

LA FARMACOGENÉTICA Y LA MEDICINA INDIVIDUALIZADA

M. Baiget, P. Gallano, A. Lasa, E. Tizzano.

Servicio de Genética. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Summary

The last decade has seen rapid progress and development in the understanding of genetic influences that underlie inter-individual differences in drug action and drug response. Differences in DNA sequences that alter the expression or function of proteins that are targeted by drugs can contribute significantly to variation in the responses of individuals.

Many of the genes examined so far are linked to highly penetrant, single-gene traits, but future advances are focused on the more difficult challenge of elucidating multigene determinants of drug response.

The interaction of genomics and medicine has the potential to yield a new set of molecular diagnostic tools that can be used to individualize and optimize drug therapy.

Introducción

De acuerdo con las definiciones elaboradas por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), el término Farmacogenómica (PGx) define la investigación de variaciones en las características del ADN y del ARN que estén relacionadas con la respuesta a los fármacos, mientras que la Farmacogenética (PGt) es el apartado de la PGx que estudia la influencia de las variaciones en la secuencia del ADN en la respuesta a los fármacos. Como información adicional, la EMA indica que la respuesta a los fármacos incluye tanto la farmacocinética como la farmacodinámica y señala además que la PGx y la PGt no incluyen otras disciplinas como la proteómica o la metabolómica.

La idea de que la respuesta a determinados fármacos estaba bajo control genético ya se sugirió en los años 1950 (cuadros hemolíticos severos en pacientes con un déficit de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa al ser tratados con agentes antimaláricos). En las décadas siguientes, cuando se efectuaron estudios familiares y en gemelos y análisis bioquímicos, se reforzó la idea que, finalmente, cristalizó en los últimos años del siglo XX gracias a los estudios de genética molecular. La identificación del primer gen humano con polimorfismos capaces de influenciar el metabolismo de un medicamento tuvo lugar en el año 1988¹. En los últimos años se han descrito un elevado número de genes con distintos tipos de polimorfismos que se han asociado con las diferencias interindividuales de la respuesta a los medicamentos. Estos genes de interés farmacogenético codifican proteínas que pueden estar implicadas en: a) procesos farmacocinéticos (absorción, distribución, elimina-

ción de la molécula), relacionados con el metabolismo del fármaco y con el desarrollo de efectos adversos y b) procesos farmacodinámicos (receptores, proteínas de transporte, dianas terapéuticas) relacionados con la eficacia de un determinado tratamiento.

Se han planteado tres distintas estrategias para realizar un estudio farmacogenético. La gran mayoría de los trabajos publicados se han centrado en una primera estrategia basada en el análisis de los denominados "genes candidatos". Una segunda estrategia de estudio contempla el abordaje de genes que codifican distintas proteínas con participación en una determinada vía metabólica del fármaco en cuestión ("vía metabólica candidata"). Una tercera estrategia plantea el análisis de la totalidad del genoma humano ("genome-wide"). Las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas se han resumido en la Figura 1.

En un buen número de estudios de genes y/o vías metabólicas candidatas, la variabilidad fenotípica observada en el producto génico final sirvió de orientación para la búsqueda de unas bases genéticas que pudiesen explicar dichas variaciones. Por ejemplo, los estudios familiares efectuados para poder explicar las diferencias interindividuales observadas en la respuesta al fármaco hipertensivo debrisoquina, evidenciaron que estos efectos farmacodinámicos tenían carácter hereditario². En estudios subsiguientes se identificó el enzima responsable del metabolismo de la debrisoquina y del gen que lo codificaba (CYP2D6). Finalmente, se describieron las variaciones en la secuencia de dicho gen capaces de causar diferencias fenotípicas en la actividad enzimática de CYP2D6³. Aunque estos marcadores genéticos (gen candidato) con interés en farmacogenética de carácter "mo-

FIGURA 1. Estrategias utilizadas en el análisis de la relación fármaco - genotipo/fenotipo.

Gen "candidato"	Genes de una "vía candidata"	Todo el genoma
• Análisis del gen candidato • Requiere cohortes grandes para testar la asociación • Comporta el riesgo de no encontrar asociación • Aporta la prueba decisiva, si se encuentra asociación	• Análisis de una serie de genes candidatos funcionales relacionados • Requiere cohortes pequeñas para testar la asociación • Comporta el riesgo de pérdida de genes importantes • Aporta una asociación con un significado biológico	• Análisis de todo el genoma (expresión y SNP) • Requiere cohortes pequeñas para testar las asociaciones • El significado biológico es difícil de establecer ya que esta estrategia tiene el riesgo de falsos positivos • Permite identificar nuevas asociaciones

nogénico" existen, se asume que la mayoría de las diferencias fenotípicas en la respuesta a los fármacos podrán explicarse por la interacción de varios genes y los factores ambientales.

En la estrategia de estudio basada en las "vías metabólicas candidatas" se asume que son los efectos de las variaciones en la secuencia de genes que participan en una misma vía los que actúan de forma conjunta para dar lugar a un único fenotipo. Por ejemplo, un genotipo del citocromo CYP2D6 asociado a una elevada capacidad oxidativa junto con un genotipo de baja actividad de conjugación de enzimas de la familia de las glucuronosiltransferasas, daría lugar a una situación en la que el paciente estaría sometido a una mayor exposición a la toxicidad de los metabolitos oxidativos producidos por la acción de determinados medicamentos.

Las estrategias de estudio de todo el genoma son extraordinariamente prometedoras para la identificación de nuevos genes de interés en farmacogenética. Se trataría, por ejemplo de identificar mediante estudios en "arrays" de expresión aquellos genes cuya expresión fuese diferente en pacientes que responden o que no responden a un determinado fármaco. O bien en identificar diferencias entre el grupo de pacientes que desarrollan toxicidad y los que no las desarrollan cuando se les administra un determinado medicamento. Una validez semejante tendría las diferencias que pudiesen identificarse a nivel proteico entre estos grupos efectuando estudios de proteómica. Este tipo de estudios presenta el grave inconveniente de que el resultado de un determinado experimento puede variar dependiendo del tipo de tejido que se haya escogido para el estudio. Por otra parte, el gran número de transcritos y/o de proteí-

nas que se analiza puede dar lugar a la identificación de marcadores que sean, en realidad, falsos positivos.

En el ámbito farmacogenético, una vez se ha implicado un gen en la respuesta a un fármaco, deben realizarse estudios de asociación en cohortes de pacientes de tamaño importante y dichos estudios deben replicarse por distintos grupos de investigación. La posibilidad de efectuar estudios funcionales del marcador genético en estudio favorecen y agilizan la utilización del marcador genético en la práctica clínica.

La Farmacogenética en Oncología: algunos ejemplos

Las diferencias interindividuales debidas a la existencia de polimorfismos genéticos tienen una relevancia especial en el metabolismo de los agentes citotóxicos, con estrecho índice terapéutico, empleados en el tratamiento anti-neoplásico.

Los tratamientos quimioterápicos clásicos de los tumores sólidos incluyen fluoropirimidinas, irinotecan, derivados del platino, taxanos, gemcitabina y, más recientemente, los denominados fármacos biológicos.

El genotipado del gen de la timidilato sintasa en pacientes tratados con 5-fluorouracilo (5-FU) es un ejemplo del potencial de los estudios farmacogenéticos en la predicción de la respuesta. El estudio del gen que codifica para un enzima metabolizador, UGT1A1, tiene una clara aplicación en la predicción de toxicidad en pacientes tratados con irinotecan mientras que los estudios farmacogenéticos de los tratamientos con productos derivados del platino contem-

plan el estudio genotípico de los genes implicados en la reparación del ADN y del gen que codifica la GSTP1.

Farmacogenética del 5-FU

El 5-FU es un profármaco análogo del uracilo con un átomo de flúor en el carbono 5 del anillo de pirimidina.

La timidilato sintetasa (TS), que es un enzima clave del metabolismo de ácido fólico, es la diana farmacológica del 5-FU. La TS cataliza una reacción de metilación de dUMP mediante 5,10-methylenetetrahydrofolate para formar dTMP. El 5-FU forma un complejo con la TS que inhibe su actividad enzimática. Existe una correlación inversa entre la actividad TS y la eficacia del 5-FU.

El gen TS contiene 7 exones y ocupa unas 30 Kb de ADN genómico (Figura 2). En la región 5'UTR del gen TS se han descrito tres polimorfismos diferentes. El primero consiste en una secuencia variable de repeticiones en tándem (VNTR) de 28 pares de bases (pb). Aunque existen alelos con 2, 3, 4, 5 y 9 copias de la secuencia, los alelos con 2 (TS*2) y 3 (TS*3) repeticiones son los más comunes. Existe una asociación entre el polimorfismo VNTR de la TS y los niveles de expresión proteica, probablemente como consecuencia

de la eficiencia en la traducción del gen, y/o de la actividad enzimática; las moléculas de mRNA de la TS con 3 repeticiones se traducen con mayor eficiencia que aquellas con dos repeticiones. El número de repeticiones en tandem también afecta al nivel de actividad de la TS⁴.

El segundo polimorfismo descrito por Mandola et al es un SNP (single nucleotide polymorphism) que consiste en una substitución de G>C en el nucleótido 12 de la segunda repetición en el alelo TS*3⁵. En los alelos TS*3 existen dos "secuencias consenso de la familia USF E-box", mientras que los alelos TS*2 contienen solo una de estas secuencias a las que se unen factores de transcripción. Esta substitución polimórfica cambia un residuo crítico en la secuencia consenso USF E-box y altera la actividad transcripcional del gen TS. (Figura 3). Estos autores demostraron que la presencia de una tercera repetición de 28 pb por si sola no era suficiente para aumentar dicha actividad transcripcional y que para ello era necesaria la existencia del "USF E-box element" en la repetición. Una clasificación final de los alelos TS sería: a) alelos de alta expresión (2R/3G; 3C/3G; 3G/3G) y b) alelos de baja expresión (2R/2R; 2R/3C; 3C/3C). Recientemente se ha descrito la existencia de un tercer polimorfismo en el alelo TS *2 que consiste en un cambio de base de G>C en el nucleótido 12 de las dos repeticiones de 28 pb.

FIGURA 2. Esquema de la estructura del gen de la Timidilato Sintetasa.

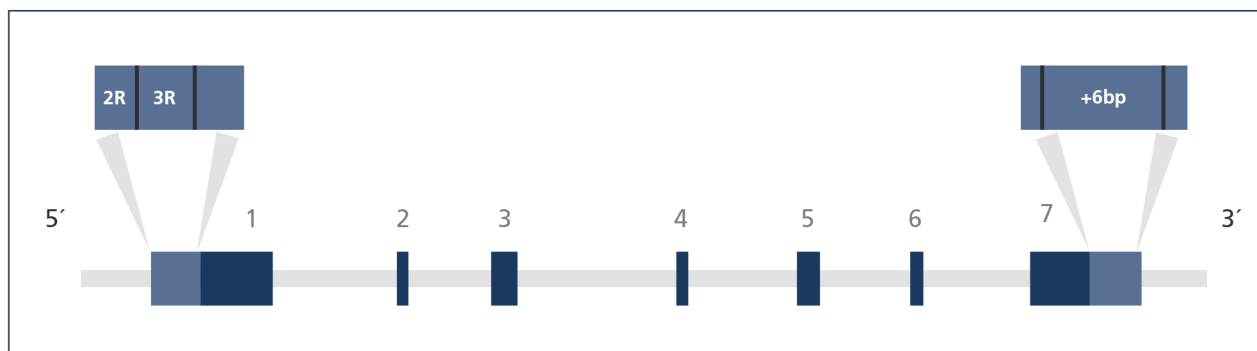
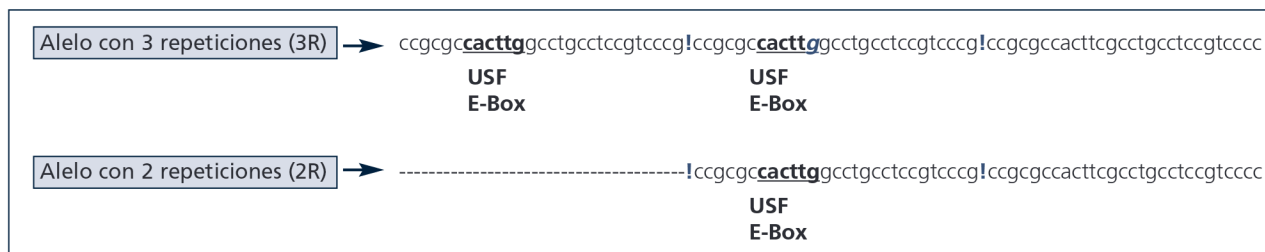


FIGURA 3. Esquema del SNP en la región 5' VNTR del gen de la Timidilato Sintetasa.



Por otro lado, en la región 3' UTR del gen TS, se encuentra un polimorfismo frecuente que consiste en la delección de 6 pb en la posición 1494 (TTAAAG). Este polimorfismo se describió haciendo una investigación en la base de datos pública de secuencias Tag, "Expressed Sequence Tag" (EST). Este polimorfismo causa inestabilidad en el ARNm y está asociado con un descenso de los niveles intratumorales del ARNm de la TS.

Se ha reportado que la expresión de TS está influenciada por los VNTR del promotor del gen TS. Pullarkat et al.⁶, hallaron unos niveles de TS mRNA más altos en individuos homocigotos TS*3 cuando los comparaban con homocigotos TS*2 ($p=0,004$) y mostraron que, en 50 pacientes con cáncer colorrectal tratados con 5-FU, había una mejor respuesta en aquellos pacientes con un bajo número de repeticiones (50% para *2/*2, 15% para *2/*3 y 9% para *3/*3). Kawakami et al.⁷, en un grupo de 21 pacientes con cáncer gastrointestinal, hallaron niveles más altos de proteína TS en los homocigotos TS*3 que en los heterocigotos TS*2/*3 ($p<0,05$). Villafranca et al. 2001⁸, en su estudio de 65 pacientes con cáncer colorrectal, demostraron que la probabilidad de reducción de la masa tumoral mediante radioterapia y tratamiento con 5-FU dependía del genotipo TS.

Marcuello et al.⁹ demostraron que el grupo de pacientes con cáncer de colon avanzado y con un genotipo asociado a una baja expresión tenía una mejor respuesta clínica ($p=0,035$). La probabilidad de alcanzar respuesta en el grupo de pacientes con un genotipo de baja expresión era 2,9 veces más alto que el de los otros grupos (IC95% 1.03-5.6, $p=0,04$). El tiempo a la progresión fue de 12 meses y de 9 meses en los grupos de baja y alta expresión respectivamente ($p=0,07$, log rank test). La supervivencia global era significativamente mejor en el grupo de baja expresión. En este grupo, fue de 50 meses, mientras que fue de 20 meses en el grupo de pacientes con genotipo de alta expresión ($p=0,03$). El modelo de regresión de Cox demostró que, tras ajustar para otras variables clínicas, el genotipo de la TS resultaba ser un predictor independiente de la supervivencia, tanto de la libre de enfermedad como de la global.

Estudios recientes han relacionado la presencia de efectos adversos del tratamiento con la combinación de ciclofosfamida, metotrexate y 5-FU con un determinado genotipo del enzima 5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), un enzima clave en la vía metabólica de los folatos. Las variantes genéticas de MTHFR podrían, potencialmente, modificar los efectos terapéuticos de los fármacos que interfieren con el transporte y/o metabolismo de los folatos. Podrían también ser capaces de modificar la respuesta clínica de aquellos fármacos cuyo metabolismo o cuyas

dianas terapéuticas dependen de reacciones de metilación. Un polimorfismo relativamente frecuente en el gen MTHFR, que consiste en un cambio C>T en el nucleótido 677, se ha relacionado con la aparición de mucositis en pacientes tratados con metotrexate. Los individuos con un genotipo mutante T/T o aquellos heterocigotos T/C (un 10% y un 40% respectivamente de la población general) tienen una actividad enzimática MTHFR disminuida que se acompaña de unas concentraciones más bajas de folato que las de aquellos con un genotipo C/C¹⁰.

Farmacogenética de los derivados del Platino y de la radioterapia

Los agentes antineoplásicos derivados del Platino (Cisplatino, Oxaliplatino, etc) inhiben la replicación celular mediante la formación de aductos inter e intra hélices de la molécula de ADN. La resistencia a estos fármacos puede ocurrir por distintos mecanismos: disminución de los niveles del fármaco, incremento de la tolerancia celular a los aductos formados por acción del Platino o por un incremento de la actividad reparadora del ADN.

El proceso de reparación del ADN puede representarse como una sinfonia de enzimas que funcionan de forma conjunta para reparar las lesiones que detectan en el ADN. Enzimas como ERCC1, ERCC2 (XPD), XRCC1 con funciones interdependientes sugieren que alteraciones en cualquiera de los genes que los codifican pueden afectar la capacidad de reparación del ADN a niveles relevantes desde el punto de vista clínico.

En distintos trabajos se ha demostrado una asociación entre la expresión del gen ERCC1 y la respuesta clínica y la toxicidad en pacientes tratados con derivados del platino. En un trabajo retrospectivo¹¹ se demuestra que dos polimorfismos del gen ERCC1 se asocian con la respuesta clínica de pacientes con cáncer colorrectal avanzado tratados con 5-FU/oxaliplatino. El primer polimorfismo consiste en el cambio C>T en el codón 118. Los pacientes con genotipo C/C tienen una supervivencia media de 15,3 meses versus 7,0 meses y 11,1 meses en los pacientes con genotipos C/T y T/T respectivamente ($p=0,021$). Esta asociación se mantiene significativa incluso cuando se estratifican los pacientes según ECOG. El estudio del segundo polimorfismo (C>A en posición 8092) indica que los pacientes con alelo A presentan una mejor supervivencia.

En el gen ERCC2 o XPD se ha descrito que el cambio A>C en el codón 751 tiene significado farmacogenético: los pacientes tratados con 5-FU/oxaliplatino con un genotipo A/A presentan una menor probabilidad de progresión y una mejor supervivencia que el resto de pacientes ($p=0,002$)¹².

En cuanto a los polimorfismos del gen XRCC1, Stoehlmacher et al.¹³ han analizado el papel de la sustitución A>C en el codón 399 (Arg399Gln). En pacientes con cáncer colorrectal avanzado tratados con derivados del platino, el grupo que son portadores del alelo Gln presentan un mayor riesgo de baja respuesta al tratamiento ($p=0,038$).

Farmacogenética de los inhibidores de EGFR

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). En base a este hecho, esta molécula se propuso como una buena diana para un tratamiento anticanceroso. Actualmente existen cuatro antagonistas 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.

Puesto que solamente un subgrupo de pacientes podrán beneficiarse del tratamiento con inhibidores de EGFR, es importante identificar y validar los criterios y/o los marcadores biológicos que permitan seleccionar dichos pacientes. Ni los estudios inmunocitoquímicos, ni la presencia de mutaciones somáticas en EGFR¹⁴ se han mostrado como marcadores óptimos. En cuanto al número de copias de EGFR, se ha observado una menor supervivencia en aquellos pacientes con un número normal de copias de EGFR¹⁵.

En el gen EGFR se han descrito tres polimorfismos funcionales que se han asociado con la regulación de EGFR: a) una repetición del dinucleótido CA en el intrón 1; b) un SNP (G>A) en el codón 497 y c) 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.

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).

Los anticuerpos monoclonales pueden ejercer, además, una actividad antitumoral indirecta porque determinan una citotoxicidad mediada por células y dependiente del anticuerpo (ADCC). La efectividad de este mecanismo inmunológico depende de cambios funcionales en el receptor celular para la fracción constante de las inmunoglobulinas (FcγγR) 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.

Recientemente, se ha publicado un trabajo que demuestra que la ausencia de mutaciones en el gen KRAS se asocia a una mayor supervivencia en pacientes con CCR tratados con Cetuximab por lo que el estado mutacional de KRAS se ha postulado como un nuevo candidato farmacogenético de marcador de respuesta¹⁶.

Comentarios finales

El estudio y el conocimiento del genoma humano y los avances tecnológicos que lo han hecho posible, sitúan a las ciencias biomédicas en un escenario donde la investigación y la aplicación de estas nuevas posibilidades conllevan una revolución tanto teórica como práctica de conceptos tan relevantes como el de enfermedad y el de terapéutica.

Con el abordaje farmacogenético se pretende la sustitución del actual sistema de "ensayo y error" en la selección y dosificación de los medicamentos por otro, en el cual sea posible evaluar el genotipo del paciente y determinar qué medicamento y a qué dosis conseguirá un balance más adecuado entre su nivel de eficacia y el riesgo de producir reacciones adversas en este paciente en concreto.

La intersección de la genómica con la medicina ofrece la posibilidad de identificar nuevas pruebas diagnósticas útiles en la individualización y en la optimización de diversos tratamientos farmacológicos.

Referencias

1. González FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988; 331: 442-446.
2. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977; 2:584-586.
3. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20:342-349.
4. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV. 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.
5. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz H-J, Ladner RD. 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.
6. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001;1:65-70.
7. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with

- its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 1999;19:3249-3252.
8. Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E, Llarramendi JJ, Arias F, Martinez R, Salgado E, Angeletti S, Brugarolas A. 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.
 9. Marcuello E, Altés A, Del Río E, César A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 3' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 112: 733-737.
 10. Toffoli G, Veronesi A, Boiocchi M, Crivellari D. MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF). *Ann Oncol* 2000;11:373-744.
 11. Park DJ, Zhang W, Stoehlmacher J, Tsao-Wei D, Groshen S, Gil J, Yun J, Sones E, Mallik N, Lenz HJ. 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: 162-166.
 12. Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8654-8658.
 13. Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, Lenz HJ. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 3075-3079.
 14. Tsao AS, Tang XM, Sabloff B, Xiao L, Shigematsu H, Roth J, Spitz M, Hong WK, Gazdar A, Wistuba I. Clinicopathologic characteristics of the EGFR gene mutation in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006; 3 :231-239.
 15. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 2007; 25:3238-3245.
 16. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Annals of Oncology* 2008; 19: 508-515.