

Departamento de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

# **FARMACOGENÉTICA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER COLORRECTAL**

Tesis doctoral

**David Páez López-Bravo**

Directores: Dra. Montserrat Baiget Bastús  
Dr. Agustí Barnadas Molins

Servicios de Oncología Médica y Genética  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Barcelona, 2012



La **Dra. Montserrat Baiget Bastús** y el **Dr. Agustí Barnadas Molins**, Directores respectivamente del Servicio de Genética y del Servicio de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

CERTIFICAN

Que David Páez López-Bravo ha realizado bajo su dirección la presente tesis doctoral: **“Farmacogenética en el tratamiento del cáncer colorrectal”** y que es apto para su defensa delante de un tribunal para optar al título de Doctor en la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que este trabajo ha estado realizado en el Servicio de Genética y en el Servicio de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Dra. M. Baiget / Dr. A. Barnadas  
Directores







A mis padres

*"It's not what happens,  
it's how you handle it"*

J. Giorno





# ÍNDICE



<b>PRÓLOGO</b> .....	I
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.- El Cáncer Colorrectal</b> .....	3
<b>1.1.- Epidemiología</b> .....	3
<b>1.2.- Etiología</b> .....	3
<b>1.3.- Patogénesis y bases moleculares</b> .....	4
<b>1.3.1- Inactivación de genes supresores</b> .....	7
<b>1.3.2- Activación de oncogenes</b> .....	10
<b>1.3.3- Inestabilidad genómica</b> .....	11
<b>1.4.- Características anatómo-patológicas del CCR</b> .....	12
<b>1.5.- Diagnóstico y estadificación</b> .....	15
<b>1.6.- Factores pronósticos</b> .....	20
<b>1.7.- Tratamiento de la enfermedad localizada</b> .....	22
<b>1.7.1.- Cirugía</b> .....	22
<b>1.7.2.- Tratamiento adyuvante</b> .....	24
<b>1.7.3.- Tratamiento neoadyuvante</b> .....	27
<b>1.8.- Tratamiento de la enfermedad diseminada o metastásica</b> .....	29
<b>2.- Farmacogenética en el tratamiento del cáncer colorrectal</b> .....	35
<b>2.1.- Farmacogenética de los agentes quimioterápicos</b> .....	37
<b>2.1.1.- Fluoropirimidinas: El 5-Fluorouracilo y la capecitabina</b> .....	37
<b>2.1.2.- El oxaliplatino</b> .....	45
<b>2.1.3.- El irinotecán</b> .....	53
<b>2.2.- Farmacogenética de los agentes diana</b> .....	58
<b>2.2.1.- Cetuximab y panitumumab</b> .....	58
<b>2.2.2.- Bevacizumab</b> .....	68
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	73

<b>RESULTADOS</b> .....	77
1.- Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado .....	79
<b>1.1.- <i>Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-fluorouracil</i></b> .....	79
<b>1.2.- <i>A pharmacogenetic study in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy: polymorphisms in thymidylate synthase, EGFR, GSTP1 and DNA repair genes.</i></b> .....	93
2.- Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico: .....	107
<b>2.1.- <i>Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: Are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy?</i></b> .....	107
<b>2.2.- <i>A genotype-directed phase I–IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer</i></b> .....	117
<b>DISCUSIÓN</b> .....	127
1. Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado .....	129
2. Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico .....	135
<b>CONCLUSIONES</b> .....	141
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	147





# **PRÓLOGO**





El cáncer colorrectal (CCR) constituye un problema sanitario de gran trascendencia en nuestro medio debido a la alta incidencia y mortalidad (1). La cirugía con intención curativa es la forma primaria de tratamiento en pacientes con tumores localizados sin metástasis a distancia o en un contexto de enfermedad metastásica resecable (2). Sin embargo, la recurrencia tumoral después de la cirugía es habitual y, con frecuencia, la causa definitiva de la muerte. En el caso de tumores metastásicos irresecables cualquier aproximación terapéutica se realiza con fines paliativos.

El factor pronóstico más importante del CCR es el estadio del tumor definido mediante el sistema de estadificación TNM. Esta herramienta tiene en cuenta sólo factores relacionados con la extensión tumoral determinada por métodos clínicos, como la presencia de metástasis a distancia, y tras el estudio de la pieza quirúrgica (grado de penetración a través de la pared intestinal y presencia o ausencia de afectación ganglionar). Existen otros factores de mal pronóstico o de alto riesgo de recurrencia tumoral como la presencia de obstrucción y/o perforación intestinal, así como los niveles séricos de antígeno carcinoembrionario (CEA) antes del tratamiento. En los últimos años se han identificado un importante número de marcadores moleculares, algunos de los cuales pueden predecir con mayor exactitud la evolución de la enfermedad o incluso pueden influir en el tratamiento a elegir.

En la actualidad, el tratamiento sistémico estándar del CCR se fundamenta en diversos agentes quimioterápicos (fluoropirimidinas, oxaliplatino e irinotecán) y anticuerpos monoclonales contra el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) como bevacizumab (3) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como cetuximab y panitumumab (4, 5). A pesar del progreso que se ha producido en los últimos años en el tratamiento del CCR, la eficacia de estos fármacos, costosos y potencialmente tóxicos, sigue siendo limitada e impredecible y un considerable número de pacientes acabará falleciendo como consecuencia

de la progresión tumoral (2). Por tanto, el desarrollo de marcadores predictivos que ayuden a la mejor selección de los tratamientos a emplear en oncología es un área de investigación de máximo interés.

Con el fin de seleccionar el tratamiento adecuado a cada paciente se han identificado tanto mutaciones somáticas en el propio tumor como variaciones genéticas en la línea germinal entre los pacientes. Algunas de las mutaciones características de los tumores son utilizadas en la práctica diaria debido a su correlación con la respuesta antitumoral a diferentes tratamientos. Es el caso de la mutación en *EGFR* en tumores de pulmón no microcíticos para la selección de los pacientes candidatos a recibir los inhibidores de tirosín quinasa, gefitinib y erlotinib (6, 7), o la mutación del oncogén *KRAS* para la selección del tratamiento con cetuximab o panitumumab en pacientes con CCR metastático (8). Sin embargo, existen algunas limitaciones en el empleo de las mutaciones somáticas para ser usadas en la selección del tratamiento como son: la inestabilidad genética del cáncer a lo largo de la evolución de la enfermedad, la discordancia en el estatus mutacional entre el tumor primario y las lesiones metastásicas para algunas variantes genéticas, así como la discordancia entre diferentes muestras del mismo tumor.

De forma complementaria, la farmacogenética estudia las variaciones genéticas en la línea germinal, a partir del ADN que se obtiene de la sangre periférica u otros tejidos. Estas variantes genéticas pueden estar presentes en genes que codifican para proteínas diana o en enzimas involucradas en la farmacocinética de los fármacos y pueden ser responsables del aumento o disminución de la expresión proteica o de alterar la funcionalidad de la proteína para la que codifica. Como resultado de esto la respuesta a los medicamentos, tanto la eficacia como la toxicidad, puede verse alterada. El estudio de las variaciones genéticas en la línea germinal tiene la ventaja con respecto a las mutaciones somáticas que permanecen constantes a lo largo del tiempo y la obtención de ADN a partir de

sangre periférica o saliva es mínimamente invasiva. Además, las variaciones genéticas de la línea germinal están presentes en el tejido tumoral, y no así a la inversa ya que las mutaciones somáticas que se originan en el tumor no pueden ser detectadas en el ADN del paciente (9).

El propósito de la presente tesis es el estudio de diferentes variaciones genéticas pertenecientes a la línea germinal capaces de predecir la eficacia, el pronóstico y/o toxicidad a los tratamientos empleados en diversos escenarios del cáncer colorrectal.

En la primera parte de la tesis se analizan los polimorfismos genéticos vinculados al tratamiento neoadyuvante con quimiorradioterapia en cáncer de recto localmente avanzado. Se estudian un total de 13 polimorfismos localizados en 6 genes diferentes en relación a la eficacia tanto de la quimioterapia con 5-fluorouracilo, capecitabina y oxaliplatino, como de la radioterapia empleada en el tratamiento preoperatorio.

En una segunda parte de la tesis se estudian polimorfismos genéticos en relación al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Se investiga el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y su relación con el estado mutacional del oncogén *KRAS* en CCR metastásico refractario a quimioterapia de primera línea.

Por último y como ejemplo de aplicación clínica y de optimización de los estudios farmacogenéticos se presentan los resultados del ensayo clínico fase I-IV de búsqueda de dosis de irinotecán en primera línea de tratamiento en CCR metastásico según el genotipo de la uridina difosfato glucuronosil transferasa (*UGT1A1*), enzima clave en el metabolismo de dicho fármaco.



# **INTRODUCCIÓN**



## **1.- El Cáncer Colorrectal**

### **1.1.- Epidemiología**

El cáncer colorrectal (CCR) constituye un problema importante de salud pública por su elevada incidencia y mortalidad. A nivel mundial supone la tercera causa más frecuente de diagnóstico de cáncer en varones por detrás del cáncer de pulmón y próstata y la segunda en mujeres por detrás del cáncer de mama. Se estima una incidencia de más de 1,2 millones de nuevos casos y de 608.700 muertes por CCR en el año 2008 (1). En España, cada año se diagnostican más de 25.000 casos nuevos que representan el 15% de la incidencia de todos los tumores. Además, se trata de la segunda causa de muerte por cáncer, después del cáncer de pulmón, con más de 13.000 fallecimientos anuales. Con respecto a Europa, la incidencia y mortalidad de España son algo inferiores a las de los países del norte de Europa, pero con una tendencia temporal de incremento en la mortalidad superior a la de países como Francia, Italia y Reino Unido (10).

La edad tiene un impacto en la incidencia del CCR superior a cualquier otro factor demográfico. La edad promedio al diagnóstico es de 70 años y, en el 90% de los casos, se presenta en personas de más de 50 años. Los hombres tienden a presentar CCR a una edad más temprana que las mujeres, pero debido a la mayor esperanza de vida de las mujeres la tasa de incidencia en ambos sexos es la misma.

### **1.2.- Etiología**

La etiología del CCR es compleja e implica una interacción de factores medioambientales y genéticos. Esos factores pueden influir en el cambio de la

## Introducción

mucosa normal a un pólipo adenomatoso premaligno y de aquí al verdadero carcinoma colorrectal a lo largo de varios años.

La mayoría de los tumores (85-90%) son de aparición esporádica y secundarios a factores ambientales como el consumo de una dieta con alto contenido en grasas, carnes rojas y bajo contenido en fibra vegetal, el exceso de consumo de bebidas alcohólicas, la obesidad y el estilo de vida sedentario (11). Por el contrario, un 5-10% de los casos son causados por alteraciones en genes de susceptibilidad conocidos, tales como los genes reparadores de bases desapareadas (MMR), *APC* (adenomatous polyposis coli), *MYH* (mutY Homolog E. coli), etc. Dentro de las neoplasias hereditarias existen dos formas de cáncer colorrectal claramente definidas: la poliposis adenomatosa familiar (*Familial Adenomatous Polyposis*, FAP) y el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*, HNPCC) (12).

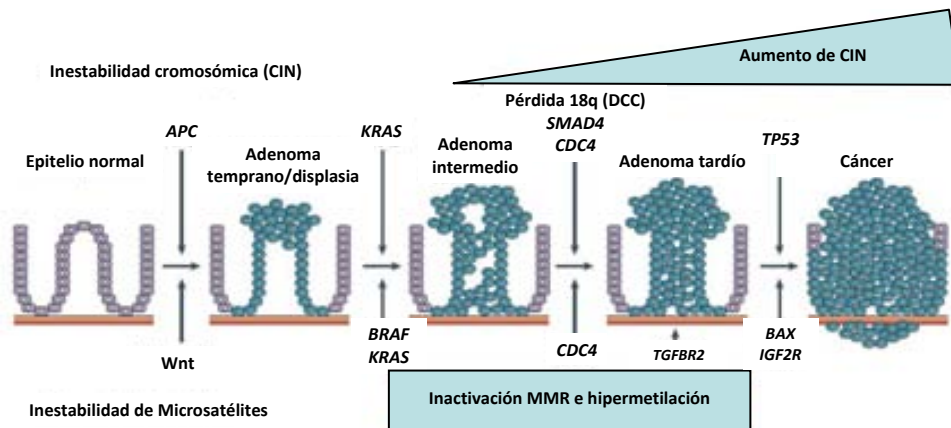
### 1.3.- Patogénesis y bases moleculares

El concepto de carcinogénesis colorrectal es un proceso multifásico resultado de una serie de alteraciones genéticas que afectan a genes reparadores del ADN, oncogenes y a la inactivación de genes supresores. En 1990 Fearon y Volgstein propusieron un modelo de carcinogénesis colorrectal que consideraba la acumulación de mutaciones que tenían lugar en la transición epitelio normal-adenoma-carcinoma. En una etapa temprana, durante el desarrollo de los pólipos, aparecen mutaciones en brazo largo del cromosoma 5 que incluye el gen *APC*. A continuación, durante la etapa adenomatosa se originan mutaciones en el gen *KRAS* y mutaciones en *p53* (cromosoma 17) y deleciones en el cromosoma 18 (gen *DCC*) que coinciden con la transición a carcinoma (13). Posteriormente se han identificado otros cambios adicionales a este modelo de carcinogénesis que



resultan en una inactivación de genes supresores, activación de oncogenes o inestabilidad genómica (Figura 1).

Figura 1.- Modelo de carcinogénesis colorrectal (epitelio normal-adenoma-carcinoma)



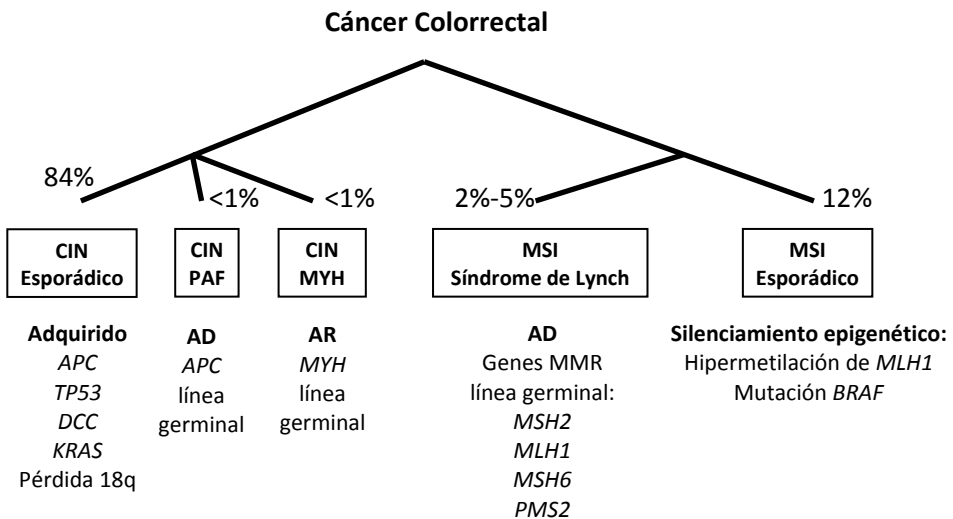
La mayoría de los CCR esporádicos surgen a través de la inestabilidad cromosómica (CIN; vía supresora) mediante cambios en el número de copias y estructura de los cromosomas que resultan en la pérdida de función de los genes supresores como *APC*, *TP53*, *DCC* y *SMAD4*. También se pueden producir mutaciones en oncogenes como en el caso de *KRAS* y pérdidas de heterocigidad (LOH). Pertenecen a esta vía supresora un pequeño porcentaje de tumores hereditarios en los que la inestabilidad cromosómica es secundaria a mutaciones de la línea germinal en el gen *APC* (poliposis adenomatosa familiar (FAP), menos de 1% de los CCR), o en el gen *MYH* (mutY Homolog E. coli; poliposis atenuada, 1% de los CCR).

Por otro lado, alrededor del 15% de los tumores esporádicos presentan una inestabilidad genómica distintiva, denominada inestabilidad de microsatélites

## Introducción

(MSI), basada en la acumulación de mutaciones en pequeñas secuencias del ADN no codificante o en una silenciación epigenética producida por una metilación aberrante de regiones promotoras de genes implicados en la proliferación, apoptosis y reparación del ADN (MMR; vía mutadora) (14, 15). Igualmente, un pequeño porcentaje de los CCR hereditarios surgen a través de la vía de MSI. En este caso, se heredan mutaciones en la línea germinal en uno de los genes de reparación del ADN de bases desapareadas (MMR; Síndrome de Lynch o cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), del 2% al 5% de los casos de CCR) (16) (Figura 2).

Figura 2.- Tipos de cáncer de colorrectal esporádico y hereditario. Abreviaturas: CIN, Inestabilidad cromosómica; MSI, Inestabilidad de Microsatélites; AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva; MMR, mismatch repair.



### 1.3.1- Inactivación de genes supresores

De los genes supresores que quedan inactivados durante la carcinogénesis, se detallan únicamente aquellos más relevantes.

#### **El gen *APC***

El gen supresor tumoral *APC* tiene un papel crítico en el desarrollo del CCR esporádico. Su principal función es regular los niveles de  $\beta$ -catenina a través de la vía de señalización Wnt. La actividad de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina va a depender de un complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina formado por las proteínas Axina, APC, casein quinasa1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) y GSK3 $\beta$  (glycogen synthetase kinase 3). Cuando Wnt, una glicoproteína secretada, se une al receptor Frizzled (Fz), se genera una actividad mediada por Dishevelled (Dvl) que inactiva GSK3 $\beta$  y por tanto se induce la estabilización de  $\beta$ -catenina (17). De esta manera, bien cuando existe una mutación de *APC* o una activación de Wnt se bloquea la fosforilación de  $\beta$ -catenina, lo que permite su acumulación. La  $\beta$ -catenina acumulada es traslocada al núcleo y forma un complejo con factores de transcripción como TCF/Lef (T-cell transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor) generando señales de proliferación y resistencia a la apoptosis como son la activación de los genes *c-Myc* y *Ciclina D* (18). En los tumores colorrectales esta vía está constitutivamente activada generalmente por mutaciones en el gen *APC* y, en una minoría de los casos, por mutaciones en la propia  *$\beta$ -catenina*.

La mutación del gen *APC* tiene lugar en etapas tempranas de la carcinogénesis ya que se encuentra mutado en alrededor de un 80% de los adenomas y de los carcinomas colorrectales (19). Se considera que las alteraciones en el gen *APC* son necesarias y suficientes para el desarrollo del tumor epitelial benigno adenoma (20). Las mutaciones en *APC* serían responsables del desarrollo de los focos de cripta aberrante como paso intermedio en la transición de mucosa normal y el

## Introducción

adenoma. Además es importante destacar que la primera mutación que se adquiere en este gen parece condicionar la naturaleza molecular de la segunda alteración (21). Dentro de las neoplasias hereditarias las mutaciones en el gen *APC* son las responsables del síndrome de herencia autosómica dominante conocido como Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP). Si bien, un 30% de las FAP se presentan como poliposis atenuadas con una herencia autosómica recesiva y alteraciones en el gen *MYH*.

### **El gen *TP53***

Si la pérdida de *APC* es crítica en la formación de un adenoma, la pérdida de *TP53* es clave en el paso de adenoma a carcinoma. El gen *TP53* codifica para una fosfoproteína nuclear que actúa como supresora del crecimiento celular. En presencia de daño no reparado en el ADN, p53 provoca una parada en el ciclo celular que conduce a un programa de muerte celular programada o apoptosis (22). Se han detectado mutaciones en el gen *TP53* en un 70% de los cánceres colorrectales. Su pérdida se asocia al aumento del daño genético que se evidencia en los carcinomas.

### ***TGF-β***

TGF- $\beta$  es una citoquina capaz de influir en el crecimiento y diferenciación celular, en la modulación a la respuesta inmune y en la modificación del microambiente necesario para la progresión de las células cancerígenas. La cascada de señalización de TGF- $\beta$  se origina por la unión a uno de sus tres receptores. Se han detectado mutaciones en *TGF- $\beta$ RII* en tumores colorrectales de pacientes con HNPCC por defectos en la reparación de apareamiento (MMR). También se han visto mutaciones en tumores colorrectales esporádicos que presentan inestabilidad de microsatélites (23).

**Pérdidas alélicas en el cromosoma 18**

Un 50% de los adenomas y el 60% de los carcinomas presentan pérdidas de la región cromosómica 18q21. Se han descrito varios genes en esta región que podrían tener importancia en la carcinogénesis colónica, entre los que destacan: *DCC* (Deleted in Colorectal Cancer) y *Smad4/DPC4* (Deleted in Pancreatic Cancer locus 4). *DCC* codifica una proteína de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se ha sugerido que puede influir en la motilidad y en la supervivencia celular. Su expresión se pierde en la mitad de los adenomas y carcinomas y se asocia a la delección del gen (24). El gen *Smad4* codifica una proteína implicada en la vía de señalización del TGF- $\beta$  (25). La inactivación comporta una resistencia a las señales inhibitoras del crecimiento iniciadas por TGF- $\beta$ . Este gen está alterado mediante delecciones en homocigosis, mutaciones puntuales y/o pérdida de expresión en un 20% de los adenomas y este porcentaje aumenta en los CCR, donde se asocia a diseminación metastásica a distancia (24).

**El gen *p16 (INK4a)***

Aproximadamente un 40% de los adenomas y carcinomas pierden la función represora de p16 por hipermetilación de novo del promotor (26). Este gen codifica una proteína que inactiva los complejos ciclinaquinasa dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4 y CDK6) impidiendo la fosforilación del producto del retinoblastoma (Rb) fundamental para la progresión del ciclo celular (27).

### 1.3.2- Activación de oncogenes

De los oncogenes que sufren un proceso de activación durante la carcinogénesis, se detallan a continuación aquellos más relevantes.

#### **El gen *KRAS***

Los oncogenes *Ras* (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS*) codifican proteínas de membrana con actividad guanosina trifosfatasa implicadas en la señalización intracelular de señales extracelulares, entre los que destacan diversos factores de crecimiento. Las mutaciones en el oncogén *KRAS* se producen en la transición de adenoma a carcinoma y se asocian al crecimiento tridimensional del adenoma y al fenotipo vellosos. En alrededor de un 40% de los CCR se detectan mutaciones en los codones 12, 13 (exón 1) y 61 (exón 2) del gen *KRAS*. Estas mutaciones conllevan una ganancia de función que implica la activación de la cascada de señalización intracelular con activación de la proteína quinasa mitógeno activada (MAPK). Por tanto, la célula tumoral con mutación en *KRAS* presenta una ventaja en el crecimiento, proliferación celular y resistencia a la apoptosis (28).

#### **El gen *BRAF***

Constituye un segundo mediador de la vía de transmisión de señales tras la activación de *KRAS*. Inicialmente las mutaciones activantes de la quinasa serina/treonina *BRAF* fueron identificadas en melanoma. Posteriormente se ha detectado la presencia de la mutación en el codón V600E de la proteína *BRAF* en un 10-15% de los tumores colorrectales. Estas mutaciones se asocian a inestabilidad de microsatélites (MSI) en ausencia de historia familiar de CCR (29).

**El gen *PI3K***

La vía de transmisión de señales fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K-AKT) parece tener un papel en la oncogénesis del CCR (30). En un 8-10% de los tumores colorrectales se detectan mutaciones activantes de la tirosina quinasa que tienen un papel clave en la supervivencia celular o resistencia a la apoptosis en ausencia de adhesión a substrato (31). Estas mutaciones se asocian a la pérdida de función de PTEN, que participa en la misma vía, mediante la metilación de su promotor y son más frecuentes en tumores con MSI (32).

**1.3.3- Inestabilidad genómica**

Los genes involucrados en la reparación de errores de apareamiento (mismatch repair, MMR) son responsables de corregir errores que ocurren durante la replicación del ADN. La inactivación de estos genes incrementa la tasa de mutaciones (inestabilidad genómica) durante la síntesis del ADN. Este aumento de la tasa de mutaciones puede afectar a genes implicados en el control del crecimiento tumoral (*TGF  $\beta$*  y receptores IGF), la apoptosis (*Caspasa 5*, *Bax*) e incluso a los mismos genes MMR. Las células con un defecto en este sistema de reparación del ADN se asocian a inestabilidad de microsatélites. El término “inestabilidad de microsatélites” (MSI) se refiere a la expansión o contracción de secuencias cortas repetidas de ADN, causado por la inserción o deleción de nucleótidos repetidos (A)<sub>n</sub> y (C)<sub>n</sub>. La MSI es una característica de los tumores de pacientes con síndrome de Lynch (HNPCC), y su presencia sugiere un defecto en los genes MMR (33). También se produce MSI en aproximadamente un 15% de CCR esporádicos habitualmente debido a la metilación silenciadora de la región promotora del gen *MLH1*. Esta alteración condiciona una secuencia adenoma-carcinoma más acelerada con menor incidencia de adenomas de gran tamaño. En

## Introducción

general, se acumulan mutaciones en genes supresores que contienen secuencias repetidas en su región codificante (*TGF-βRII*, *bax*, *E2F-4*, *MSH6*), que acostumbran a no tener mutaciones en *KRAS* y muestran características clínico patológicas específicas (localización en colon derecho, tumores pobremente diferenciados y mucinosos, infiltración linfocitaria peritumoral). Se han descrito otros genes inactivados mediante hipermetilación de sus respectivos promotores (*p16INK4a*, *p14ARF*, *APC*, *MGMT*, *LKB1*, *hMLH1*, *RasSF1a*, *CRBP1*, *RarB2*), lo que ha llevado a proponer la una clasificación molecular del CCR en función de la presencia o no de un fenotipo metilador (34).

### 1.4.- Características anatómo-patológicas del CCR

El colon y junto con el recto forman el intestino grueso que se extiende desde el íleon terminal al canal anal, con una longitud aproximada de 150 cm. El colon se divide en cuatro partes: derecha o colon ascendente, colon transverso, izquierda o colon descendente y el colon sigmoide (sigma). El colon sigmoide se continúa con el recto que termina en el canal anal.

El colon derecho está formado por el ciego (con el apéndice) y el colon ascendente. El ciego mide unos 6-9 cm de longitud y está recubierto por peritoneo visceral (serosa). El colon ascendente mide 15-20 cm. La parte posterior del colon ascendente está en contacto directo con el retroperitoneo. Por otro lado las superficies anterior y lateral están cubiertas por serosa y por tanto se encuentran a nivel intraperitoneal. A nivel de la reflexión hepática el colon ascendente se continúa con el transverso justo por debajo del hígado y anterior al duodeno.

El colon transverso se encuentra en su totalidad a nivel intraperitoneal sujeto por el mesenterio y adyacente al páncreas. Anteriormente su serosa se continúa con



el ligamento gastrocólico. Por debajo del bazo el colon transversal se continúa con el colon descendente, anterior a la cola del páncreas. De forma similar al colon ascendente la superficie posterior del colon descendente está en contacto con el retroperitoneo, mientras que sus caras lateral y anterior, cubiertas por serosa, son intraperitoneales. La longitud del colon descendente es de unos 10-15 cm y se convierte enteramente en intraperitoneal a nivel del colon sigmoide.

El recto es una estructura predominantemente extraperitoneal. Tan sólo la porción anterior del tercio medio y superior y las superficies laterales del tercio superior estarán recubiertas por peritoneo. Ubicado dentro de la pelvis, se extiende desde la mucosa transicional de la línea dentada anal hasta el colon sigmoideo en el reflejo del peritoneo. Observado mediante sigmoidoscopia rígida, el recto mide entre 10 cm y 15 cm desde el borde del ano. Se divide en tres porciones, el tercio bajo que comprende una longitud de 3 a 6 cm desde el margen anal, el tercio medio de 6 a 10 cm y el tercio superior de 10 a 12-15 cm del margen anal. Habitualmente, la localización de un tumor de recto se indica por la distancia entre el borde del ano, la línea dentada o el anillo anorrectal, y el borde inferior del tumor, con mediciones que difieren según se use un endoscopio rígido o flexible, o un examen digital (11). La distancia del tumor desde la musculatura del esfínter anal tiene consecuencias sobre la capacidad de llevar a cabo cirugías para preservar el esfínter. Las restricciones óseas de la pelvis limitan el acceso quirúrgico al recto y ello resulta en una probabilidad menor de obtener márgenes ampliamente negativos y un riesgo más alto de recidiva local.

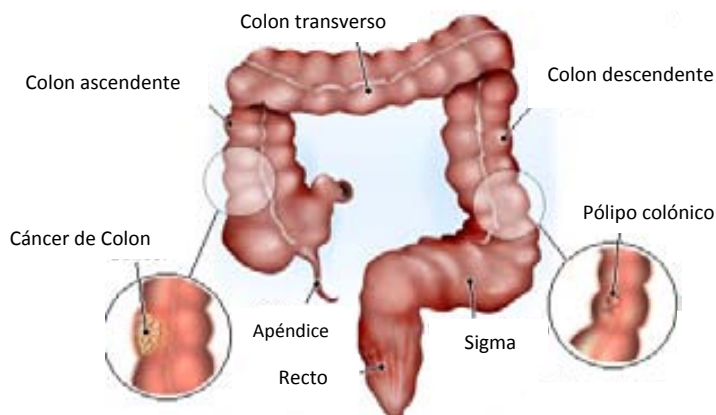
El drenaje linfático regional se localiza a nivel del recorrido de los vasos sanguíneos principales del colon y recto, a lo largo de las arcadas vasculares de la arteria marginal y adyacente al colon (ganglios pericólicos), a nivel del borde mesocólico del colon. El drenaje linfático del recto superior sigue el curso de la arteria hemorroidal superior hacia la arteria mesentérica inferior (ganglios presacros y de las iliacas internas). El drenaje linfático del recto distal, por debajo

## Introducción

de la línea dentada, se realiza hacia las cadenas ilíacas inguinales y las ilíacas externas.

El 60-70% de los tumores colorrectales se localizan en el colon, un 50% en colon izquierdo y un 50% en colon derecho y transverso. El 30-40% restante se localiza en el recto o en la unión rectosigmoidea (Figura 3).

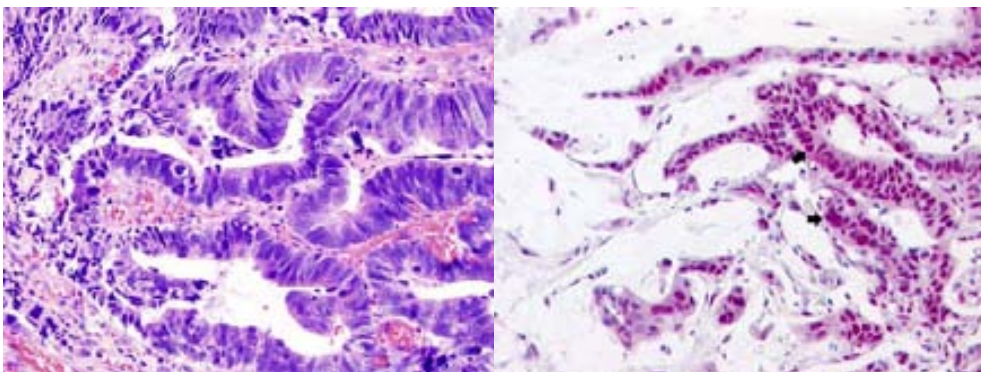
*Figura 3.- Localización de los tumores colorrectales*



Existen tres vías de diseminación del cáncer colorrectal: a) locorregional, a través de la capa submucosa y muscular hacia las estructuras adyacentes y a los ganglios linfáticos regionales; b) venosa portal, con metástasis a distancia de predominio hepático; y c) transcelómica a peritoneo, que provoca carcinomatosis peritoneal. En el recto la existencia de un sistema venoso doble, hemorroidal superior que drena en el sistema venoso portal, y otro constituido por las venas hemorroidales medias e inferiores tributarias del sistema venoso de la vena cava inferior; hace que los tumores rectales tengan dos posibles vías de diseminación sanguínea a órganos lejanos: hígado y pulmón, respectivamente.

El tipo histológico más frecuente de CCR es el adenocarcinoma (90-95%), seguido del adenocarcinoma coloide o mucinoso (10%) (Figura 4). Otros tipos histológicos, como el carcinoma epidermoide, los tumores carcinoides, los sarcomas, los melanomas o los linfomas, son menos frecuentes. Con respecto al grado de diferenciación, la mayoría de los patólogos siguen la clasificación de Broders (35), lo que permite agrupar a los tumores en dos grupos con repercusión pronóstica diferente: tumores bien y moderadamente diferenciados (bajo grado) y tumores pobremente diferenciados e indiferenciados (alto grado).

*Figura 4.- Adenocarcinoma moderadamente diferenciado y carcinoma mucinoso de colon.*



### **1.5.- Diagnóstico y estadificación**

El cáncer de colon se puede diagnosticar cuando un paciente presenta síntomas o como resultado de un programa de cribado. Dado que el cáncer en estadios iniciales no suele producir síntomas y la mayoría de los síntomas son inespecíficos (cambios en el hábito intestinal, dolor abdominal general, pérdida de peso sin causa aparente, cansancio constante), los esfuerzos agresivos en la detección a través de los programas de detección son esenciales. La determinación de sangre

## Introducción

oculta en heces tiene una sensibilidad para la detección del CCR del 61-69%. A pesar de la buena relación coste-beneficio algunos carcinomas y pólipos adenomatosos no sangran, por lo que se recomienda realizar anualmente para mejorar la sensibilidad. La endoscopia sigue siendo la principal herramienta para el diagnóstico y se puede realizar a diferentes longitudes utilizando un sigmoidoscopio o colonoscopio. En algunos pacientes la exploración colonoscópica puede ser difícil por razones anatómicas. En estos casos, la combinación colonoscopia y enema de bario permitirá un mejor examen tanto del colon izquierdo como del colon proximal. Otras exploraciones adicionales, todavía no estandarizadas en la práctica diaria, como la colonoscopia virtual o colonografía por tomografía computarizada (TC) podrían ser útiles para detectar pólipos o tumores sincrónicos del colon o localizar con mayor precisión el tumor en pacientes que son candidatos a una resección laparoscópica. Aunque la tomografía por emisión de positrones con el análogo de la glucosa 18-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG-PET) puede ser útil para detectar el CCR recurrente, su uso rutinario no se recomienda en el momento del diagnóstico inicial porque no modifica el enfoque del tratamiento en la mayoría de los casos.

La detección temprana de la carcinomatosis peritoneal mediante pruebas de imagen sigue siendo un desafío y el rendimiento de las diferentes herramientas de diagnóstico todavía es pobre. Se ha invertido un gran esfuerzo en la búsqueda de marcadores serológicos que permiten la detección temprana y el diagnóstico de CCR. El marcador más ampliamente estudiado es el antígeno carcinoembrionario (CEA), que puede ser útil en la estadificación preoperatoria y en el seguimiento postoperatorio de los pacientes con cáncer de colon, pero tiene un bajo valor predictivo para el diagnóstico en pacientes asintomáticos debido a su relativa baja sensibilidad y especificidad.

Históricamente, el sistema de estadificación de Dukes y su posterior modificación por Astler y Coller han sido los métodos más utilizados para la clasificación de los

tumores colorrectales (36). En la actualidad, el sistema de clasificación TNM es uno de los sistemas más usados para el diagnóstico del CCR. Este sistema ha sido aceptado y mantenido por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) y la UICC (International Union Against Cancer). Esta clasificación fue desarrollada como herramienta básica para la estadificación de diferentes tipos de cáncer a partir de unos criterios estándares. La misma clasificación se utiliza tanto para la estadificación clínica como la patológica (37). El sistema TNM está basado en la extensión del tumor primario (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos locorreccionales (N) y la presencia de metástasis (M) a distancia. Se le añade un número a cada letra para indicar la extensión del tumor y el grado de diseminación del cáncer (Tabla 1). De acuerdo con las categorías T, N y M el CCR se clasifica en diferentes estadios de pronóstico (Tabla 2).

En el caso del carcinoma de recto una estadificación inicial precisa podrá influir en el tipo de intervención quirúrgica y la elección de la terapia neoadyuvante. El examen digital del recto y la proctoscopia rígida ayudarán a determinar si es posible una cirugía con preservación del esfínter (11, 38, 39). La resonancia magnética (RM) del abdomen y pelvis permitirá determinar la profundidad de la invasión tumoral y la posibilidad de lograr márgenes circunferenciales (radiales) negativos, así como identificar metástasis linfáticas locorreccionales. La ecografía endorrectal (EER) con una sonda rígida o un microscopio flexible evalúa la profundidad de penetración de lesiones estenóticas e identifica metástasis ganglionares locorreccionales (40). Varios estudios indican que la exactitud de la EER en el caso de la estadificación tumoral (T) oscila entre 80 y 95%, en comparación con 65 a 75% de la TC y 75 a 85% de la RM. En cuanto a la estadificación del estado ganglionar, ninguna de las tres pruebas de imagen, RM, TC o EER, ha demostrado ser significativamente superior en un meta-análisis que incluía 84 estudios (41).

## Introducción

Tabla 1. Clasificación TNM

Tx	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia
T1	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la <i>muscularis propia</i>
T3	El tumor invade a través de la <i>muscularis propia</i> hasta los tejidos pericólicas
T4a	El tumor penetra la superficie del peritoneo visceral
T4b	El tumor invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras
Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Existen metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales
N1a	Existe metástasis en un ganglio linfático regional
N1b	Existen metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales
N1c	Hay depósito(s) tumoral(es) en la subserosa o los tejidos mesentéricos o pericólicos no peritonealizados, o en los tejidos perirrectales, sin metástasis ganglionar regional
N2	Existen metástasis en $\geq 4$ ganglios linfáticos regionales
N2a	Existen metástasis en 4 a 6 ganglios linfáticos regionales
N2b	Existen metástasis en $\geq 7$ ganglios linfáticos regionales
Mx	No es posible evaluar una metástasis a distancia
M0	No existe metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia
M1a	La metástasis está confinada a un órgano o lugar (es decir, hígado, pulmón, ovario, ganglio no regional...)
M1b	Existen metástasis en $> 1$ órgano o lugar, o en peritoneo

Nota: cTNM es la clasificación clínica, pTNM es la clasificación patológica. El prefijo y se usa para aquellos tumores clasificados después de un tratamiento neoadyuvante (ej. ypTNM)

*Tabla 2. Estadaje del CCR según la American Joint Committee on Cancer (AJCC), Dukes y la modificación por Astler y Coller (MAC)*

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Dukes</b>	<b>MAC</b>
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	-	-
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b	-	-

### 1.6.- Factores pronósticos

De entre todos los factores pronósticos que se han analizado en el estudio del cáncer colorrectal, se citan y se definen a continuación aquellos más universalmente consensuados.

- Sistema de estadificación TNM: el pronóstico de los pacientes con CCR está claramente relacionado con el grado de penetración del tumor a través de la pared del intestino, la presencia o ausencia de afectación ganglionar, y la presencia o ausencia de metástasis a distancia.
- Aspectos clínicos: la obstrucción intestinal y perforación intestinal son indicadores de mal pronóstico (42).
- Antígeno carcinoembrionario (CEA): los niveles elevados en suero del CEA (ng/ml) antes del tratamiento tienen un significado pronóstico negativo (43).
- Grado y tipo histológico: Los pacientes con carcinomas bien diferenciados (grados 1 y 2) tienen mayor supervivencia que aquellos con carcinomas pobremente diferenciados (grados 3 y 4). Los carcinomas de células pequeñas, en anillo de sello o indiferenciados presentan un peor pronóstico que otros tipos histológicos. En cambio, el carcinoma medular se asocia a un pronóstico favorable.
- Tumor residual: los tumores que son completamente resecaos con márgenes histológicos negativos se clasifican como R0. Los tumores con una resección macroscópica completa, pero con márgenes microscópicos positivos son clasificados como R1. Los pacientes con resecciones incompletas con márgenes macroscópicos positivos se clasifican como R2. Las denominaciones R0, R1, R2 suponen una importante implicación pronóstica.



- Número total de ganglios linfáticos analizados: Se recomienda que por lo menos se examinen 12 ganglios linfáticos en los pacientes con cáncer de colon y recto para confirmar la ausencia de afectación ganglionar por el tumor (37). El número de ganglios linfáticos examinados es el reflejo de la intensidad de la disección mesentérica linfovascular en la resección quirúrgica y la identificación patológica de ganglios en la pieza quirúrgica. Diversos estudios retrospectivos han demostrado que el número de ganglios linfáticos examinados durante una cirugía de colon y recto puede estar asociada con la evolución del paciente (44-46).
- Invasión vascular, linfática y perineural: aunque existe una considerable heterogeneidad en la metodología, se consideran factores de mal pronóstico.
- Alteraciones citogenéticas: Muchos otros marcadores pronósticos se han evaluado retrospectivamente en pacientes con cáncer colorrectal. La pérdida alélica del cromosoma 18q se ha asociado a un peor pronóstico. La inestabilidad de microsatélites, relacionada con el cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), se ha asociado con una mejor supervivencia independiente del estadio tumoral (47). Sin embargo, el valor pronóstico de estas alteraciones junto con otras como la expresión de la timidilato sintasa o el estado mutacional del oncogén *KRAS*, no han sido validados del todo de manera prospectiva (48, 49)

En el año 2002, Köhne *et al.* publicaron un estudio con 3.825 pacientes para identificar aquellos determinantes clínicos que estuvieran relacionados con el pronóstico de los pacientes con CCR avanzado tratados con quimioterapia basada en el 5-fluorouracilo (5-FU). En este trabajo, los pacientes se clasificaron en tres grupos de riesgo pronóstico en función de cuatro parámetros clínicos: estado

## Introducción

general, recuento de leucocitos, fosfatasa alcalina y número de localizaciones metastásicas (50).

Los 3 grupos pronósticos son:

- Riesgo bajo: ECOG (Eastern Cooperative Oncologic Group, escala práctica para medir la calidad de vida del paciente) 0-1 y sólo una localización metastásica.
- Riesgo intermedio: ECOG 0-1, más de una localización metastásica y fosfatasa alcalina  $<300$  U/L o pacientes de ECOG  $> 1$ , recuento de leucocitos  $<10 \times 10^9$ /L y una sola localización metastásica.
- Riesgo alto: ECOG 0-1, más de una localización metastásica, y fosfatasa alcalina  $\geq 300$  U/L o pacientes con ECOG  $> 1$ , más de una localización metastásica o recuento de leucocitos  $>10 \times 10^9$ /L.

## 1.7.- Tratamiento de la enfermedad localizada

### 1.7.1.- Cirugía

La resección quirúrgica es la única opción de tratamiento potencialmente curativo en el CCR localizado. Las técnicas quirúrgicas convencionales son: la hemicolectomía del colon derecho, transverso y colon izquierdo; sigmoidectomía en tumores localizados en el colon sigmoide, y la resección anterior alta del recto para los tumores de la unión recto-sigma. La cirugía debe extirpar el tumor con amplios márgenes y maximizar la linfadenectomía regional, para que al menos 12 ganglios linfáticos estén disponibles para la evaluación patológica. Las técnicas laparoscópicas dan resultados similares en cuanto a la eficacia y, a la vez, son técnicas menos invasivas.

En los casos de cirugía de urgencia por oclusión intestinal, perforación o hemorragia deberá intentarse una cirugía radical con resección y anastomosis en los tumores del lado derecho. Sin embargo, y sobre todo en las lesiones del lado izquierdo puede ser necesaria la resección en bloque más colostomía del muñón cólico proximal y cierre del muñón distal (operación de Hartmann). Otra alternativa sería practicar una colectomía subtotal y anastomosis ileorrectal. La colocación de un stent endoscópico se puede utilizar para aliviar la obstrucción en tumores de recto y colon sigmoide y permitir en un paso posterior la resección quirúrgica.

En el caso del cáncer de recto la cirugía plantea una mayor dificultad debido al marco óseo pélvico que rodea a esta localización. Una de las principales limitaciones de la cirugía rectal es la incapacidad de obtener márgenes amplios. Clásicamente, se considera adecuada la resección del tumor con un mínimo de 2 a 5 cm de margen, aunque la ligadura de los vasos de los troncos vasculares necesarios para realizar una linfadenectomía adecuada puede requerir grandes resecciones intestinales. Otro de los objetivos de la cirugía rectal es conseguir la preservación de la función del esfínter, por la repercusión que ello supone en la calidad de vida de los pacientes. En los tumores del tercio superior y medio del recto se puede conservar el esfínter si se realiza una resección anterior baja (RAB). En los tumores localizados en el recto distal la cirugía más utilizada es la resección abdominoperineal (APR) y colostomía de derivación permanente (operación de Milles). En los últimos años, la técnica de la escisión total del mesorrecto ha disminuido de forma significativa las tasas de recurrencia local de la enfermedad (51, 52). La cirugía total del mesorrecto consiste en la extirpación en bloque del tumor y el correspondiente mesorrecto asegurando unos márgenes adecuados, en particular el margen radial circunferencial (MRC). Éste se define como el margen retroperitoneal o margen adventicio de tejido blando más cercano al punto de penetración más profunda del tumor (53). Una distancia  $\leq 1$  mm del

tumor o de la metástasis ganglionar MRC será considerada como margen afecto (54).

### **1.7.2.- Tratamiento adyuvante**

El tratamiento adyuvante es un tratamiento sistémico administrado después de la resección del tumor primario con el objetivo de reducir el riesgo de recaída y muerte. Cada opción de tratamiento, incluyendo la observación sola, necesita ser discutida con los pacientes de acuerdo a sus características (estado funcional, edad, comorbilidades y la preferencia del paciente) y de las características del cáncer (estadio patológico, grado histológico y el riesgo general de recaída).

El tratamiento adyuvante se recomienda para tumores estadios III y II de "alto riesgo". La supervivencia a cinco años después de la resección quirúrgica es: en el estadio I 85-95%, estadio II 60-80%, estadio III 30-60%. El consenso general indica que los pacientes con estadio II tienen un alto riesgo de recaída si presentan al menos una de las siguientes características: nodos linfáticos examinados <12, tumor pobremente diferenciado, invasión vascular, linfática o perineural; presentación del tumor como obstrucción o perforación del intestino y estadio pT4. Otros factores biológicos prometedores en la actualidad están representados por la pérdida alélica del cromosoma 18q (negativo en el pronóstico) y MSI (positivo para el pronóstico). Si bien se recomienda la evaluación del estado de MSI en pacientes elegibles para monoterapia adyuvante con fluoropirimidinas, el valor práctico de estos factores aún debe ser confirmado en grandes estudios prospectivos.

El 5-Fluorouracilo (5-FU) fue el primer fármaco que demostró un beneficio en términos de supervivencia versus la cirugía sola como parte del tratamiento adyuvante en el cáncer de colon. En los años 90, diversos ensayos clínicos fase III aleatorizados demostraron que 5-FU asociado a los inmunomoduladores

leucovorin (LV) o levamisol (de interés histórico) conseguía un aumento de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y de la supervivencia global (SG), principalmente en tumores estadio III (55-57). Por otro lado, los esquemas de tratamiento que incluían la administración de 5-FU en infusión continua habían demostrado un mejor perfil de toxicidad y eficacia equiparable a las combinaciones de 5-FU/LV en bolus en el tratamiento de la enfermedad avanzada. En el año 2003, el grupo cooperativo francés GERCOR (Groupe d'Etude et Recherche Clinique en Oncologie Radiotherapies) demostró que el tratamiento con 5-FU en infusión continua de 48 horas junto con LV tenía una eficacia similar a los esquemas de 5-FU en bolus ensayados hasta el momento pero con un mejor perfil de seguridad (58). En un análisis posterior de los pacientes con estadio III incluidos en 7 ensayos clínicos se demostraba que la quimioterapia adyuvante conseguía mejorar la probabilidad de estar libre de recurrencia a los 5 años del 42% al 58% y la SG a 5 años del 51% al 64%. De esta forma se consolidó este tratamiento (5-FU/LV) como estándar para la realización de ensayos clínicos posteriores en el marco de la adyuvancia del cáncer de colon.

Sin embargo, el tratamiento adyuvante con quimioterapia en el estadio II sigue siendo controvertido. En algunos ensayos clínicos, pero no en todos, se han conseguido mejoras en la SLE y SG en los pacientes tratados con quimioterapia adyuvante (56-66). Un meta-análisis publicado en el año 2004 en el que se incluyeron 37 ensayos clínicos y 11 meta-análisis concluyó que la quimioterapia adyuvante basada en 5-FU en el estadio II conseguía un beneficio pequeño pero significativo en la SLE (entre 5% y 10%) pero no se traducía en un beneficio en la SG (RR= 0,87 (95% IC, 0,75-1,01;  $p=0,07$ ) (67). Más recientemente el ensayo clínico QUASAR aleatorizó 3.239 pacientes (91% estadio II) a 5-FU/LV versus observación tras la resección quirúrgica del cáncer de colon (71%) o recto. La quimioterapia con 5-FU/LV conseguía una discreta mejora absoluta en la SG a 5

## Introducción

años del 3.6% (IC 95% 1.0-6.0) en comparación con aquellos pacientes que no recibieron ningún tratamiento adyuvante (68).

De forma paralela al desarrollo de 5-FU intravenoso (i.v.), las fluoropirimidinas orales capecitabina y UTF (uracilo + tegafur)/LV han demostrado una eficacia equivalente al 5FU/LV i.v. en el tratamiento adyuvante del cáncer de colon (69, 70).

La demostrada superioridad de las combinaciones de 5-FU con oxaliplatino e irinotecán en la enfermedad metastásica condujeron a la realización de ensayos clínicos para su incorporación al tratamiento adyuvante del cáncer de colon. Sin embargo, ni el ensayo del CALGB (Cancer and Leukemia Group B) C89803 ni el PETACC-3 que estudiaban la incorporación de irinotecán al 5-FU demostraron un beneficio al tratamiento exclusivo con 5-FU/LV (71, 72). Por otro lado, en el ensayo MOSAIC 2.246 pacientes (40% estadio II y 60% estadio III) fueron aleatorizados a recibir 5-FU en infusión continua y LV con (esquema FOLFOX) o sin oxaliplatino (73). El objetivo principal de este ensayo era analizar la supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 3 años. Los resultados mostraron una SLE a los 3 años del 73% en la rama de tratamiento estándar con 5-FU/LV, comparado con el 78% de los tratados con el esquema FOLFOX. Este beneficio era de hasta un 7,5% cuando se consideraban sólo los pacientes con estadio III. En un análisis exploratorio de los pacientes con estadio II se encontró una diferencia en la SLE favorable al tratamiento con FOLFOX en el subgrupo de tumores de alto riesgo (82% vs 75%, HR=0,72). Los datos presentados recientemente en relación a la SG a los 6 años demostraban un beneficio del 2,6% con FOLFOX y de un 4,4% si sólo se consideraban los pacientes con estadio III (74). Como consecuencia, hoy en día se considera al esquema FOLFOX como tratamiento estándar para el cáncer de colon estadio III. En cuanto al grupo de pacientes con estadio II con resección óptima (al menos 12 ganglios linfáticos evaluados) y sin factores de mal pronóstico, existen limitaciones del tratamiento con quimioterapia adyuvante basado en 5-FU/LV, ya

que el beneficio terapéutico potencial es bajo e incluso inexistente, ofreciendo mejoras de entre el 0% y 3.6% en términos de supervivencia a los 5 años.

La seguridad y eficacia de la combinación capecitabina y oxaliplatino (XELOX) ha sido estudiada versus 5-FU/LV en bolus (esquemas de la Clínica Mayo o Roswell Park) en el ensayo internacional fase III "XELOXA". Los datos de eficacia recientemente publicados indican un beneficio en la SLE para la combinación XELOX. La SLE a los 3 años DFS fue de un 70,9% con XELOX frente al 66,5% con 5-FU/LV. Con un perfil de toxicidad diferente: los pacientes tratados con XELOX experimentaron menos diarrea y alopecia, y más toxicidad neurosensiva, vómitos y síndrome mano-pie. Por tanto, se considera que la combinación XELOX es una opción de tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer de colon estadio III (75).

Por último, el papel de los agentes dirigidos a diana está siendo explorado en diversos ensayos clínicos. Desafortunadamente, los recientes resultados reportados no han demostrado un claro beneficio al añadir bevacizumab (NSABP C-08, AVANT) o cetuximab (Intergroup N0147, PETACC-8) al tratamiento quimioterápico estándar (76-78).

### **1.7.3.- Tratamiento neoadyuvante**

El tratamiento del cáncer de recto requiere de una gran habilidad como parte de un equipo multidisciplinar. Debido a los límites anatómicos de los huesos de la pelvis y del hueso sacro, existe una gran dificultad para obtener márgenes amplios libres de tumor durante la resección del cáncer rectal. A diferencia del cáncer de colon, casi la mitad de las recurrencias del cáncer de recto se producen a nivel pélvico. El riesgo de recurrencia en el cáncer de recto está relacionado con la profundidad de la extensión tumoral en la pared intestinal y la presencia de afectación ganglionar, ascendiendo desde un 5-10% en los estadios I a un 30-50%

## Introducción

en los estadios III. El desarrollo de recurrencia local influye de forma sustancial en el pronóstico, de manera que la supervivencia a los 5 años disminuye de un 85 % en pacientes sin recidiva a un 20% en aquellos que presentan recidiva. Además, la recaída local supone una importante morbilidad a los pacientes, con síntomas severos de difícil manejo terapéutico que comprometen la calidad de vida (dolor, perforación, obstrucción, fístulas). Con el objetivo de mejorar tanto el control local como la supervivencia diversos estudios han evaluado el papel de la quimioterapia y radioterapia (RT) pre y post resección quirúrgica de la tumoración primaria. La RT disminuye claramente la recurrencia local, sin embargo es la adición de quimioterapia basada en 5-FU la responsable del aumento en un 5-15% de la supervivencia general. Las potenciales ventajas del empleo de quimiorradioterapia (QT-RT) frente a la RT sola son la radiosensibilización y el control de la enfermedad a distancia. Los resultados de los ensayos clínicos aleatorizados demuestran que la combinación de quimioterapia y RT preoperatoria consiguen un mejor control local del tumor que la QT-RT postoperatoria, sin demostrar impacto en la supervivencia. El grupo alemán de cáncer de recto llevó a cabo un gran ensayo clínico randomizado en el que se comparó la QT-RT preoperatoria frente a la QT-RT adyuvante en pacientes con cáncer de recto estadios II y III. Si bien no se encontraron diferencias significativas en la SG a 5 años, los pacientes tratados con QT-RT neoadyuvante presentaron una menor tasa de recaídas locales a 5 años (6%) que aquellos tratados con QT-RT adyuvante (13%;  $p=0,006$ ). Además la incidencia de toxicidades grado 3 y 4 fue superior en el grupo de pacientes tratados tras la cirugía (27% vs 40%;  $p=0,001$ ) (79).

Otro estudio de diseño más complejo llevado a cabo por la EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) tampoco consiguió demostrar un beneficio en SG, aunque sí en la tasa de recurrencias locales (17% en el grupo de RT precirugía sola; 8.7% en QT-RT pre; 9.6% en RT pre y QT post;



7.6% en el de QT-RT pre y QT post). De este ensayo se concluye que aquellos pacientes que se benefician de un tratamiento con quimioterapia posterior a la cirugía son aquellos que presentan un “downstaging” tras la QT-RT neoadyuvante (80). Más recientemente, el ensayo NSABP R-3 concluye que el tratamiento con QT-RT neoadyuvante (5-FU-RT) mejora significativamente la SLE en comparación con la QT-RT adyuvante (81). En consistencia con otros estudios, se plantea la tasa de respuestas patológicas completas (RCp) como un posible objetivo a conseguir en estos pacientes, ya que ningún paciente con RCp (15%) presentó recurrencia local.

En cuanto a la forma de administrar el 5-FU, la infusión continua ha demostrado ser menos tóxica que el tratamiento en bolus combinado con la radioterapia en tumores de recto localmente avanzados (82). Una alternativa aceptada al tratamiento de infusión continua de 5-FU es la capecitabina (83). El empleo de esquemas más complejos de QT-RT como los utilizados en los ensayos ACCORD 12/0405-Prodige 2 (capecitabina/RT vs capecitabina+oxaliplatino/RT) y STAR 01 (5-FU/RT vs FOLFOX/RT) no han demostrado una mayor tasa de respuesta completas patológicas aunque si una mayor toxicidad grado 3-4 (84, 85).

Por tanto, el tratamiento con 5-FU o capecitabina en combinación con RT neoadyuvante se ha convertido como terapia estándar en el tumor de recto estadios II y III debido a su eficacia, en términos de mejora de riesgo de recaída, y de supervivencia global.

### **1.8.- Tratamiento de la enfermedad diseminada o metastásica**

En los últimos años se han conseguido importantes avances en el tratamiento quimioterápico del CCR metastásico. Después de las casi cuatro décadas en las que el 5-FU constituía el único agente quimioterapéutico disponible, el desarrollo de otros agentes citotóxicos como el irinotecán y el oxaliplatino mejoraron significativamente los resultados terapéuticos y la supervivencia de los pacientes con CCR. Además, las fluoropirimidinas orales han demostrado una eficacia comparable al 5-FU intravenoso. Por otra parte, varios anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor de crecimiento vascular endotelial (bevacizumab) o contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (cetuximab, panitumumab) se han introducido recientemente en el tratamiento del CCR metastásico. Todo ello ha propiciado una mejora significativa de la supervivencia media actual de los pacientes con CCR metastásico llegando a casi 24 meses o más en función de si es posible plantear la resección metastásica.

La columna vertebral de la primera línea de quimioterapia paliativa consiste en una fluoropirimidina por vía intravenosa, el 5-fluorouracilo (5-FU), o fluoropirimidinas orales en diversas combinaciones y horarios. Los esquemas de infusión de 5-FU/LV son en general menos tóxicos que los regímenes en bolus. Los regímenes de uso más frecuente son un bolus seguido de 48 horas de infusión continua de 5-FU/LV cada dos semanas. La administración vía oral de la capecitabina y el UFT/LV son una alternativa a la vía intravenosa de 5-FU/LV (86). Las combinaciones de quimioterapia con 5-FU/LV/oxaliplatino (FOLFOX) o 5-FU/LV/irinotecán (FOLFIRI) administrados cada dos semanas proporcionan una tasa de respuesta superior al 50% en el tratamiento de primera línea, una mayor supervivencia libre de progresión (SLP) y mejor supervivencia global (SG) que la monoterapia con 5-FU/LV. El grupo GERCOR llevó a cabo un ensayo con el fin de determinar la mejor secuencia de estos esquemas. Los pacientes fueron

aleatorizados a recibir en primera línea el esquema FOLFIRI seguido de FOLFOX a la progresión versus la secuencia opuesta. La mediana de SG fue de 21,5 meses para la secuencia FOLFIRI→FOLFOX y de 20,6 meses para FOLFOX→FOLFIRI. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en la SLP hasta la segunda línea (14,2 vs 10,9 meses;  $p=0,64$ ) (87). Por tanto, se considera que FOLFOX ↔ FOLFIRI utilizados de manera secuencial indistintamente en primera y segunda línea consiguen una mayor supervivencia y un mayor porcentaje de enfermos subsidiarios a cirugía secundaria de resección de las metástasis hepáticas consideradas no resecables antes de la quimioterapia. Las diferencias de estos dos esquemas se encuentran en el perfil de toxicidad: más alopecia y toxicidad gastrointestinal (diarrea, náuseas, vómitos y mucositis) con irinotecán y más neutropenia y neurotoxicidad con oxaliplatino.

Sobre la base de una actividad similar y una seguridad aceptable, la combinación de capecitabina más oxaliplatino (CAPOX) es una alternativa a la combinación de infusión de 5-FU y oxaliplatino. El régimen original de capecitabina más irinotecán (CAPIRI) cada tres semanas parece ser más tóxico que el esquema FOLFIRI por lo que se utiliza con menos frecuencia. Sin embargo un régimen de dosis reducida (capecitabina 1600 mg/m<sup>2</sup>/día durante 2 semanas e irinotecán 200 mg/m<sup>2</sup> el día 1 cada 3 semanas) mantiene la actividad y parece ser menos tóxico.

Dos estudios aleatorizados han demostrado que la quimioterapia de combinación no fue superior al tratamiento secuencial en términos de supervivencia, y por lo tanto, la terapia secuencial comenzando con fluoropirimidinas en monoterapia sigue siendo una opción válida en pacientes seleccionados y frágiles. Sin embargo, cuando la respuesta objetiva es el objetivo principal en un paciente concreto (por ejemplo, en vista de la resección quirúrgica de las metástasis o cuando el paciente metastásico está muy sintomático), la quimioterapia de combinación sigue siendo la opción preferida (88-90).

## Introducción

La combinación de los tres fármacos (5-FU/LV, oxaliplatino e irinotecán) como parte del esquema denominado FOLFOXIRI también ha sido ensayado en el contexto de la primera línea del CCR metastásico (91). El Grupo Oncológico Nord Ovest (GONO) llevó a cabo un estudio de fase III en el que aleatorizó a 244 pacientes a recibir FOLFOXIRI frente a FOLFIRI. El objetivo primario del ensayo era la tasa de respuestas. FOLFOXIRI frente a FOLFIRI consiguió aumentar de un 41% a un 66% la tasa de respuestas, el número de pacientes que accedía a resección de metástasis (6% vs 15%), la SLP (6.9 vs 9.8 meses) y la SG (16.7 vs 22.6 meses). Sin embargo, el reducido número de pacientes del ensayo, el uso de la tasa de respuestas como objetivo primario y los resultados negativos del un ensayo similar conducido por el grupo helénico (Hellenic Oncology Research Group; HORG) no permiten recomendar el uso del triplete de formar estándar (92).

La duración óptima de la quimioterapia para el CCR metastásico sigue siendo un tema controvertido. Las opciones posibles serían administrar la quimioterapia durante un periodo de tratamiento fijo (3-6 meses) frente al tratamiento hasta la progresión o toxicidad. Se deben considerar las interrupciones de la quimioterapia de combinación o un tratamiento citotóxico menos intensivo si existe toxicidad acumulativa, si las metástasis no son resecables y si se consigue alcanzar el control de la enfermedad. El tratamiento de mantenimiento solo con fluoropirimidinas después de un período inicial de quimioterapia de combinación prolonga la SLP en comparación con una completa interrupción del tratamiento (93). La quimioterapia de segunda línea debe ser propuesta a los pacientes con buen estado general y adecuada función hepática, renal y de médula ósea. En los pacientes refractarios a una fluoropirimidina en monoterapia, el tratamiento de segunda línea debe consistir en una combinación con oxaliplatino o irinotecán. En los pacientes con resistencia a FOLFOX o CAPOX, se propone un régimen basado en irinotecán (FOLFIRI o irinotecán en monoterapia) y en los pacientes refractarios a FOLFIRI, los esquemas FOLFOX o CAPOX son una opción válida en segunda línea.

En los últimos años se han desarrollado nuevos agentes dirigidos a dianas terapéuticas específicas destinados a mejorar la eficacia de los fármacos ya existentes:

- Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que bloquea el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) implicado en el mecanismo de la angiogénesis. Varios ensayos clínicos de fase II/III en pacientes con CCR metastásico han demostrado que la adición de este agente antiangiogénico a los regímenes estándares de primera línea de quimioterapia basada en 5-FU mejora la SG, la SLP y la tasa de respuestas en comparación con la quimioterapia sola (3, 94, 95). Bevacizumab presenta una toxicidad específica que consiste en hipertensión arterial, proteinuria, fenómenos trombóticos, sangrado de mucosas, perforación gastrointestinal y problemas de cicatrización (96). Hasta la fecha no hay marcadores moleculares predictivos de eficacia al tratamiento con bevacizumab.

- Cetuximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 que tiene su diana en el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este medicamento demostró ser eficaz en pacientes con cáncer colorrectal metastásico refractario a quimioterapia (97). Más recientemente, el ensayo clínico aleatorizado fase III CRYSTAL demostró que el tratamiento de primera línea con cetuximab más FOLFIRI reducía discretamente el riesgo de progresión de CCR metastásico en comparación al tratamiento con FOLFIRI solo. Un análisis posterior confirmó que el beneficio de cetuximab se limitaba a aquellos pacientes con tumores con el oncogén *KRAS* no mutado (tipo nativo o salvaje) (98). Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado un beneficio de la

## Introducción

combinación FOLFIRI-cetuximab en cuanto a tasa de respuesta, SLP y SG en población *KRAS* no mutado, existen datos contradictorios con la combinación FOLFOX-cetuximab en este grupo de pacientes (ensayos OPUS, COIN y NORDIC VII) (99-101). Las mutaciones en el gen *KRAS* se encuentran en un 40% de los pacientes con CCR avanzado e inducen la activación de forma constitutiva de la proteína *KRAS*, que provoca una señalización continua intracelular con independencia de la inhibición del EGFR por el anticuerpo monoclonal. La mutación V600F en *BRAF* (presente en el 5-10% de los tumores colorrectales) parece tener un valor pronóstico en las líneas iniciales de tratamiento, si bien existen dudas en cuanto al valor predictivo de respuesta a los tratamientos anti-EGFR combinados con quimioterapia. En cuanto a otros marcadores emergentes que se están estudiando en la actualidad, es necesario validar el verdadero papel pronóstico y predictivo para su posible aplicación en la práctica clínica diaria. Es el caso de marcadores como los ligandos anfi y epirregulina, P13KCA, número de copias del gen EGFR, etc.

- Panitumumab es un anticuerpo monoclonal IgG2 totalmente humano y también tiene como diana el EGFR. El panitumumab fue aprobado en monoterapia en pacientes con tumor *KRAS* no mutado después del fracaso al tratamiento con fluoropirimidinas, oxaliplatino y régimen basado en irinotecán (102). Recientemente la combinación del anticuerpo en primera línea con FOLFOX y en segunda línea con FOLFIRI han demostrado un beneficio en la SLP en pacientes con CCR metastásico *KRAS* no mutado (103, 104). La toxicidad más frecuentemente asociada a los anticuerpos anti-EGFR (cetuximab y panitumumab) es la toxicidad cutánea tipo erupción acneiforme. Otras toxicidades posibles son: diarrea, xerosis, paroniquia, conjuntivitis, urticaria, hipomagnesemia y reacciones

de hipersensibilidad durante la perfusión inicial (menos frecuentes con panitumumab por ser un anticuerpo completamente humano).

En los últimos años los esquemas estándar de combinación de quimioterapia basada en irinotecán o en oxaliplatino más bevacizumab han sido comparados en dos ensayos clínicos fase III con el mismo tratamiento más un anticuerpo anti-EGFR (cetuximab o panitumumab). En ninguno de los dos estudios (CAIRO 2 y PACCE) se objetivó benefició alguno al añadir el fármaco anti-EGFR a la quimioterapia más bevacizumab, por lo que la utilización conjunta de los anticuerpos anti-EGFR con bevacizumab no está recomendada (105, 106). Hasta la fecha, no hay resultados de estudios fase III disponibles que comparen la actividad de bevacizumab frente a cetuximab o panitumumab en el tratamiento de primera línea del CCR metastático *KRAS* no mutado.

## **2.- Farmacogenética en el tratamiento del cáncer colorrectal**

En el tratamiento del cáncer, la respuesta a los agentes quimioterápicos se rige por la combinación de las características genéticas del tumor, así como del metabolismo específico de cada paciente. Está bien establecido que la genética del tumor es diferente para cada paciente, dando lugar a una heterogeneidad en la determinación tanto del pronóstico como de la eficacia a los distintos tratamientos. La especificidad de los individuos puede estar relacionada con las características genéticas heredadas que codifican las diferentes proteínas que participan en las vías de metabolismo de los fármacos. La incidencia y la gravedad de los efectos secundarios relacionados con los fármacos, así como su eficacia siguen siendo, por tanto, diferentes dentro de una misma población de pacientes. Los estudios farmacogenéticos pretenden correlacionar la eficacia y toxicidad de

## Introducción

los medicamentos en función de las diversas variaciones en el genoma del paciente, incluyendo tanto la expresión de genes y los polimorfismos de nucleótido único (SNP) sin tener en cuenta el genoma del tumor. El objetivo último es optimizar las distintas opciones de tratamiento según el perfil genético del paciente para obtener la máxima eficacia y la mínima toxicidad secundaria a los medicamentos.

Debido a la gravedad de las reacciones adversas, estos estudios son particularmente importantes en el tratamiento del cáncer. De hecho, la toxicidad inducida por la quimioterapia es responsable de un 4% de las hospitalizaciones que se producen en los Estados Unidos y la neutropenia secundaria a la quimioterapia se ha asociado en el año 2005 a una tasa de mortalidad del 6,8% (107). Si además de la gravedad de los efectos secundarios se considera el alto coste de los agentes quimioterapéuticos, existe una gran necesidad en ser más preciso en la selección del régimen de tratamiento administrado que consiga el máximo beneficio posible para cada paciente.

Este enfoque personalizado de la quimioterapia es actualmente objeto de debate y de investigación en pacientes con CCR. El análisis de los polimorfismos individuales podría proporcionar una información crítica sobre la selección de un régimen específico, lo que mejoraría la tasa de respuestas y, por tanto, la supervivencia de dichos pacientes. Es importante entender que para cada fármaco, están implicadas varias vías metabólicas que pueden interactuar entre sí y que la respuesta a los fármacos también puede depender del tipo de combinación de medicamentos recibidos, el número de la línea de tratamiento, el sexo, la raza y/o la edad del paciente. Por esto, los estudios farmacogenéticos en ocasiones conducen a resultados confusos y contradictorios que obligan a tener cautela en la interpretación de los resultados y exigen validaciones posteriores en estudios clínicos prospectivos. En la presente tesis doctoral se expondrá una visión simplificada de los principales polimorfismos genéticos que se han



relacionado con la respuesta y/o toxicidad a los fármacos más comúnmente utilizados en el CCR.

## **2.1.- Farmacogenética de los agentes quimioterápicos**

### **2.1.1.- Fluoropirimidinas: El 5-Fluorouracilo y la Capecitabina**

Los factores más relevantes en el uso clínico del 5-FU desde el punto de vista farmacogenético, abarcan la gran variabilidad intra e interindividual en la farmacocinética, el índice terapéutico estrecho y el papel importante que tienen las enzimas timidilato sintasa (TS), metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD).

El 5-FU es una fluoropirimidina que pertenece a la familia de los fármacos antimetabolitos, que se ha consolidado como agente quimioterápico desde hace 60 años y sigue siendo uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de tumores sólidos como los cánceres colorrectal, gástrico, esofágico, de mama y de cabeza y cuello (108). Estos fármacos son análogos de un sustrato metabólico natural de la célula que actúan durante la síntesis del ADN y ARN. En concreto, el 5-FU es un análogo de la base pirimidínica uracilo, en la que se sustituye un átomo de hidrógeno en la posición 5' del anillo de pirimidina por un átomo de flúor. La capecitabina es un profármaco del 5-FU que se transforma a través de carboxilesterasas presentes en plasma, hígado y en el mismo tumor en 5-FU. Esto supone una ventaja teórica de concentración del fármaco en el tumor.

El 5-FU entra en la célula por el mismo mecanismo de difusión facilitada que utiliza el uracilo (109). Aproximadamente el 80% del 5-FU es transformado en una forma inactiva (5-FUH<sub>2</sub>) por la acción de una enzima clave en el metabolismo del fármaco: la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD). El 20% del 5-FU residual se transforma a sus metabolitos activos, el 5-fluoroUTP (5-FUTP) y el 5-fluoro-2'-

## Introducción

deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP). Cuando el fármaco es administrado por vía oral o bolus, actúa a través del metabolito 5-FUTP que se incorpora al ARNm intracelular y conlleva la disfunción e inhibición de la síntesis de proteínas. Cuando es administrado por infusión continua la enzima timidina fosforilasa (TP) cataliza la conversión de 5-FU a 5-fluorodeoxiuridina (FudR) que, posteriormente, es fosforilada por la timidina quinasa (TK) en FdUMP. La acción principal del FdUMP es la inhibición de la timidilato sintasa (TS), que cataliza la síntesis del desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) a partir de 2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP). FdUMP compite con el sustrato natural (dUMP) de la TS para formar un complejo ternario estable con la TS y el cofactor 5,10-metilen-tetrahidrofolato ( $5,10\text{-CH}_2\text{THF}_4$ ) generando la conversión a 5'-metil-tetrahidrofolato gracias a la acción de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (110). La inhibición de la TS conlleva una disminución de los niveles de dTMP (timina) y, por consiguiente de desoxitimidina-5'-trifosfato (dTTP) necesario para la síntesis de ADN. De forma indirecta se produce acumulación de dUMP que resulta en la incorporación de desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) en el ADN debido a la ausencia del sustrato natural (dTTP). Esta incorporación errónea altera la estabilidad de la hebra y conduce finalmente a una inhibición de la síntesis del ADN y la subsiguiente inducción de la muerte celular. Por tanto, la TS es un enzima limitante en la ruta de síntesis de novo de timina, nucleótido necesario para la síntesis de ADN, lo que le confiere una atractiva diana para moléculas de inhibición (Figura 5).

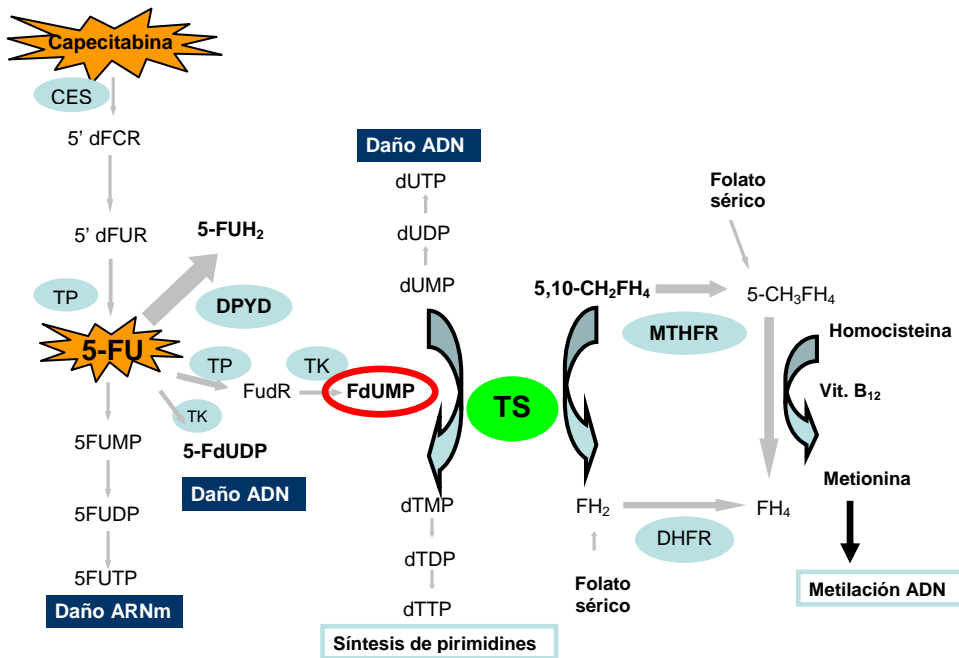


Figura 5. Metabolismo del 5-FU. Nomenclatura: 5-FUH<sub>2</sub>: 5-fluoro-5,6-dihidouracil; DPYD: dihidropirimidina deshidrogenasa; FdUMP: 5-fluoro-2'-deoxiuridin-5'-monofosfato; TP: timidina fosforilasa; FudR: 5-fluorodeoxiuridina; TK: timidina quinasa; TS: Timidilato Sintasa; dUMP: 2'-deoxiuridin-5'-monofosfato; dTMP: desoxitimidina-5'-monofosfato; dTTP: desoxitimidina-5'-trifosfato; dUTP: desoxiuridina-5'-trifosfato; 5-FdUTP: 5-fluorodesoxiuridina trifosfato; 5-FUTP: 5-fluorouridina trifosfato; FudR: 5-fluorodeoxiuridina; MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa; 5,10-CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>: 5,10-metilen-tetrahidrofolato; 5-CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub>: 5- metil-tetrahidrofolato.

Adicionalmente, el 5-FU también se metaboliza a la forma 5-fluorodesoxiuridina trifosfato (5-FdUTP) que actúa como falsa base incorporándose en el ADN, proceso que conduce del mismo modo a la muerte celular.

A continuación se describen las características más destacadas de cada uno de los genes que codifican para las enzimas protagonistas del metabolismo del 5-FU (TS, MTHFR, DPYD).

### **El gen de la Timidilato Sintasa (TS)**

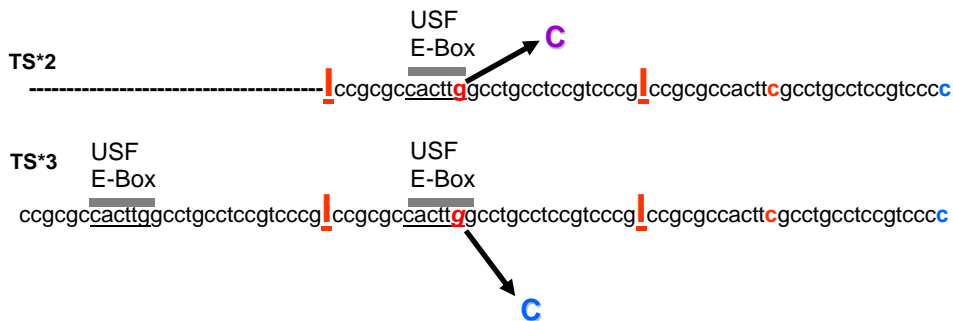
La timidilato sintasa es la principal diana farmacológica del 5-FU. Es una enzima citosólica con una estructura dimérica con dos subunidades idénticas de aproximadamente 38.5 KDa. La TS tiene un papel clave en el metabolismo del ácido fólico y cataliza la metilación reductiva de desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) a desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP), en presencia del cofactor de folatos reducido, metilen-tetrahidrofolato (CH<sub>2</sub>THF<sub>4</sub>), que actúa como grupo donador de metilo. Esta reacción es la única fuente "de novo" de dTMP (timidina), nucleótido indispensable para la síntesis de ADN.

El gen de la TS localizado en el cromosoma 18p, contiene 7 exones y ocupa unas 15,84 Kb del ADN genómico. En la región promotora del gen de la TS se han descrito tres polimorfismos funcionales. El primero de ellos consiste en un número variable de repeticiones en tándem o VNTR (del inglés Variable Number of Tandem Repeats) de 28 pares de bases (pb). Aunque se han descrito alelos que contienen dos, tres, cuatro, cinco y hasta nueve repeticiones de la secuencia de VNTR, los alelos con dos (TS\*2R) y tres (TS\*3R) repeticiones son los más frecuentes. Experimentos *in vitro* realizados mediante el ensayo de luciferasa han demostrado que el alelo TS\*3R presenta una actividad enzimática superior respecto a la del alelo TS\*2R (111). De hecho, existe una asociación entre el polimorfismo VNTR y los niveles de expresión de la TS, probablemente por una mayor eficiencia en la traducción del gen que contiene alelos con TS\*3R (112, 113). Estas VNTR en la región promotora contienen secuencias consenso de la familia de factores de transcripción USF E-box (CACTTG). El alelo TS\*3R contiene dos secuencias consenso de la familia USF E-box, mientras que el alelo TS\*2R sólo contiene una de estas secuencias.

El segundo polimorfismo descrito por Mandola *et al.* es un SNP que consiste en una sustitución de G>C en el 12º nucleótido de la segunda repetición en el alelo

TS\*3R. Esta sustitución polimórfica G>C cambia el residuo crítico en la secuencia consenso de la familia USF E-Box, eliminando o creando el dominio de unión a USF-1 y alterando la actividad transcripcional (Figura 6) (114). Kawakami *et al.* confirmaron la presencia del polimorfismo G>C y clasificaron el genotipo de los pacientes con cáncer colorrectal de acuerdo a la combinación del polimorfismo y el VNTR : 2R/3G, 3C/3G, y 3G/3G (genotipos asociados con alta expresión de TS) y 2R/2R, 2R/3C, y 3C/3C (baja expresión de TS) (115).

Figura 6. Estructura y polimorfismos más frecuentes en la región promotora del gen TS.



Estudios clínicos han demostrado que la variante 2R/2R se asocia con menores niveles de expresión de TS y por lo tanto una tasa de respuesta tumoral (TR) significativamente mejor (36 -75% frente a 8-40%;  $p<0,05$ ), supervivencia libre de enfermedad (10 vs 8 meses;  $p=0,015$ ) y global (21,9 a 29 vs 23.8 meses,  $p<0,05$ ) en pacientes tratados con un solo régimen de fluoropirimidinas (116-120) o en asociación con oxaliplatino (121, 122) o irinotecán (123). Esta variante también está asociada con un mayor riesgo de efectos secundarios graves (43% frente al 4%  $p<0,01$ ) (124). Otros pocos estudios han sido publicados y contradicen la esta correlación, siendo la variante 3R la que mejor TR (125), SG y SLP presentaba (120, 126). Estos resultados podrían explicarse por la presencia del SNP G>C en el nucleótido 12º de la segunda repetición de los alelos 3R. De hecho, la

## Introducción

combinación de estos dos polimorfismos, en estudios más recientes concluye que las variantes 2R/2R, 2R/3RC, 3RC/3RC se asocian con mejores TR (76% vs 24%;  $p=0,011$ ) (127) y SG (50 vs 20 meses;  $p=0,03$ ) que los genotipos 2R/3RG, 3RC/3RG y 3RG/3RG (128, 129).

Recientemente se ha descrito la existencia de un tercer polimorfismo muy poco frecuente en la región promotora en el alelo TS\*2, que consiste también en un cambio de base de G>C en el 12<sup>º</sup> nucleótido de la primera repetición de 28 pb (130).

En la región 3'UTR del gen TS, se ha descrito otro polimorfismo frecuente que consiste en la delección de 6 pb en la posición 1494 (TTAAAG). Se ha descrito que esta variación genética causa inestabilidad en el ARNm y está asociada con una disminución de los niveles intratumorales del ARNm de la TS en CCR (131). Sin embargo, la influencia de este polimorfismo no está del todo clara; el genotipo +6/+6 se ha relacionado con una peor SLP en un estudio entre los pacientes tratados con el régimen de primera línea FOLFIRI (132), pero con una mejor TR en los pacientes tratados en primera línea con fluoropirimidinas orales (118) y una mejor SLP en los pacientes tratados con quimioterapia basada en oxaliplatino (133).

## **El gen de la Metilen-Tetrahidrofolato Reductasa (MTHFR)**

La actividad de la metilen-tetrahidrofolato reductasa es clave para la homeostasis y regulación del folato intracelular (CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>), esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Cataliza la conversión irreversible de 5,10-metilen-tetrahidrofolato (5,10-CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>) a 5'-metilentetrahidrofolato (5'-CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub>), que actúa como donador de radicales metilo necesario para la conversión de homocisteína en metionina y la subsecuente producción de S-Adenosilmetionina

(SAM). SAM es el donador universal de grupos metilo en humanos y es necesario para múltiples reacciones de metilación en la célula, entre ellas la metilación del ADN (Figura 5).

El gen *MTHFR* se encuentra localizado en el cromosoma 1p, y contiene 11 exones (134). El polimorfismo más frecuentemente descrito consiste en la transición de C>T en la posición 677, en el exón 4 (codón 222), que da lugar a una sustitución de alanina por valina en un dominio al que se le ha atribuido actividad catalítica (135). Este polimorfismo está asociado con una baja actividad enzimática, un incremento de los niveles de homocisteína y una alteración de los niveles de folato. La variante T provoca un aumento en la termolabilidad del enzima que conlleva una reducción de la actividad de un 70% en los individuos homocigotos y de un 30% en los heterocigotos. En la población caucásica la frecuencia de homocigotos mutados es del 10-16% (136, 137).

El segundo polimorfismo más frecuente en el gen *MTHFR* es la transición de A>C en la posición 1298, en el exón 7 (codón 428), que resulta en la sustitución de ácido glutámico por alanina en un dominio proteico probablemente regulador (138). La variante C también conlleva una reducción de la actividad enzimática. La frecuencia de los homocigotos CC en población caucásica es del 12% (137). Los individuos que son heterocigotos para estas dos variantes (677T y 1298C) tienen una reducción del 40-50% de la actividad del gen *MTHFR* y un perfil bioquímico similar al observado en los homocigotos 677T (Tabla 3).

Diversos estudios han evaluado el papel del genotipo de *MTHFR* en relación al tratamiento basado en 5-FU en pacientes con CCR (139). Los pacientes con genotipo TT del polimorfismo 677 C>T respondían mejor al tratamiento que aquellos con genotipo heterocigoto (CT) o salvaje (CC). Este polimorfismo también se ha asociado a con un tiempo mayor a la progresión, aunque sin efectos relevantes en la supervivencia global (125, 140-143). De forma complementaria, los pacientes portadores de la variante A del polimorfismo 1298 A>C mostraron

## Introducción

una menor toxicidad (120, 144) y una disminución en la TR tras el tratamiento basado en fluoropirimidinas (122, 142).

*Tabla 3. Polimorfismos frecuentes en el gen MTHFR y su relación con la actividad enzimática.*

<b>Polimorfismo</b>	<b>Cambio de aminoácido</b>		<b>Actividad enzimática</b>
<b>677 C&gt;T</b>	A222V	Homocigosis	70% reducción
		Heterocigosis	35% reducción
		Doble heterocigosis	40-50% reducción
<b>1298 A&gt;C</b>	E428A	Heterocigosis	Reducción
		Homocigosis	Reducción

### **El gen de la Dihidropirimidina Deshidrogenasa (DPYD)**

La dihidropirimidina deshidrogenasa cataliza el paso inicial en la vía del catabolismo de las pirimidinas y, por tanto, del 5-FU. El gen *DPYD* está localizado en el cromosoma 1p22 y contiene 23 exones (843 kb) con un tamaño que varía desde 69 hasta 1.404 pb.

Es un gen muy polimórfico y se han descrito hasta 42 mutaciones. Aproximadamente el 3% de la población son portadores heterocigotos y un 0,1% son portadores homocigotos de mutaciones que inactivan la *DPYD* (145, 146). En la población occidental la mutación más frecuente consiste en el cambio de una G por una A que afecta a la secuencia de reconocimiento de splicing del intrón 14 (IVS14 +1 G>A) y da lugar a una delección de 55 aminoácidos de la proteína.



La DPYD transforma la molécula de 5-FU en una forma inactiva, el 5-dihidrofluorouracilo (5-FUH<sub>2</sub>), catabolizando el 80% del fármaco administrado (Figura 5). Este es el paso limitante del catabolismo de este agente que determina la biodisponibilidad del mismo.

Aunque los beneficios de la quimioterapia de 5-FU están bien establecidos, el desarrollo de toxicidad severa asociada al tratamiento con 5-FU es un problema clínico importante. Un meta-análisis con más de 1.000 pacientes diagnosticados de CCR tratados con 5-FU demostró que el 31-34% de los pacientes habían presentado toxicidad considerada grave (grados 3-4) (147). Diversos estudios han demostrado que la toxicidad relacionada con la administración de 5-FU está asociada con una actividad enzimática del DPD reducida o ausente (148-150).

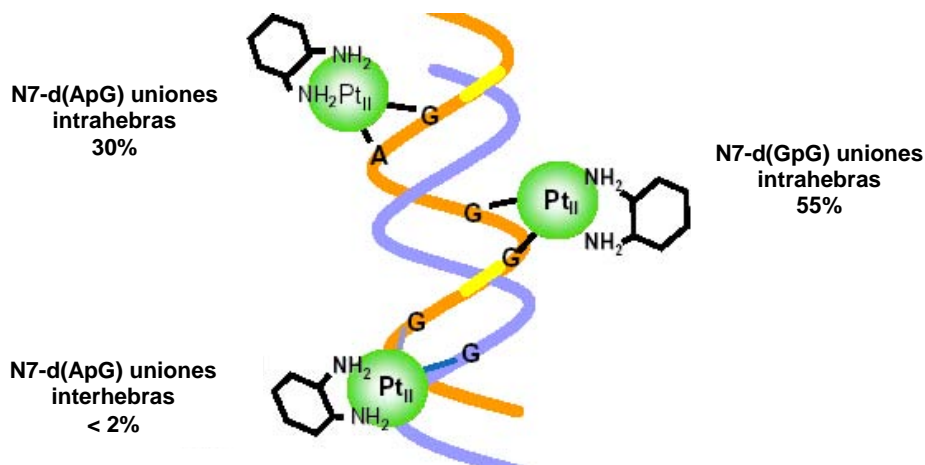
### **2.1.2.- El oxaliplatino**

El oxaliplatino (OX) es un derivado del platino de tercera generación análogo del cisplatino con diferente patrón de actividad y toxicidad. Contiene un anillo 1,2 diamino-ciclohexano y ha mostrado actividad antitumoral tanto in vitro como in vivo. El OX actúa como agente alquilante. Su acción deriva del daño que ocasiona en la molécula del ADN, provocando rotura de las cadenas de ADN y la formación de uniones intra e intercadena mediante enlaces covalentes con los nitrógenos en posición 7 de los anillos imidazol de las guaninas (G) y adeninas (A). De esta forma se impide la replicación y transcripción de los genes (Figura 7). Estas uniones oxaliplatino-ADN son más citotóxicas que las que se generan por la acción de otros derivados del platino y por tanto es más efectivo el bloqueo de la replicación del ADN (151). La principal toxicidad limitante de dosis es la neuropatía periférica que afecta a más del 70% los pacientes tratados y es reversible tras la suspensión del tratamiento en la mayoría de los casos (152). Se

## Introducción

ha propuesto que el acúmulo de compuestos de platino en los nervios sensoriales sería la causa de la neurotoxicidad crónica (153).

Figura 7. Tipos de uniones intra e inter-hebras que provoca el oxaliplatino



Con el fin de preservar la integridad de la molécula de ADN, las células se han dotado de unos mecanismos capaces de reparar el daño que distintos agentes le pueden provocar. Cuando el agente dañino es un fármaco, como es el caso del OX, se ponen en marcha dos vías importantes de reparación del ADN. Estas son la vía de reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) y la vía de reparación por escisión de bases (BER), que inician la reparación del ADN dañado, eliminando los aductos ADN-platino y por tanto queda disminuida la actividad antitumoral del OX. Otro mecanismo de prevención del daño que provocan los derivados del platino consiste en aumentar la detoxificación del OX a través de enzimas fase II metabolizadoras como las Glutacion-S-transferasas.

**La vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER).**

Este proceso de reparación de la molécula de ADN es un mecanismo de defensa celular contra los efectos citotóxicos de la quimioterapia basada en derivados de platino mediante la reparación de los aductos que distorsionan la hélice de ADN (154). El complejo proteico reparador responsable para la escisión está codificado por distintos genes, incluyendo el “excision repair cross complementing 1” (*ERCC1*) que forma un heterodímero con el “xeroderma pigmentosum grupo F” (*XPF*) para crear una incisión en la posición 5' de la hebra de ADN dañada. Existe también una expresión coordinada del “xeroderma pigmentosum grupo D” (*XPB*) con *ERCC1* y otros genes del complejo reparador NER (Figura 8).

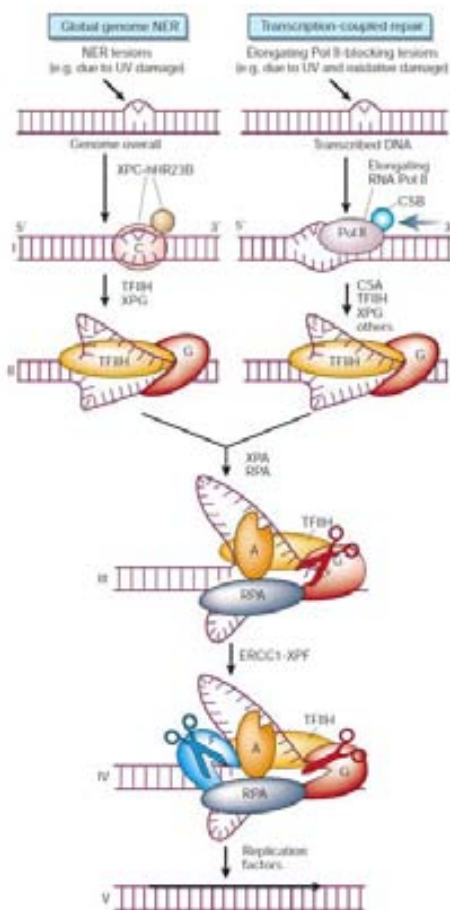
El gen *ERCC1* se localiza en el cromosoma 19q13.2-q13.3 y codifica una proteína de 297 aminoácidos. Se han identificado diversos polimorfismos en este gen: i) un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el codón 118, posición 19007 que provoca un cambio C>T y no modifica el aminoácido codificado, la asparragina; ii) un segundo SNP, localizado en la posición 8092 de la región no traducida 3' que provoca un cambio C>A y iii) un SNP localizado en el intrón 3, posición 19716 que implica un cambio G>C.

Se ha evidenciado que unos niveles bajos de expresión del gen *ERCC1* se asocian a alteraciones en la capacidad reparadora del ADN. Este hecho conlleva un incremento en la respuesta y una mayor tolerancia a esquemas terapéuticos basados en derivados de platino (155, 156). Hasta la fecha los resultados publicados en relación al polimorfismo más estudiado del *ERCC1* (C118T) han descrito que la presencia del alelo T se asocia, de forma significativa, a una mayor mortalidad global (133), a un mayor riesgo de progresión y a una mayor probabilidad de respuesta (157). Sin embargo, existen resultados contradictorios en relación al papel del alelo T en cuanto a la expresión proteica de *ERCC1* (158, 159) por lo que serían necesarios más estudios que clarifiquen el verdadero papel

## Introducción

de este polimorfismo genético y su posible utilidad como marcador farmacogenético

*Figura 8: Esquema del funcionamiento del complejo reparador por escisión de nucleótidos (NER). Hay dos formas distintas de NER: NER genómico global (GG-NER), que corrige el daño en zonas del genoma transcripcionalmente silenciadas, y NER acoplada a transcripción (TC-NER), que repara lesiones en la hebra transcripcionalmente activa del ADN. Exceptuando el mecanismo de reconocimiento del daño las dos rutas son idénticas. Adaptada de JHJ Hoeijmakers, Nature 2001.*



- (I) El complejo XPC-hHR23B es el primero en detectar el daño en el ADN.
- (II) El complejo TFIIH está formado por las helicasas XPB y XPD encargadas de abrir ~ 30 pares de bases alrededor del ADN dañado.
- (III) XPA confirma la presencia del daño y la proteína de replicación A (RPA) estabiliza la estructura abierta.
- (IV) Las endonucleasas XPG i ERCC1/XPF, rompen los extremos 3' y 5' de la cadena dañada. Se genera un oligonucleótido de 24-32 bases que tiene la lesión.
- (V) La maquinaria de replicación normal del ADN completa la reparación.

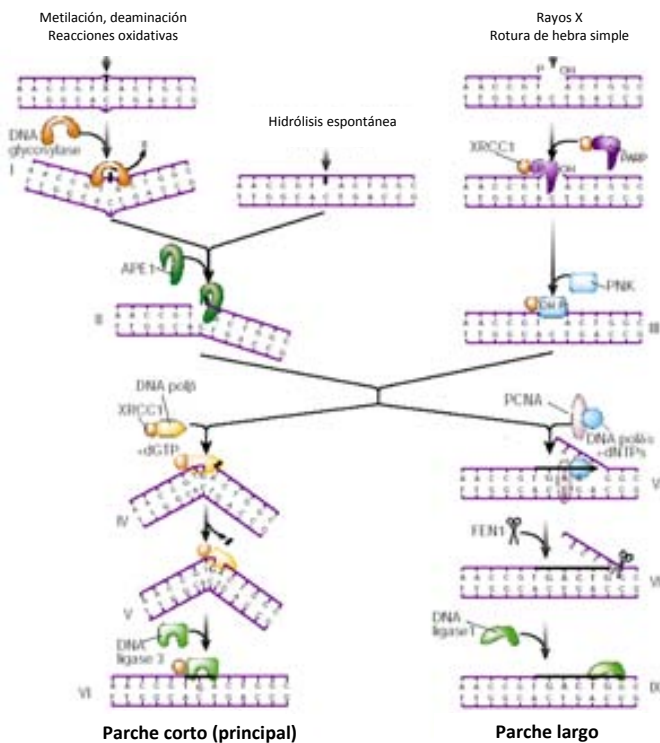
El gen *XPD* (también conocido como *ERCC2*) se encuentra en el cromosoma 19q13.3 y consta de 21.14 kb del ADN genómico. Se han descrito una serie de polimorfismos, algunos de ellos son infrecuentes y otros muy comunes. Uno de éstos es el SNP A751C que conlleva una sustitución de un residuo lisina (Lys) por una glutamina (Gln). Aunque se desconoce el verdadero papel de la mutación en *XPD-751*, se han publicado diversos resultados en relación al efecto del alelo Lys y la capacidad reparadora del *XPD* (160). Diversos estudios reportaron un descenso de la capacidad reparadora tras el tratamiento con OX en pacientes con CCR avanzado homocigotos o heterocigotos para el alelo que codifica para Gln. En otros se ha descrito una asociación estadísticamente significativa entre los pacientes portadores del alelo Gln y un aumento del riesgo de presentar progresión o mortalidad o peor respuesta al tratamiento basado en OX (133, 155, 161, 162).

### **La vía de reparación por escisión de bases (BER)**

Este mecanismo constituye el principal sistema reparador del daño ocasionado a la molécula de ADN por las distintas reacciones intrínsecas al metabolismo celular: reacciones oxidativas, metilación, deaminación e hidroxilación. El sistema BER participa, además, en la reparación de la rotura de hebras de ADN que ocasionan los fármacos derivados de platino y las radiaciones ionizantes. En este proceso de reparación del ADN participa la proteína XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) que interactúa con la ADN ligasa III y forma un complejo con la ADN polimerasa y poliADP-ribosa polimerasa (Figura 9).

## Introducción

*Figura 9: Esquema del funcionamiento del complejo reparador del ADN por escisión de bases (BER). La reparación de parche corto (80-90%) reemplaza la lesión con un solo nucleótido. La reparación de parche largo reemplaza la lesión con 2-20 nucleótidos. (I) Una batería de glicosilasas se encarga de escindir la base dañada del esqueleto azúcar-fosfato. También se puede producir por hidrólisis espontánea. (II) La reacción principal del sistema BER se inicia por la APE1 endonucleasa. (III) La polimerasa poliADP-ribosa (PARP) se une en el punto de la lesión. Una polinucleótido quinasa (PNK) orienta los extremos de la reparación. (IV) El ADN polimerasa B se encarga de llenar el vacío y (V) elimina el residuo de azúcar. (VI) El complejo XRCC1-ligasa sella la lesión reparada. (VII-IX) La vía larga de reparación incluye diferentes ADN polimerasas y el antígeno de proliferación celular del núcleo (PCNA), así como la endonucleasa FEN1 y la ADN ligasa I. Adaptada de JHJ Hoeijmakers, Nature 2001.*



El gen *XRCC1* contiene 17 exones y se localiza en el cromosoma 19q13.2. Aunque se han reportado muchos polimorfismos, tres polimorfismos no-sinónimos en *XRCC1*, Arg194Trp (C>T) Arg280His (G>A) y Arg399Gln (G>A), han demostrado alterar la capacidad reparadora de ADN de la proteína *XRCC1*. En diversos trabajos se ha sugerido una reparación de ADN defectuosa en relación al polimorfismo Arg399Gln, de modo que la presencia del alelo que codifica para Glutamina (Gln) confiere una mayor sensibilidad al tratamiento con OX (163). Sin embargo, otros autores han descrito una menor respuesta estadísticamente significativa al tratamiento con OX en presencia del alelo Gln e incluso un mayor riesgo de mortalidad en pacientes homocigotos Gln/Gln (164). En otros trabajos, los resultados no mostraron ninguna asociación significativa (133, 155).

### **La glutatión-S-transferasa pi 1 (GSTP1)**

Las Glutatión-S-transferasas (GST) constituyen una familia de enzimas (citosólicas y de membrana), implicadas en la detoxificación celular. Se clasifican en siete subfamilias que se diferencian tanto en su estructura, como en sus funciones. Catalizan la conjugación de glutatión con xenobióticos electrofílicos para inactivarlos y facilitar su excreción del organismo. Las GSTs juegan un papel importante en el metabolismo de compuestos potencialmente genotóxicos de forma que se previene el daño del ADN y la formación de aductos. GSTP1, un isoenzima perteneciente a la familia  $\pi$ , participa en la detoxificación de derivados del platino y es un importante mediador tanto de la resistencia intrínseca como la adquirida al tratamiento con fármacos derivados del platino. El gen que codifica para GSTP1 se localiza en el cromosoma 11q13. Se han estudiado distintos polimorfismos en las subclases de GST (GSTP1, GSTT1 y GSTM1) que podrían alterar la actividad de GST en relación al tratamiento con OX. La disminución o

## Introducción

abolição de la actividad de este enzima daría lugar a una reducción de la actividad detoxificadora del enzima y por tanto un aumento en la eficacia de los compuesto de platino (165). El polimorfismo más estudiado implica una sustitución A>G en la posición 313 dentro del exón 5 que conlleva un cambio de aminoácido Ile105Val. Los SNP en el gen *GSTP1*, Ile105Val y Ala114Val, se han asociado con reducción en la actividad enzimática, mientras que deleciones en *GSTT1* y *GSTM1* conllevan una total abolición de la actividad de estos enzimas (166, 167).

Diversos estudios han reportado un beneficio de la variante polimórfica de GSTP1-105 (Val/Val) en relación a la mortalidad tras el tratamiento con OX (133, 167). Además, la variante genética GSTP1-105 se ha vinculado a un menor riesgo de presentar neurotoxicidad, coincidiendo con el aumento de actividad detoxificadora reportada en estudios in vitro (162, 168). Sin embargo, en otros trabajos no se confirma el verdadero valor pronóstico o la relación con el riesgo a presentar neurotoxicidad de esta variante tras el tratamiento con OX (155, 169, 170). Tampoco se observaron diferencias en cuanto al valor pronóstico y los diferentes genotipos en *GSTP1-114*, *GSTT1* y *GSTM1*.



### 2.1.3.- El irinotecán

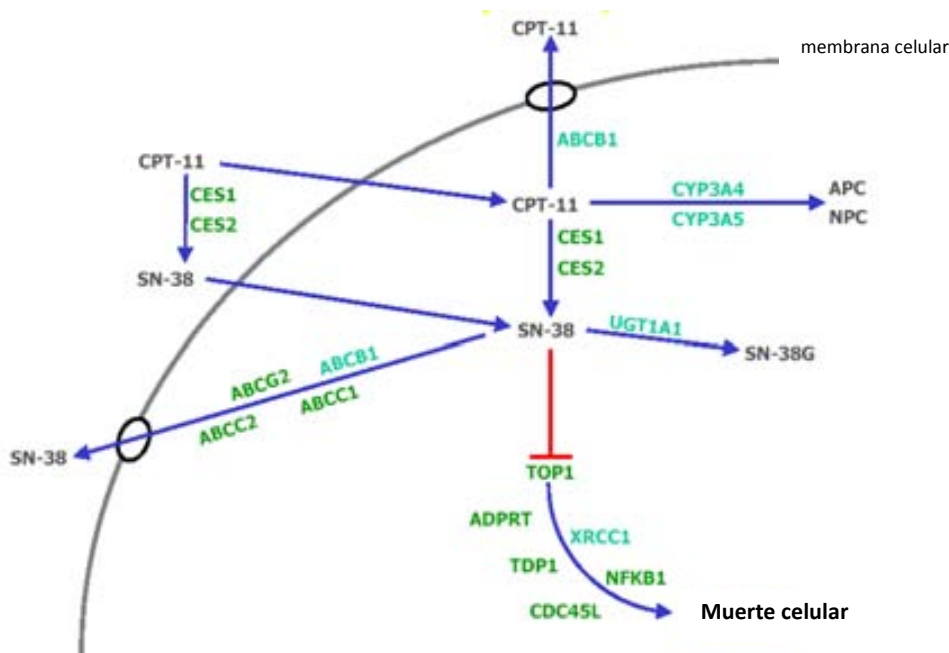
El desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos como el irinotecán (CPT-11), derivado hidrosoluble semisintético de la camptotecina (171), ofrece un nuevo enfoque terapéutico para los pacientes con CCR metastásico (172, 173). Este compuesto es un inhibidor de la topoisomerasa I, enzima necesario para la separación de la doble cadena del ADN durante los procesos de replicación y de transcripción. Esta inhibición conlleva la muerte celular y es la base de su efecto antineoplásico.

El irinotecán se metaboliza mayoritariamente por vía hepática. Puede convertirse en un metabolito inactivo gracias a la acción del citocromo CYP3A4 o en un metabolito activo, el 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38), mediante las carboxilesterasas. El SN-38 se metaboliza posteriormente por conjugación y se transforma en SN-38 glucurónido (SN-38G) por la acción de la uridina difosfato glucuronosiltransferasa (UGT1A1), el mismo enzima que conjuga la bilirrubina (Figura 10) (174).

Los efectos adversos del tratamiento con CPT11 son: toxicidad medular y diarrea severa. La aparición de esta toxicidad puede comportar la retirada del fármaco. Gupta *et al.* observaron que la glucorinización del SN-38 protegía de la toxicidad gastrointestinal del irinotecán (175). Wasserman *et al.* reportaron dos pacientes con CCR y síndrome de Gilbert (hiperbilirrubinemia no conjugada crónica debida a una actividad UGT1A1 reducida), que al ser tratados con CPT-11, desarrollaron una diarrea severa. Esto fue la primera evidencia clínica de la relación entre una actividad UGT1A1 reducida y la toxicidad inducida por irinotecán (176).

## Introducción

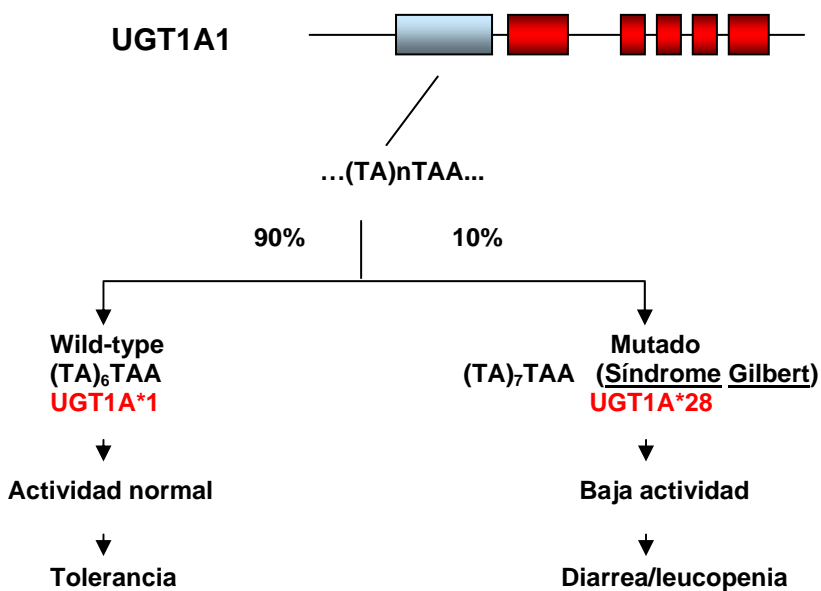
Figura 10: Metabolismo del irinotecán. El irinotecán (CPT-11) se convierte, tanto fuera como dentro de la célula en su metabolito activo SN-38 a través de las carboxilesterasas (CES). CPT-11 y SN-38 pueden ser transportadas al exterior celular a través de las proteínas transportadoras ABC (ATP-binding cassette). De forma alternativa, CPT-11 y SN-38 pueden ser inactivados por el citocromo P450 (CYP) o la uridina difosfato glicosiltransferasa (UGT), respectivamente. Si el SN-38 se une a su diana, la topoisomerasa (TOP1), interfiere con la síntesis de ADN y en los procesos de reparación, provocando la muerte celular. ADPRT, ADP-ribosiltransferasa; APC y APN, metabolitos inactivos de SN-38; CDC45L, cell division cycle 45 homolog; SN-38G, SN-38 glucurónido; TDP, tirosil-ADN fosfodiesterasa, XRCC1; X-ray repair cross-complementing protein 1; NFKB1, factor nuclear  $\kappa$ .



El locus *UGT1A* se localiza en 2q37 y ocupa una 160 Kb de ADN genómico. El gen *UGT1A* contiene 9 promotores y primeros exones que, mediante splicing alternativo con los cuatro exones únicos genera 9 isoenzimas *UGT1A*. En la región promotora de *UGT1A1* existe un polimorfismo que consiste en una variación del

número de repeticiones del dinucleótido TA, que varía de 5 a 8. En la población caucásica la forma normal es la homocigosis para 6 repeticiones (6/6 ó  $UGT1A1^{*1}/^{*1}$ ). El genotipo asociado con el síndrome de Gilbert en población caucásica se caracteriza por un promotor que contiene un dinucleótido TA extra en cada alelo, designado como  $UGT1A1^{*28}$  (7/7 ó  $UGT1A1^{*28}/^{*28}$ ). Los pacientes heterocigotos ( $^{*1}/^{*28}$ ) y homocigotos ( $^{*28}/^{*28}$ ) para este alelo tienen una actividad enzimática disminuida y están predispuestos a desarrollar diarreas severas y toxicidad hematológica grave si se tratan con irinotecán (Figura 11).

Figura 11: El polimorfismo de la región promotora del gen  $UGT1A1$  en relación al tratamiento con irinotecán



Diversos trabajos han reportado la relación entre el genotipo de  $UGT1A1$  y la toxicidad inducida por irinotecán. Ando *et al.* estudiaron 118 pacientes con distintos tipos de cáncer tratados con irinotecán. Observaron que la frecuencia del alelo  $UGT1A1^{*28}$  era 3.5 veces más elevada en el grupo de pacientes que

## Introducción

desarrollaron diarrea severa o leucopenia que en los pacientes que no presentaron efectos adversos (177). Iyer *et al.* investigaron 20 pacientes tratados con irinotecán a dosis de 300 mg/m<sup>2</sup> cada tres semanas. Los pacientes con genotipo UGT1A1 normal no desarrollaron diarrea ni leucopenia severas. Estos efectos adversos aparecieron únicamente en pacientes con un genotipo UGT1A1 \*1/\*28 y \*28/\*28 (178). Mathijssen *et al.* analizaron 65 pacientes tratados con irinotecán (200-350 mg/m<sup>2</sup> en infusión). Únicamente dos pacientes fueron homocigotos para el alelo UGT1A1\*28 y uno de ellos fue el único paciente que desarrolló una diarrea severa (grado IV) (179).

En el año 2004 el profesor Innocenti, acuñó el término “Irinogenetics” a raíz de varias publicaciones que establecían una clara relación entre el genotipo de *UGT1A1* y la toxicidad al tratamiento con irinotecán (180-183). Nuestro grupo describió los acontecimientos adversos graves relacionados con la administración de irinotecán en 74 pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Se observó diarrea grado III-IV en 5/8 pacientes (63%) homocigotos para el alelo \*28 y en 12/33 (36%) de los pacientes heterocigotos, en comparación con 5/33 (15%) de los pacientes con un genotipo salvaje. Y estas diferencias fueron significativas ( $p=0,02$ ) aun después de ser ajustadas por otras variables clínicas en el modelo de regresión logística. Cuando los acontecimientos adversos graves considerados fueron la diarrea, la astenia grave, la toxicidad hematológica o el mal estado general, estos sucedieron en el 100% de los pacientes homocigotos para el alelo \*28, precisándose en todos ellos la suspensión o la disminución de la dosis del fármaco. En el grupo de pacientes heterocigotos, el porcentaje fue del 58% y en el de pacientes homocigotos para el alelo salvaje, el porcentaje fue del 28% (toxicidad base) (183).

La FDA americana ha aceptado recientemente la relevancia de la farmacogenética de *UGT1A1* en la predicción de la toxicidad asociada al tratamiento con irinotecán: a partir del 2005, en la ficha técnica americana de Camptosar® se

señala la asociación existente entre la actividad enzimática disminuida del alelo *UGT1A1*\*28 y la presencia de neutropenia tras la administración del fármaco y recomienda una reducción de dosis en los pacientes homocigotos para dicho alelo (184). Sin embargo, a pesar de la bondad de esta recomendación, no se detalla cuál es la reducción de dosis que en estos pacientes con genotipo \*28/\*28 disminuiría la toxicidad del fármaco.

De lo anteriormente descrito podríamos concluir que la suspensión prematura y la disminución de las dosis así como los retrasos en la administración del fármaco realizados a consecuencia de la toxicidad pueden provocar una disminución de la actividad antitumoral. Por lo tanto, los índices de toxicidad grave que colaboran con la disminución de la supervivencia podrían ser anticipados mediante el análisis del genotipo para optimizar e individualizar las dosis de irinotecán. Sin embargo, el escaso número de pacientes de los diferentes estudios, las diferencias étnicas, las distintas dosis de irinotecán y los diferentes esquemas empleados, y la correlación con la toxicidad hematológica pero no con la diarrea grave en los estudios publicados han limitado la aplicación clínica de la determinación farmacogenética del *UGT1A1*.

En el año 2007, un meta-análisis de los estudios publicados hasta entonces demostró una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de *UGT1A1* y la neutropenia severa en aquellos pacientes tratados con dosis de irinotecán superiores o iguales a  $150\text{mg}/\text{m}^2$ , pero no aquellos que recibieron  $< 150\text{mg}/\text{m}^2$  (185). Más recientemente, otro meta-análisis que incluye estudios adicionales con 1998 pacientes tratados, concluye que el genotipo *UGT1A1* \*28/\*28 se asocia a un riesgo elevado neutropenia grave incluso con dosis bajas de irinotecán (186).

## 2.2.- Farmacogenética de los agentes diana

### 2.2.1.- Cetuximab y panitumumab

La mayoría de los cánceres epiteliales presentan una activación en la función de factores de crecimiento y de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). EGFR es una glicoproteína transmembrana que se encuentra expresada en más del 80% de los tumores colorrectales. Cuando el factor de crecimiento epidérmico (EGF) se une al EGFR activa múltiples cascadas de señalización intracelular, incluyendo las vías RAS/RAF/MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) y fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K/AKT) (Figura 12). Esto se traduce en el aumento de la proliferación celular, diferenciación, angiogénesis, metástasis y la disminución de la apoptosis (Figura 13). En base a esto, esta molécula se propuso como una buena diana para un tratamiento anticanceroso. Actualmente existen cuatro antagonistas de EGFR, erlotinib, gefitinib, cetuximab y panitumumab y los dos últimos, con estructura de anticuerpo monoclonal, han sido aprobados para el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado.

Cetuximab, anticuerpo monoclonal quimérico IgG1, y panitumumab, anticuerpo monoclonal IgG2 totalmente humano, bloquean el sitio de unión del ligando de EGFR impidiendo la dimerización del receptor y la fosforilación de la proteína tirosina quinasa del receptor.

El tratamiento con cetuximab y panitumumab han demostrado tener una eficacia intrínseca, como se demuestra cuando se administran solos en monoterapia. En pacientes con CCR metastásico resistentes a todos los otros regímenes de quimioterapia, el tratamiento con cetuximab mejora el objetivo de tasa de respuesta (RR; 8% vs 0%,  $p < 0,001$ ), SLP (15% vs 3% a los 6 meses;  $p < 0,001$ ) y SG (6,1 vs 4,6 meses;  $p = 0,005$ ) en comparación con el mejor tratamiento de soporte (4). Del mismo modo, panitumumab prolongó significativamente la SLP (hazard

ratio [HR] 0,54; IC 95% 0,44-0,66, [ $p < 0,0001$ ]), y la tasa de respuesta objetiva frente al mejor tratamiento de soporte (10% vs 0%;  $p < 0,0001$ ) (5). Cuando se administra en combinación con FOLFOX o FOLFIRI, hay un efecto sinérgico en el tratamiento de primera y segunda línea, con los pacientes que demuestran una mejora significativa de la tasa de respuestas y de la SLP tanto en primera como en segunda línea de tratamiento (97-99, 103, 104, 187).

Figura 12: Cascada de señalización de la vía del EGFR (188)

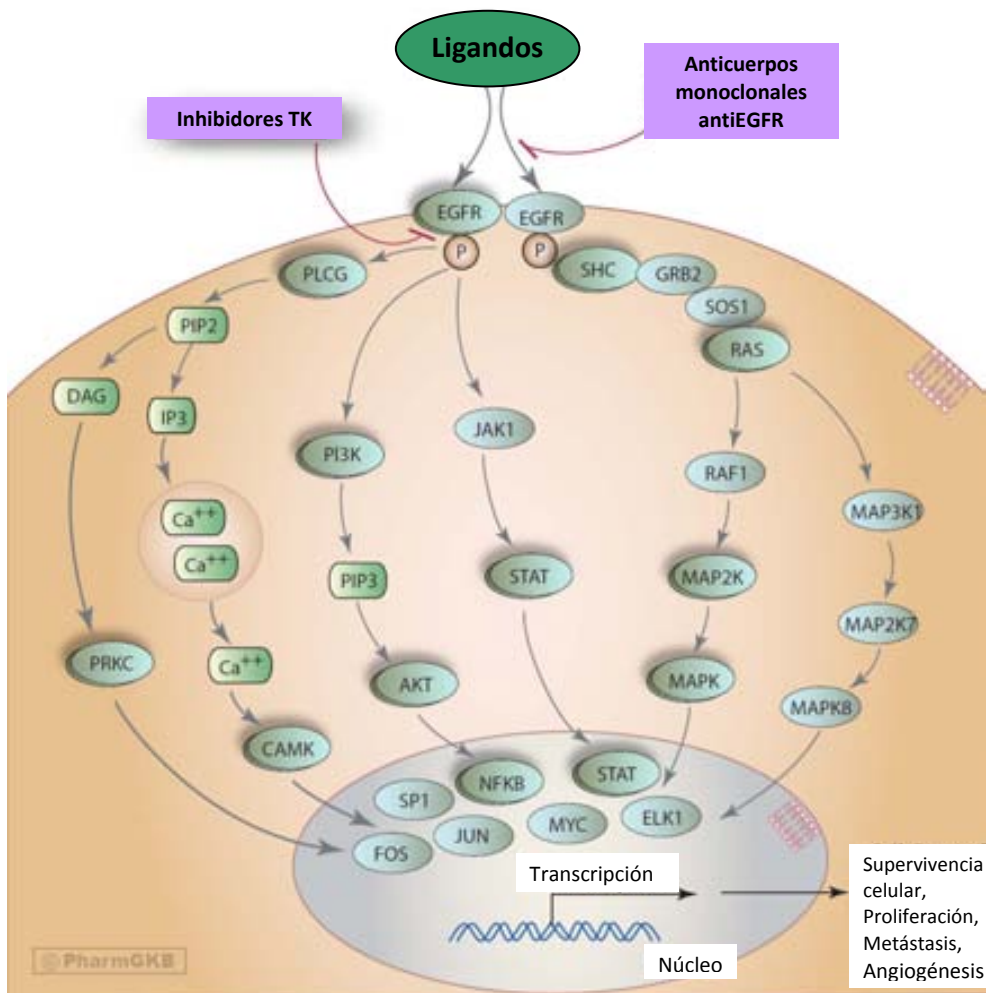
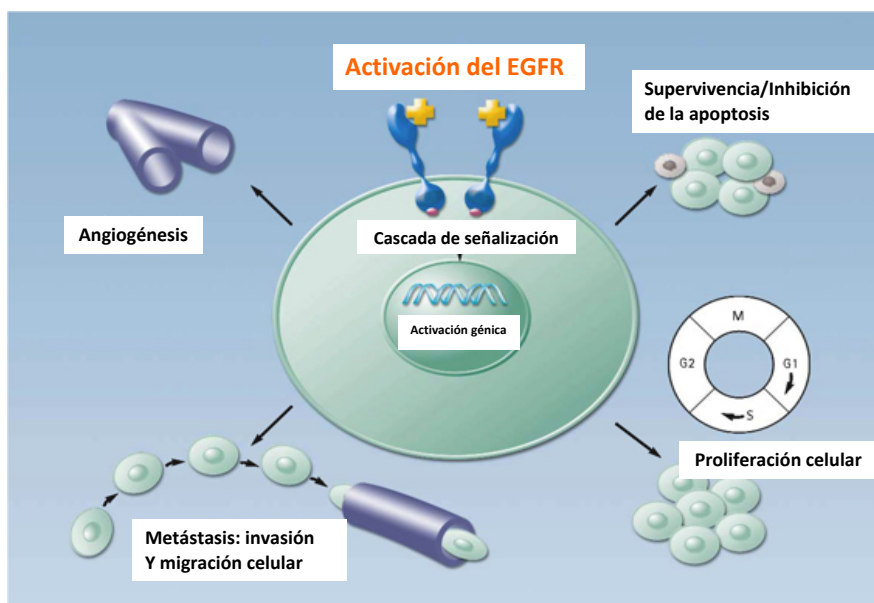


Figura 13: Efectos de la activación de EGFR



Puesto que solamente un subgrupo de pacientes podrá beneficiarse del tratamiento con inhibidores de EGFR, es importante identificar y validar los criterios y/o los marcadores biológicos que permitan seleccionar dichos pacientes. A continuación se describen algunos de los biomarcadores más destacados en esta vía de señalización.

### **Mutaciones somáticas en genes implicados en las vías señalización del EGFR: KRAS/BRAF/MAPK y PI3K/AKT**

Las mutaciones en el oncogén *KRAS* (codones 12, 13 ó 61) se encuentran en el 36 al 50% de los tumores colorrectales (98, 100, 189) y causan la activación constitutiva de la vía de RAS/RAF/MAPK, independiente de la unión del ligando (EGF) al receptor. En un estudio pionero (190) se analizaron, en 30 pacientes con



CCR tratados con cetuximab, las mutaciones en los genes *KRAS*, *BRAF* y *PI3K*. Se evidenció que la presencia de una mutación en *KRAS* en muestra de tejido tumoral era un factor de resistencia al tratamiento: ningún paciente del grupo respondedor tenía mutación en *KRAS*, frente al 68% de los no-respondedores ( $p=0,0003$ ). No se evidenció relación entre la respuesta y las mutaciones del gen *PI3K* y no aparecieron mutaciones en el gen *BRAF*. En línea con esta observación, cuando se analiza el estado del gen *KRAS* en relación al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR se ha comprobado, en diferentes ensayos clínicos, la ausencia de beneficio clínico para los pacientes con tumores *KRAS* mutados (104, 189, 191, 192). Basándose en estos hallazgos, la FDA y la Agencia de Medicamentos Europea han aprobado su uso exclusivamente en pacientes con CCR metastásico sin mutación en *KRAS* o también llamados *KRAS* wild-type (*KRAS*-wt).

El proto-oncogén *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) codifica para una serina-treonina quinasa que también forma parte de la cascada de señalización RAS/RAF/MAPK. Al igual que en las alteraciones del gen *KRAS*, las mutaciones en *BRAF* provocan la activación constitutiva de la vía, siendo la presencia de mutaciones en *KRAS* y *BRAF* mutuamente excluyentes. Se ha visto que la mutación mayoritaria de *BRAF* es la V600E que se encuentra presente en aproximadamente un 3-10% de los tumores colorrectales (193, 194). En diferentes estudios se ha correlacionado una falta de respuesta a los tratamientos anti-EGFR en tumores con mutación de *BRAF*. A pesar de que la presencia de mutación en *BRAF* no se relaciona con la supervivencia libre de recaída en tumores colorrectales estadios II y III, en aquellos que presentan recidiva constituye un marcador predictivo negativo de respuesta al tratamiento anti-EGFR. Los pacientes tratados con cetuximab que tenían tumores *BRAF* mutados tenían una menor SLP (6,5 vs 11,4 meses;  $p=0,0001$ ) y SG (12,9 vs 24,5 meses;  $p < 0,0001$ ) que aquellos con *BRAF* salvaje y la SLP era comparable a los tumores con mutación en

## Introducción

*KRAS* (195, 196). Esta paradoja puede explicarse por la alta incidencia de inestabilidad de microsatélites presente en tumores *BRAF* mutados (hasta un 40%) que es un reconocido marcador pronóstico favorable en estadios iniciales de CCR. Por lo tanto, el verdadero valor pronóstico y/o predictivo de la mutación de *BRAF* debería ser dilucidado en ensayos clínicos prospectivos antes de su incorporación en la práctica clínica rutinaria.

*PIK3CA* codifica la proteína PI3K que es crítica en la señalización hacia AKT de la vía EGFR. La presencia de mutaciones en *PIK3CA* han sido encontradas en el 10-18% de los tumores colorrectales (197), no quedando claro su papel como factor predictivo en pacientes que reciben tratamiento anti-EGFR (198). En un estudio con 110 pacientes con CCR metastático se observó que la presencia de mutaciones en *PI3K* presentaba una asociación estadísticamente significativa con la resistencia al tratamiento con cetuximab o panitumumab ( $p=0,038$ ). Cuando se consideraban solo los tumores *KRAS*-wt esta correlación estadística era mayor ( $p=0,016$ ). Por lo que los autores concluyen que el análisis combinado de *PI3K* y *KRAS* predice en un 70% de los casos la falta de beneficio al tratamiento con cetuximab o panitumumab (199). Recientemente, otro estudio ha reportado un menor tiempo a la progresión en tumores con mutación en el gen *PI3K* (196).

En la vía PI3K/AKT, la actividad del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) es crítica para su función como supresor tumoral, al antagonizar la activación de PI3K. Independiente del estado del gen *KRAS*, aproximadamente el 40-50% de los pacientes presentan una expresión positiva tumoral de PTEN mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHC) (200). En pacientes tratados con cetuximab, la expresión positiva de PTEN se ha asociado a una mayor SLP tanto en tumores con o sin mutación en *KRAS*, en comparación con los pacientes *KRAS*-wt y PTEN negativo (196, 200, 201). Respecto a AKT, varios estudios ponen en evidencia que la presencia de mutaciones de *AKT* en cáncer de colon son muy infrecuentes y que su análisis presenta un limitado interés (202), sin que se haya objetivado su

posible valor predictivo al cetuximab. Sin embargo la expresión tumoral de p-AKT (AKT fosforilada), asociada a la presencia de mutación en *PI3K*, se ha relacionado con tumores de colon de bajo estadio y de buen pronóstico (203).

### **Número de copias y expresión del gen EGFR**

Los primeros estudios que evaluaron la eficacia de cetuximab casi exclusivamente incluyeron pacientes con tumores que expresaban EGFR. Sin embargo, estudios posteriores demostraron una significativa actividad anti-tumoral de cetuximab en pacientes *KRAS*-wt, independientemente de la expresión del EGFR. Por lo tanto, hoy en día sólo la ausencia de mutaciones en *KRAS*, y no la expresión de EGFR, se requiere para tratar a los pacientes con una quimioterapia que contenga además un anticuerpo anti-EGFR. Sin embargo, dentro de los tumores *KRAS*-wt, hasta el 60% de los pacientes no se benefician del tratamiento con anti-EGFR, por lo que es necesario la búsqueda de otros indicadores predictivos y pronósticos.

En cuanto a la importancia del número de copias de EGFR como marcador de respuesta, distintos trabajos sugieren que el aumento del número de copias de EGFR se asociaba a una buena respuesta (204, 205). Una limitación de la utilización del nº de copias de EGFR como biomarcador de respuesta es el hecho de que el porcentaje de tumores colorrectales con este marcador es únicamente del 10-15% de los casos.

### **Expresión de ligandos del EGFR: la epiregulina y la amfirregulina**

Partiendo de la hipótesis de que una expresión elevada de las moléculas que se unen al EGFR podría ser determinante en el crecimiento de los tumores CCR que son dependientes de EGFR, se efectuó el análisis de la expresión de EREG (epiregulina) y AREG (amfirregulina) en tumores de pacientes tratados en

## Introducción

monoterapia con cetuximab. Se demostró que los niveles altos de ARNm correspondientes a estos genes se asociaban a una mejor SLP independiente del estado de *KRAS* (206). Como era de esperar, un estudio posterior demostró que esta asociación era solo estadísticamente significativa en pacientes con tumores *KRAS*-wt (207).

### **Polimorfismos de la línea germinal de la vía del EGFR**

La farmacogenética ha puesto de relieve que la respuesta a un régimen de quimioterapia no sólo es impulsada por las características del tumor, sino también por el genoma heredado del paciente (huésped). En el gen *EGFR* se han descrito tres polimorfismos funcionales que se han asociado con la regulación de EGFR: i) una repetición del dinucleótido CA en el intrón 1; ii) un SNP (G>A) en el codón 497; iii) un SNP (G>T) en posición -216 que afecta el lugar de unión de Sp-1, un regulador clave de la actividad del promotor del gen *EGFR* (204).

El polimorfismo CA(n) en el intrón del gen *EGFR* parece variar la expresión de EGFR tanto in vitro como in vivo. Un mayor número de repeticiones CA se asocia con niveles bajos de EGFR, mientras que un bajo número de repeticiones se asocia con alta expresión de EGFR. Se ha descrito una correlación entre el genotipo CA corto (<20 repeticiones) una mayor SLP y SG en pacientes que recibían un tratamiento basado en cetuximab (208, 209).

El polimorfismo en el codón 497 (G>A) de *EGFR*, que conlleva la sustitución del aminoácido Arginina por Lisina en el dominio extracelular del receptor, se ha relacionado con cambios en las funciones de unión a ligando, crecimiento celular, activación tirosina quinasa e inducción de myc, fos y jun en comparación con la forma nativa. Se ha relacionado al genotipo *EGFR* G497A de forma independiente con un mejor pronóstico en pacientes tratados con cetuximab en monoterapia (210).

La modulación del ligando de EGFR, EGF, y de genes que actúan en la vía de señalización, como la Ciclina D1 puede estar en relación con la respuesta a la inhibición de EGFR, por cetuximab. En la región 5' no traducida de *EGF* existe una variante polimórfica (EGF61G>A) y también en el exón 4 del gen de la *Ciclina D1* se ha descrito un SNP (870 A>G) ambos relacionados con la evolución de los pacientes con CCR metastásico (209, 211).

Varios polimorfismos de otros genes han sido relacionados con la respuesta a cetuximab y se deberán tener en cuenta en el diseño de futuros ensayos prospectivos para una mejor elección del régimen de quimioterapia. Entre ellos los efectores de la vía del VEGF, incluyendo el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF1) (212); y la ciclooxygenasa-2 (COX2), importante mediador de la inflamación y fundamental para el desarrollo de tumores (210). Además, se ha postulado que la Interleucina-8 (IL-8) es un potente regulador del EGFR, de la angiogénesis y de la progresión tumoral. Se ha reportado que tres polimorfismos en genes relacionados con dichos procesos podrían jugar un papel importante en la regulación de la vía del EGFR: T-251A en la región promotora del gen IL-8, G+2607 en el exón 2 del gen *CXCR1* y C+785T en el exón 11 del gen *CXCR2*, ambos receptores de la IL-8 (213).

### **Polimorfismos de los genes relacionados con la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpo**

Los anticuerpos monoclonales pueden ejercer, además, una actividad antitumoral indirecta porque determinan una citotoxicidad mediada por células y dependiente del anticuerpo (ADCC). A través de este mecanismo, la porción Fc del anticuerpo (Fc $\gamma$ ) interactúa con los receptores Fc (Fc $\gamma$ R) expresados en las células efectoras citotóxicas (linfocitos natural killer o macrófagos) y permite la actividad antitumoral a través de la ADCC (214, 215). Por tanto, la efectividad de este

## Introducción

mecanismo inmunológico puede verse alterada por cambios funcionales en el receptor celular para la fracción constante de las inmunoglobulinas (FcγR) IIa (CD32a) y IIIa (CD16). Se han descrito SNPs en ambos genes que afectan la afinidad del receptor para Fc de anticuerpos y probablemente puedan relacionarse con la eficiencia del proceso de ADCC (216, 217). En un estudio pionero, Zhang *et al.* reportaron que los genotipos FcγRIIa-131H/H y FcγRIIIa 158F/F se asociaron con una SLP más larga en los pacientes tratados con cetuximab en monoterapia. A pesar de que estos resultados difieren en algunos detalles, en dos estudios posteriores, los polimorfismos de FcγRIIa y FcγRIIIa parecen estar relacionados con los resultados clínicos tras el tratamiento con cetuximab (208, 218).

### **MicroRNA circulante**

Los microRNA (miRNA) son una clase de ARN no codificante que se han convertido en elementos críticos de control en la biología del tumor. Al inhibir la traducción del ARNm, los miRNAs ejercen un efecto ya sea como supresores tumorales o como oncogenes. El miRNA Let-7, ha sido identificado como un regulador de la expresión directa de RAS mediante la unión a un sitio específico en la región 3' no traducida (UTR) del ARNm de KRAS, resultando en una disminución en la expresión de RAS. Dos estudios retrospectivos han identificado recientemente una asociación entre un polimorfismo del sitio de unión complementario de Let-7 y la respuesta a cetuximab (219, 220).

En el futuro, será un reto necesario integrar la información que se obtenga de cada agente terapéutico, para adaptar el mejor régimen de tratamiento a cada paciente de forma individual.

### **La toxicidad cutánea como marcador de eficacia**

A pesar de que un buen número de estudios están de acuerdo en que la toxicidad cutánea correlaciona con la eficacia de los tratamientos con anti-EGFR, no puede aún efectuarse ninguna recomendación basada en esta toxicidad. Alrededor del 50% de pacientes sin toxicidad cutánea o con únicamente un rash de grado 1 presentan respuesta y por otra parte, entre el 20-30% de pacientes que han desarrollado un rash grave progresan (97).

Lo anteriormente expuesto pone en evidencia que un mejor conocimiento del papel de los factores individuales (genéticos) que determinan el pronóstico, la respuesta y la toxicidad de fármacos anti-EGFR empleados en el tratamiento de tumores sólidos ayudarán a seleccionar a los pacientes que pueden beneficiarse de estos fármacos y permitirá optimizar su uso clínico.

### **2.2.2.- Bevacizumab**

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) inhibiendo así la unión de éste a sus receptores (VEGFR1, VEGFR2), situados en la superficie de las células endoteliales. Al neutralizar la actividad biológica del VEGF se reduce la vascularización de los tumores y, por tanto, se inhibe el crecimiento del tumor. En la primera línea de tratamiento del CCR metastásico, bevacizumab prolongó tanto la supervivencia global (20,3 vs 15,6 meses) como la supervivencia libre de progresión (9,4 vs 8 meses) cuando se administró combinado con 5-FU/CPT-11 ó 5-FU/OX (3, 94). Asimismo, ha sido aprobado en segunda línea de tratamiento tras haber demostrado un aumento en la supervivencia global y la SLP (221, 222).

La angiogénesis tumoral es un proceso complejo que lleva a la formación de neovasos que suministran sangre y nutrientes a la masa tumoral. Se trata de un proceso esencial tanto para el crecimiento del propio tumor como para el desarrollo de metástasis a distancia. Las células neoplásicas, así como las células inmunes y/o las células de los tejidos sanos son capaces de secretar sustancias con actividad angiogénica. Cuando estos factores de crecimiento se unen a sus receptores específicos presentes en las células endoteliales, se favorece la proliferación, migración e invasión de las células endoteliales, con la consiguiente formación de los capilares sanguíneos.

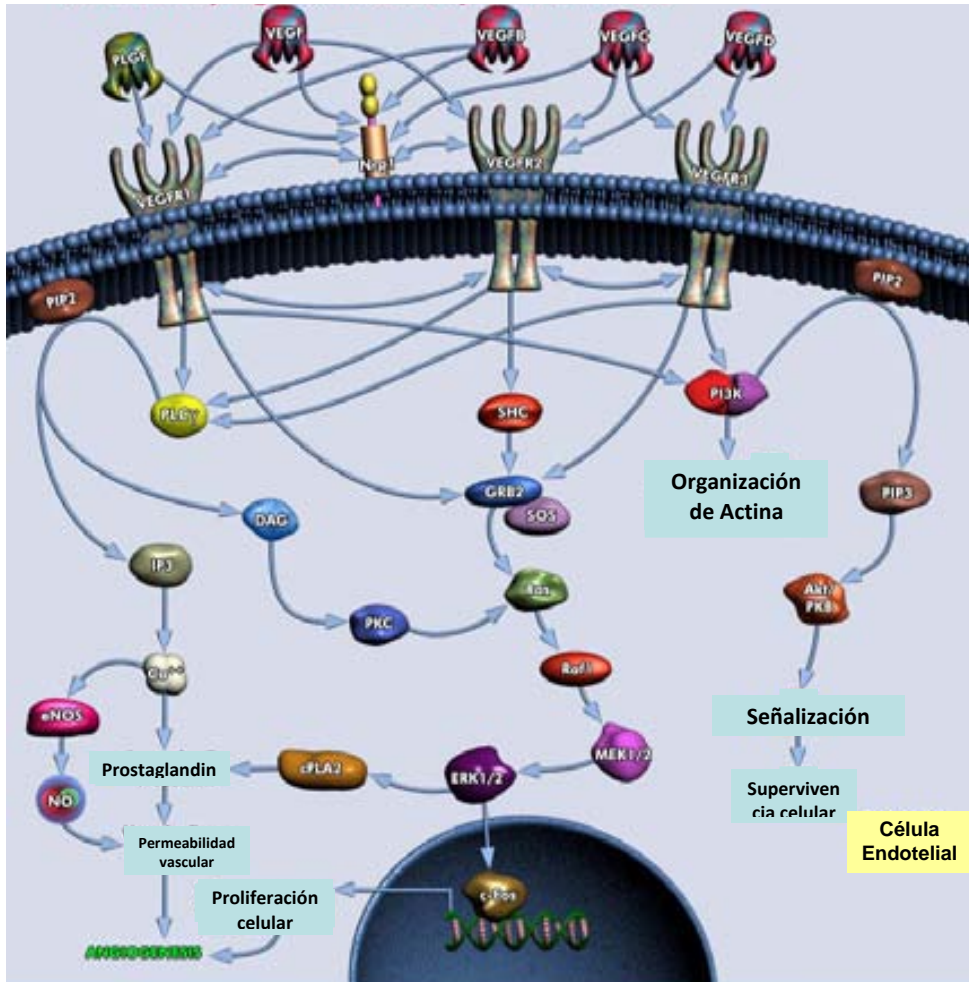
En la angiogénesis tumoral se dan dos fases separadas por el llamado “angiogenic switch” (interruptor angiogénico) (223). En un primer momento la incapacidad de los tumores para inducir angiogénesis compensa la tasa de proliferación de las células tumorales por la elevada tasa de apoptosis manteniendo al tumor en un estado latente (latencia angiogénica) (220). En esta fase prevascular, la expansión de las células tumorales está bloqueada como consecuencia de un equilibrio entre los factores proangiogénicos (VEGF, factor de crecimiento derivado de las



plaquetas (PDGF), FGF y angiopoyetina) y antiangiogénicos (endostatina, vasculostatina, andangiostatina). La transición de un estado predominantemente antiangiogénico de latencia a un estado de ambiente proangiogénico y crecimiento tumoral (fase vascular) es lo que se conoce como “angiogenic switch” (221, 222). Son múltiples los procesos que regulan la angiogénesis y se considera que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tiene un papel central en la angiogénesis tumoral. Existen al menos cuatro miembros de la familia de VEGF (VEGF-A, B, C y D; Figura 14). El gen VEGF está organizado en 8 exones que mediante splicing alternativo da lugar a 5 proteínas diferentes. La más importante de ellas es la VEGF-A que está formada por dos subunidades idénticas. Esta sustancia actúa como molécula clave en la angiogénesis, es un potente mitógeno endotelial y promueve la degradación de la matriz extracelular, la proliferación, la migración, la diferenciación y la supervivencia endotelial. El VEGF es inducido por la hipoxia, diversas citoquinas y factores de crecimiento como el EGF, PDGF, IGF-1 y bFGF, entre otros. Alteraciones genéticas en las vías que mantienen la angio-latencia o una eventual señal exógena proangiogénica puede restaurar el crecimiento tumoral. Por ejemplo, el oncogén *RAS* ha sido implicado en el mantenimiento de la angiogénesis tumoral mediante la inducción de VEGF y la represión de la trombospondina. Por el contrario, la pérdida de función del gen supresor tumoral p53 y la quinasa p38 pueden inducir la trombospondina o reprimir el VEGF.

Los estudios farmacogenéticos de la vía de señalización VEGF son escasos y han sido recientemente revisados por el grupo de trabajo Pharmacogenomics Knowledge Base (<http://www.pharmgkb.org>).

Figura 14: Ligandos y Receptores del VEGF



### Los polimorfismos en la vía del VEGF

Es de esperar que la eficacia de la terapia con bevacizumab en pacientes con CCR metastásico pueda ser influida esencialmente por alteraciones en los genes que

codifican para miembros de la vía del VEGF. Recientemente, se han descrito cinco polimorfismos en el gen *VEGF* que se han correlacionado con la supervivencia en pacientes con CCR metastásico tratados con bevacizumab. En el tratamiento de primera línea, polimorfismos en la línea germinal del *VEGF* se han asociado con una mediana de SLP y SG significativamente menor en comparación con sus variantes alélicas (224, 225).

Los receptores de VEGF (VEGFR) 1 y 2 también representan un papel clave en la vía de señalización VEGF. Se ha reportado una asociación significativa entre la alta expresión intra-tumoral del gen *VEGFR2* y una SG más larga en pacientes con CCR metastásico (226). Por el contrario, una menor expresión de *VEGFR1* se ha asociado con una mayor SG (227). En un estudio retrospectivo, incluyendo pacientes tratados con bevacizumab en primera línea, la variante de la CC-319 del polimorfismo rs9582036 en el gen *VEGFR1* se ha asociado con un menor tasa de respuestas (36% vs 56% ( $p = 0,048$ )) (228).

### **La vía interleucina-8/CXCR1/CXCR2**

La interleucina-8 (IL-8) es una quimioquina involucrada en el proceso de neovascularización al interactuar con las células endoteliales a través de sus receptores CXCR1 y CXCR2 promoviendo la migración, la invasión, la proliferación y la angiogénesis. Las interacciones entre IL-8/CXCR y VEGF/VEGFR siguen siendo inciertas, ya que, conjuntamente, pueden estimular la expresión de uno al otro, pero también se cree que actúan de forma independiente (229). Curiosamente, la variante alélica del polimorfismo rs2234671 del gen *CXCR1*, ha sido asociada con una menor tasa de respuestas al tratamiento de quimioterapia de primera línea en combinación con bevacizumab (32,4% vs 65%;  $p = 0,004$ ) (230)

Parece lógico, por tanto, que la respuesta al tratamiento basado en bevacizumab pueda modificarse por los polimorfismos localizados en el gen *VEGF* y sus

## Introducción

receptores *VEGFR1* y *VEGFR2*, así como los de la vía inflamatoria IL-8/CXCR. Sin embargo, a pesar de estos resultados preliminares, la red de señalización llevada a cabo por el VEGF está lejos de ser lineal y están involucrados una multitud de factores con superposición de funciones. Hasta la fecha no existe ningún marcador farmacogenético validado en relación a la respuesta a la terapia con bevacizumab.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Los estudios farmacogenéticos plantean la utilización de los conocimientos derivados de los estudios genómicos para que los pacientes puedan someterse a tratamientos farmacológicos más eficaces y menos tóxicos.

Estos estudios tienen una especial relevancia en el campo de la oncología, ya que los tratamientos quimiorradioterápicos se caracterizan por tener una ventana terapéutica muy estrecha que hace difícil establecer el equilibrio entre el incremento de la dosis (para mejorar la eficacia) y la aparición de efectos adversos.

La hipótesis de este trabajo es que la utilización de marcadores moleculares capaces de predecir la toxicidad y/o la respuesta al tratamiento farmacológico de pacientes con cáncer colorrectal facilitará el diseño de pautas terapéuticas personalizadas.

Los objetivos del presente trabajo son:

- Analizar la asociación y utilidad de diferentes marcadores farmacogenéticos en relación a la respuesta y/o supervivencia de pacientes con cáncer de recto localmente avanzado tratados con quimiorradioterapia preoperatoria basada en fluoropirimidinas.
- Analizar la asociación y utilidad de las variantes farmacogenéticas FcyRIIIa-H131R y FcyRIIIa-V158F, involucradas en el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), en relación al estado mutacional de *KRAS*, la respuesta y/o supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal avanzado refractarios a una primera línea de quimioterapia y tratados con un esquema anti-EGFR.

## Hipótesis y objetivos

- Realizar un ensayo clínico fase I-IV aplicando los análisis farmacogenéticos correspondientes de búsqueda de la dosis de irinotecán en el esquema estándar de quimioterapia de primera línea FOLFIRI en cáncer colorrectal avanzado. La administración de la distinta dosis del fármaco se realizará en función genotipo del gen *UGT1A1*. La estratificación de los pacientes, en base al genotipo *UGT1A1* antes de la administración de las distintas dosis de irinotecán permitirá definir la máxima dosis tolerada en los casos homocigotos para el alelo 28, así como ensayar dosis más altas para mejorar la eficacia del tratamiento en el resto de los pacientes.



## **RESULTADOS**



1.- Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado

**1.1.- *Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-fluorouracil***

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2010; 136: 1681-1689.

David Páez, Laia Paré, Albert Altés, Francesc Josep Sancho-Poch, Lourdes Petriz, Jordi Garriga, Josep Maria Monill, Juliana Salazar, Elisabeth del Rio, Agustí Barnadas, Eugenio Marcuello, Montserrat Baiget.

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





**Resumen:**

*Objetivo:* Los esquemas de quimiorradioterapia que contienen 5-Fluorouracilo han demostrado ser eficaces en el tratamiento de cáncer de recto localmente avanzado. La timidilato sintasa (TS) es un enzima clave diana farmacológica de las fluoropirimidinas. Sin embargo, el valor predictivo de los niveles de TS en el cáncer de recto localmente avanzado no está del todo establecido. En este trabajo se estudiaron los polimorfismos genéticos de la TS como posibles marcadores predictivos en pacientes con cáncer de recto estadios II y III tratados con quimiorradioterapia basada en fluoropirimidinas.

*Material y métodos:* Se obtuvieron muestras de sangre periférica para extracción de ADN de 51 pacientes con cáncer de recto estadios II/III. Los polimorfismos genéticos de la TS se estudiaron mediante técnicas de amplificación por PCR y secuenciación automática.

*Resultados:* Los pacientes con genotipo TS \*3/\*3 presentaron una mayor tasa de respuesta (regresión patológica completa y microfocos residuales de tumor; 61% vs 22% en pacientes con genotipo \*2/\*2 y \*2/\*3;  $p=0,013$ ). En el análisis multivariado el genotipo TS \*3/\*3 se mantiene como factor pronóstico independiente para una mayor supervivencia global ( $p<0,05$ ).

*Conclusiones:* El genotipo de la región promotora del gen de la TS es de utilidad en la identificación de los pacientes con cáncer de recto, estadio II/III, que podrían beneficiarse de un tratamiento de quimioterapia pre y postcirugía basado en fluoropirimidinas.



# Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-fluorouracil

David Páez · Laia Paré · Albert Altés · Francesc Josep Sancho-Poch ·  
Lourdes Petriz · Jordi Garriga · Josep Maria Monill · Juliana Salazar ·  
Elisabeth del Rio · Agustí Barnadas · Eugenio Marcuello · Montserrat Baiget

Received: 17 November 2009 / Accepted: 5 February 2010  
© Springer-Verlag 2010

## Abstract

**Purpose** Chemoradiotherapy using 5-fluorouracil has shown to be effective treatment for rectal cancer. Thymidylate synthase (TS) is an important target enzyme for the fluoropyrimidines. However, the predictive role of TS levels in early stage rectal cancer is not yet well understood. We analyzed the value of TS gene polymorphisms as a predictive marker in patients with stage II and III rectal cancer treated with preoperative concomitant radiotherapy and fluoropyrimidine-based chemotherapy.

**Methods and materials** Between 1998 and 2007, blood samples were obtained from 51 patients with stage II/III rectal cancer. Forty patients were T2–3 (78%), 11 were T4 (22%), and 59% were N+. DNA was extracted from

peripheral blood, and the genotypes were analyzed using PCR-restriction fragment length polymorphism and automated sequencing techniques.

**Results** The \*3/\*3 thymidylate synthase genotype was associated with a higher response rate (pathological complete remission and microfoci residual tumor; 61 vs. 22% in \*2/\*2 and \*2/\*3;  $P = 0.013$ ). In the multivariate analysis, the \*3/\*3 thymidylate synthase genotype was also an independent prognostic factor for better survival ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** The thymidylate synthase genotype might help to identify patients with stage II/III rectal cancer who could benefit from pre- and postoperative fluorouracil-based chemotherapy.

D. Páez (✉) · A. Barnadas · E. Marcuello  
Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain  
e-mail: dpaez@santpau.cat

L. Paré · J. Salazar · E. d. Rio · M. Baiget  
Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

A. Altés  
Department of Hematology, Althaia Foundation, Av. Bases de Manresa 6-8, 08242 Manresa, Spain

F. J. Sancho-Poch  
Department of Pathology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

L. Petriz  
Department of Radiotherapy, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

J. Garriga  
Department of Surgery, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

J. M. Monill  
Department of Radiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

J. Salazar  
U-705, CIBERER, Barcelona, Spain





with a total dose of 45 Gys over 5 weeks. All patients received concomitant chemotherapy, either with a 5-day infusion (1,000 mg/m<sup>2</sup>) at the beginning and end of radiation treatment (20 patients), a daily continuous infusion of 5-FU (225 mg/m<sup>2</sup>) during the entire radiotherapy period (24 patients), or concomitant oral capecitabine 825 mg/m<sup>2</sup> twice a day on each day of the radiotherapy (7 patients). Resection surgery was performed in all patients 6–8 weeks after the preoperative treatment. Further adjuvant treatment after surgery was left to the discretion of the treating physician. Thirty-two of the 51 patients (63%) also received 5-FU-based adjuvant chemotherapy.

#### Evaluation of the pathological response

Relevant clinical data (gender, age, ECOG, etc.) were obtained from clinical records. Clinical and radiological parameters were analyzed before and 4 weeks after CT-RT and compared with the measurement of the resected tumor. Response to treatment was considered as: (1) complete remission (CR) when the tumor mass disappeared and (2) partial remission (PR) when a 50% decrease in evaluable lesions was observed. Patients were considered to have stable disease (SD) when there was neither response to treatment nor progression of the disease. Disease progression during or after treatment was also taken into account.

Tumor regression was graded according to histopathological findings of the surgical specimen: (1) no evidence of residual carcinoma (CRp); (2) presence of residual microfoci of carcinoma (Rmic); (3) partial regression with clear evidence of residual cancer cells, but with predominant fibrosis; (4) residual cancer cells outgrowing fibrosis. Evaluation was performed by a single pathologist (FJS-P) blinded to patient characteristics and genotype status. To correlate biomarkers and disease, patients were divided into 2 groups, responders (CRp + Rmic) and non-responders (all others) (Mandart et al. 1994; Dworak et al. 1997). Tumor downstaging was determined by comparing pretreatment T and N stage with the pathologic stage of the surgical specimen (Janjan et al. 1999).

Overall survival (OS) was calculated from the beginning of treatment until death from any cause. Progression-free survival (PFS) was calculated from the beginning of treatment until tumor recurrence or death.

#### Genetic studies

The genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes by the salting-out procedure (Miller et al. 1988). The following polymorphisms were analyzed in the thymidylate synthase gene:

- a) 5'-UTR: number of repeats of 28-bp (VNTR)
- b) C>G SNP in the first and second repeat
- c) 6-bp deletion in position 1494.

For the 28-bp VNTR polymorphism and the C>G SNP analysis, a DNA fragment was amplified using previously described PCR conditions and primers (Horie et al. 1995). These polymorphisms were analyzed by direct automated DNA sequencing on an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem, Foster City, CA USA).

As the G to C substitutions change a critical residue in the USF E-box consensus element, abolishing USF-1 binding and altering transcriptional activity, TS genotypes were classified according to the number of functionally binding sites (those with a G residue in the 12th position of the repeat). We classified the TS alleles according to the number of active binding sites (high-expression alleles being those with three or more USF, and low-expression alleles those with less than three USF).

The 6-bp deletion in nucleotide 1494 (TTAAAG) was amplified using previously described PCR conditions and primers (Dotor et al. 2006). The -6-bp allele (152 bp) and the +6-bp allele (158 bp) were identified with 12% polyacrylamide gel and silver staining, and subsequently checked by sequencing.

#### Statistical analyses

The 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 response after adjustment for other relevant clinical variables. Logistic regression included the genotype variables, the functional state (ECOG), sex, age, concurrent chemotherapy protocols, degree of infiltration (T), lymph node involvement (N), and preoperative carcinoembryonic antigen (preCEA). Kaplan–Meier estimates and log-rank tests were used in the univariate analysis of overall survival and progression-free survival. The Cox regression method was used for the multivariate analyses of OS and PFS. Results were considered statistically significant when *P* values were less than 0.05.

## Results

#### Clinical results

Table 1 shows the patients' baseline clinical and tumor characteristics. Lymph node involvement was diagnosed in the pretreatment staging in 30 patients (59%) and after the surgical intervention in 17 patients (33%). Three patients had unresectable tumors after CT-RT; two remained

**Table 1** Baseline characteristics of the 51 patients

	No.	%
Mean age, years	62	
Range	42–83	
Sex		
Female	12	23
Male	39	77
ECOG		
0–1	40	78
2	11	22
Tumor stage		
T2	2	4
T3	38	74
T4	11	22
Lymph node involvement		
N0	21	41
N1–N2	30	59
Circular tumor		
No/Yes	22/29	43/57
Treatment		
5-Fluorouracil	44	86
Capecitabine	7	14
Anal verge distance		
<6 cm	28	55
>6 cm	23	45
Pretreatment CEA		
<5.5 ng/ml	29	57
>5.5 ng/ml	22	43

disease-free more than 3 years after a second line of CT and posterior radical resection surgery; while the third patient died due to loco-regional disease progression. Eighty-five percent of the patients (41/48) had an R0 resection, and fifteen percent (7/48) had an R1–R2 incomplete resection. An anterior resection with sphincter preservation was performed in 31 patients (61%), a Miles' abdominoperineal amputation was performed in 18 patients (35%), and a laparotomy with colostomy was required in the two remaining cases.

Recurrence was observed in 15 patients (29%); it was both local and metastatic in one patient, local in five, and distant in nine patients. The main site of relapse was liver (7 patients).

Under preoperative concomitant radiotherapy and fluoropyrimidine-based chemotherapy, 4 patients (7.8%) had complete clinical response, 31 had PR (61%), and 16 had SD (31%). No progression of disease was observed during CT–RT in any patient. A complete pathological response (CRp) was seen in 4 patients (7.8%; 95% CI: 1–15%), and only residual microfoci (Rmic) were found in 14 (27.5%; 95% CI: 15–39%). Fifty percent of patients (17/34) with pN0

tumors had an objective response (RCp + Rmic) while only 6% (1/27) in the group of patients with pN1–N2 tumors responded to treatment ( $P = 0.002$ ).

Tumor downstaging was observed in 24 patients (47%) after CT–RT, while no downstaging was seen in the 27 remaining cases (53%). Sixty-three percent of patients with downstaging (15/24) responded to CT–RT, in contrast with only 11% of patients (3/27) without downstaging ( $P < 0.0001$ ).

Patients with ECOG 0–1 presented a higher pathological response rate (78%) than those with an ECOG >1 (22%;  $P = 0.02$ ). No significant differences were found in the response of patients grouped according to other clinical parameters.

#### Genetic determinants and pathological response

The following TS VNTR frequencies were found in the studied DNA samples: \*2/\*2 in 8 patients (16%), \*2/\*3 in 25 patients (49%), and \*3/\*3 in 18 patients (35%). Table 2 shows the relationship between the TS genotypes and pathological regression. Patients with a homozygous \*3/\*3 genotype presented a CRp + Rmic percentage that was considerably higher than those with a heterozygous \*2/\*3 and homozygous \*2/\*2 genotype (61 vs. 22%;  $P = 0.013$ ).

When considering the association between the presence of the high/low TS expression alleles and the response, a higher response rate was observed in patients carrying high-expression alleles, although this was not significant. A similar pattern was observed when the response was evaluated in relation to the number of USF binding sites in the promoter region of the TS gene. There was no association between the 6-bp deletion polymorphisms and

**Table 2** TS genotype and pathological regression

Parameter	Response	%	Non-response	%	P-value
TS					
2/2 and 2/3	7	22	25	78	0.013
3/3	11	61	7	39	
TS expression alleles					
Low	8	32	17	68	NS
High	10	40	15	60	
USF <sup>a</sup>					
2	8	32	17	68	NS
3	9	41	13	59	
4	1	33	2	67	
Six bp					
–6/–6	1	33	2	67	NS
–6/+6	9	35	17	65	
+6/+6	5	33	12	67	

<sup>a</sup> Union site of a transcription factor

response (Table 2). No relationship was observed between the different TS genotypes and downstaging.

In the logistic regression analysis, the VNTR genotype was the only independent factor that predicted the probability of pathological regression ( $P = 0.004$ ; CI 95%: 0.012–0.43).

#### Clinical and genetic determinants and survival

OS at 5 and 10 years was 82 and 62%, respectively. PFS at both 5 and 10 years was 59%. The only significant difference ( $P = 0.02$ ) in patients' PFS in relation to a clinical parameter was observed when considering the patients' functional state (ECOG) (Fig. 2). We also observed a trend toward better OS in patients with a good performance status ( $P = 0.08$ ).

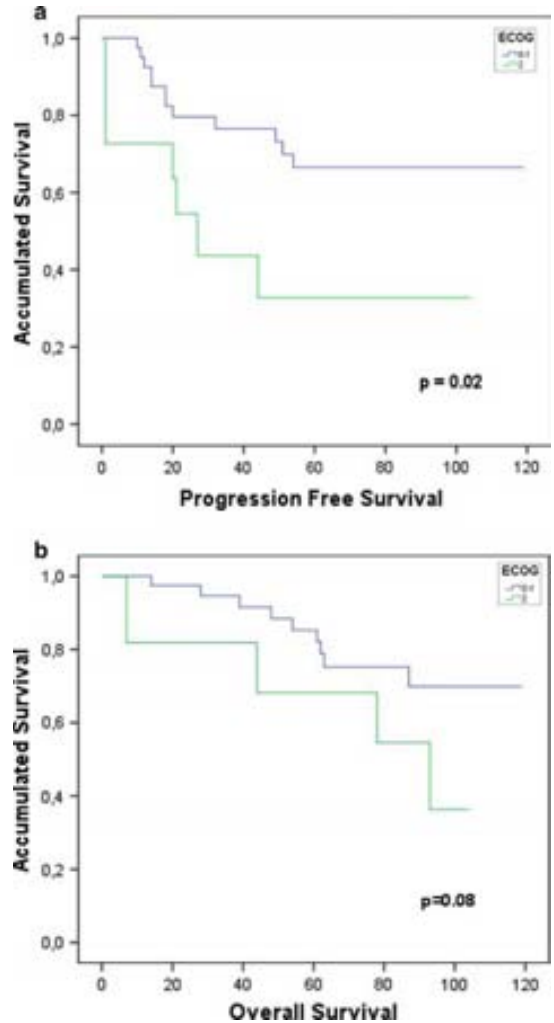
Table 3 shows the results of the univariate analysis of OS and PFS in relation to the genetic determinants. Only the TS genotype was associated with significant differences in OS; while cases with a \*3/\*3 genotype had a median survival of 111 months, median survival in the remaining cases was 84 months ( $P = 0.037$ ). Among patients with the 3/\*3 genotype, 80% were still alive at the 10-year follow-up versus 51% of the genotypes \*2/\*2 and \*2/\*3 (Fig. 3). Likewise, the median PFS was 100 months in genotype \*3/\*3 and 68 months in the genotypes \*2/\*2 and \*2/\*3. With a median PFS of 80 months (95% CI, 66–94 months), we observed that patients with genotype \*3/\*3 presented 75% PFS while patients with genotype \*2/\*2 and \*2/\*3 had 51% ( $P = 0.043$ ; log-rank test) (Fig. 4).

Taking the SNP/VNTR combination into account and using the classification of the alleles in high and low expression, we observed that the group of patients with a high expression of the TS genotype had a higher survival at 10-year follow-up (65 vs. 54%;  $P = 0.17$ ; log-rank test) (Fig. 5).

The Cox regression model included the genotype variables, ECOG, sex, age, concurrent chemotherapy protocols, T, N, preCEA, and adjuvant treatment. The TS VNTR genotype in the promoter region ( $P = 0.037$ ; HR = 0.2 CI 95%: 0.044–0.91) and the ECOG ( $P = 0.047$ ; HR = 3.07 CI 95%: 1.01–9.3) were independent predictors of overall survival after adjustment for the other clinically relevant variables. These two variables were also predictors of PFS ( $P = 0.026$ ; HR 0.2 CI 95%: 0.088–0.86 for VNTR and  $P = 0.011$ ; HR 3.5 CI 95%: 1.33–9.38 for ECOG) (Table 4).

#### Discussion

The percentage of patients with locally advanced rectal tumors who achieve a complete pathological response



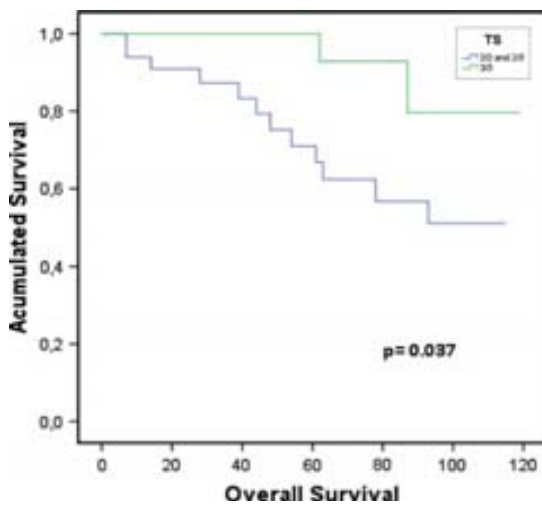
**Fig. 2** Kaplan–Meier curve for progression-free Survival (a)/Overall Survival (b) and ECOG in patients with preoperative chemoradiotherapy

using preoperative CT–RT remains low. Although CRp rates are often used and have proven to be a good end point to correlate with long-term survival in CT–RT trials, Rmic rates do not clearly show this correlation. For this reason, it has been suggested that other end points such as circumferential or radial margin resection (CRM/R0) and 3-year disease-free survival should be investigated. These prognostic factors are obtained after surgery, and to improve these results, there is a need to establish preoperative selection criteria. Promising research suggests that a pharmacogenetic strategy appears to be of great interest in this scenario.

As 5-fluorouracil is used in all preoperative chemoradiotherapy regimens today, the study of the TS—the

**Table 3** TS genotype, progression-free survival, and overall survival

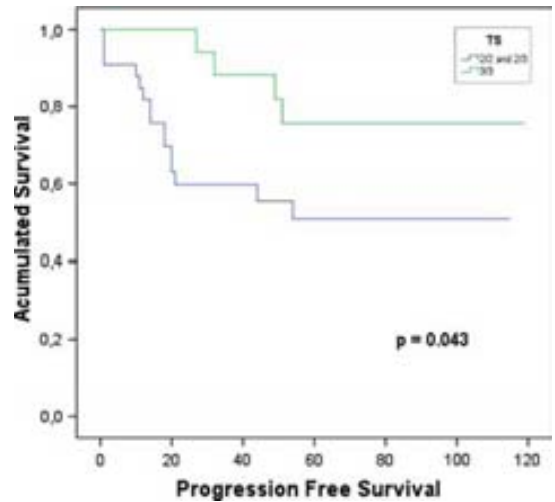
	PFS, months	P-value	OS, months CI	P-value
<b>TS</b>				
2/2 and 2/3	68 (50–85)	0.043	83 (69–97)	0.037
3/3	100 (83–116)		111 (100–121)	
<b>TS expression alleles</b>				
Low	76 (56–95)	0.6	83 (67–100)	0.17
High	83 (64–102)		103 (90–115)	
<b>USF</b>				
2	76 (56–95)	0.8	83 (67–100)	0.3
3	83 (63–103)		104 (91–117)	
4	61 (26–95)		75 (64–86)	
<b>Six bp</b>				
–6/–6	75 (29–121)	0.8	90 (67–112)	0.9
–6/+6	80 (62–97)		94 (81–107)	
+6/+6	78 (54–102)		90 (69–111)	



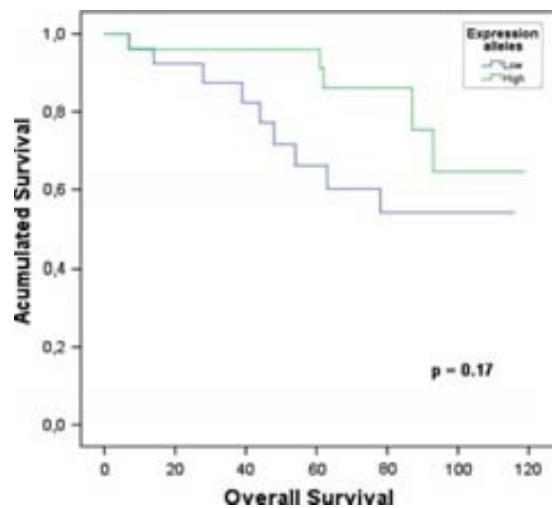
**Fig. 3** Kaplan–Meier curve for overall survival in patients with preoperative chemoradiotherapy: correlation with VNTR in the 5' region of the thymidylate synthase gene

molecular target of this drug—is clearly of interest as a possible prognostic/predictive pharmacogenetic factor. Few groups have addressed this issue to date.

In several reports, Jacob et al. have analyzed TS levels using different methods in the same group of 40 patients, and they compared results with a number of biological parameters. In an initial study, they described the significant relationship between pathological regression and low TS expression measured by immunohistochemistry in patients treated neoadjuvantly with CT–RT based on 5-FU (Jakob et al. 2005). In a subsequent paper, a high



**Fig. 4** Kaplan–Meier curve for progression-free survival in patients with preoperative chemoradiotherapy: correlation with VNTR in the 5' region of the thymidylate synthase gene



**Fig. 5** Kaplan–Meier curve for overall survival in patients with preoperative chemoradiotherapy according to a low- and a high-expression genotype

intratumoral TS expression was shown to be predictive of an unfavorable prognosis (Jakob et al. 2006). These authors also reported that DFS and OS were significantly increased in patients with downstaging when compared to patients without downstaging, but no significant correlation was found between cancer recurrence and pathological regression after preoperative CT–RT. The same group of researchers later investigated the predictive value of Ki67 and p53 and their correlation with TS expression. This was

**Table 4** Multivariate analysis for progression-free survival and overall survival

	N	Progression-free survival			Overall survival		
		Median (months; 95% CI)	HR	95% CI	Median (months; 95% CI)	HR	95% CI
<b>ECOG</b>							
0–1	40	88 (73–103)	1		100 (89–111)	1	
2	11	45 (20–72)	3.5	1.33–9.38	73 (50–96)	3.07	1.01–9.3
<i>P</i>			0.011			0.047	
<b>TS</b>							
2/2 and 2/3	33	100 (83–116)	1		83 (69–97)	1	
3/3	18	68 (50–85)	0.2	0.09–0.86	111 (100–121)	0.2	0.04–0.91
<i>P</i>			0.026			0.037	

*Note* Variables used in the multivariate model were ECOG, sex, age, concurrent chemotherapy protocols, T, N, pretreatment CEA, and adjuvant treatment

*HR* hazard ratio

measured by quantitative TaqMan real-time PCR in RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. High TS expression was correlated with a high Ki67 index, and no significant association was found between p53 and TS mRNA expression or tumor regression. TS expression was also associated with the cell proliferation rate as a consequence of a close relationship with Ki67. However, the combination of the two markers (Ki67 and TS expression) did not significantly improve the response prediction (Jakob et al. 2008).

More recently, these authors performed a genotypic study in the same group of patients, and they concluded that the TS 6-bp deletion polymorphism in the 3' region of the gene may be an important predictor for histopathological tumor regression while the TS 5' polymorphisms were not associated with either tumor regression or gene expression (Stoehlmacher et al. 2008).

Summarizing these results, it appears that a high TS expression is associated with worse response to treatment and an unfavorable prognosis.

Three further studies by three different groups have focused on the role of TS as a prognostic or predictive marker of CT–RT treatment in patients with rectal cancer. In the first of these, DNA was extracted from immediately frozen homogenized biopsies obtained during the preoperative colonoscopy in 65 patients. The authors demonstrated for the first time that polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the TS gene promoter may predict downstaging after preoperative CT–RT. Homozygous \*3/\*3 patients presented a lower probability of downstaging than homozygous \*2/\*2 or heterozygous \*2/\*3 patients (22 vs. 60% *P* = .036). In addition, downstaging may be an important clinical predictor for both local control and disease-free survival (30% of 3-year DFS in patients without downstaging versus 88% in patients with downstaging; *P* = 0.017) (Villafranca et al. 2001).

In another study, the predictive value of a combination of three gene polymorphisms—TS, epidermal growth factor receptor Sp1-216, and epidermal growth factor A61G—was analyzed. The authors included pretreatment blood samples from 60 patients with locally advanced rectal tumors treated with radiotherapy and concomitant oral chemotherapy with UFT. Patients with TS \*2/\*2 genotype had a significantly higher rate of complete pathological response than those with \*2/\*3 or \*3/\*3 genotypes. They proposed a combination of these markers as predictors of complete pathological response (Spindler et al. 2007).

In a very recent study, TS levels in the pretreatment biopsies from 57 patients with locally advanced rectal cancer were measured by immunohistochemical methods. For the first time, high TS levels were associated with a high response rate (CRp + Rmic; *P* = 0.015), and no such correlation was found in the group of patients treated with RT alone. Multivariate analysis confirmed a significant interaction between nodal status and the probability of achieving a pathological response (*P* = 0.023) and between a high TS level and a high pathological response in the CT/RT subset (*P* = 0.007) (Negri et al. 2008).

In the present work, we investigated the role of the TS genotype as a predictive marker in a group of patients with locally advanced rectal cancer undergoing CT–RT. The outcome was evaluated simultaneously considering three relevant parameters: pathological response, pathological regression, and tumor downstaging. Clinical parameters in all patients were evaluated by the same oncologist (DP) and pathological response was measured by the same pathologist (FJS-P), guaranteeing homogeneity of clinical-pathological criteria. Furthermore, both investigators were blinded to the genetic results. We found that the functional status (ECOG) was a good predictive factor in relation to tumor response and relapse. In accordance with previously reported studies (Lindebjerg et al. 2009; Liersch et al.

2006; Rödel et al. 2005), lymph node status was also a valuable predictive factor, with a significantly higher pathological response rate in pN0 patients than in those with pN1–N2 tumors (50 vs. 6%;  $P = 0.002$ ). The TS \*3/\*3 genotype significantly predicted patients who benefit from CT/RT 5FU-based treatment ( $P = 0.013$ ); this benefit translated into higher progression-free survival ( $P = 0.043$ ) and higher overall survival ( $P = 0.037$ ) for this group of patients. Although our results contradict those of Villafranca et al. (2001), they are in agreement with more recent data obtained using immunohistochemical methods (Negri et al. 2008).

Several explanations may account for these controversial findings regarding the pharmacogenetic role of TS in patients with rectal cancer. First of all, there is considerable diversity in the methods used to measure TS expression. Although the most commonly used technique has been immunohistochemical determination, other semiquantitative methods have employed different RT–PCR techniques and scales. Regarding the immunohistochemistry of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, comparison of the previously mentioned studies is often difficult as the lack of standardization of this technique allows marked interobserver variation. Such technical limitations might be overcome by blood analysis for germline polymorphisms, as presented in this study. Secondly, variables related to the tumor sample must be considered. In some of the reported studies, TS expression was analyzed in pretreatment biopsies while in others it was examined in post-treatment samples. Consequently, phenotypic changes due to therapy cannot be excluded. And finally, diagnostic and/or therapeutic differences could also explain the controversial results. The limitations in the radiological diagnosis of rectal cancer may be related to the lack of correlation between the downstaging and the different clinical and genotypic variables. More accurate and more sensitive diagnostic tests are therefore needed to define the size and degree of infiltration of the tumor and to determine lymph node involvement. Until now, the most important prognostic and predictive factors commonly used to evaluate tumor response and survival are pathological tumor regression, lymph node involvement, and downstaging, but other end points such as CRM/R0 resection seem more relevant. The different therapeutic regimens used in the above-mentioned studies could also play a role in the discordant results reported to date. Prospective studies that overcome all these methodological limitations are needed to clarify the relationship between the TS genotype and response to treatments containing 5-FU.

As an increasing number of patients with rectal cancer are being treated with a neoadjuvant approach that includes fluoropyrimidines, in depth investigation into the pharmacogenetic markers of these drugs is an issue of major concern.

**Acknowledgments** DP is a fellowship recipient of the Instituto de Salud Carlos III (CM08/00065). This study was supported in part by Instituto de Salud Carlos III (FIS/080199). The authors thank Carolyn Newey for revising the English.

## References

- Danenberg PV (1977) Thymidylate synthetase—a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 473:73–92
- Dotor E, Cuatrecasas M, Martínez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guino E, Pareja L, Figueras A, Mollevi DG, Serrano T, de Oca J, Peinado MA, Moreno V, Germa JR, Capella G, Villanueva A (2006) Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 24:1603–1611
- Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A (1997) Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 12:19–23
- Gusella M, Bolzonella C, Crepaldi G, Ferrazzi E, Padriani R (2006) A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. *Pharmacogenomics J* 6:421–424
- 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
- Jakob C, Liersch T, Meyer W, Baretton GB, Hausler P, Schwabe W, Becker H, Aust DE (2005) Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer (cUICC II/III): correlation with histopathologic tumor regression after 5-fluorouracil-based long-term neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol* 29:1304–1309
- Jakob C, Liersch T, Meyer W, Baretton GB, Schwabe W, Hausler P, Kulle B, Becker H, Aust DE (2006) Prognostic value of histologic tumor regression, thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer UICC Stage II/III after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol* 30:1169–1174
- Jakob C, Liersch T, Meyer W, Becker H, Baretton GB, Aust DE (2008) Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 14:1060–1066
- Janjan NA, Khoo VS, Abbruzzese J, Pazdur R, Dubrow R, Cleary KR, Allen PK, Lynch PM, Guber G, Wolff R, Rich TA, Skibber J (1999) Tumor downstaging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44:1027–1038
- Kawakami K, 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
- 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
- Liersch T, Langer C, Ghadimi BM, Kulle B, Aust DE, Baretton GB, Schwabe W, Hausler P, Becker H, Jakob C (2006) Lymph node

- status and TS gene expression are prognostic markers in stage II/III rectal cancer after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 24:4062–4068
- Lindebjerg J, Spindler KL, Ploen J, Jakobsen A (2009) The prognostic value of lymph node metastases and tumor regression grade in rectal cancer patients treated with long-course preoperative chemoradiotherapy. *Colorectal Dis* 11:264–269
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3:330–338
- Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, Roussel A, Jacob JH, Segol P, Samama G et al (1994) Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 73:2680–2686
- 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
- Meyerhardt JA, Mayer RJ (2005) Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 352:476–487
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
- Negri FV, Campanini N, Camisa R, Pucci F, Bui S, Ceccon G, Martinelli R, Fumagalli M, Losardo PL, Crafa P, Bordi C, Cascinu S, Ardizzoni A (2008) Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy. *Br J Cancer* 98:143–147
- Pare L, Marcuello E, Altes A, del Rio E, Sedano L, Barnadas A, Baiget M (2008) Transcription factor-binding sites in the thymidylate synthase gene: predictors of outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin? *Pharmacogenomics J* 8:315–320
- Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfnger M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R, Wittekind C (2005) Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 23:8688–8696
- 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, Group GermanRectal CancerStudy (2004) Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351:1731–1740
- Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, Jakobsen A (2007) Germline polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 50:1363–1369
- Stoehlmacher J, Goekkurt E, Mogck U, Aust DE, Kramer M, Baretton GB, Liersch T, Ehninger G, Jakob C (2008) Thymidylate synthase genotypes and tumour regression in stage II/III rectal cancer patients after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiation. *Cancer Lett* 272:221–225
- Tepper JE, O'Connell M, Niedzwiecki D, Hollis DR, Benson AB 3rd, Cummings B, Gunderson LL, Macdonald JS, Martenson JA, Mayer RJ (2002) Adjuvant therapy in rectal cancer: analysis of stage, sex, and local control—final report of intergroup 0114. *J Clin Oncol* 20:1744–1750
- 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
- Villafraña 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





**1.2.- A pharmacogenetic study in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy: polymorphisms in thymidylate synthase, EGFR, GSTP1 and DNA repair genes.**

International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 2011; May 11.

David Páez, Juliana Salazar, Laia Paré, Lourdes Petriz, Eduardo Targarona, Elisabeth del Rio, Agustí Barnadas, Eugenio Marcuello, Montserrat Baiget.

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





**Resumen:**

*Introducción:* Diversos estudios han evaluado la utilidad del tratamiento neoadyuvante basado en oxaliplatino y fluoropirimidinas en el cáncer de recto localmente avanzado. Sin embargo, no existen biomarcadores preoperatorios que permitan predecir el pronóstico de los pacientes tratados con quimiorradioterapia neoadyuvante. En este estudio se evalúa la utilidad como marcadores farmacogenéticos de diversos polimorfismos en los genes Timidilato Sintasa, *EGFR*, *GSTP1* y en varios genes reparadores de DNA (*XRCC1*, *ERCC1*, *XPB*) en una cohorte de 128 pacientes con cáncer de recto tratados con quimio-radioterapia neoadyuvante.

*Material y métodos:* Se obtuvieron muestras de sangre periférica para extracción de ADN de 128 pacientes con cáncer de recto estadios II y III. Los diferentes genotipos se analizaron mediante técnicas de amplificación por PCR y secuenciación automática o utilizando el sistema Fluidigm BioMark™ de PCR en tiempo real. Los polimorfismos genéticos estudiados fueron: *TS* (VNTR/5'UTR, 2R G>C SNP, 3R G>C SNP), *EGFR* (Arg497Lys), *GSTP1* (Ile105Val), *ERCC1* (Asn118Asn, 8092C>A, 19716G>C), *XRCC1* (Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln) y *XPB* (Lys751Gln). Se relacionó cada uno de los polimorfismos con la respuesta y regresión patológica, la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG).

*Resultados:* Los pacientes con genotipo *TS* \*3/\*3 presentaron una mayor tasa de respuesta (regresión patológica completa y microfocos residuales de tumor; 59% vs 35% en pacientes con genotipo \*2/\*2 y \*2/\*3;  $p=0,013$ ). Este genotipo \*3/\*3 se asoció a un aumento en la SLP mediana de 103 meses frente a los 84 meses de los pacientes con genotipo \*2/\*2 y \*2/\*3 ( $p=0,039$ ).

## Resultados

En cuanto al polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1*, la mediana de SLP fue de 101 meses en los pacientes G/G, 78 meses en los G/A y 31 meses en los A/A ( $p=0,048$ ).

*Conclusiones:* El genotipo de la TS y el polimorfismo *XRCC1* Arg399Gln podrían ser de utilidad en la identificación de los pacientes con cáncer de recto, estadio II/III, con mejor pronóstico tras el tratamiento con quimiorradioterapia preoperatoria.

CLINICAL INVESTIGATION

Rectum

PHARMACOGENETIC STUDY IN RECTAL CANCER PATIENTS TREATED WITH PREOPERATIVE CHEMORADIOTHERAPY: POLYMORPHISMS IN THYMIDYLATE SYNTHASE, EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR, GSTP1, AND DNA REPAIR GENES

DAVID PÁEZ, M.D.,\* JULIANA SALAZAR, PH.D.,<sup>†‡</sup> LAIA PARÉ, M.Sc.,<sup>†‡</sup> LOURDES PERTRIZ, M.D.,<sup>§</sup> EDUARDO TARGARONA, M.D.,<sup>¶</sup> ELISABETH DEL RIO, B.Sc.,<sup>†‡</sup> AGUSTI BARNADAS, PH.D., M.D.,\* EUGENIO MARCUELLO, M.D.,\* AND MONTSERRAT BAIGET, PH.D.<sup>†‡</sup>

Departments of \*Medical Oncology, <sup>‡</sup>Genetics, <sup>§</sup>Radiotherapy, and <sup>¶</sup>Surgery, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; and <sup>†</sup>Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases, Barcelona, Spain

**Purpose:** Several studies have been performed to evaluate the usefulness of neoadjuvant treatment using oxaliplatin and fluoropyrimidines for locally advanced rectal cancer. However, preoperative biomarkers of outcome are lacking. We studied the polymorphisms in thymidylate synthase, epidermal growth factor receptor, glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1), and several DNA repair genes to evaluate their usefulness as pharmacogenetic markers in a cohort of 128 rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy.

**Methods and Materials:** Blood samples were obtained from 128 patients with Stage II-III rectal cancer. DNA was extracted from the peripheral blood nucleated cells, and the genotypes were analyzed by polymerase chain reaction amplification and automated sequencing techniques or using a 48,48 dynamic array on the BioMark system. The germline polymorphisms studied were thymidylate synthase, (VNTR/5'UTR, 2R G>C single nucleotide polymorphism [SNP], 3R G>C SNP), epidermal growth factor receptor (Arg497Lys), GSTP1 (Ile105Val), excision repair cross-complementing 1 (Asn118Asn, 8092C>A, 19716G>C), X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) (Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln), and xeroderma pigmentosum group D (Lys751Gln). The pathologic response, pathologic regression, progression-free survival, and overall survival were evaluated according to each genotype.

**Results:** The \*3/\*3 thymidylate synthase genotype was associated with a greater response rate (pathologic complete remission and microfoci residual tumor, 59% in \*3/\*3 vs. 35% in \*2/\*2 and \*2/\*3;  $p = .013$ ). For the thymidylate synthase genotype, the median progression-free survival was 103 months for the \*3/\*3 patients and 84 months for the \*2/\*2 and \*2/\*3 patients ( $p = .039$ ). For XRCC1 Arg399Gln SNP, the median progression-free survival was 101 months for the G/G, 78 months for the G/A, and 31 months for the A/A patients ( $p = .048$ ).

**Conclusions:** The thymidylate synthase genotype and XRCC1 Arg399Gln polymorphism might help to identify Stage II-III rectal cancer patients with a better outcome after preoperative concomitant chemoradiotherapy. © 2011 Elsevier Inc.

Chemoradiotherapy, Rectal cancer, Pharmacogenetics, 5-Fluorouracil, Polymorphism.

INTRODUCTION

In recent years, preoperative chemoradiotherapy (CRT) and total mesorectal excision have been adopted as the standard treatment of locally advanced rectal cancer in Europe. This approach decreases the incidence of recurrence in about 50% of cases and increases the percentage of tumor conservative resections (1).

The drug most widely used in the treatment of rectal cancer is 5-fluorouracil (5-FU) (2). On activation to the

nucleotide form, this fluoropyrimidine agent develops a stable complex with thymidylate synthase (TS), inhibiting activity of the enzyme (3). TS catalyzes a critical reaction for cell proliferation, reducing methylation of deoxyuridine monophosphate by 5,10-methylenetetrahydrofolate to form deoxythymidine monophosphate (4). An inverse correlation between TS activity and the effectiveness of 5-FU exists.

Several genetic polymorphisms have been described in the gene coding TS. The first of these is located in its

Reprint requests to: David Páez, M.D., Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Pare Claret 167, Barcelona 08025 Spain. Tel: (34) 93-291-9194; Fax: (34) 93-291-9494; E-mail: dpaez@santpau.cat

Supported in part by the Instituto de Salud Carlos III (FIS/080199).

D. Páez is the recipient of a fellowship from the Instituto de Salud Carlos III (CM08/00065).

Conflict of interest: none.

**Acknowledgments**—The authors thank Carolyn Newey for English language editing.

Received Aug 2, 2010, and in revised form Dec 13, 2010. Accepted for publication Jan 18, 2011.

5'-UTR region and consists of a variation in the number of a 28-base pair (bp) tandemly repeated sequence (VNTR) (5). Alleles with two (TS\*2) and three (TS\*3) repeats are the most common. 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 (6, 7). The second polymorphism is a G>C single nucleotide polymorphism (SNP) at the 12th nucleotide of the second repeat in the TS\*3 alleles (8). This substitution changes a critical residue in the union site of a transcription factor (USF) E-box consensus element, abolishes USF-1 binding, and alters transcriptional activity. Additional studies have confirmed the presence of the G>C change and classified each polymorphic allele as \*2G, \*2C, \*3G, and \*3C in accordance with the combination of the SNP and VNTR (9). A final classification of the TS alleles would be (1) high expression genotypes (2R/3G; 3C/3G; 3G/3G) and (2) low expression genotypes (2R/2R; 2R/3C; 3C/3C). 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 also been described (10). In a previous work, we demonstrated that the number of operative binding sites of a transcription factor (USF) in the promoter region of the TS gene could be used to predict the outcome in patients treated with a 5-FU-based regimen (11).

The introduction of oxaliplatin into treatment regimens for advanced colorectal cancer represented a significant advance for the success of chemotherapy. The synergistic effects of 5-FU and oxaliplatin have increased the response rates by  $\leq 50\%$  in first-line-treated patients (12), allowing surgery of isolated liver metastases that were previously considered unresectable. Oxaliplatin is a platinum-based chemotherapeutic agent that carries a 1,2-diamino-cyclohexane ring. This bulky carrier group promotes the formation of platinum-DNA adducts. Because these adducts are more cytotoxic than those formed from other platinum agents, they are more effective in blocking DNA replication (13). These adducts are recognized and repaired by the nucleotide excision repair pathway, a major cellular defense mechanism against the cytotoxic effects of platinum-based chemotherapeutic agents (14). The DNA repair complex responsible for excision repair 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 nucleotide excision repair repairosome complex (15). The ERCC1 gene, on chromosome 19q13.2–q13.3, encodes a protein of 297 amino acids. Three polymorphisms have been identified in this gene: (1) a common SNP at codon 118 that results in a C>T change coding for the same amino acid, asparagine; (2) a second common SNP (C>A) located in 3'-untranslated region, position 8092; and (3) an SNP (G>C) located in intron 3, position 19,716, consisting of a G>C change (16). 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 (17).

Glutathione S-transferases (GSTs) have a significant function in the metabolism of genotoxic compounds. Glutathione S-transferase pi 1 (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 (18). The gene coding for GSTP1 is located on chromosome 11q13. A polymorphic A>G change in position 313 that gives rise to the Ile105Val substitution has been related to the outcome of colorectal cancer patients treated with oxaliplatin (19).

Ionizing radiation plays a key role in therapy because of its ability to directly induce DNA double-strand breaks, leading to cell death. This DNA damage is repaired mainly by the base excision repair system (15). In this system, the X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) protein interacts with DNA ligase III, forming a complex with DNA polymerase and polyADP-ribose polymerase and facilitating the repair of DNA strand breaks (20). The *XRCC1* gene, located on chromosome 19q13.2, contains 17 exons. Although many polymorphisms have been documented, three nonsynonymous polymorphisms, Arg194Trp (C>T), Arg280His (G>A), and Arg399Gln (G>A), have been shown to impair DNA repair capacity.

The epidermal growth factor receptor (EGFR), also known as HER-1, is a member of the human epithelial receptor tyrosine kinase family. The intrinsic tyrosine kinase activity leads to downstream effects in gene expression, cellular proliferation, inhibition of apoptosis, and angiogenesis (21). A polymorphic variant in the EGFR gene has been reported to lead to the substitution of an arginine (Arg) residue by a lysine (Lys) in codon 497 in the extracellular domain within subdomain IV of EGFR (22). It was observed that rectal cancer patients with the HER-1 497 Arg/Arg genotype treated with chemoradiotherapy tended to have a greater risk of local recurrence (23).

In the present work, we analyzed the usefulness of TS, EGFR, ERCC1, XPD, XRCC1, and GSTP1 gene polymorphisms as potential biomarkers of the clinical outcome of Stage II and III rectal cancer patients treated with preoperative concomitant chemoradiotherapy.

## METHODS AND MATERIALS

### Patients

A total of 128 patients with locally advanced rectal cancer diagnosed between 1998 and 2009 were included in the present study. Rectal cancer was defined as a tumor with its lowest margin within 12 cm of the anal verge on endoscopy or a location below the peritoneal reflection (24).

The median follow-up was 46 months (range, 5–141). The eligibility criteria included:  $\geq 18$  years old; an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) score of  $<3$ ; adequate bone marrow function (hemoglobin  $\geq 10$  g/dL, neutrophil count  $\geq 1,500/\mu\text{L}$ , and platelet count  $\geq 100,000/\mu\text{L}$ ); and adequate renal and liver function (serum

creatinine and bilirubin <1.5 times the upper limit of normal and aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase of  $\leq 5$  times the upper limit of normality). Colonoscopy was performed in all patients to confirm the tumor location (0–15 cm from the anal verge) and to perform the histologic study. Rectal examinations, abdominal-pelvic computed tomography or pelvic magnetic resonance imaging, chest X-rays, opaque enema, endorectal ultrasonography, and analytical determination of the carcinoembryonic antigen (CEA) were also performed. All patients provided written informed consent, and the institutional ethics committee approved the present study.

### Therapeutic protocols

All patients included in the present study were treated preoperatively with radiotherapy (RT) and concomitant chemotherapy. RT consisted of megavoltage irradiation ( $^{60}\text{Co}$  or 18-MeV linear accelerator) to the pelvis, with a total dose of 45 Gy within 5 weeks. The chemotherapeutic protocols were as follows: (1) 5-FU in a 5-day infusion ( $1,000 \text{ mg/m}^2$ ) at the beginning and end of RT; (2) a daily continuous infusion of 5-FU ( $225 \text{ mg/m}^2$ ) during the entire radiotherapy period; (3) capecitabine alone ( $825 \text{ mg/m}^2$  twice daily on each day of RT); (4) capecitabine combined with oxaliplatin  $50 \text{ mg/m}^2$  weekly for 5 weeks; and (5) 5-FU ( $225 \text{ mg/m}^2$ ) during the entire RT period plus oxaliplatin  $50 \text{ mg/m}^2$  weekly for 5 weeks. The type of CRT administered varied, depending on the protocol in force at our hospital at treatment.

Resection surgery was performed in all patients 6–8 weeks after the preoperative treatment. Total mesorectal excision was performed for mid- or distal rectal tumors, and an anterior resection excision with partial mesorectal excision was used for proximal cases. Additional adjuvant treatment after surgery was left to the discretion of the treating physician: 76 patients (59%) received fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy.

### Evaluation of response

The relevant clinical data (*e.g.*, gender, age, ECOG) were obtained from the clinical records. The circumferential rectal margin was precisely measured in millimeters (25). R1 resection was defined as tumor  $\leq 1 \text{ mm}$  from the circumferential rectal margin. The clinical and radiologic parameters were analyzed before and 4 weeks after CRT and compared with the measurement of the resected tumor. A pathologic response was classified as a complete remission (pCR) when the tumor mass disappeared and as a partial remission when a 50% decrease of the evaluable lesions was observed. Patients were considered to have stable disease when neither a response to treatment nor disease progression was found. Disease progression during or after treatment was also considered.

Tumor regression was graded according to the histologic findings of the surgical specimen as no evidence of residual carcinoma (pCR); the presence of residual microfoci of carcinoma (Rmic); partial regression with clear evidence of residual cancer cells, but with predominant fibrosis; or residual cancer cells outgrowing fibrosis (26). The evaluation was performed by a single pathologist who was unaware of the patient characteristics and genotype status.

Tumor downstaging was determined by comparing the pretreatment T and N stage with the pathologic stage of the surgical specimen (27).

### Genetic studies

The genomic DNA was extracted from the peripheral nucleated cells using the salting-out procedure (28). We genotyped all patient samples for the *EGFR* (Arg497Lys), *ERCC1* (Asn118Asn, 19716G>C, 8092C>A), *XPD* (Lys751Gln), *GSTP1* (Ile105Val), and *XRCC1* (Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln) polymorphisms using a 48.48 dynamic array on the BioMark system (Fluidigm, South San Francisco, CA). The characteristics of the polymorphisms are summarized in Table 1. The sample and TaqMan SNP Genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) mixes were prepared according to the manufacturer's recommendations. As a quality control, normal, heterozygous, and homozygous sequenced samples were included on every array for each genotype.

We also analyzed the polymorphisms in the TS gene: 5'-UTR: number of repeats of 28 bp (VNTR); and C>G SNP in the first and second repeat. We used previously described polymerase chain reaction conditions and primers (5) to amplify the target fragment. This polymerase chain reaction product was automatically sequenced on an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). To delineate the TS genotype we considered the number of repeats of 28 bp (VNTR); the combination of the C>G SNP and VNTR; and the number of functionally binding sites (those with a G residue in the 12th position of the repeat).

### Statistical analysis

Differences between the categorical variables were measured using the chi-square test. Logistic regression analysis was used as a multivariate method to ascertain which variables independently predicted response after adjustment for other relevant clinical variables. Overall survival (OS) was calculated from the beginning of treatment until death from any cause. Progression-free survival (PFS) was calculated from the beginning of treatment until tumor recurrence. The Kaplan-Meier estimates and log-rank tests were used in the univariate analysis of PFS and OS. The Cox regression

Table 1. Genetic markers evaluated in present study

Polymorphism	dbSNP	NCBI Refseq	Exon	Genotype	Amino acid substitution/position
EGFR Arg497Lys	rs2227983	NM_005228	13	G/A	Lys/497
ERCC1 Asn118Asn	rs11615	NM_001983	4	C/T	Asn/118
ERCC1 G19716C	rs3212948	NM_001983	Intron 3	G/C	–
ERCC1 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
XRCC1 Arg194Trp	rs1799782	NM_006297	6	C/T	Trp/194
XRCC1 Arg280His	rs25489	NM_006297	9	G/A	His/280
XRCC1 Arg399Gln	rs25487	NM_006297	10	G/A	Gln/399

**Abbreviations:** dbSNP = single nucleotide polymorphism database; NCBI = National Center for Biotechnology Information; Refseq = reference sequence; EGFR = epidermal growth factor receptor; ERCC1 = excision repair cross-complementing 1; XPD = xeroderma pigmentosum group D; GSTP1 = Glutathione S-transferase pi 1; XRCC1 = X-ray repair cross complementing protein 1.

model was used for multivariate analyses of PFS and OS. The results were considered statistically significant when  $p < .05$ .

## RESULTS

### Clinical results

The patients' baseline clinical and tumor characteristics are listed in Table 2. Lymph node involvement was diagnosed at pretreatment staging in 75 patients (59%) and after surgical intervention in 37 patients (29%). From the total group of 128 patients, 111 (87%) underwent R0 resection, 12 (9%) underwent R1 microscopically incomplete resection, and 5 (4%) had an R2 macroscopic unresectable tumor. An anterior resection with sphincter preservation was performed in 78 patients (61%), and a Miles' abdominoperineal amputation in 40 patients (31%). Laparotomy with colostomy was required in the 2 remaining cases.

Recurrence was observed in 45 patients (35%). It was local and metastatic in 7 patients (16%), local in 14 (31%), and distant in 24 patients (53%). The main sites of relapse were the liver in 17 and the lung in 14 patients.

After preoperative concomitant chemoradiotherapy, 17 patients (13%) had complete remission, 81 had partial remis-

sion (63%), and 28 had stable disease (22%). No disease progression was observed during CRT in any patient. The analysis of tumor grade regression showed no evidence of residual carcinoma in 17 patients (13%), with residual microfoci (Rmic) found in 41 patients (32%). The patients were classified as responders (pCR plus Rmic) and nonresponders (all others).

No statistically significant differences were found in pCR among the chemotherapeutic schemes administered. Seven (12%) of the 60 patients treated with fluoropyrimidine alone and 10 (15%) of 68 treated with an oxaliplatin combination achieved a pCR ( $p = .4$ ).

Of the 90 patients with Stage pN0 tumors, 52 (58%) had an objective response (pCR plus Rmic) and only 6 (16%) of 37 patients with Stage pN1-N2 tumors responded to treatment ( $p < .001$ ). Of the patients with minimal residual disease (Rmic), 85% had a pN0 tumor ( $p < .001$ ). Of these, 95% achieved a significant partial pathologic response ( $p < .001$ ) and 73% presented with tumor downstaging ( $p < .001$ ). This Rmic subgroup was therefore considered to have an "objective response" to CRT.

Tumor downstaging was observed in 73 patients (57%) after CRT. An objective response was achieved in 47 of these patients (64%). In contrast, no downstaging was seen in the 55 remaining patients (43%), with only 11 responders (20%;  $p < .001$ ).

Of the 128 patients, 86% completed CRT, as planned. The patients with ECOG score 0-1 had a greater pathologic response rate (84%) than those with an ECOG score  $>1$  (44%;  $p < .001$ ). No patient with an ECOG score  $>1$  achieved a pCR in contrast to 17 (16%) of 108 patients with an ECOG score 0-1 ( $p < .001$ ). Of the patients with an ECOG score of 0-1, 49% had an objective response (pCR + Rmic) compared with only 23% of patients with an ECOG score  $>1$  ( $p = .045$ ).

Patients with a normal pretreatment CEA level presented with better tumor regression grade (pCR + Rmic in 53%) and a greater probability of downstaging after CRT (67%) than those with a high pretreatment CEA level (33%,  $p = .03$ ; and 40%,  $p = .002$ , respectively).

### Genetic determinants and pathologic response, pathologic regression, and downstaging

The following TS VNTR frequencies were found in the studied DNA samples:  $*2/*2$  in 21 patients (16.4%),  $*2/*3$  in 63 patients (49.2%), and  $*3/*3$  in 44 patients (34.3%). No relationship was observed between the different TS genotypes and pCR. However, a considerably greater percentage of patients with a homozygous  $*3/*3$  genotype had pCR + Rmic than did those with a heterozygous  $*2/*3$  or homozygous  $*2/*2$  genotype (59% vs. 38%;  $p = .023$ ; Table 3).

Other tested gene polymorphisms did not show statistically significant associations with the pathologic response, pathologic regression, or downstaging (Table 3).

To be more stringent in defining the "objective response," we performed a second analysis in which we considered a patient was a true responder when the following conditions were present: pCR or Rmic and ypN0 or tumor regression

Table 2. Baseline characteristics ( $n = 128$ )

Characteristic	Value
Age (y)	
Mean	65
Range	32-83
Gender	
Female	31 (24)
Male	97 (76)
ECOG performance status score	
0-1	111 (87)
2	17 (13)
Tumor stage	
T2	8 (6)
T3	103 (81)
T4	17 (13)
Lymph node involvement	
0	51 (40)
1	55 (43)
2	20 (16)
Pretreatment CEA (ng/mL)	
$<5.5$	80 (63)
$>5.5$	48 (37)
Treatment	
5-Fluorouracil	44 (34)
Capecitabine	16 (13)
5-Fluorouracil plus oxaliplatin	46 (36)
Capecitabine plus oxaliplatin	22 (17)
Tumor response	
Complete response	17 (13)
Partial response	81 (63)
Stable disease	28 (22)
Adjuvant therapy	
Yes	76 (59)
No	49 (38)

Abbreviations: ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; CEA = carcinoembryonic antigen.

Data presented as numbers, with percentages in parentheses.



Table 3. Genetic determinants, pathologic regression, and progression-free survival

Parameter	Response		%	<i>p</i> *	Median PFS (mo) (95% CI)	<i>p</i> †
	%	( <i>n</i> )				
TS						.039
2/2 and 2/3	66	32	38	0.023	75 (61–89)	
3/3	34	26	59		103 (85–121)	
TS expression						
Alleles				.23		.28
Low	52	33	51		78 (62–94)	
High	48	25	40		94 (78–110)	
USF				.4		.5
1–2	51	33	51		78 (62–94)	
3	41	22	42		95 (77–113)	
4	8	3	30		65 (42–88)	
EGFR				.9		.12
Arg497Lys						
G/G	51	29	45		91 (77–106)	
G/A	38	22	45		74 (54–93)	
A/A	11	7	50		82 (51–114)	
XRCC1				.4		.9
Arg194Trp						
C/C	91	53	46		88 (75–100)	
C/T	9	4	33		85 (49–121)	
XRCC1				.5		.3
Arg280His						
G/G	88	52	47		86 (73–98)	
G/A	12	6	37		93 (68–118)	
XRCC1				.8		.048
Arg399Gln						
G/G	39	24	49		101 (83–118)	
G/A	50	28	44		78 (63–92)	
A/A	11	6	43		31 (23–38)	
ERCC1				.6		.21
Asn118Asn						
C/C	18	10	43		66 (42–89)	
C/T	42	22	41		92 (75–108)	
T/T	40	26	51		84 (64–103)	
ERCC1				.6		.8
19716G>C						
G/G	41	27	51		86 (67–105)	
G/C	43	22	41		85 (68–102)	
C/C	16	9	45		74 (49–99)	
ERCC1				.1		.9
8092C>A						
C/C	61	40	51		87 (71–102)	
C/A	29	11	31		80 (61–99)	
A/A	10	7	54		84 (54–114)	
XPD				.7		.9
Lys751Gln						
A/A	40	25	49		86 (69–103)	
A/C	49	28	45		84 (67–101)	
C/C	11	5	36		64 (42–86)	
GSTP1				.35		.9
Ile105Val						
A/A	45	30	52		77 (62–92)	
A/G	47	25	42		92 (74–109)	
G/G	8	3	30		86 (52–120)	

Abbreviations: PFS = progression-free survival; CI = confidence interval; TS = thymidylate synthase; USF = union site of transcription factor; EGFR = epidermal growth factor receptor; ERCC1 = excision repair cross-complementing 1; XRCC1 = X-ray repair cross-complementing group 1; XPD, xeroderma pigmentosum group D.

\* Chi-square test.

† Log-rank test.

Grade 3–4 and ypN0 and significant T stage downstaging. Using these more stringent criteria, we found that the association between the response and TS genotype was similar: 64% of patients with a homozygous \*3/\*3 genotype were classified as “objective responders” vs. only 41% of patients with a heterozygous \*2/\*3 or homozygous \*2/\*2 genotype ( $p = .013$ ). We did not find any relationship between the remaining polymorphisms analyzed and response when these criteria were included. The exact ypTN0 status of this objective responders group is provided in Table 4.

In the logistic regression analysis, the ECOG (odds ratio, 1.84; 95% confidence interval [CI], 1–3.45,  $p = .05$ ), pretreatment CEA level (odds ratio, 2.52; 95% CI, 0.012–0.43,  $p = .02$ ), and VNTR genotype (odds ratio, 0.39; 95% CI, 0.17–0.87,  $p = .021$ ) were the factors that independently predicted the probability of pathologic regression.

#### Clinical and genetic determinants and survival

The 5-year PFS rate in our group of patients was 55%. The rate of follow-up at 10 years was also 55%. The OS rate at 5 and 10 years was 72% and 47%, respectively. The pathologic stage and circumferential rectal margin (CRM) involvement correlated with a significant difference in PFS ( $p < .001$ ). The tumor regression grade was associated with PFS. Patients with pCR and Rmic had a median PFS of 103 months; however, patients with Grade 3 or 4 had a median PFS of 72 months ( $p = .018$ ). Patients with downstaging had greater 5-year PFS rate at 69% than those without downstaging (PFS rate, 41%;  $p = .003$ , log-rank test; Fig. 1). We also observed a trend toward better PFS according to clinical stage ( $p = .08$ ), ECOG ( $p = .1$ ), and pretreatment CEA level ( $p = .1$ ). The pathologic stage and complete pathologic resection (CRM/R0) were also prognostic markers for better OS ( $p = .02$  and  $p < .001$ , respectively).

Polymorphisms in the ERCC1 gene were significantly associated with the CRM: 22% of patients with a T/T genotype in the ERCC1 Asn118Asn SNP had an R1–R2 CRM resection compared with 8% of patients with a C/C or C/T genotype ( $p = .025$ ). Although a high percentage of T/T patients presented with recurrence, the differences were not statistically significant (42% vs. 33% and 24% in C/T and C/C patients, respectively;  $p = .2$ ).

Table 4. Pathologic stage of responder patients considering tumor regression grade, ypN0, and T downstaging

Response	Pathologic stage (n)		
	ypT0N0	ypT1–T2N0	ypT3N0
pCR	17 (13%)	–	–
Rmic plus ypN0	–	19 (15)	16 (13)
TRG 3–4 plus ypN0 plus T downstaging	–	10 (8)	–

Abbreviations: pCR = pathologic complete response; Rmic = residual microfoci; TRG = tumor regression grade. Data in parentheses are percentages.

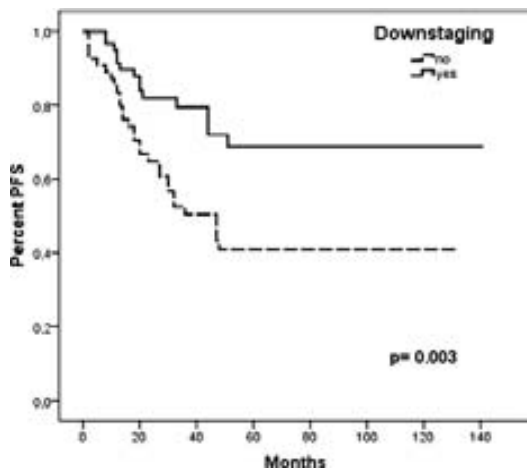


Fig. 1. Correlation between downstaging and progression-free survival (PFS) in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. Continuous line, patients without downstaging; discontinuous line, patients with downstaging.

With regard to PFS, two genetic variables, the TS genotype and the XRCC1 Arg399Gln SNP, had predictive value. For the TS genotype, the median PFS was 103 months for the \*3/\*3 patients and 75 months for the \*2/\*2 and \*2/\*3 patients ( $p = .039$ ; Fig. 2A). For the XRCC1 Arg399Gln SNP, the median PFS was 101 months for the G/G, 78 months for the G/A, and 31 months for the A/A patients ( $p = .048$ ; Fig. 2B). For OS, only the TS genotype defined a statistically significant group of survivors. The median OS was 124 months in genotype \*3/\*3 and 78 months in genotypes \*2/\*2 and \*2/\*3 ( $p = .023$ ; Fig. 3).

The Cox regression model included the genotype variables ECOG, gender, age, concurrent chemotherapy protocols, T and N stage, preoperative CEA level, and adjuvant treatment. Only the pathologic stage (hazard ratio, 0.43; 95% CI, 0.29–0.65;  $p < .001$ ) and complete pathologic resection (hazard ratio, 0.48; 95% CI, 0.29–0.8;  $p = .005$ ) were independent predictors of PFS after adjustment for the other clinically relevant variables. These two variables were also prognostic markers for better OS (hazard ratio, 0.66; 95% CI, 0.44–0.99;  $p = .045$ ; and hazard ratio, 0.44; 95% CI, 0.25–0.78;  $p = .005$ , respectively).

## DISCUSSION

Several clinical prognostic markers, including CRM, RO rate, 3-year disease-free survival, and pCR, have been proposed for identifying rectal cancer patients with a better outcome after CRT. Despite its limitations, pCR has been chosen as a primary endpoint in many clinical trials. In the present study, the five regimens of CRT resulted in a significant reduction in the sample sizes of the subgroups. In addition, the method of 5-FU delivery and the amount of 5-FU used might have influenced the response rates to neoadjuvant CRT regimens containing this drug. This could have contributed to underestimating the true influence of the

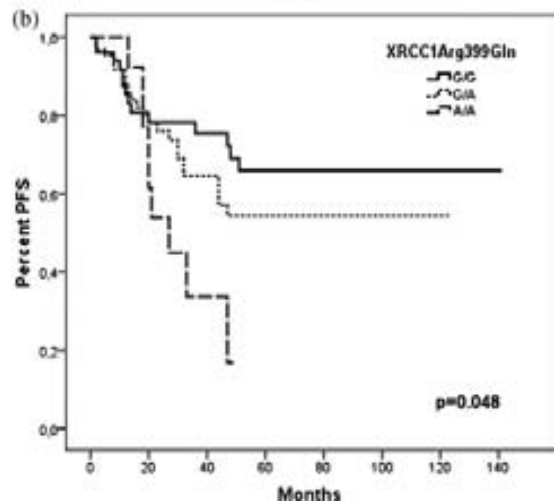
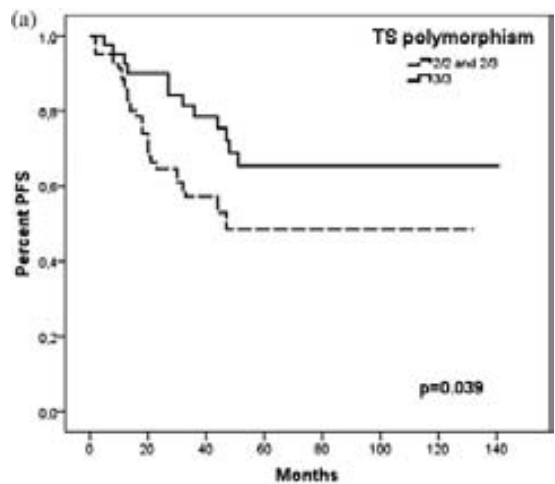


Fig. 2. (A) Kaplan-Meier curve for progression-free survival (PFS) and thymidylate synthase (TS) polymorphism in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. Continuous line, patients with \*2/\*2 or \*2/\*3 TS genotype; discontinuous line, \*3/\*3 TS genotype. (B) Kaplan-Meier curve for PFS and X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) Arg399Gln in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. Continuous line, G/G genotype; short discontinuous line, G/A genotype; and discontinuous line, A/A genotype.

CRT regimens on the response to therapy. However, the pCR rate was similar in all patients regardless of the chemotherapy scheme used and was comparable to previous data obtained from large Phase III trials (1, 29). We are aware that the heterogeneity of the CRT regimens, the grouping of patients with a complete and an incomplete pathologic response, and the heterogeneity in the use of adjuvant therapy were limitations that could have also influenced our study results.

However, because useful predictive or prognostic biomarkers have not yet been clearly defined in this context, a pharmacogenetic approach is of great interest.

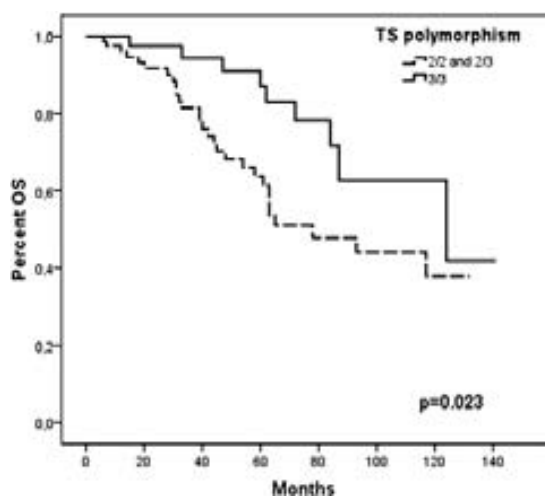


Fig. 3. Kaplan-Meier curve for overall survival (OS) and thymidylate synthase (TS) polymorphism in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. Continuous line, patients with \*2/\*2 or \*2/\*3 TS genotype; discontinuous line, \*3/\*3 TS genotype.

Pharmacogenetic information concerning rectal cancer treatment has usually been based on small patient cohorts, and, in some cases, the results have been controversial. Data are available for several genes (TS and EGFR), but information is scarce about the DNA repair genes (ERCC1, XPD, and XRCC1) and the GSTP1 gene. The information derived from pharmacogenetic studies developed for rectal cancer patients is discussed on a gene-by-gene basis.

#### Thymidylate synthase

In a pioneer study, DNA was extracted from frozen biopsy specimens obtained during preoperative colonoscopy of 65 patients. The investigators demonstrated for the first time that polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the TS gene promoter might predict downstaging after preoperative chemotherapy-RT. Homozygous \*3/\*3 patients had a lower probability of downstaging than homozygous \*2/\*2 or heterozygous \*2/\*3 patients (22% vs. 60%;  $p = .036$ ). In addition, downstaging was a clinical predictor for both local control and disease-free survival (3-year disease-free survival rate, 30% for patients without downstaging vs. 88% for patients with downstaging;  $p = .017$ ) (30). In another study, Spindler *et al.* (31) included pretreatment blood samples from 60 patients with locally advanced rectal tumors treated with RT and concomitant chemotherapy (oral Uftoral). Patients with the TS \*2/\*2 genotype had a significantly greater complete pathologic response rate than those with the \*2/\*3 or \*3/\*3 genotype (31). More recently, Stoehlmacher *et al.* (32) performed a genotypic study of 40 rectal cancer patients. They concluded that a 6-bp deletion/insertion polymorphism in the 3' region of the TS gene might be an important predictor for histopathologic tumor regression and that the TS 5' poly-

morphisms were not associated with either tumor regression or gene expression (32). Cecchin *et al.* (33) studied 25 polymorphisms in 16 genes with a key role in RT, multidrug resistance, and fluoropyrimidine-related pathways. No statistically significant association was found between the TS genotype and the tumor regression rate of their group of rectal cancer patients (33). Balboa *et al.* (34) studied a panel of pharmacogenetic markers in germline and tumor samples of 65 Stage II-III rectal patients. In the analysis of the germline DNA samples, they found a significantly better response rate for patients with TS 5'UTR genotypes with at least one high-expression allele than for those carrying two low-expression alleles ( $p = .022$ ) (34). In a recent study of 51 rectal cancer cases, we found that the TS genotype significantly predicted those patients who would benefit from chemotherapy/RT 5-FU-based treatment. The \*3/\*3 TS genotype was associated with a greater response rate (pCR and microfoci residual tumor, 61% in \*3/\*3 vs. 22% in \*2/\*2 and \*2/\*3;  $p = .013$ ). On multivariate analysis, the \*3/\*3 TS genotype was also an independent prognostic factor for better survival ( $p < .05$ ) (35). The results obtained in the present study, which included a greater number of patients ( $n = 128$ ) were almost identical to those from our previous work, reinforcing the validity of our findings. Patient outcome was evaluated simultaneously considering three relevant parameters: pathologic response, pathologic regression, and tumor downstaging. To guarantee the homogeneity of the clinical-pathologic criteria, these parameters were evaluated by the same oncologist and the same pathologist. Both investigators were unaware of the genetic results.

Several explanations could account for the controversial findings regarding the pharmacogenetic role of TS in rectal cancer pathologic complete remission, including the retrospective design, relatively small sample sizes, different origin of the DNA analyzed (germline or tumor), and different therapeutic regimens used in the cited studies. Prospective studies that overcome all these methodologic limitations are needed to clarify the relationship between the TS genotype and the response to treatment containing fluoropyrimidines.

#### Epidermal growth factor receptor

Zhang *et al.* (23) reported a high risk of local recurrence in patients carrying a EGFR 497 Arg allele and <20 CA repeats in intron 1 of EGFR gene ( $p = .005$ ). Spindler *et al.* (31) suggested a combination of predictive markers associated with a complete pathologic response. They identified a very small subgroup of patients with a very high complete response rate when the TS and EGFR genotypes were combined. A recent publication (34) and our results did not confirm these findings, because no evidence of any relationship between the EGFR genotypes and tumor regression rates was found.

#### DNA repair genes (ERCC1, XRCC1, XPD) and GSTP1

Few data are available regarding the pharmacogenetic role of these genes in the treatment of rectal cancer patients. We found that the Asn118Asn polymorphism in the ERCC1

gene was significantly associated with the CRM. The prognostic importance of this surgical parameter for local recurrence and survival is well established (36, 37). In the whole sample of patients, we achieved a CRM R0 rate of 87%, comparable to the data reported in randomized trials (38, 39).

Although it has been demonstrated that several factors can affect the CRM margins, such as the operation type (in particular, the use of abdominoperineal resection) and surgeon experience (*i.e.*, volume, training, and specialization), we found an association between CRM and a genetic variable for the first time. The biologic significance of this association could be related to the assumption that tumors in patients with a favorable ERCC1 genotype might be less aggressive than in those with genotype T/T. The tumor growth and better differentiation in patients with a favorable ERCC1 genotype would be helpful for surgeons, leading to a CRM R0 rate and greater survival. In support of this hypothesis, we found that a high percentage of T/T patients presented with recurrence.

Pharmacogenetic studies performed in metastatic colorectal cancer patients treated with folinic acid (leucovorin), 5-FU, and oxaliplatin showed a significant association with a worse response and short survival in patients carrying

a XRCC1 399Gln allele (40, 41). Subsequent studies of colorectal cancer patients failed to confirm XRCC1 Arg-399Gln as a prognostic factor (11, 19, 42). In rectal cancer patients, Balboa *et al.* (34) did not find any relation between the XRCC1 Arg399Gln analyzed in DNA from peripheral blood and response. Analogous results were reported by other investigators in a similar study (33). Although our results are in agreement with these data regarding the association of the XRCC1 polymorphisms with response, we found a significant association between the genetic marker and PFS: 101 months for patients with an Arg/Arg genotype, 78 months for those with a heterozygous genotype, and 31 months for Gln/Gln patients ( $p = .048$ ).

No statistically significant association with the response to CRT, PFS, or OS was detected in relationship to *XPD* Lys751Gln and *GSTP1* Ile105Val SNPs.

## CONCLUSIONS

We found that an assessment of the CRM and the pathologic stage after CRT are the most important clinical prognostic factors in rectal cancer and that the TS genotype and the XRCC1 Arg399Gln might help to identify those patients who will have a better outcome.

## REFERENCES

1. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1731–1740.
2. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;352:476–487.
3. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330–338.
4. Danenberg PV. Thymidylate synthetase—A target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1977;473:73–92.
5. Horie N, Aiba H, Oguro K, *et al.* 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* 1995;20:191–197.
6. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, *et al.* Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 1999;19:3249–3252.
7. Kawakami K, Salonga D, Park JM, *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.
8. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, *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.
9. 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.
10. Gusella M, Bolzonella C, Crepaldi G, *et al.* A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. *Pharmacogenomics J* 2006;6:421–424.
11. Pare L, Marcuello E, Altes A, *et al.* Transcription factor-binding sites in the thymidylate synthase gene: Predictors of outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin? *Pharmacogenomics J* 2008;8:315–320.
12. Saundes M, Iverson T. Management of advanced colorectal cancer: State of the art. *Br J Cancer* 2006;95:131–138.
13. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, *et al.* Oxaliplatin: Mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 1998;25:4–12.
14. Reed E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:6100–6102.
15. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366–374.
16. Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998;58:604–608.
17. Broughton BC, Steingrimsdottir H, Lehmann AR. Five polymorphisms in the coding sequence of the xeroderma pigmentosum group D gene. *Mutat Res* 1996;362:209–211.
18. Cullen KJ, Newkirk KA, Shumaker LM, *et al.* Glutathione S-transferase  $\pi$  amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 2003;63:8097–8102.
19. Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, *et al.* A multivariate analysis of genomic polymorphisms: Prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;91:344–354.
20. Dianov GL. Monitoring base excision repair by in vitro assays. *Toxicology* 2003;15:35–41.
21. Laskin JJ, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: A promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2004;30:1–17.
22. Moriai T, Kobrin MS, Hope C, *et al.* A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10217–10221.

23. Zhang W, Park DJ, Lu B, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin Cancer Res* 2005;11:600–605.
24. Tepper JE, O'Connell M, Niedzwiecki D, *et al.* Adjuvant therapy in rectal cancer: Analysis of stage, sex, and local control—Final report of Intergroup 0114. *J Clin Oncol* 2002;20:1744–1750.
25. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, *et al.* Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: Not one millimeter but two millimeters is the limit. *Am J Surg Pathol* 2002;26:350–357.
26. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, *et al.* Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma: Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73:2680–2686.
27. Janjan NA, Khoo VS, Abbruzzese J, *et al.* Tumor downstaging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer: The M. D. Anderson Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:1027–1038.
28. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
29. Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F, *et al.* Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3–4 rectal cancers: Results of FFC0 9203. *J Clin Oncol* 2006;24:4620–4625.
30. Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, *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.
31. Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, *et al.* Germline polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 2007;50:1363–1369.
32. Stoehlmacher J, Goekkurt E, Mogck U, *et al.* Thymidylate synthase genotypes and tumor regression in stage II/III rectal cancer patients after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiation. *Cancer Lett* 2008;272:221–225.
33. Cecchin E, Agostini M, Pucciarelli S, *et al.* Tumor response is predicted by patient genetic profile in rectal cancer patients treated with neo-adjuvant chemo-radiotherapy. *Pharmacogenomics J Epub* 2010 Apr 6.
34. Balboa E, Duran G, Lamas MJ, *et al.* Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: High incidence of somatic mutations and their relation with response. *Pharmacogenomics* 2010;11:747–761.
35. Páez D, Paré L, Altés A, *et al.* Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-fluorouracil. *J Cancer Res Clin Oncol Epub* 2010 Feb 18.
36. Gosens MJ, Klaassen RA, Tan-Go I, *et al.* Circumferential margin involvement is the crucial prognostic factor after multimodality treatment in patients with locally advanced rectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:6617–6623.
37. Sebag-Montefiore D, Stephens RJ, Steele R, *et al.* Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): A multicentre, randomised trial. *Lancet* 2009;373:811–820.
38. Gérard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, *et al.* Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: Results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol* 2010;28:1638–1644.
39. Fernández-Martos C, Pericay C, Aparicio J, *et al.* Phase II, randomized study of concomitant chemoradiotherapy followed by surgery and adjuvant capecitabine plus oxaliplatin (CAPOX) compared with induction CAPOX followed by concomitant chemoradiotherapy and surgery in magnetic resonance imaging-defined, locally advanced rectal cancer: Grupo cancer de recto 3 study. *J Clin Oncol* 2010;28:859–865.
40. Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iobal S, *et al.* A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001;21:3075–3079.
41. Suh KW, Kim JH, Kim do Y, *et al.* 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* 2006;13:1379–1385.
42. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, *et al.* Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007;25:1247–1254.



2.- Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico:

**2.1.- Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: Are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy?**

Cancer Science 2010; 10: 2048-2053.

David Páez, Laia Paré, Iñigo Espinosa, Juliana Salazar, Elisabeth del Rio, Agustí Barnadas, Eugenio Marcuello, Montserrat Baiget.

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







**Resumen:**

*Introducción:* Existe una relación entre la presencia de mutaciones en el oncogén *KRAS* y la resistencia a los tratamientos que actúan contra el factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Además de inhibir la vía del EGFR, los anticuerpos monoclonales anti-EGFR pueden ejercer efectos antitumorales a través otro mecanismo denominado citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC). A través de este mecanismo, la porción Fc del anticuerpo (Fcγ) interactúa con los receptores Fc (FcγR) expresados en las células efectoras inmunes. En este estudio se investiga la asociación de los polimorfismos en FcγR y las mutaciones en *KRAS* en una cohorte de 104 pacientes con CCR metastático tratados con anticuerpos contra el EGFR y refractarios a al menos una primera línea de quimioterapia.

*Material y métodos:* Los polimorfismos FcγRIIIa-H131R y FcγRIIIa-V158F se analizaron utilizando el sistema Fluidigm BioMark™ de PCR en tiempo real (Fluidigm, South Sanfrancisco, CA, USA). Se evaluaron las mutaciones en el gen *KRAS*, codones 12 y 13, en el ADN extraído de 96 muestras de tejido tumoral.

*Resultados:* La presencia de mutación en *KRAS* se asoció con una menor tasa de respuesta (TR) ( $p=0,035$ ) y una menor supervivencia libre de progresión (SLP) (3 vs 7 meses;  $p=0,36$ ). Los polimorfismos FcγRIIIa-H131R y FcγRIIIa-V158F no mostraron ninguna relación estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento, la SLP o estado mutacional del gen *KRAS*. En el análisis de regresión logística, la ausencia de mutación en *KRAS* ( $p=0,04$ ) y la toxicidad cutánea ( $p=0,03$ ) se asociaron con la TR. En el análisis multivariado, tanto la clasificación clínica de riesgo ( $p=0,006$ ) como la toxicidad cutánea ( $p < 0,0001$ ) fueron variables clínicas independientes asociadas con la SLP.

## Resultados

*Conclusiones:* Los polimorfismos FcγRIIIa-H131R y FcγRIIIa-V158F no son útiles como marcadores moleculares para predecir el beneficio al tratamiento con anticuerpos contra el EGFR. Hasta la fecha tan sólo la clasificación clínica de riesgo de la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), la toxicidad cutánea y el estado mutacional de *KRAS*, permiten identificar a los pacientes que se beneficiarían del tratamiento anti-EGFR.

# Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: Are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy?

David Paez,<sup>1,5</sup> Laia Paré,<sup>2</sup> Iñigo Espinosa,<sup>3</sup> Juliana Salazar,<sup>2,4</sup> Elisabeth del Rio,<sup>2,4</sup> Agustí Barnadas,<sup>1</sup> Eugenio Marcuello<sup>1</sup> and Montserrat Baiget<sup>2,4</sup>

Departments of <sup>1</sup>Medical Oncology, <sup>2</sup>Genetics and <sup>3</sup>Pathology, Hospital of the Holy Cross and Saint Paul, University Autònoma of Barcelona, Barcelona; <sup>4</sup>Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

(Received March 17, 2010/Revised April 29, 2010/Accepted May 1, 2010/Accepted manuscript online May 17, 2010)

*KRAS* mutations have been identified as a strong predictor of resistance to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapies. Besides inhibiting the EGFR pathway, anti-EGFR monoclonal antibodies may exert antitumor effects through antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). Through this mechanism, the antibody fragment C portion (Fc<sub>γ</sub>) interacts with Fc receptors (Fc<sub>γ</sub>Rs) expressed by immune effector cells. We investigated the association of Fc<sub>γ</sub>R polymorphisms and *KRAS* mutation with the clinical outcome of 104 refractory metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with anti-EGFR antibodies. *Fc<sub>γ</sub>RIIIa-H131R* and *Fc<sub>γ</sub>RIIIa-V158F* polymorphisms were analyzed in genomic DNA using a 48.48 dynamic array on the BioMark system (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA). Tumor tissues from 96 cases were screened for *KRAS* mutations. *KRAS* mutation was associated with a lower response rate (RR) ( $P = 0.035$ ) and a shorter progression-free survival (PFS) (3 vs 7 months;  $P = 0.36$ ). *Fc<sub>γ</sub>RIIIa-H131R* and *Fc<sub>γ</sub>RIIIa-V158F* polymorphisms did not show statistically significant associations with response, PFS, or *KRAS* status. In the logistic regression analysis, *KRAS* status ( $P = 0.04$ ) and skin toxicity ( $P = 0.03$ ) were associated with RR. By multivariate analysis, the clinical risk classification ( $P = 0.006$ ) and skin toxicity ( $P < 0.0001$ ) were found to be independent risk factors for PFS. In conclusion, the *Fc<sub>γ</sub>RIIIa* and *Fc<sub>γ</sub>RIIIa* polymorphisms are not useful as molecular markers for clinical outcome in mCRC patients. To date, the EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer Classification), skin toxicity, and *KRAS* status are the only reliable biomarkers to identify patients that would benefit from anti-EGFR therapy. (*Cancer Sci* 2010)

Colorectal cancer is one of the most frequent causes of cancer deaths worldwide. Survival has improved in the last decade due to the development of new combinations of chemotherapy and to the recent introduction of targeted therapies.

Two anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibodies (cetuximab and panitumumab) show activity in metastatic colorectal cancer (mCRC). Cetuximab, a chimeric immunoglobulin 1 (IgG1) monoclonal antibody, targeted against the extracellular domain of the EGFR, has demonstrated efficacy in chemorefractory mCRC patients.<sup>(1,2)</sup> Recently, the phase III trial CRYSTAL conducted by Van Cutsem *et al.* showed that first-line treatment with cetuximab plus Infusional fluorouracil/leucovorin plus irinotecan (FOLFIRI) reduced the risk of progression of metastatic colorectal cancer as compared with FOLFIRI alone. This study also demonstrated that the benefit of cetuximab was limited to patients with *KRAS* wild-type tumors.<sup>(3)</sup> Panitumumab, a fully human monoclonal IgG2 antibody that targets the EGFR, was

approved as monotherapy for patients with *KRAS* wild-type tumors after failure of fluoropyrimidine-, oxaliplatin-, and irinotecan-based regimens.<sup>(4)</sup>

The investigation of molecular markers that could potentially predict clinical response or resistance to anti-EGFR is of high interest to avoid unnecessary drug toxicity and reduce treatment costs. *KRAS* mutation has been associated with the inefficacy of cetuximab and panitumumab<sup>(3,5)</sup> and to date remains the most relevant biological marker of anti-EGFR resistance. However, as *KRAS* status cannot predict the clinical outcome in cases with a wild-type genotype, the search of novel markers independent of *KRAS* status is warranted. Cetuximab, and possibly panitumumab may exert anti-tumor effects by means of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The antibody fragment C portion (Fc<sub>γ</sub>) interacts with Fc receptors (Fc<sub>γ</sub>Rs) expressed by immune effector cells.<sup>(6)</sup> Polymorphisms have been described in genes coding for Fc<sub>γ</sub>RIIIa and in Fc<sub>γ</sub>RIIIa. A histidine/arginine polymorphism at position 131 for the *Fc<sub>γ</sub>RIIIa* gene and valine/phenylalanine polymorphism at position 158 for the *Fc<sub>γ</sub>RIIIa* gene have been reported to be functionally relevant in the ADCC mechanism.

The aim of this study was to investigate the association of the above-mentioned Fc<sub>γ</sub>R polymorphisms and *KRAS* mutation with the clinical outcome of refractory mCRC patients treated with cetuximab or panitumumab in monotherapy or in combination with chemotherapy.

## Materials and Methods

**Eligible patients.** A total of 104 patients (66 males, 38 females; median age, 64 years) with histopathologically proven metastatic colorectal adenocarcinoma, who failed at least one prior chemotherapy regimen, were included in this study. The patients were treated from 2004 to 2009 with cetuximab or panitumumab as monotherapy or in combination with chemotherapy. Relevant clinical data (gender, age, Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] performance status score, etc.) were obtained from clinical records. Patients were classified according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) clinical model validated by Köhne *et al.*<sup>(7)</sup> Skin toxicity was graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (version 2.0). The response to treatment was evaluated every 2 to 3 months by tomodesitometry according to the Response Evaluation Criteria in Solid

<sup>5</sup>To whom correspondence should be addressed E-mail: dpaez@santpau.cat

**Table 1. Baseline characteristics of metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR based therapy (n = 104)**

	No.	%
Mean age, years	64	
Range	34–85	
Sex		
Female	38	36
Male	66	64
ECOG performance status score		
0–1	79	76
2	25	24
Anatomic site		
Right colon	21	20
Left colon	10	10
Sigmoid	34	33
Rectosigmoid	10	10
Rectum	28	27
No. previous lines of chemotherapy		
1	46	44
2	46	44
3	8	8
4	4	4
Clinical classification		
Low risk	30	29
Intermediate risk	49	47
High risk	25	24
Treatment		
Cetuximab + irinotecan/FOLFIRI	72/14	69/13
Cetuximab + FOLFOX/capecitabine	5/1	5/1
Panitumumab + Irinotecan	8	8
Panitumumab alone	4	4
Tumor response		
Complete response	1	1
Partial response	19	18
Stable disease	44	42
Progressive disease	35	34

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; EGFR, epidermal growth factor receptor; FOLFIRI, fluororacil, leucovorin and irinotecan; FOLFOX, fluororacil, leucovorin and oxaliplatin.

Tumours (RECIST)<sup>(8)</sup> and classified as: (i) complete response (CR); (ii) partial response (PR); (iii) stable disease (SD); or (iv) progressive disease (PD). For the statistical analysis, the best tumor response was selected. The median follow-up time was 9.5 months (range, 0.5–44 months). All patients signed an informed consent for tissue and blood collection for the study of molecular correlates. This retrospective analysis was approved by the Institutional Ethics Committee.

**KRAS mutational analysis.** *KRAS* mutations in codon 12 and 13 were assessed on tumor DNA. Mutational analysis was

performed by PCR amplification of exon 1 of the *KRAS* gene following previously reported conditions.<sup>(9)</sup> The purified PCR products were automatically sequenced on an ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

**FcγRIIIa-H131R and FcγRIIIa-V158F genotyping.** The genomic DNA was extracted from peripheral leucocytes by the salting-out procedure.<sup>(10)</sup> We genotyped all patient samples for the FcγRIIIa-H131R and FcγRIIIa-V158F polymorphisms using a 48.48 dynamic array on the BioMark system (Fluidigm). The sample and the TaqMan SNP Genotyping assay (Applied Biosystems) mixes were prepared following the manufacturer's recommendations. Prior to loading the mixes into the inlets, the chip was primed in the NanoFlex IFC Controller. The sample and genotyping mixes were then loaded into the inlets of the dynamic array and again placed in the IFC Controller for loading and mixing for approximately 45 min. Polymerase chain reaction (PCR) was performed on the BioMark system with an initial 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for annealing and extension. Endpoint fluorescent image data were acquired on the BioMark Real-Time PCR System and analyzed using Fluidigm SNP Genotyping Analysis software.

As a quality control, normal, heterozygous and homozygous sequenced samples were included on every array for each genotype.

**Statistical analysis.** The 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 response after adjustment for other relevant clinical variables. The Kaplan–Meier estimates and log-rank tests were used in the univariate analysis of progression-free survival (PFS). Progression-free survival (PFS) was calculated from the beginning of treatment until progression of the neoplasia or death. The Cox regression model was used for multivariate analyses of PFS. Results were considered statistically significant when *P*-values were < 0.05.

## Results

A total of 104 Caucasian patients were studied. Clinical data are shown in Table 1. Overall, 92 patients (88%) were treated with cetuximab plus chemotherapy and 12 patients (12%) were treated with panitumumab alone or in combination with irinotecan. One patient had CR, 19 had PR (18%), 44 had SD (42%), and 35 progressed (34%). Five patients were not evaluated. The median PFS was 4 months (range, 0.5–30 months) and median overall survival was 9.5 months (range, 0.5–44 months).

**Clinical parameters and outcomes.** There were significant differences in the clinical response when patients were grouped in accordance with the clinical classification (EORTC model). While 21% of the low-risk patients achieved a CR/PR, only 4%

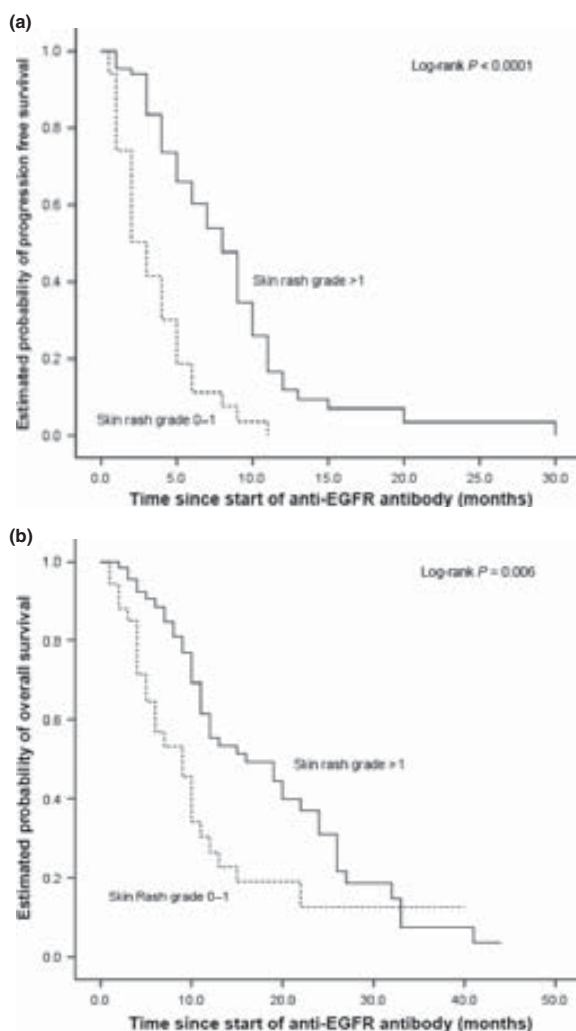
**Table 2. Clinical classification (EORTC model) and outcome of mCRC patients treated with anti-EGFR-based therapy**

	Clinical classification						<i>P</i> -value
	Low risk		Intermediate risk		High risk		
N	28		46		25		
Response	No.	%	No.	%	No.	%	
CR/PR	6	21	14	30	1	4	<0.0001*
SD	18	64	19	41	6	24	
PD	4	14	13	28	18	72	
Median PFS (months)	8		7		2		<0.0001†
95% CI	6.1–9.8		4.1–9.8		1–2.9		

\*Fisher's exact test; †log-rank test. CI, confidence interval; CR, complete response; EGFR, epidermal growth factor receptor; EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer; mCRC, metastatic colorectal cancer; PFS, progression-free survival; PR, partial response; SD, stable disease.

of high risk patients presented a PR. In a similar way, 14% of low risk patients had a progressive disease compared to 72% of high risk patients ( $P < 0.0001$ ). Accordingly, a longer median PFS was observed in low risk patients compared with high risk patients (8 months [95% confidence interval, CI, 6.1–9.9] vs 2 months [95% CI, 1–2.9]  $P < 0.0001$ ) (Table 2). Overall survival also differed in accordance with the clinical classification (13 months in low- and intermediate-risk patients [95% CI, 7.3–18.6 months] vs 5 months in high-risk patients [95% CI, 3.2–6.7 months];  $P < 0.0001$ ).

Grade 2 or 3 skin rash was observed in 68 patients (65%). Skin rash severity was significantly associated with clinical response; 19 patients (29%) with severe skin toxicity responded to treatment versus only two patients (6%) with grade 0 or 1 of skin toxicity ( $P < 0.009$ ). Skin rash severity was associated with a better PFS ( $P < 0.0001$ ; Fig. 1a) and OS ( $P < 0.006$ ; Fig. 1b).



**Fig. 1.** (a) Kaplan-Meier curve for progression-free survival and skin toxicity in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy. (b) Kaplan-Meier curve for overall survival and skin toxicity in mCRC patients treated with anti-EGFR therapy.

**Genetic determinants and outcomes.** Table 3 shows the frequencies of the two polymorphisms in the *FcγRIIa* and *FcγRIIIa* genes and *KRAS* mutation status. Frequencies of the polymorphisms studied were similar to those reported previously in a Caucasian population. There was no linkage disequilibrium between the *FcγRIIa* and *FcγRIIIa* polymorphisms in our group of patients ( $r^2 = 0.02$ ). *KRAS* status was evaluated in 96 cases and a mutation was detected in the tumor of 22 patients (21%). Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression status obtained by immunohistochemistry was negative in 44% of cases, <10% in 12%, 10–30% in 18%, and >30% in 5%. No relation was observed between EGFR expression and response. There was no concordance between the *FcγRIIa* and *FcγRIIIa* polymorphisms and EGFR status, excluding the involvement of this parameter in the ADCC activity.

*KRAS* mutation was associated with a lower response rate: only one out of 22 patients with this mutation responded. Nineteen out of 69 nonmutated patients were responders (4.5% vs 27.5%;  $P = 0.035$ ). Patients without *KRAS* mutation showed a trend to longer median PFS compared to mutated patients (7 vs 3 months;  $P = 0.36$ ) (Table 4).

No statistically significant differences were observed in response to treatment or PFS based on the *FcγRIIa-H131R* polymorphism. Neither did we observe a significant association when considering this polymorphism together with the *KRAS* status. However, patients with *FcγRIIa-131R/R* and wild-type *KRAS* showed a better response rate than those with the H/H or H/R genotype (53% vs 22% and 19% respectively;  $P = 0.1$ ) (Table 5).

Similarly, no statistically significant difference was observed for tumor response based on *FcγRIIIa-V158F* polymorphism, regardless of *KRAS* status (Table 6).

**Table 3.** Frequencies of genetic determinants

	No.	%
<b>KRAS status</b>		
Wild type	74	71
Mutated	22	21
Non-assessable	8	8
<b>FcγRIIa polymorphism</b>		
H/H	27	26
H/R	54	52
R/R	23	22
<b>FcγRIIIa polymorphism</b>		
V/V	16	15
V/F	41	39
F/F	47	45

F, phenylalanine allele; FcγR, fragment c γ receptor; H, histidine allele; R, arginine allele; V, valine allele.

**Table 4.** *KRAS* status and outcome of mCRC patients treated with anti-EGFR-based therapy

	<i>KRAS</i> status		<i>P</i> -value
	Wild type	Mutated	
<i>n</i>	69	22	
Response	No.	No.	
CR/PR	19	1	0.035*
SD/PD	50	21	
Median PFS (months)	7	3	0.36†
95% CI	5–8.9	1.2–4.7	

\*Fisher's exact test; †log-rank test. CI, confidence interval; CR, complete response; EGFR, epidermal growth factor receptor; mCRC, metastatic colorectal cancer; PFS, progression-free survival; PR, partial response; SD, stable disease.

**Table 5. Outcome of patients treated with anti-EGFR-based therapy according to FcγRIIIa polymorphism and KRAS mutations**

Whole group	FcγRIIIa						P-value
	H/H		H/R		R/R		
Response	No.	%	No.	%	No.	%	
CR/PR	4	17	8	15	9	41	0.13*
SD	9	37	26	49	8	36	
PD	11	46	19	36	5	23	
Median PFS (months)	4		6		6		0.61†
95% CI	2.9–5		3.4–8.5		3.6–8.3		
wt KRAS							
Response	No.	%	No.	%	No.	%	
CR/PR	4	22	7	19	8	53	0.1*
SD	6	33	18	50	5	33	
PD	8	44	11	31	2	13	
Median PFS (months)	5		7		7		0.7†
95% CI	3.5–6.5		4.2–9.7		5.5–8.4		
mut KRAS							
Response	No.	%	No.	%	No.	%	
CR/PR	–	–	1	7	–	–	1.0*
SD	2	50	7	47	2	67	
PD	2	50	6	47	1	33	
Median PFS (months)	3		3		6		0.7†
95% CI	0.6–5.9		0.7–5.2		0–12.4		

\*Fisher's exact test; †log-rank test. CI, confidence interval; CR, complete response; EGFR, epidermal growth factor receptor; FcγR, fragment c γ receptor; H, histidine allele; mut, mutated; PFS, progression-free survival; PR, partial response; R, arginine allele; SD, stable disease; wt, wild-type.

Combining the *FcγRIIIa-H131R* and *FcγRIIIa* polymorphisms we established a favorable genotype (patients homozygous 131 R/R and/or 158 F/F) and a non-favorable genotype (patients homozygous 131 H/H and/or 158 V/V). No significant difference was observed for tumor response and PFS between these genotype subsets (Table 7).

A logistic regression analysis indicated that *KRAS* status (odds ratio [OR] = 0.11; 95% CI, 0.01–0.93; *P* = 0.04) and skin toxicity (OR = 2.52; 95% CI, 1.09–5.85; *P* = 0.03) were the only independent predictive factors for response.

A multivariate Cox regression model that included baseline characteristics showed that the clinical risk classification (HR: 0.24; 95% CI, 0.08–0.66; *P* = 0.006) and skin toxicity (HR: 0.5; 95% CI, 0.37–0.67; *P* < 0.0001) were independent risk factors for PFS. Skin rash showed a trend to a better OS (HR: 0.73; 95% CI, 0.53–1; *P* = 0.052). *FcγRIIIa-H131R* and *FcγRIIIa-V158F* polymorphisms were not shown to be independent predictors of PFS and OS.

## Discussion

Although *KRAS* status has been identified as the most relevant molecular marker of non-response to anti-EGFR monoclonal antibodies,<sup>(11–13)</sup> not all wild-type patients respond. Furthermore, some mutant patients experience long-term disease control,<sup>(12,14,15)</sup> suggesting that *KRAS* mutation is not the only genetic alteration conferring resistance to cetuximab.

In addition to their EGFR antagonist function, cetuximab and possibly panitumumab have a functional fragment C portion with potential therapeutic properties. This fragment C portion can bind to the IgG fragment C receptor (FcγR) which is located on cytotoxic cells (natural killer lymphocytes or macrophages) and allows antitumor activity via ADCC.<sup>(16)</sup>

In an *in vitro* study, Paren *et al.* found the first evidence supporting the role of the FcγR coding genes in the ADCC mecha-

**Table 6. Outcome of patients treated with anti-EGFR-based therapy according to FcγRIIIa polymorphism and KRAS mutations**

Whole group	FcγRIIIa						P-value
	V/V		V/F		F/F		
Response	No.	%	No.	%	No.	%	
CR/PR	4	27	7	18	10	22	0.5*
SD	4	27	16	42	23	50	
PD	7	46	15	40	13	28	
Median PFS (months)	4		5		7		0.5†
95% CI	2.8–5.1		3.9–6		4.3–9.6		
wt KRAS							
Response	No.	%	No.	%	No.	%	
CR/PR	4	33	6	25	9	27	0.6*
SD	3	25	10	42	16	48	
PD	5	42	8	33	8	24	
Median PFS (months)	4		8		7		0.3†
95% CI	1.1–6.8		4.2–11.7		4.9–9.1		
mut KRAS							
Response	No.	%	No.	%	No.	%	
CR/PR	–	–	1	9	–	–	0.3*
SD	–	–	4	36	7	70	
PD	1	100	6	55	3	30	
Median PFS (months)	2		3		6		0.3†
95% CI			0.8–5.1		0–13.7		

\*Fisher's exact test; †log-rank test. CI, confidence interval; CR, complete response; EGFR, epidermal growth factor receptor; F, phenylalanine allele; FcγR, fragment c γ receptor; mut, mutated; PFS, progression-free survival; PR, partial response; SD, stable disease; V, valine allele; wt, wild-type.

**Table 7. Outcome of patients treated with anti-EGFR-based therapy according to the combination of FcγRIIIa and FcγRIIIa polymorphisms**

	FcγR combined				P-value
	H/H and/or V/V		R and F		
Response	No.	%	No.	%	
CR/PR	8	22	13	21	0.5*
SD	13	36	30	48	
PD	15	42	20	32	
Median PFS (months)	5		7		0.27†
95% CI	3.9–6.1		4.6–9.4		
	R/R and/or F/F		H and V		
Response	No.	%	No.	%	
CR/PR	13	25	8	17	0.17*
SD	25	48	18	38	
PD	14	27	21	45	
Median PFS (months)	7		5		0.9†
95% CI	5.4–8.6		3.8–6.2		

\*Fisher's exact test; †log-rank test. CI, confidence interval; CR, complete response; EGFR, epidermal growth factor receptor; F, phenylalanine allele; FcγR, fragment c γ receptor; PFS, progression-free survival; PR, partial response; SD, stable disease; V, valine allele.

nism. On studying the *FcγRIIIa* gene, they showed that the 131H allele had a higher binding efficiency for human IgG2 antibodies than the 131R allele.<sup>(17)</sup>

Pharmacogenetic studies have recently reported controversial results regarding the involvement of two genetic polymorphisms (H131R and V158F) located at the extracellular ligand-binding

domain of two receptors (*FcγRIIa* and *FcγRIIIa*, respectively) in immune cells. Here we discuss only the pharmacogenetic results obtained in colorectal cancer patients treated with anti EGFR antibodies.

Zhang *et al.* studied 39 mCRC treated with single-agent cetuximab.<sup>(6)</sup> The two mentioned *FcγR* gene polymorphisms were associated with clinical outcome. Patients with the *FcγRIIa-131H* allele had a longer PFS than patients with the *FcγRIIIa-131R* allele. Combined analysis of these two polymorphisms showed that patients with the favorable genotypes (*FcγRIIa*, any histidine allele, and *FcγRIIIa*, any phenylalanine allele) showed a median PFS of 3.7 months (95% CI, 2.4–4.4 months), whereas patients with any two unfavorable genotypes (*FcγRIIa* arginine/arginine or valine/valine) had a PFS of 1.1 months (95% CI, 1.0–1.4 months;  $P = 0.04$ ; long-rank test). These authors increased the sample to a total of 130 patients, all of whom were part of a phase II open-label multicenter clinical trial (IMC 0144) with cetuximab. This broad study of North American patients analyzed genetic markers in different genes, and the previous associations of the *FcγRIIa-FcγRIIIa* polymorphisms with clinical outcomes could not be replicated.<sup>(18)</sup>

Graziano *et al.* investigated possible associations between genetic variants in genes that could influence cetuximab-related pathways and clinical outcomes in 110 mCRC European patients. They were treated with cetuximab–irinotecan salvage therapy. No statistically significant associations between the *FcγRIIa-FcγRIIIa* polymorphisms and patients outcome were reported.<sup>(19)</sup>

More recently, other authors evaluated the association of *FcγRIIa* and *FcγRIIIa* polymorphisms and KRAS mutation with the outcome of irinotecan-refractory mCRC patients ( $n = 69$ ) treated with cetuximab plus irinotecan. Those patients with *FcγRIIa-131H/H* and/or *FcγRIIIa-158V/V* had a longer PFS than 131R and 158F carriers (5.5 vs 3.0 months;  $P = 0.005$ ). The difference remained significant for mutated-KRAS patients. Multivariate analysis showed that KRAS mutation and *FcγR* combined status were independent risk factors for PFS.<sup>(15)</sup>

The present study confirmed the prognostic clinical model proposed by Köhne *et al.* based on four baseline clinical parameters: performance status, level of white blood cell count, alkaline phosphatase, and number of involved tumor sites.<sup>(7)</sup> As our results showed a very poor outcome in the high-risk group of patients, the use of a monoclonal antibody treatment should not be considered for this population. Our study also confirmed that the presence and severity of skin rash was associated with improved clinical efficacy, as previously reported by other authors.<sup>(1,20,21)</sup> However, it should be pointed out that skin toxicity cannot be considered a clinically useful baseline feature

to preselect those patients who would benefit from anti-EGFR therapies.

As reported in previous publications, the presence of a KRAS mutation in tumor DNA was highly associated with a poor response.<sup>(3)</sup> In our series only one out of 22 mutated patients responded, while 19 out of 69 wild-type cases achieved a clinical response. In addition, patients with a wild-type KRAS status had a longer PFS (7 vs 3 months;  $P = 0.36$ ). The low frequency of KRAS mutations in our group of patients was due to the fact that patients were treated with anti-EGFR therapies, without taking KRAS status into consideration until 2008. Since then, only wild-type KRAS patients have been treated with anti EGFR monoclonal antibodies.

In our study, as in those previously reported with a high number of patients,<sup>(18,19)</sup> *FcγR* polymorphisms did not show any significant association with response to anti-EGFR therapy, and no significant effect was detected in the PFS in relation with these polymorphisms, whatever the KRAS status.

The present study has its limitations. First, most patients analyzed were treated with chemotherapy plus anti-EGFR monoclonal antibodies, while the ideal scenario to analyze the ADCC mechanism would be to include patients treated with anti-EGFR in monotherapy. Second, like other authors, we examined only two polymorphisms in only two genes involved in the ADCC mechanism. The results regarding the involvement of the *FcγR* polymorphisms in the efficacy of anti-EGFR are controversial. Differences in patients' characteristics, study design, therapeutic protocols, and even in the distribution of genotypes in the different patient groups might, in part, explain the discrepancies. The role of ADCC in anti-EGFR efficacy is, therefore, yet to be thoroughly investigated.

To the best of our knowledge, this is the first study to show that the clinical risk EORTC classification is a prognostic marker – independently of the skin toxicity and of the KRAS status – in mCRC patients treated with chemotherapy and monoclonal antibodies. Our findings allow us to conclude that the *FcγRIIa* and *FcγRIIIa* polymorphisms are not useful as molecular markers for clinical outcome in mCRC patients. Markers of poor prognosis other than KRAS mutation, such as v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF) mutation, phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide (PIK3CA) mutation, and phosphatase and tensin homolog (PTEN) loss, should be investigated as a next step.

## Acknowledgments

D.P. is a fellowship recipient of the Instituto de Salud Carlos III (CM08/00065). This study was supported in part by Instituto de Salud Carlos III (FIS/080199). The authors thank Carolyn Newey for English-language editing.

## References

- 1 Cunningham D, Humblet Y, Siena S *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**: 337–45.
- 2 Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 1201–8.
- 3 Van Cutsem E, Köhne CH, Hitt E *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1408–17.
- 4 Van Cutsem E, Peeters M, Siena S *et al.* Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 1658–64.
- 5 Amado RG, Wolf M, Peeters M *et al.* Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 1626–34.
- 6 Zhang W, Gordon M, Schultheis AM *et al.* FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 3712–8.
- 7 Köhne CH, Cunningham D, Di CF *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**: 308–17.
- 8 Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA *et al.* New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 205–16.
- 9 Lagarda H, Catasus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001; **193**: 193–9.
- 10 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215.

- 11 Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; **66**: 3992–5.
- 12 Lièvre A, Bachet JB, Boige V *et al.* KRAS mutations as independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 374–9.
- 13 Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR *et al.* American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 2091–5.
- 14 Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F *et al.* Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007; **96**: 1166–9.
- 15 Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F *et al.* Impact of Fc $\gamma$ RIIa-Fc $\gamma$ RIIIa Polymorphisms and KRAS Mutations on the Clinical Outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 1122–9.
- 16 Lièvre A, Laurent-Puig P. Toward an individualizing therapy for colorectal cancer: the example of the anti-EGFR monoclonal antibodies. *Per Med* 2009; **6**: 145–57.
- 17 Parren PW, Warmerdam PA, Boeije LC *et al.* On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1537–46.
- 18 Lurje G, Nagashima F, Zhang W *et al.* Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 7884–95.
- 19 Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F *et al.* Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 1427–34.
- 20 Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS *et al.* Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007; **357**: 2040–8.
- 21 Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S *et al.* Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 4914–21.



**2.2.- A genotype-directed phase I–IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer**

British Journal of Cancer 2011; 105: 53-57.

Eugenio Marcuello\*, David Páez\*, Laia Paré, Juliana Salazar, Ana Sebio, Elisabeth del Rio, Montserrat Baiget.

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

\* These authors contributed equally to this work.





**Resumen:**

*Introducción:* La infusión de 5-fluoruracilo y leucovorin (5-FU/LV) en combinación con irinotecán (FOLFIRI) es uno de los esquemas de elección en la primera línea de tratamiento del cáncer colorrectal metastásico (CCRm). El irinotecán se convierte en 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38) mediante una carboxilesterasa y es metabolizado a través de la uridin difosfato glucuronosiltransferasa (UGT1A1). La presencia del alelo UGT1A1\*28 se asocia con un aumento del riesgo a desarrollar toxicidad severa al tratamiento con irinotecán. El presente ensayo clínico fue diseñado para definir la dosis máxima tolerada según el genotipo de UGT1A1. Este trabajo se centra mayoritariamente en los resultados de tolerancia a FOLFIRI en los diferentes niveles de escalada de dosis del tratamiento de primera línea de quimioterapia en CCRm.

*Pacientes y métodos:* Los pacientes con CCRm sometidos a tratamiento de primera línea y elegibles para el tratamiento con FOLFIRI se clasificaron de acuerdo al genotipo de UGT1A1. Un total de 94 pacientes fueron elegibles para la escalada de dosis de irinotecán. La dosis inicial de administración de irinotecán cada dos semanas fue de 180 mg/m<sup>2</sup> para los pacientes con el genotipo \*1/\*1, de 110 mg/m<sup>2</sup> en los \*1/\*28, y de 90 mg/m<sup>2</sup> en los \*28/\*28.

*Resultados:* La dosis de irinotecán fue escalada a 450 mg/m<sup>2</sup> en los pacientes con el genotipo \*1/\*1, a 390 mg/m<sup>2</sup> en los \*1/\*28 y a 150 mg/m<sup>2</sup> en aquellos con genotipo \*28/\*28. La neutropenia y la diarrea fueron las toxicidades grado 3 y 4 más frecuentes.

*Conclusiones:* Nuestros resultados demostraron que la dosis de irinotecán dentro del esquema FOLFIRI, es considerablemente inferior a la dosis que puede ser

## Resultados

tolerada por los pacientes con los genotipos de UGT1A1 \*1/\*1 y \*1/\*28. La dosis máxima tolerable en los pacientes con el genotipo de alto riesgo, UGT1A1 \*28/\*28, es un 30% menor que la dosis estándar actual de de 180 mg/m<sup>2</sup>.

## Full Paper

# A genotype-directed phase I–IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer

E Marcuello<sup>1,4</sup>, D Páez<sup>1,4</sup>, L Paré<sup>2</sup>, J Salazar<sup>2,3</sup>, A Sebio<sup>1</sup>, E del Rio<sup>2</sup> and M Baiget<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup>Medical Oncology, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret 167, Barcelona 08025, Spain; <sup>2</sup>Genetics Departments, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Pare Claret 167, Barcelona 08025, Spain; <sup>3</sup>U-705 CIBERER, Barcelona, Spain

**BACKGROUND:** Infusional fluorouracil/leucovorin (FU/LV) plus irinotecan (FOLFIRI) is one of the standard first-line options for patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). Irinotecan is converted into 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by a carboxylsterase and metabolised through uridine diphosphate glucuronosyl transferase (UGT1A1). The UGT1A1\*28 allele has been associated with the risk of developing severe toxicities. The present trial was designed to define the maximum tolerated dose according to UGT1A1 genotype. This report focuses on the results of tolerance to different escalated doses of FOLFIRI first-line of chemotherapy.

**PATIENTS AND METHODS:** Patients undergoing first-line treatment for mCRC and eligible for treatment with FOLFIRI were classified according to UGT1A1 genotype. A total of 94 patients were eligible for dose escalation of irinotecan. The starting dose of biweekly irinotecan was 180 mg m<sup>-2</sup> for the \*1/\*1, 110 mg m<sup>-2</sup> for the \*1/\*28 and 90 mg m<sup>-2</sup> for the \*28/\*28 genotypes.

**RESULTS:** The dose of irinotecan was escalated to 450 mg m<sup>-2</sup> in patients with the \*1/\*1 genotype, to 390 mg m<sup>-2</sup> in those with the \*1/\*28 genotype and to 150 mg m<sup>-2</sup> in those with the \*28/\*28 genotype. Neutropenia and diarrhoea were the most common grade 3 or 4 toxicities.

**CONCLUSIONS:** Our results demonstrated that the recommended dose of 180 mg m<sup>-2</sup> for irinotecan in FOLFIRI is considerably lower than the dose that can be tolerated for patients with the UGT1A1 \*1/\*1 and \*1/\*28 genotypes. The maximum tolerable dose (MTD) in patients with a high-risk UGT1A1 \*28/\*28 genotype is 30% lower than the standard dose of 180 mg m<sup>-2</sup>.

British Journal of Cancer advance online publication, 7 June 2011; doi:10.1038/bjc.2011.206 www.bjancer.com

© 2011 Cancer Research UK

**Keywords:** irinotecan; colorectal cancer; UGT1A1; pharmacogenetics

Colorectal carcinoma is the third cause of cancer-related mortality in industrialised countries. Although some metastatic disease may benefit from surgical resection, chemotherapy is the prime therapeutic tool in advanced disease, as it aims to palliate symptoms and increase time to disease progression (TTP) as well as overall survival.

In the last 40 years, fluorouracil (FU) has been the most widely used chemotherapeutic agent in the treatment of advanced disease. In the early 1980s, a modulation of FU with folinic acid helped to increase the response rate and lengthen the TTP. Furthermore, the advent of new drugs such as irinotecan and oxaliplatin in different combinations with fluoropyrimidines has improved outcome in many patients (Douillard *et al*, 2000; Saltz *et al*, 2000; Köhne *et al*, 2005; Saunders and Iveson, 2006). This scenario has improved even more with the recent introduction of new biological drugs

such as bevacizumab or cetuximab in the treatment schemes (Hurwitz *et al*, 2004; Van Cutsem *et al*, 2009).

Infusional FU/leucovorin (LV) plus irinotecan (FOLFIRI) is one of the standard first-line options for patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). The recommended dose for irinotecan in combination with FU in first-line chemotherapy is 180 mg m<sup>-2</sup> every 2 weeks (Ducieux *et al*, 1999; Tournigand *et al*, 2004), and a phase-II trial reported a high response rate using 260 mg m<sup>-2</sup> every 2 weeks with a median TTP of 8 to 10 months and median survival of 22 months (Duffour *et al*, 2002). When doses of irinotecan were increased, the most frequent side effects were myelotoxicity and diarrhoea.

Irinotecan is converted into 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by a carboxylsterase, and finally metabolised through uridine diphosphate glucuronosyl transferase enzyme (UGT), predominantly by UGT1A1 isoenzyme. UGT1A1 is a polymorphic enzyme. The number of TA repeats (5, 6, 7 or 8) in the TATA box of the UGT1A1 promoter region is inversely correlated with the gene transcription efficiency and overall enzyme activity. The presence of seven repeats (TA<sub>7</sub>) results in the variant allele UGT1A1\*28 compared with the normal genotype of six TA repeats (UGT1A1\*1). This polymorphism has been related to

\*Correspondence: Dr M Baiget; E-mail: mbaiget@santpau.cat

<sup>4</sup> These authors contributed equally to this work.

Received 17 February 2011; revised 27 April 2011; accepted 12 May 2011

myelosuppression and severe diarrhoeic toxicity in UGT1A1\*28/\*28 and UGT1A1\*1/\*28 genotypes (Ando *et al*, 2000; Innocenti *et al*, 2004; Marcuello *et al*, 2004; Rouits *et al*, 2004; Toffoli *et al*, 2006; Hoskins *et al*, 2007; Kim and Innocenti, 2007). Individualising doses according to UGT1A1 genotype has been proposed to optimise treatment efficacy and tolerance. The present trial was designed to define the maximum tolerated dose (MTD) according to UGT1A1 genotype. We report the results of tolerance to different escalated doses of irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFIRI) in first-line chemotherapy.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

A total of 94 patients receiving the FOLFIRI regimen were included in the study. Eligibility criteria included histologically proven mCRC or a locally advanced recurrence after surgery, age  $\geq 18$  years, an Eastern cooperative oncology group (ECOG) performance status of 0 to 2, life expectancy of more than 3 months and adequate bone marrow function (haemoglobin  $\geq 10$  g dl<sup>-1</sup>, neutrophil count  $\geq 1500$   $\mu$ l<sup>-1</sup> and platelet count  $\geq 100\,000$   $\mu$ l<sup>-1</sup>), renal function (creatinine clearance more than 60 ml min<sup>-1</sup>) and liver function (serum creatinine and bilirubin  $< 1.5 \times$  the upper limit of normal and AST and ALT  $\leq 2.5 \times$  the upper limit of normal). The exclusion criteria were ECOG  $> 2$ , apparent jaundice or severe comorbidities. Analysis of the UGT1A1 genotype was mandatory for inclusion in this trial.

Before starting the treatment, complete medical history, physical examination, complete analytical studies including blood counts, liver and renal function, ionogram, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase, CEA determination and chest, abdomen and pelvic computed tomography scan were performed in all patients. Patients were classified according to the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) clinical model validated by Köhne *et al* (2002). Follow-up was conducted throughout the treatment period until disease progression or death. Responses and progression were evaluated every 12 weeks using Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST). Time to disease progression was assessed from inclusion until disease progression was evident. Toxicity was assessed at every visit using the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria version 3.0. Written informed consent was obtained and the study was approved by the Institutional Ethics Committee and by the Spanish Agency for Medicines and Medical Devices (N<sup>o</sup> EudraCT '2007-006788-65').

### Study design and dose escalation

The primary end-point was assessment of the MTD of irinotecan and dose-limiting toxicity (DLT) at cycle 1. Secondary end-points included the objective response rate and TTP.

Patients were treated with the FOLFIRI scheme. The dose of irinotecan, administered as a 2-h intravenous (i.v.) infusion on day 1, was escalated at different levels according to UGT1A1 genotype. The starting dose of irinotecan was 180 in \*1/\*1 patients; 110 in \*1/\*28 and 90 in \*28/\*28.

Leucovorin was administered as a 200 mg m<sup>-2</sup> in 2 h of i.v. infusion during irinotecan infusion followed by 5-FU at 400 mg m<sup>-2</sup> bolus injection, and 5-FU 600 mg m<sup>-2</sup> in 22 h infusion on days 1 and 2 (Douillard *et al*, 2000). Treatment was repeated every 14 days, if blood counts were adequate. One cycle of treatment consisted of two courses of chemotherapy in 28 days. A complete analytical study was carried out every 7 days during the first cycle.

Dose-limiting toxicity was defined when haematologic grade 4 toxicity, or non-haematologic grade 3–4 toxicities appeared

during cycle 1 and persisted despite supportive measures (including antiemetics or anti-diarrhoeal agents). Any kind of toxicity that caused hospitalisation or a delay of more than 2 weeks in the treatment administration was considered a DLT. Three patients were scheduled at each dose level. If no toxicity was detected, three new patients were treated with the following dose level. When one patient presented DLT, three new patients received that dose level, and if only one patient had DLT, the following patients were treated with the higher dose level. If two out of three or two out of six patients experienced DLT, the level below was considered MTD. Patients with DLT continued with a 20% dose reduction in the following cycles. Colony-stimulating granulocyte factor (FEC-G) was allowed in patients with grade 3–4 neutropenia.

### UGT1A1 genotyping assay

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes by the salting-out procedure (Miller *et al*, 1989). The TA index of the UGT1A1 promoter was genotyped by fragment sizing. Polymerase chain reaction was performed in a total volume of 25  $\mu$ l containing template DNA (80 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), according to Monaghan *et al* (1996). The primers used were a forward primer that was modified by the addition of a 5' fluorescent-labelled FAM and an unlabelled reverse primer (UGT-FAM\_F; 5'-GTCACGTGACACAGTCAAA C-3', UGT\_R 5'-TTTGCTCTGCCAGAGTTT-3'). The PCR product (TA\*1, 98 bp; TA\*28, 100 bp), the internal size standard and Hi-Di formamide (GeneScan 500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were mixed. The samples were then run in the ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Fragment sizes were determined by comparison with the internal standard GeneScan 500 using the local Southern algorithm and analysed by GeneMapper software version 3.5 (Applied Biosystems).

Normal, heterozygous and homozygous sequenced samples were included on every run as a quality control. Genotypes were assigned based on the number of TA repeats in each allele (i.e., TA\*1/\*1, TA\*1/TA\*28 and TA\*28/TA\*28).

### Statistics

Differences between categorical variables were measured by the  $\chi^2$ -test. The Mann–Whitney test was used for comparisons between responses in UGT1A1 genotype and dose. To ascertain the effect of irinotecan dose and the UGT1A1 genotype on response rate, a logistic regression was used as a multivariate method after adjustment for other relevant clinical variables. Time to disease progression was assessed by the Kaplan–Meier method and log-rank test for comparisons. Results were considered statistically significant when *P*-values were less than 0.05.

## RESULTS

### Patient characteristics

From July 2005 to December 2010, 94 white mCRC or patients with a locally advanced recurrence after surgery were included. Median age at the time of diagnosis was 63 years old. Their characteristics and UGT1A1 genotypes are shown in Table 1.

### Dose escalation, toxicities and DLT

The dose of irinotecan was escalated from 180 to 450 mg m<sup>-2</sup> in \*1/\*1 patients; from 110 to 390 mg m<sup>-2</sup> in \*1/\*28 and from 90 to 150 mg m<sup>-2</sup> in \*28/\*28 (Table 2).

Table 3 summarises the total number of patients included at each dose level of irinotecan together with the number of cases with DLT.

In the group with the \*1/\*1 genotype after two patients presented DLT (grade 3 diarrhoea at 220 mg m<sup>-2</sup> and grade 3 asthenia at 260 mg m<sup>-2</sup>), six additional patients were treated with 260 mg m<sup>-2</sup> and no DLT was observed. No patient presented a DLT in the 300 mg m<sup>-2</sup> level. In the next level of doses (340 mg m<sup>-2</sup>), one out of six patients developed a DLT (grade 4 asthenia and grade 3 urinary tract infection plus fever causing hospitalisation).

**Table 1** Patients characteristics

	No. of patients	Percentage
Sex		
Male	57	61
Female	37	39
Age median, years	63	
Range	33–80	
ECOG		
0.1	87	93
2	7	7
Risk group		
Low	58	62
Intermediate	26	28
High	10	10
Primary tumour		
Colon	60	64
Rectal	34	36
No of metastatic sites		
1	63	67
≥2	31	33
Assessable		
For safety	94	
For efficacy	56	
UGT1A1 gene		
*1/*1	42	45
*1/*28	38	40
*28/*28	14	15

Abbreviation: ECOG = Eastern cooperative oncology group.

One out of six had a DLT (prolonged grade 4 asthenia and grade 3 neutropenia) at 390 mg m<sup>-2</sup>. One further patient at 390 mg m<sup>-2</sup> level treated with only one dose of irinotecan was withdrawn because of a protocol violation. Finally, two out of five patients presented a DLT at 450 mg m<sup>-2</sup>. One patient presented grade 3 diarrhoea and vomiting plus a secondary grade 4 asthenia causing severe dehydration requiring intravenous fluids and hospitalisation. The other case of DLT at 450 mg m<sup>-2</sup> consisted of grade 3 diarrhoea and asthenia. Therefore, the MTD in the group of patients with a \*1/\*1 genotype was 390 mg m<sup>-2</sup> (Table 3).

In the group with a \*1/\*28 genotype no DLT was observed in the patients treated with less than 300 mg m<sup>-2</sup>. One patient presented a grade 4 neutropenia at 300 mg m<sup>-2</sup> and one patient presented a grade 3 diarrhoea and asthenia at 340 mg m<sup>-2</sup> level with catheter-related sepsis by *Staphylococcus aureus* requiring intravenous antibiotics and hospitalisation. This dose was the MTD in the \*1/\*28 genotype patients because the two first patients treated with a dose of 390 mg m<sup>-2</sup> experienced a DLT (grade 3 asthenia and persistent grade 3 neutropenia, respectively) (Table 3).

In the \*28/\*28 genotype only one of six patients presented a DLT (grade 3 diarrhoea) at 90 mg m<sup>-2</sup>. No patient presented a DLT at the 130 mg m<sup>-2</sup> level. As two of five patients at 150 mg m<sup>-2</sup> developed a DLT, the MTD was established at 130 mg m<sup>-2</sup>. One patient presented grade 4 neutropenia and grade 3 asthenia and the other presented grade 3 asthenia and grade 3 constipation with intestinal subocclusion (Table 3).

Among all grade 3–4 toxicities, the most frequent severe haematological toxicity during cycle 1 was grade 3–4 neutropenia

**Table 2** Irinotecan dose escalation according to the UGT1A1 genotype

	Irinotecan dose (mg m <sup>-2</sup> ) *1/*1	Irinotecan dose (mg m <sup>-2</sup> ) *1/*28	Irinotecan dose (mg m <sup>-2</sup> ) *28/*28
Level 1	180	110	90
Level 2	220	125	130
Level 3	260	150	150
Level 4	300	180	—
Level 5	340	220	—
Level 6	390	260	—
Level 7	450	300	—
Level 8	—	340	—
Level 9	—	390	—

**Table 3** Dose escalation and DLT of increased Irinotecan doses in patients treated with FOLFIRI in \*1/\*1, \*1/\*28 and \*28/\*28 patients

Irinotecan Dose (mg m <sup>-2</sup> )	No. of patients with *1/*1	No. of patients with DLT	Type of DLT	No. of patients with *1/*28	No. of patients with DLT	Type of DLT	No. of patients with *28/*28	No. of patients with DLT	Type of DLT
90	—	—	—	—	—	—	6	1	Grade 3 diarrhoea
110	—	—	—	3	0	—	—	—	—
125–130	—	—	—	3	0	—	3	0	Grade 3 asthenia
150	—	—	—	3	0	—	5	2	Grade 4 neutropenia. Grade 3 asthenia and constipation
180	3	0	—	9 <sup>a</sup>	0	—	—	—	—
220	6	1	Grade 3 diarrhoea and nausea	3	0	—	—	—	—
260	12 <sup>a</sup>	1	Grade 3 asthenia	3	0	—	—	—	—
300	3	0	—	6	1	Grade 4 neutropenia	—	—	—
340	6	1	Grade 4 asthenia. Urinary tract infection	6	1	Grade 3 diarrhoea. Sepsis by <i>Staph aureus</i>	—	—	—
390	6	1	Grade 4 asthenia	2	2	Grade 3 neutropenia	—	—	—
450	5	2	Grade 3 diarrhoea, vomiting and grade 4 asthenia. Grade 3 diarrhoea and asthenia	—	—	Grade 3 asthenia	—	—	—

Abbreviation: DLT = dose-limiting toxicity. <sup>a</sup>Six additional patients.

(25%). Grade 3–4 asthenia was the most common non-haematological toxicity (18%). Others severe toxicities were grade 3 diarrhoea (10%), infection without neutropenia (4%), nausea/vomiting (4%) and mucositis (1%). The different grade 3 to 4 toxicities according to the UGT1A1 genotype (including DLT and non-DLT) are summarised in Table 4.

### Effect of irinotecan dose on tumour response and survival

In all, 56 patients were assessable for tumour response. The overall response rate (ORR = complete plus partial response) was 46% ( $n = 25$ ). The ORR was 60% in patients with  $*1/*1$  genotype, 39% in those with  $*1/*28$  genotype and 13% in  $*28/*28$  ( $P = 0.049$ ).

To evaluate the relation between irinotecan dose and response rate, we grouped patients into two cohorts according to the median dose of irinotecan: 27 patients treated with  $\geq 260 \text{ mg m}^{-2}$  and 29 patients treated with a  $< 260 \text{ mg m}^{-2}$ . A statistically significant relationship between irinotecan dose and response rate was observed ( $U$ -test, Mann–Whitney;  $P = 0.023$ ). In all, 67% of patients treated with  $\geq 260 \text{ mg m}^{-2}$  of irinotecan achieved a complete or partial response in comparison with only 24% of patients treated with  $< 260 \text{ mg m}^{-2}$  ( $P = 0.001$ ) (Table 5). In the logistic regression analysis only a  $\geq 260 \text{ mg m}^{-2}$  irinotecan dose independently predicted the probability of response to FOLFIRI (odds ratio (OR) = 5.71; CI 95%: 1.76–18.51,  $P = 0.004$ ). The dose level was also associated with a better response rate in the logistic regression analysis ( $P = 0.02$ ).

Median follow-up time was 13 months (range, 1–57 months). Median TTP was 10 months (range, 8–12 months). There were no differences in TTP according to the genotype ( $P = 0.58$ ). Median TTP was higher in patients treated with  $\geq 260 \text{ mg m}^{-2}$  of

irinotecan (16 months) than in patients treated with  $< 260 \text{ mg m}^{-2}$  of irinotecan (7 months) ( $P = 0.003$ ).

In patients with assessable tumour response, a higher TTP was observed in those who achieved a complete or partial response (11 months) than in those with stable disease (10 months) or progressive disease (2.7 months;  $P < 0.001$ ) after FOLFIRI treatment. The Cox regression model included the UGT1A1 genotype, ECOG, sex, age, clinical-risk EORTC classification and primary tumour localisation. The risk-group classification ( $P = 0.003$ ; HR = 1.95; CI 95%: 1.25–3.01) and a  $\geq 260 \text{ mg m}^{-2}$  irinotecan dose ( $P = 0.003$ ; HR = 2.9; CI 95%: 1.43–5.88) were independent predictors of TTP after adjustment for the other clinically relevant variables.

### DISCUSSION

This study evaluated the DLT and MTD of irinotecan in the FOLFIRI regimen in first-line chemotherapy in mCRC according to UGT1A1 genotype. In this dose-escalating trial, we establish that the standard dose of  $180 \text{ mg m}^{-2}$  for irinotecan is significantly lower than the dose that can be tolerated by patients with a UGT1A1  $*1/*1$  or  $*1/*28$  genotype. A dose escalation was evaluated for the first time in patients with a high-risk UGT1A1  $*28/*28$  genotype, and we demonstrated that the MTD was 30% lower than the standard dose of  $180 \text{ mg m}^{-2}$ . Although results of tumour response are exploratory, with this dose ( $130 \text{ mg m}^{-2}$ ), irinotecan was poorly effective and a more active chemotherapeutic regimen should be considered for this group of patients.

This dose escalation trial of irinotecan in patients with UGT1A1  $*1/*1$  and  $*1/*28$  genotypes led us to establish that 390 and  $340 \text{ mg m}^{-2}$ , respectively, can be safely administered every 2 weeks (MTD) in mCRC patients undergoing first-line treatment with the FOLFIRI regimen. Though slightly higher, these doses, are very similar to those reported in a recent phase I study of irinotecan administered in the FOLFIRI regimen in Italian patients with mCRC:  $370 \text{ mg m}^{-2}$  for patients with UGT1A1  $*1/*1$  genotype, and  $310 \text{ mg m}^{-2}$  for those with a  $*1/*28$  genotype. These authors identified these doses as safe to administer when mCRC patients were stratified according to the UGT1A1 genotype, and patients genetically at risk for toxicity ( $*28/*28$ ) were excluded (Toffoli *et al*, 2010). One limitation of our study compared with this work is that a pharmacokinetics analysis was not carried out to describe the effect of different irinotecan doses on patient's drug exposure.

In Japan, the health authorities have approved a two-weekly dose of  $150 \text{ mg m}^{-2}$  for irinotecan monotherapy. A phase I/II study determined the recommended dose of FOLFIRI for patients with mCRC without the UGT1A1  $*28/*28$  genotype. Although the MTD was not reached, the conclusions favoured an increase in the irinotecan dose for patients without the  $*28$  allele to  $180 \text{ mg m}^{-2}$  (Yamashita *et al*, 2011). In this same population, a phase I study of irinotecan and doxifluridine (5'-DFUR) for mCRC patients without UGT1A1  $*28/*28$  genotype concluded that the recommended doses of biweekly irinotecan were  $150 \text{ mg m}^{-2}$  for patients with the UGT1A1  $*1/*1$  genotype and  $70 \text{ mg m}^{-2}$  for those with the  $*1/*28$  genotype (Hazama *et al*, 2010). However, a recent Japanese study concluded that no significant differences in the efficacy or toxicity of FOLFIRI between patients with UGT1A1  $*1/*1$  genotype and those with UGT1A1  $*1/*6$  or  $*1/*28$  genotype, when irinotecan dose is  $180 \text{ mg m}^{-2}$  (Sunakawa *et al*, 2010). This suggest that when UGT1A1  $*28/*28$  genotype is excluded, the dose of irinotecan is more relevant than the genotype.

In Caucasian populations, in Italy and Spain, the recommended doses in the phase I studies carried out to date are higher than those in the Japanese trials. These differences may perhaps be attributed to the ethnic differences in UGT1A1 genotypes and/or differences in the therapeutic regimens used. Other combinations with irinotecan that differ from the standard FOLFIRI regimen,

**Table 4** First cycle grade 3/4 toxicities (including DLT and non-DLT)

Toxicity	Genotype		
	$*1/*1$ $n = 41$ $n$ (%)	$*1/*28$ $n = 38$ $n$ (%)	$*28/*28$ $n = 14$ $n$ (%)
Diarrhoea	4 (10)	2 (5)	3 (21)
Nausea/vomiting	2 (5)	2 (5)	0 (–)
Asthenia	10 (24)	4 (11)	3 (21)
Mucositis/stomatitis	1 (2)	0 (–)	0 (–)
Anorexia	0 (–)	0 (–)	0 (–)
Infection without concomitant grade III–IV neutropenia	2 (5)	0 (–)	1 (7)
Anaemia	0 (–)	0 (–)	0 (–)
Neutropenia	9 (22)	10 (26)	4 (29)
Thrombocytopenia	0 (–)	0 (–)	0 (–)
Fever with concomitant neutropenia	0 (–)	0 (–)	0 (–)

Abbreviation: DLT = dose-limiting toxicity.

**Table 5** Response rate: effect of irinotecan dose and UGT1A1 genotype

Response	$n$	$n$	CR+PR			SD+PD			$P$	
			Percentage	CR	PR	$n$	%	SD		PD
Overall	56	25	46	4	21	31	54	22	9	
$*1/*1$	25	15	60	1	14	10	40	7	3	0.049
$*1/*28$	23	9	39	3	6	14	61	8	4	
$*28/*28$	8	1	13	–	1	7	87	5	2	
$\geq 260 \text{ mg m}^{-2}$	27	18	67	2	16	9	33	8	1	0.001
$< 260 \text{ mg m}^{-2}$	29	7	24	2	5	22	76	14	8	

Abbreviations: CR = complete response; PD = progressive disease; PR = partial response; SD = stable disease.



include those using biological agents, should be explored before making any conclusions.

Our present results also show that a dose  $\geq 260 \text{ mg m}^{-2}$  is an independent predictor of a better response and higher TTP in mCRC patients without the risk genotype (\*28/\*28). We therefore suggest that in future phase II and phase III studies, the initial dose of irinotecan in FOLFIRI regimen should be at least  $260 \text{ mg m}^{-2}$  in Caucasian patients who have either the \*1/\*1 or \*1/\*28 UGT1A1 genotype.

Finally, we suggest that as the MTD in patients with a high-risk UGT1A1 \*28/\*28 genotype ( $130 \text{ mg m}^{-2}$ ) is ineffective, other more

active chemotherapeutic regimen should be considered for these patients.

## ACKNOWLEDGEMENTS

DP is the recipient of a fellowship from the Instituto de Salud Carlos III (CM08/00065). This study was sponsored by Instituto de Salud Carlos III (ECO7/90232 Principal Investigator: Dr E Marcuello). We thank Carolyn Newey for English language editing.

## REFERENCES

- Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K, Hasegawa Y (2000) Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* **60**: 6921–6926
- Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P (2000) Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: A multicentre randomised trial. *Lancet* **355**: 1041–1047
- Ducieux M, Ychou M, Seitz JF, Bonnay M, Bexon A, Armand JP, Mahjoubi M, Méry-Mignard D, Rougier P (1999) Irinotecan combined with bolus fluorouracil, continuous infusion fluorouracil, and high-dose leucovorin every two weeks (LV5FU2 regimen): A clinical dose-finding and pharmacokinetic study in patients with pretreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **17**: 2901–2908
- Duffour J, Gourgou S, Desseigne F, Debrigode C, Mineur L, Pinguet F, Poujol S, Chalbos P, Bressole F, Ychou M (2002) Multicentre phase II study using increasing doses of irinotecan combined with a simplified LV5FU2 regimen in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **50**: 383–391
- Hazama S, Nagashima A, Kondo H, Yoshida S, Shimizu R, Araki A, Yoshino S, Okayama N, Hinoda Y, Oka M (2010) Phase I study of irinotecan and doxifluridine for metastatic colorectal cancer focusing on the UGT1A1\*28 polymorphism. *Cancer Sci* **101**: 722–727
- Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL (2007) UGT1A1\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst* **99**: 1290–1295
- 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* **350**: 2335–2342
- Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramirez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ (2004) Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* **22**: 1382–1388
- Kim TW, Innocenti F (2007) Insights, challenges, and future directions in irinotecan. *Ther Drug Monit* **29**: 265–270
- Köhne CH, Cunningham D, Di CF, Glimelius B, Blijham G, Aranda E, Scheithauer W, Rougier P, Palmer M, Wils J, Baron B, Pignatti F, Schöffski P, Michel 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
- Köhne CH, van Cutsem E, Wils J, Bokemeyer C, El-Serafi M, Lutz MP, Lorenz M, Reichardt P, Rüdke-Lanz H, Frickhofen N, Fuchs R, Mergenthaler HG, Langenbuch T, Vanhoefer U, Rougier P, Voigtmann R, Müller L, Genicot B, Anak O, Nordlinger B (2005) Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J Clin Oncol* **23**: 4856–4865
- Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Del Rio E, Gómez-Pardo M, Baiget M (2004) UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* **91**: 678–682
- Miller SA, Dykes DD, Polesky H (1989) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215
- Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B (1996) Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* **347**: 578–581
- Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, Guérin O, Morel A, Gamelin E (2004) Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. *Clin Cancer Res* **10**: 5151–5159
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirotta N, Elfring GL, Miller LL (2000) Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* **343**: 905–914
- Saunders M, Iveson T (2006) Management of advanced colorectal cancer: state of the art. *Br J Cancer* **95**: 131–138
- Sunakawa Y, Ichikawa W, Fujita KI, Nagashima F, Ishida H, Yamashita K, Mizuno K, Miwa K, Kawara K, Akiyama Y, Araki K, Yamamoto W, Miya T, Narabayashi M, Ando Y, Hirose T, Saji S, Sasaki Y (2010) UGT1A1\*1/\*28 and \*1/\*6 genotypes have no effects on the efficacy and toxicity of FOLFIRI in Japanese patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*; doi:10.1007/s00280-010-1485-8
- Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Russo A, Buonadonna A, D'Andrea M, Pasetto LM, Pessa S, Errante D, De Pangher V, Giusto M, Medici M, Gaion F, Sandri P, Galligioni E, Bonura S, Boccalon M, Biason P, Frustaci S (2006) The role of UGT1A1\*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **24**: 3061–3068
- Toffoli G, Cecchin E, Gasparini G, D'Andrea M, Azzarello G, Basso U, Mini E, Pessa S, De Mattia E, Lo Re G, Buonadonna A, Nobili S, De Paoli P, Innocenti F (2010) Genotype-driven phase I study of irinotecan administered in combination with fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **28**: 866–871
- Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Coateau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A (2004) FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* **22**: 229–237
- 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**: 1408–1417
- Yamashita K, Nagashima F, Fujita KI, Yamamoto W, Endo H, Miya T, Narabayashi M, Kawara K, Akiyama Y, Ando Y, Ando M, Sasaki Y (2011) Phase I/II Study of FOLFIRI in Japanese Patients with Advanced Colorectal Cancer. *Jpn J Clin Oncol* **41**: 204–209



## **DISCUSIÓN**



## 1. Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado

En los últimos años, se han propuesto diferentes marcadores pronósticos clínicos, tales como el margen circunferencial radial, la supervivencia libre de enfermedad a tres años y la respuesta completa patológica (RCp) para identificar a los pacientes con cáncer de recto con mejores resultados después del tratamiento con quimiorradioterapia preoperatoria. Todos estos factores pronósticos se obtienen después de la cirugía, por lo que existe una clara necesidad de establecer criterios de selección de pacientes previos al tratamiento con el fin de optimizar las diferentes estrategias terapéuticas. Es en este contexto en el que una aproximación farmacogenética al tratamiento del cáncer de recto localmente avanzado resulta de máximo interés. A continuación se discute cada uno de los genes de acuerdo a la información derivada de los estudios farmacogenéticos desarrollados en la presente tesis.

### **El gen de la Timidilato Sintasa (TS)**

En el primer estudio de la presente tesis el genotipo de TS 5'UTR VNTR estudiado en 51 pacientes con cáncer de recto localmente avanzado tratados con quimiorradioterapia con 5-FU o Capecitabina, predice de manera significativa aquellos pacientes que se benefician de dicho tratamiento preoperatorio. El genotipo \*3/\*3 se asociaba con una mayor tasa de respuesta (regresión patológica completa y microfocos residuales de tumor en 61% frente al 22% en aquellos pacientes \*2/\*2 y \*3/\*2;  $p = 0,013$ ). En el análisis multivariado el genotipo \*3/\*3 también fue un factor pronóstico independiente de mejor supervivencia ( $p < 0,05$ ).

## Discusión

En un intento de validar dichos resultados se amplió el número de pacientes (n=128) en el segundo trabajo de la presente tesis. Los resultados obtenidos demostraron que el genotipo \*3/\*3 de la timidilato sintasa se continuaba asociando a una mayor tasa de respuesta, incluso siendo más estrictos con los parámetros que definen una “verdadera” respuesta (respuesta patológica, regresión tumoral y descenso de estadio). Además la mediana de SLP fue de 103 meses para los pacientes \*3/\*3 y de 84 meses para los \*2/\*2 y \*2/\*3, lo que refuerza la validez de nuestros resultados.

Son pocos los estudios que han analizado el papel de la TS en el contexto del cáncer de recto localmente avanzado. La diferente metodología empleada de los mismos y la falta de estudios prospectivos ha dificultado la obtención de conclusiones sólidas y resultados a veces contradictorios. En un estudio pionero en 65 pacientes, se extrajo el ADN a partir de biopsias congeladas obtenidas de la colonoscopia preoperatoria. Los autores demostraron por primera vez que el polimorfismo de TS VNTR en la región promotora del gen podía predecir el descenso de estadio tumoral tras el tratamiento con QT-RT preoperatorio. Los pacientes homocigotos \*3/\*3 presentaron una menor probabilidad de descenso de estadio que los homocigotos \*2/\*2 o heterocigotos \*2/\*3 (22% vs 60%;  $p = 0,036$ ). El descenso de estadio fue además un predictor clínico tanto para el control local como para la supervivencia libre de enfermedad (30% a los 3 años en los pacientes sin descenso de estadio frente a un 88% en aquellos con descenso de estadio tras el tratamiento preoperatorio;  $p = 0,017$ ) (231). En otro estudio, Spindler *et al.* analizaron el genotipo de TS a partir de muestras de sangre de 60 pacientes con cáncer de recto localmente avanzado tratados con radioterapia y quimioterapia concomitante con Uftoral®. Los pacientes con genotipo TS \*2/\*2 tuvieron una tasa significativamente mayor de respuesta completa patológica que aquellos \*2/\*3 ó \*3/\*3 (232). En base a estos trabajos, en el año 2011 se publicaron los resultados de un ensayo clínico fase II no aleatorizado en el que se

estratificaban a los pacientes en dos grupos de riesgo diferentes a presentar respuesta al tratamiento con a 5-FU más RT preoperatoria en función del genotipo de TS: grupo favorable (TS \*2/\*2, \*2/\*3, \*2/\*4) y grupo desfavorable (TS \*3/\*3, \*3/\*4). Los pacientes con un genotipo favorable recibieron un tratamiento con 5-FU más 45 Gy de RT, mientras que en aquellos con genotipo desfavorable se les añadía irinotecán a dicho tratamiento. Las tasas de descenso de estadio tumoral (T-stage downstaging; objetivo primario del estudio), de respuesta completa del tumor ( $\gamma pT0$ ) y de respuesta completa patológica (RCp) fueron de 64,4%, 20% y 18.9% respectivamente en el grupo con genotipo favorable y de 64,5%, 42% y 35,5% en los pacientes con genotipo desfavorable. Los autores concluyeron que personalizar el tratamiento basado en el genotipo de TS permitió obtener buenos resultados en ambos grupos de riesgo (233). Sin embargo, para evaluar el verdadero papel del genotipo de TS y su incorporación en la práctica clínica habitual, sería necesario un ensayo clínico que aleatorice a los pacientes con cada genotipo de TS a recibir un mismo tratamiento.

Por otro lado, los resultados publicados en los últimos años en diferentes estudios que analizaban el genotipo de TS en relación al tratamiento del cáncer de recto no han sido tan evidentes e incluso han reportado resultados contradictorios. Stoehlmacher *et al.* realizaron un estudio genotípico en 40 pacientes con cáncer de recto. Llegaron a la conclusión de que el polimorfismo de delección de 6pb en la región 3' UTR del gen TS podía predecir la regresión tumoral al tratamiento preoperatorio, mientras que los polimorfismos de la región promotora de TS no se asociaban con la regresión tumoral ni con la expresión génica (234). Cecchin *et al.* estudiaron 25 polimorfismos en 16 genes con un papel clave en el metabolismo de las fluoropirimidinas, la radioterapia y la resistencia a múltiples fármacos. No se encontró ninguna asociación entre el genotipo de TS y la tasa de regresión tumoral (235). Balboa *et al.* Estudiaron un panel de marcadores farmacogenéticos en 65 pacientes con cáncer de recto estadios II y III. En el análisis a partir del ADN

de la línea germinal, encontraron una tasa de respuesta significativamente mejor para los pacientes con genotipos TS 5' UTR VNTR con al menos un alelo de alta expresión en comparación con los individuos con dos alelos de baja expresión ( $p=0,022$ ) (236). Más recientemente, y en concordancia con nuestros resultados, se ha reportado una asociación estadísticamente significativa entre una mayor tasa de respuesta patológica y la presencia de un genotipo asociado a una mayor expresión de TS (2R/3G, 3C/3G o 3G/3G) en 93 pacientes con cáncer de recto tratado con QT-RT preoperatoria con 5-FU ( $p=0,02$ ) (237).

Algunas de las posibles explicaciones a los resultados contradictorios en los diferentes estudios publicados con respecto al papel de la farmacogenética de TS en pacientes con cáncer de recto son: el diseño retrospectivo de los estudios, el número relativamente pequeño de pacientes analizados, el origen diferente del ADN analizado (línea germinal o tumoral) y los diferentes regímenes terapéuticos utilizados en los estudios mencionados anteriormente. Son necesarios, por tanto, estudios prospectivos que superen todas estas limitaciones metodológicas para aclarar la verdadera relación entre el genotipo de TS y la respuesta a los tratamientos que contienen fluoropirimidinas en cáncer de recto localmente avanzado.

### **Los genes de reparación del ADN (ERCC1, XRCC1, XPD) y GSTP1**

Entre los polimorfismos analizados en los genes de reparación del ADN se encontró una asociación significativa entre el marcador genético *XRCC1* Arg399Gln y la supervivencia libre de progresión. Los pacientes con genotipo Arg/Arg presentaron una supervivencia libre de progresión mediana de 101 meses frente a los 78 meses en los casos con genotipo heterocigoto y los 31 meses para los pacientes con genotipo Gln/Gln ( $p = 0,048$ ). En la actualidad hay pocos datos



disponibles sobre el papel farmacogenético de estos genes en el tratamiento de pacientes con cáncer rectal. Inicialmente, los estudios farmacogenéticos realizados en pacientes con cáncer colorrectal metastásico tratados con FOLFOX demostraron una asociación significativa con una peor respuesta y una supervivencia más corta en los pacientes portadores de un alelo XRCC1 399Gln (163, 164). Sin embargo, estudios posteriores no pudieron confirmar al polimorfismo XRCC1 Arg399Gln como factor pronóstico (129, 133, 155). En el caso de los pacientes con cáncer rectal, en dos estudios iniciales no se encontró ninguna relación entre este polimorfismo y la respuesta al tratamiento preoperatorio (235, 236). Sin embargo, en una publicación reciente, posterior al trabajo de esta tesis, el estudio del polimorfismo en XRCC1 en 93 pacientes con cáncer de recto tratado con QT-RT preoperatoria con 5-FU concluye que los pacientes con genotipo Arg/Arg tienen una mayor probabilidad de respuesta que aquellos portadores del alelo que codifica para Gln ( $p=0,003$ ) (237). Estos resultados en consonancia con los nuestros, plantean la necesidad de evaluar una estrategia de tratamiento más intensiva en los pacientes portadores del alelo Gln. De forma exploratoria se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo Asn118Asn en el gen *ERCC1* y el margen circunferencial radial (MCR). La importancia pronóstica de recidiva local y supervivencia de este parámetro quirúrgico está bien establecida. En nuestro trabajo se consiguió una tasa de MCR R0 del 87%, lo cual es comparable con los datos reportados en los ensayos clínicos aleatorizados. Aunque se ha demostrado que varios factores pueden afectar al MCR, como el tipo de cirugía y la experiencia del cirujano, es la primera vez que se describe una relación entre el MCR y una variable genética. El significado biológico de esta asociación se desconoce, si bien podría estar relacionado con la hipótesis de que los tumores en pacientes con un genotipo *ERCC1* favorable podrían ser menos agresivos que en aquellos con el genotipo T/T. El crecimiento infiltrativo del tumor y la mejor diferenciación en los pacientes con

un genotipo ERCC1 favorable facilitaría la una mejor resección quirúrgica con mayor tasa de MCR y, por tanto, una supervivencia más alta. En apoyo de esta hipótesis se encontró que un alto porcentaje de pacientes T/T presentaron recurrencia tras la cirugía.

No se encontró ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos XPD Lys751Gln y GSTP1 Ile105Val y la respuesta a la QT-RT, SLP y SG.

### **El gen del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

Inicialmente, Zhang *et al.* reportaron un alto riesgo de recidiva local en aquellos pacientes portadores de un alelo Arg del polimorfismo EGFR Arg497Lys y <20 repeticiones CA en el intrón 1 del gen *EGFR* ( $p=0,005$ ) (238). Spindler *et al.* sugirieron una combinación de marcadores predictivos asociados con una respuesta patológica completa. Se identificó un subgrupo muy pequeño de pacientes con una muy alta tasa de respuesta completa cuando se combinaban los genotipos de la TS y del *EGFR* (232). Una publicación reciente (236) y nuestros resultados no confirman estos hallazgos como evidencia de ninguna relación entre los genotipos de *EGFR* y las tasas de respuesta.

Recientemente se ha reportado un análisis de polimorfismos funcionales en genes relacionados con la vía del EGFR, la angiogénesis, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, la reparación de ADN y metabolismo de fármacos en 130 pacientes con cáncer de recto tratados con QT-RT preoperatoria con cetuximab. Los autores concluyeron que el genotipo del factor de crecimiento epidérmico (EGF) 61 G/G se asociaba a una mayor tasa de respuestas completa patológica, independientemente del estado mutacional de KRAS (239).

En conclusión, nuestros resultados indican que el genotipo de la TS y el polimorfismo XRCC1 Arg399Gln podrían ser de utilidad en la identificación de los pacientes con cáncer de recto, estadio II/III, con mejor pronóstico tras el tratamiento con quimiorradioterapia preoperatoria.

## 2. Estudios farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico

### **Aspectos farmacogenéticos de los agentes diana anti-EGFR**

Aunque el estado mutacional del oncogén *KRAS* es el marcador molecular más relevante de la falta de respuesta a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR, (8, 190, 191) no todos los pacientes *KRAS* wild-type responden a este tipo de fármacos. Además de su función antagonista sobre EGFR, cetuximab y posiblemente panitumumab pueden ejercer efectos antitumorales a través otro mecanismo denominado citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC). A través de este mecanismo, la porción Fc del anticuerpo (Fcγ) interactúa con los receptores Fc (FcγR) expresados en las células efectoras citotóxicas (linfocitos natural killer o macrófagos) y permite la actividad antitumoral a través de la ADCC.

Recientemente se han reportado varios estudios farmacogenéticos con resultados contradictorios en cuanto a la participación de dos polimorfismos genéticos (H131R y V158F) situado en el dominio extracelular de unión al ligando de dos receptores (FcγRIIa y FcγRIIIa, respectivamente) localizados en las células inmunes.

Inicialmente, Zhang *et al.* estudiaron 39 pacientes con CCR metastásico tratados con cetuximab en monoterapia (216). Los pacientes con el alelo FcγRIIa-131H se

asociaban con una mayor SLP que aquellos portadores del alelo FcγRIIa-131R. Además, el análisis combinado de estos dos polimorfismos mostró que los pacientes con genotipo favorable (FcγRIIa, al menos un alelo histidina, y FcγRIIIa, al menos un alelo fenilalanina) presentaban una mediana de SLP de 3,7 meses frente a 1,1 meses ( $p=0,04$ ) en los pacientes con genotipo desfavorable (FcγRIIa arginina/arginina o FcγRIIIa valina/valina). Sin embargo, estos resultados no pudieron replicarse al aumentar la muestra de pacientes a 130, todos ellos pertenecientes a un ensayo clínico multicéntrico fase II (IMC 0144) con cetuximab, dirigido por los mismos autores (210). Del mismo modo, Graziano *et al.* reportaron una falta de asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos FcγRIIa-H131R y FcγRIIIa-V158F en 110 pacientes con CCR metastásico tratados con cetuximab e irinotecán como terapia de rescate (209). Más recientemente, otros autores evaluaron la asociación de los polimorfismos en FcγRIIa y FcγRIIIa polimorfismos y las mutaciones del gen *KRAS* en 69 pacientes tratados con cetuximab más irinotecán. Los pacientes con genotipos FcγRIIa-131H/H y/o FcγRIIIa-158V/V presentaban una SLP superior que aquellos portadores del alelo 131R y 158F (5,5 meses frente a 3,0 meses,  $p = 0,005$ ). Esta diferencia permanecía significativa en los tumores con mutación del gen *KRAS* y en el análisis multivariado (218).

En el trabajo de la presente tesis, la presencia de mutación en *KRAS* se asoció con una menor tasa de respuesta (TR) ( $p=0,035$ ). Sin embargo los polimorfismos FcγRIIa-H131R y FcγRIIIa-V158F no mostraron ninguna relación estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento, la SLP o estado mutacional del gen *KRAS*. En el análisis de regresión logística, la ausencia de mutación en *KRAS* ( $p=0,04$ ) y la toxicidad cutánea ( $p=0,03$ ) se asociaron con la TR. En el análisis multivariado, tanto la clasificación clínica de riesgo definida por Köhne *et al.* ( $p=0,006$ ) como la toxicidad cutánea ( $p= < 0,0001$ ) fueron variables clínicas independientes asociadas con la SLP.

La publicación de presente estudio permitió la participación en un consorcio internacional para analizar las variantes genéticas FcγRIIIa-H131R y FcγRIIIa-V158F como parte del mecanismo de ADCC en pacientes quimiorrefractarios tratados con cetuximab en monoterapia o en combinación con quimioterapia. Los resultados preliminares reportados en congreso anual de 2011 de la American Society of Clinical Oncology (ASCO), que incluía un análisis en 472 pacientes *KRAS* wild-type, no mostraron ninguna correlación con el tratamiento basado en cetuximab (240).

Aunque el escenario ideal para el análisis del mecanismo ADCC sería el tratamiento con cetuximab en monoterapia, podemos concluir que los polimorfismos FcγRIIIa-H131R y FcγRIIIa-V158F no son útiles como marcadores moleculares para predecir el beneficio al tratamiento con anticuerpos contra el EGFR. Nuestros resultados demuestran el valor predictivo de la clasificación clínica de riesgo de la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), la toxicidad cutánea y el estado mutacional de *KRAS*, lo que permite identificar a aquellos pacientes que se beneficiarían del tratamiento anti-EGFR.

### **Aspectos farmacogenéticos del irinotecán**

En este estudio de escalada de dosis, se evaluó la toxicidad limitante de dosis (TLD) y la dosis máxima tolerada (DMT) de irinotecán en el esquema de quimioterapia FOLFIRI de primera línea en CCR metastásico de acuerdo al genotipo de UGT1A1. La dosis de irinotecán fue escalada partiendo de la dosis estándar de 180 mg/m<sup>2</sup> a 450 mg/m<sup>2</sup> en los pacientes con genotipo UGT1A1 \*1/\*1, de 110mg/m<sup>2</sup> a 390mg/m<sup>2</sup> en aquellos con genotipo \*1/\*28 y de 90mg/m<sup>2</sup> a 150mg/m<sup>2</sup> en aquellos con genotipo \*28/\*28. La neutropenia y la diarrea fueron

## Discusión

las toxicidades grado 3 y 4 más frecuentemente presentadas y las responsables de la mayoría de las toxicidades limitantes de dosis.

Los resultados de este ensayo demostraron que:

- La dosis estándar recomendada de irinotecán en el esquema FOLFIRI ( $180\text{mg}/\text{m}^2$ ) es considerablemente inferior a aquella dosis que puede ser tolerada en los pacientes con genotipo UGT1A1  $*1/*1$  y  $*1/*28$ .
- En los pacientes con genotipo  $*1/*1$  la dosis máxima tolerada fue de  $390\text{mg}/\text{m}^2$ .
- En los pacientes con genotipo  $*1/*28$  la dosis máxima tolerada fue de  $340\text{mg}/\text{m}^2$ .
- La dosis máxima tolerada en los pacientes de alto riesgo de toxicidad (UGT1A1  $*28/*28$ ) es un 30% inferior a la dosis estándar de  $180\text{mg}/\text{m}^2$  recomendada en la ficha técnica del fármaco.

En un análisis exploratorio secundario de la respuesta al tratamiento con FOLFIRI en 56 pacientes incluidos en este ensayo se comprobó que la tasa de respuesta global (respuesta completa más respuesta parcial) fue del 60% en los pacientes con genotipo  $*1/*1$ , del 39% en aquellos con genotipo  $*1/*28$  y de tan solo un 13% en los  $*28/*28$  ( $p=0,049$ ). Para evaluar la verdadera relación entre la dosis de irinotecán y la tasa de respuesta, los pacientes fueron agrupados en dos grupos de acuerdo a la dosis mediana de irinotecán administrada en todos los pacientes incluidos en el ensayo: 27 pacientes tratados con una dosis  $\geq 260\text{ mg}/\text{m}^2$  y 29 pacientes tratados con  $< 260\text{ mg}/\text{m}^2$ . De esta forma se obtuvo una relación estadísticamente significativa entre la dosis de irinotecán y la tasa de respuestas (U-test, Mann–Whitney;  $P<0,023$ ). Aquellos pacientes tratados con  $\geq 260\text{ mg}/\text{m}^2$  obtuvieron un 67% de respuestas completas o parciales en comparación con el 24% de los que recibieron una dosis  $< 260\text{ mg}/\text{m}^2$ . Además, el análisis de regresión logística confirma que una dosis de irinotecán  $\geq 260\text{ mg}/\text{m}^2$  predice de forma independiente la posibilidad de responder a irinotecán en el esquema FOLFIRI.

Las DMT en nuestro trabajo son muy similares a las reportadas recientemente por Toffoli *et al.* en un ensayo fase I de irinotecán para pacientes con CCR metastásico tratados con el esquema FOLFIRI: 370 mg/m<sup>2</sup> en pacientes con genotipo UGT1A1 \*1/\*1 y 310 mg/m<sup>2</sup> en pacientes con genotipo \*1/\*28(241). A diferencia de nuestro estudio los pacientes con alto riesgo de presentar toxicidad (UGT1A1 \*28/\*28) fueron excluidos. Una de las limitaciones de nuestro trabajo en comparación con el ensayo italiano es que no se llevó a cabo un análisis farmacocinético para describir el efecto de las diferentes dosis de irinotecán sobre los pacientes tratados. Estos autores concluyen que la farmacocinética del irinotecán y su metabolito SN-38 es de tipo lineal y que la dosis estándar de 180mg/m<sup>2</sup> es inferior a la que podrían tolerar los pacientes si se excluyen aquellos con genotipo \*28/\*28. Por tanto, la dosis de irinotecán es más relevante en términos de eficacia que el genotipo UGT1A1 y sugerimos considerar una dosis de al menos 260 mg/m<sup>2</sup> en el diseño de futuros ensayos clínicos fase II y III con el esquema FOLFIRI en pacientes con genotipo UGT1A1 \*1/\*1 y \*1/\*28. Por el contrario, la DMT en pacientes con genotipo UGT1A1 \*28/\*28 es poco eficaz y se deberían emplear otros esquemas de tratamiento más activos en este subgrupo de pacientes.





## **CONCLUSIONES**



En cuanto a la asociación y utilidad de diferentes marcadores farmacogenéticos en relación a la respuesta y/o supervivencia de pacientes con cáncer de recto localmente avanzado tratados con quimiorradioterapia preoperatoria basada en fluoropirimidinas, las conclusiones de la presente tesis son:

1. El genotipo de la región promotora del gen de la TS (TS 5'UTR VNTR) es de utilidad en la identificación de los pacientes con cáncer de recto, estadio II/III, que se benefician de un tratamiento de quimiorradioterapia preoperatoria basado en fluoropirimidinas.
2. Existe una relación estadísticamente significativa entre el genotipo Arg399Gln del gen XRCC1 y la supervivencia libre de progresión tras el tratamiento con quimiorradioterapia preoperatoria basada en fluoropirimidinas.
3. No se ha evidenciado ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos de ERCC1 Asn118Asn, 8092C>A, 19716G>C, XPD Lys751Gln, GSTP1 Ile105Val y EGFR Arg497Lys y la respuesta a la QT-RT, SLP y SG

## Conclusiones

En cuanto a la asociación y utilidad de las variantes farmacogenéticas FcγRIIa-H131R y FcγRIIIa-V158F, involucradas en el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), en relación al estado mutacional de *KRAS*, la respuesta y/o supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal avanzado refractarios a una primera línea de quimioterapia y tratados con un esquema anti-EGFR

1. Los polimorfismos FcγRIIa-H131R y FcγRIIIa-V158F no son útiles como marcadores moleculares para predecir el beneficio al tratamiento con anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
2. La clasificación clínica de riesgo de la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), la toxicidad cutánea y el estado mutacional de *KRAS*, permiten identificar a los pacientes que se benefician del tratamiento anti-EGFR.

En cuanto al ensayo clínico fase I-IV de búsqueda de la dosis de irinotecán en el esquema estándar de quimioterapia de primera línea FOLFIRI en CCR avanzado en función del genotipo del gen *UGT1A1*.

1. La neutropenia y la diarrea fueron las toxicidades grado 3 y 4 que se presentaron con mayor frecuencia y fueron las responsables de la mayoría de las toxicidades limitantes de dosis.
2. La dosis estándar recomendada de irinotecán en el esquema FOLFIRI ( $180\text{mg}/\text{m}^2$ ) es considerablemente inferior a aquella dosis que puede ser tolerada en los pacientes con genotipo *UGT1A1* \*1/\*1 y \*1/\*28.
  - En los pacientes con genotipo \*1/\*1 la dosis máxima tolerada fue de  $390\text{mg}/\text{m}^2$ .
  - En los pacientes con genotipo \*1/\*28 la dosis máxima tolerada fue de  $340\text{mg}/\text{m}^2$ .
3. La dosis máxima tolerada en los pacientes de alto riesgo de toxicidad (*UGT1A1* \*28/\*28) es un 30% inferior a la dosis estándar de  $180\text{mg}/\text{m}^2$  recomendada en la ficha técnica del fármaco.
4. Parece existir una relación entre la dosis de irinotecán y la eficacia al tratamiento de primera línea con el esquema FOLFIRI en CCR metastásico.



## **BIBLIOGRAFÍA**





1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61: 69-90.
2. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, *et al.* Colorectal cancer. *Lancet* 2010;375: 1030-47.
3. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, *et al.* Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008;26: 2013-9.
4. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, *et al.* Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007;357: 2040-8.
5. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, *et al.* Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25: 1658-64.
6. Rosell R, Moran T, Queralt C, *et al.* Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361: 958-67.
7. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361: 947-57.
8. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, *et al.* American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009;27: 2091-6.
9. McWhinney SR, McLeod HL. Using germline genotype in cancer pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics* 2009;10: 489-93.
10. International Agency for Research on Cancer (IARC). [cited; Available from: <http://www.iarc.fr/>]
11. DeVita V, Jr., Hellman, S and Rosenberg, SA. . *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th Edition ed: Lippincott-Raven; 2008.

## Bibliografia

12. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348: 919-32.
13. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61: 759-67.
14. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363: 558-61.
15. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, *et al.* Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 2006;9: 199-207.
16. Bedeir A, Krasinskas AM. Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135: 578-87.
17. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303: 1483-7.
18. Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res* 2010;16: 3153-62.
19. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, *et al.* APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359: 235-7.
20. Lamlum H, Papadopoulou A, Ilyas M, *et al.* APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97: 2225-8.
21. Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, *et al.* The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med* 1999;5: 1071-5.
22. Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6: 44-55.

23. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, *et al.* Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268: 1336-8.
24. Tarafa G, Villanueva A, Farre L, *et al.* DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. *Oncogene* 2000;19: 546-55.
25. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1: 169-78.
26. Esteller M, Tortola S, Toyota M, *et al.* Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000;60: 129-33.
27. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366: 704-7.
28. Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res* 1988;195: 255-71.
29. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418: 934.
30. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 489-501.
31. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304: 554.
32. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, *et al.* Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res* 2004;64: 3014-21.
33. De Jong AE, Morreau H, Van Puijnenbroek M, *et al.* The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology* 2004;126: 42-8.

## Bibliografia

34. Esteller M, Fraga MF, Guo M, *et al.* DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001;10: 3001-7.
35. Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124: 1016-25.
36. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139: 846-52.
37. Edge SB BD, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC: Colon and rectum. AJCC Cancer staging manual. 7th Edition ed: New York, NY: Springer; 2010.*
38. Siddiqui AA, Fayiga Y, Huerta S. The role of endoscopic ultrasound in the evaluation of rectal cancer. *Int Semin Surg Oncol* 2006;3: 36.
39. Schmidt CR, Gollub MJ, Weiser MR. Contemporary imaging for colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2007;16: 369-88.
40. Zammit M, Jenkins JT, Urie A, O'Dwyer PJ, Molloy RG. A technically difficult endorectal ultrasound is more likely to be inaccurate. *Colorectal Dis* 2005;7: 486-91.
41. Lahaye MJ, Engelen SM, Nelemans PJ, *et al.* Imaging for predicting the risk factors--the circumferential resection margin and nodal disease--of local recurrence in rectal cancer: a meta-analysis. *Semin Ultrasound CT MR* 2005;26: 259-68.
42. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer* 1986;57: 1866-70.
43. Filella X, Molina R, Grau JJ, *et al.* Prognostic value of CA 19.9 levels in colorectal cancer. *Ann Surg* 1992;216: 55-9.

44. Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Ann Surg Oncol* 2003;10: 65-71.
45. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, *et al.* Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol* 2003;21: 2912-9.
46. Tepper JE, O'Connell MJ, Niedzwiecki D, *et al.* Impact of number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19: 157-63.
47. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, *et al.* Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342: 69-77.
48. Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, *et al.* The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 1994;12: 2640-7.
49. Tejpar S, Bertagnolli M, Bosman F, *et al.* Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery. *Oncologist* 2010;15: 390-404.
50. Kohne CH, Cunningham D, Di CF, *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: 308-17.
51. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005;365: 153-65.
52. Arbman G, Nilsson E, Hallbook O, Sjudahl R. Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996;83: 375-9.
53. Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* 2004;54: 295-308.

## Bibliografia

54. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, van de Velde CJ, van Krieken JH. Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: not one millimeter but two millimeters is the limit. *Am J Surg Pathol* 2002;26: 350-7.
55. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, *et al.* Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990;322: 352-8.
56. IMPACT. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995;345: 939-44.
57. O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, *et al.* Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 1997;15: 246-50.
58. Andre T, Colin P, Louvet C, *et al.* 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* 2003;21: 2896-903.
59. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, *et al.* Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995;13: 2936-43.
60. IMPACTB2. 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* 1999;17: 1356-63.
61. Chau I, Norman AR, Cunningham D, *et al.* 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* 2005;16: 549-57.
62. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, *et al.* 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* 2005;23: 8671-8.

63. De Placido S, Lopez M, Carlomagno C, *et al.* Modulation of 5-fluorouracil as adjuvant systemic chemotherapy in colorectal cancer: the IGCS-COL multicentre, randomised, phase III study. *Br J Cancer* 2005;93: 896-904.
64. Smith RE, Colangelo L, Wieand HS, Begovic M, Wolmark N. Randomized trial of adjuvant therapy in colon carcinoma: 10-year results of NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 2004;96: 1128-32.
65. O'Connell MJ, Sargent DJ, Windschitl HE, *et al.* 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* 2006;6: 133-9.
66. Andre T, Quinaux E, Louvet C, *et al.* Phase III study comparing a semimonthly 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* 2007;25: 3732-8.
67. Figueredo A, Charette ML, Maroun J, Brouwers MC, Zuraw L. 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* 2004;22: 3395-407.
68. Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 2007;370: 2020-9.
69. Scheithauer W, McKendrick J, Begbie S, *et al.* Oral capecitabine as an alternative to i.v. 5-fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer: safety results of a randomized, phase III trial. *Ann Oncol* 2003;14: 1735-43.
70. Lembersky BC, Wieand HS, Petrelli NJ, *et al.* 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* 2006;24: 2059-64.
71. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, *et al.* Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with

## Bibliografia

irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol* 2009;27: 3117-25.

72. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, *et al.* Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol* 2007;25: 3456-61.

73. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, *et al.* Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350: 2343-51.

74. Andre T, Boni C, Navarro M, *et al.* Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009;27: 3109-16.

75. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, *et al.* Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29: 1465-71.

76. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, *et al.* Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol* 2011;29: 11-6.

77. Andre T VCE, Schmoll H, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, Cunningham D, Cartwright TH, Hecht JR, Rivera F, Im S, Bodoky G, Salazar R, Maindrault-Goebel F, Shmueli E, Bajetta E, Makrutzki M, Shang A, De Gramont A, Hoff PM. A multinational, randomized phase III study of bevacizumab (Bev) with FOLFOX4 or XELOX versus FOLFOX4 alone as adjuvant treatment for colon cancer (CC): Subgroup analyses from the AVANT trial. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 3509) 2011.

78. Alberts SR SD, Smyrk TC, *et al.* . Adjuvant mFOLFOX6 with or without cetuximab (Cmab) in KRAS wild-type (WT) patients (pts) with resected stage III colon cancer (CC): Results from NCCTG Intergroup Phase III Trial N0147. *J Clin Oncol* 28:18s, 2010 (suppl; abstr CRA3507) 2010.



79. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351: 1731-40.
80. Quah HM, Chou JF, Gonen M, *et al.* Pathologic stage is most prognostic of disease-free survival in locally advanced rectal cancer patients after preoperative chemoradiation. *Cancer* 2008;113: 57-64.
81. Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, *et al.* Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol* 2009;27: 5124-30.
82. O'Connell MJ, Martenson JA, Wieand HS, *et al.* Improving adjuvant therapy for rectal cancer by combining protracted-infusion fluorouracil with radiation therapy after curative surgery. *N Engl J Med* 1994;331: 502-7.
83. Velenik V, Anderluh F, Oblak I, Strojanc P, Zakotnik B. Capecitabine as a radiosensitizing agent in neoadjuvant treatment of locally advanced resectable rectal cancer: prospective phase II trial. *Croat Med J* 2006;47: 693-700.
84. Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, *et al.* Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-ProDIGE 2. *J Clin Oncol* 2010;28: 1638-44.
85. Aschele C, Cionini L, Lonardi S, *et al.* Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2011;29: 2773-80.
86. Van Cutsem E, Hoff PM, Harper P, *et al.* Oral capecitabine vs intravenous 5-fluorouracil and leucovorin: integrated efficacy data and novel analyses from two large, randomised, phase III trials. *Br J Cancer* 2004;90: 1190-7.
87. Tournigand C, Andre T, Achille E, *et al.* FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004;22: 229-37.

## Bibliografia

88. Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, *et al.* Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370: 143-52.
89. Koopman M, Antonini NF, Douma J, *et al.* Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370: 135-42.
90. Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, *et al.* Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer* 2006;42: 2212-21.
91. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, *et al.* Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007;25: 1670-6.
92. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, *et al.* FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Br J Cancer* 2006;94: 798-805.
93. Chibaudel B, Maindrault-Goebel F, Lledo G, *et al.* Can chemotherapy be discontinued in unresectable metastatic colorectal cancer? The GERCOR OPTIMOX2 Study. *J Clin Oncol* 2009;27: 5727-33.
94. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350: 2335-42.
95. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, *et al.* Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005;23: 3697-705.

96. Hochster HS, Hart LL, Ramanathan RK, *et al.* Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the TREE Study. *J Clin Oncol* 2008;26: 3523-9.
97. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351: 337-45.
98. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360: 1408-17.
99. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, *et al.* Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27: 663-71.
100. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, *et al.* Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011;377: 2103-14.
101. Tveit K GT, Glimelius B, *et al.* Randomized Phase III Study of 5-Fluorouracil/Folate/Oxaliplatin Given Continuously or Intermittently with or without Cetuximab, as First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: The NORDIC VII Study (NCT00145314), By The Nordic Colorectal Cancer Biomodulation Group. European Society for Medical Oncology 2010 21; 8 (abstr, LBA20) 2010.
102. Amado RG, Wolf M, Peeters M, *et al.* Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26: 1626-34.
103. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, *et al.* Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010;28: 4697-705.

## Bibliografia

104. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, *et al.* Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28: 4706-13.
105. Tol J, Koopman M, Cats A, *et al.* Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360: 563-72.
106. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, *et al.* A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27: 672-80.
107. Caggiano V, Weiss RV, Rickert TS, Linde-Zwirble WT. Incidence, cost, and mortality of neutropenia hospitalization associated with chemotherapy. *Cancer* 2005;103: 1916-24.
108. Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs* 2000;18: 299-313.
109. Gorlick R, Bertino JR. Drug resistance in colon cancer. *Semin Oncol* 1999;26: 606-11.
110. Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* 1974;13: 471-81.
111. 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 thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995;20: 191-7.
112. 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: 3249-52.
113. Kawakami K, Salonga D, Park JM, *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: 4096-101.

114. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, *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: 2898-904.

115. 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: 6004-7.

116. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, *et al.* Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001;1: 65-70.

117. Matsui T, Omura K, Kawakami K, Morita S, Sakamoto J. Genotype of thymidylate synthase likely to affect efficacy of adjuvant 5-FU based chemotherapy in colon cancer. *Oncol Rep* 2006;16: 1111-5.

118. 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: 325-8.

119. Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts response to capecitabine in advanced colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2002;17: 46-9.

120. Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A, Gamelin E. The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2008;8: 256-67.

121. Martinez-Balibrea E, Manzano JL, Martinez-Cardus A, *et al.* 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

## Bibliografia

cancer patients treated with 5-fluorouracil plus oxaliplatin or irinotecan. *Oncol Rep* 2007;17: 637-45.

122. Boige V, Mendiboure J, Pignon JP, *et al.* Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFC2000-05. *J Clin Oncol* 2010;28: 2556-64.

123. Martinez-Balibrea E, Abad A, Martinez-Cardus A, *et al.* UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br J Cancer* 2010;103: 581-9.

124. Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoue F, *et al.* Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2004;10: 5880-8.

125. 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: 1365-9.

126. Hitre E, Budai B, Adleff V, *et al.* Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15: 723-30.

127. Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, *et al.* Liver-only metastatic colorectal cancer patients and thymidylate synthase polymorphisms for predicting response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Br J Cancer* 2008;99: 716-21.

128. Marcuello E, Altes A, del Rio E, Cesar A, Menoyo A, Baiget M. 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* 2004;112: 733-7.

129. Pare L, Marcuello E, Altes A, *et al.* Transcription factor-binding sites in the thymidylate synthase gene: predictors of outcome in patients

with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin? *Pharmacogenomics J* 2008;8: 315-20.

130. Gusella M, Bolzonella C, Crepaldi G, Ferrazzi E, Padrini R. A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. *Pharmacogenomics J* 2006;6: 421-4.

131. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, *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: 319-27.

132. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, *et al.* Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFIRI chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2008;8: 278-88.

133. Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, *et al.* A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;91: 344-54.

134. Goyette P, Pai A, Milos R, *et al.* Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998;9: 652-6.

135. Frosst P, Blom HJ, Milos R, *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10: 111-3.

136. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22: 195-201.

137. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98: 4004-9.

## Bibliografia

138. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, *et al.* A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62: 1044-51.
139. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004;159: 423-43.
140. Narayanan S, McConnell J, Little J, *et al.* Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13: 1436-43.
141. 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: 1611-5.
142. Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F, *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2010;69: 58-66.
143. Castillo-Fernandez O, Santibanez M, Bauza A, *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (677 C>T) predicts long time to progression in metastatic colon cancer treated with 5-fluorouracil and folinic acid. *Arch Med Res* 2010;41: 430-5.
144. Sharma R, Hoskins JM, Rivory LP, *et al.* Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and toxicity to capecitabine in advanced colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008;14: 817-25.
145. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, *et al.* Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994;12: 2248-53.



146. Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2001;1: 99-108.
147. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. Meta-Analysis Group In Cancer. *J Clin Oncol* 1998;16: 3537-41.
148. Blasco H, Boisdron-Celle M, Bougnoux P, *et al.* A well-tolerated 5-FU-based treatment subsequent to severe capecitabine-induced toxicity in a DPD-deficient patient. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65: 966-70.
149. Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renee N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer* 1999;79: 627-30.
150. van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2004;40: 939-50.
151. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 1998;25: 4-12.
152. Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, Griebel DJ, Williams GA, Pazdur R. FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist* 2004;9: 8-12.
153. Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, Lapied B, Pelhate M, Gamelin E. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol* 2001;85: 2293-7.
154. Reed E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res* 2005;11: 6100-2.
155. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, *et al.* Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007;25: 1247-54.
156. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, *et al.* ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer

patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19: 4298-304.

157. Viguier J, Boige V, Miquel C, *et al.* 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* 2005;11: 6212-7.

158. Park DJ, Zhang W, Stoehmacher J, *et al.* ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003;1: 162-6.

159. Yu JJ, Lee KB, Mu C, *et al.* 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* 2000;16: 555-60.

160. Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, *et al.* XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 2000;21: 551-5.

161. Le Morvan V, Smith D, Laurand A, *et al.* Determination of ERCC2 Lys751Gln and GSTP1 Ile105Val gene polymorphisms in colorectal cancer patients: relationships with treatment outcome. *Pharmacogenomics* 2007;8: 1693-703.

162. Pare L, Marcuello E, Altes A, *et al.* 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.

163. Stoehmacher J, Ghaderi V, Iobal S, *et al.* A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001;21: 3075-9.

164. Suh KW, Kim JH, Kim do Y, Kim YB, Lee C, Choi S. 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* 2006;13: 1379-85.

165. Cullen KJ, Newkirk KA, Schumaker LM, Aldosari N, Rone JD, Haddad BR. Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 2003;63: 8097-102.
166. London SJ, Yuan JM, Chung FL, *et al.* Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 2000;356: 724-9.
167. Stoehmacher J, Park DJ, Zhang W, *et al.* Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94: 936-42.
168. Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lorient MA. Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12: 3050-6.
169. Gamelin L, Capitain O, Morel A, *et al.* Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway. *Clin Cancer Res* 2007;13: 6359-68.
170. Kweekel DM, Koopman M, Antonini NF, *et al.* GSTP1 Ile105Val polymorphism correlates with progression-free survival in MCRC patients treated with or without irinotecan: a study of the Dutch Colorectal Cancer Group. *Br J Cancer* 2008;99: 1316-21.
171. Kunimoto T, Nitta K, Tanaka T, *et al.* Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer Res* 1987;47: 5944-7.
172. Saltz LB, Kanowitz J, Kemeny NE, *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 1996;14: 2959-67.
173. Van Cutsem E, Cunningham D, Ten Bokkel Huinink WW, *et al.* Clinical activity and benefit of irinotecan (CPT-11) in patients with

## Bibliografia

colorectal cancer truly resistant to 5-fluorouracil (5-FU). *Eur J Cancer* 1999;35: 54-9.

174. Iyer L, King CD, Whittington PF, *et al.* Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest* 1998;101: 847-54.

175. Gupta E, Lestingi TM, Mick R, Ramirez J, Vokes EE, Ratain MJ. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res* 1994;54: 3723-5.

176. Wasserman E, Myara A, Lokiec F, *et al.* Severe CPT-11 toxicity in patients with Gilbert's syndrome: two case reports. *Ann Oncol* 1997;8: 1049-51.

177. Ando Y, Saka H, Ando M, *et al.* Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 2000;60: 6921-6.

178. Iyer L, Das S, Janisch L, *et al.* UGT1A1\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2002;2: 43-7.

179. Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, *et al.* Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res* 2003;9: 3246-53.

180. Innocenti F, Ratain MJ. "Irinogenetics" and UGT1A: from genotypes to haplotypes. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75: 495-500.

181. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, *et al.* Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 2004;22: 1382-8.

182. Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, Guerin O, Morel A, Gamelin E. Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. *Clin Cancer Res* 2004;10: 5151-9.

183. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Gomez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;91: 678-82.
184. United States Food and Drug Administration: Camptosar label. [cited; Available from: <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2005/020571s024,027,028lbl.pdf>
185. Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL. UGT1A1\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst* 2007;99: 1290-5.
186. Hu ZY, Yu Q, Pei Q, Guo C. Dose-dependent association between UGT1A1\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: low doses also increase risk. *Clin Cancer Res*;16: 3832-42.
187. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, *et al.* EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26: 2311-9.
188. McDonagh EM, Whirl-Carrillo M, Garten Y, Altman RB, Klein TE. From pharmacogenomic knowledge acquisition to clinical applications: the PharmGKB as a clinical pharmacogenomic biomarker resource. *Biomark Med* 2011;5: 795-806.
189. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, *et al.* Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011;22: 1535-46.
190. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66: 3992-5.
191. Lievre A, Bachet JB, Boige V, *et al.* KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26: 374-9.
192. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, *et al.* K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359: 1757-65.

## Bibliografia

193. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, *et al.* Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2009;27: 5924-30.
194. Tol J, Dijkstra JR, Klomp M, *et al.* Markers for EGFR pathway activation as predictor of outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with or without cetuximab. *Eur J Cancer* 2010;46: 1997-2009.
195. Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, *et al.* Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One* 2009;4: e7287.
196. Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, *et al.* Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in  $\geq 2$  line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. *PLoS One* 2011;6: e15980.
197. Barault L, Veyrie N, Jooste V, *et al.* Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer* 2008;122: 2255-9.
198. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, *et al.* PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2009;20: 84-90.
199. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, *et al.* PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009;69: 1851-7.
200. Park JH, Han SW, Oh DY, *et al.* Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68: 1045-55.
201. Loupakis F, Pollina L, Stasi I, *et al.* PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27: 2622-9.

202. Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, *et al.* AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene* 2008;27: 5648-50.
203. Baba Y, Nosho K, Shima K, *et al.* Phosphorylated AKT expression is associated with PIK3CA mutation, low stage, and favorable outcome in 717 colorectal cancers. *Cancer* 2010;117: 1399-408.
204. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 2007;25: 3238-45.
205. Personeni N, Fieuws S, Piessevaux H, *et al.* Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. *Clin Cancer Res* 2008;14: 5869-76.
206. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, *et al.* Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25: 3230-7.
207. Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, *et al.* Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2009;27: 5068-74.
208. Pander J, Gelderblom H, Antonini NF, *et al.* Correlation of FCGR3A and EGFR germline polymorphisms with the efficacy of cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2010;46: 1829-34.
209. Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, *et al.* Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26: 1427-34.
210. Lurje G, Nagashima F, Zhang W, *et al.* Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal

## Bibliografia

cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clin Cancer Res* 2008;14: 7884-95.

211. Zhang W, Gordon M, Press OA, *et al.* Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16: 475-83.

212. Winder T, Zhang W, Yang D, *et al.* Germline polymorphisms in genes involved in the IGF1 pathway predict efficacy of cetuximab in wild-type KRAS mCRC patients. *Clin Cancer Res* 2010;16: 5591-602.

213. Zhang W, Stoehlmacher J, Park DJ, *et al.* Gene polymorphisms of epidermal growth factor receptor and its downstream effector, interleukin-8, predict oxaliplatin efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2005;5: 124-31.

214. Bier H, Hoffmann T, Haas I, van Lierop A. Anti-(epidermal growth factor) receptor monoclonal antibodies for the induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother* 1998;46: 167-73.

215. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2001;19: 32S-40S.

216. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, *et al.* FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25: 3712-8.

217. Zhang W, Azuma M, Lurje G, *et al.* Molecular predictors of combination targeted therapies (cetuximab, bevacizumab) in irinotecan-refractory colorectal cancer (BOND-2 study). *Anticancer Res* 2010;30: 4209-17.

218. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, *et al.* Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 2009;27: 1122-9.



219. Graziano F, Canestrari E, Loupakis F, *et al.* Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to KRAS 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. *Pharmacogenomics J* 2010;10: 458-64.
220. Zhang W, Winder T, Ning Y, *et al.* A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. *Ann Oncol*;22: 104-9.
221. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, *et al.* Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007;25: 1539-44.
222. Grothey A, Sugrue MM, Purdie DM, *et al.* Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). *J Clin Oncol* 2008;26: 5326-34.
223. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285: 1182-6.
224. Formica V, Palmirotta R, Del Monte G, *et al.* Predictive value of VEGF gene polymorphisms for metastatic colorectal cancer patients receiving first-line treatment including fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab. *Int J Colorectal Dis* 2011;26: 143-51.
225. Loupakis F, Ruzzo A, Salvatore L, *et al.* Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2011;11: 247.
226. El Khoueiry AB, Pohl A, Danenberg K, *et al.* Wt Kras and gene expression levels of VEGFR2, EGFR, and ERCC-1 associated with progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with first-line 5-FU or capecitabine with oxaliplatin and bevacizumab (FOLFOX/BV or XELOX/BV). *J Clin Oncol* 2009;27:15s, 2009 (suppl; abstr 4056)

227. Weickhardt AJ, Williams D, Lee C, *et al.* Vascular endothelial growth factors (VEGF) and VEGF receptor expression as predictive biomarkers for benefit with bevacizumab in metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of the phase III MAX study. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 3531) 2011.
228. Hansen T. The predictive value of single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor system in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab plus chemotherapy as first-line treatment: Results of the phase III ACT trial NCT00598156 translational study. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 3600) 2011.
229. Martin D, Galisteo R, Gutkind JS. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *J Biol Chem* 2009;284: 6038-42.
230. Gerger A, El-Khoueiry A, Zhang W, *et al.* Pharmacogenetic angiogenesis profiling for first-line Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17: 5783-92.
231. Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, *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: 1779-86.
232. Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, Jakobsen A. Germline polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 2007;50: 1363-9.
233. Tan BR, Thomas F, Myerson RJ, *et al.* Thymidylate synthase genotype-directed neoadjuvant chemoradiation for patients with rectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2011;29: 875-83.
234. Stoehlmacher J, Goekkurt E, Mogck U, *et al.* Thymidylate synthase genotypes and tumour regression in stage II/III rectal cancer patients after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiation. *Cancer Lett* 2008;272: 221-5.

235. Cecchin E, Agostini M, Pucciarelli S, *et al.* Tumor response is predicted by patient genetic profile in rectal cancer patients treated with neo-adjuvant chemo-radiotherapy. *Pharmacogenomics J* 2010;11: 214-26.
236. Balboa E, Duran G, Lamas MJ, *et al.* Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relation with response. *Pharmacogenomics* 2010;11: 747-61.
237. Lamas MJ, Duran G, Gomez A, *et al.* X-ray cross-complementing group 1 and thymidylate synthase polymorphisms might predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;82: 138-44.
238. Zhang W, Park DJ, Lu B, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin Cancer Res* 2005;11: 600-5.
239. Grimmering PP, Danenberg P, Dellas K, *et al.* Biomarkers for cetuximab-based neoadjuvant radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17: 3469-77.
240. Geva R JB, Fountzilas G, *et al.* An international consortium study in chemorefractory metastatic colorectal cancer (mCRC) patients (pts) to assess the impact of FCGR polymorphisms on cetuximab efficacy. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 3528) 2011.
241. Toffoli G, Cecchin E, Gasparini G, *et al.* Genotype-driven phase I study of irinotecan administered in combination with fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28: 866-71.