



## ORIGINALES

## Validación de polimorfismos genéticos asociados a toxicidad al tratamiento quimioterápico en pacientes de cáncer colorrectal

L. Cortejoso<sup>1</sup>, M.<sup>a</sup> I. García<sup>1</sup>, P. García-Alfonso<sup>2</sup>, C. Grávalos<sup>3</sup>, L. Robles<sup>3</sup>,  
E. González-Haba<sup>1</sup>, M.<sup>a</sup> Sanjurjo<sup>1</sup> y L. A. López-Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Farmacia. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Oncología Médica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Madrid. <sup>3</sup>Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Doce de Octubre. Madrid.

### Resumen

**Objetivo:** Validar las asociaciones, encontradas previamente en tres cohortes de pacientes del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, entre los polimorfismos rs1128503, rs2032582 y rs1045642 del gen *ABCB1* con síndrome mano-pie y diarrea en pacientes de cáncer colorrectal tratados con regímenes que contenían capecitabina y 5-Fluorouracilo, respectivamente, y entre los polimorfismos rs2297595 del gen *DPYD* con náuseas/vómitos, rs11615 *ERCC1* y neutropenia, y rs28399433 *CYP2A6* y neutropenia en pacientes de cáncer colorrectal tratados con FOLFOX o XELOX en adyuvancia.

**Método:** Se incorporaron al estudio pacientes de cáncer colorrectal tratados con regímenes quimioterápicos que contenían capecitabina (n = 157), 5-fluorouracilo (n = 99) y pacientes tratados en adyuvancia con XELOX o FOLFOX (n = 83). Los pacientes participantes fueron reclutados en el Hospital Universitario Doce de Octubre y en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón tras firmar consentimiento informado. Se extrajo ADN a partir de muestras de sangre. Los genotipados se realizaron mediante SNaPshot. Se realizaron tablas de contingencia para analizar las asociaciones entre genotipos y reacciones adversas. Resultados: Ninguna de las asociaciones previamente identificadas fue replicada en la cohorte de validación.

**Conclusiones:** Los estudios farmacogenéticos con un tamaño muestral limitado deben ser validados en cohortes más numerosas, a ser posible en estudios multicéntricos, reduciendo al máximo las variables y nunca deben ser utilizados en clínica sin validar.

### Validation of genetic polymorphisms associated to the toxicity of chemotherapy in colorectal cancer patients

#### Abstract

**Objective:** To validate the associations previously found in three cohorts of patients from the General University Hospital Gregorio Marañón, between the polymorphisms rs1128503, rs2032582 and rs1045642 of the *ABCB1* gene and the hand-foot syndrome and diarrhea in colorectal cancer patients treated with chemotherapy regimes containing Capecitabine and 5-Fluorouracil, respectively, and between the polymorphisms rs2297595 of the *DPYD* gene and nausea/vomiting, rs11615 of *ERCC1* and neutropenia, and rs28399433 *CYP2A6* and neutropenia, in colorectal cancer patients treated with FOLFOX or XELOX as adjuvant therapy.

**Method:** Colorectal cancer patients treated with chemotherapy regimes, containing Capecitabine (n = 157), 5-Fluorouracil (n = 99) were included in the study, as well as patients treated with XELOX or FOLFOX (n = 83) as adjuvant therapy. The patients included were recruited from the Doce de Octubre University Hospital and from the Gregorio Marañón General University Hospital, and signed the informed consent form. DNA was obtained from blood samples. Genotyping was carried out with SNaPshot. Contingency tables were created for analyzing the associations between the genotypes and the adverse reactions. Results: None of the associations previously identified was replicated in the validation cohort.

**Conclusions:** Pharmacogenetic studies with a limited sample size must be validated with bigger cohorts, if possible by means of multicentre studies, reducing the variables to the maximum and should never be used in clinical practice without validation.

#### PALABRAS CLAVE

Biomarcadores; Toxicidad; Quimioterapia; Cáncer colorrectal; Validación; Farmacogenética

#### KEYWORDS

Biomarkers; Toxicity; Chemotherapy; Colorectal cancer; Validation; Pharmacogenetics

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: llfernandez@salud.madrid.org (Luis A. López-Fernández).

## Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda causa de muerte por tumores en el mundo desarrollado, con más de 608.700 muertes estimadas en el 2008<sup>1</sup>. En España hubo un total de 13.433 fallecidos en ese mismo año, lo cual representa un 14% de todas las muertes por cáncer<sup>2</sup>. Una parte importante de los pacientes de CCR son tratados con quimioterapia, bien de forma adyuvante tras cirugía, para evitar recidivas de la enfermedad, o bien en presencia del tumor. La quimioterapia aplicada en el CCR es muy variada y puede dar lugar a múltiples combinaciones de fármacos<sup>3</sup>. Entre ellos tenemos las fluoropirimidinas como base del tratamiento, entre las que se encuentra el 5-fluorouracilo (5-FU), o su profármaco capecitabina, que se suelen administrar en combinación con oxaliplatino (FOLFOX, XELOX, respectivamente) o con irinotecan (FOLFIRI, XELIRI, respectivamente)<sup>4</sup>. Además en casos de enfermedad metastásica estas combinaciones suelen ir acompañadas de un anticuerpo monoclonal como cetuximab, panitumumab o bevacizumab. Sin embargo, y a pesar de la mejora en la efectividad de estos tratamientos, cerca del 50% de los pacientes a los que se administra la quimioterapia en estadio avanzado no responden a la misma. Otro problema importante es la toxicidad provocada por estos fármacos, que puede conducir a desestimar líneas de tratamiento reduciendo las posibilidades de curación, o a provocar disminuciones y/o retrasos de dosis que hacen peligrar la eficacia<sup>5</sup>. Además, las reacciones adversas afectan a la calidad de vida de los pacientes y tienen también importantes repercusiones económicas. Las reacciones adversas a medicamentos son la 4ª causa de muerte en EEUU. Un análisis con 1.219 pacientes con CCR que recibieron 5-FU, mostró que aproximadamente el 31-34% tuvo toxicidad grado 3-4, y que el 0,5% sufrió toxicidad letal<sup>6</sup>. Aunque capecitabina es un profármaco de 5-FU, existen diferencias significativas en cuanto a su perfil de toxicidad. Mientras que la toxicidad hematológica se asocia con más frecuencia a 5-FU, efectos adversos como diarrea, náuseas y vómitos, y síndrome mano-pie (SMP) están más asociados al tratamiento con capecitabina<sup>7</sup>. Esquemas quimioterápicos que contengan irinotecan pueden conducir a toxicidades graves, fundamentalmente mielosupresión y diarrea<sup>8</sup>. En cuanto al oxaliplatino, el efecto adverso más común es la neurotoxicidad, que puede perdurar en el tiempo después de la suspensión del fármaco<sup>9</sup>.

La farmacogenética estudia los factores genéticos que influyen en la variabilidad interindividual en la respuesta a medicamentos, tanto en la eficacia como en la toxicidad. En el caso de la farmacogenética en oncología se ha avanzado bastante en los últimos años y uno de los tumores con más resultados en esta área ha sido el CCR<sup>10,11</sup>. Varias son las asociaciones claramente establecidas en farmacogenética del CCR y reacciones adversas. Se ha demostrado que en pacientes tratados con irinote-

can, la presencia del alelo \*28 del gen de la uridina difosfato-glucuronosiltransferasa (*UGT1A1\*28*) aumenta 7 veces las probabilidades de tener diarrea y neutropenia grados 3-4, y esto se predice con un 86% de positivos<sup>12,13</sup>. Otra evidencia se refiere a la relación entre toxicidad grave al tratamiento con 5-FU en pacientes con variantes del gen de la dihidropirimidina dehidrogenasa (*DPYD*), fundamentalmente el alelo \*2A<sup>14</sup>.

Nuestro grupo ha contribuido a este campo identificando varios polimorfismos genéticos asociados a determinadas reacciones adversas a la quimioterapia en pacientes con CCR<sup>15-17</sup>. Describimos cómo polimorfismos del gen *ABCB1* se encontraban asociados a neutropenia moderada-grave (rs1128503) y a síndrome mano-pie (SMP) (rs1128503, rs2032582 y rs1045642) en pacientes de CCR tratados con regímenes de quimioterapia que contenían capecitabina, y a diarrea moderada-grave (rs1045642) en pacientes tratados con regímenes que contenían 5-FU<sup>15</sup>. Así, el hecho de ser homocigoto mutante o heterocigoto para estos tres polimorfismos de secuencia única (SNPs) en *ABCB1* supuso una menor probabilidad de padecer neutropenia y SMP grado 2-5 en pacientes tratados con regímenes que contenían capecitabina en comparación con los homocigotos salvajes CC; por el contrario, estos últimos estuvieron expuestos a un menor riesgo de desarrollar diarrea grado 2-5 frente a esquemas basados en 5-FU<sup>15</sup>. Para limitar el efecto de las distintas combinaciones de tratamientos y estadios del tumor se realizó posteriormente un estudio que incluía pacientes con un tratamiento más homogéneo (FOLFOX/XELOX en adyuvancia) y en el que los SNPs rs11615 en *ERCC1* y rs28399433 en *CYP2A6* (gen que codifica para la proteína CYP2A6, involucrada en la conversión de tegafur a 5-FU) se asociaron de una forma estadísticamente significativa con el desarrollo de neutropenia<sup>17</sup>. La variante rs2297595 en *DPYD* se asoció al desarrollo de náuseas y vómitos grado 3-5 en esta misma población<sup>17</sup>.

El objetivo del presente estudio es validar estos posibles marcadores farmacogenéticos de toxicidad (rs1128503, rs2032592 y rs1045642 en *ABCB1*, rs11615 en *ERCC1*, rs28399433 en *CYP2A6* y rs2297595 en *DPYD*) en una nueva cohorte de pacientes de CCR frente a tratamientos basados en 5-FU o capecitabina, y frente a los esquemas FOLFOX/XELOX en adyuvancia con el fin de que puedan ser utilizadas en un futuro cercano como medio para decidir la terapia más adecuada para cada paciente.

## Método

### Pacientes y diseño del estudio

Se reclutaron pacientes procedentes de los Servicios de Oncología Médica tanto del Hospital General Universitario Gregorio Marañón como del Hospital Universitario Doce de Octubre en el periodo comprendido entre

**Tabla 1.** Polimorfismos analizados y oligonucleótidos utilizados en SNaPshot

Gen (SNP)	ID dbSNP	Oligo	Primer Forward
ABCB1 C1236T	rs1128503	F R SNaPshot	CCTGACTCACCACACCAATG TATCCTGTGTCTGTGAATTGCC GCCCACTCTGCACCTTCAGGTTCCAG
ABCB1 G2677T/A	rs2032582	F R SNaPshot	TAGTTTGACTCACCTTCCCGG GGCTATAGGTTCCAGGCTTG GACAAGCACTGAAAGATAAGAAAGAACTAGAAAGGT
ABCB1 C3435T	rs1045642	F R SNaPshot	CATGCTCCCAGGCTGTTTAT GTAACCTGGCAGTTTCAGTG TGACTCGATGAAGGCATGTATGTTGGCCTCCTTGTGCCCTCAC
DPYD A496G	rs2297595	F R SNaPshot	CAATCGAGCCAAAAAGGAAG CCCTCTAGGTGGGAGTAGGG AAATTTAACCATGACAATTGATTTCCCGTAGGTATTCAAAGCA
CYP2A6 T-48G	rs28399433	F R SNaPshot	CCTGCACCTCTGATTGGAT CCTGCTGAGGGTTTTAGTGG ATCAGCCAAAGTCCATCCCTCTTTTCAGGCAGTA
ERCC1 Asn118Asn	rs11615	F R SNaPshot	TCCAGAACACTGGGACATGA TCCCTATTGATGGCTTCTGC AGGGGCAATCCCGTACTGAAGTTCGTGCGCAA

SNP: Del inglés «Single Nucleotide Polymorphism»; ID: Identificador; ABCB1: Casete de unión a ATP B1; DPYD: Dihidropirimidina dehidrogenasa; CYP2A6: Citocromo P450 2A6; ERCC1: Proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1.

febrero de 2011 y diciembre de 2012. Estos pacientes fueron incorporados al estudio tanto de forma prospectiva como retrospectiva. Los pacientes debían cumplir los criterios de ser mayores de edad, estar diagnosticados de cáncer de colon o recto, y estar recibiendo o haber recibido quimioterapia basada en 5-FU o capecitabina, o los esquemas FOLFOX/XELOX en adyuvancia. Los criterios de exclusión fueron: tener una puntuación ECOG performance status (PS) mayor de 2, insuficiencia renal aguda (menos de 400 ml de producción de orina al día), diagnosticado de insuficiencia hepática aguda o crónica, y tener un tiempo de seguimiento inferior a 2 meses, siempre y cuando el paciente no hubiera presentado algún efecto adverso grave en dicho periodo. Ninguno de los pacientes incluidos en la cohorte de validación formó parte a la vez de las cohortes exploratorias de los estudios previos. El resultado de las determinaciones genéticas no modificó un ningún caso el tratamiento recibido por los pacientes. La cohorte exploratoria estuvo formada exclusivamente por pacientes del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, mientras que la cohorte de validación fue completada, mayoritariamente, con pacientes del Hospital Universitario Doce de Octubre.

El estudio se llevó a cabo según lo establecido en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y el del Hospital Universitario Doce de Octubre. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. Se siguieron los protocolos establecidos en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón y en el Hospital Universitario Doce de Octu-

bre para acceder a los datos de las historias clínicas con fines de investigación y divulgativos para la comunidad científica.

### Muestra de estudio

Se extrajeron 3-4 ml de sangre total de cada paciente en tubos conteniendo EDTA. Dichos tubos fueron conservados a -80° C.

### Métodos de ensayo

Se aisló el ADN genómico de todos los pacientes mediante el *HighPure PCR template preparation kit (Roche)*, a partir de 200 l de sangre y la concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, MA, USA)*. El ADN fue preservado a -20° C hasta su utilización.

Los polimorfismos rs1128503, rs2032592 y rs1045642 en *ABCB1*, rs2297595 en *DPYD*, rs28399433 en *CYP2A6*, y rs11615 en *ERCC1* se determinaron mediante la técnica de SNaPshot, tal y como se ha descrito por González-Haba y cols.<sup>15</sup>. Los polimorfismos estudiados y los oligonucleótidos empleados se detallan en la tabla 1.

### Análisis estadísticos

Se estudiaron las posibles asociaciones de los siguientes polimorfismos con reacciones adversas a la quimioterapia: rs1128503 en *ABCB1* (neutropenia-SMP/capecitabina), rs2032592 en *ABCB1* (SMP/capecitabina), rs1045642 en

**Tabla 2.** Características basales de los pacientes

Parámetro	Capecitabina		5FU		XELOX/FOLFOX	
	CE	CV	CE	CV	CE	CV
<i>Pacientes</i>						
Hombres	44 (59,5%)	84 (53,5%)	35 (52,2%)	54 (54,5%)	27 (57,4%)	43 (51,8%)
Mujeres	30 (40,5%)	73 (46,5%)	32 (47,8%)	45 (45,5%)	20 (42,6%)	40 (48,2%)
Total	74	157	67	99	47	83
<i>Edad (años) mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</i>						
	70 (60-73)	66 (57-72)	61 (49-69)	62 (55-69)	68 (53-72)	65 (59-71)
<i>Tipo de cáncer</i>						
Colon	52 (70,3%)	110 (70,1%)	42 (62,7%)	60 (60,6%)	33 (70,0%)	53 (63,9%)
Rectum	22 (29,7%)	47 (29,9%)	25 (37,3%)	39 (39,4%)	14 (29,8%)	30 (36,1%)
<i>Grado del tumor</i>						
I		2 (1,3%)		3 (3,0%)		2 (2,4%)
II	15 (20,2%)	26 (16,6%)	7 (10,2%)	20 (20,2%)	13 (27,7%)	19 (22,9%)
III	17 (23,0%)	68 (43,3%)	15 (22,4%)	21 (21,2%)	23 (48,9%)	52 (62,6%)
IV	42 (56,8%)	61 (38,8%)	45 (67,4%)	55 (55,6%)	11 (23,4%)	10 (12,0%)
<i>Tratamiento previo</i>						
Sin tratamiento previo	21 (28,4%)	16 (10,2%)	19 (28,4%)	18 (18,2%)		
Cirugía	46 (62,2%)	115 (73,2%)	41 (61,2%)	56 (56,5%)	41 (87,2%)	65 (78,3%)
Cirugía + Radioterapia	6 (8,1%)	5 (3,2%)	7 (10,4%)	6 (6,1%)	6 (12,8%)	5 (6,0%)
Otros	1 (1,3%)	21 (13,4%)		19 (19,2%)		13 (15,7%)

CE: Cohorte exploratoria; CV: Cohorte de validación; 5FU: 5-fluorouracilo; XELOX: Capecitabina y oxaliplatino; FOLFOX: 5-fluorouracilo y oxaliplatino.

\*P valor < 0,05.

*ABCB1* (SMP/Capecitabina; diarrea/5-Fluorouracilo), rs2297595 en *DPYD* (Nauseas-vómitos/FOLFOX-XELOX), rs28399433 en *CYP2A6* (neutropenia/ FOLFOX-XELOX), y rs11615 en *ERCC1* (neutropenia/FOLFOX-XELOX). Los pacientes fueron clasificados en dos grupos en función del grado de toxicidad desarrollada («no toxicidad» 0-1, y «toxicidad moderada-grave» 2-5) siguiendo los criterios *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) v.3.0 para las siguientes reacciones adversas: neutropenia, SMP, diarrea, y náuseas y vómitos, excepto en el análisis que incluía pacientes tratados con los regímenes FOLFOX/XELOX en adyuvancia que se estudió «toxicidad grave», es decir considerando grados 3-5 en los análisis estadísticos. Esta diferencia es debida a que se ha intentado reproducir los resultados utilizando exactamente los mismos criterios que se emplearon en los trabajos originales. Los datos de toxicidad recogidos en ambos hospitales fueron tomados de manera homogénea.

Para los estudios de asociación entre polimorfismos y toxicidad se utilizaron tablas de contingencia y se calculó el test exacto de Fisher, considerando valores de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativos.

## Resultados

Para validar las asociaciones identificadas por nuestro grupo en dos trabajos previos entre efectos adversos a la quimioterapia y variaciones genéticas se reclutaron tres grupos de pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal: 157 pacientes tratados con regímenes quimioterápicos

que contenían capecitabina, 99 pacientes tratados con regímenes que contenían 5-FU y un tercer grupo de 83 pacientes tratados en adyuvancia con FOLFOX o XELOX. Las características basales de cada una de estas tres cohortes de validación fue comparada con las cohortes de exploración de los trabajos originales, que estaban formadas por 74, 67 y 47 pacientes para tratamiento basados en capecitabina, 5-FU y FOLFOX/XELOX, respectivamente. En líneas generales, las características basales de los pacientes incluidos en cada cohorte de validación fueron muy similares a las de la equivalente cohorte exploratoria (Tabla 2). Sin embargo, en los tres tratamientos analizados el tratamiento previo resultó estadísticamente significativo entre las cohortes de exploración y las de validación. Por otro lado, en los pacientes tratados con quimioterapia que contenía capecitabina la cohorte exploratoria tenía una edad al diagnóstico mayor que en la cohorte de validación (70 versus 66). Finalmente, también se encontraron diferencias en el grado de tumor en los pacientes tratados con esquemas que contenían 5-FU.

En los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contenían 5-FU no se observó una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo rs1045642 en *ABCB1* y diarrea grados 2-5 ( $p = 0,612$ ). Los pacientes homocigotos TT para este polimorfismo, al igual que lo obtenido en la cohorte exploratoria, presentaron mayor probabilidad de desarrollar diarrea moderada-grave (42,9%) que el resto de genotipos (30% CT y 33,3% CC), pero no se mantuvo la gradación que se observó en la primera cohorte y que apuntaba a un

**Tabla 3.** Tablas de contingencia para la asociación entre *ABCB1* rs1128503 y diarrea grado  $\geq 2$  en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU

Gen (identificación de SNP)	Reacción adversa	Genotipo	Grado de toxicidad [n (%)]				p	
			0-1		2-5		CE	CV
			CE	CV	CE	CV		
<i>ABCB1</i> rs1045642	Diarrea	CC	19 (90,5)	12 (66,7)	2 (9,5)	6 (33,3)	0,037	0,612
		CT	21 (65,6)	42 (70)	11 (34,4)	18 (30)		
		TT	8 (57,1)	12 (57,1)	6 (42,9)	9 (42,9)		

CE: Cohorte exploratoria; CV: Cohorte de validación; *ABCB1*: Casete de unión a ATP B1.**Tabla 4.** Tablas de contingencia para las asociaciones entre *ABCB1* rs1128503, rs2032582 y rs1045642 y efectos adversos grado  $\geq 2$  en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina

Gen (identificación de SNP)	Reacción adversa	Genotipo	Grado de toxicidad [n (%)]				p	
			0-1		2-5		CE	CV
			CE	CV	CE	CV		
<i>ABCB1</i> rs1128503	Neutropenia	CC	12 (70,6)	48 (84,2)	5 (29,4)	9 (15,8)	0,013	0,434
		CT	34 (87,2)	66 (82,5)	5 (12,8)	14 (17,5)		
		TT	18 (100)	15 (75)	0 (0)	5 (25)		
	SMP	CC	11 (64,7)	43 (75,4)	6 (35,3)	14 (24,6)	0,027	0,887
		CT	33 (84,6)	63 (78,8)	6 (15,4)	17 (21,3)		
		TT	17 (94,4)	14 (70)	1 (5,6)	6 (30)		
<i>ABCB1</i> rs2032582	SMP	GG	14 (63,6)	40 (76,9)	8 (36,4)	12 (23,1)	0,048	0,888
		GT/A	35 (92,1)	63 (76,8)	3 (7,9)	19 (23,2)		
		TT	12 (85,7)	17 (73,9)	2 (14,3)	6 (26,1)		
<i>ABCB1</i> rs1045642	SMP	CC	10 (62,5)	32 (84,2)	6 (37,5)	6 (15,8)	0,033	0,252
		CT	37 (86)	67 (74,4)	6 (14)	23 (25,6)		
		TT	14 (93,3)	21 (72,4)	1 (6,7)	8 (27,6)		

CE: Cohorte exploratoria; CV: Cohorte de validación; SMP: Síndrome Mano-Pie; *ABCB1*: Casete de unión a ATP B1.

efecto del alelo variante T para este polimorfismo en el incremento del riesgo de diarrea (Tabla 3).

Tampoco se mantuvo estadísticamente significativa en la cohorte de validación ninguna de las asociaciones obtenidas previamente entre los tres polimorfismos en el gen *ABCB1* y efectos adversos al tratamiento basado en capecitabina (Tabla 4). En la cohorte exploratoria el alelo T para los polimorfismos rs1128503, rs2032592 y rs1045642 en *ABCB1* resultó ser un marcador de baja probabilidad de desarrollar neutropenia y SMP moderado-grave. Sin embargo, estos hallazgos no pudieron ser confirmados en la nueva cohorte de pacientes. No se obtuvo ninguna asociación en el desarrollo de SMP moderado-grave frente a esquemas basados en capecitabina y los polimorfismos *ABCB1* rs1128503 ( $p = 0,887$ ), rs2032592 ( $p = 0,888$ ), o rs1045642 ( $p = 0,252$ ), ni de neutropenia moderada-grave y el polimorfismo *ABCB1* rs1128503 ( $p = 0,434$ ) (Tabla 4).

En cuanto a las asociaciones entre reacciones adversas graves al tratamiento adyuvante FOLFOX o XELOX y los SNPs rs2297595 en *DPYD*, rs11615 en *ERCC1* y rs28399433 en *CYP2A6* tampoco se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas (Tabla 5). La asociación obtenida previamente entre rs2297595 *DPYD* y náuseas y vómitos ( $p = 0,054$ ) no se confirmó en la nueva cohorte independiente ( $p = 0,850$ ). Coincidiendo con los resultados obtenidos previamente, los pacientes homocigotos para la variante T del polimorfismo rs11615 en *ERCC1* presentaron menor probabilidad de desarrollar neutropenia grave (5,6%) que los pacientes con los genotipos CT y CC (11,8 y 7,7%, respectivamente), aunque la asociación no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,786$ ). En cuanto al polimorfismo rs28399433 en *CYP2A6*, fueron los pacientes heterocigotos GT aquéllos que presentaron un mayor riesgo de neutropenia grave a lo largo del tratamiento en ambas cohortes de pacien-

**Tabla 5.** Tablas de contingencia para las asociaciones entre *DPYD rs2297595*, *ERCC1 rs11615* y *CYP2A6 rs28399433* y efectos adversos grado  $\geq 3$  en el grupo de pacientes tratados con los esquemas en adyuvancia FOLFOXIXELOX

Gen (polimorfismo)	Reacción adversa	Genotipo	Grado de toxicidad [n (%)]				p	
			0-2		3-5		CE	CV
			CE	CV	CE	CV		
<i>DPYD rs2297595</i>	Náuseas y vómitos	AA	39 (97,5)	62 (96,9)	1 (2,5)	2 (3,1)	0,054	0,850
		GA	5 (71,4)	8 (100)	2 (28,6)	0 (0)		
		GG	0 (0)	11 (100)	0 (0)	0 (0)		
<i>ERCC1 rs11615</i>	Neutropenia	TT	16 (94,1)	34 (94,4)	1 (5,9)	2 (5,6)	0,015	0,786
		CT	16 (80)	30 (88,2)	4 (20)	4 (11,8)		
		CC	5 (50)	12 (92,3)	5 (50)	1 (7,7)		
<i>CYP2A6 rs28399433</i>	Neutropenia	TT	34 (85)	64 (92,8)	6 (15)	5 (7,2)	0,029	0,622
		GT	3 (42,9)	10 (83,3)	4 (57,1)	2 (16,7)		
		GG	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)		

CE: Cohorte exploratoria; CV: Cohorte de validación; *DPYD*: Dihidropirimidina dehidrogenasa; *CYP2A6*: Citocromo P450 2A6; *ERCC1*: Proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1.

tes, pero la asociación no se mantuvo estadísticamente significativa en la cohorte de validación ( $p = 0,622$ ).

## Discusión

La identificación de biomarcadores predictivos de toxicidad a los regímenes quimioterápicos utilizados en el tratamiento del CCR podría ayudar a seleccionar la mejor opción terapéutica para cada paciente y así minimizar la aparición de reacciones adversas graves a la quimioterapia en estos pacientes<sup>10</sup>. Sin embargo, a pesar de que hay una gran variedad de artículos que muestran asociaciones entre variantes génicas y reacciones adversas a la quimioterapia en CCR, éstas a menudo no se replican en otros estudios, lo cual dificulta la aplicación clínica de la farmacogenética<sup>18</sup>. En trabajos anteriores, encontramos varios polimorfismos asociados de una manera estadísticamente significativa a determinadas reacciones adversas a la quimioterapia en pacientes con CCR del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid). Por lo anteriormente comentado, el objetivo del trabajo fue validar los resultados obtenidos en una nueva cohorte de pacientes, esta vez mayoritariamente atendidos en un hospital diferente (Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid) antes de estudiar su aplicación clínica. En nuestros trabajos iniciales se describieron por primera vez, asociaciones de polimorfismos en genes como *ABCB1* y efectos adversos a 5-fluorouracilo y capecitabina<sup>15</sup>. Otros polimorfismos, como el *rs28399433* en el gen *CYP2A6*, eran relacionados por primera vez con un efecto adverso concreto, en este caso neutropenia<sup>17</sup>, aunque previamente había sido descrita la relación de este polimorfismo con la transformación de tegafur a 5-FU<sup>19</sup>.

Los resultados, sin embargo, no han podido ser más desalentadores, ya que ninguna de las siete asociaciones estudiadas pudo ser confirmada. Probablemente, la razón fundamental de esta falta de replicación es el bajo número de pacientes incluidos en los estudios exploratorios, limitación apuntada ya en los trabajos originales<sup>15,17</sup>. Dada la naturaleza de las variables principales que determinan el tamaño muestral (porcentaje de pacientes con el efecto adverso y frecuencia del alelo menos frecuente), éste está a menudo infraestimado en los trabajos de farmacogenética, como claramente ocurre en nuestros trabajos originales. Aunque este dato es muy variable se ha estimado que el número de casos requeridos para analizar un único polimorfismo requiere una  $n$  de 496 (para odds ratio  $> 2$ , 5% de menor frecuencia alélica en un estudio caso-control bajo la asunción de un 5% de prevalencia del caso y con un completo desequilibrio de ligamiento, permitiendo un 5% de error  $\alpha$ ), mientras que si se analizan 500.000 SNP el tamaño muestral asciende hasta 1.206<sup>20</sup>.

Además, el caso del tratamiento en CCR es especialmente complicado ya que la mayoría de tratamientos no son monoterapia sino que se administra una combinación de varios fármacos<sup>4</sup>. Esto unido a disminuciones y retrasos de dosis a menudo sin un criterio fijo (criterio médico, reacciones adversas, petición del paciente...) son factores que podría estar alterando los resultados. El estudio de pacientes en tratamiento adyuvante perseguía disminuir esta variabilidad, pero aún así los resultados no han podido validar las observaciones originales, lo que demuestra las limitaciones de este tipo de estudios.

Si además tenemos en cuenta que en los estudios de asociación en farmacogenética no estudiamos un único

SNP sino un número muy variable de ellos la aplicación de correcciones estadísticas mediante análisis multivariantes se hace imprescindible, aunque a menudo no se realizan en estudios farmacogenéticos<sup>21</sup>. En nuestro caso, las 3 asociaciones (rs11615 en *ERCC1* y neutropenia, rs28399433 en *CYP2A6* y neutropenia, y rs2297595 en *DPYD* y náuseas/vómitos) analizadas en la cohorte de exploración de pacientes en tratamiento adyuvante presentaron una significación estadística en un análisis multivariante<sup>17</sup>, corrigiendo, al igual que otros autores, por sexo y PS<sup>22,23</sup>. A pesar de esto, ninguna de estas asociaciones fue replicada en la cohorte de validación, demostrando el importante peso en los resultados finales de todos los factores de variabilidad mencionados anteriormente: tratamiento, tamaño muestral, dosis, etc.

Las distintas cohortes de exploración y validación utilizadas han reflejado características basales diferentes de manera estadísticamente significativas. Esto hace que los resultados tengan que ser tomados con cautela, principalmente el dato del grupo tratado con capecitabina donde la mediana de edad en la cohorte de validación fue cuatro años menor que la de la cohorte de exploración. Sin embargo, dado que lo que analizamos tiene que ver con la toxicidad al tratamiento, tanto el grado del tumor como el tratamiento previo que recibió el paciente son características que podrían afectar mucho a la respuesta al fármaco, pero no a las reacciones adversas. Estas variaciones pueden ser debidas a las distintas formas de prescribir tratamientos que se dan entre hospitales, ya que las cohortes de exploración están compuestas exclusivamente por pacientes del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y las de validación lo están principalmente por pacientes del Hospital Universitario Doce de Octubre. El estudio, por lo tanto asumía que estas diferencias se podían dar y que si las asociaciones se validaban el resultado era más robusto. Y esto no ha sido así.

Muy recientemente se ha demostrado la complejidad de llevar a cabo estudios retrospectivos de biomarcadores, de tal manera que se puede perder una asociación si la población de estudio es heterogénea, tal y como ocurre en el caso de *CYP2D6* y tamoxifeno en cáncer de mama<sup>24</sup>. Nuestro estudio fue prospectivo/retrospectivo, por lo que se añade otro factor de variabilidad en los resultados.

Todo ello demuestra que el camino hacia la aplicación de determinaciones farmacogenéticas en general, y en CCR en particular, pasa ineludiblemente por la validación de estas pruebas con grandes tamaños muestrales debido a las múltiples variables que normalmente se analizan y reducen el tamaño muestral de cada subgrupo, con tratamientos y estadios de enfermedad lo más uniformes posibles y preferentemente con estudios prospectivos.

En conclusión, ninguna de las asociaciones entre variaciones genéticas (rs1128503, rs2032592 y rs1045642 en

*ABCB1*, rs11615 en *ERCC1*, rs28399433 en *CYP2A6* y rs2297595 en *DPYD*) y reacciones adversas a la quimioterapia en pacientes de CCR obtenidas previamente por nuestro grupo fue confirmada en una nueva cohorte de pacientes, mayoritariamente tratados en otro hospital. Pese a ello, sería necesario analizar estas asociaciones en una cohorte más amplia de pacientes, todos ellos con el mismo tratamiento y dosis perfectamente establecidas, antes de desechar su posible utilidad en la predicción de toxicidad a regímenes quimioterápicos a nivel clínico.

## Agradecimientos

El trabajo ha sido financiado por la Fundación Española de Farmacia Hospitalaria (Beca Ruiz-Jarabo 2012) y por el Instituto de Salud Carlos III (PI12/00056).

## Bibliografía

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011; 61: 69-90.
2. Ariadna: Mortalidad por cáncer y otras causas. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Disponible en: <http://cne.isciii.es/ariadna.php>.
3. Luu C, Arrington AK, Schoellhammer HF, Sing G, Kim J. Targeted therapies in colorectal cancer: surgical considerations. *J Gastrointest Oncol*. 2013; 4: 328-36.
4. Kelly H, Goldberg RM. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J Clin Oncol. American Society of Clinical Oncology*. 2005; 23: 4553-60.
5. Chua W, Kho PS, Moore MM, Charles KA, Clarke SJ. Clinical, laboratory and molecular factors predicting chemotherapy efficacy and toxicity in colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2011; 79: 224-50.
6. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of Adverse Drug Reactions in Hospitalized Patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*. 1998; 279: 1200-5.
7. Kadoyama K, Miki I, Tamura T, Brown JB, Sakaeda T, Okuno Y. Adverse event profiles of 5-fluorouracil and capecitabine: data mining of the public version of the FDA Adverse Event Reporting System, AERS, and reproducibility of clinical observations. *Int J Med Sci*. 2012; 9: 33-9.
8. Hartmann JT, Lipp H-P. Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Saf*. 2006; 29: 209-30.
9. Grothey A. Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin Oncol*. 2003; 30 (Suppl. 15): 5-13.
10. Wilson PM, Lenz H-J. Integrating biomarkers into clinical decision making for colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2010; (Suppl. 1): S16-27.
11. Wilson PM, Labonte MJ, Lenz H-J. Molecular markers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer J*. 2010; 16: 262-72.
12. Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H et al. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Research*. 2000; 60: 6921-6.
13. Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, Karrison T, et al. UGT1A1\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J*. 2002; 2: 43-7.
14. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, Swen JJ, McLeod HL, Diasio RB et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guide-

- lines for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 94: 640-5.
15. Gonzalez-Haba E, García MI, Cortejoso L, López-Lillo C, Barrueco N, García-Alfonso P et al. ABCB1 gene polymorphisms are associated with adverse reactions in fluoropyrimidine-treated colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics.* 2010; 11: 1715-23.
  16. Cortejoso L, García MI, García-Alfonso P, Gonzalez-Haba E, Escolar F, Sanjurjo M et al. Differential toxicity biomarkers for irinotecan and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 71: 1463-72. Erratum in: *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 72: 491.
  17. Cortejoso Fernández L. Biomarcadores farmacogenéticos asociados a efectos adversos de la quimioterapia frente al cáncer colorrectal. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2013.
  18. Cortejoso L, Lopez-Fernandez LA. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics.* 2012; 13: 1173-91.
  19. Wang H, Bian T, Liu D, Jin T, Chen Y, Lin A, Chen C. Association analysis of CYP2A6 genotypes and haplotypes with 5-fluorouracil formation from tegafur in human liver microsomes. *Pharmacogenomics.* 2011; 12: 481-92.
  20. Hong EP, Park JW. Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. *Genomics Inform.* 2012; 10: 117-22.
  21. Cobos A, Sánchez P, Aguado J, Carrasco JL. Methodological quality in pharmacogenetic studies with binary assessment of treatment response: a review. *Pharmacogenet Genomics.* 2011; 21: 243-50.
  22. Gordon MA, Zhang W, Yang D, Iqbal S, El-Khouiery A, Nagashima F et al. Gender-specific genomic profiling in metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin. *Pharmacogenomics.* 2011; 12: 27-39.
  23. Sargent DJ, Kohne CH, Sanoff HK, Bot BM, Seymour MT, de Gramont A et al. Pooled Safety and Efficacy Analysis Examining the Effect of Performance Status on Outcomes in Nine First-Line Treatment Trials Using Individual Data From Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2009; 27: 1948-55.
  24. Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whalley R et al. CYP2D6 Genotype and Adjuvant Tamoxifen: Meta-analysis of Heterogeneous Study Populations. *Clin Pharmacol Ther.* 2014; 95: 216-27.