

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat Autònoma de Barcelona

# **ESTUDIS FARMACOGENÈTICS EN EL TRACTAMENT DEL CÀNCER COLORECTAL**

Tesi doctoral  
**Laia Paré i Brunet**

Directora: Dra. Montserrat Baiget i Bastús

Servei de Genètica  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Barcelona, 2010



**La Dra. Montserrat Baiget Bastús**, Cap del Servei de Genètica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

CERTIFICA

Que la Laia Paré Brunet ha realitzat sota la seva direcció la present tesi doctoral: **“Estudis farmacogenètics en el tractament del càncer colorectal”**, i que és apta per a ser defensada davant d'un tribunal per a optar al títol de Doctora en la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball ha estat realitzat al Servei de Genètica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Dra. M. Baiget  
Directora



Al Xavi i als meus pares  
pel seu suport incondicional



## **AGRAÏMENTS**

Voldria agrair a totes aquelles persones que han participat d'una o altra forma, directa o indirectament, a què aquesta tesi sigui una realitat.

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Montserrat Baiget, per haver-me donat l'oportunitat d'entrar en l'àmbit de la recerca i de realitzar aquesta tesi. Durant aquests anys en el Servei de Genètica he tingut la sort d'aprendre directament d'ella, persona considerada puntera en el món de la farmacogenètica. Així mateix gràcies a la seva empenta he pogut viure una de les millors experiències de la meua vida, com ha sigut poder disfrutar de l'estància de recerca en la Universitat de Chicago. I finalment per la coincidència d'haver dirigit la tesi a dues Brunet's, la de me mare fa 20 anys i ara la meua.

A l'Elisabeth del Río per tot el que m'ha ensenyat i pels grans moments personals i professionals que hem compartit. De totes les coses que he après gràcies a tu, hi ha una frase que sempre la recordaré: les coses només es fan d'una manera: bé! A la Lúdia Sedano per haver compartit amb mi el principi d'aquesta etapa. Al David per haver tingut la paciència d'endinsar-me en el món de l'oncologia, sempre he pogut comptar amb tu quan t'he necessitat tant a nivell professional com personal. A la Juliana per haver-me transmès la seva professionalitat i sobretot per tota l'ajuda que he rebut durant la realització de la tesi. I a tots els companys i companyes del Servei de Genètica (Eduardo Tizzano, Sara Bernal, Laura Alias, M<sup>a</sup> Jesús Barceló, Manel Baena, Eva Also, Rebeca Martínez, Pia Gallano, M<sup>a</sup> José Rodríguez, Lúdia Gonzàlez, Jonás Juan, Edgar Verdura, Eva Companys, Adriana Lasa, Arnald García, Mònica Cornet, Montserrat Domènech, Anna Cortés) cadascú de vosaltres ha contribuït d'una manera o altra a que aquesta tesi hagi sigut possible.

Al Dr. Marcuello per la seva aportació clínica en el treball i per transmetre el seu entusiasme en el camp de la farmacogenètica.

Al Prof. Francesc González Sastre per acceptar ser tutor d'aquesta tesi.

Als meus amics i amigues, perquè tot i que no han intervingut directament en el treball de la tesi, sí que hi han participat en el dia a dia durant aquests anys. En especial la Laura, que ha fet l'esforç d'escoltar-me i recolzar-me durant aquesta última etapa de la tesi.

Als meus pares, els meus referents. Al pare per tenir sempre a punt el consell més indicat en els moments més difícils, per fer-me sentir segura i dotar-me així del valor necessari per seguir. I a la mare per haver-me transmès els més alts valors, el de la força de voluntat, la perseverança i la passió per la meva feina. A tots dos, simplement per ser-hi sempre que ho he necessitat. També al meu germà, el Xavi, i a la Bet. A ells per tots els bons moments viscuts, sense els quals, res d'això valdria la pena.

A tota la meva família i en especial a l'àvia Anna, m'hagués encantat que haguessis pogut disfrutar amb mi d'aquest dia, i sé que t'haguessis sentit orgullosa.

I en especial al Xavi, per la seva ajuda durant tots aquests anys, per sempre estar al meu costat mostrant-me la part positiva en els moments difícils, per la seva comprensió i pel seu suport incondicional.



# ÍNDEX



<b>1.- INTRODUCCIÓ</b> .....	1
1.1.- La Farmacogenètica .....	3
1.2.- El Càncer Colorectal .....	4
1.2.1.- Epidemiologia .....	4
1.2.2.- Etiologia .....	4
1.2.3.- Patogènesi .....	5
1.2.4.- Diagnòstic i estadificació .....	6
1.2.5.- Factors de pronòstic .....	9
1.2.6.- Tractament del càncer colorectal localitzat .....	10
1.2.6.1.- Cirurgia .....	10
1.2.6.2.- La radioteràpia .....	11
1.2.7.- La quimioteràpia .....	11
1.2.7.1.- Tractament neoadjuvant i adjuvant .....	12
1.2.8.- Malaltia disseminada o metastàtica .....	14
1.3.- El 5-Fluorouracil: Estructura, mecanisme d'acció i metabolisme .....	16
1.3.1.- Aspectes Farmacogenètics .....	20
1.3.1.1.- El gen de la Timidilat Sintasa (TS) .....	20
1.3.1.2.- El gen de la Metilè-tetrahidrofolat reductasa (MTHFR) .....	22
1.3.1.3.- El gen de la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD) .....	24

1.4.- Els derivats del platí: Mecanisme d'acció, metabolisme .....	25
1.4.1.- Aspectes farmacogenètics .....	28
1.4.1.1.- Els gens de la via de reparació per escissió de nucleòtids (NER).....	28
1.4.1.1.1.- El gen de reparació per escissió del grup de complementació creuada 1 (ERCC1) .....	31
1.4.1.1.2.- El gen de la xeroderma pigmentosa grup D (XPD).....	32
1.4.1.2.- Els gens de la via de reparació per escissió de bases (BER) .....	33
1.4.1.2.1.- El gen de reparació per raigs X del grup de complementació creuada 1 (XRCC1) .....	35
1.4.1.3.- El gen de la glutatió-S-transferases pi 1 (GSTP1).....	36
<b>2.- HIPÒTESIS I OBJECTIUS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.- RESULTATS.....</b>	<b>41</b>
3.1.- Estudi farmacogenètic del gen de la Timidilat Sintasa: .....	43
3.1.1.- <i>Transcription factor-binding sites in the thymidylate                 synthase gene: predictors of outcome in patients with                 metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and                 oxaliplatin?</i> .....	43

3.2.- Estudi farmacogenètic del gen de la dihidropirimidina deshidrogenasa: .....	55
3.2.1.- <i>Absence of large intragenic rearrangements in the DPYD gene in large cohort of colorectal cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy.</i> .....	55
3.3.- Estudi farmacogenètic dels gens implicats en els mecanismes de reparació de l'ADN: .....	65
3.3.1.- <i>Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy.</i> .....	65
<b>4.- DISCUSSIÓ</b> .....	<b>77</b>
4.1.- Aspectes farmacogenètics del tractament amb 5-FU. ....	79
4.1.1.- El gen de la Timidilat Sintasa (TS).....	79
4.1.2.- El gen de la Metilè-tetrahidrofolat reductasa (MTHFR) .....	82
4.1.3.- El gen de la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD).....	84
4.2.- Aspectes farmacogenètics del tractament amb derivats del platí .....	85
4.2.1.- La via NER de reparació de l'ADN.....	86
4.2.2.- La via BER de reparació de l'ADN.....	91
4.2.3.- La glutatió-s-transferasa pi 1 (GSTP1) .....	93
<b>5.- CONCLUSIONS</b> .....	<b>95</b>

<b>6.- ANNEX.....</b>	<b>99</b>
<b>7.- MATERIAL DERIVAT DELS TREBALLS DE LA TESIS .....</b>	<b>103</b>
<b>8.- FINANÇAMENT REBUT PELS TREBALLS DE LA TESIS .....</b>	<b>109</b>
<b>9.- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>113</b>

# **1.- INTRODUCCIÓ**





## **1.1.- La Farmacogenètica**

Fa més de 50 anys que Watson i Crick van descobrir l'estructura de l'ADN (àcid desoxirribonucleïc) [WATSON and CRICK, 1953] i més de 5 anys que es va publicar la seqüència del genoma humà [Collins *et al*, 2003]. Gràcies al progrés en el coneixement i als grans avenços tecnològics en aquest àmbit, s'han donat passos cap a l'aplicació d'aquests avenços en la pràctica clínica. Si bé, en un primer moment només eren expectatives, ben aviat esdevingueren realitats útils en el diagnòstic i tractament de determinades patologies.

A l'any 1959 Fredrich Vogel utilitzà per primera vegada el terme farmacogenètica, per designar el paper de les variants genètiques en la resposta individual al tractament [Vogel, 1959]. En la dècada dels 80 es va demostrar la importància de determinats polimorfismes genètics en el perfil farmacocinètic d'alguns fàrmacs. A principis de 2007 la EMA (Agència Europea del Medicament) va definir la *farmacogenòmica* com l'estudi de les variacions de l'ADN i de l'ARN en relació amb la resposta als fàrmacs i la *farmacogenètica* com la part de la farmacogenòmica que estudia la influència que tenen les variacions en la seqüència de l'ADN sobre la resposta als fàrmacs.

Es calcula que els genomes de dues persones només es diferencien en un 0.1% del total de les bases nucleotídiques que els formen. És aquesta diferència, quantitativament tan petita, la que fa únic a cada individu. Naturalment, les diferències en la resposta a un medicament s'hauran de poder explicar en aquest context d'individualitat. En el genoma humà, aproximadament un nucleòtid de cada mil és polimòrfic i aquest fet és el que es coneix com a polimorfisme d'un sol nucleòtid (*single nucleotide polymorphism* o SNP). Si tenim en compte els 3.200 milions de nucleòtids que hi ha en el genoma humà, això es tradueix en un total de

3,2 milions de SNPs que, teòricament, poden utilitzar-se com a marcadors farmacogenètics.

Amb la introducció de la farmacogenètica es planteja la substitució del actual sistema “assaig i error” en la selecció i dosificació dels medicaments per una altra metodologia en la que amb la determinació del genotip del pacient es pugui avaluar quin fàrmac i en quines dosis s’assolirà el balanç més adequat entre el seu nivell d’eficàcia i el risc de provocar reaccions adverses.

## **1.2.- El Càncer Colorectal**

### **1.2.1.- Epidemiologia**

El càncer colorectal (CCR) és una malaltia amb una alta incidència i una alta mortalitat. Als Estats Units, a l’any 2009, es van diagnosticar més de 140.000 casos nous i es van registrar al voltant de 50.000 morts pel càncer colorectal [National Cancer Institute, 2009].

A Espanya cada any es diagnostiquen més de 25.000 nous casos que representen el 15% de tots els tumors. A Catalunya, la seva incidència és de 16.984 casos l’any en els homes i de 12.078 en les dones, i es diagnostiquen més de 5.600 casos de CCR nous cada any [Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, 2010].

### **1.2.2.- Etiologia**

El 85-90% dels casos de CCR són de tipus esporàdic que estan condicionats pel sexe, factors genètics, factors hormonals, història familiar i factors ambientals (dieta amb baix contingut de fibra vegetal i alt contingut de grasses, obesitat, sedentarisme, tabaquisme i consum de begudes alcohòliques).

Només un 10% dels casos de CCR corresponen a síndromes familiars. Dins de les neoplàsies hereditàries destaquen dos tipus de síndromes diferents: l'associat a la poliposis múltiple familiar (*Familiar Adenomatous Polyposis*, FAP) i el no associat a la poliposis familiar (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*, HNPCC).

### 1.2.3.- Patogènesi

Les característiques de les cèl·lules neoplàsiques es resumeixen en: autosuficiència de senyals de creixement positives, insensibilitat a senyals negatives, resistència a l'apoptosi, capacitat proliferativa il·limitada, capacitat de generar nous vasos, capacitat d'invasió local i producció de metàstasi a distància [Hanahan and Weinberg, 2000]. Aquestes característiques són el resultat d'alteracions genètiques i per a què aquestes s'acumulin, és necessari que es doni inestabilitat genètica al llarg de la progressió tumoral o en períodes concrets de la progressió.

Per a què una cèl·lula de l'epiteli colònic es converteixi en tumoral és necessari que s'acumulin un número limitat (5-8) d'alteracions genètiques tant en oncogens (responsables de la proliferació cel·lular) com en gens supressors tumorals (controlen el creixement cel·lular). Per tant, podem explicar la oncogènesi colorectal a través de dues vies diferents:

1.- La via supressora de tumors és la responsable del 85% dels càncers colorectals esporàdics i és el mecanisme que es dona en els pacients amb FAP. Aquests tumors presenten freqüentment pèrdua d'heterozigositat (LOH), així com mutacions que activen a oncogens i inactiven o bloquegen a gens supressors tumorals. En el cas del càncer de colon, l'oncogen KRAS i els gens supressors tumorals APC (*Adenomatous polyposis coli*) i p53 apareixen mutats freqüentment.

2.- La via mutadora es caracteritza per la presència de mutacions o canvis epigenètics en els gens reparadors de l'ADN que mantenen

l'estabilitat genètica en condicions normals. Es manifesta per l'acumulació d'errors de replicació en una sèrie de seqüències repetitives no codificants del genoma denominades microsatèl·lits. Pertanyen a aquesta via els càncers esporàdics de colon (15%) i els HNPCC.

#### **1.2.4.- Diagnòstic i estadificació**

Les manifestacions clíniques més freqüents al diagnòstic del CCR són: les alteracions dins de l'hàbit intestinal, el dolor abdominal, les rectorràgies i l'oclusió intestinal.

L'examen clínic complet és fonamental per l'avaluació de qualsevol pacient. S'han de realitzar diverses proves diagnòstiques, entre les quals s'inclouen:

- Examen físic complet, que inclogui un tacte rectal
- Hemograma i bioquímica hemàtica amb test de funció hepàtica i renal.
- Colonoscòpia amb biopsia.
- Nivells sèrics de l'antigen carcinoembrionari (CEA)
- Estudis radiològics amb contrast (Enema opac)
- TAC (tomografia axial computeritzada)

El sistema de classificació de TNM és un dels sistemes més usats pel diagnòstic del CCR actualment. Aquest sistema ha sigut acceptat i mantingut per la AJCC (American Joint Committee on Cancer) i la UICC (International Union Against Cancer). Aquesta classificació va ser desenvolupada com a eina bàsica per estadiar diferents tipus de càncer a partir d'uns criteris estàndards. La mateixa classificació s'utilitza tant per l'estadificació clínica com per la patològica [Edge *et al*, 2010].

El sistema TNM està basat en l'extensió del tumor (T), el grau de disseminació als ganglis limfàtics (N) i la presència de metàstasi (M) a

distància. Se li afegeix un número a cada lletra per indicar l'extensió del tumor i el grau de disseminació del càncer.

La categoria T descriu al tumor primari.

TX	El tumor primari no es pot avaluar
T0	No hi ha evidència de tumor primari
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial o invasió de la làmina pròpia
T1	El tumor invaeix la submucosa
T2	El tumor invaeix la <i>muscularis pròpia</i>
T3	El tumor invaeix a través de la <i>muscularis pròpia</i> fins als teixits pericorectals
T4a	El tumor penetra la superfície del peritoneu visceral
T4b	El tumor invaeix directament o s'adhereix a altres òrgans o estructures

La categoria N descriu si el càncer s'ha estès o no a ganglis limfàtics propers.

NX	No es poden avaluar els ganglis limfàtics regionals
N0	No hi ha metastasi en els ganglis limfàtics regionals
N1	Existeixen metastasis en 1 a 3 ganglis limfàtics regionals
N1a	Existeix metastasi en un gangli limfàtic regional
N1b	Existeixen metastasis en 2 a 3 ganglis limfàtics regionals
N1c	Hi ha dipòsit(s) tumoral(s) en la subserosa o en els teixits mesentèrics o pericòlics no peritonealitzats, o en els teixits perirectals, sense metastasi ganglionar regional
N2	Existeixen metastasis en $\geq 4$ ganglis limfàtics regionals
N2a	Existeixen metastasis en 4 a 6 ganglis limfàtics regionals
N2b	Existeixen metastasis en $\geq 7$ ganglis limfàtics regionals

La categoria M descriu si hi ha metàstasi a distància

MX	No és possible avaluar una metàstasi a distància
M0	No existeix metàstasi a distància
M1	Presència de metàstasis a distància
M1a	La metàstasi està confinada a un òrgan o lloc (és a dir, fetge, pulmó, ovari, gangli no regional)
M1b	Existeixen metàstasis en > 1 òrgan o lloc, o al peritoneu

D'acord amb les categories T, N i M el CCR es classifica en diferents estadis de pronòstic.

<b>Estadi</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Qualsevol T	Qualsevol N	M1a
IVB	Qualsevol T	Qualsevol N	M1b

### 1.2.5.- Factors de pronòstic

- Sistema d'estadificació TNM. El pronòstic pels pacients de CCR està clarament relacionat amb el grau de penetració del tumor a través de la paret intestinal, la presència o absència de ganglis, i la presència o absència de metàstasi a distància.
- El grau histològic influeix significativament en la supervivència, independentment de l'estadi. Els pacients amb carcinomes ben diferenciats (grau 1 i 2) tenen una millor supervivència als 5 anys que aquells amb carcinomes poc diferenciats (grau 3-4).
- La localització anatòmica del tumor es considera com un possible factor pronòstic independent. Per iguals estadis, pacients amb tumor de recte tenen un pitjor pronòstic que aquells amb tumor de còlon. I aquells pacients amb tumors de colon descendent tenen pitjor pronòstic que els que tenen tumors de còlon ascendents o rectosigmoides.
- Aspectes clínics. L'obstrucció intestinal o perforació s'associa a pitjor pronòstic.
- Alteracions citogenètiques. La pèrdua al·lèlica del cromosoma 18q està associada a un pitjor pronòstic. Altres anomalies que han estat identificades com a potencialment valuoses en determinar el pronòstic estan localitzades en els cromosomes 1, 5, 8, 17 i 22.

A l'any 2002, Köhne *et al.* van realitzar un estudi amb 3.825 pacients per tal d'identificar determinants clínics que estiguessin relacionats amb el pronòstic dels pacients amb CCR avançat tractats amb quimioteràpia basada en el 5-fluorouracil (5-FU). En aquest treball es classifiquen els pacients en tres grups de risc pronòstic en funció de quatre paràmetres clínics: estat general, recompte de leucòcits, fosfatasa alcalina i nombre de llocs metastàtics.

Els 3 grups pronòstics són:

- Risc baix: ECOG (*Eastern Cooperative Oncologic Group*, escala pràctica per mesurar la qualitat de vida del pacient) 0-1 i només una localització metastàtica.
- Risc intermedi: ECOG 0-1, més d'una localització metastàtica i fosfatasa alcalina < 300 U/l ó pacients de ECOG >1, recompte de leucòcits <10 x10<sup>9</sup> /l i una sola localització metastàtica.
- Risc alt: ECOG 0-1, més d'una localització metastàtica, i fosfatasa alcalina ≥ 300 U/l ó pacients amb ECOG >1, més d'una localització metastàtica o recompte de leucòcits > 10 x10<sup>9</sup> /l.

## **1.2.6.- Tractament del càncer colorectal localitzat**

### **1.2.6.1.- Cirurgia**

La cirurgia és la forma més acceptada com a potencialment curativa en el càncer colorectal. Les tècniques quirúrgiques convencionals són: hemicolectomia pel còlon dret, transvers, esquerre i l'angle esplènic; sigmoidectomia pel còlon sigmoide; i l'extirpació anterior alta del recte per la zona d'unió còlon-recte. La cirurgia ha d'extirpar el tumor amb amplis marges i maximitzar la limfadenectomia regional, per a què almenys 12 ganglis limfàtics estiguin disponibles per l'avaluació patològica. Les tècniques laparoscòpiques donen resultats similars en quant a l'eficàcia i, a la vegada, són unes tècniques menys invasives.

En el càncer de recte una de les principals limitacions de la cirurgia rectal és la incapacitat d'obtenir marges amplis. Es considera adequada la resecció del tumor amb un mínim 5 cm de marge, tot i que la lligadura dels vasos dels troncs vasculars necessaris per a realitzar una limfadenectomia adequada pot requerir grans reseccions intestinals. En els últims anys, la



tècnica de l'escissió total del mesorrecte ha disminuït de forma significativa les taxes de recurrència local de la malaltia [Weltz *et al*, 2005].

### **1.2.6.2.- La radioteràpia**

La radioteràpia és un tractament pel càncer en el que s'utilitzen raigs X d'alta energia o altres tipus de radiació per destruir cèl·lules cancerígenes o impedir que aquestes cèl·lules creixin.

Tot i que la radioteràpia no és eficaç com a tractament primari del càncer de còlon, en els últims anys, el tractament mitjançant quimioradioteràpia preoperatoria ha sigut acceptat com a tractament estàndard en el càncer rectal localment avançat. Aquest abordatge permet disminuir la incidència de recurrències locals en un 50% dels casos, augmentant el percentatge de reseccions conservadores [Sauer *et al*, 2004].

### **1.2.7.- La quimioteràpia**

En els últims anys s'han obtingut avenços importants en la quimioteràpia del càncer colorectal tant en el tractament de la malaltia metastàtica com en la teràpia adjuvant. Després de les quasi 4 dècades en les que el 5-fluorouracil va ser l'únic agent quimioterapèutic disponible, el desenvolupament d'altres agents citotòxics com l'Irinotecan i l'Oxaliplatí han millorat significativament els resultats terapèutics i la supervivència dels pacients amb CCR. A més el desenvolupament de les fluoropirimidines orals han mostrat una eficàcia comparable al 5-FU intravenós i també una menor toxicitat general.

D'altra banda, diversos anticossos monoclonals dirigits contra el factor de creixement vascular endotelial (Bevacizumab) o contra el receptor del factor de creixement epidèrmic (Cetuximab, Panitumumab) s'han introduït recentment en el tractament del CCR.

### **1.2.7.1.- Tractament neoadjuvant i adjuvant**

#### **Neoadjuvant**

A causa dels límits anatòmics dels ossos de la pelvis i de l'os sacre, els cirurgians sovint no poden aconseguir marges amplis lliures de tumor durant la resecció del càncer rectal. Gairebé la meitat de les recurrències del càncer de recte es troben a la pelvis. Els resultats dels assajos clínics randomitzats demostren que la combinació de quimioteràpia i radioteràpia preoperatòria aconseguen un millor control local del tumor que la quimioradioteràpia postoperatoria [Sauer *et al*, 2004].

La infusió continua de 5-FU és menys tòxica que el bolus de 5-FU dins del tractament combinat de quimioteràpia i radioteràpia en tumors de recte localment avançats. Aquest esquema de tractament ha esdevingut com a teràpia estàndard en el tumor de recte localitzat degut a la seva eficàcia, en termes de millora de risc de recaiguda, i de supervivència global [Arbman *et al*, 1996, O'Connell *et al*, 1994].

Una alternativa acceptada al tractament d'infusió continua de 5-FU és la capecitabina, derivat del 5-FU que es pot administrar per via oral [Velenik *et al*, 2006].

#### **Adjuvant**

El 5-FU va ser el primer fàrmac que va demostrar un benefici en termes de supervivència *versus* la cirurgia sola com a part del tractament adjuvant en el càncer de còlon. Amb aquest tractament s'aconseguia un augment de la supervivència lliure de malaltia (SLM) del 61% (cirurgia sola) al 67% (cirurgia més 5-FU) [IMPACT, 1995, André *et al*, 2003, Twelves *et al*, 2005, Lembersky *et al*, 2006, O'Connell *et al*, 1997, Haller *et al*, 2005, André *et al*, 2007].

Als anys 90, la quimioteràpia adjuvant pel càncer de còlon en estadi III amb 5-FU més levamisol (principalment d'interès històric) o 5-FU més leucovorin (FU/Lv) reduïa la incidència de recurrència en un 41% ( $p < 0,001$ ) en un gran nombre d'assajos clínics randomitzats. L'estudi MOSAIC realitzat a Europa contava amb 2.200 pacients randomitzats (40% en estadi II, el 60% en estadi III) que rebien infusió de 5-FU i leucovorin amb o sense oxaliplatí (FOLFOX). L'objectiu principal d'aquest assaig era analitzar la supervivència lliure de malaltia a 3 anys. Els resultats van mostrar una supervivència lliure de malaltia del 73% a 3 anys per la branca de tractament estàndard amb 5-FU/L, comparat amb el 78% amb el règim FOLFOX. Aquest benefici, obtingut amb el règim FOLFOX, era de fins a un 7,5% quan es consideraven només els pacients amb estadi III. Les dades presentades recentment demostren un benefici del 2,6% en la supervivència global a 6 anys amb FOLFOX i d'un 4,4% si només es consideren els pacients amb estadi III [Casciato and Territo, 2009].

Com a conseqüència, el tractament estàndard pel càncer de còlon en estadi III és un règim que conté oxaliplatí, més conegut com a FOLFOX. Exceptuant que existeixin cotraindicacions en el seu ús, com per exemple, una neuropatia sensorial preexistent [Casciato and Territo, 2009].

D'altra banda, el tractament adjuvant amb quimioteràpia en l'estadi II és controvertit. Alguns assajos clínics han demostrat les millores de supervivència global i lliure de malaltia de pacients tractats amb quimioteràpia adjuvant, però no en tots ells [Chau *et al*, 2005, Goldberg *et al*, 2006, Haller *et al*, 2005, De Placido *et al*, 2005, Tyagi *et al*, 2005, Smith *et al*, 2004, André *et al*, 2004, Lembersky *et al*, 2006, Moertel *et al*, 1995, IMPACT B2 *et al*, 1999, O'Connell *et al*, 2006, Figueredo *et al*, 2004]. Un meta-anàlisi publicat a l'any 2004 va concloure que no hi havia proves de què la quimioteràpia adjuvant ofereixi beneficis [Figueredo *et al*, 2004]. Mentre que un assaig clínic recent de 3.239 pacients amb càncer colorectal en estadi II mostra una millora del 3,6% estadísticament significativa en la supervivència

global als 5 anys en pacients tractats amb quimioteràpia adjuvant en comparació amb aquells que no van rebre cap tractament [Quasar collaborative group *et al*, 2007].

En definitiva, en aquest grup de pacients amb estadi II tractats amb ganglis negatius i amb resecció òptima (almenys 12 ganglis limfàtics avaluats) s'ha d'informar de les limitacions del tractament amb quimioteràpia adjuvant amb 5-FU i leucovorin i de que el benefici terapèutic potencial és baix i és possible fins i tot que no existeixi, oferint millores d'entre el 0% i 3.6% en termes de supervivència als 5 anys.

### **1.2.8.- Malaltia disseminada o metastàtica**

El fàrmac més àmpliament utilitzat des de la dècada dels 50 en el tractament quimioteràpic dels pacients amb CCR avançat ha estat el 5-fluorouracil. La quimioteràpia sistèmica en el càncer colorectal metastàtic (CCRm) té com a objectiu controlar els símptomes, augmentar el període de supervivència lliure de progrés (SLP) i la supervivència global (SG).

La introducció d'altres fàrmacs als règims de tractament convencional ha permès millorar el curs d'aquesta neoplàsia. Un d'ells, l'Irinotecan o CPT11, s'utilitza actualment en primera i segona línia de tractament sistèmic del càncer metastàtic, ja sigui en monoteràpia o combinat amb el 5-FU i àcid fòlic (leucovorin). S'ha demostrat que els pacients que reben CPT11 tenen una taxa de resposta significativament més alta que els tractats amb règims estàndard, el que es tradueix en una millora de l'interval lliure de progressió de la malaltia i una major supervivència global.

El tractament combinat d'Irinotecan (CPT11) amb 5-FU que es coneix com a règim (FOLFIRI en infusió intravenosa, s'ha demostrat eficaç en el CCR i va ser aprovat per la FDA (Food and Drug Administration) com a tractament de primera línia l'any 1996.

La introducció de l'Oxaliplatí (OX) dins dels esquemes de tractament ha suposat un important avanç en la teràpia del CCR. Existeix un efecte sinèrgic en el tractament combinat de 5-FU/lecovorin i OX (FOLFOX) aconseguint una taxa de resposta superior al 50% en el tractament de primera línia.

Aquests esquemes de quimioteràpia utilitzats de manera seqüencial (FOLFOX-FOLFIRI) en primera i segona línia aconsegueixen una major supervivència i un major percentatge de malalts subsidiaris de cirurgia secundària per reseccionar metàstasis hepàtiques considerades no resecables abans de la quimioteràpia.

En els darrers anys s'han desenvolupat nous agents quimioteràpics destinats a millorar l'eficàcia dels fàrmacs ja existents:

- Bevacizumab és un anticòs monoclonal humanitzat que bloqueja el factor de creixement vascular endotelial (VEGF) implicat en el mecanisme de l'angiogènesi. Diversos assajos clínics de fase II/III en pacients amb CCR metastàtic han demostrat que l'addició d'aquest nou agent antiangiogènic als règims estàndards de primera línia de quimioteràpia basada en 5-FU millora la supervivència global, la supervivència lliure de progressió i les taxes de resposta en comparació amb la quimioteràpia sola [Hurwitz *et al*, 2004, Kabbinavar *et al*, 2005, Saltz *et al*, 2007].
- Cetuximab és un anticòs monoclonal IgG1 que té la seva diana en el domini extracel·lular del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR). Aquest medicament és eficaç en pacients amb càncer colorectal metastàtic refractari a quimioteràpia. Recentment, l'assaig clínic fase III CRYSTAL ha demostrat que el tractament de primera línia amb cetuximab més FOLFIRI redueix el risc de progressió de càncer colorectal metastàtic en comparació al tractament amb

FOLFIRI sol. Aquest estudi també desmostra que el benefici del cetuximab és limitat a pacients amb tumors amb el oncogen KRAS no mutat [Van Cutsem *et al*, 2009]. Les mutacions en el gen KRAS, que es troben en un 40% dels pacients amb CCR avançat, indueixen l'activació de forma constitutiva de la proteïna KRAS, que provoca una senyalització continua amb independència de si l'EGFR està inhibit.

- Panitumumab és un anticòs monoclonal IgG2 totalment humà i també té com a diana el EGFR. El Panitumumab va ser aprovat en monoteràpia en pacients amb tumor KRAS no mutat després del fracàs al tractament amb fluoropirimidines, oxaliplatí i règim basat en Irinotecan [Amado *et al*, 2008].

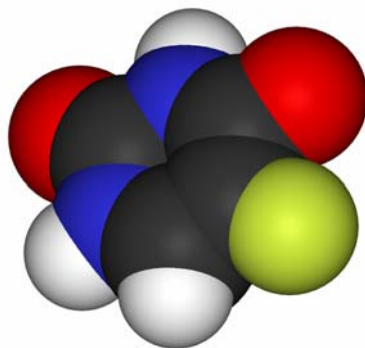
### **1.3.- El 5-Fluorouracil: Estructura, mecanisme d'acció i metabolisme**

El 5-fluorouracil és un agent quimioteràpic disponible des de fa 60 anys i continua sent un dels fàrmacs més utilitzats en el tractament de tumors sòlids com els càncers colorectal, gàstric, esofàgic, de mama i de cap i coll [Grem, 2000].

El 5-FU és una fluoropirimidina que pertany a la família dels fàrmacs antimetabòlits. Aquests fàrmacs són anàlegs d'un substrat metabòlic natural de la cèl·lula que actuen durant la síntesis de l'ADN i ARN. En concret, el 5-FU és un anàleg de la base pirimidínica uracil, en la que es substitueix un àtom d'hidrogen en la posició 5' de l'anell de pirimidina per un àtom de fluor.

La fórmula química del 5-FU és  $C_4H_3FN_2O_2$  i el seu pes molecular és de 130.077 g/mol (Figura 1).

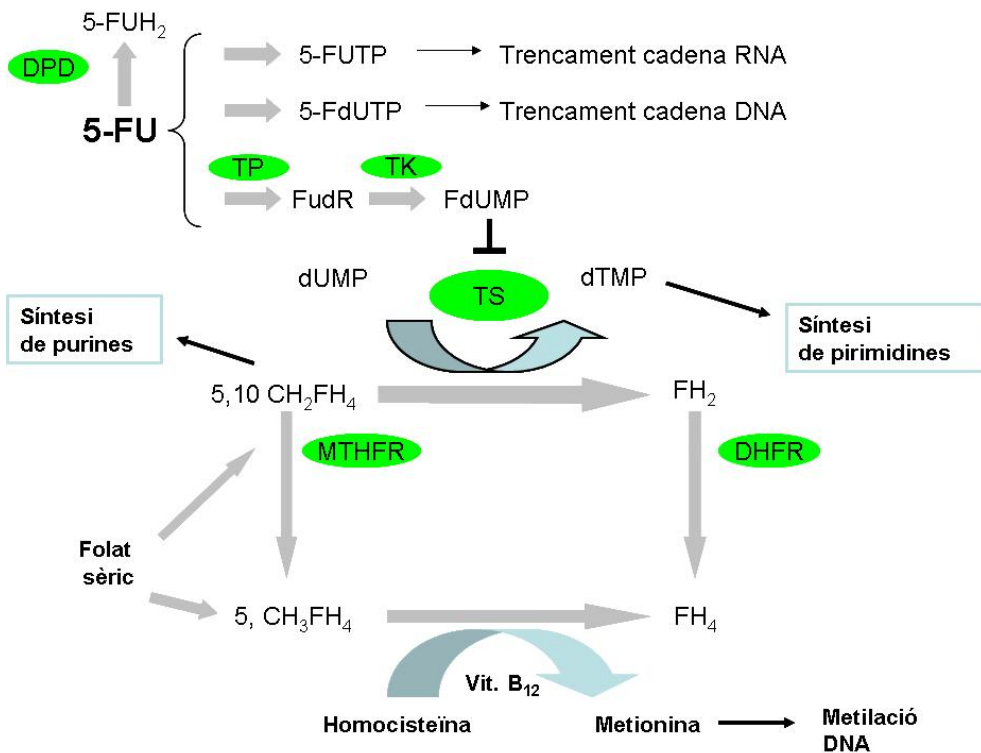
*Figura 1. Estructura del 5- fluorouracil. Els àtoms d'hidrogen en gris, els àtoms de carboni en negre, els àtoms de nitrogen en blau, els àtoms d'oxigen en vermell i en verd l'àtom de fluor.*



El 5-FU entra a la cèl·lula pel mateix mecanisme de difusió facilitada que utilitza l'uracil [Gorlick and Bertino, 1999]. Aproximadament el 80% del 5-FU és transformat a una forma inactiva (5-FUH<sub>2</sub>) per l'acció d'un enzim clau en el metabolisme del fàrmac: la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD).

El 20% de 5-FU residual es metabolitza a la seva forma activa, 5-fluoro-2'-deoxiuridin-5'monofosfat (FdUMP), utilitzant els enzims de la via de síntesis dels precursors d'àcids nucleïcs. L'enzim timidina fosforilasa (TP) catalitza la conversió de 5-FU a 5-fluorodeoxiuridina (FudR) que, posteriorment, és fosforil·lada per la timidina quinasa (TK) a FdUMP (Figura 2).

Figura 2. Metabolisme del 5-FU. Nomenclatura: 5-FUH<sub>2</sub>: 5-fluoro-5,6-dihidrouracil; DPD: dihidropirimidina deshidrogenasa; FdUMP: 5-fluoro-2'-deoxiuridin-5'-monofosfat; TP: timidina fosforilasa; FudR: 5-fluorodeoxiuridina; TK: timidina quinasa; TS: Timidilat Sintasa; dUMP: 2'-deoxiuridin-5'-monofosfat; dTMP: desoxitimidina-5'-monofosfat; dTTP: deoxitimidina-5'-trifosfat; dUTP: desoxiuridina-5'-trifosfat; 5-FdUTP: 5-fluorodesoxiuridina trifosfat; 5-FUTP: 5-fluorouridina trifosfat; FudR: 5-fluorodeoxiuridina; CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>: 5,10-metilè-tetrahidrofolat; MTHFR: metilè-tetrahidrofolat reductasa; 5, 10 CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>: 5,10-metilè-tetrahidrofolat; 5, CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub>: 5- metiltetrahidrofolat.



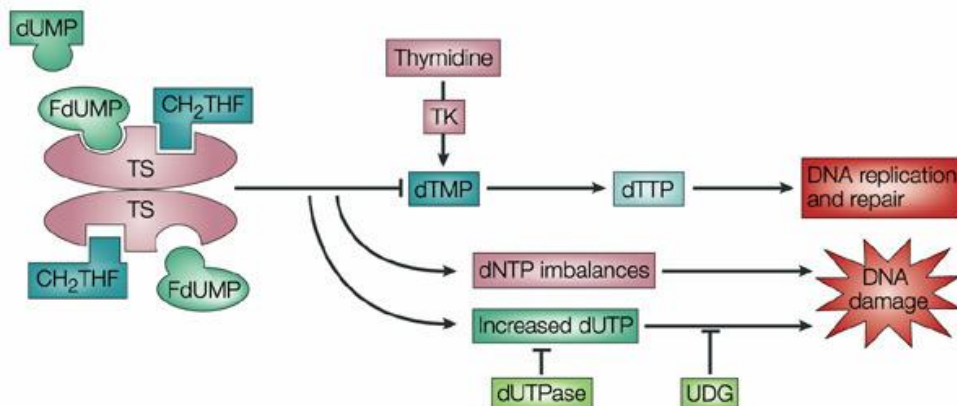
L'acció principal del 5-FU és la inhibició de la Timidilat Sintasa (TS, de l'anglès thymidylate synthase) que catalitza la síntesi del desoxitimidina-5'-monofosfat (dTMP) a partir de dUMP. La inhibició d'aquest enzim la porta a terme el metabòlit actiu del 5-FU, el FdUMP, que



compeix amb el substracte natural 2'-deoxiuridin-5'-monofosfat (dUMP) per formar un complex ternari estable amb la TS i el cofactor  $\text{CH}_2\text{THF}_4$  [Santi *et al*, 1974] (Figura 3).

La inhibició de la TS comporta una disminució en el nivell de dTMP i, per consegüent, de deoxitimidina-5'-trifosfat (dTTP) i l'acumulació indirecta de dUMP. Això resulta en la incorporació de desoxiuridina-5'-trifosfat (dUTP) en l'ADN degut a l'absència del substrat natural dTTP, conduint finalment a una inhibició de la síntesis de l'ADN i la subsegüent inducció de la mort cel·lular (Figura 3).

Figura 3. Esquema de la inhibició de la TS. (*Nature Reviews Cancer* 3,2003;330-338).



El 5-FU es metabolitza, addicionalment, cap a dues altres formes, la 5-fluorodesoxiuridina trifosfat (5-FdUTP) i la 5-fluorouridina trifosfat (5-FUTP). Aquestes actuen com falses bases incorporant-se en l'ADN i l'ARN, procés que condueix també a la mort cel·lular (Figura 2).

### 1.3.1.- Aspectes Farmacogenètics

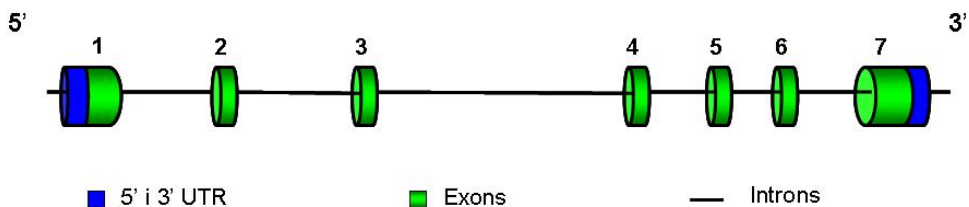
Els factors més rellevants en l'ús clínic del 5-FU des del punt de vista farmacogenètic, abarquen la gran variabilitat intraindividual i interindividual en la farmacocinètica, l'índex terapèutic estret i el paper important que tenen els enzims timidilat sintasa (TS), metilè-tetrahidrofolat reductasa (MTHFR) i dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD). A continuació s'introdueixen les característiques més destacades de cadascun dels gens d'aquests enzims.

#### 1.3.1.1.- El gen de la Timidilat Sintasa (TS)

La timidilat sintasa és la diana farmacològica del 5-FU. És un enzim citosòlic amb una estructura dimèrica amb dues subunitats idèntiques d'aproximadament 38.5 KDa. La TS té un paper clau en el metabolisme de l'àcid fòlic i catalitza la metilació reductiva de desoxiuridina-5'-monosfosfat (dUMP) a desoxitimidina-5'-monofosfat (dTMP), en presència del cofactor de folats reduïts, metilè-tetrahidrofolat ( $\text{CH}_2\text{THF}_4$ ), que actua com a grup donador de metils. Aquesta reacció és la única font "de novo" de dTMP, nucleòtid indispensable per a la síntesi d'ADN.

El gen de la TS localitzat en el cromosoma 18p, conté 7 exons i ocupa unes 15,84 Kb de l'ADN genòmic (Figura 4).

Figura 4. Esquema del gen de la TS.

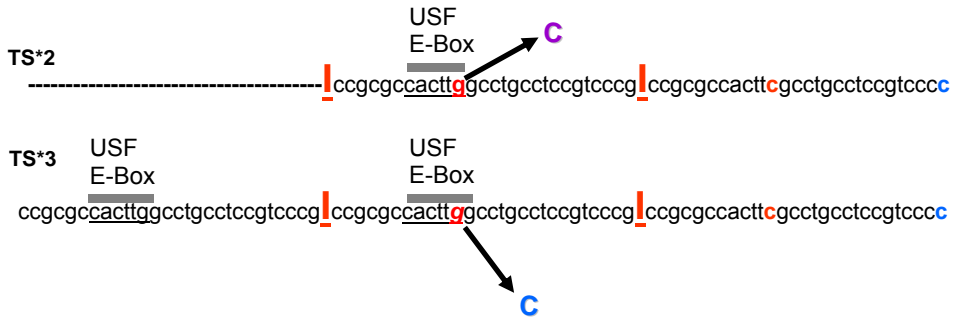


En la regió promotora del gen de la TS s'han descrit tres polimorfismes funcionals. El primer d'ells consisteix en un número variable de repeticions en tandem o VNTR (de l'anglès Variable Number of Tandem Repeats) de 28 parells de bases (pb). Tot i que s'han descrit al·lells que contenen dos, tres, quatre, cinc i fins a nou repeticions de la seqüència de VNTR, els al·lells amb dos (TS\*2) i tres (TS\*3) repeticions són els més freqüents. Experiments *in vitro* realitzats mitjançant l'assaig de luciferasa han demostrat que l'al·lel TS\*3 presenta una activitat enzimàtica superior respecte a la de l'al·lel TS\*2 [Horie *et al*, 1995]. A més, existeix una associació entre el polimorfisme VNTR i els nivells d'expressió de la TS, aquests resultats s'obtenen probablement per una major eficiència en la traducció del gen que conté al·lells amb TS\*3 [Kawakami *et al*, 1999, Kawakami *et al*, 2001]. Aquestes VNTR contenen seqüències consens de la família de factors de transcripció USF E-box (CACTTG). L'al·lel TS\*3 conté dues seqüències consens de la família USF E-box, mentre que l'al·lel TS\*2 només conté una d'aquestes seqüències.

El segon polimorfisme descrit per Mandola *et al.* és un SNP que consisteix en una substitució de G>C en el 12è nucleòtid de la segona repetició en l'al·lel TS\*3. Aquestes substitucions polimòrfiques G>C canvien el residu crític en la seqüència consens de la família USF E-Box, eliminant o creant el domini d'unió a USF-1 i alterant l'activitat transcripcional (Figura 5) [Mandola *et al*, 2003]. Kawakami *et al.* van confirmar la presència del polimorfisme G>C i van classificar cada al·lel com \*2G, \*2C, \*3G i \*3C en concordança amb la combinació del polimorfisme i el VNTR [Kawakami and Watanabe, 2003].

Recentment s'ha descrit l'existència d'un tercer polimorfisme en la regió promotora molt poc freqüent en l'al·lel TS\*2, que consisteix en un canvi de base de G>C en el 12è nucleòtid de la primera repetició de 28 parells de base (pb) [Gusella *et al*, 2006].

Figura 5. Estructura de la regió promotora del gen TS.



En la regió 3' UTR del gen TS, s'ha descrit un altre polimorfisme freqüent que consisteix en la deleció de 6 pb en la posició 1494 (TTAAAG). Aquest polimorfisme es va indentificar fent una recerca a la base de dades pública "Expressed Sequence Tag" (EST) [Ulrich *et al*, 2000]. S'ha descrit que aquesta variació genètica causa inestabilitat en l'ARNm i està associada amb una disminució dels nivells intratumorals del ARNm de la TS [Mandola *et al*, 2004].

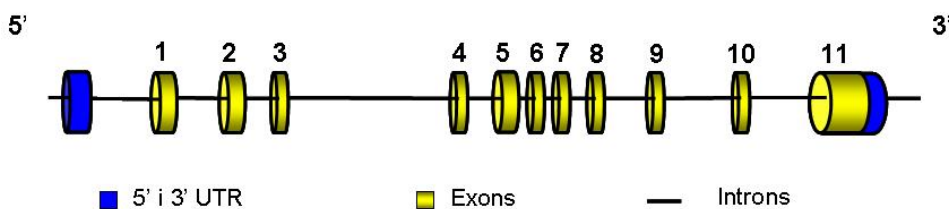
### 1.3.1.2.- El gen de la Metilè-tetrahidrofolat reductasa (MTHFR)

La concentració intracel·lular de 5,10-metilè-tetrahidrofolat ( $\text{CH}_2\text{FH}_4$ ) està regulada per l'activitat de la metilè-tetrahidrofolat reductasa. Aquest enzim participa en la regulació dels nivells de folat intracel·lular (essencial per la síntesis de proteïnes i àcids nucleïcs) i catalitza la conversió irreversible de 5,10-metilè-tetrahidrofolat ( $5,10 \text{ CH}_2\text{FH}_4$ ) a 5-metiltetrahidrofolat ( $5, \text{CH}_3\text{FH}_4$ ), que actua com a donador de radicals metil (Figura 2).

El gen MTHFR es troba localitzat en el cromosoma 1p, i conté 11 exons [Goyette *et al*, 1998] (Figura 6). S'han descrit varis polimorfismes en

aquest gen. El polimorfisme més freqüent consisteix en la transició de C>T en la posició 677, en l'exó 4 (codó 222), que dona lloc a una substitució d'alanina per valina en un domini al que se li ha atribuït activitat catalítica [Frosst *et al*, 1995]. Aquest polimorfisme està associat a una baixa activitat enzimàtica i a valors de folat alterats. La variant T provoca un augment en la termolabilitat de l'enzim que comporta una reducció de l'activitat d'un 70% en els individus homozigots i d'un 30% en els heterozigots. En la població caucàsica la freqüència d'homozigots mutats és del 10-16% [Ueland *et al*, 2001, Wiemels *et al*, 2001].

Figura 6. Esquema del gen de la MTHFR



El segon polimorfisme més freqüent en el gen MTHFR és la transició de A>C en la posició 1298, en l'exó 7 (Codó 428), que resulta en la substitució d'àcid glutàmic per alanina en un domini proteic probablement regulador [van der Put *et al*, 1998]. La variant C també comporta una reducció de l'activitat enzimàtica. La freqüència dels homozigots CC és del 12% en població caucàsica [Wiemels *et al*, 2001]. Els estudis efectuats en la població espanyola confirmen aquestes freqüències [Martinez-Frias *et al*, 2008]. Els individus que són heterozigots per aquestes dues variants (677T i 1298C) tenen una reducció del 40-50% de l'activitat del gen MTHFR i un perfil bioquímic semblant al observat en els homozigots 677T (Taula 1).

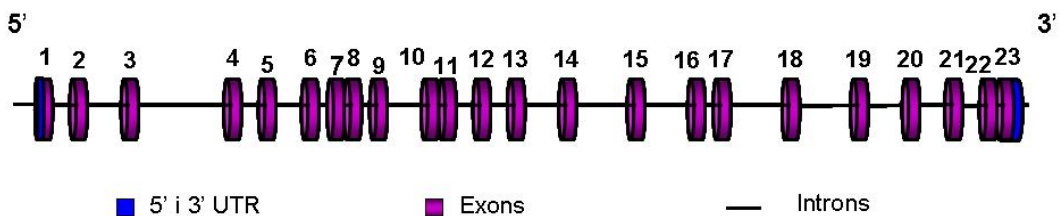
Taula 1. Polimorfismes freqüents del gen MTHFR i la seva relació amb l'activitat enzimàtica.

SNP	Canvi aa		Activitat enzimàtica
677 C>T	A222V	Heterozigots	35% reducció
		Homozigots	70% reducció
1298 A>C	E428A	Heterozigots	Reducció
		Homozigots	Reducció
		Heterozigots per ambdós al·lels	40-50% reducció

### 1.3.1.3.- El gen de la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD)

La dihidropirimidina deshidrogenasa catalitza el pas inicial en la via del catabolisme de les pirimidines i, per tant, del 5-FU. El gen DPYD està localitzat en el cromosoma 1p22 i conté 23 exons (843 kb) amb un tamany que varia des de 69 fins a 1.404 pb (Figura 7).

Figura 7. Esquema del gen de la DPYD.



És un gen molt polimòrfic i s'han descrit fins a 42 mutacions. Aproximadament el 3% de la població són portadors heterozigots i un 0,1% són portadors homozigots de mutacions que inactiven la DPD [Etienne *et al*, 1994, Relling and Dervieux, 2001]. En la població occidental la mutació més freqüent consisteix en el canvi d'una G a una A que afecta la seqüència de reconeixement d'*splicing* de l'intró 14 (IVS14 +1 G>A) i dóna lloc a una deleció de 55 aminoàcids de la proteïna.

La DPD transforma la molècula de 5-FU a una forma inactiva, el 5-dihidrofluorouracil (5-FUH<sub>2</sub>), catabolitzant el 80% del fàrmac administrat (Figura 2). Aquest és el pas limitant del catabolisme d'aquest agent que determina la biodisponibilitat del mateix.

Tot i que els beneficis de la quimioteràpia de 5-FU estan ben establerts, el desenvolupament de toxicitat severa associada al tractament amb 5-FU és un problema clínic important. Un meta-anàlisi amb més de 1.000 pacients diagnosticats de càncer colorectal tractats amb 5-FU va demostrar que el 31-34% dels pacients havien presentat toxicitat greu (de grau 3-4) [Meta-Analysis Group in Cancer, 1998].

Diversos estudis han demostrat que la toxicitat relacionada amb l'administració de 5-FU està associada amb una activitat enzimàtica del DPD reduïda o absent [Blasco *et al*, 2008, Milano *et al*, 1999, van Kuilenburg, 2004].

#### **1.4.- Els derivats del platí: Mecanisme d'acció i metabolisme**

L'oxaliplatí (1,2-diaminociclohexà-oxalat-platí II, OX) va ser desenvolupat l'any 1976 al Japó pel professor Yoshinori Kidani, qui el va patentar l'any 1979. Va ser aprovat l'any 1999 a Europa i posteriorment als Estats Units.

L'oxaliplatí és un derivat del platí de tercera generació anàleg del cisplatí amb diferent patró d'activitat i toxicitat. Ha demostrat activitat

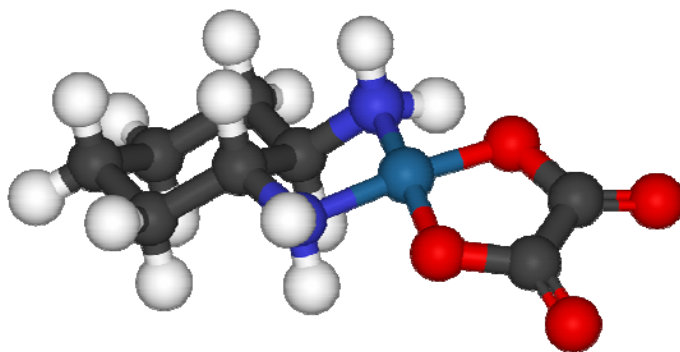
antitumoral en tumors resistents a cisplatí (CDDP) o carboplatí, entre ells el càncer colorectal, en el qual és eficaç en tumors refractaris a 5-FU [Cvitkovic and Bekradda, 1999] i en adjuvència.

En els tumors sòlids l'OX s'administra, habitualment, en combinació amb altres fàrmacs com el 5-FU, la gemcitabina, els inhibidors de la topoisomerasa I i els taxans. En càncer colorectal s'ha de destacar la capacitat de l'OX d'induir respostes en combinació amb el 5-FU en tumors amb resistència adquirida a aquest últim.

L'oxaliplatí està format per un grup oxalat, una molècula de platí (Pt) i un anell 1,2-diaminociclohexà (DACH). La presència d'aquest anell li confereix una estructura lleugerament diferent a la del seu anàleg, cisplatí, que permet l'activació de mecanismes cel·lulars diferents entre les dues molècules.

La fórmula química del OX és  $C_8H_{14}N_2O_4Pt$  i el seu pes molecular és de 397, 28 g/mol. (Figura 8)

*Figura 8. Estructura del Oxaliplatí. En gris trobem els àtoms d'hidrogen, en vermell els àtoms d'oxigen, en negre els àtoms de carboni, en blau fosc els àtoms de nitrogen i finalment en turquesa trobem la molècula de platí.*

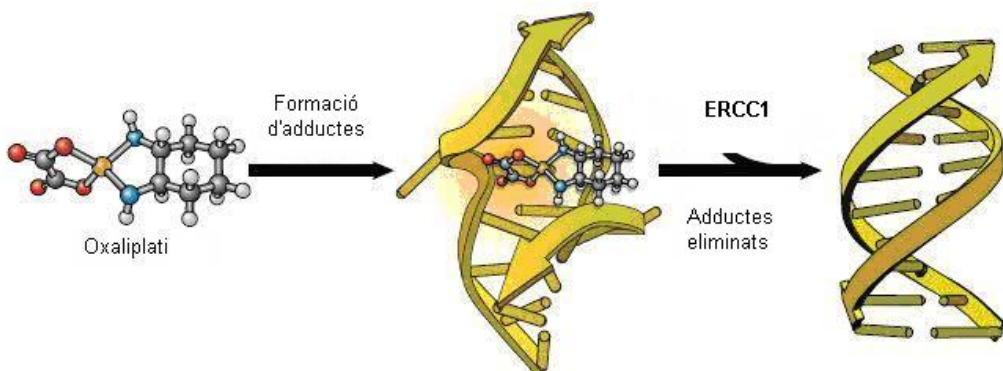




Els agents platinats entren dins la cèl·lula mitjançant sistemes de transport principalment passius, encara que també ho fan a través de proteïnes transportadores provocant una despesa d'ATP. L'ADN és la diana terapèutica preferent d'aquesta família d'agents antineoplàsics, que actuen formant estructures aberrants que provoquen la ruptura de la molècula, interfereixen en la reparació de l'ADN i desencadenen el bloqueig de la replicació i la transcripció de l'ADN i, finalment, la mort cel·lular.

La unió de l'Oxaliplatí amb l'ADN es produeix mitjançant enllaços covalents amb els nitrògens en posició 7 dels anells imidazol de les guanines (G) i adenines (A) de la molècula d'ADN. Les estructures aberrants que es formen poden ser intracatenàries, intercatenàries i en forma de monoadductes (Figura 9)

*Figura 9: Esquema de les unions intracadena i intercadena ADN-Oxaliplatí.*



L'oxaliplatí, tot i formar menys adductes que el cisplatí al ser administrats a la mateixa concentració, té la mateixa eficàcia ja que indueix la mateixa quantitat de trencaments de la cadena de l'ADN que el seu anàleg. Tanmateix, a causa de la presència de l'anell DACH, els adductes formats per l'oxaliplatí són més voluminosos i més hidrofòbics. Per aquesta

raó desencadena l'activació de vies de reconeixement i de reparació diferents a la resta d'agents platinats.

#### **1.4.1.- Aspectes farmacogenètics**

Per tal de preservar la integritat de la molècula de l'ADN, les cèl·lules s'han dotat d'uns mecanismes capaços de reparar el dany que diferents agents li provoquen. Quan l'agent nociu és un fàrmac, com és el cas del OX, es desencadenen dues vies importants de reparació de l'ADN i un mecanisme de destoxificació. Aquestes són la via de reparació per escissió de nucleòtids (NER) i la via de reparació per escissió de bases (BER). Inicien la reparació de l'ADN danyat eliminant els adductes ADN-Oxaliplatí i, per tant, l'activitat antitumoral del OX queda disminuïda. Un altre mecanisme per prevenir el dany que provoquen els derivats del platí és la destoxificació d'aquests a través d'enzims metabolitzadors de fase II, com les glutatió-S-transferases (GST).

##### **1.4.1.1.- Els gens de la via de reparació per escissió de nucleòtids (NER)**

Aquest procés de reparació de la molècula d'ADN és un mecanisme de defensa cel·lular que s'activa en reacció als efectes citotòxics de la quimioteràpia basada en derivats del platí eliminant els adductes que distorsionen la doble hèlix d'ADN [Reed, 2005]. El complex proteic reparador està codificat per:

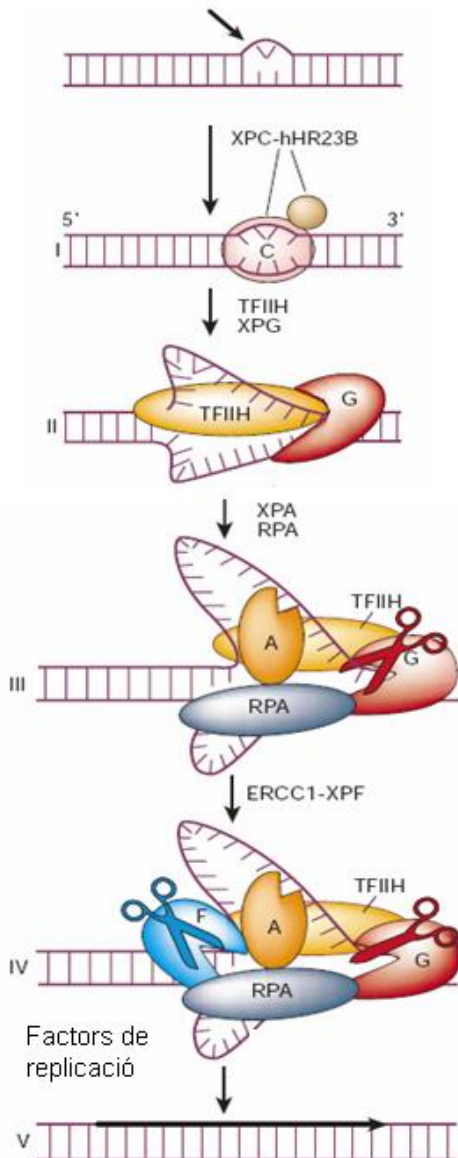
- el gen de reparació per escissió del grup de complementació creuada 1 (ERCC1, de l'anglès *excision repair cross complementing 1*)
- el gen de la xeroderma pigmentosa grup F (XPF, de l'anglès *xeroderma pigmentosum group F*)

- el gen de la xeroderma pigmentosa grup D (XPD, de l'anglès *xeroderma pigmentosum group D*)

El ERCC1 forma un heterodímer amb el XPF per crear una incisió en la posició 5' de la cadena d'ADN danyada. Existeix també una expressió coordinada del XPD amb l'ERCC1 i altres gens del complex reparador NER (Figura 10).

Figura 10: Esquema del funcionament del complex reparador NER. Adaptada de JHJ Hoeijmakers, Nature 2001.

Dany oxidatiu, llum, agents citotòxics



La maquinària NER està formada per més de 25 proteïnes.

(I) El complex XPC-hHR23B és el primer en detectar el dany en l'ADN.

(II) El complex TFIIH està format per les helicases XPB i XPD encarregades d'obrir ~ 30 parells de bases al voltant de l'ADN danyat.

(III) XPA confirma la presència del dany i la proteïna de replicació A (RPA) estableix l'estructura oberta.

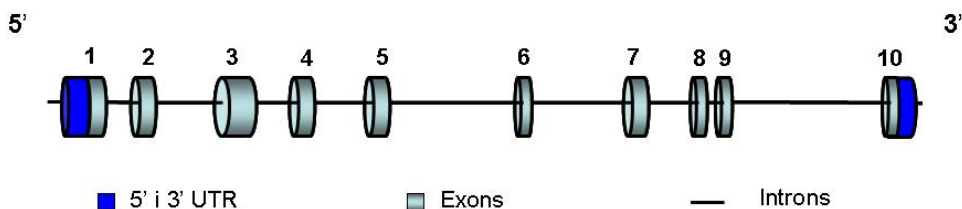
(IV) Les endonucleases XPG i ERCC1/XPF, respectivament trenquen els extrems 3' i 5' de la cadena danyada. Es genera així un oligonucleòtid de 24-32 bases que té la lesió.

(V) La maquinària de replicació normal de l'ADN completa la reparació.

#### 1.4.1.1.1.- El gen de la reparació per escissió del grup de complementació creuada 1 (ERCC1)

El gen ERCC1 es localitza en el cromosoma 19q13.2-q13.3 (Figura 11) i codifica una proteïna de 297 aminoàcids. S'han identificat diversos polimorfismes en aquest gen: a) un polimorfisme en el codó 118, posició 19007, que provoca un canvi C>T i no modifica l'aminoàcid resultant, l'asparragina (ASN); b) un segon SNP, C>A, localitzat en la posició 8092 de la regió no traduïda 3' i c) un SNP localitzat en l'intró 3, posició 19716, que implica un canvi G>C.

Figura 11. Esquema del gen de la ERCC1.



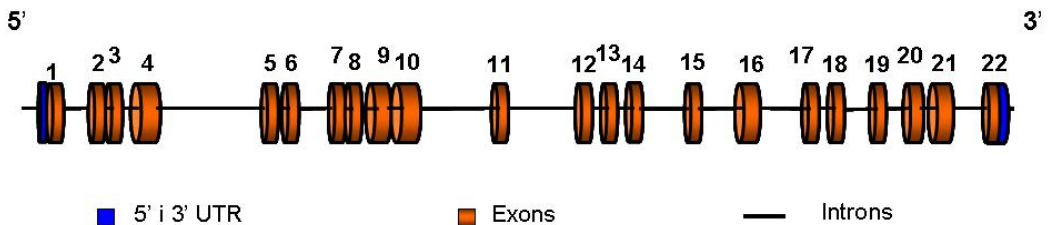
S'ha evidenciat que uns nivells baixos d'expressió del gen ERCC1 s'associen a alteracions en la capacitat reparadora de l'ADN. Aquest fet porta a un increment en la resposta i a una major tolerància a esquemes terapèutics basats en derivats del platí [Ruzzo *et al*, 2007, Shiota *et al*, 2001]. Fins al moment, els estudis publicats en relació amb el polimorfisme més estudiat del gen ERCC1 (C118T) han descrit que la presència de l'al·lel T s'associa, de forma significativa, a una major mortalitat global [Stoehlmacher *et al*, 2004], i a un major risc de progressió [Grolleau *et al*, 2001]. No obstant, existeixen resultats contradictoris en relació amb el

paper de l'al·lel T, ja que la seva presència també s'ha associat a una major probabilitat de resposta [Viguiet *et al*, 2005].

#### 1.4.1.1.2.- El gen de la xeroderma pigmentosa grup D (XPD)

El gen XPD (també anomenat ERCC2) es troba localitzat en el cromosoma 19q13.3 i consta de 21.14 kb de l'ADN genòmic (Figura 12). S'han descrit una sèrie de polimorfismes, alguns infreqüents i d'altres més comuns. Un d'aquests és el SNP A751C, que comporta una substitució d'un residu Lisina (Lys) per una glutamina (Gln). Encara que es desconeix el veritable paper de la mutació en XPD-751, s'han publicat diversos resultats en relació amb l'efecte i la capacitat reparadora del XPD. Dos estudis van evidenciar un descens de la capacitat reparadora després del tractament amb Oxaliplatí en pacients amb carcinoma colorectal avançat homozigots o heterozigots per l'al·lel que codifica per Gln [Lecomte *et al*, 2006, Le Morvan *et al*, 2007]. Al contrari, en altres estudis es va demostrar que els pacients portadors de l'al·lel Gln tenien un risc augmentat de progressió o mortalitat [Lecomte *et al*, 2006, Le Morvan *et al*, 2007, Ruzzo *et al*, 2007, Stoehlmacher *et al*, 2004].

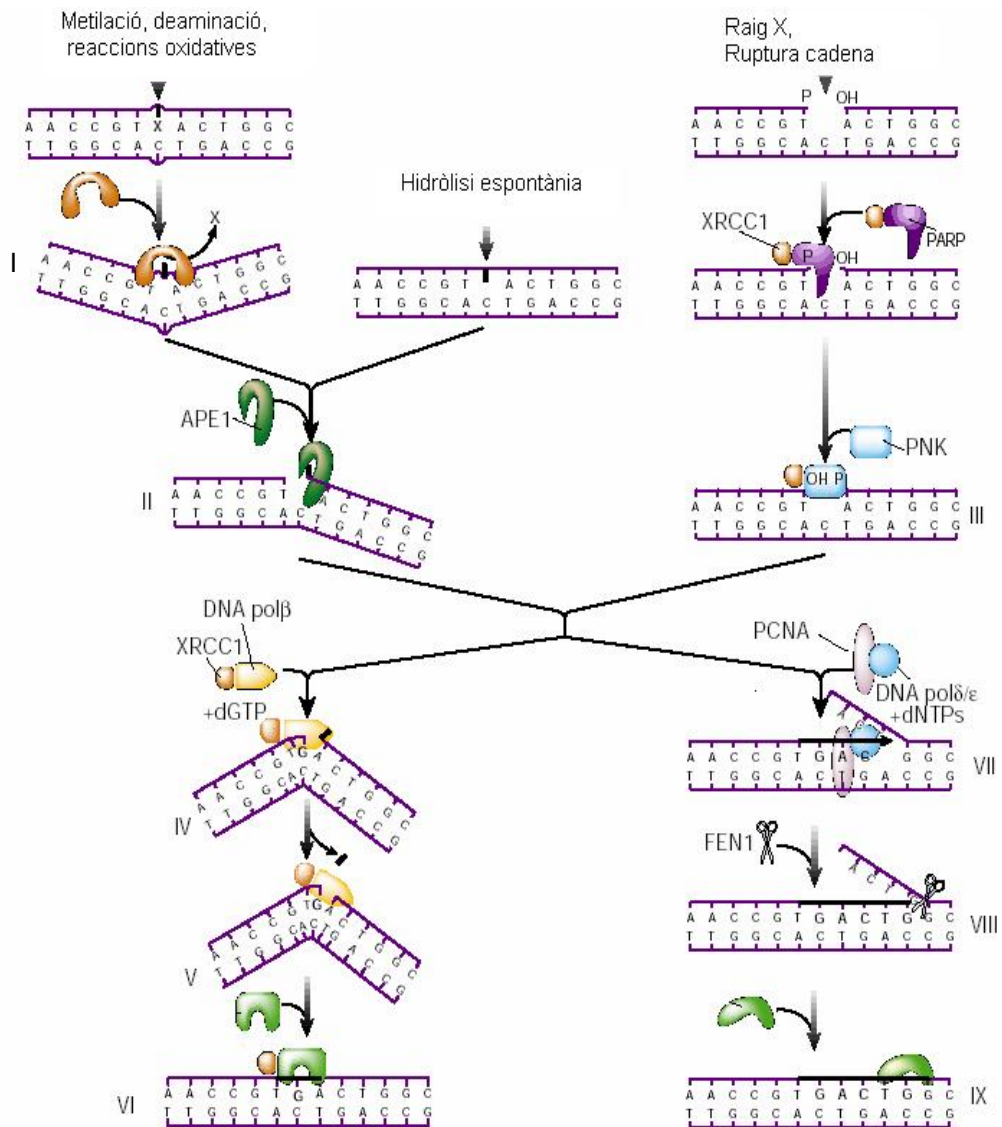
Figura 12. Esquema del gen XPD.



#### **1.4.1.2.- Els gens de la via de reparació per escissió de bases (BER)**

Aquest mecanisme constitueix el principal sistema reparador del dany ocasionat a la molècula d'ADN per les diferents reaccions intrínseques al metabolisme cel·lular: reaccions oxidatives, metilació, desaminació i hidroxilació. El sistema BER també participa en la reparació de la ruptura de les cadenes d'ADN que ocasionen els fàrmacs derivats de platí. En aquest procés de reparació de l'ADN participa la proteïna XRCC1 que interactua amb l'ADN lligasa III i forma un complex amb l'ADN polimerasa i la poliADP-ribosa polimerasa [Dianov, 2003] (Figura 13).

**Figura 13.** Esquema de la via BER de reparació de l'ADN. (I) Una bateria de glicosilases s'encarrega d'escindir la base danyada de l'esquelet sucre-fosfat. (II) El lloc sense base resultant també es pot produir per hidròlisi espontània. La reacció principal del sistema BER s'inicia per la APE1 endonucleasa. (III) La polimerasa poliADP-ribosa (PARP) s'uneix en el punt de la lesió. Una polinucleòtid quinasa (PNK) orienta els extrems de la reparació. (IV) L'ADN polimerasa B s'encarrega d'omplir el buit i (V) elimina el residu de sucre. (VI) El complex XRCC1-ligasa segella la lesió reparada. (VII-IX) La via llarga de reparació inclou diferents ADN polimerases i l'antigen de proliferació nuclear del nucli (PCNA), així com l'endonucleasa FEN1 i la ADN ligasa I. Adaptada de JHJ Hoeijmakers, Nature 2001.

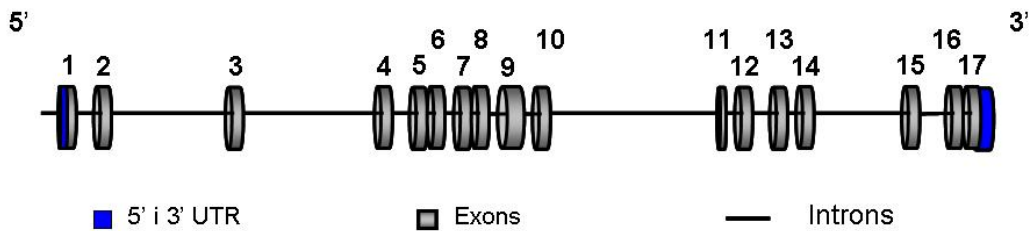




### 1.4.1.2.1.- El gen de reparació per raigs X del grup de complementació creuada 1 (XRCC1)

El gen XRCC1 conté 17 exons i es localitza en el cromosoma 19q13.2 [Lamerdin *et al*, 1995] (Figura 14). Encara que s'han descrit molts polimorfismes, hi ha tres, Arg194Trp (C>T), Arg280His (G>A) i Arg399Gln (G>A), que s'ha demostrat que alteren la capacitat de la proteïna XRCC1 de reparar l'ADN.

Figura 14. Esquema del gen XRCC1



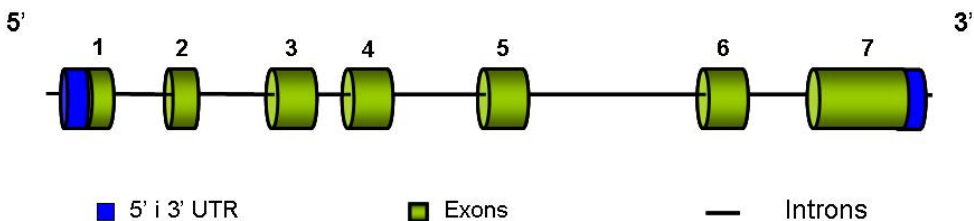
S'ha reportat que existeix una reparació de l'ADN defectuosa en relació al polimorfisme Arg399Gln, de manera que la presència de l'al·lel que codifica per Gln confereix una major sensibilitat al tractament amb OX [Lunn *et al*, 2000]. No obstant això, altres autors han descrit una menor resposta estadísticament significativa al tractament amb OX en presència de l'al·lel Gln [Stoehlmacher *et al*, 2001] i inclús un major risc de mortalitat en pacients homozigots Gln/Gln [Suh *et al*, 2006]. En altres treballs, els resultats no van mostrar cap associació significativa [Ruzzo *et al*, 2007, Stoehlmacher *et al*, 2004].

### 1.4.1.3.- La glutatió-S-transferasa pi 1 (GSTP1)

Les glutatió-transferases (GSTs) constitueixen una família d'enzims (citosòlics i de membrana) implicats en la destoxificació cel·lular. Es classifiquen en set subfamílies, que es diferencien tant en la seva estructura com en les seves funcions. Catalitzen la conjugació de glutatió amb xenobiòtics electrofílics per inactivar-los i facilitar la seva excreció. Les GSTs tenen, per tant, un paper important en el metabolisme de molècules potencialment genotòxiques. El glutatió-S-transferases P1 (GSTP1, de l'anglès glutathione S-transferase pi 1), un isoenzima que pertany a la família  $\pi$ , participa en la destoxificació de derivats del platí i és un important mediador tant de la resistència intrínseca com de la resistència adquirida al tractament amb fàrmacs derivats del platí [Cullen *et al*, 2003]. La disminució o abolició de la seva activitat destoxificadora podria, en teoria, associar-se a un augment en l'eficàcia dels compostos del platí.

El gen que codifica per la GSTP1 es localitza en el cromosoma 11q13. Consta de 7 exons i té un tamany 2,84 kb (Figura 15).

Figura 15. Esquema del gen GSTP1



Dels polimorfismes descrits en aquest gen, el més estudiat és la substitució A>G en la posició 313 dins de l'exó 5, que comporta un canvi d'aminoàcid Ile105Val. El genotip Val/Val s'ha considerat favorable en relació amb la mortalitat en els malalts tractats amb Oxaliplatí [Stoehlmacher *et al*, 2002, Stoehlmacher *et al*, 2004].

## **2.- HIPÒTESIS I OBJECTIUS**



Els estudis farmacogenètics plantegen la utilització dels coneixements derivats dels estudis genòmics per tal que els pacients es puguin sotmetre a tractaments farmacològics més eficaços i menys tòxics.

Aquests estudis tenen una especial rellevància en el camp de l'oncologia, ja que els tractaments quimioradioteràpics es caracteritzen per tenir una finestra terapèutica molt estreta que fa difícil establir l'equilibri entre l'increment de la dosi (per millorar l'eficàcia) i l'aparició d'efectes adversos.

La hipòtesi d'aquest treball és que la utilització de marcadors moleculars capaços de predir la toxicitat i/o la resposta al tractament farmacològic de pacients amb càncer colorectal avançat facilitarà el disseny de pautes terapèutiques personalitzades.

Els objectius d'aquest treball són:

- Analitzar l'associació de la resposta clínica i l'aparició d'efectes adversos del tractament amb 5-FU amb el patró de polimorfismes/mutacions dels gens relacionats amb la via metabòlica de síntesis de folats (TS, MTHFR, DPD).
- Analitzar l'associació de la resposta clínica i l'aparició d'efectes adversos de la quimioteràpia amb derivats del platí amb el patró de polimorfismes en gens relacionats amb els mecanismes de reparació de l'ADN: via de reparació NER (genes ERCC1 i XPD) i via de reparació BER (XRCC1).
- La resposta clínica a la quimioteràpia amb derivats de platí s'analitzarà, també, en relació amb el polimorfisme de la GSTP1.



## **3.- RESULTATS**





### **3.1.- Estudi farmacogenètic del gen de la Timidilat Sintasa:**

*3.1.1.- Transcription factor-binding sites in the thymidylate synthase gene: predictors of outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin?*

Paré L, Marcuello E, Altés A, del Río E, Sedano L, Barnadas A, Baiget M.

Department of Genetics, Hospital de Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.





**Resum:**

La identificació dels paràmetres clínics i genètics per predir la resposta en el càncer colorectal avançat és una qüestió clau en el maneig d'aquesta malaltia. Hem estudiat si els factors clínics determinants de la supervivència definits en un grup de pacients tractats amb 5-fluorouracil (5-FU) (Organització Europea per a la Investigació i el Tractament del Càncer, el model de la EORTC) s'apliquen també a 109 pacients amb càncer colorectal que reben una quimioteràpia combinada que inclou oxaliplatin/5-FU com a tractament de primera línia. Els nostres resultats confirmen el poder discriminatori del model clínic EORTC en els pacients tractats amb un règim de quimioteràpia combinada. Per tal d'identificar altres paràmetres genètics de pronòstic, es va determinar si els polimorfismes en la regió promotora del gen de la Timidilat Sintasa (TS) que modifiquen el nombre de llocs d'unió de factors de transcripció (USF) operatius, poden predir la resposta al tractament dels nostres pacients i complementen el model clínic EORTC. Els nostres resultats indiquen que aquest paràmetre genètic (el nombre de llocs d'unió de factors de transcripció USF) pot ser utilitzat quan s'avalua l'efecte del genotip de la TS en l'eficàcia del tractament amb 5-FU.



# Transcription factor-binding sites in the thymidylate synthase gene: predictors of outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin?

L Paré, E Marcuello, A Altés,  
E del Rio, L Sedano, A Barnadas  
and M Baiget

*The Pharmacogenomics Journal* (2009) **9**, 218; doi:10.1038/tpj.2009.17

**Correction to:** *The Pharmacogenomics Journal* (2008) **8**, 315–320; doi:10.1038/sj.tpj.6500469; published online 7 August 2007

The authors of this article have noted missing information from the affiliation details. Affiliation #1 should read as follows:

'Department of Genetics, Hospital de Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain'



# Transcription factor-binding sites in the thymidylate synthase gene: predictors of outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin?

L Paré<sup>1</sup>, E Marcuello<sup>2</sup>, A Altés<sup>3</sup>,  
E del Rio<sup>1</sup>, L Sedano<sup>1</sup>,  
A Barnadas<sup>2</sup> and M Baiget<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Department of Hematology, Hospital de l'Esperit Sant, Sta Coloma de Gramanet, Barcelona, Spain and <sup>4</sup>Ciberer, Juan Martorell 1, 46010 Valencia, ISCIII, Spain

## Correspondence:

Dr M Baiget, Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni M Claret 167, Barcelona 8025, Spain.  
E-mail: mbaiget@santpau.es

The identification of clinical and genetic parameters to predict the outcome in advanced colorectal cancer is a key issue in the management of this disease. We ascertained whether the clinical determinants of survival defined in a large cohort of patients treated with 5-fluorouracil (5-FU) (European Organization for the Research and Treatment of Cancer, EORTC model) also apply to 109 colorectal cancer patients receiving a therapy including oxaliplatin/5-FU as their first-line treatment. Our results confirm the considerable discriminatory power of the clinical model proposed in patients treated with a combined chemotherapy regimen. With the aim of identifying additional genetic prognostic parameters, we determined whether the polymorphisms in the promoter region of the thymidylate synthase (TS) gene that modifies the number of operative binding sites of a transcription factor (USF) could predict the clinical outcome of our patients and complement the EORTC clinical model. Our results indicate that this new genetic parameter (the number of USF-binding sites) could be considered when evaluating the role of TS genotype in the efficacy of the 5-FU-based regimens. Further, confirmatory studies aimed at evaluating the effect of the number of binding sites of transcription factors for selecting 5-FU-treated patients are warranted.

*The Pharmacogenomics Journal* (2008) 8, 315–320; doi:10.1038/sj.tpj.6500469; published online 7 August 2007

**Keywords:** TS polymorphisms; binding sites of transcription factors; colorectal cancer; 5-FU/oxaliplatin chemotherapy; pharmacogenetics

## Introduction

A high proportion of colorectal cancer (CRC), which is a leading cause of cancer-related morbidity and mortality in the Western world, is diagnosed at advanced stages when chemotherapy is required for its management. 5-Fluorouracil (5-FU) is a folate-pathway inhibitor that has been available for 50 years, and continues to be a mainstay of treatment of advanced disease.<sup>1</sup> Its combination with oxaliplatin has become standard for the first and second lines treatment of CRC.<sup>2</sup> 5-FU is a fluoropyrimidine which, on activation to the nucleotide form, develops

a stable complex with thymidylate synthase (TS), inhibiting the activity of the enzyme.<sup>3,4</sup>

Although over time different clinical parameters have been proposed as prognostic markers, there has not been a consensus on the relevance of these prognostic factors. This situation prompted Köhne *et al.*<sup>5</sup> to perform a multivariate analysis of the clinical data of 3825 metastatic CRC patients treated with 5-FU. These authors defined four baseline clinical parameters (performance status, white blood cell (WBC) count, alkaline phosphatase and number of metastatic sites), which allow the classification of the patients into three clearly separated risk groups. The authors suggested that any molecular or biological new marker should be validated against these clinical parameters.

Recently, different genetic markers (TS, dihydropyrimidine dehydrogenase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms) have been evaluated as predictors of outcome in CRC patients treated with fluoropyrimidines. TS is the marker that has been most often found to predict fluoropyrimidine responsiveness in these patients.<sup>6–14</sup>

In the TS gene, three different polymorphisms have been described in its 5'-untranslated region (UTR) region. The first one consists in the variation in the number of a 28 bp tandemly repeated sequence.<sup>15</sup> Although alleles containing two, three, four, five and nine copies of the repeated sequence have been described, alleles with two (TS\*2) and three (TS\*3) repeats are the most common alleles. The number of tandem repeats affects TS activity levels: TS mRNA with a three-repeat sequence has greater translational efficiency than that with the two-repeat sequence.<sup>16,17</sup> The second polymorphism, described by Mandola *et al.*<sup>18</sup> is a G>C single-nucleotide polymorphisms (SNP) at the 12th nucleotide of the second repeat in the TS\*3 alleles. This polymorphic substitution changes a critical residue in the USF E-box consensus element, abolishes the USF-1 binding and alters transcriptional activity. Kawakami *et al.*<sup>19</sup> confirmed the presence of the G>C polymorphic change (SNP) and classified each polymorphic allele as \*2G, \*2C, \*3G and \*3C in accordance with the combination of the SNP and variable number of tandem repeat. Recently, the existence of a third polymorphism, an infrequent TS \*2 allele type carrying a G>C base change in the 12th nucleotide of both 28 bp repeats, has been described.<sup>20</sup> Although the limited number of patients carrying this TS \*2 C allele does not allow a conclusion to be drawn, the authors speculate that patients with this condition should be the most sensitive to the effects of fluoropyrimidines.

Furthermore, in the 3' untranslated region of the TS gene, a frequent polymorphism, consisting of a 6 bp deletion, was discovered through searching the public Expressed Sequence Tag database.<sup>21</sup> This polymorphism causes mRNA instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels.<sup>22</sup>

The present work has two objectives: first, to ascertain whether the clinical model validated by Köhne *et al.*<sup>5</sup> in a cohort of patients treated with 5-FU can also be used to classify CRC patients receiving a combined therapy as a first-line treatment that includes oxaliplatin/5-FU (FOLFOX);

second, to determine whether the polymorphisms in the promoter region of the TS gene that modifies the number of operative binding sites of a transcription factor (USF) could predict the clinical outcome of our patients and complement the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) clinical model.

## Results

### Clinical/genetic determinants and response

A total of 109 patients who fulfilled all inclusion criteria were studied. Clinical data are shown in Table 1. Table 2 shows the relationships between response and clinical/molecular determinants. There were no significant differences in the clinical response between the patients grouped in accordance with the clinical classification ( $P=0.3$ ). Interestingly, when the patients were classified taking into account the number of USF-binding sites in the promoter region of the TS gene, the percentage of patients in clinical remission decreased as the number of binding sites increased. The 6 bp deletion polymorphism does not show any role in the probability of achieving a clinical response. Moreover, neither clinical nor genetic variables included in a logistic regression analysis to evaluate clinical response were significant.

**Table 1** Baseline characteristics of the 109 patients

Gender (men/women)	71 (65%)/38 (35%)
Median age (range, years)	66 (34–83)
<i>Performance status</i>	
0–1	88 (81%)
> 1	21 (19%)
<i>Adjuvant therapy</i>	
No	74 (68%)
QT	24 (22%)
QT+RT	11 (10%)
<i>Number of cycles of chemotherapy</i>	
Median (range)	9 (1–16)
<i>Number of metastatic sites</i>	
1	65 (60%)
2	28 (25%)
3 or more	16 (15%)
<i>Primary tumor localization</i>	
Colon	37 (34%)
Rectum—Sigma	72 (66%)
<i>Alkaline phosphatase levels</i>	
< 300 U/l	92 (84%)
≥ 300 U/l	17 (16%)
<i>WBC count</i>	
< 10 × 10 <sup>9</sup> /l	99 (91%)
≥ 10 × 10 <sup>9</sup> /l	10 (9%)



**Table 2 Clinical classification, TS genotype and clinical response**

	Clinical response	No clinical response	P
<i>Clinical classification</i> <sup>a</sup>			0.3
High risk	9	12	
Intermediate risk	15	16	
Low risk	34	22	
<i>N of USF binding sites</i> <sup>b</sup>			0.5
4	4	6	
3	19	18	
2	35	26	
<i>3' Polymorphism</i>			0.9
+6/+6	23	19	
+6/-6	26	22	
-6/-6	9	9	

<sup>a</sup>One patient not evaluable for response.

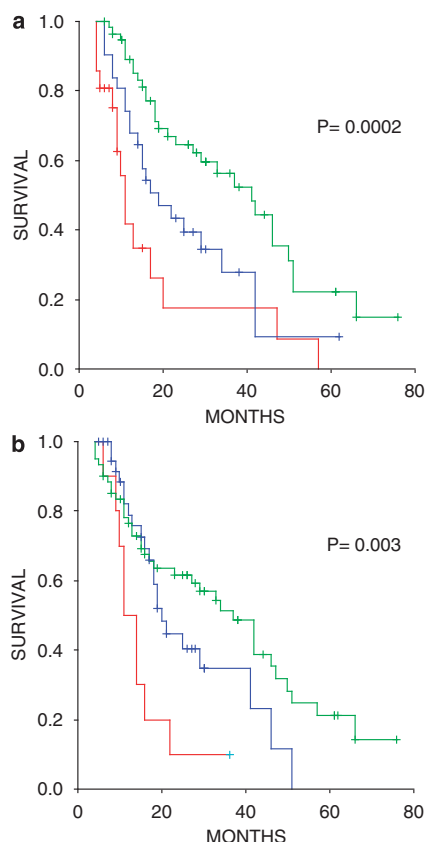
<sup>b</sup>No patient was detected with 0 or 1 USF binding sites.

**Table 3 Clinical classification, TS genotype and univariate overall survival**

	OS in months median (CI 95%)	P
<i>Clinical classification</i>		0.0002
High risk	11 (9–13)	
Intermediate risk	19 (10–28)	
Low risk	41 (29–53)	
<i>N of USF binding sites</i>		0.003
4	11 (8–14)	
3	20 (16–24)	
2	37 (27–47)	
<i>3' Polymorphism</i>		0.3
+6/+6	37 (23–51)	
+6/-6	21 (14–28)	
-6/-6	14 (10–18)	

*Clinical/genetic determinants and survival*

Table 3 shows the univariate analysis of overall survival (OS) in relation to clinical and genetic determinants. There were significant differences in the survival between the patients grouped in accordance with the clinical classification ( $P=0.0002$ ) (Figure 1a). The TS genotype of the 5' region classifies the patients into three groups according to the number of USF active binding sites with a significantly different median OS ( $P=0.003$ ) (Figure 1b). No differences in survival can be related to the 6 bp deletion polymorphism ( $P=0.3$ ). In the Cox regression model, which includes both the clinical and the genetic determinants, the clinical classification and the number of USF-binding sites retain their independent predictive value for survival (Table 4).



**Figure 1** Kaplan-Meier estimates of OS according to: (a) clinical classification (green line, low-risk patients; blue line, intermediate-risk and red line, high-risk group), (b) number of active USF-binding sites in the promoter region of the TS gene (green line, 2 binding sites; blue line, three binding sites and red line, four binding sites).

**Table 4 Cox regression analysis of OS**

Variable	P	RR (CI 95%)
<i>Clinical classification</i>	0.01	
Intermediate/low risk	0.017	2 (1.1–3.5)
High/low risk	0.0001	3.6 (1.9–6.8)
<i>N of USF binding sites</i>	0.01	
3/2	0.047	1.8 (1.009–3.15)
4/2	0.003	3.2 (1.5–7)

Intermediate-risk patients were two times more at risk of dying than low-risk patients. Likewise, high-risk patients had a probability of death 3.6 times greater than low-risk patients. The group of patients with three binding sites were 1.8 times more at risk of dying than patients with two

**Table 5** Univariate survival analysis of clinical risk groups according to the number of USF binding sites

Clinical classification	TS genotype	Median OS (months)	P
High risk (N=21)	2	11	0.5
	3	20	
	4	10	
Intermediate risk (N=31)	2	34	0.03
	3	17	
	4	11	
Low risk (N=57)	2	46	0.18
	3	41	
	4	16	

active binding sites; this risk increased to 3.2 times in the group of patients with four binding sites.

For each group of patients classified in accordance with the clinical model, we calculated the OS taking into account the number of binding sites in the promoter region of the TS gene (Table 5). In patients with an intermediate clinical risk, this genetic parameter clearly discriminates three groups with a different survival ( $P=0.03$ ), whereas no differences in survival were demonstrated in the remaining groups of patients.

## Discussion

### Clinical determinants

The identification of clinical parameters to predict the outcome in advanced CRC is a key issue in the management of this disease. A number of clinical factors such as performance status, lactate dehydrogenase values, WBC count, and so on have been identified as prognostic markers in different studies. However, no consensus on the importance of these prognostic factors has been attained. In an attempt to design a definitive prognostic clinical model for patients with metastatic CRC treated with 5-FU-based chemotherapy, Köhne *et al.*<sup>5</sup> carried out a multivariate analysis in a large number of cases ( $n=3825$ ). These authors studied 23 variables, of which eight clinical parameters were significant. Nevertheless, to devise a more simplified model, patient risk groups with similar outcomes were combined and three clearly separated risk groups were defined with the use of only four clinical parameters (performance status, level of WBC count, alkaline phosphatase and number of involved tumor sites). But, as pointed out by the authors, whether the model could also apply to patients receiving 5-FU in combination with CPT-11 or oxaliplatin as their first-line treatment is unknown. We, accordingly, applied this model to a cohort of 109 CRC patients receiving a uniform combination therapy including oxaliplatin/5-FU as their first-line treatment. Our results demonstrate that three risk groups can also be clearly defined with significantly different median survivals (11 months in the high-risk group, 19 in the intermediate and 41 in the low-risk

group), confirming the considerable discriminating power of the clinical model proposed.

### Genetic determinants

A number of clinical studies indicate that the TS expression could predict overall outcome and response to 5-FU in CRC patients. Recent studies have confirmed the role of the TS genotype as a useful parameter to predict response and survival in CRC patients treated with 5-FU alone or in combination with CPT11 or oxaliplatin.<sup>6–8,23–25</sup> The TS genotype has been demonstrated to be an independent predictor of progression-free and OS in the Cox regression models after adjustment to the other clinical variables.<sup>9</sup>

An important mechanism of expression control of the TS gene could be attributed to polymorphisms in the promoter region of this gene. Two G>C substitutions in the 12th nucleotide of the polymorphic repeats located in this 5'-UTR region change a critical residue in the USF E-box consensus elements, abolish the USF binding and alter transcriptional activity. We hypothesize that as the number of binding sites increases, the resistance to 5-FU will be greater, resulting in a poorer outcome. For this reason, in the present work the 109 patients were classified into different groups in accordance with the number of operative USF-binding sites.

As regards the clinical response, although a statistically significant relationship was not achieved, the percentage of patients in clinical remission decreased as the number of binding sites increased. When considering the OS, major differences were observed: a poor survival in patients with four binding sites, an intermediate survival in patients with three binding sites and the best OS in the group of patients with only two binding sites ( $P=0.003$ ). The results of the Cox regression analysis demonstrate that the number of USF-binding sites retains its independent predictive value and complements the predictive value of outcome of the EORTC clinical model in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-FU and oxaliplatin.

When the OS was calculated taking into account the number of binding sites for each group of patients, classified according to the clinical model, we observed that this genetic marker clearly discriminated three different survival groups in intermediate-risk patients.

In conclusion, our findings demonstrate the predictive value of the clinical model defined by Köhne *et al.* when applied to patients treated with a combined chemotherapy regimen. Furthermore, these results indicate that the number of USF-binding sites in the promoter region of the TS gene can be considered when evaluating the role of TS genotype on 5-FU efficacy. Further confirmatory studies aimed at evaluating the effect of the number of binding sites of transcription factors for selecting 5-FU-treated patients are warranted.

## Materials and methods

### Patients

A total of 109 patients diagnosed with metastatic CRC and undergoing 5-FU and oxaliplatin as a first-line

chemotherapy were studied. All patients were primarily ensured to have an adequate bone marrow and organ function before treatment. All patients gave written informed consent and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

#### Chemotherapy regimen description

We administered a uniform regimen of chemotherapy in this group of patients. The regimen consisted of 5-FU (a pulse dose of 400 mg/m<sup>2</sup> days 1 and 2 and a continuous infusion for 44 h of 1200 mg/m<sup>2</sup>) with leucovorin i.v. and oxaliplatin (85 mg/m<sup>2</sup> infused for 2 h every 2 weeks i.v.). Patients underwent chemotherapy cycles until severe toxicity or disease progression appeared.

#### Clinical parameters

Relevant clinical data were obtained from clinical records (gender, age, ECOG, adjuvant therapy, number of chemotherapy cycles, number of metastatic sites, colon vs rectum involvement, WBC count, alkaline phosphatase). Response to treatment and OS were also analyzed. Clinical response was assessed by CT scan every 3 months after the start of chemotherapy and was defined according to the World Health Organization criteria.<sup>26</sup> OS was calculated from the start of chemotherapy to death regardless of the cause.

#### TS genotyping assays

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes by the salting-out procedure.<sup>27</sup> For the analysis of the 28-repeat polymorphism, a fragment containing the repeats was amplified using the primers and the PCR conditions previously described.<sup>15</sup> DNA fragments of 242 bp (\*3/\*3), 214 bp (\*2/\*2) or both (\*2/\*3) were observed. Half of the PCR products of all cases genotype were digested with HaeIII<sup>17,18</sup> followed by electrophoresis in 3.5% agarose gel containing ethidium bromide. The G to C change in the second repeat of the \*3 alleles removes a HaeIII site, enabling the identification of the different alleles: \*2 (66, 47, 45, 44 and 12 bp), \*3C (94, 47, 45, 44 and 12 bp) and \*3G (66, 47, 45, 44, 28 and 12 bp). TS\*2 alleles carrying the novel polymorphism (G to C change in the first repeat) were identified by the presence of a 113 bp band after the HaeIII digestion.<sup>20</sup>

As these G to C substitutions change a critical residue in the USF E-box consensus element, abolish USF-1 binding and alter transcriptional activity, TS genotypes of the patients were classified according the number of functionally binding sites (those with a G residue in the 12th position of the repeat).

TS 6bp deletion polymorphism at nucleotide 1494 (TTAAAG) was amplified using the primers and the PCR previously described.<sup>28</sup> The -6bp allele (152bp) and the +6bp allele (158bp) were identified after 8% polyacrylamide gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

#### Statistical analysis

Differences between categorical variables were measured by the  $\chi^2$ -test. Logistic regression was used as a multivariate

method to ascertain which variables independently predicted clinical response. Kaplan–Meier estimates and the log-rank test were methods used in univariate analysis of survival. A Cox regression model was used for OS multivariate analysis. The results were considered as statistically significant when bilateral *P*-values were less than 0.05.

#### Acknowledgments

This work was partially supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (PI 05/1218).

#### Duality of interest

The authors declare no duality of interest.

#### References

- Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drug* 2000; **18**: 299–313.
- Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK et al. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 2059–2069.
- Danenberg PV. Thymidylate synthetase: a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1977; **473**: 73–92.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 330–338.
- Köhne CH, Cunningham D, Di Costanzo F, Glimelius B, Blijham G, Aranda E et al. Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol* 2002; **13**: 308–317.
- Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics* 2001; **1**: 65–70.
- Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 1779–1786.
- Marsh S, McKay JA, Cassidy J, McLeod HL. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2001; **19**: 383–386.
- Marcuello E, Altés A, Del Rio E, Cesar A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 3' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004; **112**: 733–737.
- Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 1611–1615.
- Etienne MC, Formento JL, Chazal M, Francoual M, Magne N, Formento P et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 785–792.
- Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 1365–1369.
- Marcuello E, Altés A, Menoyo A, del Rio E, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; **57**: 835–840.

- 14 Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, Van Gennip AH. High prevalence of the IVS14+1G>A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 555–558.
- 15 Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for the thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; **20**: 191–197.
- 16 Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 4096–4101.
- 17 Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 1999; **19**: 3249–3252.
- 18 Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003; **63**: 2898–2904.
- 19 Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 2003; **63**: 6004–6007.
- 20 Gusella M, Bolzonella C, Crepaldi G, Ferrazzi E, Padriani R. A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. *Pharmacogenomics J* 2006; **6**: 421–424.
- 21 Ulrich C, Bigler J, Velicer C, Greene E, Farin F, Potter J. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000; **9**: 1381–1385.
- 22 Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 319–327.
- 23 Suh KW, Kim JH, Kim YB, Kim J, Jeong S. Thymidylate synthase gene polymorphism as a prognostic factor for colon cancer. *J Gastrointest Surg* 2005; **9**: 336–342.
- 24 Brody JR, Hucl T, Gallmeier E, Winter JM, Kern SE, Murphy KM. Genomic copy number changes affecting the thymidylate synthase gene in cancer: a model for patient classification to aid fluoropyrimidine therapy. *Cancer Res* 2006; **66**: 9369–9373.
- 25 Salgado J, Zabalegui N, Gil C, Monreal I, Rodriguez J, Garcia-Foncillas J. Polymorphisms in the thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes predict response and toxicity to capecitabine-raltitrexed in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2007; **17**: 325–328.
- 26 World Health Organization. *Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment*. Publication no 48. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1979.
- 27 Miller SA, Dykes DD, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1989; **16**: 1215.
- 28 Dotor E, Cuatrecasas M, Martinez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guino E et al. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 1603–1611.

**3.2.- Estudi farmacogenètic del gen de la dihidropirimidina deshidrogenasa:**

*3.2.1.- Absence of large intragenic rearrangements in the DPYD gene in large cohort of colorectal cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy.*

Laia Paré, David Páez, Juliana Salazar, Elisabeth del Río, Eduardo Tizzano, Eugenio Marcuello, Montserrat Baiget.

Department of Genetics, Hospital de Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.





**Resum:**

**Objectiu:** Estudiar la relació entre la toxicitat associada amb la quimioteràpia basada en 5-FU i la presència de i) grans reordenaments intragènics en el gen de la DPYD i ii) la mutació IVS14+1G>A.

**Mètodes:** Es va utilitzar la tècnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) per estudiar l'ADN genòmic de 234 pacients amb càncer colorectal tractats amb quimioteràpia basada en 5-FU.

**Resultats:** No es va detectar cap deleció / duplicació en el gen DPYD. La mutació IVS14 +1 G>A tampoc va ser trobada en aquesta mostra.

**Conclusions:** Ni els grans reordenaments genòmics ni la mutació IVS14 +1 G>A en el gen DPYD tenen un paper important en el desenvolupament d'efectes adversos severos associats amb un règim amb 5-FU.





# Absence of large intragenic rearrangements in the *DPYD* gene in a large cohort of colorectal cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy

Laia Paré,<sup>1\*</sup> David Paez,<sup>2\*</sup> Juliana Salazar,<sup>3</sup> Elisabeth del Rio,<sup>1</sup> Eduardo Tizzano,<sup>1</sup> Eugenio Marcuello<sup>2</sup> & Montserrat Baiget<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Genetics and <sup>2</sup>Clinical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona and <sup>3</sup>Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER) (U-705), Barcelona, Spain

## WHAT IS ALREADY KNOWN ABOUT THIS SUBJECT

- Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is the enzyme responsible for the elimination of approximately 80% of the administered dose of 5-fluorouracil (5-FU).
- Mutations in the DPD-coding gene have been shown to increase the risk of severe toxicity in 5-FU treated patients.
- The IVS14+1G>A is the most common *DPYD* mutation.

## WHAT THIS STUDY ADDS

- The intragenic rearrangements of *DPYD* using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) were studied for the first time in a large series of 234 colorectal cancer patients treated with 5-FU-containing chemotherapy.
- No deletions or duplications of one or more *DPYD* exons were detected. The presence of the IVS14+1G>A mutation was also excluded.
- These data show that neither the large genomic rearrangements in the *DPYD* gene nor the IVS14+1G>A mutation are responsible for the serious toxicity associated with a 5-FU containing regimen in this cohort of Spanish patients.

## Correspondence

Dr Montserrat Baiget, Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.  
Tel.: +34 932919361  
Fax: +34 932919494  
E-mail: mbaiget@santpau.cat

\*These authors contributed equally to this work.

## Keywords

dihydropyrimidine dehydrogenase gene, 5-FU, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

## Received

21 December 2009

## Accepted

14 March 2010

## AIMS

To study the relationship between the toxicity associated with a 5-FU-based therapy and the presence of (i) the large intragenic rearrangements in the *DPYD* gene and (ii) the IVS14+1G>A mutation.

## METHODS

We used the multiplex ligation-dependent probe amplification technique (MLPA) to study genomic DNA from 234 colorectal cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy.

## RESULTS

We did not detect any deletion/duplication in the *DPYD* gene. The presence of the IVS14+1G>A mutation was also excluded.

## CONCLUSIONS

Neither the large genomic rearrangements in the *DPYD* gene nor the IVS14+1G>A mutation play a significant role in the development of serious toxicity associated with a 5-FU containing regimen.

## Introduction

For over 50 years, 5-fluorouracil (5-FU) has been the mainstay of chemotherapy for various solid cancers [1]. After intravenous administration of the drug about 80–90% of the dose is catabolized in the liver by dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD). The formation of the inactive 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (5-FUH2) by DPD is the rate-limiting step of 5-FU catabolism [2]. Although the benefits of 5-FU chemotherapy are well established, the development of severe toxicity is a major clinical problem. A meta-analysis of more than 1000 colorectal cancer patients receiving 5-FU demonstrated that grade 3–4 toxicity exists in 31–34% of patients and is responsible for 0.5% mortality [3]. Several studies have shown that this severe 5-FU related toxicity is clearly associated with DPD deficiency [4–6].

The 150 kb *DPYD* gene is located on chromosome 1p22 and comprises 23 exons that range in size from 69 to 1404 pb [7, 8]. The *DPYD* gene is highly polymorphic, and several mutations resulting in a protein with impaired activity have been described [9]. In Western populations, the most frequent of these mutations (IVS14+1G>A) is a G to A point mutation that affects the splice recognition sequence of intron 14 and results in a deletion of 55 amino acids in the native protein [10, 11]. Recently, the precise genomic position of the common fragile site FRA1E was mapped to the chromosomal band 1p22. The authors showed that FRA1E extends over 370 kb within the *DPYD* gene, which genomically spans approximately 840 kb. The 185 kb region of the highest fragility, which accounts for 86% of all observed breaks at FRA1E, encompasses the central part of *DPYD* including exons 13–16 [12]. Considering that fragile sites are prone to breakage, and deletions, translocations and amplifications can therefore occur in these genomic regions, we used the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), a simple and reliable method for the detection of intragenic rearrangements [13], to identify the presence of the large intragenic rearrangements in the *DPYD* gene. The MLPA protocol used allowed the simultaneous detection of the IVS14+1G>A mutation.

The study includes a cohort of Spanish cancer patients, 44.4% of whom suffered grade 3–4 adverse effects related to 5-FU administration.

## Methods

### Patients

Blood samples from 234 colorectal cancer patients undergoing 5-FU-based treatment were collected. All patients gave written informed consent and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

Patients were treated with either (i) 5-FU (a pulse dose of 400 mg m<sup>-2</sup> on days 1 and 2 and a continuous infusion

for 44 h of 1200 mg m<sup>-2</sup>) with leucovorin i.v and oxaliplatin (85 mg m<sup>-2</sup> infused for 2 h every 2 weeks i.v.) (FOLFOX) or (ii) 5-FU (2250 mg m<sup>-2</sup> in 48 h continuous infusion i.v.) with leucovorin i.v and irinotecan (180 mg m<sup>-2</sup> every 2 weeks i.v.) (FOLFIRI). Pharmacogenetic markers of DNA repairing genes were previously analyzed in the group of patients under FOLFOX treatment [14]. Some of the patients under FOLFIRI treatment were included in a previous study [15]. Patients underwent chemotherapy cycles until severe toxicity developed or disease progression appeared.

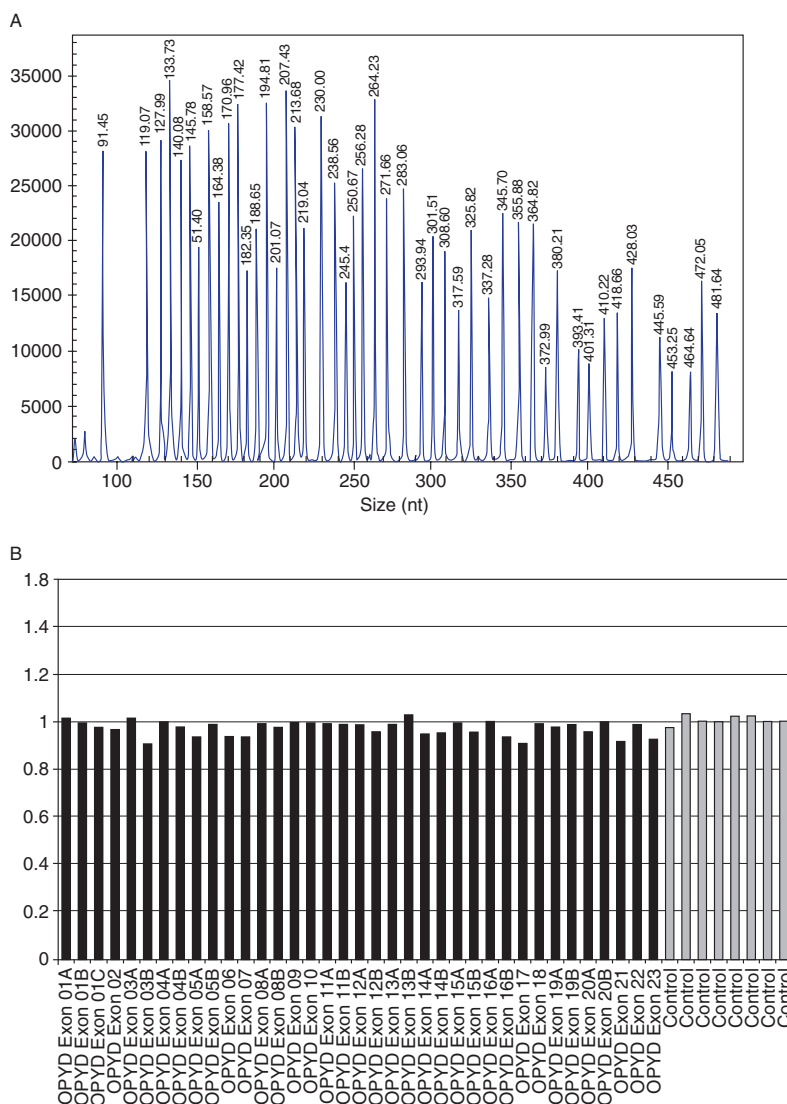
Relevant clinical data were obtained from clinical records. Toxicity was graded in accordance with the WHO scale: presence and grade of nausea, asthenia, mucositis, diarrhoea, infection, neutropenia, anaemia and thrombocytopenia.

### MLPA analyses

Genomic DNA was isolated from peripheral leukocytes by the salting-out procedure [16]. DNA (100 ng) was used for MLPA analysis performed with the SALSA MLPA P103 *DPYD* kit (MRC-Holland) under conditions specified by the manufacturer [17]. SALSA MLPA probes were present for all 23 exons. In view of the large size of the introns, two probes were present for 12 of the exons, and a probe that was specific for the IVS14+1G>A mutation was also present. Amplified PCR products were separated in the 36 cm capillary filled with POP-7 polymer on an ABI PRISM 3130 analyzer (Applied Biosystems). Data were analyzed using Gene Mapper 4.0 software (Applied Biosystems). Coffalyser software developed at MRC-Holland was used to normalize MLPA data. The peak area was normalized by dividing by the sum of areas of all peaks in that lane. Expected normalized values were 1.0 in the absence of copy number change, and 0.5 and 1.5 in the case of heterozygous deletion and duplication, respectively. Figure 1 shows the normal pattern of the *DPYD* gene MLPA analysis and the normalized MLPA results.

EuroGentest, an EU-funded Network of Excellence, has performed an inter-laboratory collaborative validation study of the MLPA method. In the validation report, data on specific performance parameters such as repeatability, reproducibility, accuracy, sensitivity and specificity are shown [18].

To confirm the absence of the IVS14+1G>A mutation in the DNA samples of our patients, we screened them by means of Real-Time PCR on an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We used the TaqMan® SNP Genotyping Assay (ID: C30633851) to study rs number 3918290 that corresponds to the mutation. Analysis of the amplification reaction was undertaken using the Sequence Detector software, version 2.0 (Applied Biosystems). Data were analyzed using the Allelic Discrimination Program (Applied Biosystems). Ten randomly selected DNA samples were sequenced to confirm the results.



**Figure 1**

A) Normal pattern of the *DPYD* gene MLPA analysis. There are 40 MLPA probes for the *DPYD* gene (12 exons were covered by two probes and three probes were present for exon 1. The 436 nt probe will only generate a signal on DNA samples containing the IVS14+1 G>A mutation) and eight control probes. On the x-axis all these probes are indicated. B) Normalized MLPA results where the y-axis shows the relative probe peak height as an indication of copy number. Normalized values were 1.0 in the absence of copy number change, and 0.5 and 1.5 in the case of heterozygous deletion and duplication, respectively

## Results and discussion

Severe toxicities were frequent in this group of patients. One hundred and four patients (44.4%) suffered a grade 3–4 adverse effect. The most frequent were asthenia (34.6%), nausea (14.5%), diarrhoea (23%) and neutropenia (40.2%) (Table 1).

In our MLPA studies, no differences were found in signal intensities of 15 probes covering the whole FRA1E site

(exons 9–18) or in seven probes located in maximum breakage region (exons 13–16). Thus, no deletion/duplication of *DPYD* exons was found in any of the 234 patient samples.

Few studies have investigated the *DPYD* gene using MLPA [19]. A recent clinical genetic study [1] reported that large intragenic rearrangements of the *DPYD* gene were present in five severely affected patients from a series of 72 patients with complete DPD deficiency. This report dem-

**Table 1**

Baseline characteristics of the 234 patients

Gender (men/women)	150 (64%) 84 (36%)
Median age (range, years)	64 (24–83)
Performance status	
0–1	182 (77%)
>1	52 (23%)
Therapeutic regimen	
FOLFOX	124 (53%)
FOLFIRI	110 (47%)
Number of cycles of chemotherapy	
Median (range)	9 (1–20)
Cases with toxicity grade 0–2	10 (3–20)
Cases with toxicity grade 3–4	8 (1–20)
Primary tumour localization	
Colon	84 (36%)
Rectum – Sigma	150 (64%)
Toxicity grade 3–4*	
Nausea	34 (14.5%)
Diarrhoea	54 (23%)
Neutropenia	94 (40.2%)
Asthenia	81 (34.6%)

\*Patients who developed high toxicity only.

onstrated for the first time the presence of large deletions in the *DPYD* gene in these DPD deficient cases. In a pharmacogenetic context, Ticha *et al.* [20] studied 68 cancer patients treated with a 5-FU containing regimen who had developed high-grade gastrointestinal and/or haematological toxicity. The MLPA analysis of the *DPYD* gene in these patients did not find any deletion/duplication although the IVS14+1G>A mutation was identified in five cases. Similarly, in the present work that includes a large number of colorectal cancer patients, no duplications or deletions were found, indicating that the large genomic rearrangements in the *DPYD* gene do not play a significant role in the toxicity developed by 44.4% of the cases included in the study.

A number of studies have been published concerning the involvement of the IVS14+1G>A mutation in the 5-FU related toxicity. Raida *et al.* studied the prevalence of the splice mutation IVS14+1G>A in 850 Caucasian individuals and in a cohort of 25 cancer patients with grades 3–4 toxicity on 5-FU. The mutation was identified with a frequency of about 1% in Caucasian control individuals. In the group of patients, 20% were heterozygous and 4% were homozygous for the mutation. The authors concluded that carriers of this mutation were at significantly increased risk to experience life-threatening effects on 5-FU treatment, even when the allelic status was heterozygous [10]. Van Kuilenburg *et al.* evaluated the DPD activity and the prevalence of the common splice site mutation IVS14+1G>A in blood samples obtained from 60 cancer patients suffering from severe grade 3–4 toxicity after the administration of 5-FU. A decreased DPD activity was detected in peripheral blood mononuclear cells in 60% of the cases. Furthermore, a high prevalence of the IVS14+1G>A mutation was noted

as 28% of all patients were heterozygous or homozygous for this mutation. In patients with a low DPD activity, 42% were heterozygous and one patient (3%) was homozygous for the IVS14+1G>A mutation. In contrast, the IVS14+1G>A mutation was detected in only one out of 24 (4%) patients with a normal DPD activity [11]. To investigate the role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity, a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group was performed. The study included 683 patients with cancer treated with FU monotherapy. Analysis according to toxicity type revealed a significant association of the IVS14+1G>A mutation in the *DPYD* gene with mucositis and leucopenia. The mutated allele was found heterozygously in 13 out of 683 patients (1.9%) and there was a clear relationship with gender. Five of the six carriers with severe toxicity were men, whereas six of the seven carriers who did not develop toxicity were women [21]. In a recent paper [22], Magne *et al.* analyzed both DPD activity and the IVS14+1G>A mutation in 131 case-reports with 5-FU-related toxicity. A very low incidence (2%) of the mutation was observed and the authors stated that IVS14+1G>A mutation screening has limited effectiveness in identifying patients at risk for severe 5-FU toxicity in a French population.

In this work, using the MLPA method, no differences were found in signal intensity of the specific probe for the IVS14+1G>A mutation. As the presence of the IVS14+1G>A mutation was excluded, we can conclude that this mutation is not associated with the development of serious toxicity associated with a 5-FU containing regimen in this large group of Spanish patients.

## Competing interests

There are no competing interests to declare.

*This work has been partially financed by FIS (08/0199). DP is a recipient of the fellowship CM08/00065 from the Instituto de Salud Carlos III.*

## REFERENCES

- Mazhar D, Stebbing J, Heller W. Recent advances in the systemic management of colorectal cancer. *Future Oncol* 2006; 2: 643–50.
- Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 1987; 47: 2203–6.
- Meta-Analysis Group in Cancer. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3537–41.
- Van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2004; 40: 939–50.

- 5 Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renée N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer* 1999; 79: 627–30.
- 6 Blasco H, Boisdron-Celle M, Ougnoux P, Calais G, Tournamille JF, Ciccolini J, Autret-Leca E, Le Guellec Ch. A well-tolerated 5-FU based treatment subsequent to severe capecitabine-induced toxicity in a DPD-deficient patients. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 65: 966–70.
- 7 Yokota H, Fernandez-Salguero, P, Furuya, H, Lin, K, McBride, OW, Podschun, B, Schnackerz, KD, Gonzalez, FJ. cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, and enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J Biol Chem* 1994; 269: 23192–6.
- 8 Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, Albin N, Diasio RB. Structural organization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Cancer Res* 1997; 57: 1660–3.
- 9 Van Kuilenburg AB, Vreken P, Abeling NG, Bakker HD, Meinsma R, Van Lenthe H, De Abreu RA, Smeitink JAM, Kayserili H, Apak MY, Christensen E, Holopainen I, Pulkki K, Riva D, Botteon G, Holme E, Tulinius M, Kleijer WJ, Beemer FA, Duran M, Niezen-Koning KE, Smit GPA, Jakobs C, Smit LME, Moog U, Spaapen LJM, Van Gennip AH. Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 1999; 104: 1–9.
- 10 Raida M, Schwabe W, Häusler P, Van Kuilenburg AB, Van Gennip AH, Behnke D, Höffken K. Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2832–9.
- 11 Van Kuilenburg AB, Meinsa R, Zoetekouw L, Van Gennip AH. High prevalence of the IVS14+1 G>A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 555–8.
- 12 Hormozian F, Schmitt J, Sagulenko E, Schwab M, Savelyeva L. FRA1E common fragile site breaks map within a 370 kilobase pair region and disrupts the dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD). *Cancer Lett* 2007; 246: 82–91.
- 13 den Dunnen JT, White SJ. MLPA and MAPH: sensitive detection of deletions and duplications. *Curr Protoc Hum Genet* 2006; Chapter 7: Unit 7.14.
- 14 Pare L, Marcuello E, Altes A, del Rio E, Sedano L, Salazar J, Cortes A, Barnadas A, Baiget M. Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy. *Br J Cancer* 2008; 99: 1050–5.
- 15 Marcuello E, Altes A, Menoyo A, del Rio E, Gomez M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 678–82.
- 16 Miller SA, Dyles DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- 17 MRC-Holland. SALSA MLPA kit P103 DPYD. Available at <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF\E\t9bmuxqlhe/Lgqfk8HKjussj&ProductOID=56GZQQnogAM>).
- 18 EuroGentest. Available at [http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit5/trials/MLPA\\_validation\\_summary.pdf](http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit5/trials/MLPA_validation_summary.pdf)).
- 19 van Kuilenburg AB, Meijer J, Mul AN, Hennekam RC, Hoovers JM, de Die-Smulders CE, Weber P, Mori AC, Bierau J, Fowler B, Macke K, Sass JO, Meinsma R, Hennermann JB, Miny P, Zoetekouw L, Vijzelaar R, Nicolai J, Ylstra B, Rubio-Gozalbo ME. Analysis of severely affected patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency reveals large intragenic rearrangements of DPYD and a de novo interstitial deletion del(1)(p13.3p21.3). *Hum Genet* 2009; 125: 581–90.
- 20 Ticha I, Kleiblova P, Fidlerova J, Novotny J, Pohlreich P, Kleibl Z. Lack of large intragenic rearrangements in dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) gene in fluoropyrimidine-treated patients with high-grade toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 615–8.
- 21 Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, Kerb R, Bliedernicht J, Fischer J, Hofmann U, Bokemeyer C, Eichelbaum M, German 5-FU Toxicity Study Group. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2131–8.
- 22 Magne N, Etienne-Grimaldi MC, Cals L, Renee N, Formento JL, Francoual M, Milano G. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64: 237–40.



### **3.3.- Estudi farmacogenètic dels gens implicats en els mecanismes de reparació de l'ADN:**

*3.3.1.- Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy.*

Paré L, Marcuello E, Altés A, del Río E, Sedano L, Salazar J, Cortés A, Barnadas A, Baiget M.

Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona 08025, Spain.







**Resum:**

Es van estudiar els polimorfismes en els gens ERCC1, XPD, XRCC1 i GSTP1 en 126 malalts amb càncer colorectal avançat (CRC) per establir quins paràmetres moleculars podrien ser, en part, responsables de la resistència o la sensibilitat a la quimioteràpia basada en l'oxaliplatí (OX) com a tractament de primera línia. Els polimorfismes genètics van ser determinats per PCR en temps real en un ABI PRISM 7000 utilitzant ADN de sang perifèrica. La resposta clínica (RC), la supervivència lliure de progressió i la supervivència global van ser avaluades d'acord a cada genotip. En l'anàlisi univariant per la RC, els polimorfismes del ERCC1-118 i del XPD-751 van mostrar una associació significativa ( $p=0,02$  i  $p=0,05$ , respectivament). Al realitzar l'anàlisi multivariant, que inclou les variables clíniques més rellevants, només el ERCC1-118 manté l'associació significativa ( $p=0,008$ ). En l'anàlisi univariant per la SLP, ERCC1 -118 i XPD-751 van ser significatius ( $p=0,003$  i  $p=0,009$ , respectivament). En l'anàlisi multivariant, només el XPD-751 va ser significatiu per la SLP ( $p=0,02$ ). Finalment, els polimorfismes del ERCC1-118 i del XPD-751 van resultar significatius en l'anàlisi univariant per la SG ( $p=0,006$  i  $p=0,015$ , respectivament). Les dues variables genètiques mantenen la significació en l'anàlisi multivariant de supervivència de Cox ( $p=0,022$  i  $p=0,03$ ). Les nostres dades recolzen la hipòtesi segons la qual un augment en la reparació de l'ADN redueix el benefici dels tractaments basats en platí.



## Corrigendum

# Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy

**L Paré, E Marcuello, A Altés, E del Río, L Sedano, J Salazar, A Cortés, A Barnadas and M Baiget**

*British Journal of Cancer* (2009) **100**, 1368. doi:10.1038/sj.bjc.6605004 www.bjcancer.com  
© 2009 Cancer Research UK

**Correction to:** *British Journal of Cancer* (2008) **99**, 1050–1055. doi:10.1038/sj.bjc.6604671

Upon publication of the above manuscript in Volume 99 of *BJC*, the authors noted a small error in the affiliations of L Paré, E del Río, A Cortés and M Baiget. The full affiliations (addition in bold) is now shown below.

L Paré<sup>1</sup>, E Marcuello<sup>2</sup>, A Altés<sup>3</sup>, E del Río<sup>1,4</sup>, L Sedano<sup>4</sup>, J Salazar<sup>4</sup>, A Cortés<sup>1</sup>, A Barnadas<sup>2</sup> and M Baiget<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, **Universitat Autònoma de Barcelona**, Barcelona 08025, Spain;

<sup>2</sup>Department of Clinical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona 08025, Spain; <sup>3</sup>Department of Hematology, Fundació Althaia, Manresa, Spain; <sup>4</sup>Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona 08025, Spain



# Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy

L Paré<sup>1</sup>, E Marcuello<sup>2</sup>, A Altés<sup>3</sup>, E del Río<sup>1,4</sup>, L Sedano<sup>4</sup>, J Salazar<sup>4</sup>, A Cortés<sup>1</sup>, A Barnadas<sup>2</sup> and M Baiget<sup>\*1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona 08025, Spain; <sup>2</sup>Department of Clinical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona 08025, Spain; <sup>3</sup>Department of Hematology, Fundació Althaia, Manresa, Spain; <sup>4</sup>Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona 08025, Spain

To determine whether molecular parameters could be partly responsible for resistance or sensitivity to oxaliplatin (OX)-based chemotherapy used as first-line treatment in advanced colorectal cancer (CRC). We studied the usefulness of the excision repair cross-complementing 1 (*ERCC1*), xeroderma pigmentosum group D (*XPD*), *XRCC1* and *GSTP1* polymorphisms as predictors of clinical outcome in these patients. We treated 126 CRC patients with a first-line OX/5-fluorouracil chemotherapeutic regimen. Genetic polymorphisms were determined by real-time PCR on an ABI PRISM 7000, using DNA from peripheral blood. Clinical response (CR), progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were evaluated according to each genotype. In the univariate analysis for CR, *ERCC1*-118 and *XPD* 751 polymorphisms were significant ( $P=0.02$  and  $P=0.05$ , respectively). After adjustment for the most relevant clinical variables, only *ERCC1*-118 retained significance ( $P=0.008$ ). In the univariate analysis for PFS, *ERCC1*-118 and *XPD* 751 were significant ( $P=0.003$  and  $P=0.009$ , respectively). In the multivariate analysis, only the *XPD* 751 was significant for PFS ( $P=0.02$ ). Finally, *ERCC1*-118 and *XPD* 751 polymorphisms were significant in the univariate analysis for OS ( $P=0.006$  and  $P=0.015$ , respectively). Both genetic variables remained significant in the multivariate Cox survival analysis ( $P=0.022$  and  $P=0.03$ ). Our data support the hypothesis that enhanced DNA repair diminishes the benefit of platinum-based treatments.

*British Journal of Cancer* (2008) **99**, 1050–1055. doi:10.1038/sj.bjc.6604671 www.bjcancer.com

Published online 16 September 2008

© 2008 Cancer Research UK

**Keywords:** colorectal cancer; oxaliplatin-based chemotherapy; DNA-repair genes; polymorphisms; pharmacogenetics

The introduction of oxaliplatin (OX) into treatment regimens for advanced colorectal cancer (CRC) represented a significant advance in the success of chemotherapy. The synergistic effects of 5-fluorouracil (5-FU) and OX have increased response rates by up to 50% in first-line-treated patients (Saunders and Iveson, 2006), allowing surgery of isolated liver metastases that were previously considered unresectable. Oxaliplatin, a platinum-based chemotherapeutic agent that carries a 1,2-diamino-cyclohexane ring, has shown antitumour efficacy *in vitro* and *in vivo*. This bulky carrier group is considered to promote the formation of platinum–DNA adducts. As these adducts are more cytotoxic than those formed from other platinum agents, they are more effective in blocking DNA replication (Raymond *et al*, 1998). These adducts are recognised and repaired by the nucleotide excision repair (NER) pathway, which is a major cellular defence mechanism against the cytotoxic effects of platinum-based chemotherapeutic agents (Reed, 2005). The repairosome responsible for excision involves a number of genes, including excision repair cross-complementing 1 (*ERCC1*). This protein forms a heterodimer with

xeroderma pigmentosum group F to execute the incision into the DNA strand, 5' to the site of damage. There is also a co-ordinate expression of the xeroderma pigmentosum group D (*XPD*) with *ERCC1* and other genes in the NER repairosome complex.

The *ERCC1* gene, on chromosome 19q13.2–q13.3, encodes a protein of 297 amino acids. A number of polymorphisms have been identified in this gene: (i) a common single-nucleotide polymorphism (SNP) at codon 118, position 19007, that causes a C>T change coding for the same amino acid, asparagine; (ii) a second common SNP, located in position 8092 of the 3'-untranslated region, consisting of a C>A change; and (iii) an SNP (G>C) located in intron 3, position 19716. The *XPD* gene (also called *ERCC2*) maps on chromosome 19q13.3 and covers 21.14 kb of genomic DNA. Although several polymorphisms have been reported in this gene, the most frequent is the A751C polymorphism, which causes the substitution of a lysine residue by a glutamine.

Another repair mechanism, known as the base excision repair system (BER), has been identified in human cells. In this system, the *XRCC1* protein interacts with DNA ligase III and complexes with DNA polymerase and PARP (polyADP-ribose polymerase), facilitating the repair of DNA strand breaks and several types of DNA damage (Dianov, 2003). The *XRCC1* gene contains 17 exons and is located on chromosome 19q13.2. Although many polymorphisms have been documented, three non-synonymous polymorphisms, Arg194Trp (C>T), Arg280His (G>A) and

\*Correspondence: Dr M Baiget, Servei de Genètica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Pare Claret 167, Barcelona 08025, Spain; E-mail: mbaiget@santpau.es

Received 3 July 2008; revised 18 August 2008; accepted 22 August 2008; published online 16 September 2008

Arg399Gln (G>A), have been shown to impair DNA-repair capacity in some phenotypic studies.

Glutathione S-transferases (GST) are a multigene family of enzymes (cytosolic and membrane bound that catalyse the conjugation of glutathione to electrophilic xenobiotics to inactivate them and facilitate their excretion from the body). Glutathione S-transferases have an important function in the metabolism of potentially genotoxic compounds by preventing DNA damage and adduct formation. GSTP1, an isoenzyme belonging to the  $\pi$  class, participates in the detoxification of platinum derivatives and is an important mediator of both intrinsic and acquired resistance to platinum (Cullen *et al.*, 2003). The gene coding for GSTP1 is located on chromosome 11q13. The most studied polymorphism is an A>G substitution in position 313 in exon 5 that gives rise to Ile105Val.

In this work, we sought to determine whether different molecular parameters could be responsible in part for resistance or sensitivity to OX-based chemotherapy used as first-line treatment in advanced CRC patients. We studied the usefulness of the ERCCI, XPD, XRCCI and GSTP1 polymorphisms as predictors of the clinical outcome of these patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

One hundred and twenty-six patients diagnosed with metastatic CRC and receiving OX combined with 5-FU as first-line chemotherapy were included in the study. All patients had adequate bone marrow and organ function before treatment. Written informed consent was obtained, and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

### Chemotherapy regimen description

We administered a uniform chemotherapy regimen in this group of patients. It consisted of OX (85 mg m<sup>-2</sup> infused for 2 h every 2 weeks i.v.) and 5-FU (a pulse dose of 400 mg m<sup>-2</sup> on days 1 and 2 and a continuous infusion of 1200 mg m<sup>-2</sup> for 44 h) with i.v. leucovorin. Patients underwent chemotherapy cycles until severe toxicity or disease progression appeared.

### Clinical parameters

Relevant clinical data (gender, age, ECOG, adjuvant therapy, number of chemotherapy cycles, number of metastatic sites, colon vs rectum involvement, WBC count, alkaline phosphatase) were obtained from clinical records. We used four baseline clinical parameters (performance status, WBC count, alkaline phosphatase and number of metastatic sites) to classify the patients into three clearly separated risk groups (Kohne *et al.*, 2002). The model was adjusted to take this clinical risk classification into account in the multivariate analysis.

We also considered patients with isolated hepatic metastases because chemotherapy in these cases produced a sufficient reduction in tumour size to make curative resection feasible.

Response to treatment and progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were also analysed. Clinical response (CR), which was defined in accordance with WHO criteria (WHO, 1979), was assessed by CT scan every 3 months after the start of chemotherapy. Progression-free survival was defined as the time from the start of chemotherapy to the first occurrence of disease progression or death. Overall survival was calculated from the start of chemotherapy to death regardless of the cause.

Cumulative OX-induced neuropathy was scored on the OX-specific scale reported earlier (Caussanel *et al.*, 1990). According to this scale, the grade of cumulative neuropathy depends on the duration and intensity of symptoms (grade 1: paraesthesia, dysesthesia of short duration; grade 2: paraesthesia, dysesthesia persisting between cycles; grade 3: paraesthesia, dysesthesia causing functional impairment).

### Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes by the salting-out procedure (Miller *et al.*, 1988). All polymorphisms were analysed by means of real-time PCR on an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The TaqMan probes employed are given in Table 1. Each reaction contained template DNA and a final concentration of 1 × TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer, 100 nM of wild-type probe (Applied Biosystems) and 100 nM of variant probe (Applied Biosystems). Thermocycling was performed with an initial 50°C incubation for 2 min followed by a 10-min incubation at 95°C. A two-step cycling reaction was performed for 40 cycles, with denaturation at 92°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Analysis of the amplification reaction was undertaken using the Sequence Detector software, version 2.0 (Applied Biosystems). Data were analysed using Allelic Discrimination Program (Applied Biosystems). For each polymorphism, a minimum of 10 randomly selected DNA samples were sequenced to confirm the results and were subsequently used as controls.

### Statistical analysis

Differences between categorical variables were measured by the  $\chi^2$  test. Logistic regression was used as a multivariate method to ascertain which variables independently predicted CR. Kaplan–Meier estimates and the log-rank tests were employed in the univariate analysis of PFS and OS. A Cox regression model was used for PFS and OS multivariate analyses. The results were considered statistically significant when bilateral *P*-values were less than 0.05. We estimated classical LD measures *D'* and *r*<sup>2</sup> with the software LDA (Ding *et al.*, 2003).

## RESULTS

The frequencies of the different alleles of the genetic markers analysed (Table 1) showed values (data not shown) similar to those reported in Caucasian populations.

**Table 1** Genetic markers evaluated in this study

Polymorphism	dbSNP	NCBI Ref Seq	Exon	Genotype	Amino-acid substitution/position
ERCCI Asn118Asn	rs11615	NM_001983	4	C/T	Asn/118
ERCCI G19716C	rs3212948	NM_001983	Intron 3	G/C	—
ERCCI C8092A	rs3212986	NM_001983	3'-UTR	C/A	—
XPD Lys751Gln	rs13181	NM_000400	23	A/C	Gln/751
GSTP1 Ile105Val	rs1695	NM_000852	5	A/G	Val/105
XRCCI Arg194Trp	rs1799782	NM_006297	6	C/T	Trp/194
XRCCI Arg280His	rs25489	NM_006297	9	G/A	His/280
XRCCI Arg399Gln	rs25487	NM_006297	10	G/A	Gln/399

**Table 2** Baseline characteristics of the 126 patients

Gender (men/women)	81 (64%)/45 (36%)
Median age (range, years)	66 (34–83)
<b>Performance status</b>	
0–1	101 (80%)
> 1	25 (20%)
<b>Adjuvant therapy</b>	
No	89 (71%)
chemotherapy	24 (19%)
chemotherapy + radiotherapy	13 (10%)
<b>Number of cycles of chemotherapy</b>	
Median (range)	9 (1–20)
<b>Number of patients with isolated hepatic metastases</b>	
Yes	64 (51%)
No	62 (49%)
<b>Number of patients receiving surgery after QT</b>	
Yes	25 (20%)
No	39 (80%)
<b>Primary tumour localisation</b>	
Colon	45 (36%)
Rectum–sigma	81 (64%)
<b>Alkaline phosphatase levels</b>	
< 300 U l <sup>-1</sup>	105 (83%)
≥ 300 U l <sup>-1</sup>	21 (17%)
<b>WBC count</b>	
< 10 × 10 <sup>9</sup> per l	113 (90%)
≥ 10 × 10 <sup>9</sup> per l	13 (10%)
<b>Risk classification</b>	
High risk	21 (17%)
Intermediate risk	38 (30%)
Low risk	67 (53%)

Two SNPs in the *ERCC1* gene, located in intron 3 and exon 4, were in high linkage disequilibrium ( $D' = 1$ ,  $r^2 = 0.86$ ) (LD:  $P < 0.00001$ ): alleles with a C residue in *ERCC1*-118 contained a G residue in position 19716 and alleles with a T in codon 118 carried a C residue in position 19716. As both SNPs gave almost the same information for association analysis, from here on, we consider only the function of *ERCC1*-118.

### Genetic determinants and response

Clinical data are given in Table 2. A total of 126 patients who fulfilled all inclusion criteria were evaluated for response.

Two genetic markers were significantly associated with response: C118T in the *ERCC1* gene ( $P = 0.02$ ) and A751C in the *XPD* gene ( $P = 0.05$ ). Table 3 shows the relationships between response and these molecular determinants.

The C118T in the *ERCC1* gene maintained its predictive value in a logistic regression model of response ( $P = 0.008$ ). The probability of response was 3.7 times greater in patients with a TT or a C/T genotype than in patients with a C/C genotype (CI 95%; relative risk (RR): 1.4–9).

### Genetic determinants and survival

With regard to PFS, the two variables, the *ERCC1*-118 and the *XPD* 751 SNPs, showed a predictive value. For *ERCC1*-118, the median PFS was 10 months for TT and C/T cases and 6 months for C/C patients ( $P = 0.003$ ) (Figure 1A). For *XPD* 751, the median PFS was

**Table 3** Positive relationships between response and molecular determinants

	No clinical response	Clinical response	P
<b>ERCC1-118</b>			
TT	16 (38%)	26 (62%)	0.02
CT	21 (40%)	31 (60%)	
CC	17 (71%)	7 (29%)	
<b>ERCC1-19716</b>			
G/G	14 (70%)	6 (30%)	0.04
C/G	23 (40%)	35 (60%)	
C/C	18 (38%)	29 (62%)	
<b>XPD 751</b>			
AA	17 (33%)	35 (67%)	0.05
AC	23 (51%)	22 (50%)	
CC	14 (58%)	10 (42%)	

12 months for A/A patients and 8 months for A/C and C/C patients ( $P = 0.009$ ) (Figure 1B). Only *XPD* 751 and the clinical risk variable remained significant in the multivariate analysis. A/C and C/C patients had a 1.7 × increased risk to progress than A/A patients (RR 1.1–2.8,  $P = 0.02$ ).

As for OS, the *ERCC1*-118 and the *XPD* 751 SNPs defined significantly different survival groups of patients. For *ERCC1*-118, the median OS was 30 months for T/T and C/T and 11 months for C/C cases ( $P = 0.006$ ) (Figure 2A). For the *XPD* 751, the median OS was 41 months for AA patients and 17 months for A/C and C/C patients ( $P = 0.015$ ) (Figure 2B). Only *ERCC1*-118 and *XPD* 751 SNPs remained significant in the multivariate Cox survival analysis ( $P = 0.022$ ; RR = 1.8; CI 95%: 1.1–3 and  $P = 0.03$ ; RR = 1.6; CI 95%: 1.1–2.5, respectively).

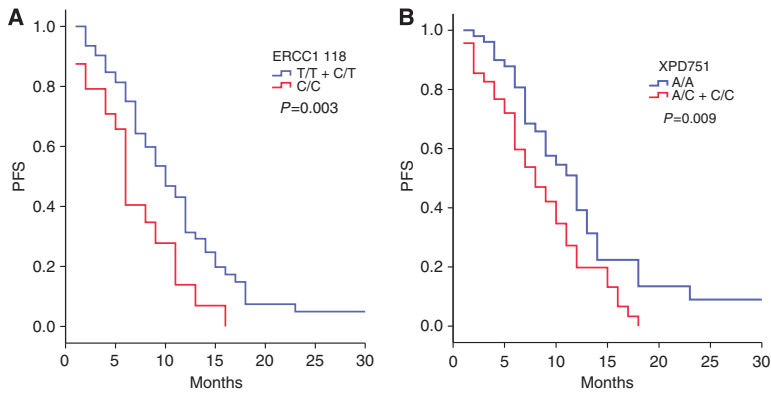
### Genetic determinants and neurotoxicity

We analysed whether the *GSTP1* Ile105Val polymorphism was associated with OX-related cumulative neuropathy in this group of patients. A median of 10 cycles per patient (range 6–16) was administered. The median dose intensity of OX was 85 mg m<sup>-2</sup> per 2 weeks and the median cumulative dose of OX was 850 mg m<sup>-2</sup> (range 510–1360). Maximal peripheral neuropathy was grade 3 in 4% (five patients), grade 2 in 52.4% (66 patients) and grade 1 in 32.5% (42 patients). No neurotoxicity was detected in the remaining patients. The distribution of the exon 5 *GSTP1* genotype was 35% for the Ile/Ile genotype (44 patients), 49% for the Ile/Val genotype (62 patients) and 16% for the Val/Val genotype (20 patients). Our allele frequency for the Val allele was 0.4 (102 of 252) and resembled earlier reports on allele frequencies for healthy Caucasians and for CRC patients (Watson *et al*, 1998; Welfare *et al*, 1999).

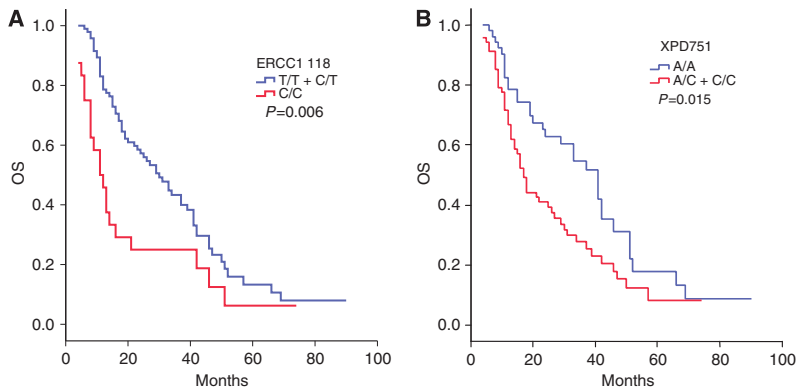
Grade 2 and 3 cumulative peripheral neuropathy was more common in patients with the Ile/Ile genotype (29/44 patients, 66%) than in patients with Ile/Val or Val/Val genotype (42/82 patients, 51%), but the difference did not reach statistical significance ( $P = 0.08$ ).

### Genetic determinants and resectability of liver metastases

Sixty-four of 126 patients (51%) had isolated hepatic metastases at diagnosis. Surgery was performed after chemotherapy when there was a sufficient reduction in tumour size (25/64; 39%). Twenty-two of the 25 patients (88%) underwent radical liver surgery with curative intent and three were treated with partial liver surgery. The median OS was 33 months in the group of patients with isolated hepatic metastases and 19 months in the remaining cases ( $P = 0.024$ ). The median OS was 46 months in the patients



**Figure 1** Progression-free survival according to the genotype of (A) ERCC1-118 and (B) XPD 751.



**Figure 2** Overall survival according to the genotype of (A) ERCC1-118 and (B) XPD 751.

who underwent surgery and 19 months in the remaining cases ( $P=0.001$ ). There was no association between the genetic markers analysed and the probability of receiving surgery after chemotherapy.

## DISCUSSION

Pharmacogenetic data concerning CRC patients treated with platinum-based chemotherapeutic regimens are scarce and sometimes contradictory. In an attempt to obtain clinically useful information, the present discussion is limited to data from similar studies concerning the diagnosis of the patient (CRC patients), the type of treatment (OX/5-FU) and the genetic markers studied (polymorphisms in genes related to the DNA-repair mechanisms). Our results are subsequently discussed gene by gene.

### ERCC1

An earlier pharmacogenomic study (Shirota *et al.*, 2001) demonstrated that intratumoral ERCC1 mRNA is an independent predictive marker of survival for 5-FU and OX combination chemotherapy. The authors showed a lower gene expression level for the excision repair gene (*ERCC1*) in responders than in non-responders. The same investigators (Park *et al.*, 2003, Stoehmacher *et al.*, 2004) devised retrospective studies to determine the association between the *ERCC1* codon 118 and 3'-UTR poly-

morphism and the clinical outcome of platinum-based chemotherapy in 106 patients with refractory advanced CRC. They found a significant association between the *ERCC1* codon 118 SNP and the clinical outcome: patients with the C/C genotype fared significantly better in terms of OS than those with the thymine allele. There was no significant association between the *ERCC1* C8092A polymorphism and the outcome. In a similar study (with *ERCC1* codon 118 SNP), other authors (Viguiet *et al.*, 2005) obtained contrasting results. The objective response rate to OX in combination with 5-FU was significantly higher in the T/T genotype group than in the C/T and C/C genotype groups (61.9, 42.3 and 21.4%, respectively;  $P=0.018$ ). In a comprehensive study of common polymorphisms in genes of DNA repair (Moreno *et al.*, 2006), it has been demonstrated that patients carrying a C/T and a C/C genotype for the *ERCC1* codon 118 polymorphism show a worse prognosis, with a hazard ratio (HR) of 1.72 (95% CI: 1.04–2.84;  $P=0.036$ ) compared with the T/T cases. The results of a prospective study of 166 patients with advanced CRC treated with first-line Folfox-4 chemotherapy were recently reported. This study, which involved eight medical oncology units from Italy (Ruzzo *et al.*, 2007), demonstrated that the *ERCC1*-118 T/T genotype is independently associated with adverse PFS in univariate and multivariate analyses.

The three clinical parameters analysed (CR, PFS and OS) in this work gave consistent results. Our findings demonstrate that patients with the C/C genotype in the *ERCC1* 118 polymorphism have a lower probability of response to treatment and a poorer



outcome. The fact that these patients were selected, treated and evaluated by the same clinical researcher, who was unaware of the genotyping findings during the study, confirms the validity of the criteria assessment of response and outcome, and lends further support to our results.

The polymorphism at codon 118 changes a common codon usage (AAC) to an infrequent codon (AAT), both coding for asparagine. Interestingly, it has been proposed that this C>T substitution impairs *ERCC1* translation (Yu *et al*, 1997). In an *in vitro* study, cells carrying the T allele showed a poor capacity to repair the adducts induced by cisplatin (Yu *et al*, 2000). These data support the pharmacogenetic role of the 118 C>T change and emphasise results that point to the T allele as a marker of a better outcome in patients with CRC treated with OX/5-FU schemes.

### XPD

In a study of 106 evaluable patients with advanced CRC who were treated with an OX/5-FU regimen as a second-line treatment, the impact of *XPD* 751 polymorphism was measured in PFS and OS (Stoehlmacher *et al*, 2004). Using the *XPD* 751 Lys/Lys group as a reference, the Gln/Gln group showed a 2.44-fold (95% CI: 1.09–5.44) increased risk of dying, whereas patients with the heterozygous genotype showed an intermediate RR of 1.87 (95% CI: 1.06–3.31) ( $P=0.049$ ), a difference that supported a multivariate analysis ( $P=0.037$ ). The same polymorphism had no impact on PFS. In an earlier study by the same team (Park *et al*, 2001), this polymorphism showed a similar effect on OS in 73 patients. Moreover, 24% of patients with the Lys/Lys genotype responded in contrast to 10% with Lys/Gln and 10% with Gln/Gln genotypes ( $P=0.015$ ). A further study (Ruzzo *et al*, 2007) of 166 patients with similar clinical characteristics indicates that this polymorphism also influenced PFS. Lys/Gln and Gln/Gln patients had HRs of 1.67 ( $P=0.06$ ) and 1.79 ( $P=0.03$ ), respectively, compared with Lys/Lys patients, a difference that was maintained in the multivariate analysis (HR 1.81,  $P=0.04$  and HR 2.21,  $P=0.01$ , respectively). Our results are in line with the above findings. Sixty-seven per cent of our Lys/Lys patients responded compared with 45% of Lys/Gln patients and 40.9% of Gln/Gln patients ( $P=0.047$ ). Likewise, a better OS for Lys/Lys patients was observed in the univariate and multivariate analyses. All the available data, including our present results, indicate that the *XPD* Lys751Gln polymorphism is a useful marker in predicting the clinical outcome of platinum-containing chemotherapy. As the present and previous reports are concordant with the results on the *XPD* 751 variant, a promising role for this marker is proposed.

### XRCC1

The first study on the utility of this gene as a pharmacogenetic marker showed that it was predictive of clinical outcome in 61 CRC patients treated with a combination of 130 mg m<sup>-2</sup> OX and continuous infusion 5-FU (Stoehlmacher *et al*, 2001). In this study, 73% of responders had an Arg/Arg genotype and three were heterozygous, but 66% of non-responders showed a Gln/Gln or Gln/Arg genotype ( $P=0.038$ ). Patients carrying at least one Gln allele had a 5.2-fold increased risk to fail chemotherapy (95% CI: 1.21–22.07). In a subsequent retrospective study that included 106 patients, the same team of investigators failed to confirm *XRCC1* Arg399Gln as a prognosticator (Stoehlmacher *et al*, 2004). Similar

negative results were reported in a prospective study of 166 patients where no association was found between this marker and PFS (Ruzzo *et al*, 2007). The results obtained in our study also did not show any evidence of the existence of an association between the three analysed SNPs (Arg194Trp, Arg280His and Arg399Gln) and the clinical parameters that define the CR and survival.

The fact that the NER pathway seems to play a major role in the repair of OX-induced DNA damage may account for the lack of association between clinical outcomes of patients treated with OX-containing regimens and polymorphisms in genes involved in other DNA-repair pathways, as is the case of *XRCC1*, which belongs to the BER system.

### GSTP1

In an unpublished report, no association was found between *GST* genotypes and OX-related cumulative neuropathy in a series of patients with advanced CRC (McLeod *et al*, 2003). A recent study (Lecomte *et al*, 2006) investigated the relationship between *GST* polymorphisms and OX-related cumulative neuropathy. In a group of 64 evaluable patients receiving a minimal cumulative dose of 500 mg m<sup>-2</sup> of OX, the cumulative neuropathy grade 3 was significantly more frequent in patients who were homozygous for the *GSTP1* 105Ile allele than in patients homozygous or heterozygous for the 105Val allele. The authors found no association with the *GSTM1*, *GSTT1* or *GSTP1* exon 6 genotypes. The results of this study suggested that the 105Val allele variant of the *GSTP1* gene confers a significantly decreased risk of developing severe OX-related cumulative neuropathy. We sought to ascertain the existence of this relationship in our group of patients with a comparable cumulative dose of OX. Our findings showed that severe neurotoxicity was less frequent in our group of patients than that reported by Lecomte *et al* (2006). This could be due to the fact that all our patients received first-line treatment, whereas 20% of the patients in Lecomte's series had received a prior chemotherapy treatment. In our patients, as in those in Lecomte's study, severe neurotoxicity was more frequent in the Ile/Ile homozygous patients than in the other groups. Nevertheless, this result did not reach statistical significance, possibly because the number of patients with severe neurotoxicity in our series was small.

The results from this study of patients with advanced CRC treated with first-line OX-based chemotherapy demonstrate the following. (i) A functional polymorphism within the *ERCC1* gene (codon 118) can predict response and OS. (ii) Significant associations exist between the *XPD* Lys751Gln polymorphism and OS and response. As the present and previous reports are concordant with the results on the *XPD* 751 variant, a promising role for this marker is proposed. (iii) No significant association can be found between *GSTP1* Ile105Val and OX-induced neurotoxicity. In conclusion, our data support the hypothesis that there is an inverse relationship between impaired DNA-repair capacity mediated by the NER pathway and superior responses to OX compounds.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (PI 05/1218).

### REFERENCES

- Caussanel JP, Levi F, Brienza S, Missel JL, Itzhaki M, Adam R, Milano G, Hecquet B, Mathe G (1990) Phase I trial of 5-day continuous venous infusion of oxalipatin at circadian rhythm-modulated rate compared with constant rate. *J Natl Cancer Inst* **82**: 1046–1050
- Cullen KJ, Newkirk KA, Schumaker LM, Aldosari N, Rone JD, Haddad BR (2003) Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res* **63**: 8097–8102

- Dianov GL (2003) Monitoring base excision repair by *in vitro* assays. *Toxicology* **193**: 35–41
- Ding K, Zhou K, He F, Shen Y (2003) LDA – a java-based linkage disequilibrium analyzer. *Bioinformatics* **19**: 2147–2148
- Kohne CH, Cunningham D, Di CF, Glimelius B, Blijham G, Aranda E, Scheithauer W, Rougier P, Palmer M, Wils J, Baron B, Pignatti F, Schoffski P, Micoel S, Hecker H (2002) Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol* **13**: 308–317
- Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lloriot MA (2006) Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val). predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* **12**: 3050–3056, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2076
- McLeod HL, Sargent DJ, Marsh S, Fuchs C, Ramanathan RK, Williamson S, Findlay B, Thibodeau S, Petersen G, Goldberg R (2003) Pharmacogenetic analysis of systemic toxicity and response after 5-fluorouracil (5FU)/CPT-11, 5FU/oxaliplatin (oxal) or CPT-11/oxal therapy for advanced colorectal cancer (CRC): results from an intergroup trial [Abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol* **22**: 253
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215
- Moreno V, Gemignani F, Landi S, Gioia-Patricola L, Chabrier A, Blanco I, Gonzalez S, Guino E, Capella G, Canzian F (2006) Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 2101–2108, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1363
- Park DJ, Stoecklacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ (2001) A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* **61**: 8654–8658
- Park DJ, Zhang W, Stoecklacher J, Tsao-Wei D, Groshen S, Gil J, Yun J, Sones E, Mallik N, Lenz HJ (2003) ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* **1**: 162–166
- Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG (1998) Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* **25**: 4–12
- Reed E (2005) ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res* **11**: 6100–6102, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1083
- Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, Catalano V, Ficarella R, Maltese P, Bissoni R, Masi G, Schiavon G, Giordani P, Giustini L, Falcone A, Tonini G, Silva R, Mattioli R, Floriani I, Magnani M (2007) Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* **25**: 1247–1254, doi:10.1200/JCO.2006.08.1844
- Saunders M, Iveson T (2006) Management of advanced colorectal cancer: state of the art. *Br J Cancer* **95**: 131–138, doi:10.1038/sj.bjc.6603233
- Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, Groshen S, Tsao-Wei DD, Danenberg PV, Lenz HJ (2001) ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* **19**: 4298–4304
- Stoecklacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, Lenz HJ (2001) A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* **21**: 3075–3079
- Stoecklacher J, Park DJ, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S, Lenz HJ (2004) A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* **91**: 344–354, doi:10.1038/sj.bjc.6601975
- Viguier J, Boige V, Miquel C, Pocard M, Giraudeau B, Sabourin JC, Ducreux M, Sarasin A, Praz F (2005) ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 6212–6217, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2216
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* **19**: 275–280
- Welfare M, Monesola Adekun A, Bassendine MF, Daly AK (1999) Polymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**: 289–292
- WHO (1979) *World Health Organization: Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment*. Publication no. 48. WHO: Geneva, Switzerland
- Yu JJ, Lee KB, Mu C, Li Q, Abernathy TV, Bostick-Bruton F, Reed E (2000) Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol* **16**: 555–560
- Yu JJ, Mu C, Lee KB, Okamoto A, Reed EL, Bostick-Bruton F, Mitchell KC, Reed E (1997) A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues. *Mutat Res* **382**: 13–20

## **4.- DISCUSSIÓ**



## **4.1.- Aspectes farmacogenètics del tractament amb 5-FU**

### **4.1.1.- El gen de la Timidilat Sintasa (TS)**

El mecanisme pel qual el 5-FU i els seus metabòlits provoquen citotoxicitat és a través de la inhibició de la TS, que és un enzim clau en la síntesi “*de novo*” de timidina per la cèl·lula. La inhibició de la TS comporta l’aturada de la síntesi de l’ADN i posa en marxa l’apoptosi i altres mecanismes de mort cel·lular.

En els últims anys s’han publicat diferents estudis clínics realitzats en pacients amb càncer colorectal que indiquen que l’expressió de la TS es correlaciona amb la sensibilitat i la resistència a règims de quimioteràpia basats en 5-FU. Estudis recents confirmen el paper del genotip de la TS com un paràmetre útil per predir la resposta al tractament amb 5-FU o combinat amb oxaliplatí o CPT11 en aquests pacients [Brody *et al*, 2006, Marsh *et al*, 2001, Pullarkat *et al*, 2001, Salgado *et al*, 2007, Suh *et al*, 2005, Villafranca *et al*, 2001]. També s’ha demostrat que el genotip de la TS és predictor independent de supervivència lliure de progressió i de supervivència global en els models de regressió de Cox després de l’ajust a les altres variables clíniques [Marcuello *et al*, 2004].

Un mecanisme important de control de l’expressió del gen TS podria atribuir-se a determinats polimorfismes en la regió promotora d’aquest gen. La substitució G>C del nucleòtid en la 12<sup>a</sup> posició de les VNTR de la regió 5'UTR canvia un residu crític en els elements de consens USF E-box (CACTTG), eliminant el lloc d’unió de factors de transcripció (USF) i alterant l’activitat transcripcional.

En el nostre estudi (apartat 3.1.1) vàrem plantejar la hipòtesi de què a mesura que augmenta el nombre de llocs d’unió, augmenten els nivells d’expressió de la TS. En conseqüència la resistència a 5-FU és més gran el que implica un pitjor pronòstic. Per aquesta raó, vàrem classificar 109

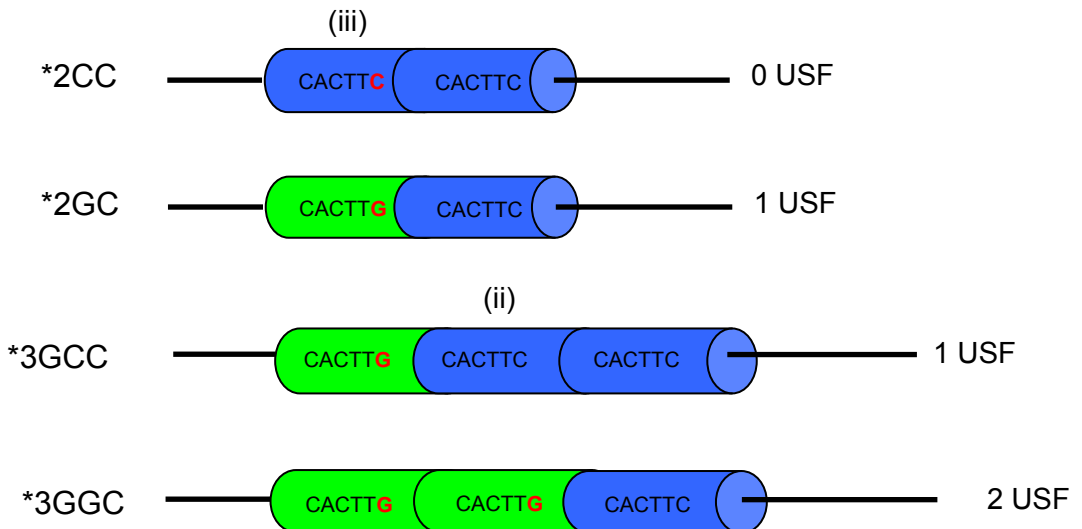
pacients en diferents grups d'acord amb el nombre de llocs d'unió USF (Figura 19).

*Figura 19. Esquema de la classificació teòrica dels al·lels del gen de la TS segons el nombre de llocs d'unió pel factors de transcripció USF1. Es mostren només els al·lels més freqüents. Els polimorfismes descrits en la regió promotora del gen, emprats en aquesta classificació són:*

CACTTG seqüència consens pel factor de transcripció USF-1.

- (i) número variable de repeticions en tandem o VNTR de 28 pb representat amb cilindres horitzontals.
- (ii) substitució de G>C en el 12è nucleòtid de la segona repetició en l'al·lel TS\*3.
- (iii) consisteix en un canvi de base de G>C en el 12è nucleòtid de la primera repetició de 28 pb de l'al·lel TS\*2.

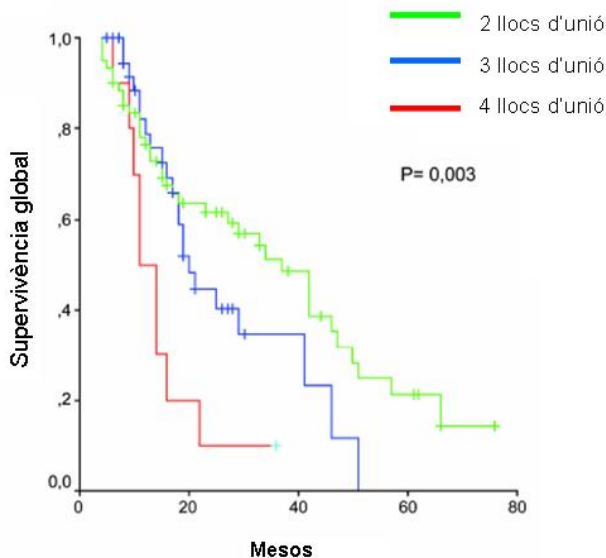
*A la part superior trobem la representació de l'al·lel TS\*2. En la primera estructura trobem el canvi de base G>C que provoca l'eliminació de la seqüència consens, per tant, no té cap lloc d'unió al USF1. La segona estructura està representat un al·lel TS\*2 amb un únic lloc d'unió. En la part inferior de la figura trobem dues estructures de l'al·lel 3. En la primera, el nucleòtid Guanina en la primera repetició de 28pb fa aparèixer la seqüència consens que permetrà que el factor de transcripció s'hi pugui unir. La segona estructura de l'al·lel TS\*3, té dues Guanines en la posició 12è tant de la primera com de la segona repetició de 28pb, per tant té dos llocs d'unió a factors de transcripció.*



S'ha de tenir en compte que en aquest treball s'ha considerat el paràmetre llocs d'unió en vers el genotip, que està format per 2 al·lels. Per exemple, en el cas de tenir un al·lel 2GC i un al·lel 3GCC, aquest individu té 2 llocs d'unió a factors de transcripció. Un individu amb 2 al·lels 3GGC tindria 4 llocs d'unió a factors de transcripció.

Els resultats que vam obtenir amb el nostre estudi es resumeixen en: pel que fa a la resposta clínica el percentatge de pacients en remissió clínica disminuïa a mesura que el nombre de llocs d'unió augmentava, encara que no es va assolir una relació estadísticament significativa. En considerar la supervivència global, es van observar diferències importants: una supervivència inferior en pacients amb quatre llocs d'unió, una supervivència intermèdia en pacients amb tres llocs d'unió i una supervivència superior en el grup de pacients amb només dos llocs d'unió ( $p=0,003$ ) (Figura 20). Els resultats de l'anàlisi de regressió de Cox demostren que el nombre de llocs d'unió USF és un marcador genètic que discrimina clarament tres grups diferents de supervivència en pacients amb risc intermedi segons la classificació del model clínic EORTC.

Figura 20: Corba de supervivència global en vers els llocs d'unió.



En conclusió, els nostres resultats demostren el valor predictiu del model clínic definit per Köhne *et al.*, aplicat als pacients tractats amb un règim de quimioteràpia combinada. A més, aquests resultats indiquen que el nombre de llocs d'unió USF en la regió promotora del gen TS és un bon paràmetre farmacogenètic en l'avaluació de l'eficàcia terapèutica d'un tractament amb 5-FU en pacients amb càncer colorectal avançat.

#### **4.1.2.- El gen de la Metilè-tetrahidrofolat reductasa (MTHFR)**

Està àmpliament acceptat que els nivells baixos de folat s'associen amb una major toxicitat pels inhibidors de la TS (5-FU). L'administració d'àcid fòlic pot reduir significativament la toxicitat d'aquests inhibidors preservant al mateix temps l'activitat antitumoral del fàrmac.

La MTHFR és un enzim clau del metabolisme del 5-FU i és capaç de modificar els nivells cel·lulars de folats i, per tant, d'alterar la sensibilitat de les cèl·lules al 5-FU. La MTHFR participa en la regulació dels nivells de folat intracel·lular, que són essencials per la síntesis de proteïnes i d'àcids nucleïcs. Catalitza la conversió irreversible de 5,10-metilè-tetrahidrofolat ( $\text{CH}_2\text{FH}_4$ ) a 5- metiltetrahidrofolat ( $\text{CH}_3\text{FH}_4$ ), que actua com a donador de radicals metil (Figura 2).

S'han descrit dos polimorfismes funcionals (C677T i A1298C) en el gen MTHFR. Les formes mutades d'aquestes variants comporten una menor activitat enzimàtica. Aquest fet podria elevar els nivells de 5,10-metiltetrahidrofolat intracel·lular que afavoririen la formació i l'estabilitat del complex ternari d'inhibició de la TS, 5,10-metiltetrahidrofolat i FdUMP. Es pot doncs hipotetitzar, que els pacients amb al·lels mutats haurien de ser més sensibles a 5-FU que els pacients amb un genotip de tipus salvatge.

Estudis *in vivo* mostren una taxa de resposta a 5-FU significativament millor pels genotips amb almenys un al·lel MTHFR 677T [Cohen *et al*, 2003, Jakobsen *et al*, 2005]. Un estudi en 142 pacients amb



adenocarcinoma de recte primari mostra uns resultats contraris: un increment de la regressió tumoral en els casos tractats amb quimioradioteràpia (inclou 5-FU) preoperatòria i amb un genotip homozigot 677 C/C [Terrazzino *et al*, 2006]. No obstant això, la majoria dels estudis han evidenciat que ni el polimorfisme 677C>T ni el 1298 A>C de la MTHFR són predictius de resposta o de supervivència en pacients tractats amb 5-FU [Jakobsen *et al*, 2005, Marcuello *et al*, 2006, Ruzzo *et al*, 2007, Sharma *et al*, 2008, Suh *et al*, 2006].

Pel que fa al compromís del genotip MTHFR en l'aparició de toxicitat associada al tractament amb 5-FU, un estudi recent reporta uns índexs més baixos de toxicitat amb genotips 677 T/T i 1298 A/A [Sharma *et al*, 2008]. De tota manera, la majoria d'estudis anteriors trobaren que ambdues variants de la MTHFR no estaven associades amb índexs de toxicitat alterats en diversos grups de pacients tractats amb derivats de 5-FU [Cohen *et al*, 2003, Largillier *et al*, 2006, Ruzzo *et al*, 2007].

Zhang *et al.* van demostrar per primera vegada que el polimorfisme A1298C té un paper com a marcador pronòstic si es considera el sexe dels pacients: en dones amb càncer de còlon metastàtic tractades amb quimioteràpia basada en 5-FU, el polimorfisme A1298C es relaciona amb la SG. Les pacients amb la MTHFR mutada 1298 C/C tenen una supervivència mitjana de 15,6 mesos comparat amb 13,9 mesos de les pacients heterozigotes A/C i 18,4 mesos en les pacients homozigotes A/A ( $p=0,038$ ).

En l'annex s'inclou la publicació Paré *et al.*, on vam reanalitzar els resultats d'un treball previ del nostre grup [Marcuello *et al*, 2006] i vam estratificar per sexe, seguint els criteris de Zhang *et al.* En aquest treball es demostra una associació estadísticament significativa ( $p=0,03$ ) entre el genotip MTHFR A1298C i la SG en les pacients de sexe femení: les dones amb genotip C/C presentaven una mitjana de 32 mesos, les pacients amb

genotip A/C presentaven una mitjana de SG de 16 mesos i les pacients amb genotip A/A tenien una mitjana de 42 mesos.

Aquestes dades junt amb les de Zhang *et al.*, apunten la conveniència d'estratificar els pacients segons el sexe en els estudis farmacogenètics de la MTHFR.

#### **4.1.3.- El gen de la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD)**

La dihidropirimidina deshidrogenasa catalitza el pas inicial en la via del catabolisme de les pirimidines i, per tant, del 5-FU. Catabolitza el 80% del 5-FU administrat a una forma inactiva, el 5-dihidrofluorouracil (5-FUH<sub>2</sub>) (Figura 2). Aquesta és la reacció limitant del catabolisme d'aquest agent que determina la biodisponibilitat del mateix.

L'administració del 5-FU comporta l'aparició de toxicitat greu en un 6-15% dels casos, amb un risc de mort de l'1-4% en funció de l'edat dels pacients [Boisdron-Celle *et al*, 2007, Ciccolini *et al*, 2006b, Tsalic *et al*, 2003]. Diversos estudis han demostrat la relació entre l'aparició dels efectes adversos associats a l'administració de 5-FU amb una activitat DPD reduïda [Bocci *et al*, 2002, Ciccolini *et al*, 2006a, Diasio *et al*, 1988, Saif and Diasio, 2006].

S'han descrit més de 40 mutacions puntuals en el gen DPYD. La mutació més freqüent en la població caucàsica consisteix en el canvi d'una G a una A que afecta la seqüència de reconeixement d'*splicing* de l'intró 14 (IVS14 +1 G> A) i dóna lloc a una deleció de 55 aminoàcids de la proteïna.

Els estudis farmacogenètics publicats mostren l'associació entre la presència de mutacions que comporten una activitat enzimàtica disminuïda o absent amb l'aparició d'efectes secundaris al tractament amb 5-FU [Raida *et al*, 2001, Ticha *et al*, 2009].

El primer estudi que planteja el paper que pot jugar la presència de deleccions de gran tamany o de reordenaments en el gen DPYD en la

toxicitat associada al tractament amb fluoropirimidines s'inclou en l'apartat 3.2.1 d'aquesta tesi. Vàrem estudiar 234 pacients amb càncer colorectal tractats amb quimioteràpia basada en 5-FU. Es va utilitzar la tècnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) i no es va detectar cap deleció/duplicació en el gen de la DPYD. La presència de la mutació IVS14+1 G>A també va ser exclosa. Amb aquests resultats vam arribar a la conclusió de que ni els grans reordenaments genòmics en el gen DPYD, ni la mutació IVS14 +1 G>A tenen un paper important en el desenvolupament d'efectes adversos severos associats amb un règim amb 5-FU en la població de malalts analitzada.

#### **4.2.- Aspectes farmacogenètics del tractament amb derivats del platí**

L'ADN és la diana preferent de la família d'agents derivats del platí. Actuen formant estructures aberrants que provoquen la ruptura de la molècula, interfereixen en la reparació de l'ADN i desencadenen el bloqueig de la replicació i la transcripció de l'ADN i, finalment, la mort cel·lular.

Les cèl·lules estan dotades d'uns mecanismes capaços de reparar el dany que diferents agents exògens li poden provocar. Les cèl·lules en presència dels derivats del platí desencadenen dues vies importants de reparació de l'ADN. Aquestes dues vies són la via NER i la via BER. Un altre mecanisme per prevenir el dany que provoquen els derivats del platí és la destoxicació a través d'enzims metabolitzadors de fase II, com les glutatió-S-transferases (GST).

Les variacions interindividuals en la capacitat de reparació de l'ADN poden modular la resposta als fàrmacs: l'activitat de les vies NER i BER, així com les GSTs, influeixen per tant, la resposta a les diverses quimioteràpies basades en platí.

#### **4.2.1.- La via NER de reparació de l'ADN**

En la via NER participen entre 30 i 40 proteïnes que són les responsables de la reparació dels adductes platí-ADN mitjançant l'escissió d'un fragment d'entre 22 i 32 nucleòtids en una de les cadenes de la doble hèlix d'ADN. En aquest procés té lloc la hidròlisi de l'enllaç fosfodièster en ambdós costats de la cadena lesionada, on s'ha format l'adducte amb el platí, i es promou la síntesi de nou fent servir l'altra cadena com a motlle. Les principals proteïnes que hi intervenen són les de la família *Xerorema Pigmentosum* (XP) i ERCC1.

Les dades farmacogenètiques en pacients amb càncer colorectal tractats amb règims de quimioteràpia basats en platí són escasses i, a vegades, contradictòries. A continuació s'exposen les dades d'estudis realitzats sobre el tractament amb OX/5FU i els marcadors genètics ERCC1, XPD (via NER), XRCC1 (via BER) i GSTP1 juntament amb els resultats obtinguts del nostre estudi.

#### **El gen de reparació per escissió del grup de complementació creuada 1 (ERCC1)**

En un primer treball es va descriure que un nivell baix de mRNA del gen ERCC1 s'associava de manera significativa amb una millor resposta i supervivència en pacients amb CCR tractats amb oxaliplatí-5FU [Shirota *et al*, 2001].

En els últims anys, l'estudi de polimorfismes dels gens que formen part dels sistemes reparadors de l'ADN ha sigut un punt important en el coneixement de la resistència a agents derivats del platí [Park *et al*, 2003, Ruzzo *et al*, 2007]. S'han identificat diversos polimorfismes en el gen ERCC1: a) un polimorfisme en el codó 118, posició 19007, que provoca un canvi C>T i no modifica l'aminoàcid resultant, l'asparragina (ASN) [Yu *et al*,

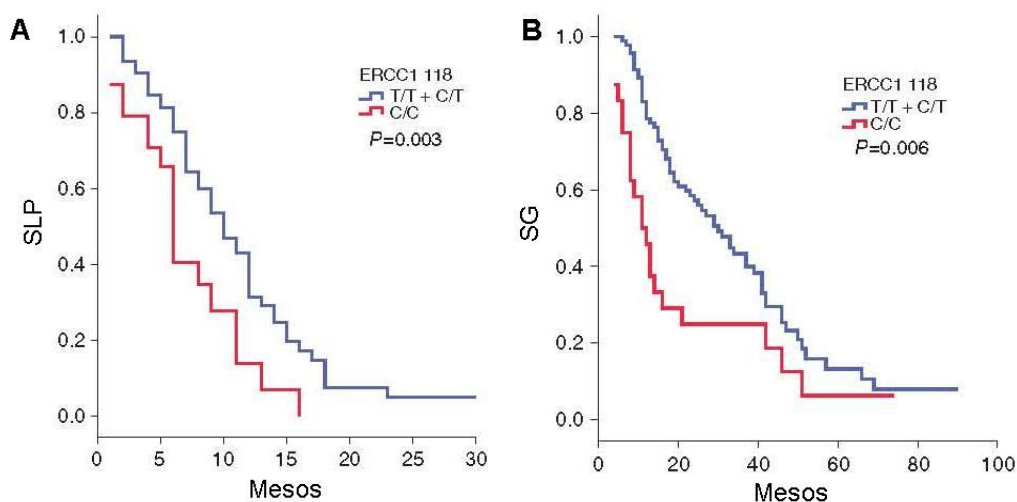
1997]; b) un segon polimorfisme, C>A, localitzat en la posició 8092 de la regió no traduïda 3' (3'-UTR) i c) un SNP localitzat en l'intró 3, posició 19716, que implica un canvi G>C.

El polimorfisme en el codó 118 de l'exó 4 s'ha relacionat amb resistència al tractament amb oxaliplatí [Martinez-Balibrea *et al*, 2008, Park *et al*, 2003, Stoeilmacher *et al*, 2004]. Els dos últims treballs publicats van plantejar estudis retrospectius per determinar l'associació entre els polimorfismes del codó 118 i el C8092A situat en la regió 3'-UTR del gen ERCC1 i la resposta clínica a la quimioteràpia basada en platí en 106 pacients amb CCR avançat refractari. Van trobar una associació significativa entre el polimorfisme del codó 118 del gen ERCC1 i els paràmetres clínics: els pacients amb el genotip C/C tenien una millor SG que els pacients amb genotip T/T. No es va evidenciar una associació significativa entre el polimorfisme C8092A i la resposta terapèutica. En un estudi similar, els autors [Viguiet *et al*, 2005] van obtenir uns resultats oposats: la taxa de resposta a l'OX en combinació amb 5-FU va ser significativament superior en els pacients amb genotip T/T que en el pacients amb genotip C/T i C/C (61,9, 42,3 i 21,4%, respectivament,  $p=0,018$ ).

En un ampli estudi realitzat amb els polimorfismes més freqüents dels gens de reparació de l'ADN [Moreno *et al*, 2006], es va demostrar que els pacients amb genotip C/C i C/T pel polimorfisme al codó 118 del gen ERCC1 tenien un pitjor pronòstic, amb un *hazard ratio* (HR) de 1,72 (IC 95%: 1.04-2.84,  $p=0,036$ ) en comparació amb pacients amb genotip T/T. Ruzzo *et al.*, amb col·laboració amb vuit unitats d'oncologia mèdica d'Itàlia [Ruzzo *et al*, 2007], van realitzar un estudi prospectiu de 166 pacients amb CCR avançat, tractats amb quimioteràpia en primera línia. Aquest estudi va demostrar que el genotip T/T del SNP ERCC1-118 té una associació independent amb una supervivència lliure de progressió superior, tant en els anàlisis univariants ( $p=0,0001$ ) com en els multivariants ( $p=0,006$ ).

El nostre treball (apartat 3.3.1) va donar uns resultats en la mateixa línia al analitzar els tres paràmetres clínics (resposta clínica, supervivència lliure de progressió i supervivència global): es demostra que els pacients amb el genotip C/C del polimorfisme ERCC1-118 tenen una probabilitat de resposta al tractament inferior i un pronòstic més descoratjador que els pacients amb genotip T/T ( $p=0,02$ ). Pel que fa a la SLP els pacients amb genotip T/T i C/T tenien una mitjana de supervivència de 10 mesos, mentre que els pacients amb genotip C/C era de 6 mesos ( $p=0,003$ ) (Figura 21.A). Aquest polimorfisme definia diferents grups de pacients respecte la supervivència: una SG de 30 mesos en els pacients amb genotip T/T i C/T i d'11 mesos en els pacients amb genotip C/C ( $p=0,006$ ) (Figura 21.B).

Figura 21: Polimorfisme ERCC1-118 versus (A) Supervivència lliure de progressió i (B) supervivència global



El fet que els pacients inclosos en el nostre estudi haguessin estat seleccionats, tractats i avaluats pel mateix investigador clínic, que desconeixia el genotip dels pacients durant l'estudi, confirma la validesa dels criteris d'avaluació i de la resposta dels resultats obtinguts. El

polimorfisme en el codó 118 provoca un canvi d'un codó comú (AAC) a un codó poc freqüent (AAT) i tot i que ambdós codons codifiquen per l'asparagina, s'ha proposat que aquesta substitució C/T afecta la traducció del gen ERCC1 [Yu *et al*, 1997]. En un estudi *in vitro*, les cèl·lules portadores d'al·lel T van mostrar una escassa capacitat per reparar els adductes induïts pel cisplatí [Yu *et al*, 2000]. Aquestes dades recolzen el paper farmacogenètic del canvi C/T del codó 118 i emfatitzen els resultats que apunten a l'al·lel T com a marcador de bon pronòstic en pacients amb CCR tractats amb règims OX/5-FU.

### **El gen xeroderma pigmentosa grup D (XPD)**

La proteïna XPD és essencial en la reparació d'excissió de nucleòtids i en la transcripció basal. Pel que fa al gen XPD, també conegut com a ERCC2, s'ha descrit un polimorfisme en l'exó 23 que causa un canvi aminoacídic (Lys751Gln) degut a un canvi de base (A>C) [Broughton *et al*, 1996]. Aquest polimorfisme XPD-751 pot estar associat amb una activitat diferencial de la reparació de l'ADN. Tenint en compte que un increment de la reparació de l'ADN juga un paper important en la quimioresistència dels compostos basats amb platí, hi ha diversos estudis que han estudiat l'associació d'aquest polimorfisme amb la resposta al règim de fluorouracil/oxaliplatí en pacients amb CCR avançat.

Park *et al*. van estudiar l'associació del polimorfisme XPD-751 i la supervivència i la resposta en 73 pacients amb càncer colorectal metastàtic. El 24% dels pacients amb genotip Lys/Lys van respondre, comparat amb el 10% dels Lys/Gln i el 10% dels Gln/Gln que no responien ( $p=0,015$ ). La mitjana de supervivència dels pacients amb genotip Lys/Lys era de 17,4 mesos versus 12,8 mesos dels pacients amb genotip Lys/Gln i 3,3 mesos dels Gln/Gln ( $p=0,002$ ). A més, d'aquests pacients amb el genotip Gln/Gln, el 50% tenien progressió de la malaltia comparat amb el

15% dels Lys/Lys i el 8% dels pacients amb genotip Lys/Gln ( $p=0,008$ ) [Park *et al*, 2001]. En un estudi posterior del mateix grup [Stoehlmacher *et al*, 2004], van estudiar l'impacte del polimorfisme XPD-751 en la supervivència lliure de progressió i la supervivència global en 106 pacients amb CCR avançat tractats amb un règim OX/5-FU com a tractament de segona línia. Aquest treball va mostrar que el grup de pacients amb genotip Gln/Gln tenien un risc 2,44 vegades (95% IC: 1.09-5.44) més elevat de mort, mentre que en pacients amb un genotip heterozigot el risc era de 1.87 (95% IC: 1.6 a 31/03) ( $p=0,049$ ). Aquesta diferència queda també evident en l'anàlisi multivariant ( $p=0,037$ ). El mateix polimorfisme no tenia impacte en la supervivència lliure de progressió.

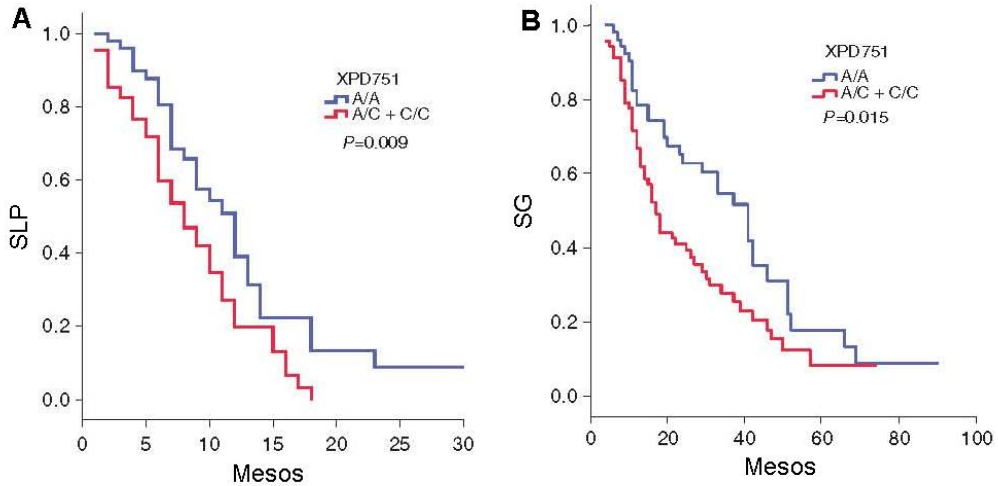
Un altre estudi [Ruzzo *et al*, 2007] de 166 pacients amb característiques clíniques similars indica que aquest polimorfisme influeix en la SLP. Els pacients amb genotip Lys/Gln i Gln/Gln tenien una HR de 1,67 ( $p=0,06$ ) i 1,79 ( $p=0,03$ ), respectivament, en comparació amb Lys/Lys pacients. Aquesta diferència es va mantenir en l'anàlisi multivariant (HR 1,81,  $p=0,04$  i 2,21 HR,  $p=0,01$ , respectivament).

Els nostres resultats (Apartat 3.3.1) estan en concordança amb les dades anteriors. El 67% dels nostres pacients amb genotip Lys/Lys van respondre en comparació amb el 50% de pacients amb genotip Lys/Gln i el 42% amb genotip Gln/Gln ( $p=0,05$ ). La mitjana de la supervivència lliure de progressió va ser de 12 mesos en els pacients amb genotip Lys/Lys i 8 mesos en els pacients amb genotip Lys/Gln i Gln/Gln ( $p=0,009$ ) (Figura 22.A). De la mateixa manera, aquest polimorfisme definia diferents grups de pacients de supervivència global. Els pacients amb genotip Lys/Lys tenien una SG de 41 mesos, i els pacients amb genotip Lys/Gln i Gln/Gln de 17 mesos ( $p=0,015$ ) (Figura 22.B). Aquests resultats seguien sent significatius en l'anàlisi multivariant ( $p=0,03$ ). Totes les dades existents, inclosos els nostres resultats actuals, indiquen que el polimorfisme



Lys751Gln del gen XPD és un marcador útil per ajudar a predir la resposta clínica i la supervivència de la quimioteràpia amb platí.

Figura 22: Polimorfisme XPD 751 versus (A) supervivència lliure de progressió i (B) supervivència global.



#### 4.2.2.- La via BER de reparació de l'ADN.

La via NER reconeix distorsions voluminoses a l'ADN mentre que, la via de reparació per escissió de bases (BER) reconeix lesions específiques. En la via BER les bases nitrogenades danyades són corregides mitjançant l'acció de glicosilases específiques [Friedberg EC, Walker GC, Siede W, 2006]. Tot i que la relació entre la via BER i l'acció dels platins és menys coneguda, s'ha descrit el paper de la proteïna XRCC1 en la reparació del dany produït per l'oxaliplatí [Martinez-Balibrea *et al*, 2007, Stoehlmacher *et al*, 2001, Suh *et al*, 2006].

## **El gen de reparació per raigs X del grup de complementació creuada 1 (XRCC1)**

S'han descrit tres polimorfismes en el gen XRCC1: Arg194Trp (C>T), Arg280His (G>A) i Arg399Gln (G>A), que alteren la capacitat de la proteïna de reparar l'ADN

El primer estudi sobre la utilitat d'aquest gen com a marcador farmacogenètic va demostrar que era un marcador predictiu de supervivència i de resposta en 61 malalts amb CCR tractats amb una combinació d'OX i infusió contínua de 5-FU [Stoehlmacher *et al*, 2001]. En aquest estudi, el 73% dels pacients que responien tenia un genotip Arg/Arg i el 27% eren heterozigots, i el 66% dels pacients que no responien tenien un genotip Gln/Gln o Gln/Arg ( $p=0,038$ ). Els pacients que presentaven almenys un al·lel Gln tenien un risc de fracassar amb la quimioteràpia 5,2 vegades superior (95% IC: 1.21 -22.07) que els portadors de l'al·lel Arg. En un estudi retrospectiu posterior, que va incloure 106 pacients, el mateix equip d'investigadors no va poder confirmar el resultat de què el polimorfisme Arg399Gln del gen XRCC1 era un marcador de pronòstic [Stoehlmacher *et al*, 2004]. Altres resultats negatius similars es van evidenciar en un estudi prospectiu en 166 pacients on no es va trobar associació entre aquest marcador i la SLP [Ruzzo *et al*, 2007].

En el nostre estudi (Apartat 3.3.1) no es van trobar evidències de l'existència d'una associació entre els tres SNPs analitzats (Arg194Trp, Arg280His i Arg399Gln) i els paràmetres clínics que defineixen la remissió completa i la supervivència. El fet de què la via NER jugui un paper més important en la reparació dels danys provocats per l'OX en l'ADN, pot explicar la manca d'associació entre els paràmetres clínics dels pacients tractats amb OX i els polimorfismes en gens implicats en altres vies de reparació de l'ADN, com és el cas de XRCC1, que pertany a la via BER.

#### 4.2.3.- La Glutatió-S-transferasa P1 (GSTP1)

La destoxicació cel·lular dels agents platinats es produeix principalment a través del sistema glutatió (GSH). Pel que fa a la destoxicació, la resistència a agents platinats ha estat relacionada amb altes concentracions de GSH i de  $\gamma$ -GT ( $\gamma$  glutamiltranspeptidasa), que forma part de la via de biosíntesi del primer [Byun *et al*, 2005, Stoehlmacher *et al*, 2001]. En canvi, els resultats obtinguts al correlacionar l'enzim glutatió-S-transferasa n (GSTn) amb la resistència a platins no han sigut consistents [Rabik and Dolan, 2007].

En diversos tumors sòlids, s'ha descrit que alts nivells de l'enzim GSTn provoquen resistència a aquests fàrmacs, ja sigui per la seva funció destoxicadora, ja sigui per la inhibició de la MAP quinasa [Goto *et al*, 2002, Townsend and Tew, 2003a, Townsend and Tew, 2003b]. S'ha descrit un polimorfisme a la posició 313 de l'exó 5 d'aquest gen que consisteix en un canvi de base nitrogenada (A>G) que es tradueix en un canvi d'aminoàcid (Ile105Val). La forma variant (Val) sembla ser menys efectiva en la destoxicació de carcinògens, això provoca una prolongada exposició de l'oxaliplatí al tumor i porta a un increment de l'eficàcia del fàrmac i una supervivència superior en els pacients portadors de l'al·lel Val davant tractaments basats en oxaliplatí [Stoehlmacher *et al*, 2002] encara que una pitjor toxicitat [Ruzzo *et al*, 2007]. Stoehlmacher *et al.*, l'any 2004, van demostrar que els pacients amb genotip Ile/Ile tenien 2,96 vegades més risc de mort i 2,13 més risc de progressió que els pacients amb genotip Val/Val. Tanmateix, altres estudis no van mostrar una correlació evident entre aquest polimorfisme i l'eficàcia del tractament amb aquest fàrmac [Ikeda *et al*, 2003, Miyatake *et al*, 2003].

En un estudi recent [Lecomte *et al*, 2006] es va investigar en 64 pacients avaluables, que rebien un mínim acumulat de dosi de 500 mg/m<sup>2</sup> d'OX, la relació entre els polimorfismes de la GSTP1 i la neuropatia

acumulada relacionada amb l'OX. La neuropatia acumulada (grau 3) va ser significativament més freqüent en els pacients que eren homozigots per l'al·lel Ile del gen GSTP1 que en els pacients homozigots o heterozigots per l'al·lel Val. Els resultats de aquest estudi suggereixen que la variant al·lèlica Val del gen GSTP1 confereix un risc significativament menor de desenvolupar neuropaties greus acumulades relacionades amb l'OX.

En el nostre grup de pacients tractats amb unes dosis acumulades d'OX vam voler determinar l'existència d'aquesta relació entre el polimorfisme Ile105Val i la neurotoxicitat. Els nostres resultats (Apartat 3.3.1) indiquen que les neurotoxicitats greus van ser menys freqüents en el nostre grup de pacients que en els pacients reportats per Lecomte *et al.* Això podria ser degut al fet que tots els nostres pacients van rebre el fàrmac en primera línia, mentre que un 20% dels malalts en la sèrie de Lecomte *et al.* havia rebut abans un altre tractament de quimioteràpia. En els nostres malalts, com en els de l'estudi de Lecomte *et al.*, les neurotoxicitats greus van ser més freqüents en els pacients amb genotip Ile/Ile que en els altres grups. No obstant això, aquest resultat no va ser estadísticament significatiu, possiblement pel petit nombre de pacients amb neurotoxicitat greu en la nostra sèrie. Els resultats d'aquest estudi demostren que no hi havia una associació significativa entre el polimorfisme Ile105Val i la neurotoxicitat induïda per l'OX.

## **5.- CONCLUSIONS**



Pel que fa a l'estudi de la relació de la resposta clínica i l'aparició d'efectes adversos del tractament amb 5-FU en pacients amb CCR avançat i el patró de polimorfismes/mutacions dels gens relacionats amb la via metabòlica de la síntesis de folats, les conclusions d'aquesta tesi són:

1. El nombre de llocs d'unió de factors de transcripció de la regió 5' no traduïda del gen de la Timidilat Sintasa és un marcador farmacogenètic de l'eficàcia del tractament amb 5-FU.
2. No s'ha evidenciat una associació entre els polimorfismes del gen de la Metilentetrahidrofolat reductasa (C677T i A1298C) i la toxicitat relacionada amb l'administració de 5-FU.
3. Existeix una associació estadísticament significativa entre el genotip A1298C del gen de la Metilentetrahidrofolat reductasa i la supervivència global en les dones tractades amb 5-FU.
4. Ni els reordenaments genòmics en el gen de la Dihidropirimidina deshidrogenasa, ni la presència de la mutació IVS14 +1 G>A tenen un paper rellevant en el desenvolupament d'efectes adversos associats amb el tractament amb 5-FU.

## Conclusions

Pel que fa a l'estudi de la relació de la resposta i de la toxicitat del tractament amb derivats del platí en pacients amb CCR avançat amb el patró de polimorfismes en gens relacionats amb els mecanismes de reparació de l'ADN de les vies de reparació NER i BER, les conclusions són:

### - Via NER:

1. El polimorfisme C118T del gen de reparació per escissió del grup de complementació creuada 1 és un bon marcador pronòstic que avalua la resposta i la supervivència en pacients amb CCR tractats amb règims OX/5-FU.
2. El polimorfisme Lys751Gln del gen xeroderma pigmentosa grup D és un marcador pronòstic que avalua la resposta i la supervivència global en pacients tractats amb derivats del platí.

### - Via BER:

1. No es demostra una associació entre els tres polimorfismes del gen de reparació per raigs X del grup de complementació creuada 1 i els paràmetres clínics que defineixen la remissió clínica i la supervivència.

Pel que fa a l'estudi de la resposta a la quimioteràpia amb derivats de platí en pacients amb CCR avançat en relació amb el polimorfisme de la Glutatió-S-transferasa, la conclusió és:

1. No es demostra associació significativa entre el polimorfisme lle105Val d'aquest gen i la neurotoxicitat induïda pel tractament amb oxaliplatí.



## **6.- ANNEX**



# Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms: Genomic Predictors of Clinical Response to Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy in Females

**TO THE EDITOR:** The article by Zhang et al<sup>1</sup> provides evidence that A1298C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) has a role as a prognostic marker in female patients with metastatic colon cancer treated with fluorouracil (FU)-based chemotherapy. The authors stated that further studies are needed to confirm these findings.

Recently, we reported a study in 94 patients with metastatic colorectal cancer who received FU and oxaliplatin chemotherapy as first-line treatment.<sup>2</sup> The aim of the study was to ascertain whether polymorphisms 677 C > T and 1298 A > C in the *MTHFR* gene could be used as genomic predictors of clinical outcome in this group of patients. Our results showed a lack of predictive value of these two *MTHFR* polymorphisms in this cohort. As we did not perform a stratified analysis by sex in our study, Zhang et al's results<sup>1</sup> prompted us to replicate their sex-specific analysis in our series of patients. We analyzed the previously studied population enlarged with 93 additional patients who met the inclusion and exclusion criteria defined in our previous study. Our present cohort comprised a total of 187 patients, 67 women (36%) and 120 men (64%). There were no statistically significant differences between the two populations—males and females—regarding location of the primary tumor, number of metastatic sites, WBC at diagnosis, Eastern Cooperative Oncology Group performance status, phosphatase alkaline levels, or global clinical assessment risk according to Kohne et al's classification.<sup>3</sup> Age was significantly different in the two groups (median age, 62 years for women and 67 years for men;  $P = .004$ ). The *MTHFR* polymorphisms were tested as previously described.<sup>2</sup> For *MTHFR* C677T polymorphism, 38% of patients had the C/C genotype (71 of 187 patients), 51% of patients had the C/T genotype (95 of 187 patients), and 11% of patients had the T/T genotype (21 of 187 patients). For *MTHFR* A1298C polymorphism, 46.5% of patients had the A/A genotype (87 of 187), 46.5% had the A/C genotype (87 of 187), and 7% had the homozygous C/C genotype (13 of 187 patients).

We found no differences in overall survival (OS) related to the *MTHFR* C677T or *MTHFR* A1298C markers when the analysis was performed without taking into account the variable sex. When the statistical analysis was stratified by sex, we found no differences in OS in men or women groups according to the *MTHFR* C677T polymorphism. However, when the patient population was separated by sex,

the *MTHFR* A1298C polymorphism was found to be significantly associated with OS (log-rank test,  $P = .03$ ) in females. Among females, OS was lower for patients with the A/C genotype ( $n = 33$ ; median OS, 16 months) than for patients with the A/A genotype ( $n = 28$ ; median OS, 42 months) or the C/C genotype ( $n = 6$ ; median OS, 32 months). The probability of death was 2.5 times higher for A/C patients (relative risk, 2.5; 95% CI, 1.2 to 5.3). However, there were no statistically significant differences between A1298C polymorphism and OS in male patients.

Our results confirm Zhang et al's<sup>1</sup> observation that the A1298C polymorphism in the *MTHFR* gene may play a pharmacogenetic role as a prognostic marker in female patients on FU-based chemotherapy. In both studies, OS was higher for C/C female patients than for A/C female patients. Although the number of patients with a C/C genotype was insufficient in either study ( $n = 10$  in Zhang's study and  $n = 6$  in our own) to allow a definitive conclusion, the OS in this group showed an intermediate value.

The differences in OS between the two studies could be attributed to the fact that all the patients in our cohort received a similar regimen as first-line chemotherapy. The value of the present data is enhanced by this therapeutic homogeneity.

*Laia Paré, Juliana Salazar, Elisabeth del Rio, and Montserrat Baiget*

Genetics Department, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

*Albert Altés*

Hematology Department, Hospital de l'Esperit Sant, Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain

*Eugenio Marcuello, David Paez, and Agustí Barnadas*

Medical Oncology, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

## ACKNOWLEDGMENT

Supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias 051218.

## AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

## REFERENCES

- Zhang W, Press OA, Haiman CA, et al: Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and sex-specific survival in patients with metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 25:3726-3731, 2007
- Menoyo A, Marcuello E, del Rio E, et al: Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: Genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol* 57:835-840, 2006
- Köhne CH, Cunningham D, Di Costanzo F, et al: Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: Results of a multivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol* 13:308-317, 2002

DOI: 10.1200/JCO.2008.17.6479

**IN REPLY:** The data by Pare et al confirming our results on *MTHFR* polymorphism are very critical to the identification of novel predictive and prognostic markers in patients with colon cancer. We applaud the efforts by Pare et al to test our findings in an independent patient cohort. These data suggest that there are potential sex-specific markers which may be predictive or prognostic in opposite ways in women versus men. We just published our data on epidermal growth

factor polymorphisms which also have different prognostic outcomes in men versus women.<sup>1</sup> This makes sense biologically, as it has been known that HER1/HER2 are coregulated with estrogen receptors, which provides a link to sex-specific markers. Colon cancer may be very special because it has been shown that estrogen levels in premenopausal women protects them against colon cancer development and that hormone replacement therapy can reduce colon cancer risk in

menopausal women. In addition, we have presented data showing polymorphisms in estrogen receptor  $\beta$  are associated with prognosis in patients with colorectal cancer, dependent on the sex.<sup>2</sup> Last year at the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, we presented data outcome on fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin in second-line chemotherapy in 152 patients identifying for the first time different predictive markers for women than for men further supporting that molecular marker should be evaluated for men and women separately.<sup>3</sup> In the past, markers were being adjusted for sex or other clinical/pathological prognostic factors but never analyzed independently. These findings strongly suggest that in colon cancer there may be a strong sex-specific molecular marker set associated with clinical outcome.

**Wu Zhang, Georg Lurje, and Heinz-Josef Lenz**

Division of Medical Oncology, University of Southern California/Norris Comprehensive Cancer Center, Keck School of Medicine, Los Angeles, CA

#### AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Although all authors completed the disclosure declaration, the following author(s) indicated a financial or other interest that is relevant to the subject matter under consideration in this article. Certain relationships marked

with a "U" are those for which no compensation was received; those relationships marked with a "C" were compensated. For a detailed description of the disclosure categories, or for more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to the Author Disclosure Declaration and the Disclosures of Potential Conflicts of Interest section in Information for Contributors.

**Employment or Leadership Position:** None **Consultant or Advisory Role:** Heinz-Josef Lenz, Chiron (C), Genentech (C), Response Genetics Inc (C) **Stock Ownership:** None **Honoraria:** Heinz-Josef Lenz, Lilly, Pfizer, Roche, Sanofi **Research Funding:** None **Expert Testimony:** None **Other Remuneration:** None

#### REFERENCES

1. Press OA, Zhang W, Gordon MA, et al: Gender-related survival differences associated with EGFR polymorphisms in metastatic colon cancer. *Cancer Res* 68:3037-3042, 2008
2. Press OA, Zhang W, Yang DY, et al: Survival differences related to estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) polymorphism and age in female patients with metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 22:275s, 2004 (suppl; abstr 3618)
3. Gordon MA, Zhang W, Yang DY, et al: Use of sex-specific genomic profile to predict clinical outcome in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with 5-fluorouracil/oxaliplatin. *J Clin Oncol* 25:193s, 2007 (suppl; abstr 4122)

DOI: 10.1200/JCO.2008.17.7063

## Efficacy of Sunitinib and Sorafenib in Non–Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Results From Expanded Access Studies

**TO THE EDITOR:** We refer to a recent report by Choueri et al<sup>1</sup> regarding the efficacy of sunitinib and sorafenib, respectively, in metastatic papillary renal cell carcinoma (PRCC) and chromophobe renal cell carcinoma (ChRCC). Although published as an Original Report, the study was not a clinical trial but a retrospective multicenter review of 53 patients with advanced PRCC and ChRCC. The rationale for this report was the lack of data on the activity of sunitinib and sorafenib in advanced PRCC and ChRCC, because recent trials were mostly restricted to patients with clear cell (CCRCC) histologies.

The most noteworthy aspects of the report were that both drugs may also prolong progression-free survival (PFS) in patients with non–clear cell histologies, and that sunitinib-treated patients had a statistically significant longer PFS compared with sorafenib-treated patients, especially in PRCC, even after adjusting for other clinical parameters.

This article, however, raises some questions: Are oral tyrosine kinase inhibitors in general less active in non–clear cell RCC than in CCRCC patients? Within the heterogeneous group of non–clear cell RCC, is the histologic subtype predictive for clinical activity of either sunitinib or sorafenib?

Renal cortical tumors have distinct histologic subtypes with varying degrees of metastatic potential. Conventional clear cell RCC, which comprises more than 80% of renal cortical tumors, has a less favorable outcome when compared with PRCC and ChRCC.<sup>2</sup>

Metastatic non–clear cell histologies including papillary, chromophobe, collecting duct, and unclassified cell types, respectively, are characterized by a resistance to systemic therapy and poor survival, with the survival for patients with chromophobe tumors being longer

than that for patients with metastatic collecting duct or PRCC.<sup>3</sup> Papillary carcinoma does not constitute a single morphologic, clinical, or genetic entity. Some variants are highly aggressive, whereas others are quite indolent. ChRCCs exhibit more indolent behavior than clear cell or papillary carcinomas.<sup>4</sup>

Both sorafenib and sunitinib have been approved by both the US Food and Drug Administration and the European Medicines Agency for the treatment of metastatic RCC, and have meanwhile largely replaced cytokines as the standard of care in this disease. However, randomized trials that have shown significant clinical activity of these drugs enrolled only patients with advanced CCRCC.<sup>5,6</sup> Our understanding of clinical activity of sunitinib and sorafenib in advanced CCRCC is largely based on the inhibition of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinases. ChRCC and PRCC overexpress c-Kit,<sup>7,8</sup> which is also a target of both drugs and could therefore provide a therapeutic target for non–clear cell subtypes of RCC.

It is questionable whether response rates in patients with ChRCC or PRCC who were treated with either sorafenib or sunitinib are the result of c-Kit inhibition.<sup>1</sup> Historical survival data associated with metastatic RCC of non–clear cell histology showed a median overall survival (OS) of 9.4 months (95% CI, 8 to 14 months). The median OS for patients with papillary and chromophobe tumors was 5.5 months (95% CI, 4 to 12 months) and 29 months (95% CI, 19 to 59 months), respectively.<sup>3</sup> Therefore, activity of oral tyrosine kinase inhibitors such as sunitinib and sorafenib in non–clear cell histologies is an unresolved issue of clinical relevance.

In addition to a published registration-study database, a number of expanded-access trials on both drugs have been performed in North America and also in Europe.<sup>9-11</sup> The primary aim of these nonrandomized, open-label trials was to make both drugs available to patients before regulatory approval. Nevertheless, analyses of this enormous database comprising thousands of patients are of great

## **7.- MATERIAL DERIVAT DELS TREBALLS DE LA TESI**



## A. COMUNICACIONES A CONGRESSOS NACIONALS

*III Congreso de la Sociedad española de Farmacogenética y Farmacogenómica. Santiago de Compostela 15-17 Noviembre 2007.*

- La toxicidad asociada al tratamiento con irinotecan: estudio farmacogenético colaborativo de pacientes con cáncer colorectal avanzado. **L. Paré**, E. Río, L. Sedano, M. Baiget, MJ. Lamas, P. Raña-Díez, F. Barros, A. Carracedo, E. Gonzalez-Haba, N. Barrueco, P. García, J.L. Jiménez, L.A. López-Fernández. Comunicació Oral.
- Métodos de genotipado de genes implicados en la reparación del ADN: su interés en la farmacogenética del tratamiento con derivados del platino. **L. Paré**, J. Salazar, E. del Rio, M. A Cortés, L. Sedano, M. Baiget . Comunicació Oral.
- El gen de la timidilato sintetasa (TS): estructura de la región 5' y su interés como parámetro farmacogenético. **L. Paré**, J. Salazar, E. del Rio, M. Calaf, A. Cortés, L. Sedano, M. Baiget . Pòster.
- Polimorfismos de la tiopurina metiltransferasa (TMPT) y la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en una población con leucemia aguda linfoblástica infantil. J. Salazar, **L. Paré**, A. Cortés, L. Sedano, M. Calaf, E. del Rio, M. Baiget. Pòster.

*II Congreso de la Sociedad española de Farmacogenética y Farmacogenómica. Valencia, Junio 2006.*

- Análisis de los genes GSTP1, ERCC1 y XPD como marcadores farmacogenéticos en el tratamiento con oxaliplatino del cáncer colorrectal avanzado. **L. Paré**, E. Marcuello, A. Altés, E. Del Rio, L. Sedano, A. Barnadas, M. Baiget. Pòster.
  
- *A single genetic variable (TS genotype) completes the predictive value of outcome of the EORTC clinical model in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin.* E. Marcuello, A. Altés, E. Del Rio, L. Sedano, **L. Paré**, A. Barnadas, M. Baiget. Pòster.
  
- Aplicación de la Farmacogenética a la individualización terapéutica en la leucemia aguda linfoblástica: presentación de un caso clínico I. Badell, E. Del Rio, **L. Paré**, L. Sedano, M. Baiget. Pòster.
  
- *Influence of thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on the disease-free survival of breast cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil based therapy.* **L. Paré**, T. Ramón y Cajal, A. Altés, E. Del Rio, C. Alonso, L. Sedano, A. Barnadas, M. Baiget. Pòster.



## **B. COMUNICACIONS A CONGRESSOS INTERNACIONALS**

*33rd ESMO Congress. 12-16 Septiembre 2008. Estocolomo.*

- Prognostic value of thymidylate synthase genotype in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-Fluorouracil. D. Páez López-Bravo, **L. Paré**, A. Altés, F. Sancho-Poch, X.González, J. Fernández, E. del Rio, E. Marcuello, A. Barnadas, M. Baiget. Pòster

*43rd ASCO Annual Meeting. June, 2007 Chicago, Illinois.*

- Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving 5-Fluorouracil (FU)/oxaliplatin (OX) as first-line chemotherapy. E. Marcuello, **L. Paré**, A. Altés, E. del Rio, L. Sedano, A. Barnadas, M. Baiget. Pòster



## **8.- FINANÇAMENT REBUT PELS TREBALLS DE LA TESI**



Els treballs que componen la tesi titulada “Estudis farmacogenètics en el tractament del càncer colorectal” han tingut el suport de les següents beques:

- Fondo de Investigación Sanitarias PI05/1218: Anàlisi de gens relacionats amb el metabolisme de fàrmacs, amb la reparació de l'ADN i de proteïnes diana com a marcadors de resposta clínica i toxicitat en el tractament quimioteràpic de pacients amb Càncer Colorectal avançat.
- Fondo de Investigación Sanitarias PI08/0199: Estudis farmacogenètics i farmacogenòmics en el tractament de tumors sòlids (Càncer Colorectal avançat i Càncer de Recte).
- Beca de movilidad para estancias breves en centros punteros dentro del Programa de Investigación Diana-Fundación Barrié-USC.
- AGAUR: beca per a estades a la recerca fora de Catalunya (BE-DGR 2009- 2n termini).



## **9.- BIBLIOGRAFIA**





- Amado RG**, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26(10):1626-34. Epub 2008 Mar 3.
- André T**, Colin P, Louvet C, Gamelin E, Bouche O, Achille E, Colbert N, Boaziz C, Piedbois P, Tubiana-Mathieu N, Boutan-Laroze A, Flesch M, Buyse M, de Gramont A (2003) A semimonthly versus monthly regimen of fluorouracil and leucovorin administered for 24 or 36 weeks as adjuvant therapy in stage II and III colon cancer: results of a randomized trial *J Clin Oncol* 21:2896-2903
- André T**, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators (2004) Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350(23):2343-51.
- André T**, Quinaux E, Louvet C, Colin P, Gamelin E, Bouche O, Achille E, Piedbois P, Tubiana-Mathieu N, Boutan-Laroze A, Flesch M, Lledo G, Raoul Y, Debrix I, Buyse M, de Gramont A (2007) Phase III study comparing a semi-monthly with a monthly regimen of fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for stage II and III colon cancer patients: final results of GERCOR C96.1. *J Clin Oncol* 20:3732-3738.
- Arbman G**, Nilsson E, Hallbook O, Sjobahl R (1996) Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 82:1297-1299
- Blasco H**, Boisdron-Celle M, Bougnoux P, Calais G, Tournamille JF, Ciccolini J, Autret-Leca E, Le Guellec C (2008) A well-tolerated 5-FU-based treatment subsequent to severe capecitabine-induced toxicity in a DPD-deficient patient. *Br J Clin Pharmacol* 65: 966-970
- Bocci G**, Danesi R, Allegrini G, Innocenti F, Di Paolo A, Falcone A, Conte PF, Del Tacca M (2002) Severe 5-fluorouracil toxicity associated with a marked alteration of pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its catabolite 5-fluoro-5,6-dihydrouracil: a case report. *Eur J Clin Pharmacol* 58: 593-595

- Boisdron-Celle M**, Remaud G, Traore S, Poirier AL, Gamelin L, Morel A, Gamelin E (2007) 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett* 249: 271-282
- Brody JR**, Hucl T, Gallmeier E, Winter JM, Kern SE, Murphy KM (2006) Genomic copy number changes affecting the thymidylate synthase (TYMS) gene in cancer: a model for patient classification to aid fluoropyrimidine therapy. *Cancer Res* 66: 9369-9373.
- Broughton BC**, Steingrimsdottir H, Lehmann AR (1996) Five polymorphisms in the coding sequence of the xeroderma pigmentosum group D gene. *Mutat Res* 362: 209-211
- Byun SS**, Kim SW, Choi H, Lee C, Lee E (2005) Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU Int* 95: 1086-1090.
- Casciato DA and Territo MC** (2009) *Manual of Clinical Oncology*. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins
- Chau I**, Norman AR, Cunningham D, Tait D, Ross PJ, Iveson T, Hill M, Hickish T, Lofts F, Jodrell D, Webb A, Oates JR (2005) A randomised comparison between 6 months of bolus fluorouracil/leucovorin and 12 weeks of protracted venous infusion fluorouracil as adjuvant treatment in colorectal cancer. *Ann Oncol* 16(4):549-57
- Ciccolini J**, Mercier C, Dahan L, Evrard A, Boyer JC, Richard K, Dales JP, Durand A, Milano G, Seitz JF, Lacarelle B (2006a) Toxic death-case after capecitabine + oxaliplatin (XELOX) administration: probable implication of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Chemother Pharmacol* 58: 272-275.
- Ciccolini J**, Mercier C, Evrard A, Dahan L, Boyer JC, Duffaud F, Richard K, Blanquicett C, Milano G, Blesius A, Durand A, Seitz JF, Favre R, Lacarelle B (2006b) A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. *Ther Drug Monit* 28: 678-685.
- Cohen V**, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R (2003) Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in

advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 9: 1611-1615

**Collins FS**, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS; US National Human Genome Research Institute. A vision for the future of genomics research. *Nature* 422: 835-47.

**Cullen KJ**, Newkirk KA, Schumaker LM, Aldosari N, Rone JD, Haddad BR (2003) Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 63: 8097-8102

**Cvitkovic E and Bekradda M** (1999) Oxaliplatin: a new therapeutic option in colorectal cancer. *Semin Oncol* 26: 647-662

**De Placido S**, Lopez M, Carlomagno C, Paoletti G, Palazzo S, Manzione L, Iannace C, Ianniello GP, De Vita F, Ficorella C, Farris A, Pistillucci G, Gemini M, Cortesi E, Adamo V, Gebbia N, Palmeri S, Gallo C, Perrone F, Persico G, Bianco AR (2005) Modulation of 5-fluorouracil as adjuvant systemic chemotherapy in colorectal cancer: the IGCS-COL multicentre, randomised, phase III study. *Br J Cancer* 17;93(8):896-904.

**Departament de Salut**, Generalitat de Catalunya, 2010. <http://www.gencat.cat/salut/depsalut/html/es/dir103/doc30334.html>.

**Dianov GL** (2003) Monitoring base excision repair by in vitro assays. *Toxicology* 193: 35-41

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

**Edge SB**, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A (2010) AJCC: Colon and rectum. *AJCC Cancer staging manual*. 7th Edition. New York, NY: Springer, 2010, pp 143–164

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

- Figueredo A**, Charette ML, Maroun J, Brouwers MC, Zuraw L (2004) Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *J Clin Oncol* 22(16):3395-407
- Friedberg EC**, Walker GC, Siede W (2006) DNA Repair and Mutagenesis. 2nd edition ed: ASM Press
- Frosst P**, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10: 111-113.
- Goldberg RM**, Tabah-Fisch I, Bleiberg H, de Gramont A, Tournigand C, Andre T, Rothenberg ML, Green E, Sargent DJ (2006) Pooled analysis of safety and efficacy of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin administered bimonthly in elderly patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 24(25):4085-91
- Gorlick R and Bertino JR** (1999) Drug resistance in colon cancer. *Semin Oncol* 26: 606-611
- Goto S**, Kamada K, Soh Y, Ihara Y, Kondo T (2002) Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs. *Jpn J Cancer Res* 93: 1047-1056
- Goyette P**, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 9: 652-656
- Grem JL** (2000) 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs* 18: 299-313
- Grolleau F**, Gamelin L, Boisdron-Celle M, Lapied B, Pelhate M, Gamelin E (2001) A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol* 85: 2293-2297

- Gusella M**, Bolzonella C, Crepaldi G, Ferrazzi E, Padrini R (2006) A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. *Pharmacogenomics J* 6: 421-424.
- Haller DG**, Catalano PJ, Macdonald JS, O'Rourke MA, Frontiera MS, Jackson DV, Mayer RJ (2005) Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of INtergroup 0089. *J Clin Oncol* 23:8671-8678
- Hanahan D and Weinberg RA** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70
- Horie N**, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K (1995) Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 20: 191-197
- Hurwitz H**, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
- Ikeda K**, Sakai K, Yamamoto R, Hareyama H, Tsumura N, Watari H, Shimizu M, Minakami H, Sakuragi N (2003) Multivariate analysis for prognostic significance of histologic subtype, GST-pi, MDR-1, and p53 in stages II-IV ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 13: 776-784
- IMPACT** (1995) Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 345:939-944
- IMPACT B2** (1999) Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. *J Clin Oncol* 17(5):1356-63.
- Jakobsen A**, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J (2005) Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. *J Clin Oncol* 23: 1365-1369.
- Kabbinavar FF**, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, Mass R, Perrou B, Nelson B, Novotny WF (2005) Addition of bevacizumab

to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 23(16):3697-705.

**Kawakami K**, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y (1999) Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 19: 3249-3252

**Kawakami K**, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV (2001) Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 7: 4096-4101

**Kawakami K and Watanabe G** (2003) Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 63: 6004-6007

**Köhne CH**, Cunningham D, Di CF, Glimelius B, Blijham G, Aranda E, Scheithauer W, Rougier P, Palmer M, Wils J, Baron B, Pignatti F, Schoffski P, Micheel S, Hecker H (2002) Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol* 13: 308-317

**Lamerdin JE**, Montgomery MA, Stilwagen SA, Scheidecker LK, Tebbs RS, Brookman KW, Thompson LH, Carrano AV (1995) Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics* 25: 547-554

**Largillier R**, Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Ciccolini J, Nebbia JF, Ginot A, Francoual M, Renee N, Ferrero JM, Foa C, Namer M, Lacarelle B, Milano G (2006) Pharmacogenetics of capecitabine in advanced breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 12: 5496-5502.

**Le Morvan V**, Smith D, Laurand A, Brouste V, Bellott R, Soubeyran I, Mathoulin-Pelissier S, Robert J (2007) Determination of ERCC2 Lys751Gln and GSTP1 Ile105Val gene polymorphisms in colorectal cancer patients: relationships with treatment outcome. *Pharmacogenomics* 8: 1693-1703.

- Lecomte T**, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lorient MA (2006) Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 12: 3050-3056.
- Lembersky BC**, Wieand HS, Petrelli NJ, O'Connell MJ, Colangelo LH, Smith RE, Seay TE, Giguere JK, Marshall ME, Jacobs AD, Colman LK, Soran A, Yothers G, Wolmark N (2006) Oral uracil and tegafur plus leucovorin compared with intravenous fluorouracil and leucovorin in stage II and III carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-06. *J Clin Oncol* 24:2059-2064
- Lunn RM**, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA (2000) XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 21: 551-555
- Mandola MV**, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, Ladner RD (2003) A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 63: 2898-2904
- Mandola MV**, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, Lenz HJ, Ladner RD (2004) A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 14: 319-327
- Marcuello E**, Altes A, del Rio E, Cesar A, Menoyo A, Baiget M (2004) Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 112: 733-737.
- Marcuello E**, Altes A, Menoyo A, Rio ED, Baiget M (2006) Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol* 57: 835-840.
- Marsh S**, McKay JA, Cassidy J, McLeod HL (2001) Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int J Oncol* 19: 383-386

- Martinez-Balibrea E**, Abad A, Aranda E, Sastre J, Manzano JL, Diaz-Rubio E, Gomez-Espana A, Aparicio J, Garcia T, Maestu I, Martinez-Cardus A, Gines A, Guino E, Spanish Group for the Treatment of Digestive Tumours (2008) Pharmacogenetic approach for capecitabine or 5-fluorouracil selection to be combined with oxaliplatin as first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 44: 1229-1237.
- Martinez-Balibrea E**, Manzano JL, Martinez-Cardus A, Moran T, Cirauqui B, Catot S, Taron M, Abad A (2007) Combined analysis of genetic polymorphisms in thymidylate synthase, uridine diphosphate glucuronosyltransferase and X-ray cross complementing factor 1 genes as a prognostic factor in advanced colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil plus oxaliplatin or irinotecan. *Oncol Rep* 17: 637-645
- Martinez-Frias ML**, Bermejo E, Perez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Mansilla E, Martinez-Fernandez ML, Rodriguez-Pinilla E, Rodriguez L, Ugarte M, Grupo de Trabajo del Estudio Colaborativo Espanol de Malformaciones Congenitas (ECEMC) (2008) Analysis of the frequencies of genotype combinations of 4 polymorphisms of genes acting on the folate cycle in the Spanish population. *Med Clin (Barc)* 131: 81-88
- Meta-Analysis Group in Cancer** (1998) Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol* 16: 3537-41
- Milano G**, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renee N (1999) Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer* 79: 627-630.
- Miyatake K**, Gemba K, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, Tabata M, Shibayama T, Takigawa N, Kawaraya M, Tanimoto M (2003) Prognostic significance of mutant p53 protein, P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in patients with unresectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 23: 2829-2836
- Moertel CG**, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH (1995) Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 13(12):2936-43.



- Moreno V**, Gemignani F, Landi S, Gioia-Patricola L, Chabrier A, Blanco I, Gonzalez S, Guino E, Capella G, Canzian F (2006) Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12: 2101-2108
- National Cancer Institute** (2009). <http://www.cancer.gov>.
- O'Connell MJ**, Martenson JA, Wieand HS, Krook JE, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, Gunderson LL, Rich TA (1994) Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 331:502-507
- O'Connell MJ**, Mailliard JA, Kahn MJ, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, Wieand HS (1997) Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 15:246-250
- O'Connell MJ**, Sargent DJ, Windschitl HE, Shepherd L, Mahoney MR, Krook JE, Rayson S, Morton RF, Rowland KM Jr, Kugler JW (2006) Randomized clinical trial of high-dose levamisole combined with 5-fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant therapy for high-risk colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6(2):133-9.
- Paré L**, Salazar J, del Rio E, Baiget M, Altes A, Marcuello E, Paez D, Barnadas A (2008) Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in females. *J Clin Oncol* 26: 3468; author reply 3468-9.
- Park DJ**, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ (2001) A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 61: 8654-8658
- Park DJ**, Zhang W, Stoehlmacher J, Tsao-Wei D, Groshen S, Gil J, Yun J, Sones E, Mallik N, Lenz HJ (2003) ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 1: 162-166
- Pullarkat ST**, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ (2001) Thymidylate

synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 1: 65-70

**Quasar Collaborative Group**, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ (2007) Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 370(9604):2020-9.

**Rabik CA and Dolan ME** (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33: 9-23.

**Raida M**, Schwabe W, Hausler P, Van Kuilenburg AB, Van Gennip AH, Behnke D, Hoffken K (2001) Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)- related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 7: 2832-2839

**Reed E** (2005) ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res* 11: 6100-6102.

**Relling MV and Dervieux T** (2001) Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 1: 99-108.

**Ruzzo A**, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, Catalano V, Ficarelli R, Maltese P, Bisonni R, Masi G, Schiavon G, Giordani P, Giustini L, Falcone A, Tonini G, Silva R, Mattioli R, Floriani I, Magnani M (2007) Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 25: 1247-1254.

**Saif MW and Diasio R** (2006) Is capecitabine safe in patients with gastrointestinal cancer and dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency? *Clin Colorectal Cancer* 5: 359-362

**Salgado J**, Zabalegui N, Gil C, Monreal I, Rodriguez J, Garcia-Foncillas J (2007) Polymorphisms in the thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes predict response and toxicity to capecitabine-raltitrexed in colorectal cancer. *Oncol Rep* 17: 325-328

- Saltz L**, Clarke S, Díaz-Rubio E (2007) Updated efficacy results from XELOX-1/NO16966, a randomised phase III trial in first-line metastatic colorectal cancer: Analysis of bevacizumab in combination with XELOX or FOLFOX-4. *Ann Oncol* 18:vii21 (suppl 7; abstr O-0032)
- Santi DV**, McHenry CS, Sommer H (1974) Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* 13: 471-481
- Sauer R**, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R; German Rectal Cancer Study Group (2004) Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351:1731-1740
- Sharma R**, Hoskins JM, Rivory LP, Zucknick M, London R, Liddle C, Clarke SJ (2008) Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and toxicity to capecitabine in advanced colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 14: 817-825
- Shirota Y**, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, Groshen S, Tsao-Wei DD, Danenberg PV, Lenz HJ (2001) ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 19: 4298-4304
- Smith RE**, Colangelo L, Wieand HS, Begovic M, Wolmark N (2004) Randomized trial of adjuvant therapy in colon carcinoma: 10-year results of NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 4;96(15):1128-32.
- Stoehlmacher J**, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, Lenz HJ (2001) A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 21: 3075-3079
- Stoehlmacher J**, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, Lenz HJ (2002) Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 936-942

- Stoehlmacher J**, Park DJ, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S, Lenz HJ (2004) A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 91: 344-354.
- Suh KW**, Kim JH, Kim do Y, Kim YB, Lee C, Choi S (2006) Which gene is a dominant predictor of response during FOLFOX chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal cancer, the MTHFR or XRCC1 gene? *Ann Surg Oncol* 13: 1379-1385.
- Suh KW**, Kim JH, Kim YB, Kim J, Jeong S (2005) Thymidylate synthase gene polymorphism as a prognostic factor for colon cancer. *J Gastrointest Surg* 9: 336-342, doi:10.1016/j.gassur.2004.09.030
- Terrazzino S**, Agostini M, Pucciarelli S, Pasetto LM, Friso ML, Ambrosi A, Lisi V, Leon A, Lise M, Nitti D (2006) A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene predicts poor tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiation. *Pharmacogenet Genomics* 16: 817-824.
- Ticha I**, Kleiblova P, Fidlerova J, Novotny J, Pohlreich P, Kleibl Z (2009) Lack of large intragenic rearrangements in dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) gene in fluoropyrimidine-treated patients with high-grade toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 64: 615-618.
- Townsend D and Tew K** (2003a) Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family. *Am J Pharmacogenomics* 3: 157-172
- Townsend DM and Tew KD** (2003b) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22: 7369-7375
- Tsalic M**, Bar-Sela G, Beny A, Visel B, Haim N (2003) Severe toxicity related to the 5-fluorouracil/leucovorin combination (the Mayo Clinic regimen): a prospective study in colorectal cancer patients. *Am J Clin Oncol* 26: 103-106
- Twelves C**, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H 3rd, Carrato A, Cassidy J, Cervantes A, Fagerberg J, Georgoulas V, Hussein F, Jodrell D, Koralewski P, Kröning H, Maroun J, Marschner N, McKendrick J, Pawlicki M, Rosso R, Schüller J, Seitz JF, Stabuc B, Tujakowski J, Van Hazel G, Zaluski J, Scheithauer W (2005) Capecitabine as

adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 352:2696-2704

- Tyagi P** (2005) Adjuvant irinotecan regimens in combination with infusional 5-fluorouracil/leucovorin fail to improve outcomes in surgically resected colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 5(2):86-8
- Ueland PM**, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE (2001) Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 22: 195-201
- Ulrich CM**, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD (2000) Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1381-1385
- Van Cutsem E**, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360(14):1408-17.
- Van der Put NM**, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62: 1044-1051
- Van Kuilenburg AB** (2004) Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 40: 939-950
- Velenik V**, Anderluh F, Oblak I, Strojan P, Zakotnik B. (2006) Capecitabine as a radiosensitizing agent in neoadjuvant treatment of locally advanced resectable rectal cancer: prospective phase II trial. *Croat Med J* 47:693-700
- Viguier J**, Boige V, Miquel C, Pocard M, Giraudeau B, Sabourin JC, Ducreux M, Sarasin A, Praz F (2005) ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 11: 6212-6217

- Villafranca E**, Okruzhnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E, Illarramendi JJ, Arias F, Martinez Monge R, Salgado E, Angeletti S, Brugarolas A (2001) Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 19: 1779-1786
- Vogel F** Moderne problem der humangenetik (1959) *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd.* 12: 52-125
- WATSON JD and CRICK FH** Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid (1953) *Nature* 171: 737-738
- Weltz J**, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW (2005) Colorectal cancer. *Lancet* 365:153-65
- Wiemels JL**, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF, United Kingdom Childhood Cancer Study investigators (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4004-4009
- Yu JJ**, Lee KB, Mu C, Li Q, Abernathy TV, Bostick-Bruton F, Reed E (2000) Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol* 16: 555-560
- Yu JJ**, Mu C, Lee KB, Okamoto A, Reed EL, Bostick-Bruton F, Mitchell KC, Reed E (1997) A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues. *Mutat Res* 382: 13-20
- Zhang W**, Press OA, Haiman CA, Yang DY, Gordon MA, Fazzone W, El-Khoueiry A, Iqbal S, Sherrod AE, Lurje G, Lenz HJ (2007) Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and sex-specific survival in patients with metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 25: 3726-3731