

# Posible influencia de factores no controlados en las concentraciones séricas de uracilo

Repilado-Álvarez A.<sup>1</sup>, Llorente-Ballesteros M. T.<sup>2</sup>, Hurtado-de-Mendoza J.<sup>3</sup>, Gallego-Iglesias B. M.<sup>3</sup>, López-Fernández L.<sup>4</sup>, Sánchez-López P.<sup>5</sup>

*Sanid. mil. 2023; 79 (1): 35-41, ISSN: 1887-8571*

## RESUMEN

**Antecedentes y objetivos:** el déficit de dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) se ha asociado con un mayor riesgo de toxicidad tras exposición a fluoropirimidinas (FP). La determinación de las concentraciones plasmáticas de uracilo endógeno (U) es la prueba recomendada para identificar el déficit de DPD. Sin embargo, el valor de U puede verse afectado por diversos factores. El objetivo fue determinar la concentración sérica de U en una población candidata a recibir tratamiento con FP y comprobar si su distribución era compatible con la prevalencia del déficit parcial de DPD estimada en población caucásica. **Material y métodos:** estudio observacional prospectivo en el que se incluyeron pacientes oncológicos candidatos a tratamiento con FP. Para la determinación analítica se empleó un sistema Dionex Ultimate 3000 UHPLC, acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo-orbitrap híbrido Q-exactive. **Resultados:** se incluyeron 77 pacientes con una edad media de 71 años. La media y la mediana de las concentraciones séricas de U fue 30,4 y 24,0 ng/ml, respectivamente. El rango fue de 7,1 a 139,7 ng/ml. Un 79,2% de los pacientes presentó un nivel de U comprendido entre 16 y 150 ng/ml, mostrando una diferencia estadísticamente significativa al compararlo con la prevalencia estimada en población caucásica (8%) ( $p$ -valor  $<0,0001$ ). El método analítico empleado tiene un coeficiente de correlación  $R^2 > 0,99$  y un límite de detección  $<0,2$  ng/ml. **Conclusiones:** es necesario llevar a cabo más estudios con un diseño dirigido a establecer las condiciones óptimas relativas al pretratamiento de las muestras a fin de evitar o minimizar la influencia de estos factores sobre los valores del analito.

**PALABRAS CLAVE:** Uracilo, Suero, Dihidropirimidina deshidrogenasa, Toxicidad, Cromatografía de líquidos, Espectrometría de masas.

## Possible influence of uncontrolled factors on serum uracil concentrations

### SUMMARY

**Background and objective:** dihydropyridine dehydrogenase (DPD) deficiency has been associated with an increased risk of toxicity after exposure to fluoropyrimidines (FP). Determination of endogenous uracil (U) plasma concentrations is the recommended test to identify DPD deficiency. However, the value of U can be affected by various factors. The objective was to determine the serum concentration of U in a population candidate to receive treatment with FP and to verify if its distribution was compatible with the prevalence of partial DPD deficiency estimated in the Caucasian population. **Material and methods:** prospective observational study in which cancer patients candidates for FP treatment were included. For the analytical determination, a Dionex Ultimate 3000 UHPLC system coupled to a Q-exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer was used. **Results:** 77 patients, with a mean age of 71 years, were included. The mean and median serum U concentrations were 30.4 and 24.0 ng/ml, respectively. The range was from 7.1 to 139.7 ng/ml. 79.2% of the patients presented a U level between 16 and 150ng/ml, showing a statistically significant difference when compared to the estimated prevalence in the Caucasian population (8%) ( $p$ -value  $<0.0001$ ). The analytical method used has a correlation coefficient  $R^2 > 0.99$  and a detection limit  $<0.2$  ng/ml. **Conclusions:** it is necessary to carry out more studies with a design aimed at establishing the optimal conditions related to the pretreatment of the samples in order to avoid or minimize the influence of these factors on the analyte values.

**KEYWORDS:** Uracil, Serum, Dihydropyrimidine dehydrogenase, Toxicity, Liquid chromatography, Mass spectrometry.

## INTRODUCCIÓN

La dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) es la principal enzima responsable del metabolismo del 5-fluorouracilo (5-FU)<sup>1</sup>, un análogo de pirimidina frecuentemente empleado en el tratamiento de diferentes tumores sólidos. La deficiencia completa o parcial de DPD aumenta el riesgo de sufrir reacciones adversas tras la exposición a 5-FU y otros tratamientos que resulten bio-transformados en este, como capecitabina, tegafur y flucitosina<sup>2</sup>.

La caracterización del genotipo es la técnica más ampliamente empleada en nuestro entorno para identificar la deficiencia de DPD, si bien es cierto que el método de referencia es la

<sup>1</sup> Teniente farmacéutico. Instituto de Toxicología de la Defensa. Madrid. España.

<sup>2</sup> Coronel farmacéutico. Instituto de Toxicología de la Defensa. Madrid. España.

<sup>3</sup> Instituto de Toxicología de la Defensa-Área de Cromatografía. Madrid. España.

<sup>4</sup> Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Servicio de Farmacia Hospitalaria-Laboratorio de Farmacogenética. Madrid. España

<sup>5</sup> Teniente coronel farmacéutico. Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla. Servicio de Farmacia Hospitalaria. Madrid. España.

**Dirección para la correspondencia:** Adrián Repilado Álvarez. Instituto de Toxicología de la Defensa. Complejo Hospitalario Gómez Ulla. Glorieta del Ejército s/n. 28047 Madrid. España. Tlf: 914222628, arepalv@mde.es

Recibido: 29 de noviembre de 2022

Aceptado: 23 de enero de 2023

DOI: 10.4321/S1887-85712023000100007

determinación de la actividad de esta enzima en células mononucleares de sangre periférica. Además de estas estrategias, se han propuesto otras opciones analíticas dirigidas a prevenir la toxicidad asociada al tratamiento con fluoropirimidinas (FP)<sup>3</sup>. Entre las más aceptadas se encuentra la prueba fenotípica que consiste en la determinación de las concentraciones séricas o plasmáticas de uracilo (U), substrato endógeno de la DPD. En mayo de 2020, la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) emitió una alerta en la que estableció el rango de concentraciones plasmáticas de U endógeno [16-150 ng/ml] compatible con un déficit parcial de esta enzima<sup>4</sup>.

La idoneidad de la determinación de las concentraciones de U para prevenir el riesgo de toxicidad severa ha sido puesta en duda recientemente alegando la influencia de diferentes factores, fundamentalmente asociados a la etapa preanalítica<sup>5</sup>.

El Instituto de Toxicología de la Defensa (ITOXDEF) es el órgano técnico superior en el ámbito toxicológico de las Fuerzas Armadas. Entre sus misiones principales se encuentra la investigación, que se sustenta en su personal especializado, un avanzado equipamiento tecnológico y la competencia técnica para realizar las determinaciones de alrededor de 200 parámetros acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). Estas capacidades permiten al ITOXDEF involucrarse en diferentes proyectos de investigación relacionados con la toxicología.

El objetivo de nuestro estudio fue determinar la concentración sérica de U endógeno en una población candidata a recibir tratamiento con FP y comprobar si su distribución es compatible con la prevalencia del déficit parcial de DPD estimada en población caucásica (3-8%). En caso de no resultar compatible se pretende realizar una revisión de la evidencia relativa a los posibles factores que pueden influir en la determinación de este analito.

## MÉTODOS

Estudio observacional prospectivo en el que se incluyeron pacientes oncológicos candidatos a tratamiento con FP. El estudio se llevó a cabo en un único centro hospitalario de tercer nivel entre los meses de octubre de 2021 y mayo de 2022. Las variables recogidas fueron sexo, edad, tipo de cáncer y concentraciones séricas de U en dicha población.

Para esta determinación, previamente al inicio del tratamiento con FP, se tomó sangre en tubos de extracción con gel separador. Tras la centrifugación las muestras fueron congeladas a una temperatura de -80 °C.

Para la determinación de U se empleó un sistema Dionex Ultimate 3000 UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo-orbitrap híbrido Q-exactive, mediante una fuente de ionización electrospray (ESI) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). El método analítico desarrollado en el ITOXDEF se recoge en la tabla 2.

La proporción de pacientes de la muestra con una concentración sérica de U comprendida entre 16 ng/ml y 150 ng/ml se comparó con la proporción poblacional preespecificada de pacientes con deficiencia parcial de DPD, tomando como valor de hipótesis una prevalencia del 8% por ser el límite superior del intervalo referenciado en la alerta emitida por la AEMPS para población caucásica (3-8%).

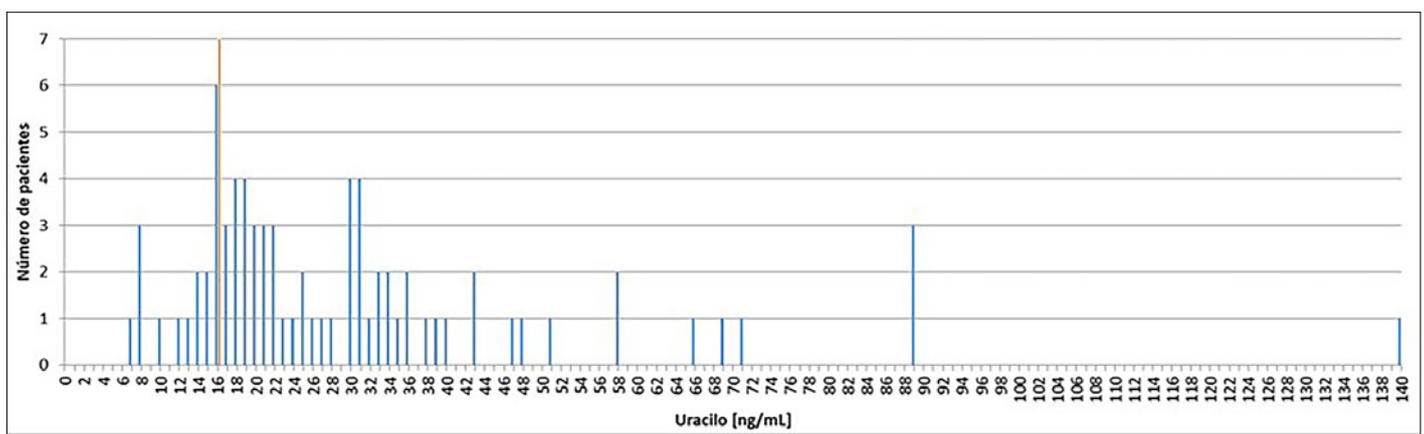
Para la realización de este test de hipótesis se aplicó una prueba-z empleando la herramienta online MedCalc Software Ltd. Test for one proportion calculator [disponible en [https://www.medcalc.org/calc/test\\_one\\_proportion.php](https://www.medcalc.org/calc/test_one_proportion.php)].

El análisis estadístico se realizó con el software IBM SPSS Statistics v25.0.

## RESULTADOS

Se incluyeron 77 pacientes. La mediana de edad fue 71 años (IQR 58,2-79,3) y 44 eran hombres (57,1%). Los tipos de cáncer más frecuentes fueron: colon (23; 29,9%), recto (16; 20,8%) y colorrectal (11; 11,7%). La concentración media de U fue de 30,4 ng/ml (IC 95% 25,0-35,0) (véase tabla 1). La distribución de la serie completa se muestra en la figura 1.

Un total de 61 pacientes (79,2% [IC 95% 68,4-87, 6%]) presentaron una concentración de U en el intervalo 16-150 ng/ml y solo 16 (20,8% [IC 95% 12,4-31, 6%]) presentaron un valor de U por debajo de 16 ng/ml. En nuestra muestra (n = 77), al comparar la proporción de pacientes con una concentración de U compatible con deficiencia parcial de DPD (79,2%) con la proporción preespecificada (8%), el estadístico z fue 23,030 y el p-valor <0,0001, rechazando así la hipótesis de que la preva-



**Figura 1.** Histograma de frecuencias de los niveles séricos de uracilo en la población estudiada. La línea roja vertical indica el valor establecido como punto de corte para la detección del déficit enzimático de dihidropirimidina deshidrogenasa (16 ng/ml).

**Tabla 1.** Distribución de las concentraciones séricas de uracilo

Número de pacientes = 77	Concentración sérica de uracilo (ng/mL)
Media	30,4
Mediana	24,0
Q1-Q3	17,0-34,5
Valor mínimo	7,1
Valor máximo	139,7

lencia observada en nuestra muestra sería igual a la descrita en población caucásica.

En lo que respecta al método analítico, el coeficiente de correlación  $R^2$  fue mayor de 0,99 y el límite de detección inferior a 0,2 ng/ml.

## DISCUSIÓN

En nuestro estudio encontramos unas concentraciones séricas de U notablemente superiores a otras publicadas por grupos que emplearon LC-MS/MS con diferentes equipos, condiciones de ensayo y métodos de preparación de las muestras<sup>5,8,16</sup> (véase tabla 2). El método analítico desarrollado por el ITOXDEF es rápido, sensible y muestra una buena linealidad, precisión y exactitud en el rango de concentración validado.

De acuerdo con los resultados presentados, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de pacientes con niveles de U compatibles con una deficiencia parcial de DPD observada en nuestra muestra y la prevalencia de esta alteración descrita para población caucásica. Teniendo en cuenta la validez de los resultados arrojados por la técnica empleada en nuestro estudio, parece que esta diferencia puede deberse a la posible influencia de factores relativos al tratamiento preanalítico que no fueron controlados en nuestro estudio (matriz empleada, tiempo hasta centrifugación, temperatura de conservación, hora de extracción, condición de ayuno). Si bien es cierto que no se puede descartar que las condiciones del método analítico (equipo, columna, iones y patrón interno, entre otras), también puedan influir en la determinación.

### Matriz y anticoagulante

Cabe destacar que la determinación del U endógeno se realizó en muestras de suero y no de plasma. Se escogió esta matriz por ser el tipo de muestra empleado en el estudio de Meulendijks *et al.* que resultó fundamental para establecer el punto de corte de U endógeno en 16 ng/ml<sup>11</sup>. Sin embargo, la *Haute Autorité de santé* (HAS) francesa recomendó en 2018 que la determinación se llevara a cabo partiendo de sangre venosa extraída en tubos con anticoagulante sin gel separador, es decir, en plasma. Entre los anticoagulantes más frecuentemente empleados se encuentra la heparina de litio y el EDTA. Un estudio reciente observó que los niveles plasmáticos de U tendían a ser superiores en las muestras anticoaguladas con EDTA y lo atribuyó a la posible influencia del pH en la estabilidad del analito<sup>17</sup>.

La determinación de los niveles séricos estaría libre de la influencia de este condicionante. Además, el hecho de que otros

estudios llevados a cabo con muestras de plasma (véase tabla 2) obtuvieran resultados similares a los del trabajo de Meulendijks *et al.* sugiere que el tipo de muestra probablemente influya en el resultado, pero no justifica por sí solo la divergencia observada en nuestra población de estudio. Por otro lado, se desconoce si el gel separador del tubo de extracción puede influir en la determinación.

### Temperatura y tiempo hasta la centrifugación

En lo que respecta a la posible influencia del tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta su centrifugación, Remaud *et al.*<sup>18</sup> ya publicaron en el 2005 que los niveles de U endógeno de voluntarios sanos se incrementaban conforme aumentaba el tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre hasta su centrifugación. Publicaciones posteriores incluyeron en su metodología la necesidad de centrifugar inmediatamente las muestras a fin de minimizar este efecto<sup>19</sup>. Coudoré *et al.*<sup>8</sup> cifraron en  $27,2 \pm 15,1\%$ ,  $163,0 \pm 26,8\%$  y  $169,0 \pm 9,1\%$  las variaciones medias en los niveles de U, cuando el tiempo transcurrido a temperatura ambiente, desde la extracción hasta el centrifugado de las muestras, era de 2 h, 5 h y 24 h, respectivamente. Otros autores estimaron que el incremento a las 6 h era de  $21,2 \pm 2,1\%$ <sup>16</sup>. Esta tendencia, aunque en menor medida, también se observó cuando la conservación de las muestras se realizaba a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Jacobs *et al.* concluyeron que, a esta temperatura, el tiempo máximo de conservación no debía superar las 4 h, debiendo evitar en todo caso la conservación a temperatura ambiente. En base a este y otros estudios la HAS recomendó llevar a cabo la centrifugación de la sangre en los 90 primeros minutos para muestras procesadas a temperatura ambiente y 4 h para aquellas refrigeradas<sup>20</sup>. Más recientemente se ha concluido que el tiempo transcurrido hasta la centrifugación no debería ser superior a 1 h y el envío de muestras y su conservación debería hacerse en condiciones de refrigeración con la finalidad de asegurar la fiabilidad en la determinación<sup>17</sup>.

Las muestras analizadas en nuestro centro no se enviaban refrigeradas ni tampoco se estableció con anterioridad un tiempo máximo hasta la centrifugación. Este hecho contribuiría a explicar, en parte, el incremento en las concentraciones de U. Coudoré *et al.* atribuyen este hecho a la liberación de U desde el DNA y la albúmina y a la degradación de las pirimidinas<sup>8</sup>. Otra posible explicación sería la conversión de uridina en U, reacción catalizada por la uridina fosforilasa<sup>21</sup>. Los niveles de uridina han sido relacionados con la actividad de la DPD<sup>22</sup>. Por otro lado, la uridina fosforilasa se encuentra elevada en pacientes con tumores sólidos<sup>23,24</sup> lo que podría hacer que la variación en los niveles de U debido a la actividad enzimática de la uridina fosforilasa fuera mayor en este tipo de pacientes. En este sentido sería interesante comprobar la evolución de uridina y U en diferentes condiciones de conservación. Otro punto interesante es evaluar si estrategias como la implementada por Büchel *et al.*<sup>7</sup> y Sistonen *et al.*<sup>9</sup>, consistentes en mantener en hielo durante un tiempo la sangre recién extraída, tiene un efecto beneficioso en el mantenimiento de los valores del analito.

**Tabla 2.** Resultados y condiciones de ensayo en estudios publicados que emplearon como método analítico LC-MS/MS

ETAPA PREANALÍTICA							
Matriz	Población	Anticoagulante	Ayuno	Hora de extracción	T. máx. hasta centrifugación	Centrifugación	Congelación
P	123 vol. sanos asiáticos	Heparina	SI	8am-9am	N.E.	N.E.	T <sup>a</sup> -30 °C t: N.E.
P	10 pac. en tto. con 5-FU	Heparina de litio	N.E.	N.E.	5 min. mantenida en hielo t: N.E.	T <sup>a</sup> N.E. t: 10 min. F: 3.000 g	T <sup>a</sup> -20 °C t: N.E.
P	26 pac.	EDTA	SI	8am-10am	<30min.	T <sup>a</sup> 4 °C t: 10 min F: 3.200 g	T <sup>a</sup> -20 °C t: N.E.
P	320 vol. y 28 pac.	Heparina de litio	N.E.	7am- 9am 11am-1.30pm	Mantenida en hielo t: <1h	T <sup>a</sup> N.E. t: 10 min. F: 3.300 g	T <sup>a</sup> -20 °C t: N.E.
P	60 pac.	EDTA	SI (8h)	8am-9am	Inmediata	N.E.	T <sup>a</sup> -70 °C t: N.E.
S	550 pac.	-	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
P	40 pac.	EDTA	N.E.	8am-11.30am	Inmediata	N.E.	T <sup>a</sup> -70 °C t: N.E.
P	64 pac.	Heparina	N.E.	N.E.	<1,5h	T <sup>a</sup> 4 °C t: N.E. F: N.E.	T <sup>a</sup> -20°C t: N.E.
P	526 pac.	Heparina, sin gel separador	N.E.	N.E.	< 1,5h a T <sup>a</sup> ambiente o < 4h a 4 °C	T <sup>a</sup> 4°C t: 10 min. F: 3.200 g	T <sup>a</sup> -20°C t: N.E.
P	37 pac.	Heparina sódica	N.E.	N.E.	t: N.E. T <sup>a</sup> 4°C	T <sup>a</sup> N.E. t: 10 min. F: 2.000 g	T <sup>a</sup> -80 °C t: N.E.
S	77 pac	- (con gel separador)	N.E.	N.E.	N.E.	T <sup>a</sup> ambiente. t: 5 min. F: 3.500 g	T <sup>a</sup> -80 °C t: N.E.

P: plasma; S: suero; Pac.: pacientes; Vol.: voluntarios; N.E.: no especificado; T<sup>a</sup>: temperatura; t: tiempo; F: fuerza g; PP: precipitación proteica; EX: extracción;

Possible influence of uncontrolled factors on the concentrations of uracil in serum

ETAPA ANALÍTICA					C. uracilo [ng/ml]	Ref.
Preparación muestras	Equipo	Columna	Ion [m/z]	Patrón interno		
<b>PP:</b> Sulfato de amonio <b>EX:</b> Isopropanol-acetato de etilo (15/85 v/v) <b>EV:</b> 45 °C 15', N <sub>2</sub> <b>R:</b> metanol 10%	API 3000 TQ	Amide C <sub>16</sub> (150 x 4.6 mm)	[M+H] <sup>+</sup> : 110,8 42,1	5-BU 5-FU	Media: 20,1±9,2 Mediana: 18,7 Rango: 7,6-60,5	Jiang <i>et al.</i> 2002 <sup>6</sup>
<b>PP:</b> Sulfato de amonio <b>EX<sub>1</sub>:</b> Acetato de etilo-2-propanol (10:1 v/v) <b>EV:</b> N <sub>2</sub> (40 °C) <b>EX<sub>2</sub>:</b> fase orgánica <b>R:</b> Ac. Fórmico 0,1% +sonicación Centrifugación	4000 QTRAP	Atlantis dC18 (2,1 x 150 mm, 3 μm) conectado a Atlantis dC18 (2.1x10 mm, 3μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 113 70.00	U-2- <sup>13</sup> C UH <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sub>4</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> 5-FU- <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	Rango: 7,8-29,1* *antes de la infusión	Büchel <i>et al.</i> 2012 <sup>7</sup>
<b>PP:</b> Sulfato de amonio <b>EX:</b> Isopropanol-acetato de etilo (15/85 v/v) <b>EV:</b> sistema de vacío <b>R:</b> Ac. acético 0,5% +vortex Centrifugación	Acquity TQD	Acquity BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1,7 μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 112.82 70.05*/95.90†	U-Br	Media: 9,7±7,7 Mediana:8,4 Rango:0,6-43,3	Coudoré <i>et al.</i> 2012 <sup>8</sup>
<b>PP:</b> Sulfato de amonio <b>EX<sub>1</sub>:</b> Acetato de etilo-2-propanol (10:1 v/v) <b>EV:</b> N <sub>2</sub> (40 °C) <b>EX<sub>2</sub>:</b> fase orgánica <b>R:</b> Ac. Fórmico 0,1% +sonicación Centrifugación	4000 QTRAP	Atlantis dC18 (2,1 x 150 mm, 3 μm) conectado a Atlantis dC18 (2.1x10 mm, 3 μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 113 70.00	U-2- <sup>13</sup> C	<u>Voluntarios sanos:</u> Media: 14,6 Rango: 3,4- 62,8 <u>Pacientes:</u> Media: 15,7 Rango: 7,8- 34,7	Sistonen <i>et al.</i> 2014 <sup>9</sup>
<b>PP:</b> Sulfato de amonio <b>EX:</b> Isopropanol-acetato de etilo (15/85 v/v) <b>EV:</b> tubo de vacío 60 °C <b>R:</b> Agua ultrapura Centrifugación	TSQ Quantum Access	Acquity C18 (150 × 2,6 mm, 1,7 μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 113 70.00*/40*/96†	5-FU	Media: 15,2 Rango: 4,5-1093,0	Galarza <i>et al.</i> 2016 <sup>10</sup>
<b>PP:</b> metanol/acetanitrilo (50:50) Centrifugación 10', 14.000 g <b>EV:</b> corriente de N <sub>2</sub> (40°C) <b>R:</b> Ac. Fórmico 0,1%+vortex Centrifugación	QTRAP 5500 TQ	Acquity HSS T3 (150 × 2.1 mm, 1,8 μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 110,9 42,0	U- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> UH <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sub>4</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	Media: NE Rango: 3,2-38,3 P <sub>1-91</sub> [ $<13,0$ ] n=500/550 P <sub>92-94</sub> [13,0-13,8] n=16/550 P <sub>95-97</sub> [13,9-16,0] n=17/550 P <sub>98-100</sub> [ $>16,0$ ] n=17/550	Meulendijks <i>et al.</i> 2017 <sup>11</sup>
<b>PP:</b> Sulfato de amonio <b>EX:</b> Isopropanol-acetato de etilo (15/85 v/v) <b>EV:</b> tubo de vacío 60 °C <b>R:</b> Agua ultrapura	TSQ Quantum Access	Hypercarb (150 × 3 mm, 5 μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 113 70.00*/40*/96†	5-FU	Media: 11,7 Rango: 5,3-26,2	Neto <i>et al.</i> 2018 <sup>12</sup>
Tubo con filtro 0,45μm + plasma + isopropanol + acetonitrilo/ác. fórmico (1%) Mezclado Filtración a vacío Extracto diluido en agua	LCMS-8060 TQ	Hypercarb, (150 x 2,1 mm, 3 μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 113,1 70.1*	U- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> UH <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sub>4</sub> - <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	Rango: 4,9-36,6 (n=63)	Robin <i>et al.</i> 2020 <sup>13</sup>
<b>PP:</b> Sulfato de amonio <b>EX<sub>1</sub>:</b> Acetato de etilo-2-propanol (85/15, v/v) <b>EV:</b> N <sub>2</sub> (40 °C) <b>R:</b> Ac. acético 0,5% Centrifugación	4500QTRAPMD	Cortecs T3 (C18) 2.5 mm (100 x 2.1 mm, 2,5 μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 112.95 70.00*/95.90†	U- <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N <sub>2</sub> UH <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	Mediana: 10,6 Q1-Q3: 8,4-13,8 Rango:3,9-81,6	Tafzi <i>et al.</i> 2020 <sup>14</sup>
<b>PP:</b> ZnSO <sub>4</sub> + acetonitrilo/metanol (95/5, v/v) <b>EX1:</b> Ac acético y acetato de etilo/ alcohol isopropílico <b>EV:</b> concentrador de vacío 50 °C <b>R:</b> ác. acético/ác. fórmico/agua (0,25/0,05/99,7, v/v/v)	6460 TQ (Agilent)	Luna PFP (2) (150 × 2 mm, 3 μm) conectado a PFP (2) (4 × 2.0 mm, 3 μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 113,1 53,1/68,1	U marcado con isótopos estables (N.E.)	Media: 10,7 Q1-Q3: 9,1-11,9 Rango: 7,2-20,7	Burns <i>et al.</i> 2021 <sup>15</sup>
<b>PP:</b> metanol + agitación + ultrasonidos 5'. <b>Centrifugación</b> 14.100 g, 10'. <b>Eliminación de fosfolípidos</b> en cartucho Phree (Phenomenex) <b>Secuadad:</b> N <sub>2</sub> (40 °C) <b>R:</b> agua tipo I	Cuadrupolo-orbitrap híbrido Q-exactive	Hypercarb (50 × 4,6 mm, 6 μm) conectado a columna Pinacle DB AQ C18 (30 x 2,1 mm, 3 μm)	[M+H] <sup>+</sup> : 113.03455 70.02935/96,00832*	U-2- <sup>13</sup> C	Media: 30,4 Mediana: 24,0 Q1-Q3: 17,0-34,5 Rango: 7,1-139,7	ITOXDEF 2022

EV: evaporación; R: reconstitución; TQ: triple cuadrupolo; \*: Ion de cuantificación; †: Ion de confirmación.

### Condición de ayuno y ritmo circadiano

La influencia de la ingesta de alimentos en los niveles de U ha sido testada en 16 voluntarios sanos, observando que tras el consumo de alimentos se produce una disminución del U plasmático en comparación con las determinaciones en un estado de ayuno<sup>25</sup>. Además, parece que, independientemente del estado alimentado o ayunado, se produce una reducción paulatina entre las 08:00h y las 13:00h. Esta observación es coherente con los resultados del trabajo de Jacobs *et al.*<sup>26</sup>, quienes analizaron el ritmo circadiano del U observando un pico de  $12,21 \pm 0,75$  ng/ml a las 05:00 h mientras que el valle se situaría a las 17:00 h con un valor medio de  $8,78 \pm 0,49$  ng/ml.

La condición de ayuno y la hora de extracción han sido definidas con anterioridad en diferentes investigaciones (véase tabla 2), pero no en nuestro estudio. No obstante, las variaciones producidas por estos factores no parecen influir de una forma tan significativa como para poder explicar, por sí solos, los elevados valores de U determinados en nuestra población de estudio.

### Congelación

En relación a la congelación del plasma, parece existir una evidencia sólida que avala el empleo de esta técnica de conservación hasta el momento de realizar la determinación<sup>6,7,16,17,26,27</sup>. En este sentido, una recomendación de la HAS fue la de congelar inmediatamente el plasma obtenido y conservar la cadena de frío hasta el momento del ensayo. Teniendo en cuenta la duración de nuestro estudio y la temperatura de conservación ( $-80$  °C), no parece razonable que la congelación de las muestras haya podido afectar de forma notoria a los valores de U.

No se ha encontrado en la bibliografía un documento en el que se concreten las condiciones en las que debe realizarse esta prueba de fenotipo antes de iniciar un tratamiento con FP. En este sentido, es importante advertir sobre las consecuencias para el paciente derivadas de la emisión de un resultado con un valor de U distorsionado. Teniendo en cuenta las recomendaciones recogidas en la alerta sanitaria emitida por la AEMPS, en caso de superar los 16 ng/ml se iniciaría un tratamiento con dosis reducidas y en caso de superar los 150 ng/ml no se iniciaría el tratamiento con estos principios activos lo que, en ambos casos, tendría una repercusión negativa en los resultados clínicos de la quimioterapia.

### CONCLUSIONES

Nuestro trabajo sugiere que es necesario llevar a cabo más estudios con un diseño dirigido a establecer las condiciones óptimas relativas al pretratamiento de las muestras a fin de evitar o minimizar la influencia de estos factores sobre los valores del analito. Solo cuando se tenga la certeza de que las condiciones fijadas aseguran la fiabilidad y exactitud de la determinación se podrá establecer el umbral de U que permita identificar correctamente a los pacientes que presenten una deficiencia de DPD y que, por tanto, sean susceptibles de sufrir toxicidad asociada al tratamiento con FP.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Van Kuilenburg, A. B. P. (2004). Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer*. Mayo 40 (7): 939-50.
2. Lorient, M. A., Ciccolini, J., Thomas, F. *et al.* (2018). Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency screening and securing of fluoropyrimidine-based chemotherapies: Update and recommendations of the French GPCO- Unicancer and RNPgX networks. *Bull Cancer*. Abril 105 (4): 397-407.
3. Knikman, J. E., Gelderblom, H., Beijnen, J. H. *et al.* (2021). Individualized Dosing of Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy to Prevent Severe Fluoropyrimidine-Related Toxicity: What Are the Options? *Clin Pharmacol Ther*. Marzo 109 (3): 591-604.
4. Fluorouracilo, capecitabina, tegafur y flucitosina en pacientes con déficit de dihidropirimidina deshidrogenasa [Internet]. [Consulta: 2022 octubre 2026]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/informa/fluorouracilo-capecitabina-tegafur-y-flucitosina-en-pacientes-con-deficit-de-dihidropirimidina-des-hidrogenasa/>
5. With, M. de, Knikman, J., Man, F. M. de *et al.* (2022). Dihydropyrimidine Dehydrogenase Phenotyping Using Pretreatment Uracil: A Note of Caution Based on a Large Prospective Clinical Study. *Clin Pharmacol Ther*. Julio 112 (1): 62-8.
6. Jiang, H., Jiang, J., Hu, P. y Hu, Y. (2002). Measurement of endogenous uracil and dihydrouracil in plasma and urine of normal subjects by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Marzo 25; 769 (1):169-76.
7. Büchel, B., Rhyn, P., Schürch, S. *et al.* (2013). LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. *Biomed Chromatogr*. Junio 27 (1): 7-16.
8. Coudoré, F., Roche, D., Lefeuvre, S. *et al.* (Validation of an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for quantifying uracil and 5,6-dihydrouracil in human plasma. *J Chromatogr Sci*. Diciembre 50 (10): 877-84.
9. Sistonen, J., Büchel, B., Froehlich, T. K. *et al.* (2014). Predicting 5-fluorouracil toxicity: DPD genotype and 5,6-dihydrouracil:uracil ratio. *Pharmacogenomics*. Septiembre 15 (13): 1653-66.
10. Galarza, A. F. A., Linden, R., Antunes, M. V. *et al.* (2016). Endogenous plasma and salivary uracil to dihydrouracil ratios and DPYD genotyping as predictors of severe fluoropyrimidine toxicity in patients with gastrointestinal malignancies. *Clin Biochem*. Noviembre 49 (16-17): 1221-6.
11. Meulendijks, D., Henricks, L. M., Jacobs, B. A. W. *et al.* (2017). Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity. *Br J Cancer*. Mayo 116 (11): 1415-24.
12. Neto, O. V., Raymundo, S., Franzoi, M. A. *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. *Clinical Biochemistry*. Junio 1; 56: 18-25.
13. Robin, T., Saint-Marcoux, F., Toinon, D. *et al.* (2020). Automatic quantification of uracil and dihydrouracil in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Abril 1; 1142:122038.
14. Tafzi, N., Woillard, J. B., Fleytoux, A. *et al.* (2020). Phenotyping of Uracil and 5-Fluorouracil Metabolism Using LC-MS/MS for Prevention of Toxicity and Dose Adjustment of Fluoropyrimidines. *Ther Drug Monit*. Agosto 42 (4): 540-7.
15. Burns, K. E., Chavani, O., Jeong, S. H. *et al.* (2021). Comparison of a thymine challenge test and endogenous uracil-dihydrouracil levels for assessment of fluoropyrimidine toxicity risk. *Cancer Chemother Pharmacol*. Mayo; 87 (5): 711-6.
16. Jacobs, B. A. W., Rosing, H., Vries, N. de, Meulendijks, D. *et al.* (2016). Development and validation of a rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for determination of uracil and dihydrouracil in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. Julio 15; 126 :75-82.
17. Maillard, M., Launay, M., Royer, B. *et al.* (2022). Quantitative impact of pre-analytical process on plasma uracil when testing for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Br J Clin Pharmacol*. Septiembre 14.
18. Rемаud, G., Boisdron-Celle, M., Hameline, C. *et al.* (2005). An accurate dihydrouracil/uracil determination using improved high performance liquid chromatography method for preventing fluoropyrimidines-related toxicity in clinical practice. *Journal of Chromatography B*. Septiembre 5; 823 (2): 98-107.

## Possible influence of uncontrolled factors on uracil concentrations in serum

19. Déporte, R., Amiand, M., Moreau, A. *et al.* (2006). High-performance liquid chromatographic assay with UV detection for measurement of dihydrouracil/uracil ratio in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Abril 13; 834 (1-2):170-7.
20. HAS (French National Authority for Health-Haute Autorité de santé). Screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency to decrease the risk of severe toxicities related to fluoropyrimidines (5-fluorouracil or capecitabine). ISBN number: 978-2-37219-416-7 [Internet]. [Consulta: 26 octubre 2022]. Disponible en: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2019-01/inahta\\_brief\\_dpd\\_5fu.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2019-01/inahta_brief_dpd_5fu.pdf)
21. Cao, D. y Pizzorno, G. (2004). Uridine phosphorylase: an important enzyme in pyrimidine metabolism and fluoropyrimidine activation. *Drugs Today (Barc)*. Mayo; 40(5):431-43.
22. Kang, J., Kim, A. H., Jeon, I. *et al.* (2022). Endogenous metabolic markers for predicting the activity of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Clin Transl Sci.* Mayo; 15 (5):1104-11.
23. Liu, M., Cao, D., Russell, R. *et al.* (1998). Expression, characterization, and detection of human uridine phosphorylase and identification of variant uridine phosphorylase activity in selected human tumors. *Cancer Res.* Diciembre 1; 58 (23): 5418-24.
24. Wang, J., Xu, S., Lv, W. *et al.* (2020). Uridine phosphorylase 1 is a novel immune-related target and predicts worse survival in brain glioma. *Cancer Med.* Junio 24; 9 (16): 5940-7.
25. Henricks, L. M., Jacobs, B. A. W, Meulendijks, D. *et al.* (2018). Food-effect study on uracil and dihydrouracil plasma levels as marker for dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* Diciembre; 84 (12):2 761-9.
26. Jacobs, B. A. W., Deenen, M. J., Pluim, D. *et al.* (2016). Pronounced between-subject and circadian variability in thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme activity in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* Septiembre; 82 (3):706-16.
27. Garg, M. .B, Sevester, J. C., Sakoff, J. A., Ackland, S. P. (2002). Simple liquid chromatographic method for the determination of uracil and dihydrouracil plasma levels: a potential pretreatment predictor of 5-fluorouracil toxicity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Julio 15; 774 (2): 223-30.