative to genotypic analysis for predicting adverse events, being more predictive than genotyping data. However, the disadvantage of the pharmacokinetics data to predict adverse events is the need to perform 1 cycle of treatment at least, while the genomic data can be done before treatment. This phenotypic measure of IRI biotransformation integrates both genetic and environmental effects and should be further explored in clinical studies. The accurate prediction of the occurrence of severe adverse effects just after the first IRI dose could allow clinicians to adopt appropriate therapeutic measures to avoid complications and the discontinuation of the treatment.

The major strength of this study is to characterize a Brazilian population with pharmacogenetic and pharmacokinetic data related to IRI. We confirmed the of pre-emptive genotypic information of *UGT1A1*, as already published. The described, for the first time, the relation between [SN-38]/IRI dose, obtained from plasma collected 15 min after the end of the IRI infusion, and the occurrence of sever adverse events. We hypothesize that this parameter can be a useful strategy to minimize the burden of patients after IRI administration. New clinical studies are needed to evaluate and validate this hypothesis.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the clinical staff of the participating institutions, the study patients, and their families.

Author contributions

Conception and design of study: JB, GS, MVA, RL. Development of methodology: VDS, RZH, MVA, RL. Acquisition of data: JB, GS, MRI, CCP. Analysis and interpretation of data: JB, GS, MRI, CCP, VDS, RZH, MVA, RL. Study supervision: GS, MVA, RL. All authors reviewed the manuscript for important content and approved the final version prior to submission.

Funding

This work was supported by a Brazilian government grant from the joint call FAPERGS/MS/CNPq/SESRS PPSUS 2017 (grant # 17/2551-0001430-8).

Declarations

Conflict of interest

None to declare.

Ethical approval

The study protocol was reviewed and approved by the institutional ethics committee. The study was conducted in accordance with the ethical principles that have their origin in the Declaration of Helsinki and that are consistent with Good Clinical Practices and applicable regulatory requirements. All patients provided written informed consent to participate in the study.

References

1. Hahn RZ, Antunes MV, Verza SG, et al (2018) Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Markers of Irinotecan Toxicity. *Curr Med Chem* 26(12):2085–2107. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180622141101>
2. Tournigand C, André T, Achille E, et al (2004) FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22(2):229–237. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.113>
3. Conroy T, Gavaille C, Samalin E, et al (2013) The role of the FOLFIRINOX regimen for advanced pancreatic cancer. *Curr Oncol Rep* 15:182–189. <https://doi.org/10.1007/s11912-012-0290-4>
4. Di Paolo A, Bocci G, Polillo M, et al (2011) Pharmacokinetic and pharmacogenetic predictive markers of irinotecan activity and toxicity. *Curr Drug Metab* 12(10):932–943. <https://doi.org/10.2174/138920011798062283>
5. Poujol S, Bressolle F, Duffour J, et al (2006) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan and its metabolites from plasma and saliva data in patients with metastatic digestive cancer receiving Folfiri regimen. *Cancer Chemother Pharmacol* 58, 292. <https://doi.org/10.1007/s00280-005-0166-5>
6. Hirose K, Kozu C, Yamashita K, et al (2012) Correlation between plasma concentration ratios of SN-38 glucuronide and sn-38 and neutropenia induction in patients with colorectal cancer and wild-type UGT1A1 gene. *Oncol Lett* 3(3):694–698. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.533>

7. Hirose K, Yamashita K, Takada H, et al (2014) Usefulness of one-point plasma SN-38G/SN-38 concentration ratios as a substitute for UGT1A1 genetic information after iri administration. *Int J Clin Oncol* 19:397–402. <https://doi.org/10.1007/s10147-013-0558-1>
8. Gunturu KS, Yao X, Cong X, et al (2013) FOLFIRINOX for locally advanced and metastatic pancreatic cancer: Single institution retrospective review of efficacy and toxicity. *Med Oncol* 30, 361. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0361-2>.
9. Toffoli, G.; Cecchin, E.; Corona, G et al (2006) The Role of UGT1A1*28 Polymorphism in the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Irinotecan in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 24 (19), 3061– 3068. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.5400>
10. Campbell JM, Stephenson MD, Bateman E, et al (2017) Irinotecan-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta- analyses. *Pharmacogenomics J* 17(1):21–8. <https://doi.org/10.1038/tpj.2016.58>
11. Kehrer DFS, Mathijssen RHJ, Verweij J, et al (2002) Modulation of irinotecan metabolism by ketoconazole. *J Clin Oncol* 20(14):3122–3129. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.08.177>
12. Xie R, Mathijssen RHJ, Sparreboom A, et al (2002) Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in relation with diarrhea. *Clin Pharmacol Ther* 72(3):265–275. <https://doi.org/10.1067/mcp.2002.126741>
13. Tomalik-Scharte D, Lütjohann D, Doroshenko O, et al (2009) Plasma 4B-hydroxycholesterol: An endogenous CYP3A metric. *Clin Pharmacol Ther* 86(2):147–153. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.72>
14. Van Der Bol JM, Mathijssen RHJ, Creemers GJM, et al (2010) A CYP3A4 phenotype-based dosing algorithm for individualized treatment of irinotecan. *Clin Cancer Res* 16(2):736–742. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1526>
15. NCI, National Cancer Institute (US). Division of Cancer Treatment and Diagnosis. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Version 5.0. NCI; 2010. https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/ctc.htm
16. Hahn RZ, Arnhold PC, Andriguetti NB, et al (2017) An Easily Implementable Liquid Chromatography Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Irinotecan and Major Metabolites in Plasma. *Lat Am J Pharm* 36(12): 2363-2368.
17. Neto OV, Raymundo S, Franzoi MA, et al (2018) 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 56:18–25.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.04.001>

18. Meulendijks D, Henricks LM, Jacobs BAW, et al (2017) Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity. *Br J Cancer* 116:1415–1424. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.94>

19. Smiderle L, Galvão ACS, Fontana C, et al (2011) Evaluation of UGT1A1 and SULT1A1 polymorphisms with lipid levels in women with different hormonal status. *Gynecol Endocrinol* 27(1):20–26. <https://doi.org/10.3109/09513590.2010.493248>

20. Moes DJAR, Swen JJ, Den Hartigh J, et al (2014) Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A combined genotypes on cyclosporine, everolimus, and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplantation. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 3(2):1-12. <https://doi.org/10.1038/psp.2013.78>

21. Amstutz U, Henricks LM, Offer SM, et al (2018) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther* 103(2):210–216. <https://doi.org/10.1002/cpt.911>

22. Etienne-Grimaldi MC, Boyer JC, Thomas F, et al (2015) UGT1A1 genotype and irinotecan therapy: General review and implementation in routine practice. *Fundam Clin Pharmacol* 29(3):219–237. <https://doi.org/10.1111/fcp.12117>

23. Chabot GG, Abigeres D, Catimel G, et al (1995) Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan (CPT-11) and active metabolite SN-38 during phase I trials. *Ann Oncol* 6(2): 141-151. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a059109>

24. Chabot GG (1997) Clinical pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Pharmacokinet* 33(4): 245-259. <https://doi.org/10.2165/00003088-199733040-0000>

25. Fertrin KY, Gonçalves MS, Saad STO et al (2002) Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. *Am J Med Genet* 108(2):117–119.

26. Dean L. Irinotecan Therapy and UGT1A1 Genotype. In: Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, Esquivel B, Kane MS, Kattman BL, et al., editors. *Medical Genetics Summaries* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012 [cited 2021 Feb 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294473/>

27. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, et al. (2004) Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan *J Clin Oncol* (8):1382-1388, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2004.07.173>.

28. Innocenti F, Schilsky RL, Ramírez J, et al (2014) Dose-finding and pharmacokinetic study to optimize the dosing of irinotecan according to the UGT1A1 genotype of patients with cancer. *J Clin Oncol* 32(22):2328–2334. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.2307>

29. Van Schaik RHN (2004) Implications of cytochrome P450 genetic polymorphisms on the toxicity of antitumor agents. *Ther Drug Monit.* 26(2):236–240. <https://doi.org/10.1097/00007691-200404000-00027>

30. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature Genetics* 27(4):383–391. <https://doi.org/10.1038/86882>

31. Minami H, Sai K, Saeki M et al (2007) Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of UGT1A1*6 and *28. *Pharmacogenet Genomics* 17(7):497–504. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328014341f>

LIST OF TABLES AND FIGURES

Table 1. Demographics of the participants of the study, treatments, and frequency of adverse events (N=41)

Table 2. Summary of *CYP3A4* and *UGT1A1* pharmacogenetic characteristics of patients (N=41)

Table 3. Occurrence of adverse effects among patients classified according to UGT1A1 and CYP3A activities predicted from genotypes.

Table 4. Comparison of pharmacokinetic and biochemical parameters according to the presence or absence of severe adverse effects, UGT1A1 and CYP3A predicted phenotype groups.

Figure 1. Distribution of the [SN-38]/IRI dose values according to the presence of severe adverse event and *UGT1A1* genotypes. (A) Severe diarrhea. (B) Global severe adverse event. P value as Mann-Whitney test.

Figure 2. ROC curve of [SN38]/IRI dose predicting severe adverse reactions (A) and severe diarrhea (B) The asterisks indicate the cut-off values with the highest Youden's index.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A principal relevância deste estudo é caracterizar uma população brasileira com dados farmacogenéticos e farmacocinéticos relacionados ao IRI. Demonstramos a importância da análise genotípica do UGT1A1*28. Genotipagem no entanto tem limitações de custo e de acesso, principalmente em países em desenvolvimento. A aferição da relação [SN38]/ IRI demonstrou correlação significativa com eventos adversos graves, apresentando bons resultados como ferramenta de diagnóstico, com alta sensibilidade e especificidade. Também apresenta vantagem com menor custo e procedimento diagnóstico menos complexo.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A nossa hipótese é que a quantificação do IRI e seu metabólito ativo SN-38 pode ser uma alternativa para individualizar a dose da droga, novos ensaios randomizados poderão responder a essa pergunta no futuro. Novos programas de farmacogenômica estão cada vez mais sendo incorporados em diversos centros no Brasil, o Instituto Nacional de Câncer sendo um desses. Estudos como o nosso são necessários para ampliar a discussão e a implementação do uso de dados farmacocinéticos e farmacogenômicos na prática oncológica.

9. ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do Projeto: Avaliação genotípica e fenotípica da farmacocinética de irinotecano e sua relação com a ocorrência de toxicidade no tratamento do câncer

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é conhecer de que forma o seu corpo processa e tolera o medicamento irinotecano e quais características do seu corpo influenciam neste processo. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com a colaboração do Hospital Militar de Área de Porto Alegre e do Instituto Kaplan de Oncologia.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: no dia do começo do seu tratamento com quimioterapia, realizaremos uma entrevista em que registraremos suas informações médicas e colheremos amostra de sangue (12 mL) do seu braço para realização de exames de sangue (hemograma, marcadores de função hepática e renal e testes genéticos que verificam a função das enzimas CYP3A4 e UGT1A1). Poderá também ser necessária a coleta de saliva após você mascar um swab de algodão de um dispositivo coletor de saliva (Salivette®, Sarstedt, Germany), por 5 minutos, de acordo com as instruções especificadas pelo produtor.

No dia da sua quimioterapia, colheremos uma amostra de sangue do braço (4 mL) (venoso) e 1 coleta de sangue do dedo (1 gota) para a dosagem do irinotecano 15 minutos após o final da quimioterapia. Conforme procedimentos normais do Hospital, 20 dias após o primeiro ciclo da quimioterapia você será avaliado pelo médico e fará novos exames de rotina. Consultaremos seu prontuário após esta consulta somente para verificar dados referentes a ocorrência de efeitos adversos causados pelo irinotecano. Desta forma, os únicos procedimentos adicionados ao protocolo do seu tratamento serão duas coletas de sangue.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são o risco mínimo devido a coleta de sangue, que podem gerar desconforto e dor em virtude da punção venosa, podendo haver a formação de hematomas, e o desconforto devido ao tempo para retornar ao Hospital para coleta e fornecimento de informações.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são o conhecimento da sua composição genética para os genes *CYP3A4* e *UGT1A1*, o que poderá ser utilizado no futuro para ajustar tratamentos com medicamentos. Cabe destacar que no momento presente estes resultados ainda não utilizados clinicamente com este propósito. A pesquisa trará benefícios indiretos aos participantes ao contribuir para o aumento do conhecimento sobre os fatores que provocam os efeitos adversos causados pelo irinotecano, o que poderá beneficiar futuros pacientes que utilizem este medicamento.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não

haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá ser ressarcido por despesas decorrentes de sua participação, tal como despesas de transporte, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Prof. Gilberto Schwartzmann pelo telefone 3359.8012 ou com o pesquisador Prof. Rafael Linden, pelo telefone 35868800 ramal 9039.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____