

Marcadors genètics d'eficàcia i toxicitat en el tractament del càncer colorectal

Pau Riera Armengol

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) y a través del Repositorio Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Marcadors genètics d'eficàcia i toxicitat en el tractament del càncer colorectal

Tesi doctoral

Pau Riera Armengol Barcelona, 2020





Programa de Doctorat en Biomedicina

MARCADORS GENÈTICS D'EFICÀCIA I TOXICITAT EN EL TRACTAMENT DEL CÀNCER COLORECTAL

Memòria presentada per en Pau Riera Armengol per optar al grau de

Doctor en Biomedicina per la Universitat de Barcelona

Tesi doctoral realitzada a

l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Codirectors

Dr. David Páez López-Bravo

Tutora

Dra. Joana M. Planas Rosselló

Durgh Hand

Dr. Jordi Surrallés Calonge

Doctorand
Pau Riera Armengol



"On m'a appris que le chemin du progrès n'était ni rapide ni facile" (Em van ensenyar que el camí del progrés no és ni ràpid ni fàcil)

(Marie Curie, 1867-1934)

AGRAÏMENTS

En aquest apartat voldria donar les gràcies a totes i cadascuna de les persones que, d'alguna o altra forma, han contribuït a la realització d'aquesta tesi doctoral. En primer lloc, i com no podria ser d'una altra manera, vull agrair la dedicació i esforç dels meus directors de tesi, en David Páez i en Jordi Surrallés, per totes les hores passades pensant en els projectes que podia dur a terme, interpretant els resultats obtinguts, debatent idees, llegint i millorant els articles, revisant la tesi, etc. He après molt de vosaltres i, sens dubte, conec molt millor el càncer colorectal i la genètica que abans de començar aquesta aventura fa quasi cinc anys. A més, vull reconèixer el suport de la tutora, la Joana M. Planas, per l'interès mostrat en la tesi en tot moment. Vull agrair també molt especialment la dedicació de la Juliana Salazar, amb qui he treballat intensament durant tots aquests anys i amb qui hem tirat endavant molts projectes que han conduït a nombroses publicacions. Crec que hem compartit bastant més que el despatx durant aquests anys (fins que el nou edifici de l'Institut de Recerca ens ha separat), he après molt sobre farmacogenètica i recerca al teu costat.

M'agradaria donar les gràcies d'una forma molt especial a la Montserrat Baiget, per donar-me l'oportunitat d'unir-me a la línia de recerca que liderava i per tot el que m'ha ajudat, de forma completament desinteressada, durant tots aquests anys. He après moltíssim de tu. En la mateixa línia vull agrair també a la M.Antònia Mangues que em proposés, ja fa cinc anys, la possibilitat de realitzar la tesi en un camp tan desconegut per a mi, però que alhora em semblava tan fascinant, com el de la farmacogenètica. Espero que tot el que he après durant aquests anys pugui revertir, en la mesura del possible, en un major coneixement d'aquesta disciplina per part de la resta de membres del Servei de Farmàcia.

També vull agrair tot el que m'ha ensenyat l'Elisabeth del Río, els mesos que vaig estar amb tu al laboratori van ser genials, vaig aprendre molt i, alhora, m'ho passava bé, no es pot demanar més. Recordo totes les converses que teníem amb certa nostàlgia (també les de política, que eren les més interessants!). Era un complet ignorant del món de la genètica i amb tu vaig aprendre des de l'extracció de l'ADN fins a la PCR a temps real passant per la seqüenciació. Agraeixo la teva paciència i haver-me ensenyat a "treballar bé"!

Vull donar les gràcies a les altres dues genetistes del pavelló 17, la Lídia i la Laura. He après moltíssim de vosaltres, en sabeu molt de genètica, m'heu ajudat i aconsellat en incomptables ocasions i, el que és sens dubte el més important, som i serem invencibles fent Escape rooms! Recordo molt intensament tots els moments viscuts amb vosaltres, les converses que teníem, així com la mudança al nou IR, tota una odissea! Enyoro quan ens trobàvem cada dia al pavelló 17, era molt familiar i hi estava molt a gust.

Òbviament no me n'oblido de tu, Alícia, vaig estar molt a gust amb tu i vaig aprendre molt d'una genetista quasi matemàtica! És una llàstima que hagis marxat, però espero que estiguis aprenent moltes coses en aquesta nova etapa, ara que ja ets la reina dels haplotips! Tampoc me n'oblido ni de l'Aida ni d'en Joan, hem passat molts bons moments plegats i segur que en podrem passar molts més! També vull agrair a totes les persones amb les quals he col·laborat a nivell científic i que m'han ajudat, com l'Ana Sebio, l'Anna Virgili, la Berta Martín, la Ivana Sullivan, l'Agustí Barnadas, la Cristina Arqueros i la María Jesús Arranz. Gràcies a vosaltres he crescut a nivell científic! Així mateix, valoro molt especialment l'ajuda desinteressada d'en Ramon Mangues. Gràcies a tu he pogut gaudir d'un contracte Río Hortega per desenvolupar la meva tesi doctoral. Espero que puguem col·laborar en un futur ben proper i fer projectes conjuntament.

De la mateixa manera, vull agrair l'ajuda de tots i cadascun dels membres del Servei de Genètica: la Pía, per la seva ajuda en els moments que més la necessitava; l'Adriana, per les incomptables anècdotes que hem viscut plegats, des de les discussions sobre el Qubit fins al vídeo fent experiments amb la teva filla; en Benja, per la paciència que has tingut amb les anàlisis bioinformàtiques; la Sara, per tots els consells i per la teva ajuda, sempre que he tingut un dubte o he necessitat quelcom m'has ajudat; tots els altres companys del Servei de Genètica (Mònica, Núria, Esther, Manel, Mª José, Paquita) així com al personal de les àrees comunes (Elisabeth, Déu n'hi do com et vaig atabalar amb els meus RUNS...) i de secretaria (Tere i Montse). També vull agrair la col·laboració de tots els membres del grup de recerca d'en Jordi Surrallés, en especial la de la Cristina i en Mingui, per tot el que m'heu ajudat i guiat en els estudis amb cultius cel·lulars (i WB!).

No me n'oblido tampoc dels meus companys del Servei de Farmàcia, amb qui vaig començar la meva experiència laboral a l'Hospital de Sant Pau i la continuo a dia d'avui. De tots vosaltres he après moltíssim i he viscut grans experiències. Molts de vosaltres no sou només companys de feina, sinó amics amb qui comparteixo molt bons moments (àpats, cine, Escape rooms, etc). Tant de bo puguem mantenir la relació molts anys més! Tampoc me n'oblido de les meves amigues de la uni (Eva, Anna, Irene, Sílvia), gràcies per totes les quedades que anem fent i els grans moments que vivim junts! (per quan un nou tast de vins?). Vull mencionar també les meves excompanyes de pis, la Mar, la Carla i l'Alba! Tot i que ens veiem bastant menys que abans, cada cop que quedem m'ho passo molt bé amb vosaltres. Òbviament vull agrair a l'Alba i a en Joan el disseny de la portada de la tesi, jo hauria estat absolutament incapaç de fer una cosa tan maca!

Vull agrair també l'interès que sempre heu mostrat els amics de Loreto The Originals (Arnau, Ferran i Esteve), amb vosaltres el temps passa volant (menys quan en Ferran em critica, si continues així no et vindré a veure a Madrid). Arnau i Ferran, va ser genial compartir pis amb vosaltres durant 4 anys, i un orgull viure al mateix carrer que la Pilar de Saber y Ganar! També vull mencionar, és clar, la Núria Admetlla, la Lucía i les germanes Domingo, que he conegut més tard però amb qui tinc gran afinitat!

Ha arribat el moment de viatjar cap a Salt, on he viscut durant gran part de la meva vida i hi tinc molts amics que òbviament vull anomenar. En primer lloc, vull citar tots els amics i amigues d'Apel·les, la Sara, l'Enric, la Mar, en Jepa, la Marta S, la Marta P, la Rússe i la Núria, pels incomptables moments viscuts junts i tots els que ens queden per viure. M'encanta fer excursions amb vosaltres (si no em deixeu enrere), jugar a jocs de taula (sobretot si són cooperatius) i parlar de política (aviat tocarà tornar-ne a parlar). També vull donar les gràcies als meus amics de Salt-Bcn, en especial a la Mimi, la Teixi i la Neus, per totes les quedades que fem a la capi. Òbviament també vull agrair els grans moments passats amb l'Oriol (les maratons de Dominion i Hanabi m'encanten!), la Leti (boníssimes les galtes de porc) i tots els companys i amics del Cau de Sant Cugat i de Can Tona, amb qui he passat molt bones estones i crescut com a persona.

Finalment, voldria agrair a la meva família tot el suport que m'ha donat i que ha possibilitat que hi torni a haver ben aviat un altre Dr. Riera a la família (i no per ser metge sinó per tenir el doctorat!). Vull agrair als meus avis, tant a en Martí i la Nati, que malauradament ja no hi són, com a en Lluís i la Loreto, que afortunadament encara hi són però que últimament he pogut veure poc, l'interès que han mostrat per tot el que he anat fent durant tota la meva vida. Iaia, sé que no entens del tot bé com és que encara estic estudiant, però si Déu vol (i, com sempre et dic, si no vol esperem que també), ja queda poc. Ben aviat ja tornaré a Salt i ens podrem tornar a veure. També vull agrair a tots els meus oncles, ties, cosins i cosines l'interès en la meva tesi (tant de bo alguns pugueu venir el dia de la defensa!). També vull agrair als meus pares, Robert i Pilar, tot el que m'heu ensenyat des que vaig néixer i el valor que sempre li heu donat a l'educació. Gràcies a vosaltres he pogut estudiar a la universitat sense preocupar-me per pagar ni les matrícules ni l'estada a Barcelona, i sempre que ho he necessitat m'heu ajudat. Finalment ja he acabat la tesi, he tardat força, sí, però bé, l'he acabada! Per acabar vull agrair a la Laia tot el suport durant tots aquests anys, espero que ara que tindré bastant més temps lliure puguem veure'ns més i fer altre cop més coses junts! També vull agrair l'interès de les dues últimes incorporacions a la família, la Laura i en Marçal.

Finalment, vull agrair a tots i cadascun dels pacients que han acceptat participar en els diferents estudis que es presenten en aquesta tesi. Sense la col·laboració de tots ells, res d'això no hauria estat possible.

En definitiva, moltes gràcies a tots!

Barcelona, 1 de juliol de 2020

Pau

RESUM

El càncer colorectal (CCR) és una neoplàsia molt freqüent que causa una elevada mortalitat arreu del món. Els fàrmacs més utilitzats en el seu maneig són quimioteràpics (fluoropirimidines, oxaliplatí i irinotecan), agents biològics contra el receptor del factor de creixement epidèrmic (fàrmacs anti-EGFR, com el cetuximab i el panitumumab) i antiangiogènics (fàrmacs anti-VEGF, com el bevacizumab i l'aflibercept). Malgrat els avenços produïts en els últims anys, l'efectivitat d'aquests fàrmacs continua essent limitada. A més, cal tenir en compte l'elevat cost i toxicitat de molts d'aquests tractaments. És per això que la identificació de marcadors pronòstics i predictius que contribueixin a la individualització terapèutica en CCR i a un ús més cost-efectiu dels seus agents terapèutics és altament interessant.

Aquesta tesi s'ha centrat en la identificació de marcadors genètics d'eficàcia i toxicitat en CCR. El primer estudi ha analitzat si 28 polimorfismes en gens pertanyents a la via del VEGF afecten el pronòstic de pacients amb càncer de còlon d'estadis II-III. Els resultats mostren que els rs9513070 (VEGFR1), rs1137282 (KRAS) i rs35251833 (ITGAV) en modifiquen el pronòstic. Pel que fa a l'irinotecan, la present tesi conté diversos estudis, els resultats dels quals confirmen el paper de l'al·lel UGT1A1*28 com a marcador de toxicitat greu induïda per aquest fàrmac. També es descriu que l'al·lel UGT1A1*37 podria tenir un paper semblant. En canvi, l'al·lel CYP3A4*20 no sembla ser crític en l'aparició d'efectes adversos. A més, s'ha trobat que l'rs1128503 (ABCB1) prediu el desenvolupament de toxicitat gastrointestinal greu (diarrea i mucositis) secundària al tractament amb irinotecan i que l'rs2032582 també està associat al desenvolupament de mucositis greu. A més d'això es presenten els resultats d'un assaig clínic fase II que mostra que els pacients amb genotip UGT1A1*1/*1 o UGT1A1*1/*28, en ser tractats amb dosis d'irinotecan superiors a les estàndard de l'esquema FOLFIRI, presenten una millor taxa de resposta objectiva sense un increment significatiu de la toxicitat. Finalment, el darrer estudi de la tesi s'ha centrat en la cerca de noves variants somàtiques de resistència als agents anti-EGFR. Aquest estudi mostra la rellevància dels gens relacionats amb la insulina i dels gens de la família LRIG en la resistència primària a aquests fàrmacs. En concret, descriu que diverses variants genètiques en IGF1R (I668N i E1218K), IRS2 (T1156M), LRIG1 (T152T), LRIG2 (S697L), LRIG3 (V812M), NRAS (G115Efs*46) i PDGFRA (T301T) són predictives de manca de resposta terapèutica. No s'identifica cap variant somàtica predictiva de bona resposta als fàrmacs anti-EGFR.

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is a common neoplasm that causes high mortality worldwide. The drugs most frequently used for its treatment are chemotherapies (fluoropyrimidines, oxaliplatin and irinotecan), biological agents against the epidermal growth factor receptor (anti-EGFR drugs, such as cetuximab and panitumumab) and antiangiogenic drugs (anti-VEGF drugs, such as bevacizumab and aflibercept). Despite advances in recent years, the effectiveness of these drugs remains limited. Additionally, the high cost and toxicity of many of these therapies must be considered. Identification of prognostic and predictive markers that contribute to therapeutic individualization in CRC and to more cost-effective use of medications is therefore of particular interest.

This thesis focused on the identification of genetic markers of efficacy and toxicity in CRC. The first study analysed whether 28 polymorphisms in genes belonging to the VEGF pathway affected the prognosis of stage II-III colon cancer patients. The results showed that rs9513070 (VEGFR1), rs1137282 (KRAS) and rs35251833 (ITGAV) modified their prognosis. Regarding irinotecan, the present thesis contains several studies, the results of which confirm the role of the UGT1A1*28 allele as a marker of irinotecan-induced severe toxicity. It is also shown that the UGT1A1*37 allele could play a similar role. In contrast, the CYP3A4*20 allele does not appear to be critical for the occurrence of side effects. In addition, it was found that rs1128503 (ABCB1) predicts the development of severe gastrointestinal toxicity (diarrhoea and mucositis) secondary to irinotecan treatment and that rs2032582 is also associated with the development of severe mucositis. Furthermore, the results of a phase II clinical trial showed that patients harbouring the UGT1A1*1/*1 or UGT1A1*1/*28 genotypes undergoing the FOLFIRI scheme with higher than standard doses of irinotecan achieved a better objective response rate without a significant increase in toxicity. The last study in this thesis was focused on the search for new somatic variants of primary resistance to anti-EGFR agents. The findings showed the relevance of insulin-related genes and LRIG family genes on anti-EGFR response. Specifically, it identified several genetic variants in IGF1R (I668N and E1218K), IRS2 (T1156M), LRIG1 (T152T), LRIG2 (S697L), LRIG3 (V812M), NRAS (G115Efs*46) and PDGFRA (T301T) as determinants of resistance to EGFR blockade. No somatic variants predicting good response to anti-EGFR antibodies were identified.

ÍNDEX

RESUM	9
SUMMARY	11
ÍNDEX	
ABREVIATURES	
INTRODUCCIÓ	19
1. EPIDEMIOLOGIA DEL CÀNCER COLORECTAL	21
2. ETIOLOGIA	
3. CARACTERÍSTIQUES ANATÒMIQUES I PATOLÒGIQUES	
4. PATOGÈNIA	
4.1. Vies moleculars del càncer colorectal	
4.1.1. Via de la inestabilitat cromosòmica (CIN)	
4.1.2. Via de la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI)	
4.1.3. Metilació d'illes CpG (CIMP)	
4.1.4. Altres vies	
4.2. Oncogens	
4.3. Gens supressors tumorals	
4.4. Característiques diferencials segons la localització tumoral	
4.5. Classificació molecular del càncer colorectal	
5. DIAGNÒSTIC I ESTADIATGE	
5.1. Diagnòstic	
5.2. Estadiatge	
6. TRACTAMENT I MONITORATGE DE LA MALALTIA	40
6.1. Tractament de la malaltia localitzada	
6.1.1. Tractament del càncer de còlon localitzat	
6.1.2. Tractament del càncer de recte localitzat	
6.2. Tractament de la malaltia metastàtica	
6.3. Utilitat de la biòpsia líquida en càncer colorectal	55
7. MEDICINA DE PRECISIÓ EN CÀNCER COLORECTAL	
7.1. Biomarcadors pronòstics	58
7.2. Biomarcadors predictius de resposta/toxicitat	

7.2.1. Fluoropirimidines: 5-FU i capecitabina
7.2.2. Irinotecan
7.2.3. Oxaliplatí
7.2.4. Anticossos anti-EGFR: cetuximab i panitumumab
7.2.5. Fàrmacs antiangiogènics: bevacizumab i aflibercept
OBJECTIUS
ELS ARTICLES
1. ESTUDI SOBRE LA IDENTIFICACIÓ DE BIOMARCADORS PRONÒSTICS EN CÀNCER DE CÒLON LOCALITZAT
Article 1. Genetic variants in the VEGF pathway as prognostic factors in stages II and III colon cancer
2. ESTUDIS SOBRE LA IDENTIFICACIÓ DE BIOMARCADORS PREDICTIUS DE RESPOSTA I TOXICITAT EN CÀNCER COLORECTAL
METASTÀTIC
2.1. Estudis sobre la identificació de marcadors de toxicitat a l'irinotecan i avaluació de la seva
aplicabilitat clínica
Article 2. Relevance of CYP3A4*20, UGT1A1*37 and UGT1A1*28 variants in irinotecan-induced
severe toxicity
Article 3. Comments on: "Clinical utility of ABCB1 genotyping for preventing toxicity in treatment
with irinotecan" (carta a l'editor)103
Article 4. ABCB1 genetic variants as predictors of irinotecan-induced severe gastrointestinal toxicity
in metastatic colorectal cancer patients 107
Article 5. Pharmacogenetic clinical randomised phase II trial to evaluate the efficacy and safety of
FOLFIRI with high-dose irinotecan (HD-FOLFIRI) in metastatic colorectal cancer patients according to
their UGT1A1 genotype
2.2. Estudi sobre la identificació de variants somàtiques de resistència als agents anti-EGFR 129
Article 6. Novel somatic genetic variants as predictors of resistance to EGFR-targeted therapies in
metastatic colorectal cancer patients 129
RESUM GLOBAL DELS RESULTATS
1. Identificació de biomarcadors pronòstics en càncer de còlon localitzat
2. Identificació de biomarcadors predictius de resposta i toxicitat en càncer colorectal metastàtic 174
2.1. Identificació de marcadors de toxicitat a l'irinotecan i avaluació de la seva aplicabilitat clínica
2.2. Identificació de variants somàtiques de resistència als agents anti-EGFR

DISCUSSIÓ	79
1. Identificació de biomarcadors pronòstics en càncer de còlon localitzat	81
2. Identificació de biomarcadors predictius de resposta i toxicitat en càncer colorectal metastàtic 18	82
2.1. Identificació de marcadors de toxicitat a l'irinotecan i avaluació de la seva aplicabilitat clínica	
	32
2.2. Identificació de variants somàtiques de resistència als agents anti-EGFR	38
CONCLUSIONS	93
BIBLIOGRAFIA	97
ANNEX: ALTRES PUBLICACIONS	27

ABREVIATURES

5-FU: 5-fluorouracil

ABCB1: transportador dependent d'ATP subfamília B membre 1 (ve de l'anglès ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1) ABCC2: transportador dependent d'ATP subfamília C membre 2 (ve de l'anglès ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2) ABCG2: transportador dependent d'ATP subfamília G membre 2 (ve de l'anglès ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2) AJCC: ve de l'anglès American Joint Committee on Cancer APC: ve de l'anglès Adenomatous polyposis coli **BRAF:** ve de l'anglès v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (protooncogen) CCR: càncer colorectal CCRm: càncer colorectal metastàtic cfDNA: ADN lliure circulant (ve de l'anglès cell-free DNA) **CIMP:** metilació d'illes CpG (ve de l'anglès CpG island methylator phenotype) **CIN:** inestabilitat cromosòmica (ve de l'anglès *chromosomal instability*) CPT-11: irinotecan ctDNA: ADN tumoral circulant (ve de l'anglès circulating tumor DNA) CYP3A4: Citocrom P450 Família 3 Subfamília A Membre 4 DPD: dihidropirimidina deshidrogenasa (proteïna) **DPYD:** dihidropirimidina deshidrogenasa (gen) **ECOG:** ve de l'anglès *Eastern Cooperative Oncology Group* EGF: factor de creixement epidèrmic (ve de l'anglès Epidermal growth factor) EGFR: receptor del factor de creixement epidèrmic (ve de l'anglès Epidermal growth factor receptor) EMA: Agència Europea del Medicament (ve de l'anglès European Medicines Agency) **ERK:** ve de l'anglès *extracellular signal–regulated kinase* FDA: ve de l'anglès U.S. Food and Drug Administration (agència reguladora dels Estats Units d'Amèrica) FOLFIRI: esquema quimioteràpic que conté 5-fluorouracil, àcid folínic i irinotecan FOLFOX: esquema quimioteràpic que conté 5-fluorouracil, àcid folínic i oxaliplatí HER2-4: receptors dels factors de creixement epidèrmic humà 2-4 (ve de l'anglès Human epidermal growth factor receptor 2-4) HNPCC: càncer colorectal hereditari no polipòsic (ve de l'anglès Hereditary nonpolyposis colorectal cancer)

KRAS: ve de l'anglès Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (protooncogen)

LV: leucovorina o àcid folínic

MAPK: ve de l'anglès mitogen-activated protein kinase MEK, MAP2K o MAPKK: ve de l'anglès mitogen-activated protein kinase kinase **MMR:** reparació d'errors d'aparellament (ve de l'anglès *mismatch repair*) MSI: inestabilitat de microsatèl·lits (ve de l'anglès microsatellite instability) NCCN: ve de l'anglès National Comprehensive Cancer Network NGS: seqüenciació massiva de nova generació (ve de l'anglès next-generation sequencing) **NRAS:** ve de l'anglès *Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog* (protooncogen) **OX:** oxaliplatí PI3K: fosfoinositol 3-quinasa **PIGF:** factor de creixement placentari (ve de l'anglès *Placental Growth Factor*) PIK3CA: ve de l'anglès Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (protooncogen) QT: quimioteràpia RT: radioteràpia SG: supervivència global **SLCO1B1:** transportador d'anions orgànics 1B1 (ve de l'anglès Solute carrier organic anion transporter family member 1B1) SLP: supervivència lliure de progressió SLR: supervivència lliure de recaiguda SNP: polimorfisme d'un únic nucleòtid (ve de l'anglès Single Nucleotide Polymorphism) **TGF-** α : factor de creixement transformador alfa (ve de l'anglès *Transforming growth factor alpha*) **TGF-**β: factor de creixement transformador beta (ve de l'anglès *Transforming growth factor beta*) TNM: ve de l'anglès Tumor, Node, Metastasis **TP53:** proteïna tumoral 53 (ve de l'anglès *Tumor protein p53*) **TRK:** receptor tropomiosina quinasa (ve de l'anglès *Tropomyosin receptor kinase*) UGT1A1: uridindifosfat glucuronil transferasa família 1 membre A1 **VEGF:** factor de creixement endotelial vascular (ve de l'anglès Vascular endothelial growth factor) VEGFR1/FLT1: receptor de tipus 1 del factor de creixement endotelial vascular (ve de l'anglès Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1/Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1). VEGFR2/KDR: receptor de tipus 2 del factor de creixement endotelial vascular (ve de l'anglès Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2/Kinase Insert Domain Receptor) XEL: capecitabina (abreviatura que prové de la marca comercial: Xeloda®) XELIRI: esquema quimioteràpic que conté capecitabina i irinotecan **XELOX:** esquema quimioteràpic que conté capecitabina i oxaliplatí

Introducció

1. EPIDEMIOLOGIA DEL CÀNCER COLORECTAL

El càncer colorectal (CCR) és una neoplàsia molt freqüent que s'associa a una alta mortalitat arreu del món. En concret, es diagnostiquen més d'1,8 milions de casos anuals (10,2% del total de càncers), dels quals 1,1 milions es corresponen amb càncer de còlon (61%) i 700.000 (39%) amb càncer de recte. Globalment, es produeixen unes 880.000 morts a causa del CCR (9,2% del total de defuncions per càncer). Es tracta del tercer càncer més comú al món (rere pulmó i mama) i el segon que causa més defuncions, només superat pel càncer de pulmó (Figura 1) (1). Per sexes, és el tercer càncer més comú en homes (rere pulmó i pròstata) i el segon en dones (rere mama), i representa la quarta causa de mortalitat per càncer en homes (superat pel de pulmó, fetge i estómac) i la tercera en dones (superat pel de mama i pulmó) (1). Cal destacar que la incidència del CCR no és uniforme. Així doncs, presenta una incidència elevada a Amèrica del Nord, Europa, Austràlia i Nova Zelanda (> 40 casos/100.000 habitants) i, en canvi, molt baixa a l'Àfrica rural (< 5 casos/100.000 habitants) (2).



Figura 1. Casos nous de càncer diagnosticats el 2018 (dades mundials). Figura adaptada de Globocan 2018 (1).

Malgrat aquestes xifres elevades, cal destacar que la incidència i mortalitat del CCR ha anat disminuint progressivament durant les darreres dècades (Figura 2). En concret, als Estats Units d'Amèrica (EUA) la incidència ha disminuït un 45% des de mitjans dels anys 80, mentre que la mortalitat s'ha reduït en més d'un 50% (3). El cribratge poblacional, que permet no només la detecció precoç del CCR sinó també la seva prevenció, podria explicar parcialment aquestes dades. Tanmateix, altres factors també hi podrien haver contribuït, com ara la millora en les tècniques quirúrgiques i els tractaments, la disminució en la ingesta de nitrosamines o l'ús d'AINEs o estatines, entre d'altres (3).



Figura 2. Mortalitat i incidència del CCR en població dels EUA de 50 anys o més. Figura adaptada de Welch et al (3).

Pel que fa a Europa, es produeixen unes 177.400 morts anuals per CCR (98.000 en homes i 79.400 en dones), la qual cosa representa la segona causa de mort per càncer en homes (rere el càncer de pulmó) i la tercera en dones (rere els càncers de pulmó i mama) (4).

A l'estat espanyol, el CCR és el càncer més habitual. Es diagnostiquen uns 37.000 casos nous anuals (23.000 en homes i 14.000 en dones, aproximadament) (Figura 3). En concret, és el segon càncer més freqüent en homes (14,6%) i en dones (12,6%), només per darrere dels càncers de pròstata i mama, respectivament (Figura 4) (1). Aproximadament un 40% dels pacients es moren, raó per la qual es produeixen unes 15.000 morts anuals per aquesta malaltia.



Figura 3. Casos nous de càncer diagnosticats el 2018 en població espanyola. Figura adaptada de Globocan 2018 (1).



Figura 4. Casos nous de càncer diagnosticats el 2018 en població espanyola (dades per sexe). Figures adaptades de Globocan 2018 (1).

Pel que fa a Catalunya, segons el Pla Director d'Oncologia de 2016, actualitzat el 2018, el CCR constitueix la neoplàsia més freqüent al nostre país, només superada en homes pel càncer de pròstata i en dones pel de mama, de forma anàloga al que s'observa al conjunt de l'estat. Suposa aproximadament el 16% de totes les neoplàsies malignes (sense incloure el càncer de pell no melanoma), i afecta sobretot la població adulta. En concret, a Catalunya el 2017 es van diagnosticar 3.607 casos nous en homes (87,3 casos/100.000 habitants) i 2.594 casos nous en dones (63,1 casos/100.000 habitants). Aquesta major incidència en la població masculina podria ser atribuïble al paper protector de les hormones femenines i a l'exposició diferencial a factors de risc entre ambdós sexes. A diferència del que s'observa als EUA, la incidència d'aquest tumor augmenta anualment un 1,3 % en homes i un 0,5% en dones (5). Es preveu que la incidència d'aquest tumor continuï augmentant els propers anys, sobretot en població anciana (6).

Pel que fa a la mortalitat, el CCR representa la segona causa de mortalitat per càncer en homes, rere el càncer de pulmó, i la primera en dones, superant lleugerament la mortalitat per càncer de mama. El 2017, a Catalunya es van produir 2.659 morts per CCR. La supervivència actual als 5 anys és d'un 56% en els homes i d'un 61% en les dones. La mortalitat disminueix anualment un 1,2% en les dones i es manté pràcticament estable en els homes (5). Tenint en compte l'augment sostingut de la incidència, l'estabilitat o lleugera millora en les dades de mortalitat s'explicaria per l'establiment dels programes de detecció precoç i els avenços terapèutics dels darrers anys.

2. ETIOLOGIA

L'etiologia del CCR és complexa. Hi ha múltiples factors, tant genètics com ambientals, que s'han relacionat amb l'aparició d'aquesta patologia. De la totalitat de tumors de CCR que es diagnostiquen, aproximadament un 90-95% es consideren esporàdics i s'atribueixen sobretot a causes ambientals, tot i que també hi influeixen factors genètics. El 5-10% restants són hereditaris, i la seva aparició va associada a alteracions en gens de susceptibilitat (7). S'han descrit diversos factors de risc associats a l'aparició de CCR, entre els quals destaquen:

- Edat: la probabilitat de presentar un CCR augmenta amb l'edat. La seva incidència és 10 vegades superior en majors de 65 anys i és també en aquest subgrup on es produeixen la majoria de morts (8). Tanmateix, cal destacar que la incidència en menors de 50 anys està creixent. En aquests pacients els càncers solen ser diagnosticats en estadis més avançats i localització distal (9–11).
- Sexe: la incidència és al voltant d'un 35% superior en homes que en dones (12).
- > **Dieta:** hi ha controvèrsia sobre la rellevància de l'alimentació en el risc de desenvolupar CCR.
 - Ingesta de carn vermella: la majoria d'estudis han postulat que la ingesta de carn vermella (porc, vedella, xai), carn processada i greixos d'origen animal podrien incrementar el risc de patir CCR (2,13–15).
 - <u>Ingesta de fibra:</u> es considera que la ingesta d'aliments rics en fibra (verdures, fruites, cereals integrals, llegums) podria diluir els agents carcinogènics en la femta, disminuir el temps de trànsit colònic i crear un ambient favorable al còlon. No obstant això, no ha demostrat que redueixi de forma significativa el risc de CCR (15,16).

 <u>Suplementació vitamínica</u>: actualment hi ha controvèrsia sobre el possible paper protector de la ingesta de calci i vitamina D en el risc de desenvolupar CCR. De fet, diversos estudis no han pogut corroborar-ho (17,18).

Hàbits de vida:

- o <u>Sedentarisme</u>: la realització regular d'exercici físic disminueix el risc de presentar CCR (13).
- <u>Obesitat:</u> un sobrepès excessiu s'ha associat a l'aparició de CCR (13).
- <u>Hàbit tabàquic:</u> tot i que no és un factor de risc tan clau com en altres càncers (pulmó, laringe, etc), aproximadament un 12% dels casos de CCR s'atribueix a l'hàbit tabàquic (13).
- <u>Ingesta d'alcohol</u>: al voltant d'un 13% dels casos de CCR s'atribueixen a un consum excessiu d'alcohol (13,15).
- Antecedents de malaltia inflamatòria intestinal: els pacients amb malaltia inflamatòria intestinal (malaltia de Crohn o colitis ulcerosa) tenen un major risc de desenvolupar un CCR (19).
- Presència de pòlips colorectals: tot i que la majoria de pòlips són benignes, hi ha un tipus, els adenomes, que poden transformar-se en càncer. Habitualment la colonoscòpia permet efectuar un diagnòstic histològic i tractar la majoria dels pòlips mitjançant la resecció endoscòpica complerta (polipectomia).
- Antecedents familiars de càncer colorectal (predisposició genètica): tot i que la majoria de CCR són esporàdics, al voltant d'un 5-10% es consideren hereditaris:
 - O Poliposi adenomatosa familiar: poc comuna (0,5-1% de tots els CCR). És una malaltia hereditària autosòmica dominant, produïda per mutacions en el gen APC. En un 30% aproximat dels casos són mutacions *de novo*, sense una història familiar prèvia. Es caracteritza per l'existència de múltiples pòlips ubicats al còlon i al recte. En aquests pacients es recomana la realització d'una panproctocolectomia profilàctica després de la pubertat, ja que si no s'efectua la probabilitat de tenir un CCR als 40 anys és del 100% (7,20).
 - <u>CCR hereditari no polipòsic o síndrome de Lynch (HNPCC)</u>: és el tipus més freqüent de CCR hereditari (representa aproximadament un 3-5% de tots els CCR). Es tracta també d'una malaltia hereditària autosòmica dominant però què, a diferència de la poliposi edematosa familiar, presenta un número escàs de pòlips adenomatosos. Es relaciona amb la presència de mutacions germinals en gens implicats en la reparació d'errors de replicació de l'ADN

(mismatch repair: MMR), com ara els gens *MLH1, MSH2, MSH6* o *PMS2* (7). També es pot produir per mutació del gen *EPCAM*, que duu al silenciament del gen veí *MSH2*. Els pacients amb síndrome de Lynch desenvolupen CCR a una edat també primerenca (40-45 anys), de localització habitualment proximal i de millor pronòstic que el CCR esporàdic. A més, tenen una major susceptibilitat a desenvolupar altres càncers: ovari, endometri, estómac, urinari, intestí prim o hepatobiliar (7,20).

Tenint en compte els diferents factors que contribueixen a l'aparició de CCR, s'han descrit diverses mesures de prevenció primària, entre les quals destaquen:

- > Mesures dietètiques: dieta rica en fibra, baixa en greixos i amb alt contingut de vitamina D i calci.
- Estil de vida: exercici regular per evitar l'obesitat i evitar el consum excessiu de begudes alcohòliques.
- Tractament quirúrgic: tal i com ja s'ha comentat, es recomana la realització d'una panproctocolectomia profilàctica en pacients amb poliposi adenomatosa familiar.

Entre les mesures de prevenció secundària, s'ha suggerit que nivells plasmàtics superiors de 25hidroxicolecalciferol s'associen a un menor risc de recaiguda i mort en pacients amb CCR (21,22).

3. CARACTERÍSTIQUES ANATÒMIQUES I PATOLÒGIQUES

L'intestí gros (o budell gros/gruixut) està constituït pel cec, el còlon, el recte i el canal anal i mesura 1,5 metres aproximadament. S'anomena recte als últims 15 cm, que connecten finalment amb l'anus. El còlon, que comença a continuació del cec, està constituït per quatre seccions: el còlon ascendent (25 cm), que correspon a la part dreta de l'abdomen; el còlon transvers (50 cm), que creua per la part superior de l'abdomen, de dreta a esquerra; el còlon descendent (30 cm), ubicat a la part esquerra de l'abdomen i, finalment, el còlon sigmoide o sigma (20 cm), que a la part final connecta amb el recte (Figura 5A). El còlon també es pot subdividir en dos segments principals: el còlon proximal (inclou el cec, el còlon ascendent i el còlon transvers) i el còlon distal (inclou el còlon descendent i el sigma).

Pel que fa a la histologia, el còlon està constituït per diverses capes tissulars. Anant des de la llum intestinal cap a l'exterior hi trobem la mucosa (conté l'epiteli la làmina pròpia), seguida de la submucosa, la capa muscular (també coneguda com *muscularis propia*) i, finalment, la serosa (Figura 5B).



Figura 5. A) Característiques anatòmiques de l'intestí gros; B) Capes histològiques del còlon. (Figures adaptades de https://www.aecc.es).

Els aliments digerits prèviament a través de l'estómac i l'intestí prim arriben finalment a aquesta zona de l'aparell digestiu, en la qual s'absorbeixen l'aigua i les sals minerals dels residus sòlids, abans que siguin eliminats definitivament de l'organisme per la femta. Tot el còlon està irrigat per vasos sanguinis i limfàtics. Aquests últims es connecten amb els ganglis limfàtics, ubicats al llarg de tot el budell gruixut.

El CCR comença a la mucosa i pot afectar més capes (fins i tot totes) de la paret intestinal. Aquest és un aspecte important per determinar el grau d'afectació del càncer. A més, el CCR es pot disseminar més enllà del la mucosa on s'ha originat. Normalment es produeix en primer lloc una extensió local, seguida d'una infiltració limfàtica i, finalment, disseminació hematògena (a distància). Una altra forma de progressió tumoral és la carcinomatosi peritoneal. A continuació es resumeixen aquestes vies de disseminació:

- <u>Extensió local</u>: el càncer pot créixer en totes direccions, a través de la paret intestinal, i pot envair estructures veïnes. Pot estrènyer i, fins i tot, tancar la llum intestinal, provocant una obstrucció o una perforació intestinal.
- <u>Infiltració limfàtica</u>: les cèl·lules tumorals poden desplaçar-se a traves dels vasos limfàtics i arribar als ganglis limfàtics. En l'acte quirúrgic cal detectar i eliminar els ganglis afectats.
- <u>Disseminació hematògena:</u> les cèl·lules tumorals arriben al torrent sanguini. Habitualment arriben, en primer lloc, al fetge, a través de la vena porta, i per això les metàstasis hepàtiques són les més habituals. En els càncers originats en el darrer terç del recte és habitual la presència de metàstasis pulmonars, ja que les venes hemorroïdals mitjanes i inferiors drenen a la vena cava inferior.
- <u>Carcinomatosi peritoneal</u>: es produeix per la invasió del peritoneu per part de les cèl·lules tumorals, la qual cosa pot dur a l'aparició d'ascitis.

Amb relació a la histologia, la majoria de tumors intestinals són epitelials, essent l'adenocarcinoma el tipus histològic més freqüent (90-95%). Altres tipus menys freqüents són l'adenocarcinoma mucinós, els tumors carcinoides, el carcinoma epidermoide, etc. Quant al grau de diferenciació, els tumors s'agrupen en tumors de baix grau (ben i moderadament diferenciats) i d'alt grau (pobrament diferenciats). Aquests últims presenten un pitjor pronòstic.

4. PATOGÈNIA

El CCR s'origina com a resultat d'una proliferació cel·lular descontrolada, amb múltiples gens i vies implicades en el procés de carcinogènesi. L'inici i creixement del tumor es deu a l'acumulació de mutacions en protooncogens (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, etc.) i en gens supressors de tumors (*APC*, *TP53*, *SMAD4*, *PTEN*, etc.), les quals desregulen vies de senyalització claus on hi participen la WNT/ β -catenina, el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR), el factor de creixement transformador beta (TGF- β), etc. Aquestes alteracions es troben en la majoria de tumors avançats, els quals es poden classificar segons presentin inestabilitat cromosòmica (CIN) o inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) (23).

Més del 90% dels CCR es desenvolupen a partir d'adenomes (pòlips adenomatosos), el que es coneix com a "seqüència adenoma-carcinoma". Aquest procés sol iniciar-se amb una mutació en el gen *APC* (gen supressor de tumors, involucrat en l'adhesió cel·lular) i es forma un adenoma petit. A continuació es produeix una mutació en *RAS* i l'adenoma creix assolint una mida gran. Finalment, per culminar el procés de carcinogènesi i esdevenir un carcinoma, apareixen mutacions en el gen *PIK3CA*, *TGFB*, en gens implicats en el cicle cel·lular o en l'apoptosi, etc. (23–25) (Figura 6).



Figura 6. Desenvolupament del càncer colorectal: seqüència epiteli colònic normal-adenoma-carcinoma. Figura adaptada de Vogelstein *et al* (25).

INTRODUCCIÓ

4.1. Vies moleculars del càncer colorectal

La seqüència "adenoma-carcinoma" (Figura 6) es caracteritza per una acumulació d'alteracions genètiques i epigenètiques. S'han descrit tres vies moleculars principals en CCR, que es detallen a continuació i es resumeixen a la Taula 1.

4.1.1. Via de la inestabilitat cromosòmica (CIN)

Aquesta via, caracteritzada per l'existència de nombrosos canvis en el nombre i estructura dels cromosomes, és la més freqüent en la carcinogènesi del CCR (80-85% dels casos) i sol produir-se per mutacions en el gen *APC*. En conseqüència, té lloc un funcionament anòmal de la via WNT/β-catenina, que duu a l'acumulació de β-catenina, la qual activa la transcripció de diversos gens que afavoreixen la proliferació cel·lular, com ara *MYC* (26). A part de mutacions en el gen *APC*, també és habitual la presència de mutacions en els gens *TP53*, *SMAD4*, *KRAS*, *TGFB2*, etc. Els tumors resultants no són hipermutats, a diferència dels tumors amb MSI, sinó que presenten inestabilitat cromosòmica.

4.1.2. Via de la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI)

Aquesta via, també coneguda com a "via del fenotip mutador" i present en un 15-20% dels casos, es caracteritza per la inactivació dels gens de reparació d'errors d'aparellament (mismatch repair, MMR) de l'ADN, la qual cosa comporta un increment en el nombre de mutacions i s'associa a l'existència de MSI (27). Els microsatèl·lits són sequències repetitives d'ADN d'1-4 nucleòtids que es troben repartides per tot el genoma i que són particularment sensibles a una manca de funcionament correcte dels gens MMR. En el cas que hi hagi deficiència de les proteïnes MMR (dMMR), es generen errades en la reparació de l'ADN, les quals provoquen canvis en la mida i nombre dels microsatèl·lits (7,28,29). A la pràctica, els pacients dMMR presenten tumors amb MSI, per la qual cosa ambdós conceptes estan estretament relacionats. Els esdeveniments característics d'aquesta via inclouen un percentatge elevat de mutacions per alteració en el marc de lectura ("frameshift") en diferents gens. Aquests tumors són hipermutats, més habituals en còlon dret, sovint presenten infiltració limfocitària i tenen un millor pronòstic en estadis localitzats (23,30). En estadis avançats, responen favorablement al tractament amb immunoteràpia (31–33). La forma hereditària dels CCR desenvolupats a través d'aquesta via es coneix com a Síndrome de Lynch o càncer colorectal hereditari no polipòsic (HNPCC). Es caracteritza per la presència d'una mutació germinal en els gens de reparació MLH1, MSH2, MSH6 o PMS2. Les mutacions en MLH1 i MSH2 representen el 90% dels casos. En la forma esporàdica d'aquest tipus de CCR, sol produir-se la hipermetilació del promotor de MLH1, amb la conseqüent inactivació del gen (34).

La determinació de la MSI és una pràctica habitual en els pacients diagnosticats de CCR. Es pot fer molecularment, mitjançant l'estudi de cinc regions conegudes, que són àrees de microsatèl·lits, o per immunohistoquímica. La segona opció és la que se sol utilitzar pel seu menor cost, i consisteix en detectar la presència o absència de les proteïnes d'interès. Els resultats poden ser els següents:

- Totes les proteïnes estan presents (80% dels casos): el tumor no presenta MSI.
- Pèrdua d'expressió d'MLH1 i PMS2 (15% dels casos): en un 80% dels casos la inexistència de la proteïna es deu a la metilació del gen *MLH1*, i no a la presència de mutacions. Per determinar si la manca de proteïna MLH1 es deu a metilació, s'estudia la presència de la mutació V600E en *BRAF*. Si *BRAF* està mutat, l'alteració d'MLH1 es considera que no és germinal, sinó que es deu a metilació esporàdica. Si *BRAF* no està mutat, s'efectua l'estudi genètic d'*MLH1*.
- Pèrdua d'expressió d'MSH2 i/o MSH6 o de PMS2 sol (5% dels casos): estudi del gen afectat.

4.1.3. Metilació d'illes CpG (CIMP)

Aquesta via, implicada en la formació de pòlips serrats, es caracteritza per la hipermetilació de la regió promotora d'un elevat nombre de gens (com ara *MLH1*) que contenen illes de dinucleòtids CpG, la qual cosa provoca el seu silenci transcripcional (35–37). Sembla ser que aquesta via sola no pot iniciar el procés de carcinogènesi, i que requereix la contribució de CIN o MSI (38).

	Inestabilitat cromosòmica	Inestabilitat de	Metilació d'illes CpG
	(CIN)	microsatèl·lits (MSI)	(CIMP)
Prevalença	80-85%	15-20%	≤20%
Esdeveniments	Aneuploïdia	Mutacions / epimutacions	Hipermetilació de
moleculars		en gens MMR: comporta	zones promotores de
	Inactivació via Wnt/β-catenina	insercions i/o delecions als	gens amb illes CpG,
		microsatèl·lits	com ara MLH1.
	Alteracions genètiques (guanys/		
	pèrdues al·lèliques) en gens		Mutacions en BRAF
	supressors tumorals i oncogens		
Característiques	Còlon esquerre o recte	Còlon dret	Còlon dret
clíniques			
		Estadiatge menor	Major prevalença en
		Major diferenciació	dones
		Alta infiltració limfocitària	
		Bon pronòstic en estadis	
		localitzats	

Taula 1: Característiques de les vies principals implicades en la carcinogènesi del CCR. Adaptada de González-Pons et al (30).

4.1.4. Altres vies

S'han descrit altres vies moleculars minoritàries implicades en el procés de carcinogènesi. D'entre elles, cal destacar la via desencadenada per mutacions germinals o somàtiques en el domini exonucleasa dels gens *POLD1* i *POLE*, que codifiquen les polimerases δ i ε , respectivament. Aquestes mutacions duen a l'aparició d'un CCR amb fenotip hipermutat que, de forma anàloga als tumors amb MSI, es podria beneficiar del tractament amb immunoteràpia (39).

4.2. Oncogens

Els oncogens s'originen per l'aparició de mutacions activadores en gens implicats en la divisió cel·lular denominats protooncogens. En produir-se aquestes mutacions activadores (habitualment dominants i *missense*, és a dir, de canvi d'aminoàcid), té lloc una activació constitutiva de vies de senyalització implicades en la proliferació cel·lular que inicia el procés de carcinogènesi. En CCR cal destacar els protooncogens *RAS* (inclou *KRAS*, *NRAS* i *HRAS*), *BRAF* i *PIK3CA*, que es detallen a continuació.

RAS

Els protooncogens *RAS* (*KRAS*, *NRAS* i *HRAS*) codifiquen proteïnes G amb activitat GTPasa implicades en la cascada de senyalització de la via de l'EGFR, ruta clau per a la proliferació, diferenciació, adhesió i migració cel·lulars (40). Aquestes proteïnes tenen un paper fonamental en la seqüència adenoma-carcinoma (Figura 6). La forma activada de la proteïna KRAS està unida a GTP. Un 35-45% dels pacients amb CCR presenten mutacions en *KRAS* (sobretot en els codons 12 i 13 de l'exó 2) que inhibeixen l'activitat GTPasa de la proteïna codificada. Això impedeix el pas de GTP a GDP i, per tant, KRAS roman constitutivament activat promovent la senyalització intracel·lular de la via de l'EGFR. També es coneixen mutacions en el gen *NRAS*, tot i que aquestes són molt menys freqüents (1-3% dels pacients amb CCR) (Figura 7) (23,41–45). En la majoria de tumors no hi coexisteixen mutacions en *KRAS* i *NRAS*, raó per la qual es consideren mútuament excloents (43,44). Les mutacions en *HRAS* són molt infreqüents en CCR (43).

> BRAF

El protooncogen *BRAF* codifica una proteïna serina/treonina quinasa de la família RAF que participa en vies de senyalització cel·lular com la de l'EGFR. Es troba mutat en aproximadament un 5-15% dels tumors colorectals, essent la mutació més freqüent la V600E, ubicada a l'exó 15 del gen, que ocasiona un canvi d'aminoàcid (de valina a àcid glutàmic) (44,45) (Figura 7). Tot i que tradicionalment s'ha considerat que les mutacions en *RAS* i *BRAF* eren mútuament excloents, darrerament s'han reportat diversos casos de

31

concomitància (46,47). D'altra banda, cal destacar que més de la meitat dels tumors amb MSI presenten la mutació V600E de *BRAF* (48). De fet, la identificació d'aquesta mutació ajuda a identificar pacients que presenten tumors esporàdics amb inestabilitat de microsatèl·lits per metilació del promotor de MLH1 (48).



Figura 7: Prevalença de mutacions en *KRAS, NRAS* i *BRAF* (només la mutació V600E) en pacients amb CCR. Figura adaptada de Janakiraman *et al* (44).

РІКЗСА

El protooncogen *PIK3CA*, de la família PI3K, apareix mutat en un 15-20% dels pacients amb CCR, independentment de l'estat mutacional de *KRAS* (45,49). Les mutacions activadores descrites fins ara es localitzen fonamentalment en els exons 10 (com ara l'E542K o l'E545K) i 21 (com ara l'H1047R). En CCR, les mutacions de l'exó 10 són més freqüents que les de l'exó 21 (45,49,50). Cal destacar que els exons 10 i 21 sovint apareixen a la literatura com exons 9 i 20 (si es tenen en compte només els exons codificants).

4.3. Gens supressors tumorals

De forma oposada als oncogens, els gens supressors tumorals inhibeixen una proliferació cel·lular excessiva. Són gens implicats en la integritat del genoma, en el cicle cel·lular i en l'apoptosi. Per iniciar el procés de carcinogènesi solen caldre mutacions de pèrdua de funció (truncants) a les dues còpies del gen. A continuació es detallarà el paper dels supressors tumorals APC, p53 i TGF- β , per la seva rellevància en el desenvolupament del CCR.

> APC

Més d'un 80% dels CCR presenten mutacions en el gen *APC*, que són claus per a l'inici del procés de carcinogènesi, en concret per a la transformació de l'epiteli colònic normal en adenoma (Figura 6) (23,51–53). L'APC és necessari per a la degradació de la β -catenina. En absència d'APC, la β -catenina s'acumula, la qual cosa desencadena una activació de la via de senyalització WNT/ β -catenina, que promou la proliferació cel·lular i la inhibició de l'apoptosi (23,26). Tal i com s'ha mencionat anteriorment, mutacions germinals en el gen *APC* són responsables de la Poliposi adenomatosa familiar.

▶ p53

Al voltant d'un 35-55% dels CCR presenten inactivació de p53, proteïna codificada pel gen *TP53*. Aquest supressor tumoral és popularment conegut com el "guardià del genoma", ja que, en presència d'ADN danyat, intervé aturant el cicle cel·lular i, si els danys són suficientment greus, indueix l'apoptosi. A més, també regula l'expressió de gens reparadors (54). La seva inactivació sol coincidir amb la transició d'adenoma gran a carcinoma (Figura 6) (23).

Factor de creixement transformador beta (TGF-β)

La inactivació de la via del factor de creixement transformador beta (TGF- β) s'observa en un elevat nombre de càncers colorectals (Figura 6) (23). El TGF- β és una citocina que promou l'expressió d'inhibidors del cicle cel·lular i actua, per tant, com a supressor tumoral. Tanmateix, també pot ocasionar un efecte contraposat, ja que la secreció de TGF- β per part de les cèl·lules tumorals activa l'estroma tumoral i afavoreix la propagació de la malaltia. De fet, s'ha demostrat que la inhibició d'aquesta citocina prevé l'aparició de metàstasis (55,56). També s'ha reportat que la via de TGF- β promou el desenvolupament de CCR de tipus mesenquimal (subtipus CMS4), que presenta molt mal pronòstic (57,58).

4.4. Característiques diferencials segons la localització tumoral

El còlon dret i l'esquerre procedeixen d'orígens embriològics diferents, la qual cosa implica perfils mutacionals i expressions gèniques diferents (59). Els tumors de còlon dret presenten més habitualment MSI, mutacions en el gen *BRAF* o metilació del gen *MLH1*, mentre que els tumors esquerres s'associen a CIN, p53 o miRNAs (60–64). Els tumors de còlon dret són més agressius i presenten un pitjor pronòstic (65). La Taula 2 resumeix els trets diferencials més destacats en funció de la localització tumoral.

33
	Càncer de còlon dret	Càncer de còlon esquerre	
Incidància	Menor	Major	
incluencia	Més habitual en dones	Més habitual en homes	
	TNM més avançat	TNM més precoç	
Presentació	Major mida tumoral	Menor mida tumoral	
	Major contingut mucinós	Menor contingut mucinós	
Activitat immunològica	Major infiltració limfocitària tumoral	Major component immunosupressor	
	Vies CIMP/ MSI	Via CIN	
	Major càrrega mutacional		
Vies moleculars	Major hipermetilació		
	Més mutacions en BRAF, PIK3CA,	Més mutacions en APC, TP53, etc.	
	SMAD4, etc.		
Microbiota	Menor càrrega bacteriana	Major càrrega bacteriana	
Pronòstic	Pitjor supervivència en estadi avançat Millor supervivència en esta		

Taula 2: Característiques diferencials entre el càncer de còlon dret i esquerre. Taula adaptada de Merlano et al (66).

4.5. Classificació molecular del càncer colorectal

El 2015 es va publicar una nova classificació de consens del CCR que estableix quatre subtipus moleculars (CMS 1-4) amb característiques clíniques i moleculars diferenciades que complementen la informació de les classificacions moleculars prèvies basades en la inestabilitat cromosòmica o de microsatèl·lits, en perfils de metilació i en la quantitat o la presència de determinades mutacions (67).

- <u>CMS1 (subtipus immunològic, ≈14% del global)</u>: els tumors que hi pertanyen es caracteritzen per presentar elevats índexs de mutacions, infiltració immunitària (limfòcits T citotòxics (CD8+), limfòcits T *helper* (CD4+) i cèl·lules *natural killer*), MSI i hipermetilació. Es concentren més en el còlon dret i en estadis localitzats, presenten mutacions en el gen *BRAF* en un percentatge elevat i són més freqüents en dones. Presenten els millors resultats de supervivència quan són diagnosticats en malaltia localitzada, mentre que en malaltia metastàtica presenten pronòstics nefastos. En aquest subgrup de pacients, la manca d'expressió de CDX2 no s'ha associat a un pitjor pronòstic (68).
- <u>CMS2 (subtipus canònic, ≈37% del global)</u>: tumors epitelials que es corresponen amb major fidelitat a la via de carcinogènesi clàssica o canònica, amb una activació molt important de WNT i MYC, inestabilitat cromosòmica, estabilitat de microsatèl·lits (MSS), mutacions en el gen *TP53* i localització preferentment en el còlon esquerre. Presenten una supervivència bona en termes relatius tant en estadis locoregionals com avançats.

- <u>CMS3 (subtipus metabòlic, ≈13% del global)</u>: presenten menors nivells d'inestabilitat cromosòmica i de microsatèl·lits i estan molt enriquits per mutacions en *KRAS*. A més, presenten una desregulació destacada de les vies de senyalització metabòliques, amb un pronòstic intermedi tant en estadis locals com avançats.
- <u>CMS4 (subtipus mesenquimal, ≈23% del global)</u>: es caracteritzen per la presència de marcadors mesenquimals i d'angiogènesi, una elevada infiltració estromal i senyalització molt sobreregulada de la via de TGF-ß. Són els que tenen pitjor pronòstic en malaltia localitzada i no solen respondre a la quimioteràpia (QT). Recentment s'ha vist que aquells tumors CMS4 que, a més, no presenten expressió de CDX2, són de molt mal pronòstic (68). Tanmateix, per les seves característiques podrien beneficiar-se del tractament amb fàrmacs antiangiogènics, com ara el bevacizumab.
- <u>Subtipus mix o indeterminat (≈13% del global)</u>: representen un fenotip de transició o heterogeneïtat tumoral.

	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
	(immunològic)	(canònic)	(metabòlic)	(mesenquimal)
Prevalença	14%	37%	13%	23%
	MSI		MSI mixta	
Ecdovonimonto		Alt SCNA	Baix SCNA	Alt SCNA
moleculars	Elevada CIMP		Baixa CIMP	
	Hipermutats			
	Mutacions en BRAF		Mutacions en KRAS	
Caractorístiques	Infiltració limfocitària	Activació WNT	Desregulació	Infiltració de l'estroma
clíniques	Activació immunitària	i MYC	metabòlica	Activació de TGF-β
				Angiogènesi
Dronàctic	Mal pronòstic a la	Favorable	Intermedi	Desfavorable
FIUIUSUL	recaiguda			

Taula 3: Característiques dels diferents subtipus moleculars en els quals es classifica el càncer colorectal. Taula adaptada de Guinney *et al* (67). Abreviatures: CIMP, metilació d'illes CpG; MSI, inestabilitat de microsatèl·lits; SCNA, alteracions somàtiques del número de còpies.

5. DIAGNÒSTIC I ESTADIATGE

5.1. Diagnòstic

El CCR es pot diagnosticar per la simptomatologia que presenta el pacient o a través del cribratge. En estadis inicials la simptomatologia sol ser inexistent o molt inespecífica, raó per la qual el cribratge és essencial per a la detecció del tumor. Els símptomes que apareixen més habitualment són alteracions del ritme deposicional (74%), sagnat rectal (71%) i dolor abdominal (45%) (69). Sovint, l'indici que permet sospitar l'aparició de CCR és la presència d'anèmia, especialment en homes, que rarament en tenen. Per determinar la presència de CCR es realitzarà una endoscòpia (amb un colonoscopi o sigmoidoscopi). Si es confirma que hi ha una lesió s'efectuarà una biòpsia i, amb tècniques d'imatge, es determinarà l'extensió del tumor.

A dia d'avui encara no existeix un test de cribratge ideal per al CCR. Els tests disponibles actualment són:

Tests basats en femta

a) Detecció de sang oculta en femta

Aquest test serveix per detectar petites quantitats de sang no visibles a simple vista en les deposicions. És un test barat, senzill, no invasiu i que no requereix preparació intestinal. S'ha descrit una reducció del 16% de mortalitat per CCR en els pacients que es sotmeten a aquest test (70). Tanmateix, aproximadament un 50% dels càncers no es detecten amb aquesta prova, per manca de sagnat al moment d'efectuar el test. A més, en el cas que el resultat sigui positiu, cal realitzar posteriorment una colonoscòpia diagnòstica per determinar si la causa és una alteració benigna o un càncer, tal i com recomana l'American Cancer Society (71). En els casos que es detectin pòlips, es poden extreure fàcilment, disminuint així el risc de desenvolupar CCR. A Catalunya s'ha implantat un Programa de detecció precoç del càncer de còlon i recte, en el qual s'invita a participar (mitjançant una carta al domicili) als homes i dones d'entre 50 i 69 anys d'edat, amb una periodicitat biennal. Les dades de 2015 mostren que la cobertura del Programa (mitjançant invitació) va ser del 28%, amb una participació del 48%. Els objectius del Pla director d'oncologia (2017-2019) eren obtenir una cobertura del 100%, amb una participació del 60% de les persones convidades (72). Cal ressaltar el fet que la recomanació de començar el cribratge als 45 anys que fa actualment l'American Cancer Society es va incorporar a l'actualització del 2018 (71). Fins aleshores també recomanava iniciar el cribratge als 50 anys d'edat, tal i com es fa actualment a Catalunya.

b) Test immunoquímic fecal

Utilitza anticossos per detectar hemoglobina a la femta. És un test alternatiu a la detecció de sang oculta en femta, i que també requereix confirmació diagnòstica amb colonoscòpia en cas de resultat positiu.

c) Test d'ADN fecal

Analitza mostres de femta per detectar la presència d'ADN mutat que pugui indicar la presència de càncer. Pot provocar falsos positius i manca de diagnòstic dels pòlips. De forma anàloga als dos tests anteriors, en cas de resultat positiu caldria efectuar una colonoscòpia per confirmar el diagnòstic.

Exàmens visuals (estructurals)

a) <u>Colonoscòpia</u>

La colonoscòpia és la tècnica d'elecció per al diagnòstic del CCR, a causa de la seva alta sensibilitat i especificitat per identificar les lesions, extirpar-les i realitzar biòpsies en casos de tumors infiltrants. Permet visualitzar tot el còlon, incloent el còlon dret (pot no arribar al cec). Tanmateix, també ofereix diversos desavantatges, com ara la necessitat de preparació intestinal prèvia, el cost, la necessitat de sedació i el risc de complicacions, com ara infeccions i perforacions. Seria la prova ideal per al cribratge, però l'insuficient nombre d'endoscopistes i el seu major cost fan que es realitzi el test de sang oculta en femta i que, en cas que sigui positiu, es realitzi una colonoscòpia com a prova de confirmació diagnòstica.

b) <u>Colonoscòpia virtual</u>

Permet examinar tot el còlon mitjançant raigs X. A diferència de la colonoscòpia, no requereix sedació, però sí que cal preparació intestinal prèvia. És una tècnica cara i, en cas que es detectin pòlips o lesions sospitoses, cal realitzar una colonoscòpia per a la seva escissió i/o biòpsia. Aquesta prova permet la visualització de tot el marc colònic en el cas de tumors estenosants.

c) Sigmoidoscòpia

A diferència de la colonoscòpia, la sigmoidoscòpia només permet examinar el terç inferior de l'intestí gros. Permet l'escissió i biòpsia de pòlips. La preparació intestinal prèvia és menor que en la colonoscòpia.

d) Proves radiològiques

En el procés diagnòstic del CCR també s'utilitzen proves radiològiques, entre les quals destaquen la tomografia axial computeritzada (TAC) i la ressonància magnètica (RM). Ambdues proves permeten localitzar el tumor, determinar-ne la mida i detectar si s'ha disseminat al fetge, pulmons o altres òrgans.

Així doncs, a diferència dels exàmens visuals prèviament citats, les proves radiològiques permeten detectar la presència de metàstasis, dada clau per a l'estadificació del CCR i el seu posterior maneig terapèutic.

Utilitat dels marcadors tumorals

Els marcadors tumorals més destacats en CCR són l'antigen carcinoembrionari (CEA) i el CA 19.9. El CEA és un antigen oncofetal que es sobreexpressa en un alt percentatge de pacients amb CCR. Tanmateix, també s'expressa en altres neoplàsies, com ara el càncer gàstric o pancreàtic (73). Cal tenir en compte que aproximadament un 30% dels tumors no l'expressa, sobretot en els casos de tumors pobrament diferenciats (74), i que factors com el tabaquisme o processos inflamatoris poden alterar-ne els seus nivells sèrics (73). Aquesta baixa sensibilitat i especificitat fa que no sigui d'utilitat per al diagnòstic de CCR en pacients asimptomàtics. Així doncs, el CEA s'utilitza sobretot per al monitoratge dels pacients amb tumors localitzats, amb l'objectiu de detectar recidives de forma precoç, així com per al monitoratge de la malaltia disseminada durant el tractament sistèmic, ja que un increment sostingut del CEA és indicatiu de progressió de la malaltia (73,75). Pel que fa al CA 19.9, presenta una sensibilitat menor que el CEA, però nivells elevats d'aquest marcador tumoral s'han associat a un pitjor pronòstic de la malaltia (73).

5.2. Estadiatge

L'estadiatge d'un tumor permet conèixer-ne el seu volum, ubicació i extensió, la qual cosa possibilita avaluar-ne la gravetat i el pronòstic, així com dissenyar la millor estratègia terapèutica possible. Per efectuar aquesta valoració sol utilitzar-se el sistema TNM, on la lletra T fa referència a l'extensió del tumor primari, l'N a l'afectació ganglionar i l'M a la presència de metàstasis a distància. La Taula 4 mostra la classificació TNM per al CCR segons la 8a edició del manual editat per l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) (76).

En base a la classificació TNM d'un CCR es pot realitzar el seu estadiatge. Com major sigui l'estadi del CCR, major és la seva gravetat i pitjor és el seu pronòstic. Es considera que un tumor és d'estadis 0-II quan no s'observa ni afectació ganglionar (són N0) ni metàstasis a distància (són M0). L'estadi III presenta afectació ganglionar (són N>0) però no metàstasis a distància (són M0). Finalment, es parla d'estadi IV quan hi ha presència de metàstasis a distància (són M1). La Figura 8 permet visualitzar els diferents estadis del CCR.

Tumor primari (T)	Afectació ganglionar (N)	Metàstasis a distància (M)		
Tx: no es pot avaluar la invasió	Nx: no es pot avaluar el número	Mx: no es pot avaluar la presència		
tumoral	de ganglis afectats	de metàstasis a distància		
T0: manca d'evidència de tumor	NO: absència de ganglis limfàtics	M0: absència de metàstasis a		
primari	regionals afectats	distància		
Tis: carcinoma <i>in situ</i> :	N1: afectació d'1-3 ganglis	M1: presència de metàstasis a		
intraepitelial o invasió de la	limfàtics regionals	distància		
làmina pròpia	N1a: afectació d'1 gangli	M1a: metàstasis en un òrgan,		
	N1b: afectació de 2-3 ganglis	sense afectació peritoneal		
	N1c: presència de dipòsits	M1b: metàstasis en dos o més		
	tumorals a la subserosa o en els	òrgans, sense afectació peritoneal		
	teixits mesentèrics o	M1c: metàstasis peritoneals, amb o		
	pericolònics o perirectals, sense	sense metàstasis a altres òrgans		
	afectació ganglionar regional			
T1: invasió de la submucosa	N2: afectació de 4 o més ganglis			
	limfàtics regionals			
	N2a: afectació de 4-6 ganglis			
	N2b: afectació de ≥7 ganglis			
T2: invasió de la muscular pròpia,				
sense sobrepassar-la				
T3: invasió, a través de la làmina				
pròpia, de la subserosa o teixits				
pericolònics o perirectals				
T4a: el tumor penetra en el				
peritoneu visceral				
T4b: el tumor invadeix				
directament altres òrgans o				
estructures				

Taula 4: Classificació TNM del càncer colorectal segons la 8a edició de l'American Joint Committee on Cancer (76).



Figura 8: Visualització dels diferents estadis tumorals del CCR (imatge adaptada del National Cancer Institute) (77).

En el moment del diagnòstic, un 75-80% dels pacients presenten malaltia localitzada, majoritàriament d'estadis II-III. El 20-25% restant presenten malaltia metastàtica. Tanmateix, fins a un 50% dels pacients acabarà desenvolupant metàstasis en el transcurs de la malaltia (78). Tal i com s'ha comentat anteriorment, la localització més habitual de les metàstasis és hepàtica. Aproximadament un 10-15% de les metàstasis hepàtiques úniques són potencialment resecables, i un 15% de les inicialment no resecables es converteixen en resecables gràcies a l'administració de QT (79). Tot i que la supervivència dels pacients amb CCR metastàtic (CCRm) ha augmentat sostingudament els darrers anys, se situa al voltant de només 30 mesos (80). La Taula 5 conté la informació relativa als diferents estadis del CCR segons l'AJCC, així com les taxes de supervivència a l'any i als cinc anys del diagnòstic en funció de l'estadi tumoral (76,81).

Estadi	Tumor	Afectació	Metàstasis	Supervivència a l'any		Supervivè	encia als 5
	primari	ganglionar	a distància			an	ys
	(T)	(N)	(M)	Pacients de	Pacients de	Pacients de	Pacients de
				20-64 anys	≥ 65anys	20-64 anys	≥ 65anys
Estadi 0	Tis	NO	M0	Sense	Sense	Sense	Sense
				dades	dades	dades	dades
Estadi I	T1 – T2	NO	M0	98 %	93 %	95 %	89 %
Estadi II	T3 – T4	NO	M0	91-98 %	76-92 %	68-90 %	55-84 %
Estadi III	T1 – T4	N1-N2	M0	94-98 %	77-92 %	62-91 %	46-85 %
Estadi IV	Qualsevol T	Qualsevol N	M1	65 %	39 %	14 %	7 %

Taula 5: Estadiatge del càncer colorectal segons l'American Joint Committee on Cancer, amb les dades de supervivència al cap d'1 any i als 5 anys observades als EUA entre 2004 i 2014 (76,81).

6. TRACTAMENT I MONITORATGE DE LA MALALTIA

L'estratègia terapèutica a seguir difereix substancialment en funció de si el tumor és localitzat o metastàtic (CCRm). En els tumors localitzats, així com en la malaltia metastàtica resecable, la cirurgia amb intenció curativa constitueix la primera opció de tractament. No obstant això, no sempre la curació és possible, ja que la recurrència post-cirurgia és habitual. En el cas de tumors metastàtics irresecables les aproximacions terapèutiques tenen intenció pal·liativa, busquen allargar la supervivència amb qualitat de vida. La localització del tumor, així com les seves característiques moleculars (presència de MSI, estat mutacional de *KRAS, NRAS, BRAF*, etc.), també tenen un pes destacat en l'abordatge terapèutica. Cal tenir en compte també les característiques del pacient (edat, estat funcional segons l'escala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), comorbilitats, etc.) i dels diferents tractaments disponibles. La Figura 9 inclou els diferents condicionants a tenir en compte a l'hora d'escollir la millor opció terapèutica per a cada pacient.

INTRODUCCIÓ



Figura 9. Factors que condicionen el maneig terapèutic del càncer colorectal.

Actualment, el tractament sistèmic del CCR es basa en la utilització de:

- a) <u>Agents quimioteràpics</u>: fluoropirimidines (5-fluorouracil i el seu profàrmac, la capecitabina), trifluridina/tipiracil, oxaliplatí i irinotecan.
- b) <u>Anticossos monoclonals antagonistes d'EGFR:</u> cetuximab i panitumumab.
- c) <u>Fàrmacs amb activitat antiangiogènica:</u> bevacizumab, aflibercept i ramucirumab.
- d) <u>Fàrmacs inhibidors de múltiples proteïnes-cinases:</u> regorafenib.

Alhora, hi ha diversos fàrmacs que es troben en investigació o que han estat recentment aprovats per les agències reguladores (FDA i/o EMA), entre els quals destaquen:

- a) Farmacs immunoterapics: els pacients amb CCR que presenten MSI són particularment sensibles a la immunoteràpia, especialment als inhibidors de PD-1 (pembrolizumab i nivolumab) (31,32). Aproximadament un 5-8 % dels pacients amb malaltia metastàtica presenten MSI al diagnòstic, fet que s'associa a un pitjor pronòstic. Tanmateix, l'aparició de la immunoteràpia està canviant les perspectives terapèutiques d'aquest subgrup de pacients. En aquest sentit, l'agència reguladora americana (FDA) ja ha aprovat el nivolumab (amb/sense ipilimumab) i el pembrolizumab per a aquells pacients amb CCRm dMMR/MSI que hagin progressat al tractament amb fluoropimirimidines, oxaliplatí i irinotecan (82,83). De fet, les guies de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomanen l'ús de nivolumab (amb/sense ipilimumab) o pembrolizumab en pacients amb CCRm dMMR/MSI en segona o tercera línia de tractament (84). Recentment, al Congrés de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) d'enguany s'han presentat els resultats de l'assaig KEYNOTE-177, que ha comparat el tractament en primera línia de pembrolizumab en comparació amb QT ± bevacizumab o cetuximab en pacients amb CCRm dMMR/MSI. Els resultats d'aquest estudi han mostrat un augment significatiu de la supervivència lliure de progressió (SLP) en el grup de pembrolizumab (16,5 vs 8,2 mesos; HR=0,60, p=0,0002). A més, els pacients en el grup de pembrolizumab han presentat menys efectes adversos de graus 3-5 (22% vs 66%) (33). Aquest assaig clínic ha dut a l'aprovació per part de la FDA del pembrolizumab en monoteràpia com a tractament de primera línia dels CCRm dMMR/MSI.
- b) Inhibidors de BRAF inhibidors de MEK: la monoteràpia amb un inhibidor de BRAF (com ara el vemurafenib o el dabrafenib) en pacients amb CCRm que presenten la mutació V600E ha resultat ser poc efectiva i no s'utilitza (85). De fet, la inhibició de V600E desencadena una ràpida activació d'EGFR, la qual cosa provoca que continuï la proliferació cel·lular malgrat la inhibició de BRAF. Per aquest motiu, s'han provat tractaments combinats, vist el fracàs de la monoteràpia. En primer lloc, es va provar la combinació de dabrafenib + trametinib (inhibidor de MEK), que s'ha utilitzat amb èxit per al tractament del melanoma metastàtic amb mutació V600E. Un 12% de pacients amb CCRm van presentar resposta al tractament (86). Posteriorment, els mateixos investigadors van testar la mateixa combinació afegint-hi panitumumab, obtenint en aquesta ocasió un percentatge de resposta clarament superior, del 21% (87). Tot semblava indicar, doncs, que aquesta estratègia terapèutica (inhibidor de BRAF + inhibidor de MEK + antagonista d'EGFR), oferia millors resultats. De fet, l'assaig fase III BEACON, recentment publicat, va mostrar que la combinació d'encorafenib (inhibidor de BRAF), binimetinib (inhibidor de MEK) i cetuximab (antagonista d'EGFR) assolia una taxa de resposta del 26% i una supervivència global (SG) de 9,0 mesos (88). Tanmateix, la combinació d'encorafenib+cetuximab, també avaluada a l'estudi, va

proporcionar uns resultats d'efectivitat similars (taxa de resposta del 20% i SG de 8,4 mesos) amb un perfil de toxicitat més favorable, raó per la qual aquest esquema ha estat recentment aprovat per la FDA i l'EMA. Els pacients del grup control, que van rebre cetuximab+irinotecan o cetuximab+FOLFIRI, van assolir una taxa de resposta de només el 2% i una SG de 5,4 mesos (88).

- c) <u>Nous agents anti-EGFR</u>: el Sym004 és una mescla de dos anticossos monoclonals no solapables, el futuximab i el modotuximab, que ha mostrat eficàcia en pacients que presenten mutacions adquirides de resistència a cetuximab o panitumumab localitzades als dominis extracel·lulars del receptor, com ara la mutació G465R (89).
- d) <u>Agents anti-HER2</u>: un 5% aproximadament dels pacients amb CCR presenten mutacions somàtiques o amplificació d'HER2 (90). Diversos estudis han mostrat que les amplificacions d'HER2 en CCR confereixen sensibilitat a un doble bloqueig anti-HER2. L'assaig clínic fase II HERACLES va mostrar que un 30% dels pacients amb CCRm *KRAS wild-type* positius per a HER2 refractaris als tractaments estàndards responien a un doble tractament anti-HER2 (trastuzumab combinat amb lapatinib) (91). Un estudi posterior va mostrar una taxa de resposta del 32% en pacients amb CCR amb amplificació/sobreexpressió d'HER2 en ser tractats amb la combinació de pertuzumab i trastuzumab (92,93). Finalment, els resultats de l'assaig fase II DESTINY-CRC01, presentats al Congrés de l'ASCO d'enguany, han mostrat que l'ús de trastuzumab-deruxtecan en pacients amb CCRm *RAS/BRAF* natiu i HER2 positiu que hagin progressat a almenys dos tractaments previs permet assolir una taxa de resposta del 45,3%, una taxa de control de la malaltia del 83,0% i una SLP de 6,9 mesos (94).
- e) <u>Inhibidors de MEK + inhibidors de PI3KCA</u>: l'ús concomitant d'inhibidors de MEK1/2 (com el refametinib)
 i PI3KCA (com el pictilisib) també podrien ser efectius en pacients amb CCR que sobreexpressen HER2 (95).
- f) <u>Inhibidor de tumors amb mutació G12C de KRAS</u>: la molècula AMG 510 ha demostrat activitat antitumoral en tumors que presenten la mutació G12C en el gen KRAS (96). Es tracta de la primera molècula que ha mostrat resultats exitosos tenint com a diana terapèutica una mutació de KRAS (97).
- g) <u>Agents per a tumors amb fusions de NTRK</u>: les fusions dels gens NTRK s'han identificat en diversos tumors sòlids, incloent el CCR (98). Malgrat la seva baixa prevalença, la seva identificació és d'elevada utilitat ja que existeixen dos fàrmacs, l'entrectinib i el larotrectinib, que han mostrat efectivitat en tumors sòlids que presenten fusions de NTRK (99).

INTRODUCCIÓ

6.1. Tractament de la malaltia localitzada

6.1.1. Tractament del càncer de còlon localitzat

En el càncer de còlon localitzat el tractament inclou sempre la cirurgia. En funció de l'estadiatge, es contempla també l'administració de QT sistèmica en adjuvància, és a dir, posterior a l'acte quirúrgic, amb l'objectiu de disminuir el risc de recaiguda. En concret, reben QT adjuvant la majoria dels pacients amb estadi III i alguns amb estadi II, els considerats d'alt risc. En canvi, en la malaltia metastàtica, sovint la cirurgia no és possible. En aquests casos, la base del tractament és la QT, associada o no a fàrmacs dirigits. La Figura 10 mostra les estratègies terapèutiques més habituals en funció de l'estadi del tumor (100).



Figura 10: Maneig del càncer de còlon en funció de l'estadi, segons la National Cancer Data Base, 2013. *La quimioteràpia inclou la teràpia dirigida. Figura adaptada de Miller *et al* (100).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, el tractament imprescindible i potencialment curatiu en el càncer de còlon localitzat és la cirurgia. El tractament quirúrgic pot consistir en alguna de les següents intervencions, en funció de la localització i extensió tumoral: hemicolectomia dreta (tumor ubicat al còlon ascendent), hemicolectomia dreta ampliada (tumor ubicat a l'angle hepàtic o a la meitat proximal del còlon transvers), hemicolectomia esquerra (tumor ubicat a la meitat distal del còlon transvers, a l'angle esplènic o al còlon descendent) o sigmoïdectomia (tumor ubicat al sigma). La cirurgia ha d'extirpar el tumor amb marges amplis (5 cm) i procurant maximitzar la limfadenectomia regional, de tal forma que es disposi d'almenys 12 ganglis limfàtics per a l'avaluació patològica. Actualment, la cirurgia per laparoscòpia és la d'elecció, ja que és menys invasiva i obté millors resultats que la cirurgia d'abdomen obert (101). A part de l'extirpació del tumor, en l'acte quirúrgic també es reconstrueix el trànsit intestinal. A més, es realitza una exploració exhaustiva de l'epipló, el fetge i la superfície peritoneal per avaluar la presència de malaltia en aquestes localitzacions que no s'hagi detectat prèviament per imatge.

En funció de l'estadiatge, a la cirurgia s'hi associa o no QT adjuvant, que cal iniciar en les 8 setmanes posteriors a l'acte quirúrgic. La QT adjuvant té com a objectiu reduir la probabilitat de recaiguda mitjançant l'eliminació de cèl·lules tumorals que puguin romandre després de la cirurgia. Inicialment, l'adjuvància estàndard es realitzava amb 5-fluorouracil (5-FU) i leucovorina (LV) (102) o amb capecitabina (Xeloda[®], XEL), que va mostrar uns resultats equivalents (103). Diversos estudis han demostrat el benefici d'afegir oxaliplatí al 5-FU o a la capecitabina. Actualment, el tractament estàndard en estadi III consisteix en combinacions de fluoropirimidines amb oxaliplatí (OX) (esquemes FOLFOX o XELOX) (104–107). No obstant això, en estadi II l'addició d'oxaliplatí no ha demostrat millors resultats que 5FU/LV o capecitabina (108), de manera que la majoria de guies no la recomanen.

L' esquema següent mostra les estratègies terapèutiques més habituals en el maneig del càncer de còlon localitzat, en funció de l'estadi de la malaltia (Figura 11).



Figura 11: Maneig terapèutic del càncer de còlon localitzat.

A continuació es detalla el maneig recomanat a seguir en funció de l'estadi tumoral:

- Estadis 0 i I: no es recomana l'administració de QT adjuvant post-cirurgia (84).
- <u>Estadi II:</u> la QT adjuvant (normalment 5-FU/LV o capecitabina) està recomanada només en els pacients que presenten un risc elevat de recaiguda post-cirurgia (109). La majoria de pacients amb estadi II es curen només amb cirurgia, però hi ha un 15-20% de pacients que recau (110). Per tant,

la identificació de marcadors pronòstics que permetin avaluar el risc de recaiguda en pacients amb estadi II és d'un gran interès. En aquest sentit, la MSI constitueix un factor de bon pronòstic útil en la pràctica clínica diària. Diversos estudis han demostrat que la presència de MSI es relaciona amb una major SG, i que els pacients amb càncer de còlon estadi II que presenten dMMR/MSI no es beneficien de l'administració de QT adjuvant basada en 5-FU (111–114). En canvi, els pacients amb tumors dMMR/MSI d'estadi III sí que es poden beneficiar de la QT adjuvant (112).

S'han descrit diversos factors relacionats amb un major risc de recaiguda, entre els quals destaquen:

- Mida del tumor: els tumors T4 (estadis IIB i IIC) presenten un major risc de recaiguda post-cirurgia.
- Perforació o obstrucció intestinal en el moment del diagnòstic.
- Poca diferenciació tumoral.
- Elevació de l'antigen carcinoembrionari (CEA) preoperatori.
- Invasió perineural i limfovascular.
- Marges positius.
- Resecció de menys de 12 ganglis limfàtics: diversos estudis han mostrat que, com major sigui el número de ganglis limfàtics extrets i analitzats, millor és el pronòstic, fins i tot en els pacients sense ganglis afectats (115–117).
- Manca d'expressió del factor de transcripció CDX2 (68,118).

La detecció de malaltia mínima residual post-cirurgia mitjançant la quantificació de l'ADN tumoral circulant (ctDNA) es presenta com una opció prometedora per optimitzar l'administració de QT adjuvant en aquests pacients i evitar així costos i toxicitats innecessaris (119). Actualment, a la pràctica clínica habitual no es quantifica el ctDNA per decidir l'administració o no de QT adjuvant. El que es fa és, en base als factors pronòstics que s'han citat anteriorment, valorar el risc de recaiguda del pacient i, en funció d'això, decidir si s'administra o no QT adjuvant.

Estadi III: en aquest estadi, l'administració de QT adjuvant amb els esquemes FOLFOX o XELOX es considera altament recomanable i superior a 5-FU/LV, fins i tot en els casos de tumors dMMR/MSI (112). Aquesta recomanació es basa en els resultats de diversos assajos clínics: l'assaig MOSAIC, que va mostrar que la SG als sis anys en el grup de FOLFOX era del 72,9%, mentre que en el grup de 5-FU/LV era del 68,7% (HR=0,80; p=0,023) (104,108); l'assaig NSABP C-07, que va mostrar que els pacients tractats amb l'esquema FOLFOX presentaven una major supervivència lliure de recaiguda (SLR) als vuit anys que els tractats amb l'esquema 5-FU/LV (HR=0,82; p=0,002), tot i que no es van

observar diferències en SG (HR=0,88; p=0,08) (107); i l'assaig NO16968 (XELOXA), que va mostrar que l'adjuvància amb XELOX permetia obtenir una SLR als set anys del 63%, mentre que el tractament amb 5-FU/LV permetia assolir una SLR de tan sols el 56% (HR=0,80; p=0,004). L'esquema XELOX també va mostrar millors resultats en SG (73% vs 67%, HR=0,83; p=0,04) (106). En base als resultats d'aquests estudis, els esquemes FOLFOX i XELOX, en adjuvància, solen administrar-se durant sis mesos. Tanmateix, la neurotoxicitat acumulativa que presenta l'oxaliplatí ha fet plantejar l'opció de règims adjuvants més curts (de 3 mesos de durada) que, en conseqüència, serien menys tòxics. En aquest sentit, l'estudi IDEA ha demostrat la no inferioritat d'administrar tres mesos de XELOX (en comptes de sis mesos) com a tractament adjuvant en pacients amb estadis III de baix risc (T1-3 N1). Aquesta no inferioritat no es va obtenir ni en pacients amb tumors T4 i/o N2 ni tampoc amb l'esquema FOLFOX (120). D'altra banda, en població anciana (>70 anys) sembla que l'addició d'oxaliplatí a les fluoropirimidines suposa un benefici clínic reduït, raó per la qual aquest subgrup poblacional sol rebre adjuvància només amb fluoropirimidines (121). Cal destacar que ni l'irinotecan ni les teràpies dirigides tenen utilitat en adjuvància.

6.1.2. Tractament del càncer de recte localitzat

La majoria de pacients que presenten càncer de recte d'estadi I són tractats quirúrgicament (microcirurgia endoscòpica transanal (TEM), proctectomia o proctocolectomia) i, en molts casos, no cal tractament quimio/radioteràpic. En canvi, els tumors d'estadi II i III són tractats majoritàriament amb QT combinada amb radioteràpia (RT) neoadjuvant, seguida d'intervenció quirúrgica +/- adjuvància. Sovint cal realitzar una ileostomia (normalment temporal) durant l'acte quirúrgic. Pel que fa als tumors d'estadi IV, la QT constitueix l'opció preferent, de forma anàloga al que succeeix en el càncer de còlon (Figura 12) (100).



Figura 12: Maneig del càncer de recte en funció de l'estadi, segons la National Cancer Data Base, 2013.

*La quimioteràpia inclou la teràpia dirigida. Figura adaptada de Miller et al (100).

En el càncer de recte, tot i que el maneig en la malaltia localitzada es basa també en la cirurgia, l'existència dels ossos de la pelvis dificulta l'acte quirúrgic i l'assoliment de marges negatius. Aquest fet augmenta el risc de recurrència locoregional, que és clarament superior al del càncer de còlon. Un dels objectius de la cirurgia de tumors rectals és intentar preservar l'esfínter anal. Per als tumors del terç superior i mitjà això és possible si es realitza una resecció anterior baixa. En canvi, per als tumors del terç inferior sol caldre una resecció abdominoperineal, que requereix la creació d'una colostomia permanent. En l'acte quirúrgic també s'extreu el mesorecte, intentant assegurar uns marges adequats i una bona limfadenectomia.

Una de les diferències més destacades entre el maneig del càncer de recte i el de còlon localitzats és el paper de la RT. Així doncs, mentre en el càncer de còlon la RT pràcticament no s'empra, en càncer de recte s'utilitza en combinació amb QT com a tractament neoadjuvant previ a la cirurgia en els estadis II i III. La dosi habitual de RT és de 45-50,4 Gy, que s'administra concomitantment amb la QT (5-FU o capecitabina) (122–124). L'addició d'oxaliplatí a aquest esquema de quimio-radioteràpia (QT-RT) no millora ni la cirurgia ni la supervivència i, a més, genera més toxicitat, raó per la qual no està recomanada (125). Els objectius de l'ús concomitant de QT i RT són millorar la resectabilitat del tumor primari (neoadjuvància) i disminuir el risc de recurrència locoregional. Recentment diversos estudis, com l'assaig fase III RAPIDO presentat enguany a ASCO, han avaluat l'estratègia coneguda com teràpia total neoadjuvant (TNT), consistent en administrar un esquema curt de RT (5x5 Gy), seguit de QT de consolidació (CAPOX o FOLFOX) i, finalment, cirurgia. Aquest abordatge ha permès millorar les taxes de resposta completa patològica (27,7% vs 13,8%, OR=2,40, p<0,001) i la supervivència lliure de malaltia en relació amb la QT-RT convencional (126). L'eleva-

L'esquema següent (Figura 13) mostra les estratègies terapèutiques més habituals en el maneig del càncer de recte localitzat, en funció de l'estadi de la malaltia.



Figura 13: Maneig terapèutic del càncer de recte localitzat.

INTRODUCCIÓ

6.2. Tractament de la malaltia metastàtica

En el CCRm (estadi IV), l'abordatge terapèutic és molt diferent del de la malaltia localitzada, però és comú per al càncer de còlon i de recte. En la majoria de les ocasions, l'objectiu del tractament no és la curació, sinó l'allargament de la vida amb la millor qualitat possible. Tanmateix, en el CCRm resecable o potencialment resecable la curació és possible. En aquest últim supòsit s'utilitza QT neoadjuvant, amb la finalitat de facilitar la resectabilitat del tumor primari i de la/les metàstasis (habitualment hepàtiques). Sol emprar-se un esquema basat en fluoropirimidines amb oxaliplatí o irinotecan (127), al qual s'hi pot afegir bevacizumab (128–130) o cetuximab (131–133).

En el CCRm irresecable, la primera línia de tractament sol comprendre els règims FOLFOX (5-FU/LV i oxaliplatí) o FOLFIRI (5-FU/LV i irinotecan), als quals es pot associar el bevacizumab o un agent anti-EGFR (cetuximab o panitumumab) (42,134–139). També s'utilitza l'esquema FOLFOXIRI (5-FU/LV, oxaliplatí i irinotecan), amb o sense bevacizumab, especialment per al tractament de tumors *BRAF* o *RAS* mutats, o en aquells que són *RAS wild-type* però de localització dreta (140,141). La Figura 14 mostra el maneig del CCRm en primera línia de tractament.



Figura 14. Maneig terapèutic del càncer de còlon metastàtic en primera línia de tractament. Figura adaptada de la Guia de la Sociedad Española de Oncología Médica per al tractament del CCRm (140).

En segona línia de tractament del CCRm estan indicats els antiangiogènics ramucirumab i aflibercept en combinació amb l'esquema FOLFIRI (142,143), així com el bevacizumab. Els agents anti-EGFR es poden utilitzar en segona línia de tractament en combinació amb QT si no s'han administrat en la primera línia i si els tumors són *RAS/BRAF* no mutats. També es poden utilitzar en monoteràpia en tercera línia de tractament (144,145). L'administració de l'inhibidor de proteïnes-cinases regorafenib, així com la trifluridina/tipiracil, es restringeixen als pacients amb CCRm que han estat prèviament tractats o no es consideren candidats a les teràpies anteriorment descrites. Actualment, la combinació d'encorafenib i cetu-ximab és una opció terapèutica a considerar en segona línia per als pacients amb CCRm *BRAF* mutat (88).

A continuació es resumeix breument l'evidència científica més rellevant que avala l'ús dels principals fàrmacs anteriorment mencionats en CCRm:

5- Fluorouracil

El 5-FU, fàrmac fonamental en el maneig de la malaltia metastàtica, va ser el primer que es va utilitzar. De fet, l'esquema descrit per Gramont *et al* el 1997 consistent en una administració bimensual d'un bolus de 5-FU/LV seguida d'infusió contínua de 5-FU continua essent la base de la QT en CCRm (146).

> Oxaliplatí

L'esquema FOLFOX, vist anteriorment com a possible tractament adjuvant, també pot emprar-se en CCRm. En aquest context, la seva evidència ve avalada per l'estudi de Gramont *et al*, en el qual la combinació de 5-FU/LV i oxaliplatí (esquema FOLFOX) va mostrar una major taxa de resposta (50,7% vs 22,3%; p=0,0001) i SLP (9,0 vs 6,2 mesos; p=0,0003) que 5-FU/LV, tot i que no va mostrar una millora significativa en la SG (16,2 vs 14,7 mesos; p=0,12) (147).

Irinotecan

A diferència de l'oxaliplatí, l'irinotecan no ha demostrat ser eficaç en adjuvància. En canvi, sí que està indicat en el tractament del CCRm en monoteràpia o combinat amb fluoropirimidines (± anticossos monoclonals). L'any 2000 Douillard *et al* van publicar que l'addició d'irinotecan a 5-FU/LV (esquema FOLFIRI) en comparació amb 5-FU/LV millorava la taxa de resposta (35% vs 22%; p<0,005) i prolongava la SLP (6,7 vs 4,4 mesos; p<0,001) i la SG (17,4 vs 14,1 mesos; p=0,031). (148).

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, els esquemes FOLFOX i FOLFIRI es consideren esquemes estàndard de primera línia en CCRm. A més, els resultats de Tournigand *et al* mostren que són equivalents i que cap de les dues possibles seqüències temporals (FOLFIRI \rightarrow FOLFOX o FOLFOX \rightarrow FOLFIRI) és superior a l'altra. De fet, la SG per a la primera seqüència va ser de 21,5 mesos i per a la segona va ser de 20,6 mesos (p=0,99)

(149). Només es van detectar algunes diferències en el perfil de toxicitat. Així doncs, els pacients que rebien primer FOLFIRI experimentaven més mucositis grau 3-4, nàusees/vòmits i alopècia grau 2, mentre que els que rebien primer FOLFOX presentaven en una major proporció neutropènia grau 3-4 i neurotoxicitat (149). De forma anàloga al que s'ha comentat per a l'adjuvància, la capecitabina constitueix una alternativa equivalent al 5-FU/LV i, per tant, els esquemes XELOX i XELIRI són perfectament vàlids en primera línia de tractament del CCRm (150,151).

Cetuximab

L'aprovació de cetuximab en primera línia de tractament per al CCRm es va basar en els resultats de dos assaigs clínics, CRYSTAL (136,137) i OPUS (138,139), que van avaluar la seva eficàcia i seguretat combinats amb QT enfront de QT sola (esquemes FOLFIRI i FOLFOX, respectivament). L'objectiu principal de l'estudi CRYSTAL va ser la supervivència lliure de progressió (SLP), amb una mitjana de 9,9 mesos per a cetuximab + QT enfront de 8,4 mesos per a QT sola (HR=0,696; p=0,001), tenint en compte només la població amb l'exó 2 de *KRAS* no mutat. Pel que fa a la SG, els resultats van ser de 23,5 vs 20,0 mesos a favor del grup de cetuximab (HR=0,796; p=0,009) (136). L'objectiu de l'estudi OPUS va ser la resposta tumoral que, en pacients amb l'exó 2 *wild-type* va ser del 61% (braç de QT + cetuximab) enfront del 37% (grup de QT sola) (p=0,011). També es va assolir una major SLP en el grup amb l'anticòs monoclonal (7,7 vs 7,2 mesos; p=0,0163) (138). En ambdós assaigs clínics es va constatar que la presència de mutacions a l'exó 2 de *KRAS* implicava una falta de resposta a cetuximab. Per això es va introduir a la seva fitxa tècnica el requeriment que el tumor no presentés cap d'aquestes mutacions per poder prescriure el fàrmac.

En segona línia de tractament el cetuximab es pot utilitzar en combinació amb irinotecan en base als resultats dels estudis BOND i EPIC. Ambdós estudis van avaluar l'eficàcia de l'esquema cetuximab + irinotecan enfront de cetuximab en monoteràpia i van obtenir diferències estadísticament significatives favorables al grup de cetuximab + irinotecan en taxa de resposta i SLP, però no en SG (152,153). Cal destacar que en cap d'aquests dos estudis es va analitzar l'estat mutacional de *RAS*.

En tercera línia de tractament el cetuximab es pot utilitzar en monoteràpia, evidència basada en els resultats de l'estudi CO.17. Aquest estudi va demostrar que, en comparació al millor tractament de suport, el cetuximab millorava la SLP (3,7 vs 1,9 mesos; HR=0,40; p<0,001) i la SG (9,5 vs 4,8 mesos; HR=0,55; p<0,001) dels pacients amb tumors sense mutacions activadores a l'exó 2 de *KRAS* (154).

Panitumumab

L'aprovació de panitumumab en primera línia de tractament es va basar en l'estudi PRIME (155), que va comparar l'esquema de panitumumab amb FOLFOX enfront de FOLFOX sol. En els pacients amb l'exó 2 de *KRAS* no mutat la mitjana de la SLP, que es va considerar la variable principal, va ser de 9,6 vs 8,0 mesos, respectivament (HR=0,80; p=0,02). Tanmateix, no es van trobar diferències ni en la taxa de resposta (55% vs 48%; p=0,068) ni en la SG (23,9 vs 19,7 mesos; p=0,072) (155). Una anàlisi posterior retrospectiva tenint en compte la presència de mutacions activadores en els exons 3 i 4 de *KRAS* i en els exons 2, 3 i 4 de *NRAS* va mostrar que els pacients *RAS wild-type* presentaven una SG considerablement superior a la descrita inicialment, en concret de 26,0 mesos, enfront dels 20,0 mesos dels pacients amb *RAS* mutat (p=0,04) (42).

La combinació de FOLFOXIRI amb cetuximab o panitumumab no s'utilitza de forma habitual per al tractament de pacients amb CCRm, malgrat els resultats prometedors dels estudis MACBETH i VOLFI. A l'estudi MACBETH els pacients rebien FOLFOXIRI + cetuximab seguit de cetuximab o bevacizumab en monoteràpia. Tot i no poder-se demostrar un augment del percentatge de pacients sense progressar als deu mesos de tractament (considerant les dades de la literatura sobre FOLFIRI o FOLFOX + anti-EGFR), es va veure que una inducció curta (de 4 mesos) amb aquest esquema podria ser útil en pacients en els quals interessa una reducció ràpida del tumor (156). Pel que fa a l'estudi VOLFI, l'addició de panitumumab a l'esquema FOLFOXIRI va permetre augmentar la taxa de resposta objectiva en relació amb el control, que era FOLFOXIRI (87,3% vs 60,6%; OR=4,47; p=0,004) (157).

En segona línia de tractament el panitumumab es pot utilitzar en combinació amb FOLFIRI, gràcies als resultats de l'estudi de Peeters *et al*, que van mostrar que la combinació FOLFIRI + panitumumab enfront de FOLFIRI assolia un augment estadísticament significatiu de la SLP (5,9 vs 3,9 mesos; HR=0,73; p=0,004), tot i que no de la SG (158).

De forma anàloga al que s'ha comentat per al cetuximab, en tercera línia de tractament es pot administrar el panitumumab en monoteràpia. L'assaig clínic dut a terme per Amado *et al*, on es comparava el tractament amb panitumumab en monotèrapia enfront del millor tractament de suport, va ser el primer en demostrar la necessitat de determinar l'estat mutacional de *KRAS* abans d'administrar un anti-EGFR. En aquest estudi es va veure que, en pacients amb l'exó 2 de *KRAS wild-type*, el tractament amb panitumumab permetia assolir una major SLP que el millor tractament de suport (12,3 vs 7,3 setmanes; HR=0,45; p<0,0001). En canvi, en els pacients amb *KRAS* mutat, el grup tractat amb panitumumab no va obtenir una major SLP que el grup control (7,4 vs 7,3 setmanes; HR=0,99) (144).

Bevacizumab

L'aprovació de bevacizumab en CCRm es va basar en l'estudi de Hurwitz *et al* (135) que va comparar bevacizumab + QT enfront de QT (esquema IFL: irinotecan, bolus de 5-FU i LV). L'objectiu principal va ser la SG, amb una mitjana de 20,3 vs 15,6 mesos (HR=0,66; p<0,001), respectivament. La mitjana de la SLP, que es va considerar un objectiu secundari, va ser de 10,6 mesos per a bevacizumab + QT vs 6,2 mesos per a QT sola (HR=0,54; p<0,001). També es va observar un augment en la taxa de respostes (44,8% vs 34,8%; p=0,004) (135). En primera línia de tractament del CCRm el bevacizumab també es pot administrar en combinació amb FOLFOXIRI (140). De fet, l'estudi TRIBE va mostrar com la combinació bevacizumab + FOLFOXIRI assolia una SG superior a la de l'esquema bevacizumab + FOLFIRI (29,8 vs 25,8 mesos; HR=0,80; p=0,03) (159).

En segona línia de tractament s'han dut a terme diversos estudis per avaluar l'eficàcia del bevacizumab, d'entre els quals destaca l'estudi E3200, que tenia 3 braços de tractament: bevacizumab + FOLFOX (braç A), FOLFOX (braç B) i bevacizumab en monoteràpia (braç C). El braç A va demostrar ser superior als braços B i C en taxa de resposta, SLP i SG (160). Més recentment, els estudis TML i PRODIGE 18 han mostrat que, després d'una primera línia de bevacizumab + QT, és favorable continuar amb bevacizumab + una altra QT (exemple: canviar el FOLFIRI rebut a la primera línia per FOLFOX a la segona) (161,162). No es contempla l'ús de bevacizumab en tercera línia de tractament.

Cal destacar que un dels dubtes que hi ha sobre la taula és quina opció es considera preferent en primera línia de tractament (anti-EGFR+QT vs bevacizumab+QT) en pacients amb CCRm *RAS* wild-type. Una metanàlisi de Heinemann *et al* (163) va mostrar que els resultats de SG eren favorables al tractament amb anti-EGFR+QT (HR=0,80 [0,68-0,93]). Aquests pacients també mostraven millors taxes de resposta (OR=0,57 [0,42-0,76]) i de reducció precoç del tumor (OR=0,48 [0,33-0,71]) (163). D'altra banda, s'ha vist que la seqüència anti-EGFR \rightarrow anti-VEGF permet obtenir millors resultats que la seqüència anti-VEGF \rightarrow anti-EGFR. Diversos estudis han descrit que l'ús d'anti-VEGF en primera línia comporta una menor efectivitat dels anticossos anti-EGFR en segona línia de tractament (164,165). Sembla ser que l'ús d'antiangiogènics genera canvis biològics que incrementen el risc de resistència adquirida als fàrmacs anti-EGFR (164).

> Aflibercept

La seva aprovació es va fonamentar en els resultats de l'estudi VELOUR, que va mostrar que l'ús d'aflibercept-FOLFIRI en segona línia de tractament enfront de FOLFIRI sol permetia augmentar tant la SLP (6,90 vs 4,67 mesos; HR=0,758; p<0,0001) com la SG (13,50 vs 12,06 mesos; HR=0,817; p=0,0032) (143). Aquests resultats favorables també s'observaven en pacients tractats prèviament amb bevacizumab. No es contempla l'ús d'aflibercept ni en primera ni en tercera línia.

Ramucirumab

El ramucirumab està indicat en pacients amb càncer colorectal metastàtic que progressen a un tractament previ amb bevacizumab, oxaliplatí i una fluoropirimidina. El ramucirumab s'administra conjuntament amb FOLFIRI, en base als resultats de l'assaig clínic fase III RAISE (142). Tanmateix, l'Informe de Posicionament Terapèutic que el va avaluar (IPT, 50/2016) va concloure que no oferia cap avantatge, ni en efectivitat ni en perfil d'efectes adversos, en relació amb les opcions ja disponibles en la mateixa línia de tractament, raó per la qual és un fàrmac no finançat a l'estat per a aquesta indicació (166).

> Regorafenib

El regorafenib va ser aprovat en base als resultats de l'assaig clínic CORRECT, que va demostrar un augment de la SG enfront de placebo (6,4 vs 5,0 mesos; HR=0,77; p=0,0052) en pacients amb CCRm en progressió després de rebre tots els tractaments estàndard (167).

> Trifluridina/tipiracil

La seva evidència es fonamenta en els resultats de l'assaig RECOURSE, on la trifluridina/tipiracil va mostrar un augment de la SG (7,1 vs 5,3 mesos; HR=0,69; p<0,001) enfront de placebo (168).

La taula 6 intenta sintetitzar les possibilitats de tractament en segona, tercera línia i posteriors del CCRm.

Estat mutacional	Condicionant del	Opcions de segona línia	Opcions de tercera línia
de RAS i BRAF	pacient		
		$FOLFIRI + panitumumab^{\dagger}$	
	Candidat a irinotecan	FOLFIRI + aflibercept	Irinotecan + cetuximab
No mutats		FOLFIRI + bevacizumab	Cetuximab o panitumumab
		Irinotecan + cetuximab †	en monoteràpia
	Candidat a oxaliplatí	FOLFOX + bevacizumab	
	Candidat a irinotecan	FOLFIRI + aflibercept	Trifluridina/tipiracil
Mutats		FOLFIRI + bevacizumab	Decemptonik
	Candidat a oxaliplatí	FOLFOX + bevacizumab	Regoratenio

Taula 6. Maneig terapèutic del càncer colorectal metastàtic en segona i tercera línies de tractament.

[†]Si no han rebut agents anti-EGFR prèviament.

6.3. Utilitat de la biòpsia líquida en càncer colorectal

L'ADN lliure circulant (cell-free DNA, cfDNA) està constituït majoritàriament per fragments d'ADN de doble cadena de 150-200 parells de bases de longitud. És alliberat al torrent sanguini de forma passiva (per apoptosi o necrosi) o activa (per exosomes o microvesícules). En persones sanes, la quantitat de cfDNA és molt baixa, de l'ordre de 10-15 ng/ml de plasma. En canvi, en pacients oncològics, aquesta quantitat augmenta considerablement i pot ser detectada i analitzada amb relativa facilitat, especialment en pacients amb càncers avançats (169–171). L'ADN alliberat a la sang per les cèl·lules tumorals és conegut com ADN tumoral circulant (circulating tumor DNA, ctDNA).

La biòpsia líquida consisteix en l'extracció d'una mostra d'un fluid biològic (normalment la sang) per tal de poder determinar les mutacions tumorals o somàtiques mitjançant l'estudi del ctDNA prèviament aïllat. Representa una tècnica nova, ràpida i menys invasiva que la biòpsia tissular, i que a més no es veu tan afectada per l'heterogeneïtat intratumoral (172). Diversos estudis han mostrat un grau de similitud elevat (superior al 85%) entre les mutacions trobades a la mostra de teixit i les observades mitjançant la biòpsia líquida (173–178). Tanmateix, cal destacar que aproximadament un 15% dels pacients amb càncer metastàtic no tenen una quantitat suficientment elevada de ctDNA per poder obtenir el perfil mutacional del tumor amb una mostra de plasma (176,179). Aquest és un dels aspectes claus que fa que la implementació d'aquesta tècnica a l'àmbit assistencial encara sigui reduïda i que la biòpsia de teixit continuï essent la tècnica d'elecció per establir el perfil mutacional del tumor (169). La Taula 7 mostra els principals trets diferencials entre la biòpsia líquida i la biòpsia de teixit.

Biòpsia tissular	Biòpsia líquida	
Obtenció complicada en alguns casos	Obtenció ràpida i fàcil	
(exemple: càncer de pulmó)		
Invasiva (major risc)	No invasiva	
No capta tota l'heterogeneïtat tumoral	Visió global del tumor	
Més costosa	Potencialment més econòmica	
No és assumible fer biòpsies tissulars repetides per	Facilita el seguiment de l'evolució de la malaltia	
seguir la malaltia		
	No detecció de les mutacions en casos de baixa	
	quantitat de ctDNA	

Taula 7: Característiques diferencials de la biòpsia de teixit i la biòpsia líquida.

La quantitat de ctDNA augmenta substancialment en funció de l'estadi tumoral. Així doncs, els pacients amb càncer metastàtic presenten major quantitat de ctDNA que els pacients amb càncers localitzats (180). La probabilitat de detectar ctDNA també depèn del tipus de tumor. En alguns tipus de tumor (colorectal, bufeta urinària, ovari, etc) la capacitat de detecció és molt elevada, mentre que en d'altres (gliomes, càncer de tiroides, etc) és molt reduïda. S'han descrit diverses tècniques útils per detectar les mutacions somàtiques en ctDNA (Droplet Digital PCR (ddPCR), BEAMing, seqüenciació massiva de nova generació (NGS), etc). Les tècniques ddPCR i BEAMing presenten una sensibilitat de detecció molt elevada, millor que NGS, però presenten l'inconvenient de permetre només la identificació de mutacions ja conegudes (172).

Entre les aplicacions clíniques de la biòpsia líquida cal destacar-ne les següents:

a) Identificació del perfil molecular del tumor i monitoratge de la resposta farmacològica

El ctDNA pot proporcionar informació de les alteracions presents al tumor, que sovint són determinants per guiar l'estratègia terapèutica a seguir (170,172). En el cas del CCRm, la majoria d'estudis s'han centrat en la detecció de mutacions en *RAS*. En concret, diversos d'ells han avaluat la detecció de mutacions de resistència adquirida en pacients tractats amb anti-EGFR (181–183). L'evidència científica acumulada fins ara fa que es consideri que la biòpsia líquida pot esdevenir una tècnica eficient per monitorar la resposta al tractament i anticipar la resistència farmacològica (184–189). S'ha descrit que la presència de *RAS* mutat en el ctDNA previ al tractament amb anti-EGFR es relaciona amb una pitjor resposta a aquesta teràpia, tot i que no implica necessàriament una manca de benefici clínic (182,183,190). A més, la biòpsia líquida permet identificar cèl·lules tumorals abans que s'estableixin en un teixit i desenvolupin una metàstasi.

b) Avaluació de la malaltia mínima residual post-cirurgia

La presència de ctDNA constitueix un marcador prometedor per avaluar la malaltia residual post-cirurgia. Això pot ser especialment rellevant en càncers de còlon d'estadis II i III. Tal i com s'ha explicat anteriorment, la identificació dels pacients amb càncer de còlon estadi II que es beneficien de QT adjuvant continua essent una assignatura pendent. Cal tenir present que un 80% dels pacients es curen només amb cirurgia. Tanmateix, el 20% restant sí que es podrien beneficiar de rebre tractament adjuvant. En aquest sentit, comença a haver-hi evidència científica que la detecció de ctDNA post-cirurgia identifica aquells pacients amb malaltia residual amb alt risc de recurrència i que, per tant, són candidats a rebre QT adjuvant (119).

c) Detecció precoç de tumors

Una de les aplicacions potencials de la biòpsia líquida és la identificació precoç de tumors en pacients asimptomàtics mitjançant l'anàlisi d'una mostra de sang. Per fer-ho possible, caldria una metodologia molt sensible capaç de detectar traces de ctDNA, així com elevadament específica per evitar falsos positius. A més, tenint en compte que molts tumors comparteixen mutacions en els mateixos gens (ex: *KRAS*, *TP53*, etc.), sembla complicat pensar que l'anàlisi del ctDNA permeti determinar amb precisió la localització tumoral (191).

7. MEDICINA DE PRECISIÓ EN CÀNCER COLORECTAL

El fracàs terapèutic suposa un alt impacte econòmic per al Sistema Nacional de Salut, així com una minva en la qualitat de vida dels pacients. Els factors genètics són determinants en la resposta a la teràpia farmacològica i expliquen gran part de la variabilitat interindividual (192). D'aquí el gran interès actual en la realització d'estudis farmacogenètics que contribueixin a la implementació d'una medicina personalitzada.

El terme "medicina personalitzada", o "medicina de precisió", es refereix a l'aplicació de les dades genètiques, fenotípiques, clíniques, ambientals i socials per tal de fer un abordatge individualitzat en la prevenció, diagnòstic, tractament i pronòstic de les malalties. La farmacogenètica constitueix la disciplina biomèdica més rellevant en aquest camp. Segons la definició de l'EMA, la farmacogenètica estudia la influència de les variacions en la seqüència de l'ADN en la resposta als fàrmacs, de tal manera que l'estudi dels biomarcadors farmacogenètics (polimorfismes/mutacions) és, actualment, un tema de màxim interès. L'objectiu és la identificació de biomarcadors de resposta i/o toxicitat als fàrmacs que permetin contribuir a la individualització de la teràpia i a un ús més cost-efectiu dels medicaments.

Per tal de seleccionar el tractament més adequat per a cada pacient la farmacogenètica planteja l'estudi tant de les mutacions somàtiques en el propi tumor com dels polimorfismes/mutacions en la línia germinal del pacient. Algunes de les mutacions tumorals descrites s'utilitzen en la pràctica clínica diària a causa de la seva correlació amb la resposta antitumoral a diferents tractaments. És el cas de les mutacions activadores dels oncogens *KRAS* i *NRAS* per a la selecció del tractament amb cetuximab o panitumumab en pacients amb CCRm (193). De forma complementària, els polimorfismes genètics presents en gens que codifiquen per a proteïnes diana o enzims involucrats en la farmacocinètica dels fàrmacs poden ser responsables de l'augment o disminució de l'expressió proteica o d'alterar la funcionalitat de la proteïna. Com a resultat, tant la resposta com la toxicitat a aquests fàrmacs es poden veure alterades. És el cas del polimorfisme rs8175347 del gen *UGT1A1* (al·lel *UGT1A1*28*), marcador de toxicitat a l'irinotecan (194,195).

Aquesta tesi s'ha centrat en la identificació de nous biomarcadors pronòstics i predictius en CCR. Cal diferenciar el concepte de biomarcador pronòstic del de biomarcador predictiu. Un biomarcador pronòstic indica la probabilitat de recuperació o recurrència d'una determinada malaltia, independentment del tractament. En canvi, un biomarcador predictiu proporciona informació sobre la probabilitat de resposta o toxicitat a un determinat tractament. Per exemple, l'expressió d'HER2 és un marcador de mal pronòstic en càncer de mama, és a dir, es relaciona amb majors taxes de recurrència i mortalitat (196). Tanmateix, és un marcador predictiu de bona resposta a trastuzumab o pertuzumab, que són fàrmacs anti-HER2 (197).

Pel que fa al CCR, i malgrat els avenços terapèutics que s'han produït en els últims anys, l'efectivitat dels fàrmacs emprats segueix essent limitada i impredictible, i un considerable nombre de pacients acaba morint com a conseqüència de la progressió tumoral (198). A més a més, cal tenir en compte l'elevat cost de molts d'aquests fàrmacs i la seva toxicitat inherent. Tot plegat posa en relleu la necessitat d'identificar biomarcadors predictius que contribueixin a identificar aquells pacients que es beneficiaran d'un determinat tractament o bé que presentaran efectes adversos en rebre'l. En aquest sentit, el coneixement dels perfils moleculars que presenten els diferents tumors està demostrant la seva utilitat en la identificació de les denominades mutacions "driver", en el descobriment de noves dianes terapèutiques i en una millor estratificació dels pacients en assaigs clínics basats en el seu perfil genotípic.

7.1. Biomarcadors pronòstics

Un biomarcador pronòstic és aquell que proporciona informació sobre la probabilitat de recuperació o recurrència d'una malaltia, independentment del tractament. En CCR cal destacar-ne els següents:

- Estadi del tumor: és el factor pronòstic més rellevant. Es defineix mitjançant el sistema d'estadiatge TNM. Tal i com ja s'ha explicat, els tumors d'estadi més avançat presenten una pitjor supervivència.
- > Grau histològic: els pacients amb carcinomes ben diferenciats presenten una supervivència superior.
- Subtipus molecular: els pacients amb un CCR del subtipus mesenquimal (CMS4) presenten un pitjor pronòstic (67).
- > Presència d'obstrucció i/o perforació intestinal: constitueix un marcador de mal pronòstic.
- Localització: els pacients que presenten càncer de còlon dret presenten un pitjor pronòstic (65,199).
- Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI): és conseqüència de la inactivació dels gens de reparació de desaparellaments post-replicatius (*mismatch repair*, MMR) de l'ADN, i es relaciona amb un millor pronòstic en càncer de còlon d'estadi II (112–114). En aquest estadi, els pacients que presenten MSI es consideren de baix risc i no són candidats a rebre QT adjuvant basada en fluoropirimidines (112–114). En canvi, els pacients que no presenten MSI poden ser de baix o alt risc en funció d'altres característiques del tumor (mida, invasió tumoral, grau de diferenciació, etc) (109).

- Invasió limfovascular / perineural: són indicadores de mal pronòstic i s'associen a una pitjor supervivència (200,201).
- BRAF: la presència de la mutació V600E (c.1799T>A; p.(Val600Glu)), ubicada a l'exó 15, és un factor validat de mal pronòstic en pacients amb CCRm (202). Aquesta mutació augmenta l'activitat de BRAF unes deu vegades en comparació amb el wild-type (203).
- CDX2: la manca d'expressió del factor de transcripció CDX2 (caudaltypehomeobox transcription factor 2) s'ha descrit com a biomarcador de mal pronòstic en càncer de còlon d'estadis II-III (118). Els tumors sense expressió de CDX2 solen presentar característiques relacionades amb una major agressivitat del càncer, com ara un estadi avançat, invasió vascular, diferenciació pobra i fenotip metilador d'illes CpG.
- EphA2: l'expressió d'EphA2 s'està postulant com un marcador de mal pronòstic en càncer de còlon d'estadis II-III. S'ha descrit que els pacients amb nivells superiors de mRNA i de proteïna EphA2 presenten una menor SG (204).
- Estat mutacional de FBXW7: mutacions en aquest gen (sobretot missense, és a dir, de canvi d'aminoàcid) duen a una pèrdua de la seva funcionalitat. La proteïna FBXW7 és un supressor tumoral amb activitat ubiqüitina-ligasa que regula múltiples oncoproteïnes crucials. S'ha vist que els pacients amb CCRm amb FBXW7 mutat presenten una menor SG en relació amb els pacients wild-type (205).
- Nivells de ctDNA post-cirurgia: els pacients amb càncer de còlon d'estadis II i III als quals es detecta ctDNA post-cirurgia o post-QT adjuvant tenen una probabilitat superior de recaiguda (119,206).

7.2. Biomarcadors predictius de resposta/toxicitat

Un biomarcador predictiu és aquell que proporciona informació sobre la probabilitat de resposta i/o toxicitat a un determinat tractament. A continuació es detallen els biomarcadors predictius que apareixen a les fitxes tècniques de cadascun dels fàrmacs utilitzats habitualment en CCR (Taula 8). Alguns d'ells són d'obligada determinació segons fitxa tècnica, com ara l'anàlisi del perfil mutacional de *RAS* per a la prescripció d'agents anti-EGFR. D'altres, com la determinació de la presència de l'al·lel *UGT1A1*28* (predictor de toxicitat a irinotecan) o de mutacions en el gen *DPYD* (predictores de toxicitat a fluoropirimidines) es recomanen a les guies clíniques però no són d'obligada determinació segons fitxa tècnica.

Fàrmac	Gen	Biomarcadors predictius		Efecte	Recomanació de genotipat segons les fitxes tècniques
Fluoropirimidines (5-fluorouracil i capecitabina)	DPYD	c.1905+1G>A (rs3918290, DPYD*2A, IVS14+1G>A) c.2846A>T (rs67376798, D949V) c.1679T>G (rs55886062, DPYD*13, I560S) c.1236G>A (rs56038477, E412E, a l'haplotip B3)		Toxicitat greu	Recomanable
Irinotecan	UGT1A1	UGT1A1*28	(rs8175347)	Toxicitat greu	Recomanable
Oxaliplatí	-		-	-	No inclou cap biomarcador predictiu
Anticossos anti-EGFR (cetuximab i panitumumab)	KRAS NRAS	Codó 12 (exó 2) Codó 13 (exó 2) Codó 59 (exó 3) Codó 61 (exó 3) Codó 117 (exó 4) Codó 146 (exó 4)	G12A G12C G12D G12I G12R G12S G12V G13A G13C G13D G13R G13S G13V A59T A59E Q61E Q61H Q61H Q61K Q61L Q61P Q61R K117N A146P A146T A146V	Manca de resposta	Obligatòria
Fàrmacs antiangiogènics (bevacizumab, aflibercept, ramucirumab)	-	A146V		-	No inclouen biomarcadors predictius

Taula 8: Biomarcadors predictius de resposta/toxicitat inclosos a les fitxes tècniques de fàrmacs utilitzats en càncer colorectal. Abreviatures: *DPYD*, gen de la dihidropirimidina deshidrogenasa; *KRAS*, gen Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; *NRAS*, gen Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog; *UGT1A1*, gen de la uridindifosfat glucuronil transferasa família 1 membre A1. A continuació es detallaran els biomarcadors predictius resumits a la taula anterior, explicant l'evidència científica que els avala.

7.2.1. Fluoropirimidines: 5-FU i capecitabina

Les fluoropirimidines són fàrmacs antimetabòlits àmpliament utilitzats en el tractament de diversos tumors sòlids (mama, CCR, estómac, esòfag, cap i coll...), ja sigui en monoteràpia o en combinació amb altres quimioteràpics (207). Dins d'aquesta família hi ha el 5-FU, anàleg fluorat de l'uracil (base pirimidínica). El 5-FU és un fàrmac d'administració intravenosa, mentre que la capecitabina i el tegafur són profàrmacs d'administració oral que es converteixen en 5-FU majoritàriament al fetge. El mecanisme d'acció de les fluoropirimidines consisteix en la inhibició de l'enzim timidilat sintasa (TS) a través de la formació d'un complex ternari estable entre el metabòlit actiu del 5-FU, que és el 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfat, la TS i el cofactor 5,10-metilentetrahidrofolat (208). La inhibició de la TS provoca una disminució dels nivells de timidilat, nucleòtid indispensable en la síntesi d'ADN (209,210).

Un 30-35% dels pacients amb CCRm que reben tractament amb fluoropirimidines experimenten toxicitat greu, que pot ser letal en un 0,5-1% dels casos. Les toxicitats més habituals són la neutropènia, la síndrome mà-peu, alteracions gastrointestinals (nàusees, vòmits, diarrea), estomatitis i mucositis (211–213). Aquesta toxicitat greu es pot deure a una deficiència de l'enzim dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), que és el responsable principal de transformar el 5-FU a la forma inactiva 5-fluoro-5,6-dihidrouracil (5-FUH₂). El gen *DPYD*, que codifica la DPD, és altament polimòrfic i es coneixen nombroses variants que alteren la seqüència proteica resultant. Algunes d'aquestes variants genètiques donen lloc a una proteïna deficient, la qual cosa comporta un dèficit parcial o total d'activitat enzimàtica. Aquest fet duu a una acumulació del fàrmac a l'organisme i a un major risc d'aparició de toxicitat greu. Per això, les fitxes tècniques d'aquests fàrmacs (5-FU, capecitabina i tegafur) recomanen utilitzar-los amb precaució en aquells pacients en els quals es conegui o sospiti una deficiència d'aquest enzim, i en contraindiquen el seu ús en el cas d'absència d'activitat comprovada (214). Tanmateix, no concreten què cal fer en aquells pacients que presenten un dèficit parcial de DPD (3-5% de la població), malgrat ésser molt més comú que el dèficit complet de l'enzim (0,01-0,1% de la població).

La mutació c.1905+1G>A (rs3918290, *DPYD*2A*, IVS14+1G>A) és la més estudiada. Afecta la seqüència de reconeixement del lloc de *splicing* de l'intró 14 de la proteïna i, en conseqüència, es produeix una proteïna amb l'exó 14 delecionat (Figura 15). Diversos estudis han trobat que hi ha una associació estadísticament significativa entre la presència d'aquesta mutació i l'aparició de toxicitat greu relacionada amb

l'administració de 5-FU (215,216). Altres mutacions conegudes de pèrdua de funcionalitat són la c.2846A>T (rs67376798, D949V), la c.1679T>G (rs55886062, *DPYD*13*, I560S) i la c.1236G>A (rs56038477, E412E, a l'haplotip B3) (217).



Figura 15: Efecte funcional de la variant *DPYD*2A* (IVS14+1G>A). Es tracta d'un polimorfisme d'un únic nucleòtid ubicat a la primera posició de l'intró 14. Provoca l'eliminació completa de l'exó 14 (*exon skipping*) durant el processament (*splicing*) del pre-ARNm, la qual cosa fa que es creï una proteïna truncada amb absència d'activitat. Figura adaptada de Deenen *et al* (218).

Tot i l'evidència que aquestes mutacions es relacionen amb un major risc de toxicitat greu secundària a l'ús de fluoropirimidines, ni la fitxa tècnica del 5-FU ni la de la capecitabina especifiquen recomanacions de dosi en funció del perfil mutacional. En aquest sentit, el grup de *Henricks et al* va establir unes pautes de reducció de dosi en pacients portadors en heterozigosi de variacions de la *DPYD*, tenint en compte la pèrdua d'activitat enzimàtica descrita per a cada tipus de variant (Taula 9). En el cas que el pacient fos homozigot per a aquestes mutacions, es suggeria l'elecció d'un tractament alternatiu (217,219).

Variant genètica de la DPYD	% de la dosi estàndard de		
	fluoropirimidina recomanada		
c.1905+1G>A (rs3918290, DPYD*2A, IVS14+1G>A)	50%		
c.1679T>G (rs55886062, DPYD*13, I560S)	50%		
c.2846A>T (rs67376798, D949V)	75%		
c.1236G>A (rs56038477, E412E, a l'haplotip B3)	75%		

Taula 9: Recomanacions de dosi de fluoropirimidina en funció de la variant de DPYD que presenti el pacient (219).

En base a aquestes recomanacions, el mateix grup va publicar el 2018 un estudi prospectiu amb 1103 pacients, la majoria dels quals (63%) amb diagnòstic de CCR (220). Es va analitzar la presència de les quatre variants abans esmentades i es va observar que 85 pacients (8%) n'eren portadors en heterozigosi. Els pacients portadors (n=85) van rebre el % de la dosi detallat a la Taula 9. Els pacients wild-type (n=1018) van ser tractats amb la dosi estàndard de fluoropirimidina. Es va comparar la incidència de toxicitat greu entre ambdós grups i, a més, es va comparar el risc relatiu (RR) de toxicitat greu amb una cohort històrica de pacients portadors de variants de DPYD tractats amb dosis plenes de fluoropirimidines. Tot i les reduccions de dosi inicials efectuades en els portadors de variants en el gen DPYD, la toxicitat greu (grau \geq 3) en aquest subgrup de pacients va ser superior a la dels pacients wild-type (p=0,0013). En canvi, no es van trobar diferències estadísticament significatives en la toxicitat grau 4 (p=0,49). Pel que fa al risc dels pacients portadors de desenvolupar toxicitat greu, els que van rebre una dosi reduïda basant-se en el seu genotip van presentar menor toxicitat que els que van rebre la dosi estàndard, en tres de les quatre variants analitzades (c.2846A>T, DPYD*2A i c.1679T>G). Tanmateix, cal destacar que, malgrat observar-se una reducció del RR en els pacients portadors de c.2846A>T, aquest va ser de 2,00, encara força alt en comparació als pacients wild-type. Pel que fa als portadors de c.1236G>A, no es van observar diferències en el RR amb la cohort històrica (RR d'1,69 amb reducció de dosi vs 1,72 sense reducció de dosi). Per això, els autors van concloure que caldria estudiar la possibilitat de reduir també al 50% la dosi inicial de fluoropirimidines en els pacients portadors dels al·lels c.2846A>T i c.1236G>A (220).

En definitiva, l'evidència disponible actualment avala genotipar les quatre mutacions del gen *DPYD* mencionades abans de l'inici del tractament amb fluoropirimidines, per tal de poder ajustar, si cal, la dosi del 5-FU o de la capecitabina des del primer cicle de tractament. De fet, l'Agència Espanyola de Medicaments i Productes Sanitaris (AEMPS) va publicar una nota de seguretat (Referència: MUH (FV) 8/2020) el passat mes de maig recomanant determinar la deficiència de DPD en tots els pacients abans d'iniciar un tractament amb fluoropirimidines. A més, la nota recomanava reduir la dosi de fluoropirimidines en aquells pacients que presentessin dèficit parcial de l'enzim, així com evitar aquests fàrmacs en aquells pacients amb dèficit total de DPD (221).

7.2.2. Irinotecan

L'irinotecan (CPT-11) és un agent quimioteràpic utilitzat per al tractament de diversos tipus de càncer, entre els quals destaquen el d'estómac, pàncrees i colorectal. Es tracta d'un derivat semisintètic de la camptotecina, alcaloide present en un arbre d'origen xinès (*Camptotheca acuminata*). El fàrmac exerceix el

seu efecte antineoplàstic inhibint la topoisomerasa I, enzim necessari per separar la doble cadena d'ADN, pas clau en els processos de replicació, transcripció i reparació de l'ADN.

L'irinotecan és un profàrmac que s'hidrolitza al seu metabòlit actiu, el 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38), mitjançant les carboxilesterases hepàtiques. El SN-38 és responsable tant de l'eficàcia com de la toxicitat de l'irinotecan. Les seves toxicitats limitants de dosi i potencialment mortals són la diarrea retardada i la neutropènia greu, que poden aparèixer en més d'un terç dels pacients (222). Aquesta toxicitat greu induïda per l'irinotecan suposa en molts casos la retirada del fàrmac.

El SN-38 es conjuga mitjançant l'acció de la uridindifosfat glucuronil transferasa (UGT1A1) formant un metabòlit glucurònid inactiu, el SN-38G, el qual és excretat per via renal o biliar. D'altra banda, el SN-38G pot "reactivar-se" novament a SN-38 mitjançant β -glucuronidases bacterianes que eliminen el grup glucurònic (Figura 16).



Figura 16: Metabolisme de l'irinotecan. Figura adaptada de Santos *et al* (223) Abreviatures: APC, 7-etil-10-[4-N-(5-àcid aminopentanoic)-1-piperidino]carboniloxicamptotecina; CYP3A4, citocrom P450 3A4; NPC, 7-etil-10-(4-amino-1-piperidino) carboniloxicamptotecina; SN-38, 7-etil-10-hidroxicamptotecina; SN-38G, glucurònid de l'SN-38; UDP, uridindifosfat; UGT1A1, uridindifosfat glucuronil transferasa família 1 membre A1.

Diversos estudis han vinculat la toxicitat induïda per l'irinotecan a una activitat disminuïda de l'enzim detoxificador UGT1A1 (224,225). En concret, un polimorfisme a la regió promotora del gen UGT1A1 (TA indel, rs8175347), que consisteix en una variació en el nombre de repeticions del dinucleòtid TA, s'associa amb variacions en l'expressió i activitat enzimàtica. En població caucàsica, la forma més fregüent (al·lel salvatge o wild-type) és la de 6 repeticions, A(TA)₆TAA, que es correspon amb una activitat enzimàtica normal. La segona forma més freqüent és la que conté 7 repeticions, és a dir, A(TA)₇TAA (UGT1A1*28), que es correspon amb una activitat enzimàtica disminuïda (226). En població espanyola, la freqüència del genotip homozigot mutat o Síndrome de Gilbert (UGT1A1*28/*28) és del 9% aproximadament, la del genotip heterozigot (UGT1A1*1/*28) del 51% i la del genotip salvatge (UGT1A1*1/*1) del 40% (227). Això implica una freqüència al·lèlica d'UGT1A1*28 al voltant de 0,34. Hi ha altres variants descrites, com ara A(TA)₅TAA (UGT1A1*36), que implica una activitat enzimàtica lleugerament augmentada, i A(TA)₅TAA (UGT1A1*37), que implica una activitat enzimàtica disminuïda, de forma més accentuada encara que en el cas d'A(TA)₇TAA (UGT1A1*28) (228). Ambdós al·lels es troben quasi exclusivament en població africana, amb unes freqüències al·lèliques de 0,03–0,10 i 0,02–0,07, respectivament (228,229). Un altre al·lel que s'ha relacionat amb un major risc de toxicitat greu secundària a l'irinotecan és l'UGT1A1*6 (c.211G>A (p.Gly71Arg)), variant rara en caucàsics però present en un 16-40% de pacients asiàtics (230).

Diversos estudis farmacogenètics han demostrat la relació entre la presència de l'al·lel UGT1A1*28 i l'aparició de toxicitat greu induïda per irinotecan (194,195,231,232). En base a aquestes evidències, el 2005 l'FDA va reconèixer la utilitat clínica del genotipat d'UGT1A1 en pacients candidats a rebre irinotecan i va especificar a la seva fitxa tècnica l'associació entre l'activitat enzimàtica disminuïda de l'al·lel UGT1A1*28 i l'alt risc de patir neutropènia greu, recomanant una reducció de dosi (sense especificar-ne el percentatge) en els pacients homozigots per a aquest al·lel (233). S'han publicat recomanacions contradictòries sobre la reducció de dosi d'irinotecan a realitzar en pacients portadors de l'al·lel UGT1A1*28. Així doncs, mentre que el Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG), de la Reial Associació Holandesa per a l'Avenç de la Farmàcia (KNMP), recomana reduir un 30% la dosi d'irinotecan només en pacients homozigots mutats i si la dosi prescrita és superior a 250 mg/m² (234), el Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique (GPCO), de França, recomana la mateixa reducció de dosi en pacients UGT1A1*28/*28 que reben l'esquema FOLFIRI (dosi d'irinotecan de 180 mg/m²) (235). L'experiència investigadora del nostre grup corrobora les recomanacions del grup francès que, de fet, va incloure per fonamentar les seves recomanacions l'assaig clínic realitzat el 2011 amb 94 pacients tractats amb FOLFIRI que van ser classificats en funció del genotip d'UGT1A1 per a l'escalada de dosi d'irinotecan. Els resultats de l'estudi van demostrar que els pacients UGT1A1*28/*28 toleraven una dosi màxima d'irinotecan de 130 mg/m², un 28% inferior a la dosi estàndard de 180 mg/m² recomanada a la fitxa tècnica del fàrmac. En canvi, es va observar que la dosi estàndard d'irinotecan de l'esquema FOLFIRI és considerablement inferior a la que pot ésser tolerada pels pacients

amb genotip *UGT1A1*1/*1* (390 mg/m²) i **1/*28* (340 mg /m²) (236). Aquests resultats indiquen que els pacients amb genotip favorable per a la *UGT1A1* (*UGT1A1*1/*1* i *UGT1A1*1/*28*) podrien rebre en la pràctica clínica habitual dosis superiors als 180 mg/m² establerts a l'esquema FOLFIRI sense experimentar més toxicitat i, probablement, amb una millor resposta farmacològica.

Tot i el paper rellevant que desenvolupa la UGT1A1 en el desenvolupament de toxicitat greu induïda per irinotecan, hi ha pacients que desenvolupen efectes adversos greus malgrat presentar una activitat enzimàtica normal (genotip *UGT1A1*1/*1*). En aquest sentit, cal tenir present que hi ha moltes altres proteïnes, a part de la UGT1A1, que participen en el transport o metabolisme de l'irinotecan. Per exemple, diversos transportadors de la família ABC (*ATP-binding cassette transporters*), com ara l'ABCB1, l'ABCC2 o l'ABCG2, entre d'altres, participen en el transport del fàrmac entre la sang i l'hepatòcit i/o entre l'hepatòcit i la bilis (Figura 17). És de suposar, doncs, que la funcionalitat d'aquestes molècules pot contribuir a l'aparició de toxicitat secundària a irinotecan. Per exemple, diverses variants en els gens *ABCB1* i *ABCC2* s'han associat amb toxicitat greu induïda per irinotecan (237,238), tot i que l'evidència disponible és encara escassa.



Figura 17: Metabolisme de l'irinotecan i mecanismes de transport involucrats en la seva farmacocinètica. Figura adaptada de Chen *et al* (239). Abreviatures: ABCB1, transportador dependent d'ATP subfamília B membre 1; ABCC1, transportador dependent d'ATP subfamília C membre 1; ABCC2, transportador dependent d'ATP subfamília C membre 2; ABCC5, transportador dependent d'ATP subfamília C membre 5; ABCG1, transportador dependent d'ATP subfamília G membre 1; ABCC2, transportador dependent d'ATP subfamília G membre 1; ABCC2, transportador dependent d'ATP subfamília G membre 1; ABCG2, transportador dependent d'ATP subfamília G membre 2; APC, 7-etil-10-[4-N-(5-àcid aminopentanoic)-1-piperidino]carboniloxicamptotecina; CES, carboxilesterasa; CYP3A4, citocrom P450 3A4; CYP3A5, citocrom P450 3A5; NPC, 7-etil-10-(4-amino-1-piperidino) carboniloxicamptotecina; SLC01B1, transportador d'anions orgànics 1B1; SN-38, 7-etil-10-hidroxicamptotecina; SN-38G, glucurònid de l'SN-38; UGT1A1, uridindifosfat glucuronil transferasa família 1 membre A1; UGT1A9, uridindifosfat glucuronil transferasa família 1 membre A9.

Altres estudis han analitzat el paper del CYP3A4 (Citocrom P450 Família 3 Subfamília A Membre 4) en la toxicitat induïda per irinotecan. El CYP3A4 és un enzim que transforma l'irinotecan en metabòlits inactius, entre els quals destaquen l'APC (7-etil-10-[4-N-(5-àcid aminopentanoic)-1-piperidino]carboniloxicamptotecina) i l'NPC (7-etil-10-(4-amino-1-piperidino) carboniloxicamptotecina) (Figura 16) (223). Tanmateix, tot i que el fenotip del CYP3A4 s'ha associat amb la farmacocinètica de l'irinotecan (240–244), no s'han trobat associacions estadísticament significatives entre el genotip del CYP3A4 i l'aparició de toxicitat secundària a l'irinotecan (245). En aquest sentit, cal tenir present que el *CYP3A4* és un gen molt poc polimòrfic. De fet, només es coneixen tres al·lels no funcionals (*6, *20 i *26), els quals generen un codó de parada prematur (246–248). Les tres variants són extremadament rares en població caucàsica, tot i que recentment s'ha descrit una freqüència d'un 1,2% de portadors de l'al·lel *CYP3A4*20* en població espanyola com a resultat d'un efecte fundador (249). Els resultats d'aquest estudi indicarien que aquesta variant constitueix l'al·lel no funcional més prevalent del *CYP3A4* en el nostre entorn. Tanmateix, és necessària la realització de més estudis per validar la prevalença descrita en el nostre entorn i dilucidar la seva possible utilitat clínica.

7.2.3. Oxaliplatí

L'oxaliplatí és un agent alquilant derivat del platí àmpliament utilitzat en el tractament del CCR. Genera enllaços intra i intercatenaris que impedeixen la replicació i transcripció de l'ADN. Tanmateix, les cèl·lules disposen de diferents vies per reparar l'ADN danyat, entre les quals destaca la de reparació per escissió de nucleòtids (NER), on un dels components claus és la proteïna ERCC1. S'han realitzat múltiples estudis per determinar si l'expressió d'ERCC1 afecta la resposta als platins, amb la hipòtesi que una menor expressió causaria una menor reparació dels adductes generats per l'oxaliplatí i, en conseqüència, una major resposta al fàrmac. No obstant això, els resultats publicats fins ara són contradictoris (250–252). L'assaig clínic MAVERICC, recentment publicat, mostra que el tractament en primera línia amb FOLFIRI-bevacizumab presenta una tendència a una millor SLP (p=0,06) i SG (p=0,09) enfront de FOLFOX-bevacizumab, sense que l'expressió tumoral d'ERCC1 generi diferències estadísticament significatives entre ambdós esquemes. Sí que s'observa una major taxa de resposta objectiva al tractament amb FOLFOX-bevacizumab en pacients amb baixa expressió d'ERCC1 tumoral (63,7%) en relació amb els d'alta expressió tumoral (56,3%) (253).

D'altra banda, la detoxificació de l'oxaliplatí depèn d'enzims de fase II de la família de les glutatió-Stransferases (com ara GSTP1). Diversos estudis han avaluat l'associació de polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNPs) en gens d'aquesta família (com ara l'rs1695, Ile105Val, a *GSTP1*) amb l'aparició de neurotoxicitat associada a l'oxaliplatí però, de forma anàloga al que s'ha comentat anteriorment per a ERCC1, els resultats obtinguts fins ara són contradictoris i no implementables a la pràctica clínica diària (252,254).

7.2.4. Anticossos anti-EGFR: cetuximab i panitumumab

El receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR), també conegut com HER1 o ErbB1, pertany a la família de receptors tirosina quinasa ErbB, que també inclou els receptors HER2, HER3 i HER4 (ErbB2-4). La majoria de càncers colorectals expressen l'EGFR, l'activació del qual inicia una via de senyalització implicada en la proliferació i supervivència cel·lulars (255,256). Més concretament, quan a l'EGFR s'hi uneix un dels seus lligands (per exemple, el factor de creixement epidèrmic, EGF), es produeix l'homo o heterodimerització del receptor seguida de la seva autofosforilació, la qual cosa desencadena una cadena de transmissió de senyals que, en última instància, acaba conduint a la proliferació i invasió cel·lulars, al desenvolupament de metàstasis i a la producció de nous vasos sanguinis (neoangiogènesi) Aquests processos tenen lloc a través de dues vies: la via RAS-RAF-MEK-MAPK i la via PI3K-AKT-mTOR (Figura 18).



Figura 18. Via del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) i altres receptors paràlegs, incloent els lligands principals i les molècules que participen en la via de transmissió de senyals. Figura adaptada de Ciardello *et al* (134). Abreviatures: Akt, *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*; EGF, factor de creixement epidèrmic; EGFR, receptor del factor de creixement epidèrmic; HB-EGF, factor de creixement epidèrmic lligat a heparina; HER2-4, receptors dels factors de creixement epidèrmic humà 2-4; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; MEK, *mitogen-activated protein kinase*; NRGs, neuregulines; PI3K, fosfoinositol 3-quinasa; RAF, *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*; RAS, *rat sarcoma viral oncogene homolog*; SOS, *Son Of Sevenless*; TGF-α, factor de creixement transformador alfa, VEGF, factor de creixement endotelial vascular.

El fet que la majoria de CCRm presentin una activació en la via del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) fa que aquest receptor constitueixi una bona diana farmacològica. Tal i com s'ha comentat anteriorment, estan comercialitzats dos anticossos monoclonals anti-EGFR, cetuximab i panitumumab que, combinats amb QT o en monoteràpia, s'utilitzen per al tractament del CCRm (42,134,137). Els anticossos anti-EGFR presenten una afinitat per l'EGFR molt superior a la dels lligands endògens. En unir-se al receptor, el fàrmac inhibeix l'autofosforilació del receptor i en provoca la seva internalització cel·lular, la qual cosa pot comportar una disminució dels receptors disponibles a la superfície cel·lular (*downregulation*). Tot plegat acaba conduint a la inhibició del creixement cel·lular, a la inducció de l'apoptosi i a un descens de la producció d'interleucina 8 i del factor de creixement endotelial vascular (VEGF). A més, el cetuximab, en ser un anticòs anti-EGFR IgG1, pot induir citotoxicitat cel·lular a través del mecanisme de citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos (ADCC, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (257).

a) Resistència primària als anticossos anti-EGFR

S'han descrit múltiples marcadors genètics de resposta/resistència primària als agents anti-EGFR, que es detallen a continuació.

➢ KRAS i NRAS

Nombrosos estudis han demostrat que la presència de mutacions activadores en els exons dos (codons 12 i 13), tres (codons 59 i 61) i quatre (codons 117 i 146) d'aquests protooncogens impliquen manca de resposta als fàrmacs anti-EGFR (258). Les primeres mutacions que es van descriure van ser les ubicades en els codons 12 i 13 de *KRAS* (exó 2), que inicialment eren les úniques que calia descartar per poder prescriure un fàrmac anti-EGFR. Més tard, a causa de les noves evidències científiques, també va passar a ser obligatòria la determinació de les mutacions ubicades en els exons 3 i 4 de *KRAS*, així com les presents en el gen *NRAS* (exons 2, 3 i 4). Per això, l'Agència Europea del Medicament (EMA) ha restringit l'ús d'aquests fàrmacs a aquells pacients que siguin natius o no mutats (*wild-type*) per a *KRAS* i *NRAS* (259,260). L'alt valor predictiu negatiu de les mutacions en *KRAS* i *NRAS* indueix a pensar que la inhibició de la via RAS/RAF/MAPK és responsable de l'activitat clínica dels anti-EGFR en tumors natius. No obstant això, cal tenir en compte que entre un 40 i un 50% dels pacients amb *KRAS* i *NRAS* natius no responen al tractament, la qual cosa suggereix que existeixen altres determinants moleculars de resposta que encara no s'han identificat.

> BRAF

La mutació V600E (c.1799T>A; p.(Val600Glu)), ubicada a l'exó 15 del gen *BRAF*, crea una molècula constitutivament activada que augmenta l'activitat de BRAF unes deu vegades en comparació amb el *wild-type* (203). Es tracta d'un factor validat de mal pronòstic, present en un 5-15% dels pacients amb CCRm
(202). A més, la presència d'aquesta mutació s'ha associat amb una manca de resposta a les teràpies anti-EGFR (261,262). Malgrat això, continua havent-hi controvèrsia sobre si aquesta mutació actua com a factor predictiu negatiu de resposta als fàrmacs anti-EGFR. De fet, l'ASCO recomana avaluar l'estat mutacional de *BRAF* com a marcador pronòstic, però considera que no hi ha prou evidència per considerar-lo un biomarcador predictiu.

També s'han descrit altres mutacions ubicades en el gen *BRAF* diferents a la V600E, com ara la G466A, G469A, D594G, D594N, G596D, G596R, K601E..., presents en un 2% aproximadament dels tumors de pacients amb CCRm (263–265). Aquestes mutacions de *BRAF* que no afecten el codó 600 representen un 22% aproximadament del total de mutacions de *BRAF* en CCRm i diverses d'elles, com les ubicades en els codons 594 i 596, s'han associat a un pronòstic favorable (263,264). El pronòstic està relacionat amb l'activació o desactivació de l'activitat quinasa de BRAF. Així doncs, mutacions com ara la V600E, la G469A o la K601E, que impliquen una elevada activitat quinasa, es relacionarien amb un mal pronòstic, mentre que mutacions com ara la G466A, D594G, D594N, G596D o G596R, que impliquen una activitat quinasa reduïda o inexistent, es relacionarien amb un millor pronòstic (263,266,267).

РІКЗСА

Hi ha estudis contradictoris sobre el paper de diverses mutacions en la resposta als anti-EGFR, essent les mutacions a l'exó 21 (abans considerat exó 20) les que més s'han associat a manca de resposta als anti-EGFR (45,49,50,268–270).

Amfiregulina i epiregulina

S'ha publicat que una major expressió tumoral dels lligands amfiregulina i epiregulina es relaciona amb una millor resposta als fàrmacs anti-EGFR (271–273).

Expressió d'EGFR

No ha demostrat tenir un valor predictiu de resposta als agents anti-EGFR, raó per la qual la seva determinació no està recomanada (274).

Alteracions en altres receptors

L'activació d'altres receptors, com ara HER2, HER3, FGFR1, etc., també genera resistència als agents anti-EGFR (275). Un dels articles més destacats en aquest sentit el van publicar el 2015 Bertotti *et al*, que van descriure noves mutacions a *ERBB2, EGFR, FGFR1, PDGFRA* i *MAP2K1* com a mecanismes potencials de resistència primària als anti-EGFR (276).

70

Expressió d'EphA2

La via de senyalització del receptor EphA2 interactua en múltiples punts amb les vies de l'EGFR, FAK i VEGF promovent la migració cel·lular i l'aparició de metàstasis. A més, s'ha descrit que la sobreexpressió d'EphA2 podria implicar resistència a cetuximab, independentment de l'estat mutacional de *RAS* (277).

Localització tumoral

Diversos estudis han demostrat que els pacients amb CCRm dret es beneficien menys del tractament amb anti-EGFR que els pacients amb CCRm esquerre (278–280). En realitat, la localització dreta no constitueix un factor predictiu negatiu de resposta als anti-EGFR, sinó que es tracta d'un factor de mal pronòstic, de tal forma que els CCR drets presenten pitjors resultats independentment del tractament rebut (281). Les guies actuals recomanen l'ús d'anti-EGFR en els pacients que, a part de presentar els gens *RAS* i *BRAF* no mutats, no tinguin un tumor de localització dreta (84,140). Tanmateix, una metanàlisi recent ha demostrat que, en tumors drets, la teràpia anti-VEGF aconsegueix millors resultats que la teràpia anti-EGFR en SLP i SG, però no en taxa de resposta global. Per tant, si l'objectiu terapèutic és aconseguir una bona resposta, la teràpia anti-EGFR estaria indicada tant en tumors drets com en tumors esquerres (281). De fet, aquesta mateixa metanàlisi mostra que, en tumors de localització esquerra, el tractament amb anti-EGFR és superior al tractament amb anti-VEGF en SLP, SG i taxa de resposta global (281).

Subtipus molecular

En relació amb la predicció de resposta a antagonistes d'EGFR en funció del subtipus molecular, és d'esperar que pocs pacients tractats amb anti-EGFR presentin el subtipus CMS1 o CMS3, a causa de la seva elevada presència de mutacions en *BRAF* i *KRAS*, respectivament, que impliquen que ja no es prescriguin aquests fàrmacs. D'altra banda, s'ha descrit que l'activació de la signatura d'expressió de transició epitelimesènquima, on els marcadors mesenquimals i epitelials estan sobre i infraexpressats respectivament, es correlaciona amb un benefici reduït a anticossos anti-EGFR (282,283), la qual cosa fa preveure que els tumors CMS4 presentin resistència intrínseca als agents anti-EGFR. Així doncs, tot sembla indicar que el subtipus CMS2 és el que presentarà una millor resposta a cetuximab i panitumumab.

b) Resistència adquirida als anticossos anti-EGFR

La gran majoria dels tumors, en ser tractats amb agents anti-EGFR, es tornen resistents a aquests fàrmacs, ja sigui per la desregulació en la internalització del receptor, per l'activació d'altres receptors oncogènics (MET, HER2, HER3, etc.) o per l'aparició de noves mutacions en dominis del receptor d'unió a l'anticòs monoclonal (284). Aquesta resistència adquirida podria suggerir que la inhibició d'un únic receptor ErbB seria insuficient per controlar i eradicar les cèl·lules canceroses (285,286). La resistència adquirida als agents anti-EGFR es deu habitualment a mutacions en *RAS* o en el domini extracel·lular del receptor EGFR.

- **Mutacions en RAS:** aproximadament el 50% dels pacients progressen per l'aparició de mutacions en RAS no detectades en el tumor primari (184,186,287).

- **Mutacions en el domini extracel·lular del receptor EGFR:** constitueixen aproximadament el 20% de les mutacions de resistència adquirides al tractament amb anti-EGFR La primera mutació de resistència descrita en aquest receptor va ser el canvi de serina a arginina a la posició 492 (S492R) (284), la qual apareix en el 16% aproximadament dels pacients tractats amb cetuximab (288,289). Aquesta mutació no s'ha identificat en CCR abans de l'inici del tractament amb cetuximab (290). Posteriorment s'han descrit altres mutacions de resistència que afecten el domini extracel·lular del receptor, com ara la R451C, S464L, G465R, K467T o I491M (286).

S'han descrit altres mecanismes de resistència adquirida als agents anti-EGFR, com ara l'amplificació del receptor MET (291).

A més a més de tot el que s'ha comentat, és destacable esmentar que les cèl·lules disposen de mecanismes endògens capaços de regular l'efecte de l'EGFR i de la resta de membres de la família ErbB, ja que la quantitat de receptors i lligands expressada a la superfície cel·lular és dependent de processos de reciclatge i degradació. En aquests processos hi participen diferents proteïnes (LRIG1-3, SOCS4, SOCS5, SPRY2, RALT, etc). Hi ha pocs estudis que hagin analitzat si mutacions en gens involucrats en la regulació negativa/positiva dels receptors ErbB poden afectar la resposta al tractament amb fàrmacs anti-EGFR en CCRm.

7.2.5. Fàrmacs antiangiogènics: bevacizumab i aflibercept

Els dos principals agents antiangiogènics utilitzats en CCRm són el bevacizumab i l'aflibercept. El bevacizumab s'uneix al VEGFA (membre principal de la família VEGF implicat en l'angiogènesi) impedint-ne la unió als seus receptors (principalment VEGFR1 i VEGFR2). Pel que fa a l'aflibercept, a part d'unir-se al VEGFA també s'uneix al VEGF de tipus B i al factor de creixement placentari (PIGF), tots ells membres de la família de factors antiangiogènics VEGF.

72

S'han realitzat nombrosos estudis per tal d'identificar biomarcadors útils per predir la resposta als agents antiangiogènics en CCRm. Tanmateix, els resultats publicats fins ara són contradictoris i no concloents (292). Diversos estudis han relacionat una major expressió de VEGF amb un pitjor pronòstic (253,293), però no és clar el seu valor predictiu envers la resposta als fàrmacs antiangiogènics. L'assaig MAVERICC, anteriorment citat, va constatar que nivells plasmàtics elevats de VEGFA es relacionaven amb una menor SLP i SG en pacients amb CCRm tractats amb FOLFIRI o FOLFOX i bevacizumab (253). D'altra banda, l'assaig VELOUR va constatar que nivells sèrics elevats de VEGFA i PIGF indicaven adquisició de resistència al tractament amb bevacizumab (293).

Diversos estudis també han avaluat si variants en gens relacionats amb la via del VEGF podrien afectar la resposta a bevacizumab en pacients amb CCRm. Loupakis *et al* van analitzar si variants genètiques germinals en el gen *VEGFA* i en els gens que codifiquen els principals receptors d'aquesta proteïna (VEGFR1/FLT1 i VEGFR2/KDR), afectaven la resposta a FOLFIRI-bevacizumab en pacients amb CCRm. Aquest estudi pretenia validar de forma prospectiva el paper predictiu de l'rs833061 (un dels SNPs funcionals més estudiats de *VEGFA*), però el resultat va ser negatiu (294). A part d'aquest estudi s'han publicat múltiples articles, la majoria d'ells retrospectius, avaluant si SNPs en gens de la via del VEGF podrien afectar la resposta a un esquema de tractament que contingués bevacizumab. Tal i com ja s'ha comentat, els resultats no són concloents (295–299). Tot sembla indicar, doncs, que la complexitat del procés d'angiogènesi fa difícil la troballa clara d'algun SNP funcional com a predictor de resposta als agents antiangiogènics.

Pel que fa a l'aflibercept, s'han publicat pocs articles sobre marcadors de resposta a aquest fàrmac. Un d'ells és el recentment publicat assaig VELOUR, que va demostrar que l'aflibercept és actiu independentment dels nivells sèrics de VEGFA i PIGF (293). Això es podria deure a la major afinitat que presenta l'aflibercept envers VEGFA i PIGF en comparació a altres agents antiangiogènics com el bevacizumab.

73

Objectius

Aquesta tesi s'ha centrat en la realització d'estudis genètics per identificar nous factors pronòstics o predictius en càncer colorectal que poguessin ser d'utilitat en la pràctica clínica.

Els objectius han estat els següents:

- a) Identificar variants genètiques en la via del VEGF com a factors pronòstics en càncer de còlon d'estadis II i III.
- b) Estudiar la rellevància de variants funcionals ubicades en els gens UGT1A1, CYP3A4 i ABCB1 en l'aparició de toxicitat greu induïda per irinotecan.
- c) Avaluar si l'ús de FOLFIRI a altes dosis en pacients amb genotip UGT1A1*1/*1 i UGT1A1*1/*28 permet obtenir una millor taxa resposta en primera línia de tractament del càncer colorectal metastàtic, sense un increment significatiu de la toxicitat.
- d) Identificar noves variants genètiques somàtiques que modulin la resposta als fàrmacs anti-EGFR en càncer colorectal metastàtic.

Els articles

1. Estudi sobre la identificació de biomarcadors pronòstics en càncer de còlon localitzat

En aquest apartat s'hi inclou la publicació que es descriu a continuació (primer article de la tesi):

ARTICLE 1

Genetic variants in the VEGF pathway as prognostic factors in stages II and III colon cancer

The Pharmacogenomics Journal 2018; 18(4):556–64 doi: 10.1038/s41397-017-0009-x PMID: 29282362

Pau Riera^{1,2*}, Anna C. Virgili^{3,4*}, Juliana Salazar^{1,5}, Ana Sebio³, María Tobeña³, Ivana Sullivan³, David Páez³

¹Servei de Genètica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

²Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Espanya

³Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

⁴Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Espanya

⁵CIBERER, U-705, Barcelona, Espanya

*Ambdós autors van contribuir de forma equitativa en l'estudi

ARTICLE



Genetic variants in the VEGF pathway as prognostic factors in stages II and III colon cancer

Pau Riera D^{1,2} · Anna C. Virgili ^{3,4} · Juliana Salazar^{1,5} · Ana Sebio³ · María Tobeña³ · Ivana Sullivan³ · David Páez³

Received: 9 June 2017 / Revised: 19 September 2017 / Accepted: 6 November 2017 / Published online: 27 December 2017 © Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature 2017

Abstract

The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms in the prognosis of colon cancer prognosis remains unclear. We evaluated the influence of 28 single-nucleotide polymorphisms in 12 genes in the VEGF pathway on the prognosis of 347 patients with stage II–III colon cancer. We found that rs9513070 (*VEGFR1*) and rs1137282 (*KRAS*) were associated with overall survival in stage II colon cancer patients (p = 0.025 and p = 0.001, respectively). When primary tumor location was considered, rs9513070 was also associated with relapse-free and overall survival (p = 0.033 and p = 0.031, respectively) in left colon cancer patients. Additionally, rs35251833 in the *ITGAV* gene correlated with relapse-free survival (p = 0.032). This study provides evidence that germline polymorphisms in *VEGFR1*, *KRAS* and *ITGAV* genes are associated with prognosis in stages II–III colon cancer patients. As stage and tumor location are correlated with prognosis, future genetic studies should stratify colon cancer patients according to these parameters.

Introduction

The survival of colon cancer (CC) has improved in recent decades, however this disease remains the third cause of cancer death worldwide [1]. Patients with stages II and III CC undergo a complete surgical resection with curative intent. However, the risk of tumor recurrence is considerable, especially in patients with stage III and high-risk stage II disease. In these stages, adjuvant chemotherapy following surgery is recommended.

Several biomarkers have been correlated with prognosis of CC. Microsatellite instability, for example, implies a favorable outcome in stage II patients. Other putative

Pau Riera and Anna C. Virgili contributed equally to this study.

Juliana Salazar jsalazar@santpau.cat

- ¹ Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain
- ² Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain
- ³ Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain
- ⁴ Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain
- ⁵ CIBERER, U-705 Barcelona, Spain

biomarkers include *BRAF*, *KRAS PIK3CA* mutations and CDX2 expression, but few studies have described the role of molecules such as VEGF and interleukins in the like-lihood of recurrence in stage II–III colon cancer [2–5].

The vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway plays a key role in tumor-induced angiogenesis, which promotes the growth and progression of solid tumors [6, 7]. Activation of this pathway may confer a worse prognosis in stages II-III colon cancer as it can promote the switch from dormant tumor cells not removed by surgery to proliferative cells [8]. Multiple proteins are involved in the VEGF pathway, particularly VEGFA, a major mediator of angiogenesis whose synthesis is stimulated under hypoxic conditions by HIFα. Several receptors (VEGFR1/FLT1, VEGFR2/KDR, VEGFR3 and FGFR), neuropilins (NRP1) and integrins (ITGAV), among other proteins are involved in the process. The binding of circulating VEGFA to its main receptors, VEGFR1 and VEGFR2, promotes cell migration, survival and proliferation by triggering a protein cascade that involves PRKCE, GRB2, RAS and MAP kinases [9-11].

Heritable functional variation in genes involved in the angiogenesis process may impact on the angiogenic switch, tumor progression and, hence, on clinical cancer outcomes. In the present work, we analyzed 28 genetic variants in a panel of 12 VEGF-dependent genes (*VEGFA*, *VEGFR1*/*FLT1*, *VEGFR2*/*KDR*, *GRB2*, *ITGAV*, *KISS1*, *KRAS*, *PRKCE*, *HIF1α*, *MAP2K4*, *MAP2K6*, *MAPK11*). The goal

Table 1 Selected polymorphisms in VEGF-related genes

SNP	Gene symbol	Alleles	MAF (%)	Rationale for genotyping (ref.)
rs7219	GRB2	T>C	26	LCL eQTLs [12]
rs11549465	HIF1a	C>T	10	mCRC survival [13]
rs35251833	ITGAV	G>A	31	LCL eQTLs [12]
rs71745629	KISS1	T>*	22	mCRC survival [14]
rs61764370	KRAS	T>G	10	Let7 [15]
rs10842513	KRAS	C>T	9	LCL eQTLs [12]
rs12813551	KRAS	T>C	40	Stage I–III NSCLC RFS [16]
rs1137282	KRAS	A>G	22	Stage I–III NSCLC RFS [17]
rs3826392	MAP2K4	T>G	25	mCRC survival [14]
rs11656130	MAP2K6	T>G	45	mCRC PFS [14]
rs2716191	MAP2K6	T>C	48	mCRC PFS [14]
rs2076139	MAPK11	C>T	26	LCL eQTLs [12]
rs4953299	PRKCE	T>C	24	LCL eQTLs [12]
rs833061	VEGFA	T>C	50	mCRC PFS [18]
rs1570360	VEGFA	G>A	32	mCRC PFS [18]
rs2010963	VEGFA	G>C	31	mCRC OS [19]
rs3025039	VEGFA	C>T	12	Stage III CRC RFS [5]
rs699947	VEGFA	C>A	50	mCRC OS [19]
rs3024997	VEGFA	G>A	31	LCL eQTLs [12]
rs9582036	VEGFR1	A>C	27	Stage I–III NSCLC RFS [16]
rs7993418	VEGFR1	A>G	20	Advanced NSCLC survival [20]
rs9513070	VEGFR1	A>G	41	mCRC survival [21]
rs7996030	VEGFR1	G>A	20	Stage I–III NSCLC RFS [16]
rs2305948	VEGFR2	C>T	9	mCRC PFS [14]
rs7667298	VEGFR2	C>T	45	mCRC survival [14]
rs1551641	VEGFR2	G>A	30	mCRC survival [14]
rs2071559	VEGFR2	A>G	49	mCRC survival [14]
rs1870377	VEGFR2	T>A	23	Functional evidence

GRB2 growth factor receptor-bound protein 2, *HIF1a* hypoxia inducible factor 1, alpha subunit, *ITGAV* integrin, alpha V, *KISS1* KiSS-1 metastasis-suppressor, *KRAS* kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, *MAP2K4* mitogen-activated protein kinase kinase 4, *MAP2K6* mitogen-activated protein kinase kinase 6, *MAPK11* mitogen-activated protein kinase 11, *PRKCE* protein kinase C, epsilon, *VEGFA* vascular endothelial growth factor A, *VEGFR1* or *FLT1* fmsrelated tyrosine kinase 1, *VEGFR2* or *KDR* kinase insert domain receptor, *eQTLs* quantitative trait loci expressions, *LCL* lymphoblastoid cell lines, *MAF* minor allele frequency (1000 Genomes Project, European population; accession date: 25/04/17), *mCRC* metastatic colorectal cancer, *NSCLC* non-small cell lung cancer, *RFS* relapse-free survival, *PFS* progression-free survival of this study was to evaluate the association between the selected genetic variants and the clinical outcome in a cohort of 347 stages II–III CC patients.

Materials and methods

Patient population

Three-hundred and forty-seven patients with stage II–III CC who underwent radical surgery between 2009 and 2014 at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP, Barcelona, Spain) were consecutively included in the study. Patients with rectal tumor were excluded. Patient data including tumor localization, histological tumor grade, lymph node sampling and vascular or perineural invasion were collected retrospectively through chart review. Patients were treated with fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy at clinician discretion. Blood samples from 345 patients were available for the genetic analyses. The study was approved by the Institutional Ethics Committee at HSCSP and all the study participants gave informed consent for the analysis of molecular correlates.

Genetic studies

We analyzed 28 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in 12 candidate genes involved in the VEGF pathway. The selected SNPs were (i) SNPs associated with lymphoblastoid cell line (LCL) mRNA expression of VEGF pathway genes [12] and (ii) functional variants associated with cancer survival according to studies reported in the literature [5, 13–22]. The SNPs that were Tag SNPs had an r^2 greater than 0.8. All SNPs had a minor allele frequency (MAF) >5% in the Caucasian population. Table 1 shows detailed information about the SNPs.

Genomic DNA was automatically extracted from peripheral whole-blood samples (Autopure, Qiagen, Hilden, Germany). SNP genotyping was performed by means of real-time PCR using TaqMan® SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 48.48 dynamic arrays on the BioMarkTM system (Fluidigm, San Francisco, CA, USA). Patients' characteristics and clinical outcome were unknown to the investigator conducting the genetic analyses. SNP allele frequencies were comparable to those reported in the 1000 Genomes project. Genotyping was successful in atleast 99% of cases for each SNP analyzed. The quantity and/or the quality of the extracted DNA were the most common causes of failure.

Statistical analyses

The endpoints of the study were recurrence-free survival (RFS) and overall survival (OS). RFS was calculated from the date of surgery until the date of first recurrence. RFS was censored at the last follow-up or the time of death if the patient remained tumor recurrence-free at that time. OS was defined as the time from the surgery date until death from any cause or last follow-up. We also analyzed survival after relapse (SaR), which was defined as the time from the relapse date until death from any cause or last follow-up. All patients were included in the colon cancer surveillance program of HSCSP, providing history and undergoing physical examination and CEA determination every 3 months for 2 years and every 6 months at years 3-5 after surgery, colonoscopy at year 1 and thereafter every 3-5 years, and computed tomographic scans of chest and abdomen every year. The associations between polymorphisms and clinicopathological features were evaluated using Fisher's exact test. The associations of polymorphisms with RFS and OS were analyzed using Kaplan-Meier curves and a log-rank test. Three different models of inheritance were considered to evaluate associations with outcome variables-additive, dominant and recessive. To identify markers associated with the outcomes independently from clinical data, each SNP was fitted to a Cox model in which the statistically significant clinicopathological variables in the univariate analyses were included as covariates. For each SNP, Hardy-Weinberg equilibrium was assessed using an exact test. All statistical tests were performed at 95% significance. All analyses were performed using SPSS (version 19.0, IBM).

Results

We studied a total of 347 patients. Two-hundred and five were diagnosed as stage II and 142 were classified as stage III CC. Following total surgical resection of the tumor, 47 patients received adjuvant fluorouracil plus leucovorin (FL) or oral fluoropyrimidine capecitabine, and 162 patients were treated with oxaliplatin added to FL (FOLFOX) or capecitabine (XELOX). The remaining 138 patients did not receive adjuvant therapy.

Table 2 shows the baseline clinical characteristics. The median follow-up was 46.3 months (range, 9.3–91.5 months). Seventy-one patients (20.5%) relapsed during the follow-up. Thirty-four of the 71 corresponded to 16.6% of the stage II patients, while the remaining 37 patients represented 26.1% of the stage III group.

The stage II and stage III probability of 3-year recurrence-free survival was 0.876 ± 0.023 and 0.800 ± 0.034 , respectively. The stage II and stage III probability of 5-year

Table 2 Baseline patient characteristics

	n	%
Sex		
Male	193	55.6
Female	154	44.4
Age		
<75	212	61.1
≥75	135	38.9
T stage		
T1 and T2	17	4.9
Т3	216	62.2
T4	114	32.9
Grade		
Low	287	82.7
High	48	13.8
Missing	12	3.5
N stage		
N0	205	59.1
N1	96	27.7
N2	46	13.3
Stage		
П	205	59.1
III	142	40.9
N of resected lymph nodes		
<12	57	16.4
≥12	290	83.6
Vascular invasion		
Yes	65	18.7
No	210	60.5
Missing	72	20.7
Perineural invasion		
Yes	49	14.1
No	223	64.3
Missing	75	21.6
Tumor side		
Right	143	41.2
Left	204	58.8
Adjuvant treatment		
5-FU/LV or capecitabine	47	13.5
5-FU/LV/oxaliplatin or capecitabine/oxaliplatin	162	46.7
No adjuvant therapy	138	39.8

overall survival was 0.860 ± 0.025 and 0.766 ± 0.036 , respectively.

Stage classification was significantly associated with RFS (p = 0.028) and OS (p = 0.001). Tumor grade was significantly associated with OS (p = 0.032). Localization of the tumor and administration of adjuvant therapy were associated with OS (p = 0.05). Perineural invasion and the

number of resected lymph nodes were also significantly associated with RFS (p = 0.004 and p = 0.05, respectively). Thus, these covariates were included in the multivariate model.

Genetic determinants and RFS

In the univariate analysis of the stage II and III patients, two genetic variants were significantly associated with RFS: rs61764370 in the *KRAS* gene (p = 0.041) and rs699947 in the *VEGFA* gene (p = 0.035). These results are detailed in Table 3. Non-significant genetic variants are presented in the Supplementary Table. Stage II patients showed a significant association between RFS and four genetic variants: rs35251833 in the *ITGAV* gene (p = 0.018), rs71745629 in the *KISS1* gene (p = 0.018), rs61764370 in the *KRAS* gene (p = 0.046) and rs4953299 in the *PRKCE* gene (p = 0.033) (Table 4). No association was found between any of the SNPs evaluated and RFS in stage III colon cancer patients. In the multivariate analysis, none of the variants remained significantly associated with RFS.

Genetic determinants and OS

In the univariate analysis of the stage II and III patients, three genetic variants were significantly associated with OS: rs11656130 (*MAP2K6*) (p = 0.017), rs9513070 (*VEGFR1*) (p = 0.041) and rs1551641 (*VEGFR2*) (p = 0.049). Table 3 shows these results. Polymorphisms not significantly associated with OS are detailed in the Supplementary Table. Stage II patients showed a significant association between OS and six genetic variants corresponding to four different genes: rs11549465 (*HIF1a*) (p = 0.003); rs1137282 (*KRAS*) (p = 0.001); rs833061, rs1570360 and rs699947 (*VEGFA*) (p = 0.038, p = 0.009 and p = 0.035, respectively) and rs9513070 (*VEGFR1*) (p = 0.025) (Table 4). No association was found between any of the SNPs evaluated and OS in stage III colon cancer patients.

 Table 3
 Germline polymorphisms in the VEGF pathway and univariate analysis for time to recurrence and overall survival in patients with stage II or III colon cancer

		Time to recurrence			Overall survival			
Polymorphism	Ν	Probability \pm s.e. of 3-year free recurrence	Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> -value	Probability ± s.e. of 5-year survival	Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> -value	
KRAS rs61764370	0							
T/T	282	0.793 ± 0.025	1 (reference)	0.041	0.844 ± 0.033	1 (reference)	0.349	
T/G ^a	59	0.952 ± 0.027	0.45 (0.2, 0.9)		0.964 ± 0.025	0.61 (0.2, 1.7)		
G/G ^a	4							
MAP2K6 rs11656	5130							
T/T	99	0.857 ± 0.036	1 (reference)	0.215	0.894 ± 0.044	1 (reference)	0.017	
T/G	171	0.822 ± 0.030	1.28 (0.7, 2.3)		0.896 ± 0.034	1.13 (0.4, 2.8)		
G/G	75	0.770 ± 0.049	1.78 (0.9, 3.4)		0.719 ± 0.102	2.90 (1.1, 7.3)		
VEGFA rs699947	,							
C/C	97	0.882 ± 0.034	1 (reference)	0.035	0.902 ± 0.043	1 (reference)	0.346	
C/A ^a	164	0.798 ± 0.026	1.89 (1.0, 3.4)		0.849 ± 0.035	1.49 (0.6, 3.4)		
A/A ^a	84							
VEGFR1 rs95130	070							
A/A	112	0.763 ± 0.041	1 (reference)	0.133	0.812 ± 0.054	1 (reference)	0.041	
A/G ^a	165	0.849 ± 0.024	0.69 (0.4, 1.1)		0.891 ± 0.030	0.49 (0.2, 0.9)		
G/G ^a	67							
VEGFR2 rs15516	641							
G/G	164	0.832 ± 0.030	1 (reference)	0.755	0.932 ± 0.026	1 (reference)	0.049	
G/A ^a	161	0.812 ± 0.030	0.93 (0.6, 1.5)		0.796 ± 0.048	2.03 (0.9, 4.2)		
A/A ^a	20							

P-value was based on log-rank test in codominant

s.e. Greedwood standard error

^aDominant model

^bRecessive model

The bold values indicate the *P*-values statistically significant (P < 0.05)

Table 4 Germline polymorphisms in the VEGF pathway associated with RFS/OS by tumor stage

Recurrence free survival

	Stag	e II only			Stag	e III only		
Polymorphism	N	Probability \pm s.e. of 3-year free recurrence	Hazard ratio (95% CI)	P-value	N	Probability \pm s.e. of 3-year free recurrence	Hazard ratio (95% CI)	P-value
ITGAV rs3525	1833							
G/G	98	0.822 ± 0.039	1 (reference)	0.006	58	0.789 ± 0.054	1 (reference)	0.841
G/A	89	0.932 ± 0.027	0.39 (0.2, 0.9)		71	0.737 ± 0.054	1.04 (0.5, 2.0)	
A/A	17	0.706 ± 0.111	1.94 (0.8, 4.8)		12	0.825 ± 0.113	0.68 (0.1, 2.9)	
A/A ^b	17	0.706 ± 0.111	2.77 (1.1, 6.7)	0.018	12	0.825 ± 0.113	0.66 (0.1, 2.8)	0.570
KISS1 rs71745	629							
T/T	123	0.818 ± 0.035	1 (reference)	0.018	74	0.787 ± 0.049	1 (reference)	0.587
T/* ^a	77	0.923 ± 0.030	0.38 (0.2, 0.9)		61	0.746 ± 0.053	1.19 (0.6, 2.3)	
/ ^a	4				6			
KRAS rs61764.	370							
T/T	160	0.828 ± 0.030	1 (reference)	0.046	122	0.746 ± 0.040	1 (reference)	0.589
T/G ^a	40	0.977 ± 0.023	0.32 (0.1, 1.0)		19	0.895 ± 0.070	0.75 (0.3, 2.1)	
G/G ^a	4				0			
PRKCE rs4953	299							
T/T	122	0.865 ± 0.031	1 (reference)	0.098	86	0.775 ± 0.046	1 (reference)	0.788
T/C	72	0.874 ± 0.039	0.88 (0.4, 1.8)		45	0.740 ± 0.069	1.26 (0.6, 2.5)	
C/C	10	0.700 ± 0.145	2.82 (0.9, 8.3)		10	0.800 ± 0.126	0.94 (0.2, 4.0)	
C/C ^b	10	0.700 ± 0.145	2.96 (1.0, 8.4)	0.033	10	0.800 ± 0.126	0.86 (0.2, 3.6)	0.842

Overall survival

	Stag	e II only			Stag	e III only		
Polymorphism	N	Probability \pm s.e. of 5-year survival	Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> -value	N	Probability \pm s.e. of 5-year survival	Hazard ratio (95% CI)	P-value
HIF1a rs11549	465							
C/C	161	0.919 ± 0.033	1 (reference)	0.008	115	0.765 ± 0.058	1 (reference)	0.498
C/T	40	0.974 ± 0.026	0.39 (0.05, 3.1)		24	0.767 ± 0.175	0.49 (0., 2.1)	
T/T	30	0.667 ± 0.272	10.87 (1.3, 91.3)		2	-	-	
T/T ^b	30	0.667 ± 0.272	12.4 (1.5, 103.2)	0.003	2	-	-	0.53
KRAS rs113728	32							
A/A	121	0.922 ± 0.034	1 (reference)	0.002	89	0.803 ± 0.061	1 (reference)	0.737
A/G	75	0.950 ± 0.049	0.50 (0.1, 2.4)		50	0.717 ± 0.103	1.18 (0.5, 2.8)	
G/G	8	0.750 ± 0.153	7.99 (1.5, 41.1)		2	-	-	
G/G ^b	8	0.750 ± 0.153	9.81 (1.9, 48.4)	0.001	2	-	-	0.494
VEGFA rs8330	61							
T/T	61	0.984 ± 0.016	1 (reference)	0.074	38	0.682 ± 0.139	1 (reference)	0.883
T/C	94	0.906 ± 0.048	3.28 (0.4, 28.1)		67	0.810 ± 0.080	0.77 (0.3, 2.2)	
C/C	49	0.902 ± 0.047	7.84 (0.9, 67.5)		36	0.773 ± 0.089	0.85 (0.3, 2.7)	
C/C ^b	49	0.902 ± 0.047	3.29 (0.9, 10.9)	0.038	36	0.773 ± 0.089	1.00 (0.4, 2.6)	0.991
VEGFA rs1570.	360							
G/G	93	0.954 ± 0.027	1 (reference)	0.034	64	0.768 ± 0.084	1 (reference)	0.250
G/A	93	0.900 ± 0.053	1.07 (0.3, 4.3)		65	0.735 ± 0.085	1.24 (0.5, 2.9)	
A/A	18	0.881 ± 0.079	5.14 (1.1, 23.2)		12	-	-	
A/A ^b	18	0.881 ± 0.079	4.96 (1.3, 18.9)	0.009	12	-	_	0.113

Stage II only

Probability \pm s.e. 5-year survival

Ν

 Table 4 (continued)

 Overall survival

Polymorphism

			Stag	ge III only		
of	Hazard ratio (95% CI)	P-value	N	Probability \pm s.e. of 5-year survival	Hazard ratio (95% CI)	P-value

VEGFA rst	699947							
C/C	60	0.983 ± 0.017	1 (reference)	0.106	37	0.707 ± 0.142	1 (reference)	1.000
C/A	96	0.906 ± 0.048	3.94 (0.7, 20.4)		68	0.796 ± 0.080	1.00 (0.3, 3.3)	
A/A	48	0.899 ± 0.048	1.29 (0.2, 7.0)		36	0.773 ± 0.089	0.99 (0.3, 2.9)	
A/A ^b	48	0.899 ± 0.048	3.35 (1.0, 11.1)	0.035	36	0.773 ± 0.089	1.00 (0.4, 2.6)	0.991
VEGFR1 rs	\$9513070							
A/A	61	0.907 ± 0.040	1 (reference)	0.025	51	0.669 ± 0.119	1 (reference)	0.362
A/G ^a	100	0.929 ± 0.037	0.27 (0.08, 0.9)		65	0.829 ± 0.053	0.67 (0.3, 1.6)	
G/G ^a	43				24			

P-value was based on log-rank test in codominant

s.e. Greedwood standard error

^a Dominant model

^b Recessive model

The bold values indicate the *P*-values statistically significant (P < 0.05)

In the multivariate analysis, two SNPs retained their significance: rs1137282 in the *KRAS* gene and rs9513070 in the *VEGFR1* gene. Stage II patients harboring a homo-zygous GG genotype in the *KRAS* SNP were significantly associated with decreased OS (HR = 10.82; 95% CI: 2.1–56.0; adjusted p = 0.005). In the same cohort of stage II CC patients, patients carrying at least one G allele of the SNP in the *VEGFR1* gene were significantly associated with an increased OS (HR = 0.268; 95% CI: 0.07–0.95; adjusted p = 0.043).

Considering the clinical parameter survival after relapse, only the rs11656130 genetic variant in the *MAP2K6* gene showed a significant association (p = 0.027). However, in the multivariate analysis this association did not remain statistically significant.

Genetic determinants and survival by localization of the tumor

In the univariate analysis, three genetic variants showed an association with RFS in patients with left colon cancer tumors: rs35251833 (*ITGAV*) (p = 0.032), rs833061 (*VEGFA*) (p = 0.036) and rs9513070 (*VEGFR1*) (p = 0.033) (Table 5). In the multivariate analysis, only two genetic variants retained their significance: rs9513070 of *VEGFR1* gene and rs35251833 of *ITGAV* gene. Left colon cancer patients carrying at least one G allele in the *VEGFR1* SNP showed a longer time to recurrence (HR = 0.345; 95% CI: 0.2–0.7; adjusted p = 0.005). The same cohort of left colon cancer patients harboring at least one G allele in the

ITGAV variant showed an increased RFS (HR = 0.242; 95% CI: 0.1–0.6; adjusted p = 0.005).

Considering OS and tumor location, evaluation of the genetic variants included in the study showed a significant association with the rs9513070 variant of *VEGFR1* gene (p = 0.031) in left-side tumors, and with two variants in the *MAP2K6* gene: rs11656130 in right-sided tumors (p = 0.026) and rs2716191 in left-sided tumors (p = 0.029). Table 5 shows these results and the mode of inheritance. In the multivariate analysis, only the *VEGFR1* variant retained its significance. Left colon cancer patients carrying atleast one G allele in the *VEGFR1* SNP showed a longer overall survival (HR = 0.061; 95% CI: 0.01–0.5); adjusted p = 0.011).

Discussion

We investigated the role of germline polymorphisms as prognostic factors in stages II and III colon cancer patients in several genes involved in the angiogenesis pathway. We found that several genetic variants in the VEGFA and its main receptors, VEGFR1 and VEGFR2, were associated with RFS and/or OS and that these associations were influenced by tumor stage and location. Several polymorphisms in additional genes of the VEGF pathway such as MAP2K6, KRAS, PRKCE and ITGAV, as well as in HIF α , a protein that stimulates the synthesis of VEGFA, and in the metastasis suppressor KISS1, were also associated with survival. However, only rs9513070 in the Table 5 Germline polymorphisms in the VEGF pathway associated with RFS/OS by localization of the tumor

Recurrence free survival

		Left colon			Rig	ght colon		
Polymorphism	Ν	Probability \pm s.e. of 3-year free recurrence	Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> -value	N	Probability \pm s.e. of 3-year free recurrence	Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> -value
ITGAV rs3525	1833							
G/G	100	0.858 ± 0.035	1 (reference)	0.099	56	0.721 ± 0.061	1 (reference)	0.081
G/A	86	0.820 ± 0.042	1.05 (0.5, 2.0)		74	0.875 ± 0.039	0.43 (0.2, 0.9)	
A/A	17	0.637 ± 0.119	2.58 (1.0, 6.5)		12	0.917 ± 0.080	0.50 (0.1, 2.2)	
A/A ^b	17	0.637 ± 0.119	2.52 (1.1, 6.0)	0.032	12	0.917 ± 0.080	0.75 (0.2, 3.2)	0.696
VEGFA rs8330)61							
T/T	52	0.848 ± 0.050	1 (reference)	0.111	45	0.883 ± 0.049	1 (reference)	0.199
T/C	97	0.852 ± 0.036	0.99 (0.4, 2.2)		64	0.778 ± 0.053	2.26 (0.9, 5.7)	
C/C	54	0.747 ± 0.061	1.92 (0.8, 4.3)		33	0.809 ± 0.071	1.54 (0.5, 4.8)	
C/C ^b	54	0.747 ± 0.061	1.92 (1.0, 3.6)	0.036	33	0.809 ± 0.071	0.90 (0.4, 2.2)	0.824
VEGFR1 rs951	3070							
A/A	59	0.723 ± 0.059	1 (reference)	0.033	53	0.807 ± 0.055	1 (reference)	0.733
A/G ^a	96	0.864 ± 0.029	0.52 (0.3, 0.9)		69	0.824 ± 0.041	1.07 (0.5, 2.3)	
G/G ^a	47				29			

Overall survival

		Left colon			Rig	t colon		
Polymorphism	Ν	Probability \pm s.e. of 5-year survival	Hazard ratio	<i>P</i> -value (95% CI)	N	Probability \pm s.e. of 5-year survival	Hazard ratio	<i>P</i> -value (95% CI)
MAP2K6 rs11	65613	0						
T/T	62	0.934 ± 0.038	1 (reference)	0.604	37	0.847 ± 0.080	1 (reference)	0.026
T/G	98	0.891 ± 0.051	1.61 (0.7, 3.5)		73	0.901 ± 0.004	0.88 (0.3, 2.2)	
G/G	43	0.769 ± 0.145	1.61 (0.6, 3.9)		32	0.621 ± 0.154	1.94 (0.7, 5.1)	
MAP2K6 rs27.	16191							
T/T	53	0.778 ± 0.104	1 (reference)	0.029	26	0.761 ± 0.099	1 (reference)	0.458
T/C	107	0.942 ± 0.035	0.76 (0.4, 1.5)		77	0.899 ± 0.036	0.83 (0.3, 2.1)	
C/C	43	0.869 ± 0.083	0.60 (0.2, 1.5)		39	0.708 ± 0.135	0.73 (0.2, 2.2)	
VEGFR1 rs95.	13070							
A/A	59	0.799 ± 0.075	1 (reference)	0.031	53	0.828 ± 0.078	1 (reference)	0.525
A/G ^a	96	0.924 ± 0.040	0.061 (0.01, 0.5)		69	0.837 ± 0.049	1.34 (0.4, 4.4)	
G/G ^a	47				29			

P-value was based on log-rank test in codominant

s.e. Greedwood standard error

The bold values indicate the *P*-values statistically significant (P < 0.05)

VEGFR1 gene, rs1137282 in the *KRAS* gene and rs35251833 in the *ITGAV* gene retained their significance after multivariate adjustments.

In the present work, we discuss only those published studies that have identified polymorphisms in VEGF-related genes as predictive biomarkers for tumor recurrence in stages II or III colon cancer patients. We do not discuss data from case-control studies. In 2008, Lurje et al. studied 10 polymorphisms in eight genes involved in the angiogenesis pathway in a cohort of 125 stage III CC patients [5]. They demonstrated that patients with the T allele in rs3025039 (+936 C/T), located in the VEGFA gene, showed a significantly longer time to recurrence (TTR) (p = 0.003). However, they found no correlation between rs2010963 (-634 G/C), also located in the *VEGFA* gene, and TTR. Some time later, these same

^a Dominant model

^b Recessive model

authors also analyzed both polymorphisms in a cohort of 109 stage II colon cancer patients [23]. Surprisingly, they found a contradictory result: rs3025039 was not associated with TTR, whereas rs2010963 was significantly associated with this outcome parameter (p = 0.028). They also analyzed rs1870377 of VEGFR2, finding no association between this polymorphism and TTR. More recently, Kjaer-Frifeldt et al. studied 3 polymorphisms in the VEGFA gene in a cohort of 698 stage II colon cancer patients. They found that rs699947 and rs833061 were significantly associated with TTR (p = 0.02 for both SNPs), whereas rs2010963 was not [24]. It should be emphasized that these studies evaluated a reduced number of SNPs in VEGF-related genes in a cohort of stages II and III colon cancer patients and that their results are contradictory. For this reason we designed a study that included functional SNPs of several VEGF-related genes, focusing especially on the ligands (VEGFA), receptors (VEGFR1 and VEGFR2), and other relevant genes in the VEGF signal cascade.

One of the results of the present study concerns rs9513070, a SNP located in the VEGFR1 gene. To the best of our knowledge, this is the first study that shows that the variant rs9513070 is associated with survival in both stage II CC and in left-sided primary tumor location. Tumor sidedness has a great impact on prognosis, as right and left colon cancer tumors harbor different biological features. Whereas right-sided tumors are more likely to present microsatellite instability, mutations in KRAS or BRAF or MLH1 methylation, left-sided tumors are associated with CIN, p53 or miRNAs [25-29]. Additionally, right colon cancers present a higher expression of pro-angiogenic factors, which justifies the better response to bevacizumab of these tumors [30]. Interestingly, rs9513070 variant had been associated with survival in a previous study conducted in advanced CC patients [21]. In that study, the median PFS and OS were superior in patients with the VEGFR1 rs9513070 A/A genotype (8.7 vs. 6.6 months; p = 0.001and 26.4 vs. 16.1 months; p = 0.038, respectively). Expression studies conducted by Ning et al. showed that VEGF and VEGFR1 gene expression levels were significantly associated with TTR. One of their studies included 140 stage II-III CC patients treated with adjuvant chemotherapy [31]. They observed that patients with lower VEGF or VEGFR1 gene expression levels had longer time to recurrence than those with higher expression levels of these genes (p < 0.05, log-rank test). All these data, along with the results of the in silico analysis of this intron variant (http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP), strengthen the hypothesis that VEGFR1 could play a role in CC outcomes. However, until the mechanisms underlying all these findings are not fully elucidated an independent validation study that confirms our results is needed to highlight the clinical relevance of VEGFR1 polymorphisms.

Regarding the association between rs1137282 in the *KRAS* gene and OS, we observed that stage II patients harboring a homozygous GG genotype were significantly associated with a decreased OS. Our group recently conducted a study in 131 patients who underwent surgery for stage I-III non-small cell lung cancer. We found that the GG genotype was also associated with a poor prognosis [17]. In vitro experiments have demonstrated that the minor allele (G) increase luciferase activity significantly and in silico analyses predict that this SNP introduces an exon splicing enhancer motif and disrupts an exon splicing silencer motif [12]. These findings reinforce the role of this SNP as a prognostic biomarker in cancer.

Finally, the present study shows that rs35251833 SNP in the *ITGAV* gene correlated with RFS in left CC patients: G/G and G/A genotypes were significantly associated with an increased RFS. This variant is in high linkage-disequilibrium with rs1839123 that showed similar results in a previous study conducted by our group in metastatic colorectal cancer patients [14]. Bohanes et al. studied the role of genetic variants in several integrin genes and although they reported some associations in stages II–III CC, the rs35251833 was not included in their study [32]. In silico analysis of this intronic SNP suggests a potential role in transcriptional regulation (http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP).

In conclusion, this study provides evidence that germline polymorphisms in *VEGFR1*, *KRAS* and *ITGAV* genes are associated with prognosis in stages II–III CC patients. As stage and tumor location have also been correlated with prognosis, future genetic studies should stratify CC patients according to these parameters.

Acknowledgements This work was supported by the Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (2016FI_B 00368 to Pau Riera).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2014;64:104–17.
- Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2011;29:1261–70.
- Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. J Clin Oncol. 2015;33:1787–96.
- Dalerba P, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, et al. CDX2 as a prognostic biomarker in stage II and stage III colon cancer. N Engl J Med. 2016;374:211–22.

- Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, et al. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. Ann Oncol. 2008;19: 1734–41.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. 2000;407:249–57.
- 7. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 2003;9:653-60.
- Páez D, Labonte MJ, Bohanes P, Zhang W, Benhanim L, Ning Y, et al. Cancer dormancy: a model of early dissemination and late cancer recurrence. Clin Cancer Res. 2012;18:645–53.
- Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling—in control of vascular function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7:359–71.
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol. 2005;23:1011–27.
- Maitland ML, Lou XJ, Ramirez J, Desai AA, Berlin DS, McLeod HL, et al. Vascular endothelial growth factor pathway. Pharm Genom. 2010;20:346–9.
- Paré-Brunet L, Glubb D, Evans P, Berenguer-Llergo A, Etheridge AS, Skol AD, et al. Discovery and functional assessment of gene variants in the vascular endothelial growth factor pathway. Hum Mutat. 2014;35:227–35.
- Gerger A, El-Khoueiry A, Zhang W, Yang D, Singh H, Bohanes P, 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.
- Paré-Brunet L, Sebio A, Salazar J, Berenguer-Llergo A, Río E, Barnadas A, et al. Genetic variations in the VEGF pathway as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy. Pharm J. 2015;15:397–404.
- 15. Sebio A, Paré L, Páez D, Salazar J, González A, Sala N, et al. The LCS6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA to the KRAS 3'-untranslated region: its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients. Pharm Genom. 2013;23:142–7.
- Glubb DM, Paré-Brunet L, Jantus-Lewintre E, Jiang C, Crona D, Etheridge AS, et al. Functional FLT1 genetic variation is a prognostic factor for recurrence in stage I–III non-small-cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2015;10:1067–75.
- Sullivan I, Salazar J, Arqueros C, Andrés M, Sebio A, Majem M, et al. KRAS genetic variant as a prognostic factor for recurrence in resectable non-small cell lung cancer. Clin Transl Oncol. 2017;19:884–90.
- Rollin J, Payancé A, Gouilleux-Gruart V, Boisdron-Celle M, Azzopardi N, Morel A, et al. Significant effect of VEGFA polymorphisms on the clinical outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with FOLFIRI-cetuximab. Pharmacogenomics. 2015;16:2035–43.
- Dassoulas K, Gazouli M, Rizos S, Theodoropoulos G, Christoni Z, Nikiteas N, et al. Common polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and colorectal cancer development, prognosis, and survival. Mol Carcinog. 2009;48:563–9.

- Pallaud C, Reck M, Juhasz E, Szima B, Yu C-J, Burdaeva O, et al. Clinical genotyping and efficacy outcomes: exploratory biomarker data from the phase II ABIGAIL study of first-line bevacizumab plus chemotherapy in non-squamous non-small-cell lung cancer. Lung Cancer. 2014;86:67–72.
- 21. Sohn BS, Park SJ, Kim JE, Kim K-P, Hong YS, Suh C, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor pathway and outcomes of patients treated with firstline cytotoxic chemotherapy combined with bevacizumab for advanced colorectal cancer. Oncology. 2014;87:280–92.
- 22. Dong G, Guo X, Fu X, Wan S, Zhou F, Myers RE, et al. Potentially functional genetic variants in KDR gene as prognostic markers in patients with resected colorectal cancer. Cancer Sci. 2012;103:561–8.
- Lurje G, Hendifar AE, Schultheis AM, Pohl A, Husain H, Yang D, et al. Polymorphisms in interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist associated with tumor recurrence in stage II colon cancer. Pharm Genom. 2009;19:95–102.
- 24. Kjaer-Frifeldt S, Fredslund R, Lindebjerg J, Hansen TF, Spindler K-LG, Jakobsen A, et al. Prognostic importance of VEGF-A haplotype combinations in a stage II colon cancer population. Pharmacogenomics. 2012;13:763–70.
- Shen H, Yang J, Huang Q, Jiang M-J, Tan Y-N, Fu J-F, et al. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. World J Gastroenterol. 2015;21:6470.
- Lee MS, Menter DG, Kopetz S. Right versus left colon cancer biology: integrating the consensus molecular subtypes. J Natl Compr Canc Netw. 2017;15:411–9.
- Sinicrope FA, Mahoney MR, Yoon HH, Smyrk TC, Thibodeau SN, Goldberg RM, et al. Analysis of molecular markers by anatomic tumor site in stage III colon carcinomas from adjuvant chemotherapy trial NCCTG N0147 (Alliance). Clin Cancer Res. 2015;21:5294–304.
- Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC, Thibodeau SN, Warren RS, Bertagnolli MM, et al. Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. J Clin Oncol. 2013;31:3664–72.
- 29. Sinicrope FA, Shi Q, Allegra CJ, Smyrk TC, Thibodeau SN, Goldberg RM, et al. Association of DNA mismatch repair and mutations in *BRAF* and *KRAS* with survival after recurrence in stage III colon cancers. JAMA Oncol. 2017;3:472.
- Ulivi P, Scarpi E, Chiadini E, Marisi G, Valgiusti M, Capelli L, et al. Right- vs. left-sided metastatic colorectal cancer: differences in tumor biology and Bevacizumab efficacy.Int J Mol Sci. 2017;18:1240
- Ning Y, Lurje G, Danenberg K, Cooc J, Yang D, Pohl A, et al. VEGF and VEGFR1 gene expression levels and tumor recurrence in adjuvant colon cancer. J Clin Oncol. 2009;27 Suppl 15:4040.
- 32. Bohanes P, Yang D, Loupakis F, LaBonte MJ, Gerger A, Ning Y, et al. Integrin genetic variants and stage-specific tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer. Pharm J. 2015;15: 226–34.

ARTICLE 1

		Time	to recurrence		Overall survival			
Polymorphism	N	Probability ± s.e. of 3- year free recurrence	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Probability ± s.e. of 5-year survival	Hazard ratio (95% CI)	P-value	
GRB2 rs7219								
T/T	171	0.791 ± 0.032	1 (reference)	0.124	0.862 ± 0.034	1 (reference)	0.779	
T/C	146	0.865 ± 0.029	0.61 (0.4, 1.0)		0.840 ± 0.055	0.83 (0.4, 1.7)		
C/C	28	0.781 ± 0.079	1.07 (0.5, 1.1)		0.958 ± 0.041	0.64 (0.1, 2.8)		
HIF1α rs11549465								
C/C	276	0.809 ± 0.024	1 (reference)	0.507	0.854 ± 0.032	1 (reference)	0.198	
C/T	64	0.875 ± 0.041	0.67 (0.3, 1.3)		0.911 ± 0.059	0.40 (0.1, 1.3)		
т/т	5	0.800 ± 0.179	0.98 (0.1, 7.1)		0.800 ± 0.179	2.10 (0.3, 15.5)		
TGAV rs35251833								
G/G	156	0.810 ± 0.032	1 (reference)	0.212	0.862 ± 0.037	1 (reference)	0.864	
G/A	160	0.845 ± 0.029	0.72 (0.4, 1.2)		0.873 ± 0.039	0.86 (0.4, 1.7)		
A/A	29	0.756 ± 0.080	1.35 (0.6, 2.9)		0.800 ± 0.179	0.73 (0.2, 3.2)		
KISS1 rs71745629								
т/т	197	0.806 ± 0.029	1 (reference)	0.242	0.867 ± 0.035	1 (reference)	0.735	
T/* ^a	138	0.842 ± 0.030	0.74 (0.5. 1.2)	0.2.12	0.903 ± 0.028	0.89 (0.4. 1.8)	0	
*/*a	10							
KRAS rs10842513								
C/C	307	0.823 + 0.022	1 (reference)	0.709	0.882 + 0.026	1 (reference)	0.447	
C/T	38	0.805 ± 0.067	1.20 (0.5. 2.5)	0.705	0.746 ± 0.114	1.44 (0.5. 3.7)	0	
с, ч	0	0.000 ± 0.007	1.20 (0.0, 2.0)		0.7 10 2 0.11 1	1.1.1 (0.0, 0.7)		

KRAS rs12813551							
T/T	142	0.802 ± 0.034	1 (reference)	0.451	0.859 ± 0.044	1 (reference)	0.937
T/C	154	0.844 ± 0.030	0.72 (0.4, 1.2)		0.848 ± 0.045	0.89 (0.4, 1.8)	
C/C	49	0.809 ± 0.058	0.87 (0.4, 1.8)		0.935 ± 0.037	0.86 (0.3, 2.6)	
KRAS rs1137282							
A/A	210	0.815 ± 0.027	1 (reference)	0.620	0.871 ± 0.033	1 (reference)	0.400
A/G ^a	125	0.832 ± 0.033	0.88 (0.5, 1.4)		0.853 ± 0.055	0.86 (0.4, 1.8)	
G/G ^a	10				0.800 ± 0.126	2.38 (0.5, 10.2)	
MAP2K4 rs3826392							
Т/Т	191	0.807 ± 0.029	1 (reference)	0.247	0.841 ± 0.042	1 (reference)	0.874
T/G ^a	139	0.839 ± 0.030	0.75 (0.5, 1.2)		0.894 ± 0.033	0.95 (0.5, 1.9)	
G/G ^a	15						
MAP2K6 rs2716191							
T/T	79	0.779 ± 0.047	1(reference)	0.487	0.775 ± 0.077	1 (reference)	0.050
T/C	184	0.822 ± 0.029	0.78 (0.4, 1.4)		0.926 ± 0.025	0.38 (0.2, 0.8)	
C/C	82	0.861 ± 0.039	0.66 (0.3, 1.3)		0.796 ± 0.076	0.62 (0.2, 1.5)	
MAPK11 rs2076139							
C/C	228	0.819 ± 0.026	1 (reference)	0.598	0.846 ± 0.038	1 (reference)	0.451
C/T ^a	101	0.827 ± 0.03	0.87 (0., 1.4)		0.903 ± 0.032	0.74 (0.3, 1.6)	
T/T ^a	16						
PRKCE rs4953299							
T/T	208	0.827 ± 0.027	1(reference)	0.405	0.830 ± 0.040	1 (reference)	0.375
T/C	117	0.824 ± 0.036	1.02 (0.6, 1.7)		0.913 ± 0.031	0.59 (0.3, 1.3)	
C/C	20	0.743 ± 0.100	1.78 (0.7,4.2)		0.500 ± 0.354	0.54 (0.1, 4.0)	
			,				
VEGFA rs833061							
T/T	99	0.864 ± 0.035	1 (reference)	0.180	0.890 ± 0.044	1 (reference)	0.225
T/C	161	0.823 ± 0.030	1.44 (0.8 <i>,</i> 2.6)		0.868 ± 0.043	1.22 (0.5, 3.0)	

ARTICLE 1

	1			1			
C/C	85	0.770 ± 0.047	1.85 (0.9, 3.5)		0.825 ± 0.059	2.07 (0.8 <i>,</i> 5.3)	
C/C ^b	85	0.770 ± 0.047	1.46 (0.9, 2.4)	0.140	0.825 ± 0.059	1.82 (0.9, 3.7)	0.093
VEGEA rs1570360							
G/G	157	0 849 + 0 029	1 (reference)	0 295	0 887 + 0 034	1 (reference)	0.867
G/G	150	0.049 ± 0.029	1 49 (0 0 2 4)	0.235	0.007 ± 0.004		0.007
G/A	100	0.793 ± 0.032	1.46 (0.9, 2.4)		0.820 ± 0.050	1.21 (0.0, 2.5)	
A/A	30	0.807 ± 0.079	1.21 (0.5, 2.9)		0.926 ± 0.050	1.20 (0.3, 4.2)	
VEGFA rs2010963							
G/G	157	0.799 ± 0.032	1 (reference)	0.505	0.817 ± 0.046	1 (reference)	0.210
G/C	143	0.834 ± 0.032	0.86 (0.5, 1.4)		0.906 ± 0.042	0.51 (0.2, 1.1)	
C/C	45	0.861 ± 0.053	0.63 (0.3, 1.4)		0.899 ± 0.048	0.64 (0.2, 1.9)	
VEGEA rs3025039							
c/c	251	0.810 ± 0.025	1 (reference)	0.602	0 857 + 0 022	1 (reference)	0.007
	201	0.819 ± 0.025	1 (12) (0.7, 1.0)	0.092	0.037 ± 0.033		0.907
C/T	80	0.822 ± 0.040	1.11 (0.7, 1.9)		0.877 ± 0.057	0.95 (0.4, 2.1)	
1/1-	11						
VEGFA rs3024997							
G/G	160	0.802 ± 0.032	1 (reference)	0.562	0.820 ± 0.045	1 (reference)	0.243
G/A	140	0.830 ± 0.032	0.89 (0.5, 1.5)		0.906 ± 0.041	0.52 (0.2, 1.1)	
A/A	45	0.861 ± 0.053	0.65 (0.3, 1.4)		0.899 ± 0.048	0.66 (0.2, 1.9)	
,							
VEGER1 rs9582036							
A/A	156	0 820 + 0 031	1 (reference)	0.820	0 818 + 0 0/15	1 (reference)	0 1 1 9
	165	0.820 ± 0.031		0.820	0.010 ± 0.043	0.72(0.2, 1.4)	0.445
A/C	24	0.820 ± 0.030			0.908 ± 0.051	0.72(0.5, 1.4)	
C/C	24	0.792 ± 0.083	1.29 (0.5, 3.1)		0.958 ± 0.041	0.37 (0.05, 2.8)	
VEGFR1 rs7993418							
A/A	199	0.812 ± 0.028	1 (reference)	0.879	0.825 ± 0.041	1 (reference)	0.078
A/G ^a	135	0.833 ± 0.031	0.96 (0.6, 1.5)		0.922 ± 0.030	0.51 (0.2, 1.1)	
G/G ^ª	11						
	1			I			

VEGFR1 rs7996030							
G/G	202	0.815 ± 0.028	1 (reference)	0.995	0.827 ± 0.041	1 (reference)	0.092
G/A ^a	133	0.830 ± 0.032	1.02 (0.6,1.6)		0.921 ± 0.030	0.52 (0.2, 1.1)	
A/A ^a	10						
VEGFR2 rs2305948							
C/C	285	0.826 ± 0.023	1 (reference)	0.805	0.856 ± 0.032	1 (reference)	0.887
C/T ^a	56	0.799 ± 0.05	1.08 (0.6, 1.9)		0.907 ± 0.040	0.93 (0.3, 2.4)	
T/T ^a	4						
VEGFR2 rs7667298							
C/C	112	0.818 ± 0.037	1 (reference)	0.567	0.901 ± 0.041	1.68 (0.7, 3.8)	0.450
C/T	177	0.814 ± 0.030	0.90 (0.5, 1.5)		0.832 ± 0.044	1.59 (0.5, 4.9)	
T/T	56	0.854 ± 0.048	0.65 (0.3, 1.4)		0.899 ± 0.043		
VEGFR2 rs2071559							
A/A	95	0.850 ± 0.037	1 (reference)	0.994	0.918 ± 0.041	1 (reference)	0.278
A/G	185	0.810 ± 0.029	1.01 (0.6, 1.7)		0.861 ± 0.037	1.73 (0.7, 4.3)	
G/G	65	0.812 ± 0.049	1.04 (0.5, 2.1)		0.789 ± 0.084	2.32 (0.8, 6.7)	
VEGFR2 rs1870377							
T/T	225	0.803 ± 0.027	1(reference)	0.371	0.867 ± 0.032		0.893
T/A	102	0.861 ± 0.035	0.67 (0.4, 1.2)		0.851 ± 0.062	0.98 (0.4, 2.1)	
A/A	18	0.824 ± 0.992	0.78 (0.2, 2.5)		0.872 ± 0.086	1.40 (0.3, 5.9)	
	-						

P-value was based on log-rank test in codominant. s.e.: Greedwood standard error. ^aDominant model. ^bRecessive model.

2. Estudis sobre la identificació de biomarcadors predictius de resposta i toxicitat en càncer colorectal metastàtic

2.1. Estudis sobre la identificació de marcadors de toxicitat a l'irinotecan i avaluació de la seva aplicabilitat clínica

En aquest apartat s'hi inclouen les publicacions que es mostren a continuació (articles 2-5 de la tesi):

ARTICLE 2

Relevance of CYP3A4*20, UGT1A1*37 and UGT1A1*28 variants in irinotecan-induced severe toxicity

British Journal of Clinical Pharmacology 2018; 84: 1389–1392 doi: 10.1111/bcp.13574 PMID: 29504153

Pau Riera^{1,2}, Juliana Salazar^{1,3}, Anna C. Virgili⁴, María Tobeña⁴, Ana Sebio⁴, Pía Gallano^{1,3}, Agustí Barnadas⁴, David Páez⁴

¹Servei de Genètica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

²Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Espanya

³U-705, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Espanya

⁴Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya



SHORT REPORT

Relevance of CYP3A4*20, UGT1A1*37 and UGT1A1*28 variants in irinotecan-induced severe toxicity

Correspondence Dr Juliana Salazar PhD, Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Carrer de Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 553 75 83; Fax: +34 93 553 72 87; E-mail: jsalazar@santpau.cat

Received 3 November 2017; Revised 16 February 2018; Accepted 27 February 2018

Pau Riera^{1,2} , Juliana Salazar^{1,3}, Anna C. Virgili⁴, María Tobeña⁴, Ana Sebio⁴, Pía Gallano^{1,3}, Agustí Barnadas⁴ and David Páez⁴

¹Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ²Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain, ³U705, ISCIII Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain, and ⁴Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Keywords colorectal cancer, CYP3A4*20, irinotecan, toxicity, UGT1A1*28, UGT1A1*37

Severe irinotecan-induced toxicity is associated with *UGT1A1* polymorphisms. However, some patients develop side-effects despite harbouring a normal *UGT1A1* genotype. As CYP3A4 is also an irinotecan-metabolizing enzyme, our study aimed to elucidate the influence of the *CYP3A4*20* loss-of-function allele in the toxicity profile of these patients. Three-hundred and eight metastatic colorectal cancer patients treated with an irinotecan-containing chemotherapy were studied. The presence of *CYP3A4*20*, *UGT1A1*37* and *UGT1A1*28* alleles was tested. Associations between these genetic variants and toxicity were evaluated. *UGT1A1*28* was significantly associated with severe diarrhoea, neutropenia and asthenia (P = 0.002, P = 0.037 and P = 0.041, respectively). One patient with the *UGT1A1*28/*37* genotype presented with grade IV neutropenia and lethal septic shock. One heterozygous *UGT1A1 (*1/*28)* patient also carried the *CYP3A4*20* allele but did not develop toxicity. We confirm that *UGT1A1*37* and *UGT1A1*28* are associated with severe toxicity and suggest that the *CYP3A4*20* allele does not play a role in irinotecan-induced toxicity.

Introduction

Irinotecan [also known as camptothecin-11 (CPT-11)] is an active drug that is widely used for the treatment of several types of cancer, including colorectal, gastric and pancreatic cancer. Its dose-limiting and potentially life-threatening toxicities are delayed diarrhoea and severe neutropenia, which can occur in up to 36% of patients [1].

Several enzymes are involved in the metabolism of irinotecan, highlighting the **UDP-glucuronosyltransfer**ase (UGT) isoform 1A1, encoded by the *UGT1A1* gene. The number of TA repeats in its TATA box is associated with the enzyme activity. Whereas six TA repeats imply normal activity (*UGT1A1*1*), seven TA repeats (*UGT1A1*28*) or eight

TA repeats (UGT1A1*37) reduce activity markedly. The UGT1A1*28 allele is strongly associated with irinotecaninduced toxicity [2–4]. The UGT1A1*37 allele is rare in the Caucasian population [5], and its influence on irinotecan toxicity has not yet been reported. However, some patients carrying a normal UGT1A1 genotype (*1/*1) develop severe diarrhoea and/or neutropenia. Identification of additional toxicity biomarkers that could help to individualize irinotecan treatment is therefore of major clinical interest in the management of cancer patients.

The enzyme cytochrome P450 3A4 (**CYP3A4**) converts irinotecan into several inactive oxidation products, such as 7-ethyl-10-[4-*N*-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (APC) and 7-ethyl-10-[4-amino-



1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (NPC). Although the CYP3A4 phenotype is associated with irinotecan pharmacokinetics [6, 7], no significant associations between *CYP3A4* genotype and irinotecan toxicity have been found [8]. Three *CYP3A4* nonfunctional alleles result from premature stop codons in the coding gene *6, *20 and *26 *CYP3A4* alleles. In Caucasians, these variants are extremely rare, but a frequency of 1.2% of carriers of *CYP3A4*20* has recently been reported in the Spanish population as the result of a founder effect [9].

This state of knowledge prompted us to evaluate whether the presence of the *CYP3A4*20* allele could help to identify patients who develop severe irinotecan-induced toxicity despite having a normal *UGT1A1* genotype. We genotyped the *UGT1A1* (TA repeats) and the *CYP3A4*20* variant in a cohort of 308 metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with an irinotecan-containing therapy.

Methods

Patient population

The study included 308 mCRC patients treated with an irinotecan-containing therapy at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP, Barcelona, Spain). Genomic DNA was available in all cases. Left colon cancer was diagnosed in 144 patients, right colon cancer in 76 and rectum cancer in 88. A total of 283 patients received irinotecan combined with fluorouracil and leucovorin (FOLFIRI), 176 of whom were enrolled in clinical trials [10, 11]. The remaining patients received either irinotecan monotherapy or another chemotherapeutic regimen containing irinotecan. Patients were administered chemotherapy until unacceptable toxicity or disease progression. Table 1 shows patients' baseline clinical characteristics.

Relevant clinical data (gender, age and line of chemotherapy) were collected retrospectively through chart review. Toxicity was graded according to the common toxicity criteria (CTC) v4.0: presence and grade of diarrhoea, neutropenia, febrile neutropenia, asthenia, nausea and mucositis. The most severe grade of toxicity was recorded in all cases. The study was approved by the Institutional Ethics Committee at HSCSP, and all study participants gave informed consent to participate.

Genotyping of UGT1A1 and CYP3A4

UGT1A1 genotyping was performed as previously described [10]. *CYP3A4*20* (rs67666821) genotyping was carried out by automatic sequencing of a fragment of 244 base pairs in exon 13, which was specifically amplified using the primers FW (5'-TGAAGGAGTGTCTCACTC-3') and RV (5'-AGGTCT CTGGTGTTCTCAG-3').

Statistical analyses

Allele frequencies were calculated by direct counting. The associations between the toxicities assessed and the aforementioned genetic variants were analysed using chi-square tests. The results were considered statistically significant if P < 0.05.

Table 1

Baseline patient characteristics (n = 308)

Characteristic	n	%	
Gender			
Male	191	62	
Female	117	38	
Age (years)	ge (years)		
<75	265	86	
≥75	43	14	
Primary tumour site			
Right colon	76	25	
Left colon	144	47	
Rectum	88	29	
Chemotherapy treatment			
FOLFIRI	283	92	
Irinotecan monotherapy	13	4	
Other irinotecan combinations	12	4	
Line of chemotherapy			
First line	244	79	
≥Second line	64	21	

FOLFIRI, combination of irinotecan, fluorouracil and leucovorin

Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in http://www.guidetopharmacology. org, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [12], and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18 [13].

Results

A total of 137 of the 308 patients developed some type of grade III/IV toxicity. The most common severe adverse effects observed were neutropenia (68 patients, 22%), asthenia (65 patients, 21%) and diarrhoea (55 patients, 18%). Twenty-seven patients experienced severe nausea, nine patients presented with severe mucositis, eight patients experienced febrile neutropenia and two developed septic shock.

The frequencies of the genetic variants studied were consistent with Hardy–Weinberg equilibrium. For the *UGT1A1* variants, we found 44.2% (*1/*1), 46.4% (*1/*28), 9.1% (*28/*28) and 0.3% (*28/*37). The allelic frequency of *UGT1A1*28* was 32%, within the range reported in Spanish populations [14]. The genotype frequencies for the *CYP3A4*20* variant were 99.7% (*1/*1) and 0.3% (*1/*20).

There was a clear association between the UGT1A1*28/*28 genotype and the occurrence of severe diarrhoea (*P* = 0.002), neutropenia (*P* = 0.037) and asthenia (*P* = 0.041) (Table 2). The presence of nausea or mucositis was not



Table 2

Associations between UGT1A1 genotypes and grade III-IV diarrhoea, neutropenia and asthenia

Genotype	n (%)	Diarrhoea (%)	Neutropenia (%)	Asthenia (%)
*1/*1	136 (44.2%)	18 (13.2%)	23 (16.9%)	23 (16.9%)
*1/*28	143 (46.4%)	25 (17.5%)	34 (23.8%)	31 (21.7%)
*28/*28	28 (9.1%)	12 (42.9%)	10 (35.7%)	10 (35.7%)
*28/*37	1 (0.32%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Р		0.002 ^a	0.037 ^a	0.041 ^a

UGT1A1, UDP-glucuronosyltransferase isoform 1A1

^aTo perform the chi-square test, patients *28/*28 and *28/*37 were considered together

significantly associated with the UGT1A1*28/*28 genotype (P = 0.495 and P = 0.595, respectively).

The extremely rare UGT1A1 genotype *28/*37 was identified in one mCRC patient who received a reduced dose of irinotecan monotherapy (150 mg m⁻²) as a second-line treatment. The patient developed grade IV neutropenia and febrile neutropenia; neutropenic colitis was diagnosed and led to lethal septic shock.

Thirty-eight out of 136 patients (28%) with a UGT1A1*1/*1 genotype presented with severe diarrhoea and/or neutropenia, despite the normal enzymatic activity associated with this genotype. None of these patients harboured the nonfunctional *CYP3A4*20* allele. One patient out of 308 carried the *CYP3A4*20* allele. One patient, with the *UGT1A1*1/*28* genotype, received the FOLFIRI regimen as first-line treatment and cetuximab-irinotecan as second-line treatment without any of the toxicities assessed.

Discussion

We investigated the role of the *CYP3A4*20* allele in mCRC patients with a normal *UGT1A1* genotype treated with an irinotecan-containing regimen. We found that *UGT1A1*37* and *UGT1A1*28* alleles were highly associated with severe toxicity to irinotecan treatment, whereas the presence of the *CYP3A4*20* allele was not associated with toxicity in our sample.

Patients harbouring the UGT1A1*28/*28 genotype (Gilbert's syndrome) are at risk of severe irinotecan-induced toxicity [2, 4]. Our findings confirmed this association, as the presence of this genotype was statistically significant for diarrhoea, neutropenia and asthenia (P = 0.002, P = 0.037 and P = 0.041, respectively). One patient who carried the infrequent UGT1A1*28/*37 genotype developed fatal toxicity, despite the reduced doses of irinotecan administered. One explanation for this could be that the additive effect of the UGT1A1*37 allele reduces enzyme activity even more than the UGT1A1*28 allele [15]. This case study reinforces the clinical relevance of identifying such a low-frequency nonfunctional variant before prescribing irinotecan. However, further studies are needed in order to confirm the role of this genetic variant in severe irinotecan-induced toxicity.

Several phenotypic studies have focused on the role of the enzymatic activity of CYP3A4 in irinotecan-induced toxicity. In 2008, Rouits et al. [16] estimated CYP3A4 activity from cortisol biotransformation into 6β-hydroxycortisol. They found that the level of cortisol 6β-hydroxylation predicted the occurrence of diarrhoea. Later, in 2010, van der Bol et al. [17] conducted a randomized trial in which an irinotecan dose of 350 mg m⁻² was administered in the control group, whereas the dose was calculated using an algorithm that considered midazolam clearance in the experimental group. They found a significant reduction in the incidence of grades III-IV neutropenia in the experimental group but no differences in grades III-IV diarrhoea [17]. Recently, Makihara et al. [18] conducted a study to evaluate the influence of concomitant use of clarithromycin, a potent CYP3A4 inhibitor, on irinotecan toxicity. The study did not identify an increase in irinotecan-induced toxicity by coadministration of clarithromycin [18]. To the best of our knowledge, to date, only one genotypic study, performed in 177 Japanese cancer patients, has evaluated the influence of variants in the CYP3A4 gene on irinotecan-induced toxicity; no significant association was found [8].

Recently, a frequency of 1.2% of the loss-of-function CYP3A4*20 allele was described in a Spanish population [9]. In the light of these data, and taking into account the role of CYP3A4 in the metabolism of irinotecan, we hypothesized that the presence of the CYP3A4*20 allele could help to identify patients who will develop severe irinotecan-induced toxicity despite having a normal UGT1A1 genotype. We found one patient carrying the CYP3A4*20 allele (0.3%), a frequency similar to that found in a previous study recently performed by our group [19] and lower than that reported previously by Apellániz-Ruiz et al. [9]. The only patient in our cohort who carried the CYP3A4*20 variant was also heterozygous (*1/*28) for UGT1A1. She did not experience any of the toxicities evaluated in our study. Our findings add uncertainty about the effect of a loss-of-function CYP3A4 allele on severe irinotecan-induced toxicity.

Competing Interests

There are no competing interests to declare.



This work was supported by a grant from the Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (2016FI B 00368 to Pau Riera).

References

- 1 Fuchs CS, Moore MR, Harker G, Villa L, Rinaldi D, Hecht JR. Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2003; 21: 807–14.
- **2** Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, *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.
- **3** Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, Guérin 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.
- **4** Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Del Rio E, Gómez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. Br J Cancer 2004; 91: 678–82.
- **5** Peña L, Pico M, Rosatelli C, Meloni A, del Río E, Tizzano EF, *et al.* UGT1A1 genotype in a white boy with Crigler-Najjar syndrome type 2. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2012; 55: e136–7.
- **6** Mathijssen RHJ, de Jong FA, van Schaik RHN, Lepper ER, Friberg LE, Rietveld T, *et al.* Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. J Natl Cancer Inst 2004; 96: 1585–92.
- 7 Kehrer DFS, Mathijssen RHJ, Verweij J, de Bruijn P, Sparreboom A. Modulation of irinotecan metabolism by ketoconazole. J Clin Oncol 2002; 20: 3122–9.
- 8 Sai K, Saito Y, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, Kaniwa N, Kamatani N, *et al*. Impact of CYP3A4 haplotypes on irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol 2008; 62: 529–37.
- **9** Apellániz-Ruiz M, Inglada-Pérez L, Naranjo MEG, Sánchez L, Mancikova V, Currás-Freixes M, *et al*. High frequency and founder effect of the CYP3A4*20 loss-of-function allele in the Spanish population classifies CYP3A4 as a polymorphic enzyme. Pharmacogenomics J 2015; 15: 288–92.

- **10** Marcuello E, Páez D, Paré L, Salazar J, Sebio A, del Rio E, *et al.* A genotype-directed phase I-IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. Br J Cancer 2011; 105: 53–7.
- **11** Paez D, Tobeña M, Sebio A, Fernandez-Plana J, Martin M, Virgili A, *et al.* Pharmacogenetic clinical randomized phase II trial to evaluate the efficacy and safety of FOLFIRI with high dose of irinotecan (FOLFIRI-HD) in metastatic colorectal cancer patients according to UGT1A 1 genotype. Ann Oncol 2017; 28 (Suppl. 3).
- **12** Harding SD, Sharman JL, Faccenda E, Southan C, Pawson AJ, Ireland S, *et al.* The IUPHAR/BPS guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY. Nucl Acids Res 2018; 46 (D1): D1091–106.
- **13** Alexander SPH, Fabbro D, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, *et al*. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18: Enzymes. Br J Pharmacol 2017; 174 (Suppl. 1): S272–S359.
- **14** Fernández Salazar JM, Remacha Sevilla A, del Río Conde E, Baiget Bastús M. Distribution of the A(TA)7TAA genotype associated with Gilbert syndrome in the Spanish population. Med Clin (Barc) 2000; 115: 540–1.
- **15** Dean L. Irinotecan therapy and UGT1A1 genotype. Medical Genetics Summaries. National Center for Biotechnology Information (US); 2012
- **16** Rouits E, Charasson V, Pétain A, Boisdron-Celle M, Delord J-P, Fonck M, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. Br J Cancer 2008; 99: 1239–45.
- **17** van der Bol JM, Mathijssen RHJ, Creemers G-JM, Planting AST, Loos WJ, Wiemer EAC, *et al*. A CYP3A4 phenotype-based dosing algorithm for individualized treatment of irinotecan. Clin Cancer Res 2010; 16: 736–42.
- **18** Makihara K, Nakamura S, Miyagi K, Ueno H, Nakata I. Clarithromycin co-administration does not increase irinotecan (CPT-11) toxicity in colorectal cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol 2017; 80: 527–33.
- **19** Riera P, Apellániz MV, Salazar J. Relevancia de la variante CYP3A4*20 como predictor de neuropatía inducida por paclitaxel en población española. Med Clin (Barc) 2018; 150: 163–4.

ARTICLE 3

Comments on: "Clinical utility of *ABCB1* genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan" (carta a l'editor)

Pharmacological Research 2019; 145:104287 doi: 10.1016/j.phrs.2019.104287 PMID: 31141715

Pau Riera^{1,2,3}, Alícia Artigas¹, Juliana Salazar^{1,4}, David Páez^{4,5}

¹Servei de Genètica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

²Servei de Farmàcia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

³Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Espanya

⁴U-705, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud

Carlos III, Barcelona, Espanya

⁵Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs

Letter to the Editor

Comments on: "Clinical utility of *ABCB1* genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan"



narmacologica

Dear Sir,

We read carefully the article entitled "Clinical utility of *ABCB1* genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan" by Salvador-Martín et al, recently published in *Pharmacological Research* [1]. The topic of the article is of high interest, as up to 36% of the patients undergoing an irinotecan-containing regimen develop grade 3–4 toxicity [2]. The authors conclude that genotyping of *ABCB1* variants could help to prevent severe adverse reactions to irinotecan-based treatments in colorectal cancer. However, no association between *UGT1A1* and severe irinotecan-induced toxicity was found in their study. As contradictory results have been reported in other studies, they suggest a meta-analysis as a way to clarify these discrepant findings.

UGT1A1 is the best pharmacogenetic biomarker with a recognized role in preventing severe irinotecan-induced toxicity. As a matter of fact, the FDA-approved drug label for irinotecan states that patients homozygous for the UGT1A1*28 allele are at higher risk of neutropenia [3]. In 2007, a meta-analysis of nine studies including a variety of irinotecan-containing regimens demonstrated that the UGT1A1*28 genotype-based dosing of irinotecan is likely to improve safety of patients on high doses of irinotecan (> 250 mg/m^2) but not in those on low doses ($< 150 \text{ mg/m}^2$) [4]. This argument is used to justify the lack of utility of upfront UGT1A1 screening and UGT1A1-guided dose individualization of irinotecan at the recommended dose of 180 mg/m² when co-administered with infusional 5-fluorouracil/leucovorin (FOL-FIRI regimen). However, in 2011, a phase I-IV dose-finding trial confirmed that in patients with the UGT1A1*28 homozygous genotype the maximum tolerated dose was 30% lower than the standard dose of 180 mg/m^2 [5]. In the study performed by Salvador-Martín et al, this genetic variation does not comply with Hardy-Weinberg equilibrium (P < 0.05), therefore the subgroup of *UGT1A1*28/*28* patients, which are the most likely to develop severe irinotecan-induced toxicity, are underrepresented in their sample. It is worth mentioning this limitation, as a meta-analysis that would have included this study could have been underestimated the effect of UGT1A1 genotype upon irinotecaninduce toxicity.

In conclusion, we consider that the results showed by Salvador-Martín et al are not strong enough to discard the role of *UGT1A1*28* as a biomarker of severe toxicity to irinotecan treatment.

Conflict of interest

David Páez declares a scientific advisory role for Amgen, Sanofi,

Merck Serono, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Lilly and Servier, and certifies no funding for the preparation of this letter. No other conflicts of interest were disclosed by the other authors.

References

- S. Salvador-Martín, X. García-González, M.I. García, C. Blanco, P. García-Alfonso, L. Robles, et al., Clinical utility of ABCB1 genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan, Pharmacol. Res. 136 (2018) 133–139.
- [2] C.S. Fuchs, M.R. Moore, G. Harker, L. Villa, D. Rinaldi, J.R. Hecht, Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer, J. Clin. Oncol. 21 (5) (2003) 807–814.
- [3] Irinotecan (CAMPTOSAR) Drug Label, Food and Drug Administration, 2019 (Accessed 26 April 2019).
- [4] J.M. Hoskins, R.M. Goldberg, P. Qu, J.G. Ibrahim, H.L. McLeod, UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters, JNCI J. Natl. Cancer Inst. 99 (17) (2007) 1290–1295.
- [5] E. Marcuello, D. Páez, L. Paré, J. Salazar, A. Sebio, E. del Rio, et al., A genotypedirected phase I-IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer, Br. J. Cancer 105 (1) (2011) 53–57.

Pau Riera^{a,b,c}

^a Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona, Spain

- ^b Pharmacy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona, Spain
- ^c Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona (UB), Campus Diagonal, Av. de Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona, Spain

Alícia Artigas

Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona, Spain

Juliana Salazar^{a,b}

^a Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona, Spain

^b CIBERER U-705. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain

David Páez^{a,b,*}

^a Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona, Spain

^b CIBERER U-705, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain

E-mail address: dpaez@santpau.cat.

https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104287 Received 12 May 2019 Available online 26 May 2019 1043-6618/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

^{*} Corresponding author at: Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain.
ARTICLE 4

ABCB1 genetic variants as predictors of irinotecan-induced severe gastrointestinal toxicity in metastatic colorectal cancer patients

Pau Riera^{1,2,3*}, Alícia Artigas-Baleri^{1*}, Juliana Salazar⁴, Ana Sebio⁵, Anna C. Virgili⁵, María J. Arranz⁶, David Páez^{5,7}

Frontiers in Pharmacology 2020; 11:973 doi: 10.3389/fphar.2020.00973 PMID: 32695000

¹Servei de Genètica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

²Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Espanya

³Servei de Farmàcia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

⁴Laboratori d'Oncologia Mèdica Translacional, Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau (IIB-Sant Pau), Barcelona, Espanya

⁵Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

⁶Laboratori de recerca, Fundació Docència i Investigació Mútua de Terrassa, Terrassa, Espanya

⁷U-705, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Espanya

*Ambdós autors van contribuir de forma equitativa en l'estudi





ABCB1 Genetic Variants as Predictors of Irinotecan-Induced Severe Gastrointestinal Toxicity in Metastatic Colorectal Cancer Patients

OPEN ACCESS

Edited by:

Chonlaphat Sukasem, Mahidol University, Thailand

Reviewed by:

Chalirmporn Atasilp, Rangsit University, Thailand Luis Andrés López-Fernández, Gregorio Marañón Hospital, Spain Jaw-Yuan Wang, Kaohsiung Medical University, Taiwan

*Correspondence:

Juliana Salazar jsalazar@santpau.cat [†]These authors have contributed equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to Pharmacogenetics and Pharmacogenomics, a section of the journal Frontiers in Pharmacology

Received: 07 April 2020 Accepted: 15 June 2020 Published: 30 June 2020

Citation:

Riera P, Artigas-Baleri A, Salazar J, Sebio A, Virgili AC, Arranz MJ and Páez D (2020) ABCB1 Genetic Variants as Predictors of Irinotecan-Induced Severe Gastrointestinal Toxicity in Metastatic Colorectal Cancer Patients. Front. Pharmacol. 11:973. doi: 10.3389/fphar.2020.00973

Pau Riera^{1,2,3†}, Alícia Artigas-Baleri^{1†}, Juliana Salazar^{4*}, Ana Sebio⁵, Anna C. Virgili⁵, María Jesús Arranz⁶ and David Páez^{5,7}

¹ Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ² Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain, ³ Pharmacy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ⁴ Translational Medical Oncology Laboratory, Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau, (IIB-Sant Pau), Barcelona, Spain, ⁵ Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ⁶ Research Laboratory, Fundació Docència i Investigació Mútua Terrassa, Terrassa, Spain, ⁷ U705, ISCIII Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

Irinotecan is widely used in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) despite its severe toxicities. Toxicity is often associated with the UGT1A1*28/*28 genotype. An explanation for idiopathic toxicity beyond the UGT1A1 biomarker, however, remains a major concern for clinicians. One of the main irinotecan transporters is P-glycoprotein (Pgp), which is a hepatic efflux pump encoded by ABCB1. P-gp is involved in the biliary excretion of irinotecan and its active metabolite SN-38. We aimed to assess whether functional variants in ABCB1 also contribute to identifying patients at risk of toxicity. A cohort of 308 mCRC patients treated with irinotecan-based regimens were genotyped for polymorphisms in ABCB1 (rs1128503, rs2032582, and rs1045642). The effect of these variants and their haplotypes on irinotecan-induced severe toxicity (diarrhea, neutropenia, asthenia, nausea, and mucositis) was assessed. After adjusting for the relevant clinical and pathological parameters in the multivariate analysis, we found rs1128503 was significantly associated with severe diarrhea and mucositis (P=0.014 and P=0.002, respectively). Additionally, rs2032582 was associated with severe mucositis (P<0.001). Our results show that rs1128503 genotyping could help to predict severe gastrointestinal toxicity induced by irinotecan.

Keywords: ABCB1, P-glycoprotein, irinotecan (CPT-11), gastrointestinal toxicity, diarrhea, mucositis, biomarker, colorectal cancer

INTRODUCTION

Irinotecan (CPT-11) is an antitumor agent that is broadly used in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients and normally coadministered with infusional 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFIRI regimen). Its use is hampered by toxicities such as severe diarrhea and neutropenia in more than one-third of the patients (Fuchs et al., 2003).

In the liver, CPT-11 is converted to 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), which is responsible for both the efficacy and the toxicity of the drug. SN-38 is mainly eliminated through glucuronidation by the uridine 5'-diphospho-(UDP)glucuronosyltransferase (UGT) isoform 1A1, which is encoded by the *UGT1A1* gene. The presence of seven TA repeats (*UGT1A1*28* allele) in the promoter region of this gene reduces enzymatic activity (Bosma et al., 1995) and patients homozygous for this variant have a higher risk of irinotecan-induced toxicity (Innocenti et al., 2004; Marcuello et al., 2004; Rouits et al., 2004; Riera et al., 2018). However, *UGT1A1* genetic status does not always explain severe toxicity, suggesting that other mechanisms contribute to the appearance of side effects.

An ATP-powered pump encoded by the *ABCB1* gene, P-glycoprotein (P-gp), participates in the biliary excretion of CPT-11 and SN-38. The enhancement of P-gp expression increases biliary secretion of SN-38 and reduces its plasma concentrations, conferring a higher risk of intestinal toxicity but a lower risk of neutropenia (Iyer et al., 2002; Mathijssen et al., 2003; Han et al., 2009; Filipski et al., 2014; Li et al., 2018). The most well-known *ABCB1* variants, rs1128503 (1236 C>T), rs2032582 (2677 G>T/A), and rs1045642 (3435 C>T), modulate P-gp expression (Hoffmeyer et al., 2000; Haenisch et al., 2007), CPT-11 and SN-38 plasma concentrations, and renal clearance (Mathijssen et al., 2003; Sai et al., 2003). However, the influence of these variants on irinotecan-induced severe toxicity remains inconclusive (Han et al., 2007; Innocenti et al., 2009; Glimelius et al., 2011; Teft et al., 2015; Li et al., 2018; Salvador-Martín et al., 2018).

Based on the relevance of P-gp on irinotecan pharmacokinetics, we conducted a study in a cohort of mCRC patients treated with an irinotecan-containing therapy in whom the *UGT1A1* gene had previously been analyzed. The aim was to elucidate whether the aforementioned *ABCB1* variants could also help to identify patients who develop severe irinotecan-induced toxicity.

MATERIAL AND METHODS

Study Population

We retrospectively included patients from Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP, Barcelona, Spain) who were diagnosed between 2001 and 2016 with mCRC and treated with an irinotecan-containing regimen. All patients had an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status ≤ 2 and age ≥ 18 . Irinotecan-containing regimens were biweekly FOLFIRI (irinotecan 180 mg/m²), irinotecan in monotherapy every 3 weeks (350 mg/m², except for one patient with the UGT1A1*28/*37 genotype who received a reduced dose of 150 mg/m²), and other regimens containing irinotecan (irinotecan

125–350 mg/m²). We excluded those patients without available germline DNA or without all the toxicities properly collected. The toxicities assessed were diarrhea, neutropenia, asthenia, nausea, and mucositis. For each side-effect, we recorded the highest grade of toxicity experienced by each patient. Toxicities were graded (1 to 4) on the basis of the Common Terminology Criteria for Adverse Events v5.0 (CTCAE) of the National Cancer Institute. Grade 3 to 4 toxicities were considered severe toxicities. The study was approved by the Institutional Ethics Committee at HSCSP and written informed consent was obtained from all participants.

Genotyping

Germline DNA was extracted from blood cells by the salting-out procedure (Miller et al., 1988). Three functional *ABCB1* gene polymorphisms, rs1128503 (1236 C>T), rs2032582 (2677 G>T/A), and rs1045642 (3435 C>T), were genotyped using TaqMan PCR assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Due to the rs2032582 triallelic condition, two probes (C_11711720C_30 and C_11711720D_40) were needed to genotype this variant. The other probes used were C_7586662_10 for rs11128503, and C_7586657_20 for rs1045642. Genotyping was performed on a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistics

Allele frequencies for each single nucleotide polymorphism (SNP) were checked by direct counting and compared to published data (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015). Genotype data were tested for Hardy-Weinberg equilibrium using chi-squared tests. The triallelic condition of the rs2032582 variant results in six possible genotypes (GG, GT, GA, TT, TA, and AA). To simplify the statistical analyses, we combined patients with GT or GA genotypes, and also patients with TT, TA, or AA genotypes. For haplotype analysis, GA, TA, and AA patients were excluded, as PLINK removes triallelic SNP genotype calls. We performed phased haplotype analyses (using the E-M algorithm) including the three ABCB1 variants or using the window option for diplotype analyses. Associations between toxicities and genetic variants/ haplotypes were measured using chi-squared tests. Multivariate analyses were carried out, including sex, age, chemotherapy treatment, line of chemotherapy, and UGT1A1 and ABCB1 genotypes. P-values <0.05 were considered statistically significant. Bonferroni correction for multiple comparisons was applied (Pvalues $<2.4 \cdot 10^{-4}$). All statistical analyses were conducted using SPSS (v25.0, IBM) and PLINK (v1.07, Shaun Purcell).

RESULTS

Patient Population

We studied a total of 308 patients. Most patients (n=283) were treated with irinotecan in combination with 5-fluorouracil and leucovorin (FOLFIRI). A total of 176 patients had been enrolled in clinical trials (Marcuello et al., 2011; Páez et al., 2019). The presence of the *UGT1A1*28*, *UGT1A1*37*, and *UGT1A1*36* alleles was determined in a previous study (Riera et al., 2018). **Table 1** shows patients' clinical characteristics along with

UGT1A1 genotype status. **Supplementary Table 1** shows toxicity grades according to CTCAE v5.0.

Genetic Studies

Allelic frequencies for all polymorphisms were within the probability limits of Hardy–Weinberg equilibrium (P>0.05), and their minor allele frequencies were in accordance with European population frequencies reported in the 1000 Genomes Project (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015). Genotyping was successful in 307 patients (99.7%).

Associations Between *ABCB1* Variants and Severe Side Effects

In the univariate analysis, we found no significant associations between the tested *ABCB1* variants and the presence of irinotecan-

TABLE 1 | Baseline patient characteristics (n=308).

		n	%
Sex			
Male		194	63.0%
Female		114	37.0%
Age			
Mean	63		
Range	24–83		
Primary tumor site			
Right colon		76	24.7%
Left colon		232	75.3%
Chemotherapy treatment			
FOLFIRI		283	91.9%
Irinotecan monotherapy		13	4.2%
Other irinotecan combinations		12	3.9%
Line of chemotherapy			
First line		244	79.2%
≥ Second line		64	20.8%
UGT1A1 genotype			
UGT1A1 *1/*1		136	44.2%
UGT1A1 *1/*28		143	46.4%
UGT1A1 *28/*28		28	9.1%
UGT1A1 *28/*37		1	0.3%

FOLFIRI, combination of irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin, UGT1A1, uridine 5'diphospho-(UDP)-glucuronosyltransferase (UGT) isoform 1A1 induced side effects. In the multivariate analysis, rs1128503 was significantly associated with severe diarrhea and mucositis (P=0.014 and P=0.002, respectively). Patients harboring the CC genotype for rs1128503 presented a higher prevalence of severe diarrhea and mucositis than those with CT and TT genotypes (**Figure 1**). In addition, rs2032582 was associated with severe mucositis (P=0.0001). This association retained its significance after Bonferroni correction. **Table 2** shows the genotyping distributions and associations between the three polymorphisms and the toxicities assessed. When analyzing gene interactions, we found no significant interactions between the *UGT1A1* and the *ABCB1* variants tested.

Associations Between *ABCB1* Haplotypes and Severe Side Effects

In the univariate analysis, we found that the diplotypes rs1045642T-rs1128503C (frequency=10.5%) and rs1128503C-rs2032582T (frequency=1.9%) were associated with a higher risk of diarrhea (P=0.034 and P=0.002, respectively). The rs1128503C-rs2032582T diplotype was also associated with a higher risk of mucositis (P=3.8·10⁻⁸), asthenia (P=0.043), and nausea (P=0.034). The association with mucositis remained statistically significant after applying Bonferroni test.

In the multivariate analysis, the associations of both diplotypes with diarrhea remained significant (P=0.035 for rs1045642T-rs1128503C and P=0.005 for rs1128503C-rs2032582T). The associations of the diplotype rs1128503C-rs2032582T with mucositis and nausea also retained their significance after multivariate adjustments (P=0.00018 and P=0.049, respectively), but only the association with mucositis retained its significance after Bonferroni correction. No other associations between *ABCB1* diplotypes and the occurrence of severe side effects were found. These results are shown in the **Supplementary Table 2**.

The haplotype analyses considering the three *ABCB1* gene variants (rs1128503-rs2032582-rs1045642) identified seven of the eight possible haplotypes in our cohort of patients. The most frequent haplotypes were CGC and TTT, with a prevalence of 47.5% (n=282) and 37.4% (n=222), respectively (**Table 3**). In contrast, the haplotype CTC was rare (0.3%) and the TGT haplotype was not harbored by any patient.



Genotype	n (%)	Diarrhea, n (%)	Neutropenia, n (%)	Asthenia, n (%)	Nausea, n (%)	Mucositis, n (%)
rs1128503 (1236 C>T)						
сс	107 (34.9%)	22 (20.6%)	29 (27.1%)	24 (22.4%)	10 (9.4%)	5 (4.7%)
СТ	145 (47.2%)	24 (16.6%)	27 (18.6%)	29 (20.0%)	11 (7.6%)	4 (2.8%)
тт	55 (17.9%)	9 (16.4 %)	11 (20.0%)	11 (20.0%)	6 (10.9%)	0 (0%)
P-value (univariate analysis)		P = 0.676	P = 0.256	P = 0.883	P = 0.737	P = 0.245
P-value (multivariate analysis)		<i>P</i> = 0.014	P = 0.990	P = 0.236	P = 0.615	P = 0.002
rs2032582 (2677 G>T/A)						
GG	102 (33.2%)	18 (17.7%)	28 (27.5%)	20 (19.6%)	8 (7.8%)	2 (2.0%)
GT	144 (46.9%)					
GA	7 (2.3%)					
GT+GA		26 (17.2%)	28 (18.5%)	33 (21.9%)	14 (9.3%)	5 (3.3%)
тт	51 (16.6%)					
ТА	3 (1.0%)					
TT+TA		11 (20.4%)	11 (20.4%)	11 (20.4%)	5 (9.3%)	2 (3.7%)
P-value (univariate analysis)		P = 0.871	P = 0.233	P = 0.907	P = 0.917	P = 0.768
P-value (multivariate analysis)		P = 0.095	P = 0.213	P = 0.586	P = 0.713	P = 0.0001 ^a
rs1045642 (3435 C>T)						
сс	90 (29.3%)	15 (16.7%)	24 (26.7%)	16 (17.8%)	6 (6.7%)	3 (3.3%)
СТ	149 (48.5%)	25 (16.8%)	27 (18.1%)	34 (22.8%)	15 (10.1%)	6 (4.0%)
тт	68 (22.2%)	15 (22.1%)	16 (23.5%)	14 (20.6%)	6 (8.8%)	0 (0%)
P-value (univariate analysis)		P = 0.600	P = 0.279	P = 0.648	P = 0.667	P = 0.255
P-value (multivariate analysis)		<i>P</i> = 0.197	<i>P</i> = 0.207	<i>P</i> = 0.240	P = 0.659	P = 0.352

The bold values indicate the statistically significant P-values (P < 0.05).

^aSignificant after Bonferroni correction ($P < 2.4 \cdot 10^{-4}$).

ABCB1, ATP binding cassette subfamily B member 1.

In the univariate analysis, the CTT haplotype (frequency= 1.5%) was significantly associated with a higher risk of severe diarrhea, mucositis, asthenia, and nausea (P=0.005, P=8.8·10⁻⁶, P=0.015, and P=0.014, respectively). These associations retained their significance after multivariate adjustments (P=0.012, P=0.002, P=0.047, and P=0.029, respectively) (see **Table 3**). Only the association with mucositis in the univariate analysis remained statistically significant after applying the Bonferroni test.

DISCUSSION

This study shows the *ABCB1* rs1128503 variant is a promising predictor of irinotecan-induced severe gastrointestinal toxicity, in particular diarrhea and mucositis. This result is reinforced by the significant associations found between the diplotypes and haplotypes containing the rs1128503-C allele and the referred toxicities. The rs2032582 variant also appears to be associated with severe mucositis.

Irinotecan-induced toxicities, the most common being neutropenia and diarrhea, usually lead to dose reduction or treatment withdrawal (Douillard et al., 2000). The Food and Drug Administration (FDA) drug label for irinotecan includes therapeutic recommendations for *UGT1A1*28* homozygous patients to reduce the risk of developing neutropenia [Irinotecan (CAMPTOSAR) drug label. Food and Drug Administration. (Accession date: 24/02/2020)]. However, no recommendations are given to reduce the likelihood of irinotecan-induced severe gastrointestinal toxicity. The variability observed in the development of toxicity in clinical practice suggests that other polymorphisms or haplotypes could be involved. A growing body of evidence shows that variants in CPT-11 transporter genes could be helpful to identify patients at risk of severe side effects (Innocenti et al., 2009; Chen et al., 2015; Teft et al., 2015). *ABCB1* gene is one of the most promising candidates, considering the relevance of the P-gp on the biliary secretion of irinotecan and its metabolites from the liver (Iyer et al., 2002). Great attention has been paid to rs1128503 (1236 C>T), rs2032582 (2677 G>T/A), and rs1045642 (3435 C>T), variants found to be in strong linkage disequilibrium and associated with drug exposure (Mathijssen et al., 2003; Han et al., 2007; Li et al., 2018).

Rhodes et al. analyzed 11 polymorphisms in 54 patients with metastatic colorectal cancer, and reported significant associations with grade 3-4 toxicity and grade 3-4 neutropenia when combining ABCB1, C1236T, and SLCO1B1 T521C polymorphisms (Rhodes et al., 2007). More recently, Salvador-Martín et al. analyzed the association between variants in ABC efflux transporter genes and irinotecan adverse effects, and found that the ABCB1 variants were significantly associated with overall toxicity (P < 0.01) and with higher hematological toxicity including, but not limited to, neutropenia (P<0.01) (Salvador-Martín et al., 2018). However, other studies conducted in mCRC patients treated with irinotecan in whom ABCB1 variants were analyzed did not show significant associations with severe neutropenia (De Mattia et al., 2013; Chen et al., 2015; Teft et al., 2015; Yan et al., 2016). Our findings support these negative results as we found no associations with severe neutropenia in the 307 patients analyzed. These data, together with the significant association obtained with the UGT1A1*28 marker (P = 0.037) in a previous study by our group (Riera et al., 2018), lead us to infer that UGT1A1 is a more powerful predictor of severe neutropenia than ABCB1.

Few studies have analyzed *ABCB1* variants as determinants of gastrointestinal toxicity in mCRC patients treated with

		Haplotype (rs1128503-rs2032582-rs1045642)*					
		TTT (n=222)	TTC (n=13)	CTT (n=9)	TGC (n=16)	CGT (n=50)	CGC (n=282)
Diarrhoea	Unaffected (n=485)	185 (38.1%)	10 (2.1%)	4 (0.8%)	15 (3.1%)	38 (7.8%)	233 (48.0%)
	Affected (n=107)	37 (34.6%)	3 (2.8%)	5 (4.7%)	1 (0.9%)	12 (11.2%)	49 (45.8%)
	P-value (univariate analysis)	0.511	0.703	0.005	0.213	0.256	0.680
	P-value (multivariate analysis)	0.459	0.888	0.012	0.193	0.306	0.791
Neutropenia	Unaffected (n=458)	179 (39.1%)	10 (2.2%)	5 (1.1%)	13 (2.8%)	38 (8.3%)	213 (46.5%)
	Affected (n=134)	43 (32.1%)	3 (2.2%)	4 (3.0%)	3 (2.2%)	12 (9.0%)	69 (51.5%)
	P-value (univariate analysis)	0.151	0.963	0.140	0.708	0.812	0.303
	P-value (multivariate analysis)	0.122	0.631	0.234	0.815	0.361	0.408
Asthenia	Unaffected (n=468)	176 (37.6%)	12 (2.6%)	4 (0.9%)	13 (2.8%)	40 (8.5%)	223 (47.6%)
	Affected (n=124)	46 (37.1%)	1 (0.8%)	5 (4.0%)	3 (2.4%)	10 (8.1%)	59 (47.6%)
	P-value (univariate analysis)	0.935	0.246	0.015	0.829	0.901	0.984
	P-value (multivariate analysis)	0.975	0.203	0.047	0.979	0.765	0.777
Nausea	Unaffected (n=538)	201 (37.4%)	13 (2.4%)	6 (1.1%)	14 (2.6%)	47 (8.7%)	257 (47.8%)
	Affected (n=54)	21 (38.9%)	0 (0%)	3 (5.6%)	2 (3.7%)	3 (5.6%)	25 (46.3%)
	P-value (univariate analysis)	0.812	0.263	0.014	0.633	0.447	0.832
	P-value (multivariate analysis)	0.799	0.708	0.029	0.753	0.427	0.866
Mucositis	Unaffected (n=579)	219 (37.8%)	13 (2.2%)	7 (1.2%)	16 (2.8%)	50 (8.6%)	274 (47.3%)
	Affected (n=13)	3 (23.1%)	0 (0%)	2 (15.4%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (61.5%)
	<i>P-value</i> (univariate analysis)	0.214	0.906	8.8.10 ^{-6a}	0.541	0.302	0.353
	P-value (multivariate analysis)	0.251	0.921	0.002	0.998	0.458	0.733

TABLE 3 | Univariate and multivariate associations between ABCB1 haplotypes and grade 3-4 toxicities.

*The haplotype CTC was present in two patients. Due to its low frequency, it was excluded from the statistical analysis. The haplotype TGT was not harbored by any patient. ^aSignificant after Bonferroni correction ($P < 2.4 \cdot 10^{-4}$).

The bold values indicate the statistically significant P-values (P < 0.05).

ABCB1, ATP binding cassette subfamily B member 1.

irinotecan, and most of them produced negative results (De Mattia et al., 2013; Chen et al., 2015; Teft et al., 2015; Yan et al., 2016; Salvador-Martín et al., 2018). Nevertheless, in a cohort of 56 mCRC patients receiving an irinotecan-based treatment, Cortejoso et al. found that patients with the CC genotype for the rs1045642 variant had a higher probability of diarrhea than patients with CT and TT genotypes (P=0.039) (Cortejoso, et al., 2013). In line with this study, and after adjusting for clinicopathological covariates and the UGT1A1*28 genotype in a larger sample, we found that patients with the CC genotype for the ABCB1 rs1128503 variant were at highest risk of diarrhea (P=0.014) and mucositis (P=0.002). Furthermore, diplotypes and haplotypes including the rs1128503-C allele were significantly associated with severe gastrointestinal toxicity, suggesting this allele contributes to the risk of toxicity. Of note, Mathijssen et al. reported that patients homozygous for the rs1128503-T allele showed greater exposure to both irinotecan (P=0.038) and SN-38 (P=0.031) than the other patients in the trial (Mathijssen et al., 2003). They also postulated that this synonymous variant could alter RNA stability and affect the expression of ABCB1. Thus, in keeping with our findings, we speculate that patients carrying the TT genotype may present less biliary excretion and a lower risk of gastrointestinal toxicity.

In an attempt to improve the pharmacogenetic prediction of irinotecan-induced severe toxicity, we focused our study on the three most informative *ABCB1* variants. Although this approach allowed us to achieve a higher statistical power, it has the limitation of losing the genetic effect of other variants located in the *ABCB1* gene or in other hepatic efflux transporters, such as *ABCC2* or *ABCG2*. A second limitation of our study could be the similar side-effect profile of 5-fluorouracil and irinotecan. However, the ABCB1 transporter has not been found to be involved in the pharmacokinetics of 5-fluorouracil, suggesting that the associations observed are likely due to irinotecan effects. A third limitation is that we did not record whether toxicity appeared in the first or later cycles or whether diarrhea was earlyonset or delayed. Neither did we record the prophylactic antidiarrheal agents received by each patient. Taken together, these data would have been useful to interpret the results. Finally, the associations found in this study should be considered exploratory because only the results with a P<0.001 survived Bonferroni correction for multiple comparisons. We note, however, that the Bonferroni correction was too conservative as the ABCB1 variants were in linkage disequilibrium and the procedure ignored the dependencies between these variants. This limitation could be overcome by validating our findings in a similar and independent cohort of patients, and also by performing functional studies.

In conclusion, our findings in a large and homogeneous cohort of mCRC patients show that rs1128503 and the diplotypes/ haplotypes containing the C allele of this variant could be useful predictors of irinotecan-induced severe gastrointestinal toxicity. Further studies are needed to increase evidence regarding the utility of the rs1128503 variant in clinical practice.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PR, AA-B, JS, and DP contributed to the conception and design of the study. PR, AA-B, and JS performed genotyping and collected data. AS and AV collected data. PR, AA-B, JS, MA, and DP analyzed the data and performed statistical analyses. PR, AA-B, JS, and DP wrote the manuscript. All

REFERENCES

- 1000 Genomes Project Consortium, R. A., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., et al. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature* 526 (7571), 68–74. doi: 10.1038/nature15393
- Bosma, P. J., Chowdhury, J. R., Bakker, C., Gantla, S., de Boer, A., Oostra, B. A., et al. (1995). The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDPglucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *New Engl. J. Med.* 333 (18), 1171–1175. doi: 10.1056/NEJM199511023331802
- Chen, S., Villeneuve, L., Jonker, D., Couture, F., Laverdière, I., Cecchin, E., et al. (2015). ABCC5 and ABCG1 polymorphisms predict irinotecan-induced severe toxicity in metastatic colorectal cancer patients. *Pharmacogenet. Genomics* 25 (12), 573–583. doi: 10.1097/FPC.00000000000168
- Cortejoso, L., García, M. I., García-Alfonso, P., González-Haba, E., Escolar, F., Sanjurjo, M., et al. (2013). Differential toxicity biomarkers for irinotecan- and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71 (6), 1463–1472. doi: 10.1007/s00280-013-2145-6
- De Mattia, E., Toffoli, G., Polesel, J., D'Andrea, M., Corona, G., Zagonel, V., et al. (2013). Pharmacogenetics of ABC and SLC transporters in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI treatment. *Pharmacogenet. Genomics* 23 (10), 549–557. doi: 10.1097/FPC.0b013e328364b6cf
- Douillard, J. Y., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., et al. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355 (9209), 1041–1047. doi: 10.1016/ s0140-6736(00)02034-1
- Filipski, E., Berland, E., Ozturk, N., Guettier, C., van der Horst, G. T. J., Lévi, F., et al. (2014). Optimization of irinotecan chronotherapy with P-glycoprotein inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 274 (3), 471–479. doi: 10.1016/ j.taap.2013.12.018
- Fuchs, C. S., Moore, M. R., Harker, G., Villa, L., Rinaldi, D., and Hecht, J. R. (2003). Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 21 (5), 807–814. doi: 10.1200/ JCO.2003.08.058
- Glimelius, B., Garmo, H., Berglund, A., Fredriksson, L. A., Berglund, M., Kohnke, H., et al. (2011). Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenom. J.* 11 (1), 61–71. doi: 10.1038/tpj.2010.10
- Haenisch, S., Zimmermann, U., Dazert, E., Wruck, C. J., Dazert, P., Siegmund, S., et al. (2007). Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenom. J.* 7 (1), 56–65. doi: 10.1038/sj.tpj.6500403
- Han, J.-Y., Lim, H.-S., Yoo, Y.-K., Shin, E. S., Park, Y. H., Lee, S. Y., et al. (2007). Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecanpharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 110 (1), 138–147. doi: 10.1002/cncr.22760
- Han, J.-Y., Lim, H.-S., Park, Y. H., Lee, S. Y., and Lee, J. S. (2009). Integrated pharmacogenetic prediction of irinotecan pharmacokinetics and toxicity in

authors contributed to the article and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (CM18/00207 for PR).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.00973/ full#supplementary-material

patients with advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer 63 (1), 115–120. doi: 10.1016/j.lungcan.2007.12.003

- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmöller, J., Johne, A., et al. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with Pglycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (7), 3473–3478. doi: 10.1073/pnas.050585397
- Innocenti, F., Undevia, S. D., Iyer, L., Chen, P. X., Das, S., Kocherginsky, M., et al. (2004). Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. J. Clin. Oncol. 22 (8), 1382–1388. doi: 10.1200/JCO.2004.07.173
- Innocenti, F., Kroetz, D. L., Schuetz, E., Dolan, M. E., Ramírez, J., Relling, M., et al. (2009). Comprehensive Pharmacogenetic Analysis of Irinotecan Neutropenia and Pharmacokinetics. *J. Clin. Oncol.* 27 (16), 2604–2614. doi: 10.1200/ JCO.2008.20.6300
- Irinotecan (CAMPTOSAR) drug label. Food and Drug Administration. [Accession date: 02/24/2020].
- Iyer, L., Ramírez, J., Shepard, D. R., Bingham, C. M., Hossfeld, D.-K., Ratain, M. J., et al. (2002). Biliary transport of irinotecan and metabolites in normal and Pglycoprotein-deficient mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 49 (4), 336–341. doi: 10.1007/s00280-001-0420-4
- Li, M., Seiser, E. L., Baldwin, R. M., Ramirez, J., Ratain, M. J., Innocenti, F., et al. (2018). ABC transporter polymorphisms are associated with irinotecan pharmacokinetics and neutropenia. *Pharmacogenom. J.* 18 (1), 35–42. doi: 10.1038/tpj.2016.75
- Marcuello, E., Altés, A., Menoyo, A., Del Rio, E., Gómez-Pardo, M., and Baiget, M. (2004). UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 91 (4), 678–682. doi: 10.1038/ sj.bjc.6602042
- Marcuello, E., Páez, D., Paré, L., Salazar, J., Sebio, A., del Rio, E., et al. (2011). A genotype-directed phase I-IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. Br. J. Cancer 105 (1), 53–57. doi: 10.1038/bjc.2011.206
- Mathijssen, R. H. J., Marsh, S., Karlsson, M. O., Xie, R., Baker, S. D., Verweij, J., et al. (2003). Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin. Cancer Res.* 9 (9), 3246–3253.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16 (3), 1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215
- Páez, D., Tobeña, M., Fernández-Plana, J., Sebio, A., Virgili, A. C., Cirera, L., et al. (2019). Pharmacogenetic clinical randomised phase II trial to evaluate the efficacy and safety of FOLFIRI with high-dose irinotecan (HD-FOLFIRI) in metastatic colorectal cancer patients according to their UGT1A 1 genotype. Br. J. Cancer 120 (2), 190–195. doi: 10.1038/s41416-018-0348-7
- Rhodes, K. E., Zhang, W., Yang, D., Press, O. A., Gordon, M., Vallböhmer, D., et al. (2007). ABCB1, SLCO1B1 and UGT1A1 gene polymorphisms are associated with toxicity in metastatic colorectal cancer patients treated with

first-line irinotecan. Drug Metab. Lett. 1 (1), 23-30. doi: 10.2174/ 187231207779814328

- Riera, P., Salazar, J., Virgili, A. C., Tobeña, M., Sebio, A., Gallano, P., et al. (2018). Relevance of CYP3A4*20, UGT1A1*37 and UGT1A1*28 variants in irinotecaninduced severe toxicity. Br. J. Clin. Pharmacol. 84 (6), 1389–1392. doi: 10.1111/ bcp.13574
- Rouits, E., Boisdron-Celle, M., Dumont, A., Guérin, O., Morel, A., and Gamelin, E. (2004). Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. *Clin. Cancer Res.* 10 (15), 5151–5159. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0548
- Sai, K., Kaniwa, N., Itoda, M., Saito, Y., Hasegawa, R., Komamura, K., et al. (2003). Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics* 13 (12), 741–757. doi: 10.1097/00008571-200312000-00005
- Salvador-Martín, S., García-González, X., García, M.II, Blanco, C., García-Alfonso, P., Robles, L., et al. (2018). Clinical utility of ABCB1 genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan. *Pharmacol. Res.* 136, 133–139. doi: 10.1016/ j.phrs.2018.08.026
- Teft, W. A., Welch, S., Lenehan, J., Parfitt, J., Choi, Y.-H., Winquist, E., et al. (2015). OATP1B1 and tumour OATP1B3 modulate exposure, toxicity, and survival after irinotecan-based chemotherapy. *Br. J. Cancer* 112 (5), 857–865. doi: 10.1038/bjc.2015.5

Yan, L., Wang, X., Wei, L., Nie, Y., Liu, J., and Zhang, L. (2016). Effects of UGT1A1*6, UGT1A1*28, and ABCB1-3435C<T polymorphisms on irinotecan-induced toxicity in Chinese cancer patients. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 54 (03), 193– 199. doi: 10.5414/CP202442

Conflict of Interest: AS reports receiving travel grants from Merck, Amgen, Sanofi, and Roche. AV has honoraria from Speakers Bureau of Amgen, Sanofi, and Kyowa Kirin, declares a scientific advisory role for Roche and Amgen, and reports receiving travel grants from Merck, Roche, Amgen, Sanofi, MSD, and Servier. DP has honoraria from Speakers Bureau of Merck Serono and F. Hoffmann-La Roche Ltd, and declares a scientific advisory role for Amgen and Sanofi.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Riera, Artigas-Baleri, Salazar, Sebio, Virgili, Arranz and Páez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary table 1. Prevalence and grade of the toxicities assessed according to CTCAE (n=308)							
Toxicity	Grade 0, n (%)	Grade 1, n (%)	Grade 2, n (%)	Grade 3, n (%)	Grade 4, n (%)		
Diarrhea	131 (42.5%)	58 (18.8%)	64 (20.8%)	52 (16.9%)	3 (1.0%)		
Neutropenia	150 (48.7%)	20 (6.5%)	70 (22.7%)	57 (18.5%)	11 (3.6%)		
Asthenia	108 (35.1%)	45 (14.6%)	90 (29.2%)	61 (19.8%)	4 (1.3%)		
Nausea	170 (55.2%)	41 (13.3%)	70 (22.7%)	27 (8.8%)	0 (0%)		
Mucositis	214 (69.5%)	44 (14.3%)	41 (13.3%)	9 (2.9%)	0 (0%)		

Abbreviations: CTCAE, Common Terminology Criteria for Adverse Events (v5.0)

Supplementary table 2. Univariate and multivariate associations between ABCB1 diplotypes and grade III-IV toxicities									
			rs1045642	2-rs1128503			rs1128503	-rs2032582	
		TT	СТ	тс	СС	тт	СТ	TG	CG
		(n=219)	(n=32)	(n=62)	(n=281)	(n=235)	(n=11)	(n=16)	(n=332)
	Unaffected (n=486)	182 (37.4%)	28 (5.8%)	45 (9.3%)	231 (47.5%)	195 (40.1%)	5 (1.0%)	15 (3.1%)	271 (55.8%)
Diarrhaa	Affected (n=108)	37 (34.3%)	4 (3.7%)	17 (15.7%)	50 (46.3%)	40 (37.0%)	6 (5.6%)	1 (0.9%)	61 (56.5%)
Diarrnea	P-value (univariate analysis)	0.482	0.497	0.034	0.756	0.553	0.002	0.210	0.892
	P-value (multivariate analysis)	0.464	0.317	0.035	0.932	0.498	0.005	0.193	0.781
	Unaffected (n=460)	176 (38.3%)	26 (5.7%)	46 (10.0%)	212 (46.1%)	189 (41.1%)	7 (1.5%)	13 (2.8%)	251 (54.6%)
Noutroponio	Affected (n=134)	43 (32.1%)	6 (4.5%)	16 (11.9%)	69 (51.5%)	46 (34.3%)	4 (3.0%)	3 (2.2%)	81 (60.4%)
Neutropenia	P-value (univariate analysis)	0.163	0.741	0.429	0.311	0.159	0.269	0.712	0.228
	P-value (multivariate analysis)	0.125	0.812	0.174	0.428	0.097	0.358	0.815	0.192
	Unaffected (n=470)	174 (37.0%)	27 (5.7%)	46 (9.8%)	223 (47.4%)	188 (40.0%)	6 (1.3%)	13 (2.8%)	263 (56.0%)
Acthonia	Affected (n=124)	45 (36.3%)	5 (4.0%)	16 (12.9%)	58 (46.8%)	47 (37.9%)	5 (4.0%)	3 (2.4%)	69 (55.6%)
Astrienia	P-value (univariate analysis)	0.944	0.358	0.378	0.955	0.671	0.043	0.832	0.950
	P-value (multivariate analysis)	0.984	0.356	0.215	0.743	0.704	0.083	0.979	0.896
	Unaffected (n=540)	198 (36.7%)	30 (5.6%)	56 (10.4%)	256 (47.4%)	214 (39.6%)	8 (1.5%)	14 (2.6%)	304 (56.3%)
Naucaa	Affected (n=54)	21 (38.9%)	2 (3.7%)	6 (11.1%)	25 (46.3%)	21 (38.9%)	3 (5.6%)	2 (3.7%)	28 (51.9%)
Ndused	P-value (univariate analysis)	0.807	0.684	0.770	0.817	0.916	0.034	0.631	0.531
	<i>P-value</i> (multivariate analysis)	0.804	0.628	0.764	0.846	0.931	0.049	0.753	0.558
	Unaffected (n=580)	216 (37.2%)	32 (5.5%)	60 (10.3%)	272 (46.9%)	232 (40.0%)	8 (1.4%)	16 (2.8%)	324 (55.9%)
Mucocitic	Affected (n=14)	3 (21.4%)	0 (0%)	2 (14.3%)	9 (64.3%)	3 (21.4%)	3 (21.4%)	0 (0%)	8 (57.1%)
iviucositis	P-value (univariate analysis)	0.207	0.427	0.579	0.215	0.160	3.8·10 ^{-8 a}	0.529	0.924
	P-value (multivariate analysis)	0.299	0.620	0.524	0.374	0.251	0.00018 ^a	0.998	0.815

			rs2032582-i	rs1045642	
		TT	GT	тс	GC
		(n=230)	(n=51)	(n=16)	(n=297)
	Unaffected (n=486)	188 (38.7%)	39 (8.0%)	12 (2.5%)	247 (50.8%)
Diawahaa	Affected (n=108)	42 (38.9%)	12 (11.1%)	4 (3.7%)	50 (46.3%)
Diarrnea	P-value (univariate analysis)	0.992	0.279	0.426	0.379
	P-value (multivariate analysis)	0.991	0.318	0.528	0.472
	Unaffected (n=460)	183 (39.8%)	39 (8.5%)	13 (2.8%)	225 (48.9%)
Noutrononia	Affected (n=134)	47 (35.1%)	12 (9.0%)	3 (2.2%)	72 (53.7%)
Neutropenia	P-value (univariate analysis)	0.310	0.820	0.786	0.342
	P-value (multivariate analysis)	0.229	0.372	0.517	0.367
	Unaffected (n=470)	179 (38.1%)	41 (8.7%)	15 (3.2%)	235 (50.0%)
Acthonia	Affected (n=124)	51 (41.1%)	10 (8.1%)	1 (0.8%)	62 (50.0%)
Astrienia	P-value (univariate analysis)	0.570	0.886	0.197	0.960
	P-value (multivariate analysis)	0.553	0.785	0.176	0.793
	Unaffected (n=540)	206 (38.1%)	48 (8.9%)	16 (3.0%)	270 (50.0%)
Naucaa	Affected (n=54)	24 (44.4%)	3 (5.6%)	0 (0%)	27 (50.0%)
Nausea	P-value (univariate analysis)	0.384	0.442	0.246	0.972
	P-value (multivariate analysis)	0.381	0.419	0.486	0.957
	Unaffected (n=580)	225 (38.8%)	51 (8.8%)	15 (2.6%)	289 (49.8%)
B.4	Affected (n=14)	5 (35.7%)	0 (0%)	1 (7.1%)	8 (57.1%)
IVIUCOSILIS	P-value (univariate analysis)	0.798	0.263	0.274	0.603
	P-value (multivariate analysis)	0.993	0.619	0.224	0.841
Asthenia Nausea Mucositis	 <i>P-value</i> (univariate analysis) <i>P-value</i> (multivariate analysis) Unaffected (n=540) Affected (n=54) <i>P-value</i> (univariate analysis) <i>P-value</i> (multivariate analysis) Unaffected (n=580) Affected (n=14) <i>P-value</i> (univariate analysis) <i>P-value</i> (univariate analysis) 	0.570 0.553 206 (38.1%) 24 (44.4%) 0.384 0.381 225 (38.8%) 5 (35.7%) 0.798 0.993	0.886 0.785 48 (8.9%) 3 (5.6%) 0.442 0.419 51 (8.8%) 0 (0%) 0.263 0.619	0.197 0.176 16 (3.0%) 0 (0%) 0.246 0.486 15 (2.6%) 1 (7.1%) 0.274 0.224	0.9 0.7 270 (9 27 (5 0.9 0.9 289 (4 8 (5 0.0 0.9

The bold values indicate the statistically significant P-values (P<0.05). Abbreviations: *ABCB1*, ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1. ^aSignificant after Bonferroni correction (P< $2.4 \cdot 10^{-4}$).

ARTICLE 5

Pharmacogenetic clinical randomised phase II trial to evaluate the efficacy and safety of FOLFIRI with high-dose irinotecan (HD-FOLFIRI) in metastatic colorectal cancer patients according to their *UGT1A1* genotype

British Journal of Cancer 2019; 120(2):190–5 doi: 10.1038/s41416-018-0348-7 PMID: 30585257

David Páez^{1,2}, María Tobeña¹, Julen Fernández-Plana³, Ana Sebio¹, Anna C. Virgili^{1,4}, Lluís Cirera³, Agustí Barnadas¹, Pau Riera^{5,6}, Ivana Sullivan¹, Juliana Salazar^{2,5}

¹Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

²CIBERER U-705, Barcelona, Espanya

³Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa, Espanya

⁴Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Espanya

⁵Servei de Genètica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

⁶Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Espanya

ARTICLE

Clinical Study



Pharmacogenetic clinical randomised phase II trial to evaluate the efficacy and safety of FOLFIRI with high-dose irinotecan (HD-FOLFIRI) in metastatic colorectal cancer patients according to their *UGT1A 1* genotype

David Páez^{1,2}, María Tobeña¹, Julen Fernández-Plana³, Ana Sebio¹, Anna C. Virgili^{1,4}, Lluís Cirera³, Agustí Barnadas¹, Pau Riera^{5,6}, Ivana Sullivan¹ and Juliana Salazar^{2,5}

BACKGROUND: Patients harbouring the *UGT1A1*28/*28* genotype are at risk of severe toxicity with the standard irinotecan dose. However, this dose is considerably lower than the dose that can be tolerated by *UGT1A1*1/*1* and *1/*28 patients. This randomised phase II trial evaluated the efficacy and safety of the FOLFIRI regimen with high-dose irinotecan (HD-FOLFIRI) in metastatic colorectal cancer patients.

METHODS: Eighty-two patients with the *UGT1A1**1/*1 or the *1/*28 genotype were randomised to receive HD-FOLFIRI versus FOLFIRI. Patients with the *UGT1A1**28/*28 genotype were excluded. In the experimental group, the irinotecan dose was 300 mg/m² for *UGT1A1**1/*1 and 260 mg/m² for *1/*28 patients. In the control group, the dose was 180 mg/m². We analysed the overall response rate (ORR), toxicity, and survival.

RESULTS: The ORR was significantly higher in the HD-FOLFIRI group (67.5 versus 43.6%; p = 0.001 OR: 1.73 [95% Cl:1.03–2.93]). Neutropenia (17.7%), diarrhoea (5.1%), and asthenia (5.1%) were the most common grade 3–4 toxicity. No differences were observed in severe toxicity (22.5% versus 20.5%), dose reduction (22.5% versus 28.2%), or prophylactic G-CSF (17.5% versus 12.8%). No difference in survival was found.

CONCLUSIONS: Patients with the *UGT1A1**1/*1 and *1/*28 genotypes can receive high doses of irinotecan to achieve a more favourable ORR without significant adverse events.

British Journal of Cancer (2019) 120:190-195; https://doi.org/10.1038/s41416-018-0348-7

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the second most frequent neoplasm in industrialised countries. Worldwide, it is the fourth deadliest type of cancer. At initial diagnosis, around 30% of patients have inoperable or metastatic disease, and >50% of patients will receive chemotherapy at some stage of the disease.^{1,2} Current cytotoxic agents are fluoropyrimidine-based regimens in combination with oxaliplatin or irinotecan.³

Irinotecan (CPT11) inhibits topoisomerase I, an enzyme needed to separate the DNA double helix during replication and transcription.⁴ This inhibition leads to cell death and is the basis of its antineoplastic effect. Irinotecan is converted to an active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by a carbox-ylesterase, and finally metabolised through the action of uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) enzymes. The predominant enzyme is UGT1A1, the enzyme that conjugates bilirubin.⁵ In the promoter region of the *UGT1A1* gene, an extra TA dinucleotide characterises the genotype associated with Gilbert's

syndrome (chronic non-conjugated hyperbilirubinemia due to reduced UGT1A1 activity). The presence of this polymorphism (TA7) results in the UGT1A1*28 variant allele instead of the dominant allele of 6 TA repeats (UGT1A1*1). Patients who are homozygous for this variant (UGT1A1*28/*28) have less enzymatic activity and are predisposed to develop myelosuppression and severe diarrhoea when treated with irinotecan.⁶⁻¹² Premature drug suspension and dose reduction as well as administration delays due to toxicity can decrease antitumour activity. Therefore, serious toxicity rates that decrease survival can be anticipated through genetic analysis of patients prior to treatment, thereby optimising and personalising irinotecan dosing. The United States of America Food and Drug Administration recognises the importance of UGT1A1 pharmacogenetics in predicting toxicity to irinotecan and describes the association between reduced enzymatic activity of the UGT1A1*28 allele and neutropenia after drug administration in their summary of product characteristics. The recommendation is to reduce the dose of irinotecan in

¹Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ²CIBERER U-705, Barcelona, Spain; ³Medical Oncology Department, Hospital Universitario Mutua Terrassa, Terrassa, Spain; ⁴Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; ⁵Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain and ⁶Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

Correspondence: David Páez (dpaez@santpau.cat)

Received: 27 March 2018 Revised: 1 November 2018 Accepted: 6 November 2018 Published online: 26 December 2018

homozygous patients.¹³ Despite the good will of this recommendation, however, the exact dose reduction needed to limit drug toxicity is not specified for *28/*28 patients.

In a previous study (EC07/90232), we classified patients with metastatic CRC (mCRC) treated with first-line chemotherapy (FOLFIRI regimen) according to their UGT1A1 genotype. The goal was to predict, diminish, and/or avoid toxicity and improve the therapeutic effect of chemotherapy. This optimisation was based on administering different doses depending on the genotype of the UGT1A1 gene. The results showed that the recommended dose of irinotecan within the FOLFIRI regimen (180 mg/m^2) was considerably lower than the dose tolerated by UGT1A1*1/*1 and *1/*28 patients.¹⁴ These findings validated the results reported by an Italian group who performed a clinical phase I irinotecan dose-escalation trial according to the UGT1A1 genotype in mCRC patients treated with FOLFIRI.¹⁵ Based on these two studies, it has been proposed to individualise irinotecan dosing according to the UGT1A1 status so as to optimise treatment efficacy and tolerability. However, whether genotype-driven dosing will lead to differences in outcome has yet to be tested prospectively. For these reasons, the main objectives of the present randomised phase II trial were to evaluate the efficacy and safety of the FOLFIRI regimen with high-dose irinotecan (HD-FOLFIRI) in mCRC patients with a favourable UGT1A1 genotype (homozygous wild type *1/*1 and heterozygous *1/*28), while excluding patients genetically at risk for toxicity (*28/*28).

METHODS

Study design

This randomised, multicentre, open-label, non-blinded phase II study was conducted in three hospitals in Spain: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; Hospital Universitario Mutua Terrassa, Terrassa; and Hospital de Mataró, Mataró, Barcelona. The protocol was approved by the institutional review board at each participating centre. All patients signed a written informed consent form before entering the study. The clinicaltrials.gov identifier was NCT01639326.

Patient eligibility

Patients with histologically confirmed diagnosis of mCRC and measurable disease defined via RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumour; version 1.1) were enrolled. Eligibility criteria were: UGT1A1*1/*1 or *1/*28 genotypes, no prior chemotherapy for metastatic disease, age $\geq 18-<76$ years, The Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of 0 or 1, absolute neutrophil count $\geq 1500/\mu$ l, platelets $\geq 100,000/\mu$ l, creatinine clearance $<1.5\times$ the upper limit of normal (ULN), alanine transaminase and aspartate aminotransferase $<2.5\times$ the ULN ($<5\times$ the ULN in the presence of liver metastases), and total serum bilirubin ≤ 1.5 mg/dl. Patients with the UGT1A1*28/*28 genotype or carriers of other UGT1A1 alleles (*6, *36 (TA5), *37 (TA8)) were not eligible.

Randomisation and drug administration

Between June 2012 and October 2016, patients were randomised 1:1 to receive HD-FOLFIRI (experimental group) versus FOLFIRI (control group) every 2 weeks. Treatment allocation was conducted using block randomisation and stratified by centre. The Statistical Package for Social Sciences, Version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. Irinotecan doses for *UGT1A1**1/*1 and *1/*28 patients in the experimental group were 300 and 260 mg/m², respectively. These doses were chosen based on our previous phase I trial, in which a dose \geq 260 mg/m² was an independent predictor of a better response in mCRC patients with the *1/*1 or *1/*28 *UGT1A1* genotypes.¹⁴ The standard irinotecan dose of 180 mg/m² was administered in the control 191

group. Irinotecan was administered as an intravenous infusion over 90 min on days 1 and 15, with leucovorin 400 mg/m² administered concomitantly. 5-Fluorouracil was administered as a 400 mg/m² bolus immediately after the irinotecan infusion, followed by 2400 mg/m² over a 46-h continuous infusion on days 1 and 15. A cycle was 28 days. Before irinotecan was started, patients were pretreated with atropine 0.5 mg, dexamethasone 20 mg, and granisetron 1 mg. Diarrhoea was promptly treated at onset with oral intake of loperamide 4 mg, and oral intake of 2 mg for any further episodes. Granulocyte-colony stimulating factors (G-CSF) were allowed in patients who had grade \geq 3 neutropenia during previous cycles. Treatment was continued until disease progression, unacceptable toxicity, withdrawal of consent, or investigator's decision, whichever was earlier. To avoid potential bias regarding the primary objectives of the study, biological agents were not allowed.

Study objectives

The primary objectives were: (1) to determine the effect of higher doses of irinotecan on the efficacy of FOLFIRI as assessed by overall response rate (ORR); and (2) to evaluate safety according to the NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events (version 3.0). Objective tumour response was evaluated by the investigator at each centre using the modified RECIST (version 1.1); no independent review was performed. Tumour response was evaluated every 10 weeks (±2 weeks) according to the standard of care at each centre. Secondary objectives were progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). PFS was defined from the time of drug administration to the occurrence of progressive disease or death, whichever occurred first. OS was defined from the time of drug administration to the date of death. Patients not meeting the criteria by the cutoff date were censored at the last contact date.

Genotyping assays

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes by the salting-out procedure.¹⁶ The TA index of the UGT1A1 promoter was genotyped by fragment sizing. Polymerase chain reaction was performed in a total volume of 25 µl containing template DNA (80 ng/ μ l), according to Monaghan et al.¹⁷ The primers used were a forward primer that was modified by the addition of a 50 fluorescent-labelled FAM and an unlabelled reverse primer (UGT-FAM_F; 50-GTCACGTGACACAGTCAAAC-30, UGT_R 50-TTTGCTCCTGCCAGAGGTT-30). 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 the GeneMapper software version 3.5 (Applied Biosystems). Homozygous-dominant and heterozygous- and homozygousrecessive 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/TA*1, TA*1/TA*28, and TA*28/TA*28).

KRAS and *NRAS* mutations in exons 2, 3, and 4 and *BRAF* V600E mutation were assessed on tumour DNA. Genomic DNA was extracted using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as specified by the manufacturer's instructions. Mutational analysis was performed using standard PCR conditions and primers for exons 2, 3, and 4 of *KRAS* and *NRAS* genes and for exon 15 of *BRAF* gene. The thermal cycling conditions were an initial 12 min at 94°C, followed by 40 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at primer annealing temperature of 55°C, 10 min at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C. Each sample underwent capillary electrophoresis on an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

192



Fig. 1 CONSORT diagram

Statistical analysis

All data were analysed using the Statistical Package for Social Sciences, Version 19.0, software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). ORR (complete+partial response) was compared between groups using chi-square or Fisher's exact test for Count Data. Based on the report from Van Cutsem et al., the ORR was reported as 38.7% for the FOLFIRI regimen.¹⁸ An estimated difference to the order of 30% was assumed between the control and the experimental groups. The target sample size was therefore determined to be 96 patients, distributed between the two groups. The effects of the irinotecan dose on PFS and OS were estimated using the Kaplan–Meier estimator, and differences were tested using the log-rank test. For all comparisons, a two-sided *p* value <0.05 was considered significant, so the level was set at 5% (a = 0.05) and the β level was set at 20% ($\beta = 0.20$).

RESULTS

Patient population

Between June 2012 and October 2016, the *UGT1A1* genotype was analysed in mCRC patients (Fig. 1). Owing to 4 years of slower-than anticipated accrual, the trial was terminated early. Eighty-two patients harbouring *UGT1A1*1/*1* or *1/*28 genotypes were enrolled from the three centres, with 41 patients randomly

assigned to HD-FOLFIRI (experimental group) and 41 patients to FOLFIRI (control group). Three patients were not included in the final study because they did not receive the pre-planned dose for the endpoint analyses. Therefore, 79 patients were evaluated for toxicity and for response to treatment. Patient characteristics are summarised in Table 1.

Efficacy

Table 2 shows the results of the tumour response per-protocol analysis. The ORR of patients treated with HD-FOLFIRI was significantly higher than in patients treated with FOLFIRI (67.5% versus 43.6%; p = 0.001 odds ratio (OR): 1.73 [95% confidence interval (CI): 1.03–2.93]). In the intention to treat analysis, the ORR was 65.9% in the experimental group versus 43.9% in the control group (p = 0.046 OR: 1.64 [95% CI: 0.99–2.72]). There were no interactions between ORR and clinical characteristics (sex, age, ECOG, tumour location, or synchronous disease). Metastatic surgical resection was performed in 15 patients (22.5% in HD-FOLFIRI and 15.4% in FOLFIRI) and was associated with ORR (29.5% versus 5.7%; p = 0.007).

There were no interactions between ORR and *UGT1A1* or *RAS* status (Table 2). However, when BRAF mutated tumours were considered, the ORR was 41.7% in the HD-FOLFIRI group versus no objective response in the control group (p = 0.003).

Table 1. Patient characteristics							
	Overall population, $N = 79^{a}$	HD-FOLFIRI group, N = 40	Control group, $N = 39$	p Value			
UGT1A1 genoty	pe						
*1/*1	37 (46.8%)	13 (32.5%)	24 (61.5%)	0.01			
*1/*28	42 (53.2%)	27 (67.5%)	15 (38.5%)				
Age, years							
Median [range]	63 [40–77]	62 [48–75]	64 [40–77]	0.32			
Sex							
Male	49 (62%)	23 (57.5%)	26 (66.7%)	0.41			
Female	30 (38%)	17 (42.5%)	13 (33.3%)				
ECOG performar	nce status						
0	38 (48.1%)	17 (42.5%)	21 (53.8%)	0.16			
1	39 (49.4%)	23 (57.5%)	16 (41%)				
2	2 (2.5%)		2 (5.1%)				
Primary site							
Right ^b	22 (27.8%)	9 (22.5%)	13 (33.3%)	0.11			
Left	36 (45.6%)	16 (40%)	20 (51.3%)				
Rectum	20 (25.3%)	14 (35%)	6 (15.4%)				
Missing	1 (1.3%)	1 (2.5%)	_				
Metastatic devel	opment						
Synchronic	62 (78.5%)	31 (77.5%)	31 (79.5%)	0.83			
Metachronic	17 (21.5%)	9 (22.5%)	8 (20.5%)				
Number of cycle	s						
Median [range]	10.6 [3–23]	10.6 [3–23]	10.5 [4–20]	0.9			
RAS and BRAF st	tatus						
Wild type	36 (45.6%)	18 (45%)	18 (46.1%)	1.00			
RAS mutant	30 (38%)	15 (37.5%)	15 (38.5%)				
BRAF mutant	12 (15.2%)	6 (15%)	6 (15.4%)				
Unknown	1 (1.2%)	1 (2.5%)	_				

^aPatients who received at least one dose of protocol therapy ^bThree patients with transverse colon (one in the HD-FOLFIRI group and

two in the control group)

Survival

The median follow-up period was 18 months (range, 1.8–45 months). The cutoff date for PFS and OS was December 2016. At the time of analysis, 89% of the patients had progressed (90% in the experimental group and 87% in the control group). The median PFS and OS were 8.6 and 26 months in the experimental group (HD-FOLFIRI) and 8.2 and 17.6 months in the control group (FOLFIRI) (p = 0.46 hazard ratio (HR) 0.84 [95% CI: 0.52–1.35] and p = 0.74 HR 0.90 [95% CI: 0.49–1.67], respectively) (Supplementary Figure 1).

PFS was significantly associated with ECOG performance status (9.9 months in ECOG 0 versus 7.2 months in ECOG 1) and metastatic resection (15.5 months in patients who underwent surgery versus 7.8 months in the remaining cases). In terms of OS, patients with metastatic surgery achieved a better outcome than patients who did not undergone surgery (median not reached versus 18.4 months).

No statistically significant difference in PFS or OS was found between the experimental and control groups according to *RAS* or *BRAF* status. In *RAS/BRAF* wild-type tumours, the median PFS and OS were 9.8 versus 8.6 months and 29 versus 17 months, Pharmacogenetic clinical randomised phase II trial to evaluate the... D Páez et al.

Table 2. Efficacy data: response rate in the overall population and

according to UGT1A1 and RAS/BRAF genotypes							
	Response rat	Response rate					
	CR + PR (%)	SD (%)	PD (%)				
Overall population, $N = 79$	44 (55.7)	20 (25.3)	15 (19)	0.001			
HD-FOLFIRI group, $N = 40$	27 (67.5)	3 (7.5)	10 (25)				
Control group, $N = 39$	17 (43.6)	17 (43.6)	5 (12.8)				
UGT1A1 genotype							
*1/*1 and *1/*28 N = 79	44 (55.7)	20 (25.3)	15 (19)	0.147			
*1/*1 N = 37	17 (46)	13 (35.1)	7 (18.9)				
*1/*28 N = 42	27 (64.3)	7 (16.7)	8 (19)				
RAS and BRAF genotype							
Wild type $N = 36$	21 (58.3)	9 (25)	6 (16.7)	0.648			
RAS mutant $N = 30$	17 (56.7)	6 (20)	7 (23.3)				
BRAF mutant $N = 12$	5 (41.7)	5 (41.7)	2 (16.6)				

respectively. In *RAS*-mutated tumours, the median PFS and OS were 8.5 versus 8.1 months and 14 versus 17.6 months, respectively. In BRAF-mutated tumours, the median PFS and OS were 8.3 versus 7.6 months and 22 versus 11.7 months, respectively.

Table 3 shows the results of the multivariate survival analysis. Multivariate analysis showed a significant association between metastatic resection with both PFS and OS. When patients undergoing metastasectomy were excluded, *BRAF-* and *RAS-* mutated tumours had a shorter PFS and OS than wild-type tumours (Table 4).

Toxicity

Table 5 summarises the toxicity data available for the 79 patients who received treatment. The non-haematological toxicities that were frequently reported were asthenia and adverse gastrointestinal effects, such as diarrhoea and nausea/vomiting. With regard to haematological toxicities, the most frequent were anaemia, neutropenia, and leukopenia. Most of the toxicities were grade 1 or 2. No significant differences in grade 3–4 toxicities were observed between patients treated with HD-FOLFIRI or standard irinotecan dose (FOLFIRI): diarrhoea (2.5% versus 7.7%), asthenia (5% versus 5.1%), leukopenia (7.5% versus 2.6%), and neutropenia (15% versus 20.5%). Febrile neutropenia was observed in 2 patients in each arm (5% versus 5.1%). No differences were observed in serious adverse events (22.5% versus 20.5%), dose reduction (22.5% versus 28.2%), or prophylactic use of G-CSF (17.5% versus 12.8%) irrespectively of irinotecan dose.

DISCUSSION

In this study, we continued our line of research by conducting a randomised phase II trial to evaluate the efficacy and safety of the FOLFIRI regimen with HD-FOLFIRI as first-line therapy in patients with mCRC. Our findings confirmed that HD-FOLFIRI increased ORR without adding toxicity in patients with a favourable *UGT1A1* genotype (*1/*1 or *1/*28).

Previous prospective studies have shown that the recommended dose of 180 mg/m² for irinotecan in the FOLFIRI regimen is considerably lower than the dose that can be tolerated by non-*UGT1A1**28/*28 mCRC patients. In a Caucasian population study, Toffoli et al.¹⁵ established that 370 mg/m² in *1/*1 genotype and 310 mg/m² in *1/*28 genotype can be safely administered every 2 weeks in patients undergoing first-line treatment for mCRC treated with FOLFIRI. Similar maximum tolerated doses (MTD)

193

194

Table 3. Multivariate survival analysis							
	Overall population, $N = 79$	HD-FOLFIRI group, $N = 40$	Control group, $N = 39$	HR [95% CI]	p Value		
mPFS (months) [95% CI]	8.6 [8–9.2]	8.6 [7.9–9.4]	8.2 [6.8–9.6]	0.84 [0.52–1.35]	0.46		
mOS (months) [95% CI]	26 (15–37)	26 [16.7–35.2]	17.6 [1.8–33.4]	0.90 [0.49–1.67]	0.74		

Table 4. Survival analyses according to RAS and BRAF status						
	RAS and BRAF wild type, $N = 30^{a}$	RAS mutant, $N = 24^{a}$	BRAF mutant, $N = 8^{a}$			
mPFS (months) [95% CI]	8.7 [7.2–10.2]	6.7 [3.3–10.2]	4.3 [0.0–10.1]			
mOS (months) [95% CI]	25.9 [10.7–41.1]	16.3 [11.3–21.2]	13.8 [1.1–16.5]			
^a Patients undergoing metastasectomy were excluded						

Table 5. Safety data						
	Overall popula	ation	HD-FOLFIRI gr	oup	Control group)
	N = 79, N (%)		N = 40, N (%)		N = 39, N (%)	
	All	Grade 3–4	All	Grade 3–4	All	Grade 3–4
Haematological toxicity						
Anaemia	53 (67.1)	1 (1.3)	27 (67.5)	0 (0)	26 (66.7)	1 (2.6)
Leukopenia	21 (26.6)	4 (5.1)	10 (25)	3 (7.5)	11 (28.2)	1 (2.6)
Neutropenia	40 (50.6)	14 (17.7)	20 (50)	6 (15)	20 (51.3)	8 (20.5)
Febrile neutropenia	4 (5.1)	4 (5.1)	2 (5)	2 (5)	2 (5.1)	2 (5.1)
Thrombocythemia	5 (6.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (12.8)	0 (0)
Non-haematological toxicity	у					
Diarrhoea	42 (53.2)	4 (5.1)	21 (52.5)	1 (2.5)	21 (53.8)	3 (7.7)
Nausea/vomiting	35 (44.3)	0 (0)	19 (47.5)	0 (0)	16 (41)	0 (0)
Mucositis	25 (31.6)	1 (1.3)	13 (32.5)	1 (2.5)	12 (30.8)	0 (0)
Anorexia	22 (27.8)	0 (0)	8 (20)	0 (0)	14 (35.9)	0 (0)
Asthenia	54 (68.4)	4 (5.1)	26 (65)	2 (5)	28 (71.8)	2 (5.1)

(390 mg/m² in *1/*1 and 340 mg/m² *1/*28 patients) were validated the following year in a study conducted by our group.¹⁴ In an Asian population, in addition to *UGT1A1**28, the variant *UGT1A1**6 has been associated with significantly increased related toxicities. In a phase I study, Korean patients were genotyped for *UGT1A1* and stratified according to the number of defective alleles (DA): *28 and/or *6. The recommended doses were 300 (0 DA), 270 (1 DA), and 150 (2 DA) mg/m².¹⁹

The effect of adding a biologic drug to genotype-guide dosing of FOLFIRI has recently been explored. Two initial retrospective studies in Asian patients were performed by the same group of investigators. They showed that patients with mCRC with pre-therapeutic *UGT1A1* genotyping and subsequent irinotecan dose escalation can achieve a more favourable response and outcome without a significant increase in toxicity while using the FOLFIRI-plus-bevacizumab regimen.^{20,21}

More recently, Toffoli et al. published a dose-finding study in first-line mCRC patients treated with FOLFIRI plus bevacizumab to establish the MTD of irinotecan in *1/*1 and *1/*28 patients.²² Again, the MTD of irinotecan was 310 mg/m² for *UGT1A1**1/*1 patients and 260 mg/m² for *1/*28 patients. The most common dose-limiting toxicities were neutropenia (46%) and diarrhoea

(38%), but 65% of the patients treated at the MTD did not require a reduction of irinotecan. These authors also demonstrated that bevacizumab did not alter the pharmacokinetics of irinotecan.

High-dose FOLFIRI (irinotecan 260 mg/m² for *UGT1A1**1/*1 and *1/*28 genotypes and 220 mg/m² for *UGT1A1**28/*28 genotypes) combined with cetuximab has been explored in a multicentre phase II study (ERBIFORT) in patients with potentially resectable liver metastases of CRC.²³ This regimen yielded high response rates and enabled complete resection of hepatic metastases in most patients. Thanks to the irinotecan dose adaptation according to *UGT1A1* pharmacogenomics status, this treatment schedule was less toxic yet as effective as the intense combination of FOLFIRINOX plus cetuximab reported by Assenat et al. in a phase II trial.²⁴

It is now widely accepted that the dosing recommendations obtained from traditional, non-genotype-directed clinical trials should be revised in light of validated genetic markers of toxicity risk. The lack of patient stratification based on genotype might result in significant underdosing of patient subgroups. However, phase II–III clinical trials are required to determine whether these irinotecan genotype-guided doses—with or without a biological agent—imply a higher antitumour efficacy.

To our knowledge, the present work is the first randomised phase II trial to show higher antitumour efficacy when a genotype-guided dose of irinotecan is considered. It should be noted that this scheme not only increases the response rate and metastasis surgery but also improves efficacy in patients with worse prognosis, such as mutated BRAF. However, the limitations of our study should be considered. In addition to those previously mentioned concerning the early termination due to low accrual, there was an imbalance between experimental and control arms regarding the UGT1A1*1/*1 and *1/*28 genotypes and tumour sidedness, which could have favoured the experimental arm. Therefore, UGT1A1 genotype and primary tumour location should have been included as stratification factors to avoid bias that could have influenced the results in survival or disease control rates. Moreover, lower doses than in our previous phase I study were used and the FOLFIRI schedule is now given together with biologics in the first-line setting for most mCRC patients, which limits the incorporation of high doses of irinotecan regimens in clinical practice. Regarding toxicity aspects, current evidence highlights the association between dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and an increased risk of fluoropyrimidine-related toxicity. The additive value of combined UGT1A1/DPYD genotype analysis could improve the safety of irinotecan plus fluoropyrimidine combinations and should be considered in further studies using these drugs.

To conclude, the findings from our study confirm the safety of chemotherapy with HD-FOLFIRI and indicate that this strategy, although does not show an improvement in survival, improves ORR. A randomised phase II–III study is needed to validate irinotecan intensification according to *UGT1A1* pharmacogenetic status combined with a biological drug adapted to RAS status.

ACKNOWLEDGEMENTS

In addition to the authors listed on the title page, the following investigators and Institutions contributed to this study: Marta Martín-Richard, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; and Montserrat Zanui, Rosa Querol, and Pilar Lianes, Hospital de Mataró, Barcelona, Spain. We are indebted to the patients who participated in the study. We also extend our sincere thanks to Montserrat Baiget for her invaluable support for this project. This work has been financed by the Ministry of Health, Social Services and Equality (Spain) with the co-finantiation of FEDER funds (EC11-336).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.P., M.T., and A.S. designed the study. D.P., M.T., J.F.-P., A.S., A.C.V., L.C., and I.S. included and followed patients. D.P. provided clinical data. P.R. and J.S. performed sequencing experiments. D.P. performed statistical analyses. D.P. and P.R. designed the figures. A.B. supervised the study. D.P., M.T., A.S., P.R., and J.S. wrote the manuscript. All coauthors read and approved the final manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/ s41416-018-0348-7.

Ethics approval and consent to participate: All subjects gave written consent. The study protocol was approved by the hospital's ethics committee. The study was performed according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Consent for publication: All subjects gave written consent for publication: **Competing interests:** D.P. has declared scientific advisory role for Amgen, Sanofi, Merck Serono, and Servier. M.T. has declared scientific advisory role for Amgen, Sanofi, and F. Hoffmann-La Roche Ltd. A.B. has declared scientific advisory role and has participated on the speaker's bureau for Novartis, Pfizer, F. Hoffmann-La Roche Ltd, MSD, Pierre Fabre, Lilly. and Pallex. A.B. has received institutional grant support from F. Hoffmann-La Roche Ltd, Pfizer, Lilly. and Bristol Myers Squibb. The other authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J. Cancer 136, E359–E386 (2015).
- Scnall, S. & MacDonald, J. S. Gastrointestinal cancers: Colorectal carcinoma, In Manual of Oncologic Therapeutics 3rd edn. (eds McDonald, J. S., Haller, D. G. & Mayer, R. J.) (Lippincott Company, Michigan, 2004).
- Tournigand, C. et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. J. Clin. Oncol. 22, 229–237 (2004).
- Kunimoto, T. et al. Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy-camptothec in, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer Res.* 47, 5944–5947 (1987).
- Iyer, L. 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. 101, 847–854 (1998).
- Marcuello, E. et al. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. Br. J. Cancer 91, 678–682 (2004).
- Ando, Y. et al. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res.* 60, 6921–6926 (2000).
- Innocenti, F. et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. J. Clin. Oncol. 22, 1382–1388 (2004).
- Rouits, E. et al. Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecaninduced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. *Clin. Cancer Res.* 10, 5151–5159 (2004).
- Toffoli, G. et al. 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 (2006).
- Hoskins, J. M., Goldberg, R. M., Qu, P., Ibrahim, J. G. & McLeod, H. L. UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1290–1295 (2007).
- Kim, T. W. & Innocenti, F. Insights, challenges, and future directions in irinogenetics. *Ther. Drug Monit.* 29, 265–270 (2007).
- United States Food and Drug Administration: Camptosar label. http://www.fda. gov/cder/foi/label/2005/020571s024,027,028lbl.pdf
- Marcuello, E. et al. A genotype-directed phase I-IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. Br. J. Cancer 105, 53–57 (2011).
- Toffoli, 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. 28, 866–871 (2010).
- Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215 (1998).
- Monaghan, G., Ryan, M., Seddon, R., Hume, R. & Burchell, B. Genetic variation in bilirubin UPD-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 347, 578–581 (1996).
- Van Cutsem, E. et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 360, 1408–1417 (2009).
- Kim, K. P. et al. A phase I study of UGT1A1 *28/*6 genotype-directed dosing of irinotecan (CPT-11) in Korean patients with metastatic colorectal cancer receiving FOLFIRI. Oncology 88, 164–172 (2015).
- Lu, C. Y. et al. Prognostic advantage of irinotecan dose escalation according to uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) genotyping in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab combined with 5-fluorouracil/leucovorin with irinotecan in a first-line setting. *Transl. Res.* 164, 169–176 (2014).
- Lu, C. Y. et al. Clinical implication of UGT1A1 promoter polymorphism for irinotecan dose escalation in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab combined with FOLFIRI in the first-line setting. *Transl. Oncol.* 8, 474–479 (2015).
- Toffoli, G. et al. Genotype-guided dosing study of FOLFIRI plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 23, 918–924 (2017).
- Phelip, J. M. et al. High resectability rate of initially unresectable colorectal liver metastases after UGT1A1-adapted high-dose irinotecan combined with LV5FU2 and cetuximab: a multicenter phase II study (ERBIFORT). Ann. Surg. Oncol. 23, 2161–2166 (2016).
- Assenat, E. et al. Cetuximab plus FOLFIRINOX (ERBIRINOX) as first-line treatment for unresectable metastatic colorectal cancer: a phase II trial. *Oncologist* 16, 1557–1564 (2011).
- Henricks, L. M., Opdam, F. L., Beijnen, J. H., Cats, A. & Schellens, J. H. M. DPYD genotype-guided dose individualization to improve patient safety of fluoropyrimidine therapy: call for a drug label update. *Ann. Oncol.* 28, 2915–2922 (2017).



Supplementary Figure 1. Kaplan-Meier plots of (A) progression-free survival and (B) overall survival

2.2. Estudi sobre la identificació de variants somàtiques de resistència als agents anti-EGFR

En aquest apartat s'hi inclou la publicació que es mostra a continuació (darrer article de la tesi):

ARTICLE 6

Novel somatic genetic variants as predictors of resistance to EGFR-targeted therapies in metastatic colorectal cancer patients

En procés de publicació

Pau Riera^{1,2,3,4}, Benjamín Rodríguez-Santiago^{1,4,5}, Adriana Lasa^{1,4,5}, Lidia González-Quereda^{1,4,5}, Berta Martín⁶, Juliana Salazar⁷, Ana Sebio⁶, Anna C. Virgili⁶, Jordi Minguillón^{1,4,5,8}, Cristina Camps^{1,3,4}, Jordi Surrallés^{1,4,5,8}, David Páez^{5,6}

¹Servei de Genètica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

²Servei de Farmàcia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

³Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Espanya

⁴Unitat Mixta de Recerca en Medicina Genòmica UAB-IR Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Espanya

⁶Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espanya

⁷Laboratori d'Oncologia Mèdica Translacional, Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau (IIB-Sant Pau), Barcelona, Espanya

⁸Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Espanya

Novel somatic genetic variants as predictors of resistance to EGFR-targeted therapies in metastatic colorectal cancer patients

Pau Riera^{1,2,3,4*}, Benjamín Rodríguez-Santiago^{1,4,5}, Adriana Lasa^{1,4,5}, Lidia González-Quereda^{1,4,5}, Berta Martín⁶, Juliana Salazar⁷, Ana Sebio⁶, Anna C. Virgili⁶, Jordi Minguillón^{1,4,5,8}, Cristina Camps^{1,3,4}, Jordi Surrallés^{1,4,5,8}, David Páez^{5,6*}

¹Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

²Pharmacy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

³Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain.

⁴Join Research Unit on Genomic Medicine UAB-IR Sant Pau, Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

⁵ISCIII Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain.

⁶Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

⁷Translational Medical Oncology Laboratory. Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau (IIB-Sant Pau), Spain.

⁸Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

Running title

Genetic markers of resistance to anti-EGFR therapy

Keywords

Genetic variants, anti-EGFR monoclonal antibodies, colorectal cancer, predictive biomarkers, case-control study

Financial support

This work was supported by the Asociación Española Contra el Cáncer and the Instituto de Salud Carlos III (CM18/00207 to Pau Riera). Jordi Surrallés is supported by ICREA Academia Programme.

*Corresponding authors

David Páez, MD, PhD Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Carrer Sant Quintí, 89, 08041, Barcelona, Spain E-mail: dpaez@santpau.cat Phone: +34 935535638 Fax: +34 935535769 Pau Riera, PharmD

Genetics Department /Pharmacy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Carrer Sant Quintí, 89, 08041, Barcelona, Spain E-mail: priera@santpau.cat Phone: +34 935537464 Fax: +34 93553747

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Ana Sebio reports receiving travel grants from Merck, Amgen, Sanofi and Roche. Anna C. Virgili has honoraria from Speakers Bureau of Amgen, Sanofi and Kyowa Kirin, declares a scientific advisory role for Roche and Amgen, and reports receiving travel grants from Merck, Roche, Amgen, Sanofi, MSD and Servier. David Páez has honoraria from Speakers Bureau of Merck Serono and F. Hoffmann-La Roche Ltd, and declares a scientific advisory role for Amgen and Sanofi. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

STATEMENT OF TRANSLATIONAL RELEVANCE

Anti-EGFR monoclonal antibodies are effective treatment for many patients with *RAS* wild-type metastatic colorectal cancer but unfortunately, around 40% of patients do not benefit from these drugs. It has been suggested that genes other than *RAS* may be predictors of primary resistance to anti-EGFR agents. We performed next-generation sequencing in somatic and germline DNA samples using a customized panel including 43 EGFR-related genes. Our findings highlight how novel somatic variants located in insulin-related genes or LRIG family genes could confer resistance to anti-EGFR agents. Identifying these novel mechanisms of resistance to EGFR blockade is paramount to guide subsequent studies in this field and to better characterize those patients resistant to anti-EGFR blockade despite harboring *RAS/BRAF* wild-type tumors.

ABSTRACT

Background

About 40% of *RAS/BRAF* wild-type metastatic colorectal cancer (mCRC) patients undergoing anti-EGFRbased therapy have poor outcomes. Treatment failure is not only associated with poorer prognosis but higher healthcare costs. Our aim was to identify novel somatic genetic variants in the primary tumor and assess their effect on anti-EGFR response.

Patients and methods

Tumor (somatic) and blood (germline) DNA samples were obtained from two well-defined cohorts of mCRC patients, those sensitive and those resistant to EGFR blockade. Genetic variant screening of 43 EGFR-related genes was performed using targeted next-generation sequencing (NGS). Relevant clinical data were collected through chart review to assess genetic results.

Results

Among 61 patients, 38 were sensitive and 23 were resistant to treatment. We identified eight somatic variants that predicted non-response. Three were located in insulin-related genes (I668N and E1218K in *IGF1R*, T1156M in *IRS2*) and three in genes belonging to the LRIG family (T152T in *LRIG1*, S697L in *LRIG2* and V812M in *LRIG3*). The remaining two variants were found in *NRAS* (G115Efs*46) and *PDGFRA* (T301T). We did not identify any somatic variants related to good response.

Conclusions

This study provides evidence that novel somatic genetic variants along the EGFR-triggered pathway could modulate the response to anti-EGFR drugs in mCRC patients. It also highlights the influence of insulinrelated genes and *LRIG* genes on anti-EGFR efficacy. Our findings could help characterize patients who are resistant to anti-EGFR blockade despite harboring *RAS/BRAF* wild-type tumors.

INTRODUCTION

The epidermal growth factor receptor (EGFR), usually overexpressed in colorectal cancer (CRC), plays a pivotal role in tumor growth and progression (1,2). Multiple proteins are involved in the EGFR signaling pathway, including other receptors, ligands, intracellular downstream effectors and regulators (2–4). In the metastatic setting, anti-EGFR targeted antibodies, cetuximab and panitumumab, are commonly used, but response rates are variable (5,6). Several somatic mutations along the EGFR-triggered pathway, such as activating *RAS* mutations and the *BRAF* V600E mutation, are validated predictors of primary resistance to anti-EGFR-based therapies (7–12). Other promising biomarkers of non-response are *PIK3CA* or *PTEN* mutations, although the level of evidence is lower (13,14). In addition, some studies have observed that right-sided and mesenchymal tumors show worse outcomes to EGFR-targeted therapies regardless of *RAS* mutation status (15–18). As about 40% of *RAS*-wild-type patients undergoing anti-EGFR therapy do not benefit from this treatment (19,20), we hypothesized that other mutations in the EGFR pathway could act as additional mechanisms of resistance to EGFR blockade.

Next-generation sequencing (NGS) technologies have revolutionized research in cancer genomics. NGS allows for the simultaneous analysis from several genes to complete genomes with higher sensitivity and cost-effectiveness than the previously used Sanger sequencing methods. In addition, its high sensitivity has detected somatic variants in the tumor at a low allelic fraction.

In this study we used NGS technology to analyze the exons and intron boundaries of 43 EGFR pathwayrelated genes. We genotyped both germline and tumor DNA samples to optimize the identification of somatic genetic variants. The main objective was to identify novel genetic variants in two cohorts of extreme responder patients with *RAS* wild-type metastatic CRC (mCRC). Extreme responders were either primary resistant or highly sensitive to anti-EGFR therapy. We also aimed to increase knowledge of EGFRrelated genes as this could lead to the identification of new biomarkers of anti-EGFR response and promising therapeutic targets for mCRC.

PATIENTS AND METHODS

Patient population

We conducted this case-control study with mCRC patients from the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP, Barcelona, Spain). We retrospectively analyzed patients who underwent any anti-EGFR-containing regimen between 2012 and 2017. All tumor samples had been previously classified as *RAS* wild-type using

134

the *therascreen* KRAS test (Qiagen, Hilden, Germany) or the TruSight Tumor 15 panel (Illumina, San Diego, CA, USA).

Two well-defined cohorts of patients were studied (patients who were resistant *versus* patients who were sensitive to anti-EGFR drugs). The first CT-scan reassessment was performed 2-3 months after treatment. Patients showing disease progression in the first CT-scan were classified as resistant. Conversely, those achieving a complete or partial response at this time point, or disease stabilization lasting at least 6 months were considered sensitive. Response to anti-EGFR treatment was assessed according to RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) v1.1 (21). An Eastern cooperative oncology group (ECOG) performance status ≤ 2 and age ≥ 18 was required for inclusion in the study. We excluded patients for whom tumor DNA was not available.

Clinical data collected from hospital records included gender, age, performance status (PS) according to the ECOG scale, primary tumor location, number of metastatic sites, resection of the primary tumor, previous lines of chemotherapy, type of anti-EGFR administered, and concomitant chemotherapy. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor tissues were available from all patients. Germline DNA was also available for 92% of the patients. The study was approved by the Institutional Ethics Committee at HSCSP and all study participants gave written informed consent.

Gene selection and primer design

Two custom panels were created, one for blood samples and the other for tumor samples. Custom amplicon oligonucleotides were designed for each region of interest following the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA). As FFPE tumor DNA is more degraded and fragmented than germline DNA, amplicons of less length are needed to achieve good quality sequencing reads. The panel for germline DNA therefore contained 771 amplicons with an average size of 250-300 base pairs (bp) whereas the panel for tumor DNA contained 1,124 amplicons of ~175 bp. Both panels included the 43 candidate genes related to the EGFR pathway and had an expected coverage >99% for all the coding regions (~200,000 bp). These genes mainly encoded receptors, ligands, intracellular downstream effectors or proteins involved in EGFR turnover. We included the most relevant genes of the pathway and also those related to anti-EGFR response in previous studies (3,22,23). Table 1 provides information about the selected genes and the function of their corresponding encoded proteins.

Isolation and quantification of DNA

Germline DNA was automatically extracted from peripheral whole-blood samples (Autopure, Qiagen, Hilden, Germany). Tumor DNA was extracted from CRC tissue samples using the GeneRead DNA FFPE Kit

135

(Qiagen, Hilden, Germany). This kit purifies tumor DNA by removing artificial C>T mutations. DNA concentrations were measured using Qubit[™] dsDNA HS Assay Kits with the Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Library preparation, sequencing runs and NGS analysis

Library preparation was carried out following the manufacturer's instructions (TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep, Illumina, San Diego, CA, USA). We used ~15 ng of germline DNA or ~100 ng of tumor DNA, due to the low quality of DNA from FFPE samples. Library sizes were determined using QIAxcel DNA Screening Gel Cartridge on QIAxcel capillary electrophoresis system (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Library concentrations were measured with Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All libraries were subsequently diluted and pooled equimolarly.

Germline DNA sequencing was performed on a MiSeq platform (Illumina) to obtain 150-bp paired-end reads. Samples were sequenced using the MiSeq v2-300 Reagent Kit. To achieve higher coverage, tumor DNA sequencing was performed on a NextSeq 500 platform (Illumina), also obtaining 150-bp paired-end reads. Samples were sequenced using the NextSeq Mid v2-300 Reagent Kit.

Sequence reads were aligned against the human reference genome (version GRCh37) using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA, version 0.7.12) (24). Single nucleotide and indel variants were called by means of the Mutect2 tool (version 4.0.12.0) that can use both input tumor and germline data. It can also manage high coverage data from tumor sequences (25). Alignment and calling were performed following software development best practices (Broad Institute, Cambridge, MA, USA). After alignment, a panel of normal variation (PoN) obtained from germline DNA sequencing data was used to exclude rare germline variants and individual-specific artifacts. The number of somatic variants per patient was calculated by filtering tumor DNA sequencing data with the PoN. We excluded variants located in intronic, intergenic or UTR regions, and also polymorphisms (GnomAD allele frequency >0.001). Results were inspected using the Integrative Genomics Viewer (IGV). Resistant patients whose tumors harbored a known non-response mutation (in KRAS, NRAS or BRAF V600E) of over 5% of mutated clones were excluded. Finally, only those variants that were over 1% of mutant clones in all patients harboring them were kept for further examination. COSMIC cancer database v91 was used to assess whether the candidate somatic variants identified had been previously described (26). Additional functional annotation of variants was performed using ANNOVAR (27). Variant analyses and interpretation were performed using Alamut® Visual v2.15 software (SOPHiA GENETICS, Boston, MA, USA) and the Cancer Genome Interpreter platform (Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain), which is publicly available at http://www.cancergenomeinterpreter.org (28).

Statistical analyses

We used the chi-square test to compare the baseline clinical characteristics between the two cohorts of patients and Fisher's exact test to compare the prevalence of alterations between sensitive and resistant patients. The Mann-Whitney test was carried out to compare the number of somatic genetic variants between sensitive and resistant patients. All statistical tests were performed using R software (version 3.3.2.) and IBM SPSS[®] statistics software (version 25). A 95% confidence level was set for all tests of significance.

RESULTS

Patient population

A total of 168 mCRC patients were treated with anti-EGFR-containing regimens between 2012 and 2017. Sixty-one of the patients (38 sensitive and 23 resistant to EGFR blockade) fulfilled the inclusion criteria and quality of tumor DNA was good (Figure 1). Regarding treatment, 33 patients received cetuximab and 28 received a panitumumab-containing regimen, with no significant differences between the two cohorts (p = 0.814). There were more females and more patients with worse ECOG PS in the non-responder cohort (p < 0.001 and p = 0.013, respectively). No differences were observed between the two cohorts in respect to primary tumor location (p = 0.634). A higher percentage of patients in the sensitive group received the anti-EGFR-containing regimen as first-line treatment (47.4% in the sensitive group *vs* 26.1% in the resistant group). Baseline clinical features are described in Table 2.

Genetic analyses

The mean target coverage for tumor samples was 3,600, achieving 100x or greater coverage for 88% of the bases. For germline samples, the mean target coverage was 640, achieving 30x or greater coverage for 87% of the bases. As shown in Figure 2, we identified 46,512 somatic genetic variants. We found a mean of 707 variants per sample in sensitive patients and 854 variants per sample in resistant patients (p = 0.19).

KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA assessment and patient selection

Five anti-EGFR resistant patients were finally excluded from the analyses because a validated mutation of non-response (in *RAS* or *BRAF*^{V600E}) was detected at an allelic fraction over 5%. One of the five patients (P11) had the *KRAS* G12C mutation. The remaining four patients (P3, P39, P55 and P64), all with right-sided tumors, presented the *BRAF* V600E mutation. In one patient (P64) this mutation had not been previously detected by Sanger. Patient P55 presented the mutations *BRAF* V600E and *NRAS* G13D at a frequency over 5% for both mutations. As for patient P39, *BRAF* V600E and *KRAS* Q61L mutations coexisted, although the

allelic fraction for *KRAS* Q61L was only 0.8%. No patients harbored somatic mutations in both *KRAS* and *NRAS* genes. One sensitive patient (P28) who underwent FOLFIRI plus panitumumab as a second-line treatment presented the *KRAS* A146V mutation at an allelic fraction of 5.0%. This mutation had not been identified previously. Table 3 and Supplementary material S1 show all the somatic mutations found in these genes and their allelic fractions.

We also analyzed *PIK3CA* mutations and *BRAF* mutations other than V600E. Two patients, one resistant (P63) and one sensitive (P66), presented the *PIK3CA* E545K mutation, with an allelic fraction of 10.1 % and 6.1 %, respectively. In addition, two *BRAF* mutations previously related to favorable prognosis (D594N and G466A) (29–32) were identified at around 20% in two sensitive patients (P45 and P59). Table 3 shows all the findings concerning *BRAF* and *PIK3CA* assessment.

Identification of novel genetic variants related to anti-EGFR response

We identified eight potential somatic variants of non-response at a frequency of over 1% in 12 out of 18 (66.7%) non-responder patients (Table 4). In 8 cases two or more of these variants coexisted. Mutant allele fractions differed substantially among the patients (Supplementary material S2). No potential resistance variants were found in 6 non-responders. Additionally, no variants of good response were identified.

Three of the eight variants detected were missense variants located in insulin-related genes, such as *IGF1R* I668N and E1218K or *IRS2* T1156M. Three others were found in genes belonging to the LRIG family: *LRIG1* (T152T), *LRIG2* (S697L), and *LRIG3* (V812M). The remaining two variants were found in *NRAS* (G115Efs*46) and *PDGFRA* (T301T). All variants were non-synonymous except for *LRIG1* and *PDGFRA* variants. According to Alamut software, these two variants may create a novel cryptic acceptor site identifiable by the splicing complex.

DISCUSSION

We sought to investigate the existence of novel somatic variants in EGFR-related genes as predictive markers of response to anti-EGFR antibodies. We found eight potential somatic variants that could explain the lack of response to these agents, highlighting the variants in the insulin-related and LRIG family genes. In contrast, we did not find somatic variants related to good response.

Accurate identification of somatic variants is challenging. In the past, Sanger sequencing was the only technique available to detect somatic mutations in tumor samples. Currently, NGS technology is replacing

138

Sanger method as it allows the sequencing of hundreds of genes simultaneously and shows high sensitivity (33). These advantages have enabled the detection of concomitant mutations in several genes of interest, including low-allele-fraction variants not previously found by Sanger sequencing. Mutant allele fractions may influence the response to targeted therapies. In this sense, the mutant allele fraction that determines anti-EGFR response continues to be debated. A major point of discussion is whether the optimal threshold of the *RAS* mutant allele fraction to identify patients likely to benefit from anti-EGFR drugs should be 1% or 5%. We used a threshold of 5% as it has been reported that reducing the threshold to 1% does not improve outcomes (34,35). We found one sensitive patient (P28) who harbored the A146V *KRAS* mutation at 5%. The good response in this patient could be related to the chemotherapy scheme concomitantly given with the anti-EGFR drug. We also found a novel somatic variant of non-response in the *NRAS* gene. *NRAS* variants routinely tested prior to anti-EGFR initiation are normally missense mutations (≈95%) (7). Conversely, the new *NRAS* variant we found, G115Efs*46, is a truncating mutation. It consists of a deletion located in exon 4 that leads to a premature stop codon and a truncated protein (26). The Cancer Genome Interpreter predicts that it is a passenger mutation with a highly deleterious effect, but its role in anti-EGFR resistance should be further explored before a solid conclusion can be reached.

Similarly to *RAS* genes, *BRAF* and *PIK3CA* are driver oncogenes involved in colorectal carcinogenesis. It has been reported that *BRAF* mutations implying a high kinase activity (such as V600E) confer a poor prognosis, whereas those implying a low kinase activity (such as those located in codons 594 and 596) confer a favorable prognosis (29–31). Our results reinforce the differential prognostic role of *BRAF* mutations as we only detected mutations implying a high kinase activity (V600E) in patients who were resistant to treatment, and we only found mutations causing low kinase activity in sensitive patients (D594N and G466A). As for location, several studies show that V600E mutations are more common in right colon cancers (36,37). Accordingly, we only found V600E mutations in right-sided tumors. In contrast, we found D594N and G466A mutations in left-sided tumors. This differential distribution of *BRAF* mutations may affect the prognosis of left-sided tumors vs right-sided tumors and define a clinically distinct subtype of CRC with an excellent prognosis. In addition, one resistant patient harbored *NRAS* and *BRAF* mutations over 5%, indicating that they are not always mutually exclusive. Regarding *PIK3CA*, the role of its activating mutations on anti-EGFR response remains under discussion (14,38,39). In the present study, two patients, one responder and one non-responder, harbored the *PIK3CA* E545K mutation with an allelic fraction over 5%. Our results therefore strengthen the notion that this mutation is not critical for anti-EGFR response.

Our findings suggest some insulin-related genes (*IGF1R* and *IRS2*) have a substantial influence on anti-EGFR outcomes. A growing amount of evidence indicates that the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) is frequently overexpressed in CRC and that its activation is related to poorer outcomes (40). IGF1R is a

tyrosine kinase receptor that can also activate the RAS pathway and promote proliferation of cancer cells. Furthermore, it has been reported that a functional IGF1R receptor is required for EGFR-mediated growth and transformation (41). Consequently, in the same way that activating mutations in the EGFR receptor potentiate the RAS pathway, IGF1R activating mutations could play a similar role, with worse responses to EGFR-targeted therapies. To our knowledge, this is the first time that the missense IGF1R variants identified in our study (I668N and E1218K) have been related to anti-EGFR resistance. The variant E1218K has been previously described in a patient with leiomyosarcoma (42), but the variant I668N has not been reported previously (26). We also identified a missense variant in the IRS2 gene (T1156M) associated with a lack of response to anti-EGFR drugs. Interestingly, Bertotti et al demonstrated that IRS2 knockdown reduced sensitivity to cetuximab (23). Truncating variants in this gene could therefore imply a lack of response to this drug. In our study, we found a missense variant in this gene harbored by three non-responders (Table 4). This variant had already been reported in a patient with colon cancer (42). Like EGFR and IGF1R signaling pathways, the PDGFRA pathway is also involved in cell proliferation and migration (43). The plateletderived growth factor receptor A (PDGFRA) is a tyrosine kinase receptor that is frequently mutated in gastrointestinal stromal tumors (44). In the present study, we found a splicing variant located in PDGFRA. Mutations in this gene have been correlated with a lack of response to anti-EGFR agents, although evidence is still scarce. In this line, Bertotti et al described novel missense mutations located in/near the catalytic domain as mechanisms of anti-EGFR resistance (23).

We also found that *LRIG1-3* genes could play a role in anti-EGFR response. Little is known about the role of somatic variants in these genes in responsiveness to anti-EGFR agents. Several studies have demonstrated that LRIG1 acts as a tumor suppressor by down-regulating ErbB and Met receptors, including EGFR (45–49). In contrast, no definitive conclusions concerning the contribution of LRIG2 and LRIG3 to EGFR levels can be drawn as results reported to date are contradictory (45,50–53). Gelfo *et al* found that a lower LRIG1 expression predicted resistance to cetuximab therapy in CRC xenopatients, an effect that was not observed with LRIG3 (54). In our study, one somatic variant in each *LRIG* gene was significantly associated with resistance to anti-EGFR blockade. Interestingly, the alteration located in *LRIG1* had already been described in two cancer patients, one with a colon adenocarcinoma and the other with bladder cancer (55). Conversely, the variants found in *LRIG2* and *LRIG3* have not been previously reported (26).

We wish to emphasize that no somatic variants related to good response were found in our study. This result is not striking as resistant mCRC phenotypes tend to be more heterogeneous than sensitive phenotypes (56). Our results are in keeping with most papers to date describing mutations of non-response to anti-EGFR antibodies (57–59). Only three of the eight somatic variants identified had been previously described (26), strengthening the extreme phenotype approach as a useful strategy to identify rare

140

alterations. However, our study has some limitations. First, the two cohorts of patients are relatively small. The low number of patients showing an extremely poor response could be the result of good selection by clinicians after assessing *RAS* and *BRAF* mutational status and considering patient's characteristics. Second, patients were included over a five-year period (2012-2017), during which time scientific knowledge regarding *RAS* and *BRAF* mutations increased significantly. This could explain why some patients with a *BRAF* V600E mutation already detected in the first assessment received an anti-EGFR agent. Larger, prospective and functional studies are needed to confirm the validity of our findings.

In conclusion, this study shows that novel genetic variants along the EGFR-triggered pathway could affect the response to anti-EGFR drugs in mCRC patients. Our findings may help to better identify patients who are resistant to anti-EGFR drugs despite harboring *RAS/BRAF*-wild-type tumors. The eight genetic variants predictive of non-response could help guide clinical decision-making and improve outcomes by tailoring anti-EGFR drugs.

REFERENCES

- 1. Saif MW. Colorectal cancer in review: the role of the EGFR pathway. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19(3):357–69.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; 366(1):2–16.
- 3. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7(7):505–16.
- Avraham R, Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(2):104–17.
- Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, *et al.* Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; 369(11):1023–34.
- Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, *et al*. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360(14):1408–17.
- Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, *et al.* Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. *J Clin Oncol* 2015; 34(2):179–85.
- Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* 2015; 26(1):13–21.

141
- 9. Ali M, Kaltenbrun E, Anderson GR, Stephens SJ, Arena S, Bardelli A, *et al.* Codon bias imposes a targetable limitation on KRAS-driven therapeutic resistance. *Nat Commun* **2017**; 8:15617.
- Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, *et al.* Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2015; 51(5):587–94.
- 11. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, *et al.* Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* **2015**; 112(12):1888–94.
- 12. van Brummelen EMJ, de Boer A, Beijnen JH, Schellens JHM. *BRAF* Mutations as Predictive Biomarker for Response to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies. *Oncologist* **2017**; 22(7):864–72.
- Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* 2014; 53(7):852–64.
- 14. Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, Hanson JE, O'Callaghan CJ, Marginean C, *et al.* PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer--results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clin Cancer Res* **2014**; 20(3):744–53.
- 15. Arnold D, Lueza B, Douillard J-Y, Peeters M, Lenz H-J, Venook A, *et al.* Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol* **2017**; 28(8):1713–29.
- 16. Moretto R, Cremolini C, Rossini D, Pietrantonio F, Battaglin F, Mennitto A, *et al.* Location of Primary Tumor and Benefit From Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies in Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist* **2016**; 21(8):988–94.
- 17. De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LPMH, *et al*. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* **2013**; 19(5):614–8.
- Linnekamp JF, Wang X, Medema JP, Vermeulen L. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: a case for molecular disease subtypes. *Cancer Res* 2015; 75(2):245–9.
- 19. Khattak MA, Martin H, Davidson A, Phillips M. Role of first-line anti-epidermal growth factor receptor therapy compared with anti-vascular endothelial growth factor therapy in advanced colorectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Colorectal Cancer* **2015**; 14(2):81–90.
- 20. Lee MS, Kopetz S. Current and Future Approaches to Target the Epidermal Growth Factor Receptor and Its Downstream Signaling in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* **2015**; 14(4):203–18.
- 21. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid

tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer 2009; 45(2):228-47.

- 22. Bertotti A, Sassi F. Molecular Pathways: Sensitivity and Resistance to Anti-EGFR Antibodies. *Clin Cancer Res* **2015**; 21(15):3377–83.
- 23. Bertotti A, Papp E, Jones S, Adleff V, Anagnostou V, Lupo B, *et al.* The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nature* **2015**; 526(7572):263–7.
- 24. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**; 25(14):1754–60.
- 25. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, *et al.* Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* **2013**; 31(3):213–9.
- Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, *et al.* COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer.
 Nucleic Acids Res 2019; 47(D1):D941–7.
- 27. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* **2010**; 38(16):e164.
- 28. Tamborero D, Rubio-Perez C, Deu-Pons J, Schroeder MP, Vivancos A, Rovira A, *et al.* Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. *Genome Med* **2018**; 10(1):25.
- 29. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY, *et al.* ^{Non-V600} *BRAF* Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* **2017**; 35(23):2624–30.
- 30. Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A, Antoniotti C, Moretto R, Berenato R, *et al.* BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann Oncol* **2015**; 26(10):2092–7.
- 31. Yao Z, Yaeger R, Rodrik-Outmezguine VS, Tao A, Torres NM, Chang MT, *et al.* Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature* **2017**; 548(7666):234–8.
- Dankner M, Rose AAN, Rajkumar S, Siegel PM, Watson IR. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene* 2018; 37(24):3183–99.
- Sabour L, Sabour M, Ghorbian S. Clinical Applications of Next-Generation Sequencing in Cancer Diagnosis. Vol. 23, Pathology and Oncology Research. Springer Netherlands; 2017. p. 225–34.
- Santos C, Azuara D, Viéitez JM, Páez D, Falcó E, Élez E, *et al.* Phase II study of high-sensitivity genotyping of *KRAS*, *NRAS*,
 BRAF and *PIK3CA* to ultra-select metastatic colorectal cancer patients for panitumumab plus FOLFIRI: the ULTRA trial. *Ann Oncol* 2019; 30(5):796-803.
- 35. Vidal J, Bellosillo B, Santos Vivas C, García-Alfonso P, Carrato A, Cano MT, *et al.* Ultra-selection of metastatic colorectal cancer patients using next-generation sequencing to improve clinical efficacy of anti-EGFR therapy. *Ann Oncol* **2019**; 30(3):439–46.
- 36. Isnaldi E, Garuti A, Cirmena G, Scabini S, Rimini E, Ferrando L, et al. Clinico-pathological associations and concomitant

mutations of the RAS/RAF pathway in metastatic colorectal cancer. J Transl Med 2019; 17(1):137.

- 37. Salem ME, Weinberg BA, Xiu J, El-Deiry WS, Hwang JJ, Gatalica Z, *et al.* Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers. *Oncotarget* **2017**; 8(49):86356–68.
- Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, De Roock W, Biesmans B, Claes B, *et al.* PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(9):3184–8.
- 39. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, *et al.* Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* **2010**; 11(8):753–62.
- 40. Lee J, Jain A, Kim P, Lee T, Kuller A, Princen F, *et al.* Activated cMET and IGF1R-driven PI3K signaling predicts poor survival in colorectal cancers independent of KRAS mutational status. *PLoS One* **2014**; 9(8):e103551.
- 41. Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C, Rubin R, *et al*. A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* **1994**; 14(7):4588–95.
- 42. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, *et al.* Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* **2017**; 23(6):703–13.
- Hayashi Y, Bardsley MR, Toyomasu Y, Milosavljevic S, Gajdos GB, Choi KM, *et al.* Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Regulates Proliferation of Gastrointestinal Stromal Tumor Cells With Mutations in KIT by Stabilizing ETV1.
 Gastroenterology 2015; 149(2):420-32.e16.
- 44. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, *et al.* PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* **2003**; 299(5607):708–10.
- 45. Rafidi H, Mercado F, Astudillo M, Fry WHD, Saldana M, Carraway KL, *et al.* Leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing protein-1 (Lrig1) negative regulatory action toward ErbB receptor tyrosine kinases is opposed by leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing protein 3 (Lrig3). *J Biol Chem* **2013**; 288(30):21593–605.
- 46. Faraz M, Herdenberg C, Holmlund C, Henriksson R, Hedman H. A protein interaction network centered on leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1) regulates growth factor receptors. *J Biol Chem* **2018**; 293(9):3421–35.
- 47. Wang Y, Poulin EJ, Coffey RJ. LRIG1 is a triple threat: ERBB negative regulator, intestinal stem cell marker and tumour suppressor. *Br J Cancer* **2013**; 108(9):1765–70.
- Wong VWY, Stange DE, Page ME, Buczacki S, Wabik A, Itami S, *et al.* Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat Cell Biol* 2012; 14(4):401–8.
- 49. Powell AE, Wang Y, Li Y, Poulin EJ, Means AL, Washington MK, *et al.* The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* **2012**; 149(1):146–58.

- 50. Wang B, Han L, Chen R, Cai M, Han F, Lei T, *et al.* Downregulation of LRIG2 expression by RNA interference inhibits glioblastoma cell (GL15) growth, causes cell cycle redistribution, increases cell apoptosis and enhances cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Biol Ther* **2009**; 8(11):1018–23.
- 51. Yang H-K, Chen H, Mao F, Xiao Q-G, Xie R-F, Lei T. Downregulation of LRIG2 expression inhibits angiogenesis of glioma via EGFR/VEGF-A pathway. *Oncol Lett* **2017**; 14(4):4021–8.
- 52. Wu X, Hedman H, Bergqvist M, Bergström S, Henriksson R, Gullbo J, *et al.* Expression of EGFR and LRIG proteins in oesophageal carcinoma with emphasis on patient survival and cellular chemosensitivity. *Acta Oncol* **2012**; 51(1):69–76.
- 53. Guo D, Yang H, Guo Y, Xiao Q, Mao F, Tan Y, *et al*. LRIG3 modulates proliferation, apoptosis and invasion of glioblastoma cells as a potent tumor suppressor. *J Neurol Sci* **2015**; 350(1–2):61–8.
- 54. Gelfo V, Pontis F, Mazzeschi M, Sgarzi M, Mazzarini M, Solmi R, *et al.* Glucocorticoid Receptor Modulates EGFR Feedback upon Acquisition of Resistance to Monoclonal Antibodies. *J Clin Med* **2019**; 8(5):600.
- 55. Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, Qian ZR, Cohen O, Nishihara R, *et al*. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Rep* **2016**; 15(4):857–65.
- 56. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**; 15(2):81-94.
- 57. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol* **2016**; 8(1):57–84.
- 58. Bignucolo A, De Mattia E, Cecchin E, Roncato R, Toffoli G. Pharmacogenomics of Targeted Agents for Personalization of Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* **2017**; 18(7):1522.
- 59. Cremolini C, Morano F, Moretto R, Berenato R, Tamborini E, Perrone F, *et al.* Negative hyper-selection of metastatic colorectal cancer patients for anti-EGFR monoclonal antibodies: the PRESSING case–control study. *Ann Oncol* **2017**; 28(12):3009–14.

Ligands	Receptors	Intracellular downstream effectors	Proteins involved in EGFR turnover	Others
AREG	EGFR (ERBB1 or HER1)	AKT1	AGR2	TP53
BTC	ERBB2 (HER2)	BRAF	CBL	YAP1
EGF	ERBB3 (HER3)	HRAS	LRIG1	
EPGN	ERBB4 (HER4)	IRS2	LRIG2	
EREG	FGFR1	KRAS	LRIG3	
HBEGF	IGF1R	MAP2K1	NEDD8	
HGF	MET	NRAS	ERRFI1 (RALT or MIG6)	
IGF1-2	PDGFRA	ΡΙΚЗСΑ	SOCS4	
NRG1-4		PTEN	SOCS5	
TGFα			SPRY2	

Table 1. Selected genes classified according to the function of their encoding proteins

Abbreviations: *AGR2*, Anterior Gradient 2, Protein Disulphide Isomerase Family Member; *AKT1*, AKT Serine/Threonine Kinase 1; *AREG*, Amphiregulin; *BRAF*, B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase; *BTC*, Betacellulin; *CBL*, Cbl Proto-Oncogene; *EGF*, Epidermal Growth Factor; *EGFR*, Epidermal Growth Factor Receptor; *EPGN*, Epithelial Mitogen; *ERBB2*, Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2; *ERBB3*, Erb-B3 Receptor Tyrosine Kinase 3; *ERBB4*, Erb-B4 Receptor Tyrosine Kinase 4; *EREG*, Epiregulin; *ERRF11*, ERBB Receptor Feedback Inhibitor 1; *FGFR1*, Fibroblast Growth Factor Receptor 1; *HBEGF*, Heparin Binding EGF Like Growth Factor; *HGF*, Hepatocyte Growth Factor; *HRAS*, HRas Proto-Oncogene, GTPase; *IGF1*, Insulin Like Growth Factor 1; *IGF2*, Insulin Like Growth Factor 2; *IGF1R*, Insulin Like Growth Factor 1 Receptor; *IRS2*, Insulin Receptor Substrate 2; *KRAS*, KRAS Proto-Oncogene, GTPase; *MAP2K1*, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1; *LRIG1*, Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1; *LRIG2*, Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 2; *LRIG3*, Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 3; *MET*, MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase; *NEDD8*, Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8; *NRAS*, NRAS Proto-Oncogene, GTPase; *NRG1*, Neuregulin 1; *NRG2*, Neuregulin 2; *NRG3*, Neuregulin 3; *NRG4*, Neuregulin 4; *PDGFRA*, Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha; *PIK3CA*, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha; *PTEN*, Phosphatase And Tensin Homolog; *SOCS4*, Suppressor Of Cytokine Signaling 4; *SOCS5*, Suppressor Of Cytokine Signaling 5; *SPRY2*, Sprouty RTK Signaling Antagonist 2; *TGFα*, Transforming Growth Factor Alpha; *TP53*, Tumor Protein P53; *YAP1*, Yes Associated Protein 1.

Table 2. Baseline patient characteristics

	Study population	Sensitive patients	Resistant patients	P-value
	(n= 61)	(n= 38)	(n= 23)	
	N (%)	N (%)	N (%)	
Sex				
Male	40 (65.6%)	32 (84%)	8 (34.8%)	<0.001
Female	21 (34.4%)	6 (16%)	15 (65.2%)	
Age				
<75	43 (70.5%)	26 (68.4 %)	17 (73.9%)	0.649
≥75	18 (29.5%)	12 (31.6%)	6 (26.1%)	
Mean Age		67.7	66.9	
Performance status (ECOG)				
0				
1-2	31 (50.8%)	24 (63.2%)	7 (30.4%)	0.013
	30 (49.2%)	14 (36.8%)	16 (69.6%)	
Tumor side				
Right	24 (39.4%)	15 (39.5%)	9 (39.2%)	0.634
Left	20 (32.7%)	13 (34.2%)	7 (30.4 %)	
Rectal	16 (26.3%)	10 (26.3%)	6 (26.1%)	
Jejunum	1 (1.6%)	0	1 (4.3%)	
Number of metastatic sites				
1	30 (49.2%)	18 (47.4%)	12 (52.3%)	0.716
≥2	31 (50.8%)	20 (52.6%)	11 (47.7%)	
Primary resected				
Yes	49 (80.3%)	32 (84.2%)	17 (73.9%)	0.327
No	12 (19.7%)	6 (15.8%)	6 (26.1 %)	
Previous lines of treatment				
0	24 (39.3%)	18 (47.4%)	6 (26.1%)	0.246
1	32 (52.5%)	17 (44.7%)	15 (65.2%)	
≥2	5 (8.2%)	3 (7.9%)	2 (8.7%)	

Type of anti-EGFR				
Cetuximab	33 (54.1%)	21 (55.3%)	12 (52.2%)	0.814
Panitumumab	28 (45.9%)	17 (44.7%)	11 (47.8%)	
Combination QT				
FOLFOX	18 (29.5%)	14 (36.8 %)	4 (17.4%)	0.192
Irinotecan scheme	40 (65.6%)	23 (60.6%)	17 (73.9%)	
Monotherapy	3 (4.9%)	1 (2.6 %)	2 (8.7%)	
PFS (months)		18.8	4.7	
OS (months)		41.2	17.2	

Abbreviations: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; OS, overall survival; PFS, progression-free survival.

P-values below 0.05 are highlighted in bold.

ARTICLE 6

Table 3. Assessment of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutational status by next-generation sequencing

Treatment outcome	Gene	Mutation	Patient	% of mutation	Coverage	Mutational status prior to anti-EGFR prescription
	KRAS	G12C	P11	45.7%	2,316	KRAS wild-type
	KRAS	Q61L	P39	0.8%	14,637	KRAS exon 3 not tested
	NRAS	G12S	P51	2.6%	5,093	NRAS wild-type
	NRAS	G13D	P55	8.1%	12,265	NRAS not tested
Resistant	NRAS	G13D	P57	0.5%	41,758	NRAS wild-type
Resistant	BRAF	V600E	Р3	24.4%	10,995	BRAF V600E mutated
	BRAF	V600E	P39	10.6%	7,906	BRAF V600E mutated
	BRAF	V600E	P55	20.8%	22,185	BRAF V600E mutated
	BRAF	V600E	P64	12.1%	1,316	BRAF V600E wild-type
	РІКЗСА	E545K	P63	10.1%	17,051	PIK3CA not tested
	KRAS	A146V	P28	5.0%	2,743	KRAS wild-type
Sensitive	BRAF	D594N	P45	19.7%	23,584	BRAF codon 594 not tested
	BRAF	G466A	P59	21.0%	10,234	BRAF codon 466 not tested
	РІКЗСА	E545K	P66	6.1%	12,888	PIK3CA not tested

Abbreviations: *BRAF*, B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase; *KRAS*, KRAS Proto-Oncogene, GTPase; *NRAS*, NRAS Proto-Oncogene, GTPase; *PIK3CA*, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

Table 4. Genetic variations significantly associated with lack of response to anti-EGFR blockade

Gene	Genetic variant	Patients with	% of the	Coverage	P- value*	Presence in COSMIC cancer database v91
		the variant	somatic variant			
IGF1R	NM_001291858.1: c.2003T>A;	P4	3.5%	8,008	0.029	Not described
	p.(I668N)	P9	4.2%	1,745		
		P10	10.6%	3,093		
	NM_001291858.1: c.3652G>A;	P1	6.3%	2,740	0.008	Mutation Id: 6919417
	p.(E1218K)	P2	11.8%	1,866	-	Patient with a leiomyosarcoma (n=1)
		P9	2.4%	1,238		(Ref. 42)
		P61	1.5%	10,017		
IRS2	NM_003749.2: c.3467C>T;	P12	7.0%	743	0.029	Mutation Id: 6974893
	p.(T1156M)	P14	5.1%	1,093		Patient with colon cancer (n=1)
		P57	3.4%	11,118		(Ref. 42)
LRIG1	NM_015541: c.456G>A;	P12	89.3%	196	0.008	Mutation Id: 4005617
	p.(T152T)	P57	2.7%	12,073		Patient with colon cancer (n=1)
		P63	7.9%	6,106		Patient with bladder cancer (n=1)
		P67	4.0%	3,218		(Ref. 55)
LRIG2	NM_014813.2: c.2090C>T;	P1	2.2%	8,802	0.029	Not described
	p.(S697L)	P10	4.2%	1,464	1	
		P12	7.9%	1,794		

LRIG3	NM_001136051.2: c.2434G>A;	P1	1.7%	12,378	0.029	Not described
	p.(V812M)	P2	4.8%	4,477	-	
		P9	4.6%	2,266		
NRAS	NM_002524.3: c.344del;	Р9	1.6%	2,273	0.029	Not described
	p.(G115Efs*46)	P10	3.1%	3,140		
		P63	2.2%	20,507		
PDGFRA	NM_001347828: c.903G>A;	P52	22.0%	19,078	0.029	Not described
	p.(T301T)	P63	3.8%	26,774	-	
		P67	1.2%	55,158		

* P-value was obtained by Fisher's exact test.

Abbreviations: *IGF1R*, Insulin-like Growth Factor 1 Receptor; *IRS2*, Insulin Receptor Substrate 2; *LRIG1*, Leucine-rich Repeats and Immunoglobulin-like Domains 1; *LRIG2*, Leucine-richRich Repeats and Immunoglobulin-like Domains 2; *LRIG3*, Leucine-rich Repeats and Immunoglobulin-like Domains 3; *NRAS*, NRAS Proto-Oncogene, GTPase; *PDGFRA*, Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha.

Figure 1. Flow chart of patient selection



*<u>Inclusion criteria</u>: patients \geq 18 years, with an Eastern cooperative oncology group (ECOG) performance status \leq 2 and *RAS* wildtype tumors. Patients had to be sensitive (patients achieving complete or partial response at the first CT-scan or disease stabilization lasting at least 6 months) or resistant to anti-EGFR blockade (patients showing disease progression at the first CT-scan).





Supplementary material S1

a) Resistant patients

KRAS: NM_004985.4: c.34G>T; p.(G12C) (P11)



KRAS: NM_004985.4: c.182A>T; p.(Q61L) (P39)

25.380.260 bp	25.38	0.270 bp 	25.380.280 bp	25.380.290 bp					
Б. тоот 			chr12:25.380.276 Total count: 14637 A : 119 (1%, 76+, 43-) C : 2 (0%, 1+, 1-) G : 1 (0%, 1+, 0-) T : 14515 (99%, 7233+, 7282-) N : 0						
		Т							
			A	<u>A</u>					
		Ţ	Ä	Å					
			A	A					
		i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	Â	A					
		Į	ТА						
			A	A					
		T	Â	A					
		Ţ	A	Ą					
TCATTG	CACTGTAC	тсстстт	G A C C T G C	T G T G T C G A G A A T A					
M A	S Y	E E Q	G A	T D L I					
		KRAS							

NRAS: NM_002524.4: c.34G>A; p.(G12S) (P51)

	1	-			1					1				I																		1		
ip - 3099j																	chr1	1:115.	258.7	48			7											
																	Tota G: G: N: DEL	al cour 4 (0% 4956 (0 133 (3 0 .: 2 : 2	nt: 50 , 2+, 97%, 97%, 6	193 2-) , 2478 6+, 6	3+, 2ª 7-)	178-)												
																	Ì																	
																	r i																	
																	-																	
																	į																	
TG	С	G C	Т	T	Т	Т	С	С	С	A	A C	Α	С	С	A	C (:	T G	С	Т	С	С	A	Α	С	С	۱ C	: с	Α	С	С	A	G	ТТ
A		S			K			G			V		G			G		Α			G			V			/		- V			Ľ		K

NRA

NRAS: NM_002524.4: c.38G>A; p.(G13D)

P55



P57



BRAF: NM_004333.5: c.1799T>A; p.(V600E)

Ρ3



ARTICLE 6

P39

	140.453.120 bp			I				140.453. ⁻	30 bp				I				40.453.1 	40 bp				1			140	.453.150 	bp				1
0. 13199)																															
														C : G : T : N :	r7:14 tal co : 705 : 11 (: 2 (0 : 835 : 1 (0	0.453 punt: 7 (899 0%, (0%, 1 (11% 0%, 0	.136 7906 %, 3 +, 1 +, 1- , 419 +, 1-	537+, 1-)))+, 41)	3520- 6-))	-	_	G								
														T																	
A C C G	CAC S	T	с с W	A	T	с R	G	<mark>a g</mark> S	A	T	T K	T	С	A V	С	T G	Т	A	G A	С	T	A () A	c G	С	A	A F	A	A	T (D	C A

P55

140.453.120 bp	1	140.453.130 bp	I	140.453.140 bp	140.453.150 bp
0 - 22207]					
		٨	T	chr7:140.453.136 Total count: 22185 A : 17563 (79%, 8769+, 8794-) C : 9 (0%, 2+, 7-) G : 5 (0%, 4+, 1-) T : 4608 (21%, 2300+, 2308-) N : 0	A
ACCCACTC GS	CATC W R	GAGATTT SK	C A	C T G T A G C	TAGACCAAAATCA LGFD

BRAF

P64



PIK3CA: NM_006218.3: c.1633G>A; p.(E545K) (P63)



b) Sensitive patients

KRAS: NM_004985.4: c.437C>T; p.(A146V) (P28)

bp	1	25.378.550 bp	25.378.560	bp I	25.378.570 bp	25.378.580 bp
p. 2248				chr12:25.378.561 Total count: 2743 A : 136 (5%, 68+, 68-) C : 2 (0%, 2+, 0-) G : 2595 (95%, 1302+, 1293-) T : 10 (0%, 2+, 8-) N : 0		
				A		G
T A C T	TACCT	G T C T T R	G T C T T T T K	G C T G A T G T A S T	T T C A A T E I	A A A A G G A F P

BRAF: NM_004333.5: c.1780G>A; p.(D594N) (P45)



BRAF: NM_004333.5: c.1397G>C; p.(G466A) (P59)



PIK3CA: NM_006218.3: c.1633G>A; p.(E545K) (P66)



PIK3CA

Supplementary material S2

IGF1R: NM_001291858.1: c.2003T>A; p.(I668N)

Ρ4



Ρ9



P10



IGF1R: NM_001291858.1: c.3652G>A; p.(E1218K)

Ρ1

91.850 bp	39.491.860 bp	33.431.870 bp	33,431,880 bp I I	99.491.8: I
0.000		ch:15:99.491.870 Total count: 2740 A : 172 (6%, 36+, 8) C : 2 (0%, 2+, 0-) A : 52566 (94%, 128) T : 0 N : 0	6-) 2+, 1284-)	
P Y	Q G L	S N E O		F V

Ρ2

191.850 bp	99.491.860 bp 	99.491.870 bp I	39.491.880 bp	99.491.8: I
p272g		chr15:99.491.870		
	T	A : 221 (12%, 110- C : 1 (0%, 1+, 0-) G : 1644 (88%, 821 T : 0 N : 0	+, 111-) ++, 823-)	
				^
C C T A C C A G G P Y Q	G C T T G T C	CAACGAGCA N E Q	A G T C C T T C	G C T T C G T C R F V

Р9



191.850 E	p				I				99	.491.860 	bp				I				99	491.870 	bp				I				99.4	91.880 bj 	р				I				99.49	1.8
j0 - 24789j			_	_	_		_	_							_				_	_		_			_	_					_				_			_		-
																	G			ch Tc A C G T N	r15: tal (: 14 : 8 (: 98 : 15 : 0	99.49 count 7 (1% 0%, 47 (9 (0%	91.87 : 100 6,74 6+,2 8%, ,5+,	0 117 +, 73 2-) 4920 10-)	3-) +, 4)	927-)		A		6									
6	<u> </u>	T	0	<u> </u>	<u> </u>		6	6	6	6	T	T	6	T	<u> </u>	6	0	С		I		6		0	0	6	T	<u> </u>	6	T	T	6	6	6	T	T	<u> </u>	A	T	<u> </u>
P	U.		Y	L		Ó	U	U	G	U	1	L	U	•	S	L	A	Ň	L	U IGF1R	E	U	L	Ô	A	U	V	L	L	L		L	R			F		U	V	

IRS2: NM_003749.2: c.3467C>T; p.(T1156M)



P14

	I			110.434.9 	20 bp				1				110.434.93 	0 bp				1				110.43	і4.940 Бр І				I				110.4	134.950 bp)	
0 - 3590)																																		
																	C : G : T : N :	r13:1 tal co 56 (103 0	10.43 punt: : 5%, 2 7 (95 	4.93 1093 28+, %, 5	4 28-) 84+,) 453-	-)											
G	G G	A	С	A C	G	G P	G	G	G	T	G	A C	С	G	T	С	G	Т	G	G	T	G	G / S	G	G S	A	G	A	Α	G	G	T	C 1	G
																	IRS2																	



LRIG1: NM_015541: c.456G>A; p.(T152T)

P12



P57



167.580 bp	86.467.590 bp	66:467:600 bp I	66.467.610 bp I	66.467.62
p.etii		chr3:66.467.600 Total count: 6106 A : 4 (0%, 2+, 2-) C : 5615 (92%, 2811+ G : 3 (0%, 2+, 1-) T : 484 (8%, 243+, 24 N : 0	+, 2804-) 41-)	
A A G C A G F C	GTGTTCCGC/ TNR	ACTTCCGTGA1	TGTTGTTCAA N N L	ACTCAG SL

P67



LRIG2: NM_014813.2: c.2090C>T; p.(S697L)

Ρ1



ARTICLE 6

P10

113.657.040 bp	1	113.657.050 bp	I	113.657.060 bp	113.657.070 bp	1
(0 - 1657 <u>)</u>						
			A	L chr1:113.657.058 Total count: 1464 A : 134 (9%, 128+, 6-) C : 1265 (86%, 470+, 795-) G : 3 (0%, 0+, 3-) T : 62 (4%, 25+, 37-) N : 0 	т	А Т А Т А Т А Т А
	T			A	T	A A A
			A			A T
T T T C C T	G T T A	G A G A C A	Р	<mark>catttat</mark> SFI	TAGACCC R P	C T G G A G G

P12



LRIG3: NM_001136051.2: c.2434G>A; p.(V812M)

Ρ1





Ρ9



59.270.290 bp I	59.270.300 bp	59.270.310 bp	53.270.320 bp	
p. 221		Chr12:59.270.308 Total count: 2266 A : 1 (0%, 0+, 1-) C : 2161 (95%, 1079+, 1082-) G : 0 T : 104 (5%, 52+, 52-) N : 0 T	T C	
GCTTCCA	C T T T C T G A A G	GACACGTACCCA SVY	T C C T G C C T G T	C A G

LRIG3

Р9



ARTICLE 6

P10

115.252.280 bp	115.252.290 bp	115.2 I	52.300 bp	115.252.310 bp
P-0204		chr1:115.252.290 Total count: 314 A : 2 (0%, 1+, 1 C : 3133 (100%, G : 3 (0%, 2+, 1 T : 2 (0%, 0+, 2 N : 0 DEL: 99 INS: 0)))) c c c c c	
T T G G C A A A	D C K	G T T T C C C A	C T A G C A C	CATAGGTACA
		NRAS		

P63



NRAS

PDGFRA: NM_001347828: c.903G>A; p.T301T

P52



	1			55	.133.510	bp				1				55.	133.520 t 	PP .				1				55.1	33.530 t 	эр				1				55.1	33.540 E	PP		
j0 - 26907j																																						
		G	i							T										chr4: Total A : 10 C : 6 G : 2! T : 18 N : 0 DEL: INS: 0	55.13 coun)13 (4 (0%, 5737 3 (0%) 2)	3.52 t: 26 4%, , 4+, (96 0, 13	24 5774 505 , 2-) %, 11 3+, 5	+, 50) 2842 i-)	08-) !+, 1	2895	-)	A										
A	A K	A T	T	G	G	T	G	T	A	С	A	С	T	T	T	G	A	C	G	G	T V	С	С	<mark>с</mark> Р	С	G	A	G	G	<mark>с</mark> А	С	A	C	G	G	T V	G	A A
																		P	DGFRA																			

P67

1	55.133.510 bp	55.133.520 bp	55.133.530 bp	55.133.540 bp
p. 5516g			chr4:55.133.524 Total count: 55158 A: 633 (1%, 321 +, 312 -) C: 65 (0%, 45 +, 20 -) G: 54175 (98%, 27061 +, 27114 -) F: 285 (1%, 120 +, 165 -) N: 0	c c c
A		٨		G G C
A A A T T K	G G T G T A C	ACTTTGAC	G G T C C C G	A G G C C A C G G T G A A E A T V K

Resum global dels resultats



Informe dels directors de la tesi per a la presentació de la tesi com a compendi de publicacions

El Dr. David Páez López-Bravo i el Dr. Jordi Surrallés Calonge, directors de la tesi doctoral elaborada pel Sr. Pau Riera Armengol amb el títol "Marcadors genètics d'eficàcia i toxicitat en el tractament del càncer colorectal" corroboren que el doctorand és autor de quatre articles i una carta a l'editor, tots ells publicats en revistes ubicades en el primer quartil de la seva categoria.

Aquestes publicacions, citades a continuació, no han estat utilitzades ni implícitament ni explícita per cap dels altres coautors per a la realització d'una tesi doctoral.

Riera P, Virgili AC, Salazar J, Sebio A, Tobeña M, Sullivan I, Páez D. Genetic variants in the VEGF pathway as prognostic factors in stages II and III colon cancer. Pharmacogenomics J 2018; 18(4):556–64

IF (segons JCR 2016): 3,815

1r quartil (Categoria "Pharmacology & Pharmacy")

Participació del doctorand (és co-primer autor amb l'AC Virgili): genotipat de les mostres, anàlisi i interpretació dels resultats, redacció i revisió del manuscrit.

Riera P, Salazar J, Virgili AC, Tobeña M, Sebio A, Gallano P, Barnadas A, Páez D. Relevance of *CYP3A4*20*, *UGT1A1*37* and *UGT1A1*28* variants in irinotecan-induced severe toxicity. Br J Clin Pharmacol 2018; 84: 1389–1392

IF (segons JCR 2016): 3,493

1r quartil (Categoria "Pharmacology & Pharmacy")

Participació del doctorand (és primer autor): elaboració de la base de dades clínica, genotipat de les mostres, anàlisi i interpretació dels resultats, redacció i revisió del manuscrit.

Riera P, Artigas A, Salazar J, Páez D. Comments on: "Clinical utility of *ABCB1* genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan" (carta a l'editor). Pharmacol Res 2019; 145:104287

IF (segons JCR 2017): 4,897

1r quartil (Categoria "Pharmacology & Pharmacy")

Participació del doctorand (és primer autor): redacció i revisió de la carta.



Riera P, Artigas-Baleri A, Salazar J, Sebio A, Virgili AC, Arranz MJ, Páez D. *ABCB1* genetic variants as predictors of irinotecan-induced severe gastrointestinal toxicity in metastatic colorectal cancer patients. Front Pharmacol 2020; 11:973

IF (segons JCR 2019): 4,225

1r quartil (Categoria "Pharmacology & Pharmacy")

Participació del doctorand (és co-primer autor amb l'A Artigas-Baleri): elaboració de la base de dades clínica, genotipat de les mostres, anàlisi i interpretació dels resultats, redacció i revisió del manuscrit.

Páez D, Tobeña M, Fernández-Plana J, Sebio A, Virgili AC, Cirera L, Barnadas A, Riera P, Sullivan I, Salazar S. Pharmacogenetic clinical randomised phase II trial to evaluate the efficacy and safety of FOLFIRI with highdose irinotecan (HD-FOLFIRI) in metastatic colorectal cancer patients according to their *UGT1A1* genotype. Br J Cancer 2019; 120(2):190–5

IF (segons JCR 2017): 5,922

1r quartil (Categoria "Oncology")

Participació del doctorand: genotipat de les mostres, disseny de les figures, redacció i revisió del manuscrit.

A més, el doctorand és autor d'un article en procés de publicació que també s'inclou a la tesi doctoral:

Riera P, Rodríguez-Santiago B, Lasa A, González-Quereda L, Martín B, Salazar J, Sebio A, Virgili AC, Minguillón J, Camps C, Surrallés J, Páez D. Novel somatic genetic variants as predictors of resistance to EGFR-targeted therapies in metastatic colorectal cancer patients

Participació del doctorand (és primer autor): elaboració de la base de dades clínica, genotipat de les mostres, anàlisi i interpretació dels resultats, redacció i revisió del manuscrit.

Barcelona, a 30 de juny de 2020

Signat:

Dr. David Páez López-Bravo

Dr. Jordi Surrallés Calonge

Aquesta tesi s'ha centrat en la identificació de marcadors pronòstics i predictius (tant d'eficàcia com de toxicitat) en càncer colorectal, amb l'objectiu últim de poder avançar en la individualització terapèutica i aconseguir que el tractament seleccionat sigui el més efectiu i segur per a cada pacient. En aquest sentit, la tesi aporta evidències sobre nous marcadors d'interès (tant germinals com somàtics) que podrien ser d'utilitat en la pràctica clínica. A continuació es resumeixen els resultats més destacats de cadascuna de les publicacions que constitueixen aquesta tesi doctoral.

1. Identificació de biomarcadors pronòstics en càncer de còlon localitzat

<u>Article 1.</u> Riera P, Virgili AC, Salazar J, Sebio A, Tobeña M, Sullivan I, Páez D. Genetic variants in the VEGF pathway as prognostic factors in stages II and III colon cancer. Pharmacogenomics J 2018; 18(4):556–64.

En aquest estudi vam avaluar la influència de 28 polimorfismes d'un sol nucleòtid en 12 gens de la via del factor de creixement endotelial vascular (VEGF) i el seu paper en el pronòstic de 347 pacients amb càncer de còlon d'estadis II-III. Vam trobar que els rs9513070 (*VEGFR1*) i rs1137282 (*KRAS*) estaven associats amb la SG dels pacients amb càncer de còlon d'estadi II (p=0,025 i p=0,001, respectivament). En fer l'anàlisi multivariada, aquestes associacions van romandre estadísticament significatives. Així doncs, els pacients d'estadi II portadors d'almenys un al·lel G per a l'rs9513070 van presentar una SG superior (HR=0,268; p ajustada=0,043), mentre que els homozigots GG per a l'rs1137282 van presentar una SG menor (HR=10,82; p ajustada=0,005).

Quan es va tenir en compte la ubicació del tumor, l'rs9513070 també es va associar amb la supervivència lliure de recaiguda (SLR) i la SG (p=0,033 i p=0,031, respectivament) en els pacients amb càncer de colon esquerre. En fer l'anàlisi multivariada, aquestes associacions van mantenir la significació estadística. D'aquesta manera, els pacients amb càncer de còlon esquerre portadors d'almenys un al·lel G per a l'rs9513070 van presentar una major SLR (HR=0,345; p ajustada=0,005) i SG (HR=0,061; p ajustada=0,011). A més, l'rs35251833 del gen *ITGAV* es va correlacionar amb la SLR en pacients amb càncer de còlon esquerre (p=0,032). En fer l'anàlisi multivariada, els pacients portadors d'almenys un al·lel G per a l'rs35251833 seguien presentant una major SLR (HR=0,242; p ajustada=0,005).

En definitiva, els resultats d'aquest estudi mostren com diversos polimorfimes germinals ubicats en els gens *VEGFR1, KRAS* i *ITGAV* s'associen amb el pronòstic en pacients amb càncer de còlon d'estadis II-III.

2. Identificació de biomarcadors predictius de resposta i toxicitat en càncer colorectal metastàtic

2.1. Identificació de marcadors de toxicitat a l'irinotecan i avaluació de la seva aplicabilitat clínica

<u>Article 2.</u> Riera P, Salazar J, Virgili AC, Tobeña M, Sebio A, Gallano P, Barnadas A, Páez D. Relevance of *CYP3A4*20*, *UGT1A1*37* and *UGT1A1*28* variants in irinotecan-induced severe toxicity. Br J Clin Pharmacol 2018; 84: 1389–1392.

En aquest estudi vam incloure-hi 308 pacients amb CCRm tractats amb un règim quimioteràpic que incloïa irinotecan. Es va determinar la presència dels al·lels *CYP3A4*20*, *UGT1A1*37* i *UGT1A1*28* i la seva associació amb el desenvolupament de toxicitat greu (diarrea, neutropènia, neutropènia febril, astènia, nàusees i mucositis) secundària al tractament. Vam trobar que l'al·lel *UGT1A1*28* estava associat de forma estadísticament significativa amb l'aparició de diarrea, neutropènia i astènia greus (p=0,002, p=0,037 i p=0,041, respectivament). A més, un pacient amb el genotip *UGT1A1*28/*37* va desenvolupar neutropènia grau IV i un xoc sèptic que va resultar ser letal, tot i la reducció inicial de dosi d'irinotecan en monoteràpia (dosi = 150 mg/m²). Pel que fa a la presència de l'al·lel *CYP3A4*20*, un pacient heterozigot per a l'*UGT1A1 (*1/*28)* també era portador de l'al·lel *CYP3A4*20* en heterozigosi, però no va patir toxicitat greu.

<u>Article 3.</u> Riera P, Artigas A, Salazar J, Páez D. Comments on: "Clinical utility of *ABCB1* genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan" (carta a l'editor). Pharmacological Research 2019; 145:104287.

Aquesta carta a l'editor anava dirigida a l'article de Salvador-Martín *et al* titulat *Clinical utility of ABCB1* genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan. En aquest article s'afirmava que la presència de l'al·lel *UGT1A1*28* no era útil com a predictor de toxicitat a l'irinotecan en aquells pacients que rebien dosis $\leq 180 \text{ mg/m}^2$ (237). La dosi de 180 mg/m² és la dosi habitual de l'esquema FOLFIRI, esquema quimioteràpic àmpliament utilitzat en CCRm. A la carta vam citar un estudi previ de cerca de dosi d'irinotecan que demostrava que els pacients homozigots per a l'al·lel *UGT1A1*28* només podien tolerar una dosi màxima d'irinotecan de 130 mg/m², és a dir, una dosi un 28% inferior als 180 mg/m² contemplats a l'esquema FOLFIRI (236). A més, en llegir l'estudi de Salvador-Martín *et al* vam detectar que la distribució de l'al·lel *UGT1A1*28* a la seva mostra no complia l'equilibri de Hardy-Weinberg (p<0,05), i que precisament els pacients *UGT1A1*28/*28*, que són els que presenten un major risc de toxicitat, estaven infrarepresentats. Per tant, tenint en compte aquest fet i l'evidència científica existent, vam concloure que els resultats del seu estudi no eren suficients per descartar que l'al·lel *UGT1A1*28* fos un bon predictor de toxicitat induïda per irinotecan en pacients que rebessin dosis \leq 180 mg/m².

<u>Article 4.</u> Riera P, Artigas-Baleri A, Salazar J, Sebio A, Virgili AC, Arranz MJ, Páez D. *ABCB1* genetic variants as predictors of irinotecan-induced severe gastrointestinal toxicity in metastatic colorectal cancer patients. Frontiers in Pharmacology 2020; 11:973.

En aquest estudi vam avaluar, en la mateixa cohort de 308 pacients mencionada al segon article, l'associació de tres variants funcionals en el gen *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 i rs1045642), així com dels seus diplotips i haplotips, amb el desenvolupament de toxicitat greu secundària a l'irinotecan. Les toxicitats avaluades van ser la diarrea, la neutropènia, l'astènia, les nàusees i la mucositis, el grau de les quals es va establir d'acord amb la versió 5.0 de Common Terminology Criteria for Adverse Events, del National Cancer Institute. Per a l'anàlisi multivariada es van introduir com a covariables el gènere, l'edat, el tractament quimioteràpic, la línia de tractament i els genotips de l'*ABCB1* i la *UGT1A1*.

En l'anàlisi multivariada vam trobar que l'rs1128503 estava associat de forma estadísticament significativa amb l'aparició de diarrea i mucositis greus (p=0,014 i p=0,002, respectivament). En concret, els pacients que presentaven el genotip CC tenien un major risc de toxicitat gastrointestinal (en comparació als pacients amb els genotips CT i TT). A més, l'rs2032582 també es va associar amb l'aparició de mucositis greu (p=0,0001). En aquest cas, els pacients GG eren els que presentaven un menor risc de patir mucositis greu. Pel que fa a l'anàlisi de diplotips, vam observar que els diplotips rs1045642T-rs1128503C (freqüència=10,5%) i rs1128503C-rs2032582T (freqüència=1,9%) estaven associats amb un major risc de diarrea (p=0,035 i p=0,005, respectivament). El diplotip rs1128503C-rs2032582T també va mostrar associació amb el desenvolupament de mucositis i nàusees (p=0,00018 i p=0,049, respectivament).

Quant als haplotips, vam trobar que la presència de l'haplotip CTT (rs1128503-rs2032582-rs1045642) s'associava a un major risc de diarrea, astènia, nàusees i mucositis greus (p=0,012, p=0,047, p=0,029 i p=0,002, respectivament). Aquest haplotip, però, va ser bastant rar a la cohort estudiada (freqüència=1,5%). No vam observar cap altra associació de cap haplotip amb l'aparició de toxicitat greu induïda per irinotecan.

<u>Article 5.</u> Páez D, Tobeña M, Fernández-Plana J, Sebio A, Virgili AC, Cirera L, Barnadas A, Riera P, Sullivan I, Salazar S. Pharmacogenetic clinical randomised phase II trial to evaluate the efficacy and safety of FOLFIRI with high-dose irinotecan (HD-FOLFIRI) in metastatic colorectal cancer patients according to their *UGT1A1* genotype. Br J Cancer 2019; 120(2):190–5.

En aquest assaig clínic fase II aleatoritzat vam avaluar si els pacients amb genotip *UGT1A1*1/*1* o *UGT1A1*1/*28*, en ser tractats amb dosis d'irinotecan superiors a les estàndard de l'esquema FOLFIRI (180 mg/m²) presentaven una millor taxa de resposta objectiva sense un increment significatiu de la toxicitat (en comparació amb els que rebien la dosi de FOLFIRI estàndard). Es van incloure 82 pacients, 41 al grup de FOLFIRI altes dosis (FOLFIRI-AD) i 41 al grup de FOLFIRI estàndard. La dosi d'irinotecan al grup FOLFIRI-AD va ser de 300 mg/m² per als pacients *UGT1A1*1/*1* i 260 mg/m² per als pacients *UGT1A1*1/*28*. Al grup control, la dosi va ser l'habitual de 180 mg/m². La taxa de resposta objectiva va ser significativament més alta en el grup FOLFIRI-AD (67,5% enfront del 43,6%; *p*= 0,001; OR: 1,73 [IC 95%: 1,03-2,93]). En el grup de FOLFIRI-AD va ser possible realitzar la resecció quirúrgica de les metàstasis en un 22,5% dels pacients (enfront del 15,4% del grup control). Com a dada curiosa es va observar que, dels sis pacients *BRAF* mutats en el grup de FOLFIRI-AD, cinc (83,3%) van presentar resposta completa o parcial al tractament, mentre que dels sis pacients *BRAF* mutats en el grup control cap (0%) no va presentar resposta (*p*=0,003). En canvi, no es van observar diferències en la taxa de resposta objectiva entre ambdós grups de l'assaig segons l'estat mutacional de *RAS*. No es van observar diferències ni en la SLP ni en la SG entre el grup de FOLFIRI-AD i el grup control (*p*=0,46 i *p*=0,74, respectivament).

Les toxicitats grau 3-4 més comunes van ser la neutropènia (17,7%), leucopènia (5,1%), neutropènia febril (5,1%), diarrea (5,1%) i astènia (5,1%). No es van observar diferències entre el grup experimental i el control ni en l'aparició de toxicitat greu (22,5% enfront del 20,5%), ni en la reducció de la dosi d'irinotecan prescrita (22,5% enfront del 28,2%) ni en l'administració de G-CSF profilàctic (17,5% enfront del 12,8%).

2.2. Identificació de variants somàtiques de resistència als agents anti-EGFR

<u>Article 6.</u> Riera P, Rodríguez-Santiago B, Lasa A, González-Quereda L, Martín B, Salazar J, Sebio A, Virgili AC, Minguillón J, Camps C, Surrallés J, Páez D. Novel somatic genetic variants as predictors of resistance to EGFR-targeted therapies in metastatic colorectal cancer patients. *Article en procés de publicació*.

En aquest estudi vam incloure-hi 61 pacients amb CCRm tractats amb fàrmacs anti-EGFR que havien presentat fenotips extrems pel que fa a la resposta farmacològica: 38 pacients eren responedors i 23

pacients eren resistents al tractament biològic. Vam dissenyar un panell customitzat que incloïa 43 gens relacionats amb la via de l'EGFR, entre els quals gens de lligands, receptors, molècules de la via de transmissió de senyals i gens involucrats en processos de reciclatge i degradació del receptor EGFR. Vam seqüenciar mostres d'ADN germinal i tumoral dels pacients mitjançant seqüenciació de segona generació o next-generation sequencing (NGS). L'objectiu de l'estudi era descobrir noves variants somàtiques de resposta o resistència als fàrmacs anti-EGFR que poguessin explicar la resposta farmacològica observada en pacients els tumors dels quals eren no mutats per als gens *RAS* i *BRAF* (mutació V600E).

L'anàlisi mitjançant NGS va permetre detectar cinc pacients resistents al tractament biològic que presentaven mutacions validades de manca de resposta al tractament (ubicades en els gens *KRAS* o *NRAS* o la mutació V600E de *BRAF*) en un percentatge superior al 5% de clona mutada. Per aquest motiu, aquests individus van ser exclosos de la cerca de noves mutacions, en tenir ja una causa demostrada de manca de resposta al tractament. No es va trobar cap pacient que presentés alhora mutació V600E de *BRAF* i la mutació Q61L de *KRAS*, així com un altre pacient que presentava la mutació V600E de *BRAF* i la mutació Q61L de *KRAS*, així com un altre pacient que presentava la mutació V600E de *BRAF* i la mutació G13D de *NRAS*. A més, vam identificar dues mutacions de *BRAF* (D594N i G466A), prèviament relacionades amb un pronòstic favorable, en dos pacients responedors. La mutació de *PIK3CA* E545K va ser trobada en un pacient resistent al tractament amb anticossos anti-EGFR.

En aquest estudi vam identificar vuit variants somàtiques de resistència als fàrmacs anti-EGFR. Totes elles es van trobar només en pacients no responedors i amb una freqüència al·lèlica superior a l'1% de clona mutada. Tres d'elles es van localitzar en gens relacionats amb la insulina (I668N i E1218K en el gen *IGF1R*, T1156M en el gen *IRS2*). Tres variants estaven localitzades en gens pertanyents a la família LRIG (T152T en el gen *LRIG1*, S697L en el gen *LRIG2* i V812M en el gen *LRIG3*). Les dues variants restants es trobaven a *NRAS* (G115Efs*46) i *PDGFRA* (T301T). No es van identificar variants somàtiques de bona resposta al tractament biològic.
Discussió

Els resultats d'aquesta tesi aporten noves evidències científiques sobre la utilitat dels marcadors genètics per afrontar tres reptes importants en el camp del CCR: en primer lloc, conèixer amb una major precisió quins pacients amb càncer de còlon localitzat amb un pronòstic pitjor es podrien beneficiar de rebre QT adjuvant (article 1); en segon lloc, predir amb una major fiabilitat quins pacients no són candidats a rebre tractament amb irinotecan a les dosis estàndard a causa del seu elevat risc de desenvolupar toxicitat greu i quins pacients poden rebre dosis més altes que les estàndard sense que augmenti significativament el risc de toxicitat associada (articles 2-5); finalment, conèixer més determinants de resistència a les teràpies anti-EGFR que permetin millorar l'efectivitat d'aquests agents biològics (article 6).

1. Identificació de biomarcadors pronòstics en càncer de còlon localitzat

El primer estudi d'aquesta tesi ens aporta més informació sobre marcadors pronòstics en càncer de còlon d'estadis II-III (300). Com ja s'ha comentat a la introducció, el maneig terapèutic dels pacients amb càncer de còlon d'estadis II i III consisteix fonamentalment en una intervenció quirúrgica amb intenció curativa. Tanmateix, el risc de recurrència és alt, especialment en els pacients d'estadi III i d'estadi II d'alt risc (110). Per això, amb l'objectiu de reduir el risc de recurrència, aquests pacients reben QT adjuvant basada en fluoropirimidines. És important poder determinar de forma precisa quins són els pacients d'estadi II-III amb risc de recaiguda, de tal forma que no administrem QT adjuvant a un pacient que no recaurà (i així li evitem una toxicitat innecessària) i que no deixem sense QT adjuvant a qui realment se'n beneficia. És per això que cal tenir marcadors que ajudin a decidir de forma individualitzada la idoneïtat de l'adjuvància. En aquest sentit, la inestabilitat de microsatèl·lits en estadi II és un factor de bon pronòstic amb una evidència sòlida (111–114), fet que fa que es determini de forma rutinària a la pràctica clínica diària. Hi ha altres marcadors que són d'utilitat, com ara el grau de diferenciació tumoral, la invasió perineural i limfovascular o l'expressió de CDX2, entre d'altres. No obstant això, encara hi ha pacients en els quals la decisió sobre la idoneïtat o no de l'adjuvància és dubtosa. En el nostre estudi vam observar que diverses de les variables recollides s'associaven de forma estadísticament significativa amb la SLR i/o la SG, com ara l'estadi del tumor, el grau de diferenciació, la localització tumoral, l'administració de QT adjuvant, la invasió perineural i el número de ganglis limfàtics resecats. Aquestes covariables es van incloure en l'anàlisi multivariada. Com a limitació, cal destacar que no es coneixia la presència/absència d'inestabilitat de microsatèl·lits en la majoria de pacients, en ser una cohort de pacients diagnosticats entre 2009 i 2014, període en el qual aquesta determinació encara no s'efectuava de forma rutinària al nostre centre. En base a les evidències científiques actuals, és de suposar que la presència d'inestabilitat de microsatèl·lits també hauria afectat el pronòstic dels pacients i s'hauria hagut d'incloure com a covariable en l'anàlisi multivariada.

El factor de creixement endotelial vascular (VEGF) és el promotor principal de l'angiogènesi tumoral, la qual promou el creixement i progressió dels tumors sòlids, com ara el CCR (301,302). L'activació de l'angiogènesi pot conferir un pitjor pronòstic en pacients amb tumors localitzats, ja que pot promoure el *switch* de cèl·lules dorments no eliminades per la cirurgia a cèl·lules amb capacitat proliferativa (303). És per això que ens vam plantejar si polimorfismes en gens de la via del VEGF podien modificar el pronòstic en aquests pacients. Vam trobar que diverses variants genètiques estaven associades amb la SLR i/o la SG. En concret, el nostre estudi és el primer en mostrar que l'rs9513070 (*VEGFR1*) s'associa amb la supervivència, tant en tumors d'estadi II com en tumors de localització esquerra. Aquesta variant ja s'havia relacionat amb la supervivència en pacients amb càncer de còlon avançat (296). Pel que fa a l'rs1137282 (*KRAS*), vam trobar que els pacients amb genotip GG presentaven menor SG, uns resultats concordants amb els d'un estudi que va avaluar el paper d'aquesta variant en pacients amb càncer de pulmó no microcític d'estadis I-III (304). Finalment, la variant rs35251833 (*ITGAV*) es va relacionar amb la SLR en pacients amb càncer de còlon esquerre, uns resultats semblants als trobats en un estudi previ que incloïa pacients amb CCRm (305).

En definitiva, aquest estudi evidencia que polimorfismes genètics de la via del VEGF s'associen amb el pronòstic en pacients amb càncer de còlon d'estadis II-III, i que els resultats depenen tant de l'estadi com de la localització tumoral. Per tant, és important que estudis futurs sobre marcadors pronòstics en càncer de còlon localitzat estratifiquin els pacients en funció tant de l'estadiatge com de la ubicació del tumor, ja que són característiques rellevants per al pronòstic.

2. Identificació de biomarcadors predictius de resposta i toxicitat en càncer colorectal metastàtic

2.1. Identificació de marcadors de toxicitat a l'irinotecan i avaluació de la seva aplicabilitat clínica

Aquesta tesi doctoral conté tres estudis (306–308) i una carta a l'editor (309) sobre marcadors genètics de toxicitat a l'irinotecan i la seva utilitat clínica.

El descobriment i possible translació a la pràctica clínica de marcadors de toxicitat és d'una gran utilitat, ja que l'aparició d'efectes adversos greus secundaris a la quimioteràpia condiciona de forma notòria la qualitat de vida dels pacients oncològics. En aquest sentit, l'irinotecan és un citostàtic àmpliament utilitzat per al maneig del CCR avançat que ocasiona toxicitats greus (habitualment neutropènia i/o diarrea, entre

d'altres) en un terç dels pacients aproximadament (22). Tanmateix, a dia d'avui encara no hi ha cap marcador de toxicitat a l'irinotecan que sigui de determinació obligatòria segons la seva fitxa tècnica (233), malgrat les evidències existents sobre el paper rellevant de diversos marcadors (228,239,310). Aquest fet fa que en molts centres no es realitzi cap test genètic prèviament a l'administració d'irinotecan.

Els resultats del segon article d'aquesta tesi confirmen el paper de l'UGT1A1*28 com a factor predictiu de toxicitat greu secundària al tractament amb irinotecan. En aquest estudi vam demostrar que la presència d'aquest al·lel s'associava de forma estadísticament significativa amb l'aparició de diarrea, neutropènia i astènia greus (p=0,002, p=0,037 i p=0,041, respectivament). En canvi, no vam trobar associació ni amb les nàusees (p=0,495) ni amb la mucositis (p=0,595) (306). Tal i com s'ha esmentat anteriorment, l'associació amb la neutropènia és molt coneguda i fins i tot apareix a la fitxa tècnica del fàrmac (233). Pel que fa a l'associació amb la diarrea, tot no aparèixer a la fitxa tècnica del fàrmac, ja havia estat descrita en un article previ del nostre grup, que va mostrar que la presència de l'al·lel UGT1A1*28 s'associava de forma estadísticament significativa amb un major risc de patir diarrea greu (p=0,005) (194). En aquest sentit, s'ha demostrat que l'associació de l'al·lel UGT1A1*28 amb l'aparició de diarrea greu depèn considerablement de la dosi d'irinotecan administrada. Així doncs, una metanàlisi realitzada per Hu et al va concloure que no hi havia associació de l'al·lel UGT1A1*28 amb aquesta toxicitat a dosis baixes d'irinotecan (<125 mg/m²). En canvi, els pacients heterozigots o homozigots per a l'al·lel UGT1A1*28 sí que presentaven un major risc de patir diarrea greu quan l'irinotecan era administrat a dosis mitjanes i altes (311). Una metanàlisi posterior, publicada per Liu et al, va mostrar uns resultats similars. En aquesta metanàlisi, que va incloure 16 estudis, es va concloure que els pacients amb genotip UGT1A1*28/*28 presentaven un major risc de presentar diarrea greu (OR=1,84; p=0,002). Es va constatar, també, que aquesta incidència major de diarrea en els pacients homozigots per a l'al·lel UGT1A1*28 es circumscrivia als pacients que rebien dosis mitjanes i altes d'irinotecan (OR=2,37; p=0,002), és a dir, a aquells que rebien dosis d'irinotecan >150 mg/m² (312).

En el nostre estudi, un 92% dels pacients van rebre l'esquema FOLFIRI, que conté irinotecan a la dosi de 180 mg/m², considerada una dosi d'irinotecan mitjana. Per tant, els resultats trobats sobre l'associació entre l'al·lel *UGT1A1*28* i l'aparició de diarrea greu concorden amb les dues metanàlisis recentment esmentades. De totes maneres, cal tenir present que la diarrea és una toxicitat bastant manejable que pot veure's emmascarada per tractaments preventius, com ara l'atropina o la loperamida. Com a limitació dels resultats observats en aquest estudi hi ha la manca de registre del moment d'aparició de la diarrea. Per tant, no podíem saber si es tractava d'una diarrea precoç (produïda en les primeres 24 hores per síndrome colinèrgica) o tardana (produïda a partir de les 24 hores per inflamació de la mucosa intestinal). Tampoc no podíem saber-ne el cicle d'aparició, dada a considerar ja que els pacients amb predisposició genètica solen presentar toxicitat en els primers cicles de tractament.

L'evidència de l'associació entre l'al·lel *UGT1A1*28* i l'aparició de toxicitat greu induïda per irinotecan, mostrada en el segon article d'aquesta tesi i avalada per la fitxa tècnica del fàrmac (233), ens van impulsar a escriure una carta a l'editor (article 3) (309). Aquesta carta anava dirigida a un article publicat a la revista *Pharmacological Research* que afirmava que la presència d'aquest al·lel no era rellevant per a la predicció de toxicitat secundària a l'irinotecan en pacients que rebessin dosis $\leq 180 \text{ mg/m}^2$ (237). Aquesta afirmació no tan sols contradeia els resultats del segon article d'aquesta tesi, on un 92% dels pacients van rebre irinotecan a la dosi de 180 mg/m² (esquema FOLFIRI), sinó també diverses publicacions que mostren que a les dosis mitjanes d'irinotecan la presència de l'al·lel *UGT1A1*28* s'associa de forma estadísticament significativa amb l'aparició d'efectes adversos greus (194,311,312). Vam detectar que en l'estudi objecte de la carta aquesta variant no complia l'equilibri de Hardy-Weinberg. Més concretament, hi havia una infrarepresentació dels pacients homozigots per a l'al·lel *UGT1A1*28*, la qual cosa podria explicar que no trobessin cap associació entre la presència d'aquesta variant i l'aparició de toxicitat greu secundària a l'irinotecan. Cal tenir present que l'estudi tenia una mida mostral relativament petita (n=158), la qual cosa podria explicar que la distribució de l'al·lel *UGT1A1*28* no complís l'equilibri de Hardy-Weinberg (p>0,05).

A més a més, en el segon estudi de la tesi també vam descriure com a marcador de toxicitat greu induïda per irinotecan l'al·lel UGT1A1*37. Prèviament ja s'havia demostrat que aquest al·lel reduïa l'activitat enzimàtica de la UGT1A1 fins i tot més que l'al·lel UGT1A1*28 (228), però no s'havien descrit pacients portadors d'aquesta variant que desenvolupessin toxicitat greu a l'irinotecan. Nosaltres vam descriure el cas d'un pacient amb genotip UGT1A1*28/*37 que va presentar una toxicitat letal (neutropènia grau 4 i neutropènia febril) tot i rebre irinotecan en monoteràpia a una dosi reduïda de 150 mg/m². Aquest pacient va ser diagnosticat d'un adenocarcinoma de sigma amb disseminació hepàtica i pulmonar irresecable. A part de tenir el genotip UGT1A1*28/*37, el pacient presentava un tumor amb la mutació G12S en el gen KRAS. Per tot plegat, es va realitzar una primera línia de tractament amb FOLFOX-bevacizumab. Després de 6 cicles de tractament el pacient presentava malaltia estable, però el TC toràcic va mostrar la presència d'un tromboembolisme pulmonar, atribuïble al bevacizumab. Per aquest motiu, a partir del 7è cicle es va administrar només FOLFOX. En els cicles posteriors va presentar neutropènies greus que van requerir l'administració de filgrastim i dues reduccions de dosi d'oxaliplatí. Després del 12è cicle, el pacient va presentar progressió de la malaltia. En aquest moment es va plantejar una segona línia de tractament. Tenint en compte la contraindicació dels anti-EGFR (per la mutació en KRAS), es va decidir l'administració d'irinotecan en monoteràpia a una dosi reduïda de 150 mg/m². No es va afegir 5-fluorouracil per minimitzar el risc de toxicitat. Tanmateix, tal i com ja s'ha comentat, el pacient va presentar una toxicitat molt greu que va acabar essent letal. Aquest cas posa de relleu la rellevància de la personalització de la teràpia en CCRm. En base al que s'ha descrit, caldria determinar també l'al·lel UGT1A1*37 (a més de l'al·lel UGT1A1*28) a qualsevol pacient amb CCRm abans de prescriure l'irinotecan.

El darrer al·lel que vam genotipar en el segon article va ser el CYP3A4*20, també denominat rs67666821. Aquest al·lel es caracteritza per la inserció d'un residu d'adenina (c.1461_1462insA), que comporta un codó de parada prematur (p.P488Tfs*494) i, per tant, la síntesi d'una proteïna truncada i inactiva (246). Nosaltres vam decidir genotipar aquest al·lel en aquesta cohort de pacients tractats amb irinotecan en base als resultats d'un estudi previ publicat per Apellániz-Ruiz et al (313). En aquest article van demostrar que els portadors d'aquesta variant mostraven una major probabilitat de presentar neuropatia greu secundària al paclitaxel i de patir modificacions en el tractament, amb el consegüent risc d'inefectivitat terapèutica (313). Com que el CYP3A4 és un dels principals enzims implicats en el metabolisme del paclitaxel, la presència d'una mutació truncant en heterozigosi causa una disminució de la seva activitat i, en conseqüència, un major risc de patir toxicitat al fàrmac. En base a aquesta premissa, i tenint en compte que el CYP3A4 també és un enzim rellevant implicat en el metabolisme de l'irinotecan (Figures 16 i 17), vam voler determinar si els pacients portadors d'aquesta mutació presentaven un risc superior de patir efectes adversos secundaris al tractament amb aquest citostàtic. Contràriament al que havíem hipotetitzat, l'únic pacient que vam trobar portador d'aquesta variant (genotip CYP3A4*1/*20), que a més era heterozigot per a l'al·lel UGT1A1*28, no va experimentar toxicitat greu. Tanmateix, caldria avaluar la tolerància al tractament amb irinotecan de més pacients portadors d'aquesta mutació per poder discernir amb major fiabilitat si es tracta o no d'un factor predictiu de toxicitat a aquest citostàtic.

Cal tenir present que, fins ara, només un estudi dut a terme en 177 pacients japonesos havia avaluat la influència de variants en el gen *CYP3A4* en l'aparició de toxicitat greu induïda per irinotecan, sense trobar cap associació estadísticament significativa (245). Altres estudis han avaluat el paper del CYP3A4 en l'aparició de toxicitat greu induïda per irinotecan a partir del nivell de 6β-hidroxicortisol (242), de l'aclariment de midazolam (243) o avaluant l'efecte d'un inhibidor com la claritromicina (244), obtenint resultats no concloents. Els nostres resultats semblarien indicar que l'activitat d'aquest enzim no és crítica per a l'aparició de toxicitat greu secundària a l'irinotecan.

Pel que fa a la freqüència poblacional de l'al·lel *CYP3A4*20*, és precís destacar que vam trobar una freqüència de només el 0,3% a la nostra mostra (un portador d'entre 308 pacients). Aquesta freqüència és menor a l'1,2 % trobat en població espanyola per Apellániz-Ruiz *et al* (249). En base a aquesta publicació, els autors van descriure un efecte fundador espanyol per a aquesta mutació. La freqüència trobada en la nostra cohort de pacients s'aproxima més a la que vam descriure prèviament en una carta a l'editor publicada a *Medicina Clínica* (314) (Annex 1). En aquesta carta vam detallar que aquesta mutació no va ser detectada en cap individu d'una mostra de 310 pacients del nostre centre tractats amb paclitaxel. Considerant ambdós articles podem concloure que hem detectat la presència de l'al·lel *CYP3A4*20* en només un individu de 618 pacients catalans analitzats (0,16%). Així doncs, la freqüència d'aquesta mutació

és possiblement menor a l'1,2% descrit per al global de la població espanyola. D'altra banda, la base de dades *CIBERER Spanish Variant Server* (http://csvs.babelomics.org/), que recull dades de seqüenciació d'exoma complet d'individus espanyols, descriu un 0,6% de portadors en heterozigosi (12 individus) de la mutació *CYP3A4*20* en una mostra analitzada de 1890 individus. No s'ha descrit cap cas d'individu portador d'aquesta mutació en homozigosi, fet lògic tenint en compte la baixa freqüència poblacional d'aquesta mutació.

Pel que fa al paper de variants funcionals en el gen *ABCB1*, els resultats de la quarta publicació de la tesi suggereixen que la presència de l'rs1128503 prediu el desenvolupament de toxicitat gastrointestinal greu (mucositis i diarrea), que és superior en els pacients amb genotip CC. Aquest resultat de l'rs1128503 es veu clarament reforçat pel fet que diversos diplotips i haplotips contenint l'al·lel C per a l'rs1128503 també han mostrat associacions estadísticament significatives amb l'aparició de toxicitat gastrointestinal greu, tal i com s'ha exposat prèviament a l'apartat de resultats (307). Tot plegat suggereix un paper rellevant d'aquest al·lel en el risc de desenvolupar toxicitat gastrointestinal greu secundària al tractament amb irinotecan. També vam trobar l'existència d'una associació estadísticament significativa entre l'rs2032582 i la presència de mucositis greu. En aquest cas, els pacients amb el genotip GG eren els que tenien un menor risc de patir mucositis greu.

Hi ha pocs estudis que hagin analitzat les variants en el gen *ABCB1* com a marcadores de toxicitat gastrointestinal greu secundària a l'irinotecan, i la majoria d'ells han mostrat resultats negatius (237,315–318). No obstant això, Cortejoso *et al* van dur a terme un estudi en una cohort de 56 pacients amb CCRm que van rebre tractament basat en irinotecan i van descriure que els pacients amb genotip CC per a la variant rs1045642 tenien una probabilitat més alta de diarrea que els pacients amb genotips CT i TT (p=0,039) (319). En línia amb aquest estudi, nosaltres vam trobar, en una mostra bastant més gran (n=308), que els pacients amb genotip CC per a la variant rs1128503 tenien un risc més elevat de diarrea (p=0,014) i mucositis (p=0,002), després d'ajustar considerant les covariables clinicopatològiques d'interès i el genotip de la *UGT1A1*. Es tracta del primer estudi que mostra aquesta associació, que es veu reforçada pels estudis funcionals de Mathijssen *et al*, que van mostrar que els pacients amb genotip TT presentaven una major exposició sistèmica a l'irinotecan (p=0,038) i a l'SN-38 (p=0,031) (320). Aquest fet es deuria a una menor excreció biliar, secundària a un pitjor funcionament de la glicoproteïna P (bomba codificada pel gen *ABCB1*). Aquesta reducció en l'excreció biliar d'irinotecan podria explicar la menor toxicitat gastrointestinal observada en els pacients amb genotip TT en la nostra mostra d'estudi.

En un intent de millorar la predicció farmacogenètica de toxicitat greu induïda per irinotecan, vam centrar el nostre estudi en les tres variants més informatives del gen *ABCB1*. Aquest enfocament ens va permetre obtenir un poder estadístic més elevat, però amb la limitació de perdre l'efecte genètic d'altres variants situades en el gen *ABCB1* o en altres transportadors d'eflux hepàtic, com ara ABCC2 o ABCG2, que també poguessin ser d'interès. Una segona limitació del nostre estudi podria ser la similitud en el perfil d'efectes adversos del 5-fluorouracil i l'irinotecan. Tanmateix, com que la glicoproteïna P no afecta la farmacocinètica del 5-FU (321), considerem que les associacions trobades es deuen a modificacions en la farmacocinètica de l'irinotecan.

Els resultats d'aquest estudi, doncs, mostren la utilitat de l'rs1128503 (a part de l'*UGT1A1*28* descrit a l'article 2), com a marcador de toxicitat gastrointestinal (diarrea i mucositis). No obstant això, caldria validar els nostres resultats en una cohort de pacients independent per poder confirmar el valor predictiu de l'rs1128503 com a marcador de toxicitat gastrointestinal greu.

El darrer estudi que involucra l'irinotecan (article 5) és l'assaig clínic fase II exposat anteriorment, en el qual els pacients amb genotip favorable per a la *UGT1A1 (UGT1A1*1/*1 i UGT1A1*1/*28)* van ser aleatoritzats a rebre l'esquema FOLFIRI amb una dosi d'irinotecan estàndard (grup control: 180 mg/m²) o una dosi superior (grup experimental: 300 mg/m² als pacients *UGT1A1*1/*1* i 260mg/m² als pacients *UGT1A1*1/*28*) (308). Prèviament ja s'havia demostrat que els pacients amb aquests genotips favorables podien tolerar dosis superiors als 180 mg/m² d'irinotecan (236,322). Aquest assaig clínic es el primer estudi aleatoritzat que confirma que les dosis superiors als 180 mg/m² en pacients amb genotip favorable per a la *UGT1A1 (UGT1A1*1/*1 i UGT1A1*1/*1 i UGT1A1*1/*28*) permeten aconseguir una major eficàcia del tractament amb FOLFIRI sense un increment significatiu dels efectes adversos secundaris. A més, el tractament amb FOLFIRI-AD va permetre augmentar el percentatge de reseccions quirúrgiques de metàstasis i millorar els resultats en el subgrup de pacients de mal pronòstic amb la mutació V600E de *BRAF*. Tanmateix, no es va obtenir una millora ni en la SLP ni en la SG.

Els nostres resultats van en la mateixa línia que diversos estudis recentment publicats que mostren resultats favorables a dosificar l'irinotecan en base al genotip de la *UGT1A1* (323–326). També permeten constatar que les recomanacions de dosi obtingudes a partir d'assaigs clínics tradicionals (com la de 180 mg/m² d'irinotecan en l'esquema FOLFIRI) s'haurien de revisar tenint en compte els marcadors genètics de toxicitat validats (com l'*UGT1A1*28* per als tractaments amb irinotecan). El nostre estudi indica que els pacients amb genotip favorable per a la *UGT1A1* podrien estar essent infradosificats quan són tractats amb l'esquema FOLFIRI amb la dosi d'irinotecan estàndard de 180 mg/m².

DISCUSSIÓ

Com a limitacions de l'estudi cal ressaltar el desequilibri existent entre ambdós grups tant pel que fa a la distribució genotípica (hi havia més pacients amb genotip *UGT1A1*1/*28* en el grup experimental) com pel que fa a la localització tumoral (hi havia menys pacients amb tumors de localització dreta en el grup experimental). Ambdós fets podrien haver afavorit el grup experimental ja que, d'una banda, hem observat un major percentatge de respostes completes i parcials en els pacients amb genotip *UGT1A1*1/*28* en relació amb els de genotip *UGT1A1*1/*1* (64,3% vs 45,9%) i, de l'altra, els tumors de localització dreta presenten un pitjor pronòstic (65,199). Per evitar aquest desequilibri i el possible biaix en els resultats, caldria haver inclòs tant el genotip de la *UGT1A1* com la localització tumoral com a factors d'estratificació. Una altra limitació important és el fet que, actualment, l'esquema FOLFIRI sol administrar-se conjuntament amb un agent biòlogic en primera línia de tractament en CCRm, fet que limita la translació dels nostres resultats a la pràctica clínica. Finalment, cal tenir present que futurs estudis haurien de contemplar també el genotip de la *UGT1A1*, tenint en compte les evidències existents sobre la seva rellevància com a marcadors genètics de toxicitat a les fluoropirimidines (219,327).

En definitiva, per aconseguir la translació a la pràctica clínica, cal que es realitzin assaigs clínics aleatoritzats fase II-III per validar la utilitat de la intensificació de dosi d'irinotecan en funció del genotip de la *UGT1A1*, però en aquest cas administrant un esquema de tractament que inclogui FOLFIRI i un agent biològic (anti-EGFR o antiangiogènic en funció de l'estat mutacional de *RAS*).

2.2. Identificació de variants somàtiques de resistència als agents anti-EGFR

El darrer estudi d'aquesta tesi (article 6) ha permès identificar noves variants genètiques somàtiques de resistència als agents anti-EGFR, fins ara no relacionades amb la manca de resposta a aquests fàrmacs.

En primer lloc, gràcies a l'ús de l'NGS i a la seva major sensibilitat, hem pogut detectar mutacions de resistència en *RAS* i *BRAF* que no s'havien detectat prèviament mitjançant la seqüenciació per Sanger. Aquest fet ja era previsible, i és un dels motius principals pels quals l'NGS està desplaçant Sanger com a tècnica per a la identificació de mutacions somàtiques (328). La identificació acurada de les mutacions somàtiques, així com el percentatge de clona mutada, és rellevant a nivell clínic, i l'NGS és actualment la tècnica de referència per establir amb precisió la fracció al·lèlica mutada de cada variant (329). Un altre dels avantatges de l'NGS és que es poden seqüenciar molts gens simultàniament. En el nostre cas, en només dos dies de treball (preparació i seqüenciació de les llibreries amb un equip NextSeq) podíem seqüenciar tots els exons de 43 gens alhora en 8 pacients, fet impensable si haguéssim pretès fer-ho mitjançant Sanger.

A més, hem pogut constatar que és possible la presència de mutacions concomitants en *BRAF* i *KRAS* o en *BRAF* i *NRAS*, tal i com suggerien alguns casos recentment publicats (46). En canvi, no hem detectat que cap pacient presentés de forma concomitant mutacions en els gens *KRAS* i *NRAS*, que tradicionalment s'han considerat mútuament excloents, tot i que recentment s'hagi descrit algun cas de concomitància (330).

També hem pogut comprovar la rellevància del percentatge de clona mutada per predir la resistència al tractament amb anti-EGFR. S'ha descrit que el percentatge de fracció al·lèlica mutada que determina la resposta/resistència al tractament amb anti-EGFR és del 5%, i que reduir-lo a un 1% no millora els resultats (329,331). En el nostre estudi, un pacient que presentava un 5% de clona mutada amb una mutació activadora en el gen *KRAS* (A146V) va presentar una bona resposta al tractament amb QT i anti-EGFR. Es tracta de l'únic pacient responedor en el qual es van detectar mutacions en *RAS*. És de suposar que la bona resposta mostrada per aquest pacient es va deure sobretot a l'esquema quimioteràpic administrat conjuntament amb l'anticòs anti-EGFR. Tanmateix, l'heterogeneïtat tumoral també podria explicar que els clons cel·lulars *RAS* natius hagin respost al tractament amb anti-EGFR.

Com a dada interessant del nostre estudi hi ha el fet que una de les mutacions detectades de resistència al tractament amb anti-EGFR és una mutació truncant en el gen *NRAS* (G115Efs*46). Es tracta d'un resultat sorprenent, ja que la immensa majoria de mutacions descrites en aquest gen (aproximadament un 95%) són *missense*, és a dir, de canvi d'aminoàcid (332). Tot i això, ja s'han descrit algunes delecions en aquest gen, tal i com es pot comprovar a la base de dades COSMIC (332), però es desconeix el seu paper com a marcadors predictius de resistència als fàrmacs anti-EGFR. La mutació identificada, consistent en una deleció ubicada a l'exó 4 del gen que genera un codó de parada prematur i, en conseqüència, una proteïna trucada, és considerada una mutació passatgera amb un efecte deleteri elevat segons Cancer Genome Interpreter (333).

A part dels gens de la família RAS, especialment *KRAS* i *NRAS*, els gens *BRAF* i *PIK3CA* també són oncogens *driver* involucrats en la carcinogènesi del CCR. Els nostres resultats confirmen el paper diferencial de les mutacions en el gen *BRAF* envers la resposta als agents anti-EGFR. Hem observat que aquelles mutacions que impliquen una alta activitat quinasa (com ara la V600E) es troben només en pacients resistents al tractament amb anti-EGFR, mentre que aquelles mutacions que generen una activitat quinasa reduïda o nul·la (com ara la D594N o la G466A) es troben només en pacients sensibles al tractament amb aquests agents biològics. Aquest fet concorda amb els resultats d'estudis previs que descriuen que les mutacions en el gen *BRAF* diferents a la V600E identifiquen un subtipus molecular de CCRm amb pronòstic favorable (263,264). A més, la mutació V600E només la vam detectar en tumors de còlon dret, mentre que les mutacions D594N i G466A les vam identificar en tumors de còlon esquerre. Estudis previs ja havien descrit

la major proporció de mutació V600E en tumors de còlon dret (334,335). Aquesta distribució diferencial de les mutacions en *BRAF* podria afectar el pronòstic dels tumors de còlon esquerre en relació amb els de còlon dret i definir un subtipus de CCR de pronòstic excel·lent. Pel que fa a la mutació E545K, el fet que s'hagi trobat en un percentatge elevat de clona mutada (>5%) tant en un pacient responedor com en un pacient resistent denota que no és crítica per a la resposta als agents anti-EGFR, tal i com havien suggerit diversos estudis previs (45,49,50). De fet, el valor predictiu de les mutacions en *PIK3CA* pel que fa a l'efectivitat dels anticossos anti-EGFR continua essent dubtós a dia d'avui.

El nostre estudi suggereix un rol important de gens relacionats amb la insulina (en concret IGF1R i IRS2) en la resposta als agents anti-EGFR. S'ha descrit que el receptor IGF1R pot estimular la via RAS i promoure la proliferació cel·lular d'una forma semblant al receptor EGFR, i que la seva funcionalitat és clau per a la via de l'EGFR (336). En conseqüència, és de suposar que mutacions activadores en aquest receptor podrien implicar una pitjor resposta a la teràpia anti-EGFR. Per tant, caldria esperar que les dues variants missense trobades en el gen IGF1R (E1218K i I668M) generin una activació d'aquest receptor que comporti una menor efectivitat del tractament amb fàrmacs anti-EGFR. Cal destacar que la variant E1218K ja havia estat descrita prèviament en un pacient amb leiomiosarcoma (337), mentre que la variant I668N no s'havia descrit abans i no apareix a la base de dades COSMIC (332). Pel que fa a la variant T1156M, identificada en el gen IRS2, ja havia estat descrita prèviament en un pacient amb càncer de còlon (337). En aquest cas, aquesta variant hauria d'afectar negativament la funcionalitat d'IRS2, ja que s'ha demostrat que el knockdown d'aquest gen comporta una menor sensibilitat a cetuximab (276). D'altra banda, i de forma anàloga a les vies activades pels receptors EGFR i IGF1R, la via del receptor PDGFRA també està involucrada en la proliferació cel·lular (338). El PDGFRA és un receptor amb activitat tirosina quinasa que es troba habitualment mutat en tumors de l'estroma gastrointestinal (339). La variant identificada en el nostre estudi com a predictora de manca de resposta als agents anti-EGFR en el gen PDGFRA afecta el seu procés d'splicing. Fins ara, un dels estudis més rellevants que ha descrit mutacions de resistència als agents anti-EGFR en aquest gen és l'estudi de Bertotti et al, que va mostrar que diverses mutacions localitzades en el domini catalític d'aquest gen podrien actuar com a mecanismes de resistència primària als agents anti-EGFR (276).

El nostre estudi també ha mostrat que variants somàtiques en els gens *LRIG1-3* podrien afectar la resposta als agents anti-EGFR. El paper com a supressor tumoral de LRIG1 és bastant conegut, i s'ha descrit que aquesta proteïna provoca una disminució en l'expressió d'EGFR (340–342). Tanmateix, el paper de LRIG2 i LRIG3 és menys conegut, i hi ha resultats contradictoris envers la seva funció (340,343–347). La variant trobada en el gen *LRIG1* (T152T), que afecta l'*splicing* del gen, s'ha trobat prèviament en dos pacients, un amb adenocarcinoma de còlon i l'altre amb càncer de bufeta. Les altres dues variants, a *LRIG2* (S697L) i *LRIG3* (V812M) encara no s'han descrit (332). Caldria conèixer de quina manera aquestes variants afecten la funcionalitat de la proteïna codificada així com el seu efecte en la quantitat de receptors EGFR en la superfície cel·lular, fet que podria afectar la resposta als fàrmacs anti-EGFR.

Cal tenir present que el nostre estudi s'ha centrat en la cerca de variants genètiques que confereixin resistència primària als agents anti-EGFR. Per tant, és raonable que no haguem trobat mutacions de resistència adquirida ubicades als dominis extracel·lulars del receptor EGFR, tals com la S492R (284,290). Tampoc no hem identificat cap variant genètica de sensibilitat als fàrmacs anti-EGFR. Aquest fet concorda amb l'evidència científica disponible fins ara, que descriu fonamentalment alteracions genètiques de resistència al tractament (348,349). De fet, els fenotips de CCRm resistents tendeixen a ser més heterogenis que els fenotips sensibles (350). Com a limitació de l'estudi cal destacar la reduïda mida mostral, la qual podria explicar la manca d'associació observada entre la localització tumoral i la resposta farmacològica. Tanmateix, tot i la reduïda mida mostral, només tres de les vuit variants somàtiques identificades havien estat descrites prèviament (332), la qual cosa reforça l'estratègia dels fenotips extrems com a aproximació útil per identificar alteracions genètiques rares.

Estudis de funcionalitat

Per donar una major validesa als resultats de l'estudi comentats anteriorment, estem realitzant estudis de funcionalitat per poder demostrar la rellevància de les variants genètiques trobades. Aquests estudis no són l'objecte de la tesi doctoral, però li donaran continuïtat i permetran donar més solidesa als resultats trobats en el darrer article.

Els estudis que s'estan realitzant, però que encara no han finalitzat, són:

- a) <u>Predicció de les estructures tridimensionals de les proteïnes amb les variants trobades:</u> es determinarà com les diferents alteracions genètiques trobades poden afectar la funcionalitat de la proteïna, les seves interaccions amb altres molècules, etc. Això es farà mitjançant la creació de models tridimensionals. Inicialment es treballarà amb les variants que generen un canvi d'aminoàcid (*missense*).
- b) <u>Realització de cultius cel·lulars</u>: l'objectiu és poder determinar si les proteïnes que codifiquen els gens en els quals s'ha identificat alguna variant de resistència als agents anti-EGFR afecten la resposta a aquests fàrmacs. Per tal de poder-ho fer, es procedirà de la següent forma:

- <u>Fase 1:</u> identificació de línies cel·lulars d'adenocarcinoma de còlon sensibles als fàrmacs anti-EGFR. S'han escollit línies cel·lulars *wild-type* per a *EGFR, RAS* (exons 2-4), *BRAF* (exó 15) i *PIK3CA* (exons 10 i 21).
- <u>Fase 2</u>: inhibició mitjançant un ARN d'interferència (siRNA) del gen d'interès. D'aquesta forma, i per comparació amb el control, es podrà veure si la inhibició d'un determinat gen comporta aparició de resistència al tractament amb anti-EGFR.
- <u>Fase 3:</u> determinar si les cèl·lules, amb la inhibició pel siRNA, es tornen resistents al tractament amb anti-EGFR.
- <u>Fase 4:</u> en cas de constatar que, en inhibir la generació d'una proteïna, les cèl·lules esdevenen resistents al tractament amb anti-EGFR, el següent pas seria, mitjançant mutagènesi dirigida, determinar si la mutació detectada produeix un efecte anàleg.

En conclusió, els resultats d'aquest estudi revelen nous mecanismes de resistència a les teràpies anti-EGFR en pacients amb CCRm i suggereixen la utilitat de futures teràpies dirigides a proteïnes relacionades amb la insulina i/o proteïnes LRIG. La utilitat d'IGF1R com a possible diana terapèutica ja ha estat avaluada prèviament, tot i que els resultats encara no són concloents. En el càncer de pulmó no microcític, la hiperactivitat d'IGF1R s'ha relacionat amb la resistència adquirida a l'erlotinib, i s'ha descrit que la inhibició simultània d'EGFR i IGF1R és eficaç per prevenir i també per superar la resistència a l'erlotinib (351). Pel que fa al CCRm, la inhibició simultània d'EGFR i IGF1R, amb cetuximab i dalotuzumab, s'ha avaluat en pacients amb CCRm *KRAS wild-type*, tot i que amb resultats negatius (352). En definitiva, els nostres resultats, juntament amb les evidències descrites fins ara, podrien motivar la realització de més estudis que avaluïn la utilitat de les proteïnes relacionades amb la insulina i les proteïnes LRIG1-3 com a possibles dianes terapèutiques en CCR.

Conclusions

En relació amb la identificació de biomarcadors pronòstics en càncer de còlon localitzat, les conclusions d'aquesta tesi són les següents:

- 1) Els biomarcadors pronòstics en càncer de còlon localitzat es veuen influenciats tant per l'estadi com per la localització tumoral, raó per la qual cal estratificar els pacients considerant aquests paràmetres.
- 2) En pacients amb càncer de còlon d'estadi II, els rs9513070 (*VEGFR1*) i rs1137282 (*KRAS*) s'associen amb la supervivència global.
- 3) En pacients amb càncer de còlon esquerre, l'rs9513070 (VEGFR1) s'associa amb la supervivència lliure de recaiguda i la supervivència global i l'rs35251833 (ITGAV) s'associa amb la supervivència lliure de recaiguda.

Pel que fa a la identificació de marcadors genètics de toxicitat a l'irinotecan i a la seva aplicabilitat clínica, les conclusions d'aquesta tesi són les següents:

- L'al·lel UGT1A1*28 està associat de forma estadísticament significativa amb l'aparició de diarrea, neutropènia i astènia greus induïdes per irinotecan. Es tracta d'un bon marcador predictiu de toxicitat a l'irinotecan a les dosis habituals de l'esquema FOLFIRI (dosi d'irinotecan= 180 mg/m²). Els pacients homozigots per a aquest al·lel són els que presenten un major risc de toxicitat.
- L'al·lel UGT1A1*37, de molt baixa freqüència en població caucàsica, sembla predir també el desenvolupament de toxicitat greu induïda per irinotecan, en reduir l'activitat enzimàtica de la UGT1A1 fins i tot més que l'al·lel UGT1A1*28.
- 3) No s'ha trobat associació entre la presència de l'al·lel *CYP3A4*20* i l'aparició de toxicitat greu induïda per irinotecan.
- Dues variants ubicades en el gen ABCB1 s'associen amb l'aparició de toxicitat gastrointestinal greu secundària al tractament amb irinotecan: l'rs1128503 s'associa amb diarrea i mucositis i l'rs2032582 s'associa amb mucositis.

5) Els pacients amb CCRm amb genotip *UGT1A1*1/*1* i *UGT1A1*1/*28*, en ser tractats amb FOLFIRI amb altes dosis d'irinotecan (dosi de 300 mg/m² i 260 mg/m², respectivament) assoleixen una millor taxa de resposta objectiva que els pacients tractats amb FOLFIRI amb la dosi estàndard d'irinotecan de 180 mg/m², sense que es produeixi un increment significatiu de la toxicitat greu.

En relació amb la identificació de variants genètiques somàtiques de resistència als agents anti-EGFR, les conclusions d'aquesta tesi són les següents:

- L'ús de l'NGS permet identificar mutacions somàtiques amb fiabilitat encara que la seva fracció al·lèlica sigui baixa.
- 2) En tumors colorectals poden coexistir-hi mutacions activadores en *BRAF* (com ara la V600E) i *KRAS/NRAS*.
- 3) L'activitat quinasa de les mutacions de BRAF és determinant en la resposta als agents anti-EGFR. La mutació V600E (alta activitat quinasa) confereix resistència al tractament amb anti-EGFR, mentre que les mutacions amb baixa activitat quinasa, com ara la D594N o la G466A, confereixen sensibilitat al tractament amb anti-EGFR.
- 4) La distribució diferencial de les mutacions de *BRAF*, amb una major presència de la mutació V600E en els pacients amb càncer de còlon dret, podria contribuir a la diferència de pronòstic entre els tumors de còlon dret i esquerre.
- 5) La mutació de *PIK3CA* E545K no és determinant en la resposta als fàrmacs anti-EGFR.
- 6) Diverses variants somàtiques localitzades en gens relacionats amb la insulina (I668N i E1218K en el gen *IGF1R*, T1156M en el gen *IRS2*) i de la família LRIG (T152T en el gen *LRIG1*, S697L en el gen *LRIG2* i V812M en el gen *LRIG3*) ocasionen resistència al tractament amb anti-EGFR.

Bibliografia

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018; 68(6):394–424.
- 2. O'Keefe SJD. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2016; 13(12):691–706.
- Welch HG, Robertson DJ. Colorectal Cancer on the Decline Why Screening Can't Explain It All. N Engl J Med 2016; 374(17):1605–7.
- 4. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, et al. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. Ann Oncol 2018; 29(4):1016–22.
- Pla director d'Oncologia. Departament de Salut. Generalitat de Catalunya. Dades de 2017 [citat novembre 2019]. Disponible a: https://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_A-Z/C/cancer/recursos_prof/estadistiques/2017_ccr.pdf
- 6. Clèries R, Ameijide A, Marcos-Gragera R, Pareja L, Carulla M, Vilardell M-L, et al. Predicting the cancer burden in Catalonia between 2015 and 2025: the challenge of cancer management in the elderly. Clin Transl Oncol 2018; 20(5):647–57.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. Guttmacher AE, Collins FS, editors. N Engl J Med 2003; 348(10):919–32.
- Noone AM, Howlader N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2015/
- 9. Bailey CE, Hu C-Y, You YN, Bednarski BK, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, et al. Increasing Disparities in the Age-Related Incidences of Colon and Rectal Cancers in the United States, 1975-2010. JAMA Surg 2015; 150(1):17–22.
- 10. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo A-G, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. Mol Oncol 2019; 13(2):109–31.
- 11. Kasi PM, Shahjehan F, Cochuyt JJ, Li Z, Colibaseanu DT, Merchea A. Rising Proportion of Young Individuals With Rectal and Colon Cancer. Clin Colorectal Cancer 2018; 18(1):e87–95.
- 12. Dorak MT, Karpuzoglu E. Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. Front Genet 2012; 3:268.
- Islami F, Goding Sauer A, Miller KD, Siegel RL, Fedewa SA, Jacobs EJ, et al. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. CA Cancer J Clin 2018; 68(1):31–54.
- Carr PR, Jansen L, Bienert S, Roth W, Herpel E, Kloor M, et al. Associations of red and processed meat intake with major molecular pathological features of colorectal cancer. Eur J Epidemiol 2017; 32(5):409–18.

- 15. Vieira AR, Abar L, Chan DSM, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, et al. Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. Ann Oncol 2017; 28(8):1788–802.
- 16. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F, van den Brandt PA, et al. Dietary Fiber Intake and Risk of Colorectal Cancer. JAMA 2005; 294(22):2849–57.
- Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, O'Sullivan MJ, et al. Calcium plus Vitamin D Supplementation and the Risk of Colorectal Cancer. N Engl J Med 2006; 354(7):684– 96.
- Baron JA, Barry EL, Mott LA, Rees JR, Sandler RS, Snover DC, et al. A Trial of Calcium and Vitamin D for the Prevention of Colorectal Adenomas. N Engl J Med 2015; 373(16):1519–30.
- 19. Carchman E. Crohn's Disease and the Risk of Cancer. Clin Colon Rectal Surg 2019; 32(4):305–13.
- Vasen HFA, Tomlinson I, Castells A. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2015; 12(2):88–97.
- Ng K, Meyerhardt JA, Wu K, Feskanich D, Hollis BW, Giovannucci EL, et al. Circulating 25-Hydroxyvitamin D Levels and Survival in Patients With Colorectal Cancer. J Clin Oncol 2008; 26(18):2984–91.
- 22. Fuchs MA, Yuan C, Sato K, Niedzwiecki D, Ye X, Saltz LB, et al. Predicted vitamin D status and colon cancer recurrence and mortality in CALGB 89803 (Alliance). Ann Oncol 2017; 28(6):1359–67.
- Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. N Engl J Med 2009; 361(25):2449–60.
- 24. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. N Engl J Med 1988; 319(9):525–32.
- 25. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science 2013; 340(6127):1546–58.
- Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. Cell Signal 2014;
 26(3):570–9.
- 27. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61(5):759–67.
- 28. Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Histopathology 2010; 56(2):167–79.
- 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(6429):558–61.
- 30. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? Biomed Res Int 2015; 2015:149014.
- 31. Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, Geva R, Jäger D, Hara H, et al. Phase II Open-Label Study of

Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability–High/Mismatch Repair–Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. J Clin Oncol 2020; 38(1):11-19.

- O'Neil BH, Wallmark JM, Lorente D, Elez E, Raimbourg J, Gomez-Roca C, et al. Safety and antitumor activity of the anti–PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. PLoS One 2017; 12(12):e0189848.
- 33. Andre T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt CJA, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: The phase 3 KEYNOTE-177 Study. J Clin Oncol 2020;38(18_suppl):LBA4–LBA4.
- 34. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. Cancer Res 1997; 57(5):808–11.
- 35. Bae JM, Kim JH, Kang GH. Epigenetic alterations in colorectal cancer: the CpG island methylator phenotype. Histol Histopathol 2013; 28(5):585–95.
- Hammoud SS, Cairns BR, Jones DA. Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells.
 Curr Opin Cell Biol 2013; 25(2):177–83.
- 37. Issa J-P. CpG island methylator phenotype in cancer. Nat Rev Cancer 2004; 4(12):988–93.
- 38. Kim JH, Bae JM, Cho NY, Kang GH. Distinct features between MLH1-methylated and unmethylated colorectal carcinomas with the CpG island methylator phenotype: Implications in the serrated neoplasia pathway. Oncotarget 2016; 7(12):14095–111.
- 39. Bourdais R, Rousseau B, Pujals A, Boussion H, Joly C, Guillemin A, et al. Polymerase proofreading domain mutations: New opportunities for immunotherapy in hypermutated colorectal cancer beyond MMR deficiency. Crit Rev Oncol Hematol 2017; 113:242–8.
- 40. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9(7):517–
 31.
- 41. Russo AL, Borger DR, Szymonifka J, Ryan DP, Wo JY, Blaszkowsky LS, et al. Mutational analysis and clinical correlation of metastatic colorectal cancer. Cancer 2014; 120(10):1482–90.
- 42. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and *RAS* mutations in colorectal cancer. N Engl J Med 2013; 369(11):1023–34.
- 43. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. Genes Cancer 2011; 2(3):344–58.
- 44. Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, Pratilas CA, Taylor BS, Chitale D, et al. Genomic and biological characterization of exon 4 *KRAS* mutations in human cancer. Cancer Res 2010; 70(14):5901–11.
- 45. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet

Oncol 2010; 11(8):753-62.

- 46. Midthun L, Shaheen S, Deisch J, Senthil M, Tsai J, Hsueh CT. Concomitant *KRAS* and *BRAF* mutations in colorectal cancer. J Gastrointest Oncol 2019; 10(3):577–81.
- 47. Ates O, Yalcin S. Concomitant *RAS* and *BRAF* mutation in colorectal cancer A report of 7 cases. Indian J Cancer 2019; 56(2):176–9.
- 48. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, Korhonen M, et al. *BRAF* mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Virchows Arch 2013; 463(5):613–21.
- 49. Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, Hanson JE, O'Callaghan CJ, Marginean C, et al. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer-results from NCIC CTG/AGITG CO.17. Clin Cancer Res 2014; 20(3):744–53.
- 50. Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, De Roock W, Biesmans B, Claes B, et al. *PIK3CA* mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res 2009; 15(9):3184–8.
- 51. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. *APC* mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature 1992; 359(6392):235–7.
- 52. Korinek V, Barker N, Morin PJ, Van Wichen D, De Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC(-/-) colon carcinoma. Science 1997; 275(5307):1784–7.
- 53. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of β-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β-catenin or APC. Science 1997; 275(5307):1787–90.
- 54. Lane DP. p53, guardian of the genome. Nature 1992; 358(6381):15–6.
- 55. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DVF, Iglesias M, Céspedes MV, et al. Dependency of Colorectal Cancer on a TGF-β-Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation. Cancer Cell 2012; 22(5):571–84.
- 56. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llergo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGFβ drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. Nature 2018; 554(7693):538–43.
- 57. Fessler E, Drost J, van Hooff SR, Linnekamp JF, Wang X, Jansen M, et al. TGFβ signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype. EMBO Mol Med 2016; 8(7):745–60.
- 58. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llergo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, Iglesias M, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. Nat Genet 2015; 47(4):320–9.
- 59. Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. J Surg Oncol 2004; 88(4):261–6.
- 60. Kavuri SM, Jain N, Galimi F, Cottino F, Leto SM, Migliardi G, et al. HER2 Activating Mutations Are

Targets for Colorectal Cancer Treatment. Cancer Discov 2015; 5(8):832–41.

- Lee MS, Menter DG, Kopetz S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. J Natl Compr Canc Netw 2017; 15(3):411–9.
- Sinicrope FA, Mahoney MR, Yoon HH, Smyrk TC, Thibodeau SN, Goldberg RM, et al. Analysis of Molecular Markers by Anatomic Tumor Site in Stage III Colon Carcinomas from Adjuvant Chemotherapy Trial NCCTG N0147 (Alliance). Clin Cancer Res 2015; 21(23):5294–304.
- 63. Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC, Thibodeau SN, Warren RS, Bertagnolli MM, et al. Prognostic Impact of Deficient DNA Mismatch Repair in Patients With Stage III Colon Cancer From a Randomized Trial of FOLFOX-Based Adjuvant Chemotherapy. J Clin Oncol 2013; 31(29):3664–72.
- 64. Sinicrope FA, Shi Q, Allegra CJ, Smyrk TC, Thibodeau SN, Goldberg RM, et al. Association of DNA Mismatch Repair and Mutations in *BRAF* and *KRAS* With Survival After Recurrence in Stage III Colon Cancers. JAMA Oncol 2017; 3(4):472–80.
- 65. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer. JAMA Oncol 2017; 3(2):211–9.
- 66. Merlano MC, Granetto C, Fea E, Ricci V, Garrone O. Heterogeneity of colon cancer: From bench to bedside. ESMO Open 2017; 2(3):e000218.
- 67. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med 2015; 21(11):1350–6.
- Pilati C, Taieb J, Balogoun R, Marisa L, de Reyniès A, Laurent-Puig P. CDX2 prognostic value in stage
 II/III resected colon cancer is related to CMS classification. Ann Oncol 2017; 28(5):1032–5.
- Thompson MR, O'Leary DP, Flashman K, Asiimwe A, Ellis BG, Senapati A. Clinical assessment to determine the risk of bowel cancer using Symptoms, Age, Mass and Iron deficiency anaemia (SAMI). Br J Surg 2017; 104(10):1393–404.
- Hewitson P, Glasziou P, Watson E, Towler B, Irwig L. Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. Am J Gastroenterol 2008; 103(6):1541–9.
- 71. Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. CA Cancer J Clin 2018; 68(4):250–81.
- 72. Pla Director d'Oncologia 2017-2019. Departament de Salut. Generalitat de Catalunya. L'Hospitalet de Llobregat, setembre de 2017.
- 73. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. World J Gastroenterol 2016; 22(5):1745–55.
- 74. Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. Ann Intern Med 1986; 104(1):66–73.
- 75. Bhatti I, Patel M, Dennison AR, Thomas MW, Garcea G. Utility of postoperative CEA for surveillance

of recurrence after resection of primary colorectal cancer. Int J Surg 2015; 16(Part A):123-8.

- 76. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR BR, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC HK, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE SR, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M GD, LR. M. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. New York, NY: Springer, 2017: 252-254.
- 77. Colorectal cancer stages. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Data d'accés:
 16-01-2020. <https://www.nih.gov/research-training/advances-colorectal-cancer-research/.
- 78. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2014; 25(suppl 3):iii1–9.
- 79. Institut Català d'Oncologia (ICO): ICOPraxi per al tractament mèdic i amb irradiació del càncer colorectal; desembre 2012 [citat gener 2020].
- 80. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol 2016; 27(8):1386–422.
- Hannah Crooke, Monica Kobayashi, Brian Mitchell, Esmond Nwokeji, Melissa Laurie, Shital Kamble, Mike McKenna, Ashiq Masood and BK. Estimating 1- and 5-year relative survival trends in colorectal cancer (CRC) in the United States: 2004 to 2014. J Clin Oncol 2018; 36:4_suppl:587–587.
- 82. Fitxa tècnica pembrolizumab (Keytruda). FDA. Data de consulta: 12-06-2020.
- 83. Fitxa tècnica nivolumab (Opdivo). FDA. Data de consulta: 12-06-2020.
- 84. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Colon Cancer v.4.2020. The National Comprehensive Cancer Network, Inc. http://www.nccn.org (consultada el juny de 2020).
- Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. Nature 2012; 483(7387):100–3.
- Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, Kwak EL, Ryan DP, Bendell JC, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in *BRAF* V600–Mutant Colorectal Cancer. J Clin Oncol 2015; 33(34):4023–31.
- Corcoran RB, André T, Atreya CE, Schellens JHM, Yoshino T, Bendell JC, et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAFV600E-Mutant Colorectal Cancer. Cancer Discov 2018; 8(4):428–43.
- Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in *BRAF* V600E–Mutated Colorectal Cancer. N Engl J Med 2019; 381(17):1632–43.
- 89. Sánchez-Martín FJ, Bellosillo B, Gelabert-Baldrich M, Dalmases A, Cañadas I, Vidal J, et al. The Firstin-class Anti-EGFR Antibody Mixture Sym004 Overcomes Cetuximab Resistance Mediated by EGFR Extracellular Domain Mutations in Colorectal Cancer. Clin Cancer Res 2016; 22(13):3260–7.

- 90. Siena S, Sartore-Bianchi A, Marsoni S, Hurwitz HI, McCall SJ, Penault-Llorca F, et al. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. Ann Oncol 2018; 29(5):1108–19.
- 91. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, *KRAS* codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol 2016; 17(6):738–46.
- 92. Hainsworth JD, Meric-Bernstam F, Swanton C, Hurwitz H, Spigel DR, Sweeney C, et al. Targeted Therapy for Advanced Solid Tumors on the Basis of Molecular Profiles: Results From MyPathway, an Open-Label, Phase IIa Multiple Basket Study. J Clin Oncol 2018; 36(6):536–42.
- 93. Meric-Bernstam F, Hurwitz H, Raghav KPS, McWilliams RR, Fakih M, VanderWalde A, et al. Pertuzumab plus trastuzumab for HER2-amplified metastatic colorectal cancer (MyPathway): an updated report from a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. Lancet Oncol 2019; 20(4):518–30.
- 94. Siena S, Di Bartolomeo M, Raghav KPS, Masuishi T, Loupakis F, Kawakami H, et al. A phase II, multicenter, open-label study of trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients (pts) with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (mCRC): DESTINY-CRC01. J Clin Oncol 2020; 38(15_suppl):4000.
- 95. Belli V, Matrone N, Napolitano S, Migliardi G, Cottino F, Bertotti A, et al. Combined blockade of MEK and PI3KCA as an effective antitumor strategy in HER2 gene amplified human colorectal cancer models. J Exp Clin Cancer Res 2019; 38(1):236.
- 96. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. Nature 2019; 575(7781):217–23.
- 97. AMG 510 First to Inhibit "Undruggable" KRAS. Cancer Discov 2019; 9(8):988–9.
- 98. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Pizzutilo EG, Tosi F, Siena S. Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of *NTRK* gene fusions in cancer. Ann Oncol 2019; 30(8):viii5–15.
- 99. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. N Engl J Med 2018; 378(8):731–9.
- 100. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. CA Cancer J Clin 2016; 66(4):271–89.
- 101. Lacy AM, Delgado S, Castells A, Prins HA, Arroyo V, Ibarzabal A, et al. The long-term results of a randomized clinical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer. Ann Surg 2008; 248(1):1–7.
- 102. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG, et al. Pooled analysis of fluorouracilbased adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? J Clin Oncol

2004; 22(10):1797-806.

- 103. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. N Engl J Med 2005; 352(26):2696–704.
- 104. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. N Engl J Med 2004; 350(23):2343–51.
- 105. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. J Clin Oncol 2011; 29(11):1465–71.
- 106. Schmoll H-J, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil/Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: Final Results of the NO16968 Randomized Controlled Phase III Trial. J Clin Oncol 2015; 33(32):3733– 40.
- 107. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. J Clin Oncol 2011; 29(28):3768–74.
- 108. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, 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(19):3109–16.
- 109. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. J Clin Oncol 2015; 33(16):1787–96.
- 110. Böckelman C, Engelmann BE, Kaprio T, Hansen TF, Glimelius B. Risk of recurrence in patients with colon cancer stage II and III: a systematic review and meta-analysis of recent literature. Acta Oncol 2015; 54(1):5–16.
- 111. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. J Clin Oncol 2011; 29(10):1261–70.
- 112. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA Mismatch Repair Status and Colon Cancer Recurrence and Survival in Clinical Trials of 5-Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy. JNCI J Natl Cancer Inst 2011; 103(11):863–75.
- 113. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. N Engl J Med 2003; 349(3):247–57.
- 114. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective Mismatch Repair As a Predictive Marker for Lack of Efficacy of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy in Colon

Cancer. J Clin Oncol 2010; 28(20):3219–26.

- 115. 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(1):65–71.
- 116. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, 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(15):2912–9.
- 117. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph Node Evaluation and Survival After Curative Resection of Colon Cancer: Systematic Review. JNCI J Natl Cancer Inst 2007; 99(6):433–41.
- 118. Dalerba P, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, et al. CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. N Engl J Med 2016; 374(3):211–22.
- 119. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. Sci Transl Med 2016; 8(346):346ra92.
- 120. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. N Engl J Med 2018; 378(13):1177–88.
- 121. McCleary NJ, Meyerhardt JA, Green E, Yothers G, de Gramont A, Van Cutsem E, et al. Impact of age on the efficacy of newer adjuvant therapies in patients with stage II/III colon cancer: findings from the ACCENT database. J Clin Oncol 2013; 31(20):2600–6.
- 122. Bosset J-F, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, et al. Enhanced tumorocidal effect of chemotherapy with preoperative radiotherapy for rectal cancer: preliminary results--EORTC 22921. J Clin Oncol 2005; 23(24):5620–7.
- 123. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. N Engl J Med 2006; 355(11):1114–23.
- 124. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, Matzdorff A, Laechelt S, Hartmann JT, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: A randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. Lancet Oncol 2012; 13(6):579–88.
- 125. O'Connell MJ, Colangelo LH, Beart RW, Petrelli NJ, Allegra CJ, Sharif S, et al. Capecitabine and oxaliplatin in the preoperative multimodality treatment of rectal cancer: surgical end points from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trial R-04. J Clin Oncol 2014; 32(18):1927–34.
- 126. Hospers G, Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, Marijnen C, Putter H, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before TME in locally advanced rectal cancer: The randomized RAPIDO trial. J Clin Oncol 2020; 38(15_suppl):4006.
- 127. Delaunoit T, Alberts SR, Sargent DJ, Green E, Goldberg RM, Krook J, et al. Chemotherapy permits resection of metastatic colorectal cancer: experience from Intergroup N9741. Ann Oncol 2005; 16(3):425–9.

- 128. Gruenberger B, Tamandl D, Schueller J, Scheithauer W, Zielinski C, Herbst F, et al. Bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin as neoadjuvant therapy for patients with potentially curable metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008; 26(11):1830–5.
- 129. Wong R, Cunningham D, Barbachano Y, Saffery C, Valle J, Hickish T, et al. A multicentre study of capecitabine, oxaliplatin plus bevacizumab as perioperative treatment of patients with poor-risk colorectal liver-only metastases not selected for upfront resection. Ann Oncol 2011; 22(9):2042–8.
- Nasti G, Piccirillo MC, Izzo F, Ottaiano A, Albino V, Delrio P, et al. Neoadjuvant FOLFIRI+bevacizumab in patients with resectable liver metastases from colorectal cancer: a phase 2 trial. Br J Cancer 2013; 108(8):1566–70.
- 131. Ye LC, Liu TS, Ren L, Wei Y, Zhu DX, Zai SY, et al. Randomized controlled trial of cetuximab plus chemotherapy for patients with KRAS wild-type unresectable colorectal liver-limited metastases. J Clin Oncol 2013; 31(16):1931–8.
- 132. Primrose J, Falk S, Finch-Jones M, Valle J, O'Reilly D, Siriwardena A, et al. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis: The New EPOC randomised controlled trial. Lancet Oncol 2014; 15(6):601–11.
- 133. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein W, Raab HR, Weitz J, Lordick F, et al. Survival of patients with initially unresectable colorectal liver metastases treated with FOLFOX/cetuximab or FOLFIRI/cetuximab in a multidisciplinary concept (CELIM study). Ann Oncol 2014; 25(5):1018–25.
- 134. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med 2008; 358(11):1160–74.
- 135. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2004; 350(23):2335–42.
- 136. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor *KRAS* and *BRAF* mutation status. J Clin Oncol 2011; 29(15):2011–9.
- 137. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2009; 360(14):1408–17.
- 138. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2009; 27(5):663–71.
- 139. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, 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(7):1535–46.

- 140. Gómez-España MA, Gallego J, González-Flores E, Maurel J, Páez D, Sastre J, et al. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer (2018). Clin Transl Oncol 2019; 21(1):46–54.
- 141. Cremolini C, Antoniotti C, Lonardi S, Bergamo F, Cortesi E, Tomasello G, et al. Primary tumor sidedness and benefit from FOLFOXIRI plus bevacizumab as initial therapy for metastatic colorectal cancer. Retrospective analysis of the TRIBE trial by GONO. Ann Oncol 2018; 29(7):1528–34.
- 142. Tabernero J, Yoshino T, Cohn A, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blin. Lancet Oncol 2015; 16(5):499–508.
- 143. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. J Clin Oncol 2012; 30(28):3499–506.
- 144. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008; 26(10):1626–34.
- 145. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. N Engl J Med 2007; 357(20):2040–8.
- 146. de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouché O, Etienne PL, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: A French intergroup study. J Clin Oncol 1997; 15(2):808–15.
- 147. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol 2000; 18(16):2938–47.
- 148. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. Lancet 2000; 355(9209):1041–7.
- 149. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. J Clin Oncol 2004; 22(2):229–37.
- 150. Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. XELOX vs FOLFOX-4 as firstline therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966 updated results. Br J Cancer 2011; 105(1):58–64.

- 151. Garcia-Alfonso P, Mũoz-Martin A, Mendez-Urẽa M, Quiben-Pereira R, Gonzalez-Flores E, Perez-Manga G. Capecitabine in combination with irinotecan (XELIRI), administered as a 2-weekly schedule, as first-line chemotherapy for patients with metastatic colorectal cancer: A phase II study of the Spanish GOTI group. Br J Cancer 2009; 101(7):1039–43.
- 152. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan- refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2004; 351(4):337–45.
- 153. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, 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(14):2311–9.
- 154. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. *K-ras* mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med 2008; 359(17):1757–65.
- 155. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, 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(31):4697–705.
- 156. Cremolini C, Antoniotti C, Lonardi S, Aprile G, Bergamo F, Masi G, et al. Activity and safety of cetuximab plus modified folfoxiri followed by maintenance with cetuximab or bevacizumab for *RAS* and *BRAF* wild-type metastatic colorectal cancer a randomized phase 2 clinical trial. JAMA Oncol 2018; 4(4):529–36.
- 157. Modest DP, Martens UM, Riera-Knorrenschild J, Greeve J, Florschütz A, Wessendorf S, et al. FOLFOXIRI plus panitumumab as first-line treatment of *RAS* wild-type metastatic colorectal cancer: The randomized, open-label, phase II Volfi study (AIO KRK0109). J Clin Oncol 2019; 37(35):3401–11.
- 158. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, 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(31):4706–13.
- 159. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: Updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. Lancet Oncol 2015; 16(13):1306–15.
- 160. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, 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(12):1539–44.

- Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Osterlund P, Greil R, Van Cutsem E, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2013; 14(1):29–37.
- 162. Bennouna J, Hiret S, Bertaut A, Bouché O, Deplanque G, Borel C, et al. Continuation of Bevacizumab vs Cetuximab Plus Chemotherapy after First Progression in KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: The UNICANCER PRODIGE18 Randomized Clinical Trial. JAMA Oncol 2019; 5(1):83–90.
- 163. Heinemann V, Rivera F, O'Neil BH, Stintzing S, Koukakis R, Terwey JH, et al. A study-level metaanalysis of efficacy data from head-to-head first-line trials of epidermal growth factor receptor inhibitors versus bevacizumab in patients with *RAS* wild-type metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer 2016; 67:11–20.
- 164. Zaniboni A, Formica V. The Best. First. Anti-EGFR before anti-VEGF, in the first-line treatment of RAS wild-type metastatic colorectal cancer: from bench to bedside. Cancer Chemother Pharmacol 2016; 78(2):233-44.
- 165. Derangère V, Fumet JD, Boidot R, Bengrine L, Limagne E, Chevriaux A, et al. Does bevacizumab impact anti-EGFR therapy efficacy in metastatic colorectal cancer? Oncotarget 2016; 7(8):9309–21.
- 166. Informe de Posicionamiento Terapéutico de ramucirumab (Cyramza[®]) en cáncer colorrectal metastásico. IPT, 50/2016. Versión 1. Fecha de publicación: 21 de noviembre de 2016.
- 167. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet 2013; 381(9863):303–12.
- 168. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2015; 372(20):1909–19.
- Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. N Engl J Med
 2018; 379(18):1754–65.
- 170. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol 2013; 10(8):472–84.
- 171. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer 2011; 11(6):426–37.
- 172. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. J Clin Oncol 2014; 32(6):579–
 86.
- 173. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of *KRAS* and *BRAF* mutations from circulating tumor DNA. Nat Med 2014; 20(4):430–5.
- 174. Adalsteinsson VA, Ha G, Freeman SS, Choudhury AD, Stover DG, Parsons HA, et al. Scalable wholeexome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. Nat Commun 2017; 8(1):1324.

- 175. Zill OA, Greene C, Sebisanovic D, Siew LM, Leng J, Vu M, et al. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. Cancer Discov 2015; 5(10):1040–8.
- 176. Schrock AB, Pavlick D, Klempner SJ, Chung JH, Forcier B, Welsh A, et al. Hybrid Capture–Based Genomic Profiling of Circulating Tumor DNA from Patients with Advanced Cancers of the Gastrointestinal Tract or Anus. Clin Cancer Res 2018; 24(8):1881–90.
- 177. Grasselli J, Elez E, Caratù G, Matito J, Santos C, Macarulla T, et al. Concordance of blood- and tumorbased detection of *RAS* mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. Ann Oncol 2017; 28(6):1294–301.
- 178. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA *RAS* mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. Ann Oncol 2017; 28(6):1325–32.
- 179. Strickler JH, Loree JM, Ahronian LG, Parikh AR, Niedzwiecki D, Pereira AAL, et al. Genomic Landscape of Cell-Free DNA in Patients with Colorectal Cancer. Cancer Discov 2018; 8(2):164–73.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor
 DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. Sci Transl Med 2014; 6(224):224ra24.
- Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. Nat Med 2015; 21(7):795– 801.
- 182. Kim TW, Peeters M, Thomas A, Gibbs P, Hool K, Zhang J, et al. Impact of Emergent Circulating Tumor DNA RAS Mutation in Panitumumab-Treated Chemoresistant Metastatic Colorectal Cancer. Clin Cancer Res 2018; 24(22):5602–9.
- 183. Peeters M, Price T, Boedigheimer M, Kim TW, Ruff P, Gibbs P, et al. Evaluation of Emergent Mutations in Circulating Cell-Free DNA and Clinical Outcomes in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with Panitumumab in the ASPECCT Study. Clin Cancer Res 2019; 25(4):1216–25.
- 184. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. Nature 2012; 486(7404):532–6.
- 185. Siravegna G, Bardelli A. Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance. Genome Biol 2014; 15(8):449.
- 186. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. Nature 2012; 486(7404):537–40.
- 187. Meador CB, Lovly CM. Liquid biopsies reveal the dynamic nature of resistance mechanisms in solid tumors. Nat Med 2015; 21(7):663–5.
- 188. Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature 2013; 497(7447):108–12.

- 189. Montagut C, Siravegna G, Bardelli A. Liquid biopsies to evaluate early therapeutic response in colorectal cancer. Ann Oncol 2015; 26(8):1525–7.
- 190. Cremolini C, Rossini D, Dell'Aquila E, Lonardi S, Conca E, Del Re M, et al. Rechallenge for Patients with *RAS* and *BRAF* Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer with Acquired Resistance to First-line Cetuximab and Irinotecan: A Phase 2 Single-Arm Clinical Trial. JAMA Oncol 2019; 5(3):343–50.
- 191. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. Science 2018; 359(6378):926–30.
- 192. Relling M V., Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. Nature 2015; 526(7573):343–50.
- 193. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, 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(12):2091–6.
- 194. Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Del Rio E, Gómez-Pardo M, Baiget M. *UGT1A1* gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. Br J Cancer 2004; 91(4):678–82.
- 195. Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, Guérin 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(15):5151–9.
- 196. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244(4905):707–12.
- 197. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by *HER2* Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review. J Clin Oncol 2010; 28(1):92–8.
- 198. Cunningham D, Atkin W, Lenz H-J, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. Lancet 2010; 375(9719):1030–47.
- 199. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y. The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. J Gastrointest Surg 2016; 20(3):648–55.
- 200. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. J Clin Oncol 2009; 27(31):5131–7.
- 201. Skancke M, Arnott SM, Amdur RL, Siegel RS, Obias VJ, Umapathi BA. Lymphovascular invasion and perineural invasion negatively impact overall survival for stage II adenocarcinoma of the colon. Dis Colon Rectum 2019; 62(2):181–8.
- 202. Sanz-Garcia E, Argiles G, Elez E, Tabernero J. *BRAF* mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. Ann Oncol 2017; 28(11):2648–57.
- 203. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in
human cancer. Nature 2002; 417(6892):949–54.

- 204. Dunne PD, Dasgupta S, Blayney JK, McArt DG, Redmond KL, Weir J-A, et al. EphA2 Expression Is a Key Driver of Migration and Invasion and a Poor Prognostic Marker in Colorectal Cancer. Clin Cancer Res 2016; 22(1):230–42.
- 205. Korphaisarn K, Morris VK, Overman MJ, Fogelman DR, Kee BK, Raghav KPS, et al. FBXW7 missense mutation: A novel negative prognostic factor in metastatic colorectal adenocarcinoma. Oncotarget 2017; 8(24):39268–79.
- 206. Tie J, Cohen JD, Wang Y, Christie M, Simons K, Lee M, et al. Circulating tumor dna analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III colon cancer. JAMA Oncol 2019; 5(12):1710–7.
- 207. Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. Invest New Drugs 2000; 18(4):299–313.
- 208. Santi D V, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5fluorodeoxyuridylate. Biochemistry 1974; 13(3):471–81.
- 209. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer 2003; 3(5):330–8.
- 210. Walko CM, Lindley C. Capecitabine: a review. Clin Ther 2005; 27(1):23–44.
- 211. Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M, et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. J Clin Oncol 2001; 19(8):2282–92.
- 212. Bajetta E, Procopio G, Celio L, Gattinoni L, Della Torre S, Mariani L, et al. Safety and efficacy of two different doses of capecitabine in the treatment of advanced breast cancer in older women. J Clin Oncol 2005; 23(10):2155–61.
- 213. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, et al. Oral Capecitabine Compared With Intravenous Fluorouracil Plus Leucovorin in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results of a Large Phase III Study. J Clin Oncol 2001; 19(21):4097–106.
- 214. Fluorouracil injection drug label. Food and Drug Administration. [Data d'accés: 13/02/2020].
- 215. Raida M, Schwabe W, Häusler P, Van Kuilenburg AB, Van Gennip AH, Behnke D, et al. Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (*DPD*) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)- related toxicity compared with controls. Clin Cancer Res 2001; 7(9):2832–9.
- Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. J Clin Oncol 2008; 26(13):2131–8.

- 217. Henricks LM, Lunenburg CATC, Meulendijks D, Gelderblom H, Cats A, Swen JJ, et al. Translating DPYD genotype into DPD phenotype: using the *DPYD* gene activity score. Pharmacogenomics 2015; 16(11):1277–86.
- 218. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JHM. Part 2: Pharmacogenetic Variability in Drug Transport and Phase I Anticancer Drug Metabolism. Oncologist 2011; 16(6):820–34.
- 219. Henricks LM, Opdam FL, Beijnen JH, Cats A, Schellens JHM. *DPYD* genotype-guided dose individualization to improve patient safety of fluoropyrimidine therapy: call for a drug label update. Ann Oncol 2017; 28(12):2915–22.
- 220. Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM, Meulendijks D, Frederix GWJ, Kienhuis E, et al. *DPYD* genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. Lancet Oncol 2018; 19(11):1459–67.
- 221. Nota de seguridad de la AEMPS (Referencia: MUH (FV) 8/2020). Fluorouracilo, capecitabina, tegafur y flucitosina en pacientes con déficit de dihidropirimidina deshidrogenasa. Fecha de publicación: 11/05/2020. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentos UsoHumano/seguridad/2020/docs/NI_MUH_FV-8-2020-Fluorouracilo.pdf?x27361
- 222. Fuchs CS, Moore MR, Harker G, Villa L, Rinaldi D, Hecht JR. Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2003; 21(5):807–14.
- 223. Santos A, Zanetta S, Cresteil T, Deroussent A, Pein F, Raymond E, et al. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. Clin Cancer Res 2000; 6(5):2012–20.
- 224. 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(14):3723–5.
- 225. Wasserman E, Myara A, Lokiec F, Goldwasser F, Trivin F, Mahjoubi M, et al. Severe CPT-11 toxicity in patients with Gilbert's syndrome: two case reports. Ann Oncol 1997; 8(10):1049–51.
- 226. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. N Engl J Med 1995; 333(18):1171–5.
- 227. Fernández Salazar JM, Remacha Sevilla A, del Río Conde E, Baiget Bastús M. Distribution of the A(TA)₇TAA genotype associated with Gilbert syndrome in the Spanish population. Med Clin 2000; 115(14):540–1.
- 228. Dean L. Irinotecan Therapy and *UGT1A1* Genotype. Medical Genetics Summaries. National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
- 229. Barbarino JM, Haidar CE, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for UGT1A1. Pharmacogenet Genomics 2014; 24(3):177–83.
- 230. Yang Y, Zhou M, Hu M, Cui Y, Zhong Q, Liang L, et al. UGT1A1*6 and UGT1A1*28 polymorphisms are

correlated with irinotecan-induced toxicity: A meta-analysis. Asia Pac J Clin Oncol 2018; 14(5):e479– 89.

- 231. Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, et al. Polymorphisms of UDPglucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. Cancer Res 2000; 60(24):6921–6.
- 232. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, et al. Genetic variants in the UDPglucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. J Clin Oncol 2004; 22(8):1382–8.
- 233. Irinotecan (CAMPTOSAR) drug label. Food and Drug Administration. [Data d'accés: 19/06/2020].
- 234. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: From Bench to Byte— An Update of Guidelines. Clin Pharmacol Ther 2011; 89(5):662–73.
- 235. Etienne-Grimaldi M-C, Boyer J-C, Thomas F, Quaranta S, Picard N, Loriot M-A, et al. *UGT1A1* genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice. Fundam Clin Pharmacol 2015; 29(3):219–37.
- 236. Marcuello E, Páez D, Paré L, Salazar J, Sebio A, del Rio E, et al. A genotype-directed phase I-IV dosefinding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. Br J Cancer 2011; 105(1):53–7.
- 237. Salvador-Martín S, García-González X, García MI, Blanco C, García-Alfonso P, Robles L, et al. Clinical utility of *ABCB1* genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan. Pharmacol Res 2018; 136:133–9.
- 238. Li M, Seiser EL, Baldwin RM, Ramirez J, Ratain MJ, Innocenti F, et al. ABC transporter polymorphisms are associated with irinotecan pharmacokinetics and neutropenia. Pharmacogenomics J 2018; 18(1):35–42.
- 239. Chen S, Sutiman N, Zhang CZ, Yu Y, Lam S, Khor CC, et al. Pharmacogenetics of irinotecan, doxorubicin and docetaxel transporters in Asian and Caucasian cancer patients: a comparative review. Drug Metab Rev 2016; 48(4):502–40.
- 240. Mathijssen RHJ, de Jong FA, van Schaik RHN, Lepper ER, Friberg LE, Rietveld T, et al. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. J Natl Cancer Inst 2004; 96(21):1585–92.
- 241. Kehrer DFS, Mathijssen RHJ, Verweij J, de Bruijn P, Sparreboom A. Modulation of Irinotecan Metabolism by Ketoconazole. J Clin Oncol 2002; 20(14):3122–9.
- 242. Rouits E, Charasson V, Pétain A, Boisdron-Celle M, Delord J-P, Fonck M, et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. Br J Cancer 2008; 99(8):1239–45.

- 243. van der Bol JM, Mathijssen RHJ, Creemers G-JM, Planting AST, Loos WJ, Wiemer EAC, et al. A CYP3A4 phenotype-based dosing algorithm for individualized treatment of irinotecan. Clin Cancer Res 2010; 16(2):736–42.
- 244. Makihara K, Nakamura S, Miyagi K, Ueno H, Nakata I. Clarithromycin co-administration does not increase irinotecan (CPT-11) toxicity in colorectal cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol 2017; 80(3):527–33.
- 245. Sai K, Saito Y, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, Kaniwa N, Kamatani N, et al. Impact of CYP3A4 haplotypes on irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol 2008; 62(3):529–37.
- 246. Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huennemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N, et al. Identification and characterization of *CYP3A4*20*, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. Clin Pharmacol Ther 2006; 79(4):339–49.
- 247. Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, et al. Novel mutations of *CYP3A4* in Chinese. Drug Metab Dispos 2001; 29(3):268–73.
- 248. Werk AN, Lefeldt S, Bruckmueller H, Hemmrich-Stanisak G, Franke A, Roos M, et al. Identification and characterization of a defective CYP3A4 genotype in a kidney transplant patient with severely diminished tacrolimus clearance. Clin Pharmacol Ther 2014; 95(4):416–22.
- 249. Apellániz-Ruiz M, Inglada-Pérez L, Naranjo MEG, Sánchez L, Mancikova V, Currás-Freixes M, et al. High frequency and founder effect of the *CYP3A4*20* loss-of-function allele in the Spanish population classifies CYP3A4 as a polymorphic enzyme. Pharmacogenomics J 2015; 15(3):288–92.
- 250. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, 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(23):4298–304.
- 251. Koopman M, Venderbosch S, van Tinteren H, Ligtenberg MJ, Nagtegaal I, Van Krieken JH, et al. Predictive and prognostic markers for the outcome of chemotherapy in advanced colorectal cancer, a retrospective analysis of the phase III randomised CAIRO study. Eur J Cancer 2009; 45(11):1999– 2006.
- 252. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. J Clin Oncol 2007; 25(10):1247–54.
- 253. Parikh AR, Lee FC, Yau L, Koh H, Knost J, Mitchell EP, et al. MAVERICC, a randomized, biomarkerstratified, phase II study of mFOLFOX6-Bevacizumab versus FOLFIRI-bevacizumab as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res 2019; 25(10):2988–95.
- 254. Kanai M, Yoshioka A, Tanaka S, Nagayama S, Matsumoto S, Nishimura T, et al. Associations between glutathione S-transferase π Ile105Val and glyoxylate aminotransferase Pro11Leu and Ile340Met

polymorphisms and early-onset oxaliplatin-induced neuropathy. Cancer Epidemiol 2010; 34(2):189–93.

- 255. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7(7):505–16.
- 256. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene 2006; 366(1):2–16.
- 257. Dechant M, Weisner W, Berger S, Peipp M, Beyer T, Schneider-Merck T, et al. Complementdependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. Cancer Res 2008; 68(13):4998–5003.
- 258. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended *RAS* mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Ann Oncol 2015; 26(1):13–21.
- 259. Dempke WCM, Heinemann V. Ras mutational status is a biomarker for resistance to EGFR inhibitors in colorectal carcinoma. Anticancer Res 2010; 30(11):4673–7.
- 260. Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, et al. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. J Clin Oncol 2015; 34(2):179–85.
- 261. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type *BRAF* is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008; 26(35):5705–12.
- 262. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. Eur J Cancer 2015; 51(5):587–94.
- 263. Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A, Antoniotti C, Moretto R, Berenato R, et al. *BRAF* codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. Ann Oncol 2015; 26(10):2092–7.
- 264. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY, et al. Non-V600 BRAF Mutations
 Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol 2017; 35(23):2624–30.
- 265. Hsu H-C, Thiam TK, Lu Y-J, Yeh CY, Tsai W-S, You JF, et al. Mutations of *KRAS/NRAS/BRAF* predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients. Oncotarget 2016; 7(16):22257–70.
- 266. Yao Z, Yaeger R, Rodrik-Outmezguine VS, Tao A, Torres NM, Chang MT, et al. Tumours with class 3 *BRAF* mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. Nature 2017; 548(7666):234–8.
- 267. Shinozaki E, Yoshino T, Yamazaki K, Muro K, Yamaguchi K, Nishina T, et al. Clinical significance of

BRAF non-V600E mutations on the therapeutic effects of anti-EGFR monoclonal antibody treatment in patients with pretreated metastatic colorectal cancer: the Biomarker Research for anti-EGFR monoclonal Antibodies by Comprehensive Cancer genomics (BREAC) study. Br J Cancer 2017; 117(10):1450–8.

- 268. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Acta Oncol 2014; 53(7):852–64.
- 269. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. *PIK3CA* mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. Cancer Res 2009; 69(5):1851–7.
- 270. Sood A, McClain D, Maitra R, Basu-Mallick A, Seetharam R, Kaubisch A, et al. *PTEN* gene expression and mutations in the *PIK3CA* gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with *KRAS* wild-type metastatic colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer 2012; 11(2):143–50.
- 271. Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, et al. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol 2009; 27(30):5068–74.
- 272. Ohchi T, Akagi Y, Kinugasa T, Kakuma T, Kawahara A, Sasatomi T, et al. Amphiregulin is a prognostic factor in colorectal cancer. Anticancer Res 2012; 32(6):2315–21.
- 273. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, 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(22):3230–7.
- 274. Kim TW. EGFR status is not a reliable biomarker to select patients suitable for cetuximab-based therapy. Clin Colorectal Cancer 2014; 13(1):3-4.
- 275. Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. Sci Transl Med 2011; 3(99):99ra86.
- 276. Bertotti A, Papp E, Jones S, Adleff V, Anagnostou V, Lupo B, et al. The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. Nature 2015; 526(7572):263–7.
- 277. De Robertis M, Loiacono L, Fusilli C, Poeta ML, Mazza T, Sanchez M, et al. Dysregulation of EGFR pathway in EphA2 cell subpopulation significantly associates with poor prognosis in colorectal cancer. Clin Cancer Res 2017; 23(1):159–70.
- 278. Demurtas L, Puzzoni M, Giampieri R, Ziranu P, Pusceddu V, Mandolesi A, et al. The role of primary tumour sidedness, EGFR gene copy number and EGFR promoter methylation in *RAS/BRAF* wild-type colorectal cancer patients receiving irinotecan/cetuximab. Br J Cancer 2017; 117(3):315–21.

- 279. Arnold D, Lueza B, Douillard J-Y, Peeters M, Lenz H-J, Venook A, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. Ann Oncol 2017; 28(8):1713–29.
- 280. Moretto R, Cremolini C, Rossini D, Pietrantonio F, Battaglin F, Mennitto A, et al. Location of Primary Tumor and Benefit From Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies in Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. Oncologist 2016; 21(8):988–94.
- 281. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. Eur J Cancer 2017; 70:87–98.
- 282. De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LPMH, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. Nat Med 2013; 19(5):614–8.
- 283. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. Nat Med 2013; 19(5):619–25.
- 284. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. Nat Med 2012; 18(2):221–3.
- 285. Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, et al. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. Oncogene 2008; 27(28):3944– 56.
- 286. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G, Martínez A, Cañadas I, Lazzari L, et al. Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer. Clin Cancer Res 2015; 21(9):2157–66.
- 287. Van Emburgh BO, Arena S, Siravegna G, Lazzari L, Crisafulli G, Corti G, et al. Acquired *RAS* or *EGFR* mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. Nat Commun 2016; 7:13665.
- 288. Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, Kazmi SMA, Mazard T, Vilar E, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. Ann Oncol 2015; 26(4):731–6.
- 289. Newhall K, Price T, Peeters M, Kim TW, Li J, Cascinu S, et al. Frequency of S492R Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor: Analysis of Plasma DNA from Metastatic Colorectal Cancer Patients treated with Panitumumab or Cetuximab Monotherapy. Ann Oncol 2014; 25(Supplement 2):ii109.

- 290. Esposito C, Rachiglio AM, La Porta ML, Sacco A, Roma C, Iannaccone A, et al. The S492R *EGFR* ectodomain mutation is never detected in *KRAS* wild-type colorectal carcinoma before exposure to EGFR monoclonal antibodies. Cancer Biol Ther 2013; 14(12):1143–6.
- 291. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. Cancer Discov 2013; 3(6):658–73.
- 292. Rodriguez-Pascual J, Cubillo A. Dynamic Biomarkers of Response to Antiangiogenic Therapies in Colorectal Cancer: A Review. Curr Pharmacogenomics Person Med 2017; 15(2):81–5.
- 293. van Cutsem E, Paccard C, Chiron M, Tabernero J. Impact of prior bevacizumab treatment on VEGF-A and PLGF levels and outcome following second-line aflibercept treatment: Biomarker post hoc analysis of the VELOUR trial. Clin Cancer Res 2020; 26(3):717–25.
- 294. Loupakis F, Cremolini C, Yang D, Salvatore L, Zhang W, Wakatsuki T, et al. Prospective validation of candidate SNPs of VEGF/VEGFR pathway in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus bevacizumab. PLoS One 2013; 8(7):e66774.
- 295. Koutras AK, Antonacopoulou AG, Eleftheraki AG, Dimitrakopoulos F-I, Koumarianou A, Varthalitis I, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and clinical outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan-based chemotherapy and bevacizumab. Pharmacogenomics J 2012; 12(6):468–75.
- 296. Sohn BS, Park SJ, Kim JE, Kim K-P, Hong YS, Suh C, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor pathway and outcomes of patients treated with first-line cytotoxic chemotherapy combined with bevacizumab for advanced colorectal cancer. Oncology 2014; 87(5):280–92.
- 297. Hansen TF, Christensen R dePont, Andersen RF, Garm Spindler K-L, Johnsson A, Jakobsen A. The predictive value of single nucleotide polymorphisms in the VEGF system to the efficacy of first-line treatment with bevacizumab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: results from the Nordic ACT trial. Int J Colorectal Dis 2012; 27(6):715–20.
- 298. Formica V, Palmirotta R, Del Monte G, Savonarola A, Ludovici G, De Marchis ML, 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(2):143–51.
- 299. Rollin J, Payancé A, Gouilleux-Gruart V, Boisdron-Celle M, Azzopardi N, Morel A, et al. Significant effect of *VEGFA* polymorphisms on the clinical outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with FOLFIRI-cetuximab. Pharmacogenomics 2015; 16(18):2035–43.
- 300. Riera P, Virgili AC, Salazar J, Sebio A, Tobeña M, Sullivan I, et al. Genetic variants in the VEGF pathway as prognostic factors in stages II and III colon cancer. Pharmacogenomics J 2018;

18(4):556-64.

- 301. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med 2003; 9(6):653–60.
- 302. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000; 407(6801):249–57.
- 303. Páez D, Labonte MJ, Bohanes P, Zhang W, Benhanim L, Ning Y, et al. Cancer dormancy: a model of early dissemination and late cancer recurrence. Clin Cancer Res 2012; 18(3):645–53.
- 304. Sullivan I, Salazar J, Arqueros C, Andrés M, Sebio A, Majem M, et al. *KRAS* genetic variant as a prognostic factor for recurrence in resectable non-small cell lung cancer. Clin Transl Oncol 2017; 19(7):884–90.
- 305. Paré-Brunet L, Sebio A, Salazar J, Berenguer-Llergo A, Río E, Barnadas A, et al. Genetic variations in the VEGF pathway as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy. Pharmacogenomics J 2015; 15(5):397–404.
- 306. Riera P, Salazar J, Virgili AC, Tobeña M, Sebio A, Gallano P, et al. Relevance of CYP3A4*20, UGT1A1*37 and UGT1A1*28 variants in irinotecan-induced severe toxicity. Br J Clin Pharmacol 2018; 84(6):1389–92.
- 307. Riera P, Artigas-Baleri A, Salazar J, Sebio A, Virgili AC, Arranz MJ, et al. *ABCB1* Genetic Variants as Predictors of Irinotecan-Induced Severe Gastrointestinal Toxicity in Metastatic Colorectal Cancer Patients. Front Pharmacol 2020; 11:973.
- 308. Páez D, Tobeña M, Fernández-Plana J, Sebio A, Virgili AC, Cirera L, et al. Pharmacogenetic clinical randomised phase II trial to evaluate the efficacy and safety of FOLFIRI with high-dose irinotecan (HD-FOLFIRI) in metastatic colorectal cancer patients according to their *UGT1A1* genotype. Br J Cancer 2019; 120(2):190–5.
- 309. Riera P, Artigas A, Salazar J, Páez D. Comments on: "Clinical utility of *ABCB1* genotyping for preventing toxicity in treatment with irinotecan" Pharmacol Res 2019; 145:104287.
- 310. Campbell JM, Stephenson MD, Bateman E, Peters MDJ, Keefe DM, Bowen JM. Irinotecan-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. Pharmacogenomics J 2017; 17(1):21–8.
- 311. Hu Z-Y, Yu Q, Zhao Y-S. Dose-dependent association between *UGT1A1*28* polymorphism and irinotecan-induced diarrhoea: A meta-analysis. Eur J Cancer 2010; 46(10):1856–65.
- 312. Liu X, Cheng D, Kuang Q, Liu G, Xu W. Association of *UGT1A1*28* polymorphisms with irinotecaninduced toxicities in colorectal cancer: A meta-analysis in Caucasians. Pharmacogenomics J 2014; 14(2):120–9.
- 313. Apellániz-Ruiz M, Lee M-Y, Sánchez-Barroso L, Gutiérrez-Gutiérrez G, Calvo I, García-Estévez L, et al. Whole-exome sequencing reveals defective *CYP3A4* variants predictive of paclitaxel dose-limiting neuropathy. Clin Cancer Res 2015; 21(2):322–8.
- 314. Riera P, Apellániz M V, Salazar J. Relevance of the CYP3A4*20 variant as a predictor of paclitaxel-

induced neuropathy in the Spanish population. Med Clin 2018; 150(4):163-4.

- 315. Teft WA, Welch S, Lenehan J, Parfitt J, Choi Y-H, Winquist E, et al. OATP1B1 and tumour OATP1B3 modulate exposure, toxicity, and survival after irinotecan-based chemotherapy. Br J Cancer 2015; 112(5):857–65.
- 316. Chen S, Villeneuve L, Jonker D, Couture F, Laverdière I, Cecchin E, et al. *ABCC5* and *ABCG1* polymorphisms predict irinotecan-induced severe toxicity in metastatic colorectal cancer patients. Pharmacogenet Genomics 2015; 25(12):573–83.
- 317. De Mattia E, Toffoli G, Polesel J, D'Andrea M, Corona G, Zagonel V, et al. Pharmacogenetics of ABC and SLC transporters in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI treatment. Pharmacogenet Genomics 2013; 23(10):549–57.
- 318. Yan L, Wang X, Wei L, Nie Y, Liu J, Zhang L. Effects of *UGT1A1*6*, *UGT1A1*28*, and *ABCB1*-3435C>T polymorphisms on irinotecaninduced toxicity in Chinese cancer patients. Int J Clin Pharmacol Ther 2016; 54(03):193–9.
- 319. Cortejoso L, García MI, García-Alfonso P, González-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(6):1463–72.
- 320. Mathijssen RHJ, Marsh S, Karlsson MO, Xie R, Baker SD, Verweij J, et al. Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. Clin Cancer Res 2003; 9(9):3246–53.
- 321. Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, McLeod HL, Klein TE, Altman RB. Pharm GKB summary: Fluoropyrimidine pathways. Pharmacogenet Genomics 2011; 21(4):237-42.
- 322. Toffoli G, Cecchin E, Gasparini G, D'Andrea M, Azzarello G, Basso U, 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(5):866–71.
- 323. Lu C-Y, Huang C-W, Hu H-M, Tsai H-L, Huang C-M, Yu F-J, et al. Prognostic advantage of irinotecan dose escalation according to uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) genotyping in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab combined with 5-fluorouracil/leucovorin with irinotecan in a first-line setting. Transl Res 2014; 164(2):169–76.
- 324. Lu C-Y, Huang C-W, Wu I-C, Tsai H-L, Ma C-J, Yeh Y-S, et al. Clinical Implication of *UGT1A1* Promoter Polymorphism for Irinotecan Dose Escalation in Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated with Bevacizumab Combined with FOLFIRI in the First-line Setting. Transl Oncol 2015; 8(6):474–9.
- 325. Phelip JM, Mineur L, De la Fouchardière C, Chatelut E, Quesada JL, Roblin X, et al. High Resectability Rate of Initially Unresectable Colorectal Liver Metastases After UGT1A1-Adapted High-Dose Irinotecan Combined with LV5FU2 and Cetuximab: A Multicenter Phase II Study (ERBIFORT). Ann Surg Oncol 2016; 23(7):2161–6.
- 326. Toffoli G, Sharma MR, Marangon E, Posocco B, Gray E, Mai Q, et al. Genotype-Guided Dosing Study

of FOLFIRI plus Bevacizumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Clin Cancer Res 2017; 23(4):918–24.

- 327. Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM, Meulendijks D, Frederix GWJ, Kienhuis E, et al. A cost analysis of upfront *DPYD* genotype–guided dose individualisation in fluoropyrimidine-based anticancer therapy. Eur J Cancer 2019; 107:60–7.
- 328. Sabour L, Sabour M, Ghorbian S. Clinical Applications of Next-Generation Sequencing in Cancer Diagnosis. Pathol Oncol Res 2017; 23(2):225–34.
- 329. Vidal J, Bellosillo B, Santos Vivas C, García-Alfonso P, Carrato A, Cano MT, et al. Ultra-selection of metastatic colorectal cancer patients using next-generation sequencing to improve clinical efficacy of anti-EGFR therapy. Ann Oncol 2019; 30(3):439–46.
- 330. Vittal A, Sharma D, Samanta I, Kasi A. Rare case of triple mutant (*KRAS* + *NRAS* + *BRAF*) metastatic colon adenocarcinoma. BMJ Case Rep 2019; 12(9):e221816.
- 331. Santos C, Azuara D, Viéitez JM, Páez D, Falcó E, Élez E, et al. Phase II study of high-sensitivity genotyping of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* to ultra-select metastatic colorectal cancer patients for panitumumab plus FOLFIRI: the ULTRA trial. Ann Oncol 2019; 30(5):796–803.
- 332. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Nucleic Acids Res 2019; 47(D1):D941–7.
- 333. Tamborero D, Rubio-Perez C, Deu-Pons J, Schroeder MP, Vivancos A, Rovira A, et al. Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. Genome Med 2018; 10(1):25.
- 334. Isnaldi E, Garuti A, Cirmena G, Scabini S, Rimini E, Ferrando L, et al. Clinico-pathological associations and concomitant mutations of the RAS/RAF pathway in metastatic colorectal cancer. J Transl Med 2019; 17(1):137.
- 335. Salem ME, Weinberg BA, Xiu J, El-Deiry WS, Hwang JJ, Gatalica Z, et al. Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers. Oncotarget 2017; 8(49):86356–68.
- 336. Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C, Rubin R, et al. A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. Mol Cell Biol 1994; 14(7):4588–95.
- 337. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. Nat Med 2017; 23(6):703–13.
- 338. Hayashi Y, Bardsley MR, Toyomasu Y, Milosavljevic S, Gajdos GB, Choi KM, et al. Platelet-Derived Growth Factor Receptor-α Regulates Proliferation of Gastrointestinal Stromal Tumor Cells With Mutations in KIT by Stabilizing ETV1. Gastroenterology 2015; 149(2):420-32.e16.
- 339. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, et al. PDGFRA activating

mutations in gastrointestinal stromal tumors. Science 2003; 299(5607):708–10.

- 340. Rafidi H, Mercado F, Astudillo M, Fry WHD, Saldana M, Carraway KL, et al. Leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing protein-1 (Lrig1) negative regulatory action toward ErbB receptor tyrosine kinases is opposed by leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing protein 3 (Lrig3). J Biol Chem 2013; 288(30):21593–605.
- 341. Faraz M, Herdenberg C, Holmlund C, Henriksson R, Hedman H. A protein interaction network centered on leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1) regulates growth factor receptors. J Biol Chem 2018; 293(9):3421–35.
- 342. Wang Y, Poulin EJ, Coffey RJ. LRIG1 is a triple threat: ERBB negative regulator, intestinal stem cell marker and tumour suppressor. Br J Cancer 2013; 108(9):1765–70.
- 343. Wang B, Han L, Chen R, Cai M, Han F, Lei T, et al. Downregulation of LRIG2 expression by RNA interference inhibits glioblastoma cell (GL15) growth, causes cell cycle redistribution, increases cell apoptosis and enhances cell adhesion and invasion in vitro. Cancer Biol Ther 2009; 8(11):1018–23.
- 344. Yang H-K, Chen H, Mao F, Xiao Q-G, Xie R-F, Lei T. Downregulation of LRIG2 expression inhibits angiogenesis of glioma via EGFR/VEGF-A pathway. Oncol Lett 2017; 14(4):4021–8.
- 345. Wu X, Hedman H, Bergqvist M, Bergström S, Henriksson R, Gullbo J, et al. Expression of EGFR and LRIG proteins in oesophageal carcinoma with emphasis on patient survival and cellular chemosensitivity. Acta Oncol 2012; 51(1):69–76.
- 346. Liu B, Guo Z, Dong H, Daofeng T, Cai Q, Ji B, et al. LRIG1, human EGFR inhibitor, reverses multidrug resistance through modulation of ABCB1 and ABCG2. Brain Res 2015; 1611:93–100.
- 347. Gelfo V, Pontis F, Mazzeschi M, Sgarzi M, Mazzarini M, Solmi R, et al. Glucocorticoid Receptor Modulates EGFR Feedback upon Acquisition of Resistance to Monoclonal Antibodies. J Clin Med 2019; 8(5):600.
- 348. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. Ther Adv Med Oncol 2016; 8(1):57–84.
- 349. Bignucolo A, De Mattia E, Cecchin E, Roncato R, Toffoli G. Pharmacogenomics of Targeted Agents for Personalization of Colorectal Cancer Treatment. Int J Mol Sci 2017; 18(7):1522.
- 350. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat Rev Clin Oncol 2018; 15(2):81–94.
- 351. Vazquez-Martin A, Cufí S, Oliveras-Ferraros C, Torres-Garcia VZ, Corominas-Faja B, Cuyàs E, et al. IGF-1R/epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) crosstalk suppresses the erlotinib-sensitizing effect of EGFR exon 19 deletion mutations. Sci Rep 2013; 3:2560.
- 352. Sclafani F, Kim TY, Cunningham D, Kim TW, Tabernero J, Schmoll HJ, et al. A Randomized Phase II/III Study of Dalotuzumab in Combination With Cetuximab and Irinotecan in Chemorefractory, *KRAS* Wild-Type, Metastatic Colorectal Cancer. J Natl Cancer Inst 2015; 107(12):djv258.

Annex: altres publicacions

A continuació es mostren dues publicacions que també s'han realitzat durant el doctorat. Són les següents:

Annex 1. Relevance of the *CYP3A4*20* variant as a predictor of paclitaxel-induced neuropathy in the Spanish population (carta a l'editor)

Medicina Clínica 2018; 150(4):163-164 doi: 10.1016/j.medcli.2017.09.004 PMID: 29054579

Pau Riera, María V. Apellániz, Juliana Salazar

Annex 2. Prognostic effect of VEGF gene variants in metastatic non-small-cell lung cancer patients

Angiogenesis 2019; 22(3):433-440. doi: 10.1007/s10456-019-09668-y PMID: 30977010

Ivana Sullivan, Pau Riera, Marta Andrés, Albert Altés, Margarita Majem, Remei Blanco, Laia Capdevila, Andrés Barba, Agustí Barnadas, Juliana Salazar

Jonathan Franco^{a,*}, Francesc Formiga^b y Ángel Charte^a

^a Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario Quirón Dexeus, Barcelona, España

^b Unidad de Geriatría, Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: Jonathan.franco@quironsalud.es (J. Franco).

https://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.07.016

0025-7753/ © 2017 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Relevancia de la variante *CYP3A4*20* como predictor de neuropatía inducida por paclitaxel en población española

Relevance of the CYP3A4*20 variant as a predictor of paclitaxel-induced neuropathy in the Spanish population

Sr. Editor:

El paclitaxel es un citostático ampliamente usado para el tratamiento de neoplasias de mama, ovario, pulmón, esófago y estómago. Su toxicidad limitante de dosis es la neuropatía periférica, que puede ser grave y afectar a un 5-30% de los pacientes en función del esquema quimioterápico¹. Por ello, la identificación de biomarcadores genéticos predictores de dicha toxicidad es de especial interés clínico para prevenir efectos adversos en los pacientes.

Se han descrito diversas variantes genéticas asociadas a neuropatía inducida por paclitaxel, sobre todo en genes codificadores de enzimas metabolizadoras (*CYP2C8*, *CYP3A4*, *CYP3A5*) y transportadoras (*SLCO1B3*, *SLCO1B1*, *ABCB1*)². Sin embargo, ninguna variante en estos genes ha demostrado suficiente evidencia para su implementación en la práctica clínica diaria.

El CYP3A4 es una de las principales enzimas implicadas en el metabolismo del paclitaxel. En consecuencia, una disminución de su actividad puede ocasionar toxicidad a este fármaco. Una de las variantes descritas, relacionada con pérdida de la actividad enzimática, es el alelo CYP3A4*20, también denominado rs67666821. Este alelo se caracteriza por la inserción de un residuo de adenina (c.1461_1462insA), que comporta un codón de parada prematuro (p.P488Tfs*494) y, por consiguiente, la síntesis de una proteína truncada e inactiva³. Recientemente, Apellániz-Ruiz et al. reportaron su presencia en un 1,2% de la población española analizada y demostraron un efecto fundador de esta mutación⁴. En un trabajo posterior, estos mismos autores evidenciaron que los pacientes tratados con paclitaxel portadores de esta variante mostraban una mayor probabilidad de presentar neuropatía grave y de sufrir modificaciones en el tratamiento, con el consiguiente riesgo de inefectividad terapéutica⁵.

Los interesantes resultados de ambos estudios nos impulsaron a replicar el análisis en pacientes de nuestro centro, el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, con la finalidad de validar estos resultados y poder plantear la implementación del genotipado del alelo *CYP3A4*20* en la práctica clínica diaria. Se trata de un hospital universitario de tercer nivel que atiende a una población general de unos 400.000 habitantes de la ciudad de Barcelona.

En el presente estudio se incluyeron un total de 310 pacientes, cuyos diagnósticos fueron: cáncer de mama (n = 211), cáncer de pulmón (n = 66), cáncer de ovario (n = 22) y cáncer de esófago (n = 11). Todos ellos se trataron en nuestro hospital con distintas pautas terapéuticas que incluían la administración de paclitaxel entre los años 2006 y 2016. El genotipado del alelo *CYP3A4*20* se efectuó en muestras de ADN genómico, utilizando metodología previamente descrita⁴.

Se observó que ninguno de los pacientes genotipados resultó ser portador del alelo *CYP3A4*20*. Ello evidencia que la frecuencia del *CYP3A4*20* en la población de nuestra área de referencia podría ser menor al 0,8% descrito inicialmente por Apellániz-Ruiz et al.⁴, aunque las diferencias con dicho trabajo no son estadísticamente significativas (p = 0,29). Asimismo, estos autores reportaron diferencias en la frecuencia de la variante entre las distintas regiones españolas⁴, con porcentajes de portadores que oscilaban entre un 0% en Galicia y un 3,8% en Castilla y León. Por otro lado, la base de datos *CIBERER Spanish Variant Server* (http://csvs.babelomics.org/), que recoge datos de secuenciación de exoma completo de individuos españoles, describe un 0,5% de portadores de la mutación *CYP3A4*20* en 816 individuos. Estas evidencias indican la necesidad de genotipar poblaciones de estudio más amplias para establecer con fiabilidad la frecuencia de la variante en cada territorio.

En conclusión, el genotipado del *CYP3A4*20* no nos ha permitido identificar a ningún paciente con toxicidad grave inducida por paclitaxel, posiblemente debido a la baja frecuencia de la variante. La implementación del genotipado de esta variante en la práctica clínica de nuestro centro queda, por lo tanto, condicionada a la realización de estudios similares en poblaciones más amplias.

Agradecimientos

Al Servicio de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Bibliografía

- Rivera E, Cianfrocca M. Overview of neuropathy associated with taxanes for the treatment of metastatic breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2015;75:659–70.
- Hertz DL. Germline pharmacogenetics of paclitaxel for cancer treatment. Pharmacogenomics. 2013;14:1065–84.
- Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huennemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N, et al. Identification and characterization of CYP3A4*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. Clin Pharmacol Ther. 2006;79:339–49.
- 4. Apellániz-Ruiz M, Inglada-Pérez L, Naranjo ME, Sánchez L, Mancikova V, Currás-Freixes M, et al. High frequency and founder effect of the CYP3A4*20 lossof-function allele in the Spanish population classifies CYP3A4 as a polymorphic enzyme. Pharmacogenomics J. 2015;15:288–92.
- Apellániz-Ruiz M, Lee MY, Sánchez-Barroso L, Gutiérrez-Gutiérrez G, Calvo I, García-Estévez L, et al. Whole-exome sequencing reveals defective CYP3A4 variants predictive of paclitaxel dose-limiting neuropathy. Clin Cancer Res. 2015;21:322–8.



Pau Riera^{a,b}, María V. Apellániz^c y Juliana Salazar^{a,d,*}

^a Servicio de Genética, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

^b Universidad de Barcelona (UB), Barcelona, España

^c Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, España

^d Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) U-705, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España * Autor para correspondencia. Correo electrónico: jsalazar@santpau.cat (J. Salazar).

https://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.09.004 0025-7753/ © 2017 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

ORIGINAL PAPER



Prognostic effect of VEGF gene variants in metastatic non-small-cell lung cancer patients

Ivana Sullivan¹ · Pau Riera^{2,3,4} · Marta Andrés¹ · Albert Altés⁵ · Margarita Majem¹ · Remei Blanco⁶ · Laia Capdevila⁷ · Andrés Barba¹ · Agustí Barnadas^{1,8} · Juliana Salazar^{2,9}

Received: 17 January 2019 / Accepted: 8 April 2019 / Published online: 11 April 2019 © Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Introduction Clinical and pathological characteristics are still considered prognostic markers in metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients but they cannot explain all interindividual variability. Tumoral angiogenesis mediated by the vascular endothelial growth factor (VEGF) is critical for the progression and metastasis of the disease. We aimed to investigate the prognostic role of genetic variants within the VEGF pathway in patients with metastatic NSCLC.

Materials and methods We prospectively included 170 patients with metastatic NSCLC treated with first-line platinumbased chemotherapy. A comprehensive panel of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes belonging to the VEGF pathway (*VEGFA*, *VEGFR1/FLT1*, *VEGFR2/KDR*, *GRB2*, *ITGAV*, *KISS1*, *KRAS*, *PRKCE*, *HIF1a*, *MAP2K4*, *MAP2K6*, and *MAPK11*) were genotyped in blood DNA samples. SNPs were evaluated for association with overall survival (OS) and progression-free survival (PFS).

Results In multivariate analyses adjusted for patient characteristics, we found that *VEGFA* rs2010963 and *VEGFR2* rs2071559 were significantly associated with OS [Hazard Ratio (HR) 0.7 (0.5–0.9); p = 0.026 and HR 1.5 (1.1–2.3); p = 0.025, respectively]. Additionally, *ITGAV* rs35251833 and *MAPK11* rs2076139 were significantly associated with PFS [HR 2.5 (1.4–4.3; p = 0.002 and HR 0.6 (0.5–0.9); p = 0.013, respectively].

Conclusion Our findings reinforce the potential clinical value of germline variants in *VEGFA* and *VEGFR2* and show for the first time variants in *ITGAV* and *MAPK11* as promising prognostic markers in metastatic NSCLC patients receiving platinum-based chemotherapy.

Keywords VEGF · Genetic variants · Metastatic NSCLC · Prognostic factors

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s10456-019-09668-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Ivana Sullivan and Pau Riera contributed equally to this study.

☑ Ivana Sullivan isullivan@santpau.cat

- ⊠ Juliana Salazar jsalazar@santpau.cat
- ¹ Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona, Spain
- ² Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona, Spain
- ³ Pharmacy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona, Spain
- ⁴ Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona (UB), Campus Diagonal, Av. de Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona, Spain

- ⁵ Hematology Department, Fundació Althaia, C/Dr. Joan Soler, 1-3, 08243 Manresa, Barcelona, Spain
- ⁶ Medical Oncology Department, Consorci Sanitari de Terrassa, Carretera de Torrebonica, S/N 08227 Terrassa, Spain
- ⁷ Medical Oncology Department, Hospital de Sant Pau i Santa Tecla, Rambla Vella, 14, 43003 Tarragona, Spain
- ⁸ Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Edifici M. Av. de Can Domènech, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain
- ⁹ CIBERER U-705, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain

Introduction

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) represents about 85% of lung cancer diagnoses and remains a major cause of cancerrelated deaths worldwide [1]. Unfortunately, as most patients are diagnosed at an advanced stage, radical treatments are unfeasible and outcomes are poor [2]. The treatment strategy should take several factors into account, such as histology, molecular alterations, performance status (PS), age, comorbidities, and patient preferences. Chemotherapy with platinum doublets continues to be the standard of care in NSCLC patients without an actionable oncogenic driver, with clinical contraindications to immunotherapy and with PS of 0–2 [3]. Although prognosis depends mainly on clinicopathological characteristics, these factors alone are insufficient to predict the course of the disease [4]. Identifying novel prognostic biomarkers is thus needed to ameliorate patient outcomes.

Progression and metastasis of NSCLC is significantly promoted by angiogenesis triggered by the vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway [5, 6]. A major inducer of this process is hypoxia, mostly mediated by the hypoxia-inducible factor HIF α , which contributes to the synthesis of several proteins, including cellular receptors and proangiogenic factors. Among these, VEGF is the pivotal activator of this pathway through its binding to the membrane receptors VEGFR1 (FLT1) and VEGFR2 (KDR). VEGF overexpression has already been correlated with worse prognoses in lung cancer patients [4]. Some studies have reported that variants within VEGF-related genes regulate their transcription [7, 8]. Likewise, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes affect tumor microvessel density and thus influence patient outcomes [9, 10].

Given the paramount importance of angiogenesis in NSCLC, we hypothesized that variants in genes of the VEGF signaling pathway could contribute to prognosis. Several studies have described associations between polymorphisms in VEGF-related genes and survival in advanced-stage NSCLC, although results reported to date are inconsistent [11–15]. Most of these studies have focused only on functional SNPs in the *VEGFA* gene, without including other key genes such as *VEGFR1* or *VEGFR2*. We aimed to evaluate the correlation of germline polymorphisms in the most relevant VEGF-related genes, with outcomes in a homogeneous cohort of metastatic NSCLC patients treated with first-line platinum-based chemotherapy.

Materials and methods

Study population

Between 2010 and 2014, one hundred and seventy metastatic NSCLC patients treated with first-line platinum-based chemotherapy at either Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (N = 149), Consorci Sanitari de Terrassa (N = 16) or Hospital de Sant Pau i Santa Tecla (N = 5) were prospectively included in the study. None of them harbored *EGFR*-activating mutations or *ALK* translocations. The following data were collected from electronic medical records: age, gender, PS according to ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) scale, tobacco exposure, histological subtype, disease stage IVA or IVB according to TNM/AJCC 7th edition [16], platinum-doublet chemotherapy regimen, and response according to RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) v1.1 [17].

The study was approved by the Institutional Ethics Committees and all the participants gave written informed consent for blood collection and genetic analyses.

Genetic studies

We selected 24 SNPs with functional evidence in 12 VEGFrelated genes (*VEGFA*, *VEGFR1/FLT1*, *VEGFR2/KDR*, *GRB2*, *ITGAV*, *KISS1*, *KRAS*, *PRKCE*, *HIF1* α , *MAP2K4*, *MAP2K6*, and *MAPK11*). The rationale for the selection of the SNPs has been detailed in previous studies [18–21]. All the SNPs presented a minor allele frequency (MAF) over 0.05 and an r^2 threshold of 0.8 in European population according to the 1000 Genomes project [22]. Table 1 includes more detailed information about the selected polymorphisms.

Genomic DNA was automatically extracted from peripheral whole-blood samples (Autopure, Qiagen, Hilden, Germany). The SNPs were analyzed by real-time PCR using TaqMan[®] SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 48.48 dynamic arrays on the BioMarkTM system (Fluidigm, San Francisco, CA, USA). More than 99.8% of cases were successfully genotyped.

Statistical analyses

Hardy–Weinberg equilibrium was assessed for each analyzed SNP using a Chi-square test. Codominant, dominant, and recessive models of inheritance were considered to assess associations with outcome variables whenever appropriate.

The primary endpoint was overall survival (OS) and the secondary endpoint was progression-free survival (PFS). OS was defined as the time from diagnosis until death from any cause or last clinical follow-up. PFS was defined as the time from treatment initiation until disease progression or death, whichever occurred first. Considering hazard ratios (HR) of 1.7 for OS, and adopting two-sided $\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.20$, we estimated 138 **Table 1**Selected putativefunctional polymorphisms in

VEGF-related genes

Gene symbol	refSeq	Label	Relevant SNPs in LD	MAF	Minor allele	
GRB2	rs7219	c.*1081G>A	rs8079197	0.26	G	
HIF1a	rs11549465	c.1816C>T		0.10	Т	
ITGAV	rs35251833	c.2791-163G>A	rs1839123, rs9333289	0.31	А	
KISS1	rs71745629	c.417delA		0.22	_	
KRAS	rs61764370	c.*2505T>G		0.10	G	
	rs10842513	c.112-4312A>G	rs10505980	0.09	А	
	rs12813551	c.111+3429G>A		0.40	G	
	rs1137282	c.519T>C		0.22	С	
MAP2K4	rs3826392	c1300G>T	300G>T rs3809728		G	
MAP2K6	rs11656130	g.67400446T>G		0.45	G	
	rs2716191	g.67536322T>C		0.48	С	
MAPK11	rs2076139	c.756A>G		0.26	А	
PRKCE	rs4953299	c.1264-274T>C		0.24	С	
VEGFA	rs699947	c2055A>C	rs833061, rs833070	0.50	А	
	rs1570360	c614A>G		0.32	А	
	rs2010963	c94C>G	rs3024997	0.31	С	
	rs3025039	c.*237C>T	rs3025040	0.12	Т	
VEGFR1	rs9582036	c.3635+319G>T	rs9554316, rs7993418	0.27	G	
	rs7996030	c.3636-273T>C		0.20	Т	
	rs9513070	c.3815+976C>T		0.41	С	
VEGFR2	rs2305948	c.889G>A		0.09	А	
	rs1551641	g.55993915C>T	rs10013228	0.30	Т	
	rs2071559	c906T>C	rs7667298	0.49	С	
	rs1870377	c.1416A>T		0.23	А	

GRB2 growth factor receptor-bound protein 2, *HIF1a* hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit, *ITGAV* integrin, alpha V; *KISS1* KiSS-1 metastasis-suppressor, *KRAS* Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, *MAP2K4* mitogen-activated protein kinase kinase 4, *MAP2K6* mitogen-activated protein kinase kinase 6, *MAPK11* mitogen-activated protein kinase 11, *PRKCE* protein kinase C, epsilon; *VEGFA* vascular endothelial growth factor A, *VEGFR1* or *FLT1* fms-related tyrosine kinase 1, *VEGFR2* or *KDR* kinase insert domain receptor, *MAF* minor allele frequency (1000 Genomes Project, European population; accession date: 21/08/18), *LD* Linkage disequilibrium; refSeq, reference sequence

Label according to the accession numbers: NM_002086.4 (*GRB2*), NM_001243084.1 (*HIF1α*), NM_001144999.2 (*ITGAV*), NM_002256.3 (*KISS1*), NM_004985.4 (*KRAS*), NM_001281435.1 (*MAP2K4*), NC_000017.10 (*MAP2K6*), NM_002751.6 (*MAPK11*), NM_005400.2 (*PRKCE*), NM_001025366.2 (*VEGFA*), NM_002019.4 (*VEGFR1*), NC_000004.11 (rs1551641, *VEGFR2*), and NM_002253.2 (*VEGFR2* SNPs except rs1551641)

events would be needed to detect the prognostic effect of the genetic variants (Schoenfeld). To achieve this objective, the study was continued until April 2017. For OS and PFS analyses, survival curves and survival medians were estimated at the 95% confidence level using the Kaplan–Meier method, and differences in survival were analyzed with the log-rank test. A Cox proportional hazards regression model was adjusted for multivariate analysis of OS and PFS, including all significant polymorphisms in the univariate analysis and ECOG PS, tobacco exposure, histological subtype, and disease stage. The results were considered statistically significant when p-values were below 0.05. All statistical analyses were performed using SPSS (version 24.0, IBM).

Results

Clinical results

Table 2 summarizes the patients' baseline clinical and pathological characteristics. After a median follow-up of 14.7 (range 1.0-75.0) months, 160 (94.1%) patients had progressed and 140 (82.4%) had died. The median OS was 14.8 [95% confidence interval (CI) 12.0–17.6] months, and the median PFS was 6.0 [95% CI 4.7–7.2] months.

Overall survival differed significantly according to ECOG PS and tobacco exposure. Patients with an ECOG PS of 0 had a median OS of 22.8 months [95% CI 0.0–60.2] compared to 12.7 months [95% CI 9.0–16.3] in patients with an ECOG PS of 1, and to 12.8 months [95%

Table 2 Patient and tumor characteri	istics $(N=170)$
--------------------------------------	------------------

Characteristics	N	%	
Age (years)			
Median	63		
Range	[32,86]		
Gender			
Male	131	77.1	
Female	39	22.9	
Performance status (ECOG)			
0–1	132	77.6	
2	38	22.4	
Tobacco exposure			
No	24	14.1	
Yes	146	85.9	
Histological subtype			
Adenocarcinoma	118	69.4	
Squamous-cell carcinoma	37	21.8	
Large-cell carcinoma	15	8.8	
Disease stage			
IVA	37	21.8	
IVB	133	78.2	
Treatment			
Platinum plus pemetrexed	59	34.7	
Platinum plus gemcitabine	56	32.9	
Platinum plus vinorelbine	28	16.5	
Platinum plus taxanes	27	15.9	
Response			
Complete response	5	2.9	
Partial response	69	40.6	
Stable disease	59	34.7	
Disease progression	37 2		

ECOG Eastern Cooperative Oncology Group

CI 8.7–16.9] in patients with an ECOG PS of 2 (p = 0.01). Regarding tobacco exposure, patients who smoked had a median OS of 12.7 months [95% CI 10.4–14.9), whereas non-smokers had a median OS of 22.8 months [95% CI 15.7–29.9] (p = 0.027). In the multivariate analysis including all the clinical variables, both ECOG PS and tobacco exposure retained their statistical significance (p = 0.01and p = 0.04, respectively).

We also found a significant difference between PFS and ECOG PS. Patients with an ECOG PS of 0 had a median PFS of 12.2 months [95% CI 7.8–16.6] compared to 5.9 months [95% CI 5.3–6.5] in patients with an ECOG PS of 1, and to 5.1 months [95% CI 0.5–6.7] in patients with an ECOG PS of 2 (p = 0.008). In the multivariate analysis, this association remained statistically significant (p = 0.004).

Genetic variants and survival

All the genotypic frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium except for rs11656130 T>G (*MAP2K6*) and rs61764370 T>G (*KRAS*) variants, which were therefore excluded from the analysis.

In the univariate analyses, four SNPs showed a statistically significant association with OS: rs2010963 G>C (VEGFA), rs2071559 C>T (VEGFR2), rs10842513 G>A (KRAS), and rs3826392 T>G (MAP2K4) (Table 3). For the rs2010963 variant, patients with the GC genotype had a longer median OS (18.9 months) than patients with the GG (12.5 months) and CC genotypes (12.3 months) (p=0.009) (Fig. 1a). For the rs2071559 variant, patients with the CC genotype achieved a longer median OS than patients carrying the T allele for the variant (17.2 vs. 12.8 months) (p = 0.024 in a dominant model) (Fig. 1b). For the rs10842513 variant, patients with the GG genotype had a longer median OS than A allele carriers (15.6 vs. 8.8 months) (p = 0.024 in a dominant model). For the rs3826392 variant, patients with the TT genotype had a longer median OS (16.5 months) than patients with the TG and GG genotypes (12.7 and 9.9 months, respectively) (p = 0.042). Non-significant associations between genetic variants and OS are shown in the Supplementary Table. In the multivariate analysis, two of these SNPs showed statistical significance considering a dominant model of inheritance: VEGFA rs2010963 (HR 0.7; 95% CI 0.5-0.9; p = 0.026) and VEGFR2 rs2071559 (HR 1.5; 95% CI 1.1-2.3; p = 0.025).

In the univariate analyses, three variants were significantly associated with PFS: rs9513070 T>C (VEGFR1), rs35251833 G>A (ITGAV), and rs2076139 G>A (MAPK11) (Table 3). For the rs9513070 variant, patients carrying the C allele had a longer median PFS than those with the TT genotype (7.1 vs. 5.0 months) (p = 0.025 in a dominant model). For the rs35251833 variant, patients carrying the G allele presented a longer median PFS than patients with the AA genotype (6.3 vs. 4.0 months) (p=0.027 in a recessive model). For the rs2076139 variant, patients carrying the A allele had a longer median PFS than patients with the GG genotype (7.6 vs. 5.2 months) (p=0.006 in a dominant model). The supplementary table summarizes the non-significant associations between genetic variants and PFS. In the multivariate analysis, two of the variants retained their statistical significance: *ITGAV* rs35251833 (HR 2.5; 95% CI 1.4–4.3; *p* = 0.002) and MAPK11 rs2076139 (HR 0.6; 95% CI 0.5-0.9; p = 0.013), considering a recessive and a dominant model, respectively.

PFS

.....

Table 3 Univariable analyses of VEGF genetic variants and their significant association with overall survival or progression-free survival

			Median OS, months (95% CI)	Hazard ratio (95% CI)	P value	Median PFS, months (95% CI)	Hazard ratio (95% CI)	P value
VEGFA	rs2010963							
	GG	77	12.5 (8.20-16.72)	1 (reference)	0.009	5.7 (4.49-7.00)	1 (reference)	0.181
	GC	70	18.9 (13.68-24.09)	0.78 (0.48-1.27)		6.8 (5.16-8.42)	0.78 (0.48-1.26)	
	CC	23	12.3 (8.33-16.33)	0.50 (0.30-0.83)		5.5 (4.24-6.78)	0.64 (0.39–1.05)	
	GC+CC	93	15.7 (11.29–20.19)	1.32 (0.95–1.85)	0.100	6.0 (4.32-7.62)	1.10 (0.80-1.50)	0.553
VEGFR1	rs9513070							
	TT	57	12.7 (8.14–17.17)	1 (reference)	0.348	5.0 (3.20-6.71)	1 (reference)	0.022
	TC	83	17.0 (11.90-22.13)	0.76 (0.19–3.15)		7.7 (6.70–8.71)	1.43 (0.35-5.90)	
	CC	28	13.8 (8.10–19.57)	0.57 (0.14–2.33)		5.0 (3.74-6.29)	0.87 (0.21-3.58)	
	TC+CC	111	15.6 (12.03–19.25)	1.25 (0.88–1.78)	0.210	7.1 (5.81-8.49)	1.45 (1.05-2.02)	0.025
VEGFR2	rs2071559							
	CC	52	17.2 (12.76–21.61)	1 (reference)	0.079	7.2 (5.67-8.76)	1 (reference)	0.415
	CT	80	12.9 (8.00–17.77)	0.66 (0.41-1.06)		5.4 (4.49-6.26)	0.93 (0.60–1.44)	
	TT	38	12.4 (6.22–18.50)	1.03 (0.68–1.56)		6.0 (3.59-8.41)	1.17 (0.78–1.76)	
	CT+TT	118	12.8 (8.95–16.63)	0.65 (0.45-0.95)	0.024	5.5 (4.65-6.37)	0.83 (0.60-1.17)	0.289
ITGAV	rs35251833							
	GG	94	16.3 (12.72–19.94)	1 (reference)	0.598	6.0 (4.67–7.26)	1 (reference)	0.046
	GA	59	14.5 (10.37–18.62)	0.75 (043-1.31)		7.1 (5.04–9.26)	0.61 (0.36–1.04)	
	AA	17	10.5 (3.30–17.75)	0.79 (0.44–1.41)		4.0 (2.51–5.56)	0.50 (0.28-0.87)	
	GG + GA	153	15.6 (12.52–18.69)	0.76 (0.45–1.31)	0.326	6.3 (5.15–7.38)	0.56 (0.33-0.95)	0.027
KRAS	rs10842513							
	GG	150	15.6 (12.75–18.53)	1 (reference)	0.024	6.0 (4.74–7.20)	1 (reference)	0.490
	GA + AA	20	8.8 (4.52–12.99)	0.57 (0.34-0.93)		5.3 (1.65-8.91)	0.84 (0.51–1.38)	
MAP2K4	rs3826392							
	TT	99	16.5 (14.31–18.61)	1 (reference)	0.042	5.9 (4.60–7.27)	1 (reference)	0.989
	TG	63	12.7 (7.98–17.33)	0.40 (0.19–0.84)		6.0 (3.98-8.02)	0.98 (0.45-2.12)	
	GG	8	9.9 (8.90–10.90)	0.41 (0.19–0.89)		7.7 (0.00–19.99)	1.01 (0.46-2.20)	
MAPK11	rs2076139							
	GG	112	14.8 (11.59–18.05)	1 (reference)	0.574	5.2 (3.99-6.37)	1 (reference)	0.024
	GA	54	13.8 (9.63–18.05)	1.80 (0.57-5.70)		7.5 (6.97-8.05)	1.57 (0.58-4.28)	
	AA	4	22.5 (0.10-44.95)	1.67 (0.52–5.38)		8.8 (5.29–12.29)	0.99 (0.35-2.75)	
	GA+AA	58	14.5 (8.45–20.53)	1.12 (0.79–1.60)	0.520	7.6 (6.76–8.38)	1.60 (1.14–2.24)	0.006

The values highlighted in bold are statistically significant (P < 0.05)

OS overall survival, PFS progression-free survival, SNP single-nucleotide polymorphism

Discussion

Variants in genes belonging to the VEGF pathway were found to be associated with outcomes in metastatic NSCLC patients treated with first-line platinum-based chemotherapy. The multivariate analyses after adjusting for the most relevant clinical and pathological parameters showed that polymorphisms in the VEGF pathway were significantly associated with OS, rs2010963 (VEGFA) and rs2071559 (VEGFR2), and with PFS, rs35251833 (ITGAV) and rs2076139 (MAPK11).

A large body of research suggests that polymorphisms within the main VEGF-related genes can predict NSCLC outcomes, although their clinical utility has not yet been demonstrated [11-15, 19, 20, 23-27]. Some of the most interesting findings to date concern the VEGFA rs2010963 (c.-634G>C, +405G>C). In 2008, Heist et al. conducted a study in a cohort of 462 stage IA-IIB NSCLC patients and observed that C allele carriers of the rs2010963 presented longer OS (p = 0.006) [25]. Later, through univariate analysis, de Mello et al. found that this SNP was also significantly associated with OS in stage I-IV NSCLC patients

Ν

OS

. . ..

SNP

Gene



Fig.1 OS by genotype for patients with the *VEGFA* rs2010693 polymorphism (**a**) and *VEGFR2* rs2071559 polymorphism (**b**). OS overall survival, *VEGFA* vascular endothelial growth factor A, *VEGFR2* or *KDR* kinase insert domain receptor

(p=0.042) [12]. Conversely, other studies performed in NSCLC patients did not find any correlation between this SNP and OS [11, 13–15]. Other findings of note include the 2012 study by Eng et al. In their systematic review and metaanalysis [26], updated in 2013 [27], these authors evaluated the role of polymorphisms in the VEGF pathway as prognostic and predictive factors in cancer, including NSCLC. They reported that harboring the C allele of rs2010963 conferred a significant protective effect on OS regardless of the tumor type (p = 0.007). Additionally, this allele correlated with better overall response to bevacizumab in combination with platinum-based chemotherapy (p=0.038) in a cohort of 303 patients with advanced or recurrent non-squamous NSCLC from the ABIGAIL study [28]. The functional effect of this variant on VEGF expression remains inconsistent. Whereas two studies reported that the GG genotype implied higher VEGF production [8, 29], another study carried out in NSCLC described opposite results [7]. In our study, we observed that C allele carriers of rs2010963 presented longer OS, a finding in keeping with the results reported by previous studies [25, 26]. These findings strengthen the hypothesis that rs2010963 could predict NSCLC outcomes, although more research is required.

As for the association between *VEGFR2* rs2071559 (c.-906T>C, -604T>C) and survival in NSCLC patients, few studies have been conducted to date. Uzunoglu et al. found that NSCLC adenocarcinoma patients who underwent surgical resection with the TT genotype presented better OS than patients with the CC genotype (p=0.024) [24]. In a

subsequent study conducted in a cohort of 350 inoperable stage I-IV primary NSCLC patients receiving radiotherapy, the C allele was significantly associated with poorer OS (p = 0.002) and PFS (p = 0.009) [23]. However, in the ABIGAIL study, no associations were found between the variant and OS or PFS [28]. In silico and in vitro functional analyses showed that rs2071559 correlated with VEGFR2 mRNA expression in NSCLC tumors, which could be explained by the fact that the variant introduces a putative IKZF2 (IKAROS Family Zinc Finger 2) transcription binding site in the promoter region [9]. In the present study, we found that metastatic NSCLC patients with the CC genotype for the polymorphism had a greater OS. The inconsistency of the results so far published could be due to the heterogeneity in patient populations tested, as it has been reported that VEGFR2 protein expression differs between early- and advanced-stage NSCLC [9]. Consequently, in advancedstage NSCLC, further research is needed to confirm the relevance of the rs2071559 variant as a prognostic marker.

ITGAV rs35251833 was also found to be clinically relevant in the present study. ITGAV is a cell surface adhesion receptor involved in cell survival, proliferation, and invasion, as well as in tumor growth and angiogenesis, by interacting with the extracellular matrix. Thus, genetic variants in *ITGAV* are likely to modulate NSCLC prognosis. Yi et al. performed a study in a cohort of 301 Chinese lung cancer patients treated with thoracic radiation in which they investigated the association of functional polymorphisms in *ITGAV* and *ITGB6* integrin genes with the risk of radiation pneumonitis [30]. In their set of polymorphisms, they included the rs1839123, which is in high LD with rs35251833 (D': 1.0, r^2 : 0.99 in European and Asian populations; data from Phase 3 of the 1000 Genomes Project), and found no association with the variant. More recently, we analyzed the correlation of the variant with survival in a cohort of stage I-III NSCLC patients treated with complete surgical resection, and obtained negative results [19]. The variant is an intronic SNP associated with transcriptional regulation, which suggests functional relevance. In the present study, we found that the G allele of rs35251833 correlated with longer PFS in metastatic NSCLC patients treated with first-line platinum-based chemotherapy. Apart from the results herein reported, there are no data showing significant associations of rs35251833 with outcomes in NSCLC, although it should be noted that little research has been conducted in this area. Moreover, two previous studies conducted in colon cancer patients showed better outcomes in patients harboring the G allele [18, 21]. Based on the findings of our group, we propose the variant as a potential outcome biomarker, worthy of validation.

Finally, almost no data are available regarding the potential value of the *MAPK11* rs2076139 variant as a biomarker of survival in NSCLC. MAPK11 participates in the MAPK signaling pathway, which modulates angiogenesis and cancer outcomes. In lung cancer, the previously mentioned study by Sullivan et al. conducted in early-stage NSCLC patients showed no association of the rs2076139 variant with prognosis [19]. The analyzed SNP is located in exon 9 and causes a synonymous substitution (p.Ser252=) of unknown pathogenicity, although it has been associated with mRNA levels [31]. In the present study, we found that metastatic NSCLC patients carrying the A allele presented better PFS. Our data suggest a possible role of the *MAPK11* rs2076139 variant in predicting survival in metastatic NSCLC patients, although additional studies are needed to validate this result.

The present study adds support to the utility of *VEGF*related polymorphisms as prognostic biomarkers in metastatic NSCLC patients. We conducted a comprehensive evaluation of putative functional polymorphisms in the VEGF pathway genes, but more in vitro functional analyses are needed to provide further insight into their pathogenicity. It should be noted that our findings could be limited by the relatively small number of patients included. However, as far as we know, this is the largest reported prospective cohort of metastatic NSCLC patients treated with a platinum-based chemotherapy regimen in which associations between SNPs in the VEGF pathway and survival have been analyzed.

Conclusions

This prospective study provides additional evidence concerning the association of functional germline polymorphisms in *VEGFA* and *VEGFR2* genes with prognosis. Moreover, it shows for the first time that variants in *ITGAV* and *MAPK11* genes involved in the angiogenesis process predict clinical outcome in metastatic NSCLC patients.

Acknowledgements This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. We thank Carolyn Newey for language editing.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declared no conflict of interest.

References

- 1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015) Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin 66(1):7–30
- Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R (2010) Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. J Thorac Oncol 5(1):29–33
- Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C et al (2018) Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol 29(Suppl 4):iv192–iv237
- Zhan P, Wang J, Lv X, Wang Q, Qiu L, Lin X et al (2009) Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with metaanalysis. J Thorac Oncol 4(9):1094–1103
- Alevizakos M, Kaltsas S, Syrigos KN (2013) The VEGF pathway in lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol 72(6):1169–1181
- Piperdi B, Merla A, Perez-Soler R (2014) Targeting angiogenesis in squamous non-small cell lung cancer. Drugs 74(4):403–413
- Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E et al (2004) VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 46(3):293–298
- Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW (2003) Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. Cancer Res 63(4):812–816
- Glubb DM, Cerri E, Giese A, Zhang W, Mirza O, Thompson EE et al (2011) Novel functional germline variants in the VEGF receptor 2 gene and their effect on gene expression and microvessel density in lung cancer. Clin Cancer Res 17(16):5257–5267
- Maeda A, Nakata M, Yasuda K, Yukawa T, Saisho S, Okita R et al (2013) Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on non-small cell lung cancer tumor angiogenesis. Oncol Rep 29(1):39–44
- Dong J, Dai J, Shu Y, Pan S, Xu L, Chen W et al (2010) Polymorphisms in EGFR and VEGF contribute to non-small-cell lung cancer survival in a Chinese population. Carcinogenesis 31(6):1080–1086
- 12. de Mello RA, Ferreira M, Soares-Pires F, Costa S, Cunha J, Oliveira P et al (2013) The impact of polymorphic variations in the 5p15, 6p12, 6p21 and 15q25 Loci on the risk and prognosis of portuguese patients with non-small cell lung cancer. PLoS ONE 8(9):e72373
- Masago K, Fujita S, Kim YH, Hatachi Y, Fukuhara A, Nagai H et al (2009) Effect of vascular endothelial growth factor polymorphisms on survival in advanced-stage non-small-cell lung cancer. Cancer Sci 100(10):1917–1922

- Chen N, Ma CN, Zhao M, Zhang YJ (2015) Role of VEGF gene polymorphisms in the clinical outcome of non-small cell lung cancer. Genet Mol Res 14(4):16006–160011
- Guan X, Yin M, Wei Q, Zhao H, Liu Z, Wang L-E et al (2010) Genotypes and haplotypes of the VEGF gene and survival in locally advanced non-small cell lung cancer patients treated with chemoradiotherapy. BMC Cancer 10:431
- 16. Edge S, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene F, Trotti A (2010) AJCC cancer staging manual. Springer, New York
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R et al (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer 45(2):228–247
- Riera P, Virgili AC, Salazar J, Sebio A, Tobeña M, Sullivan I et al (2018) Genetic variants in the VEGF pathway as prognostic factors in stages II and III colon cancer. Pharmacogenomics J 18(4):556–564
- Sullivan I, Salazar J, Arqueros C, Andrés M, Sebio A, Majem M et al (2017) KRAS genetic variant as a prognostic factor for recurrence in resectable non-small cell lung cancer. Clin Transl Oncol 19(7):884–890
- Glubb DM, Paré-Brunet L, Jantus-Lewintre E, Jiang C, Crona D, Etheridge AS et al (2015) Functional FLT1 genetic variation is a prognostic factor for recurrence in stage I–III non-small-cell lung cancer. J Thorac Oncol 10(7):1067–1075
- Paré-Brunet L, Sebio A, Salazar J, Berenguer-Llergo A, Río E, Barnadas A et al (2015) Genetic variations in the VEGF pathway as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy. Pharmacogenomics J 15(5):397–404
- Genomes Project Consortium RA, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM et al (2015) A global reference for human genetic variation. Nature 526(7571):68–74
- Butkiewicz D, Krześniak M, Drosik A, Giglok M, Gdowicz-Kłosok A, Kosarewicz A et al (2015) The VEGFR2, COX-2 and MMP-2 polymorphisms are associated with clinical outcome of patients with inoperable non-small cell lung cancer. Int J Cancer 137(10):2332–2342
- 24. Uzunoglu FG, Kaufmann C, Wikman H, Güngör C, Bohn BA, Nentwich MF et al (2012) Vascular endothelial growth factor

receptor 2 gene polymorphisms as predictors for tumor recurrence and overall survival in non-small-cell lung cancer. Ann Surg Oncol 19(7):2159–2168

- 25. Heist RS, Zhai R, Liu G, Zhou W, Lin X, Su L et al (2008) VEGF polymorphisms and survival in early-stage non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 26(6):856–862
- 26. Eng L, Azad AK, Habbous S, Pang V, Xu W, Maitland-van der Zee AH et al (2012) Vascular endothelial growth factor pathway polymorphisms as prognostic and pharmacogenetic factors in cancer: a systematic review and meta-analysis. Clin Cancer Res 18(17):4526–4537
- Eng L, Liu G (2013) VEGF pathway polymorphisms as prognostic and pharmacogenetic factors in cancer: a 2013 update. Pharmacogenomics 14(13):1659–1667
- Pallaud C, Reck M, Juhasz E, Szima B, Yu C-J, Burdaeva O et al (2014) Clinical genotyping and efficacy outcomes: exploratory biomarker data from the phase II ABIGAIL study of first-line bevacizumab plus chemotherapy in non-squamous non-small-cell lung cancer. Lung Cancer 86(1):67–72
- 29. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE (2000) Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. Cytokine 12(8):1232–1235
- 30. Yi M, Tang Y, Liu B, Li Q, Zhou X, Yu S et al (2016) Genetic variants in the ITGB6 gene is associated with the risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients treated with thoracic radiation therapy. Tumour Biol 37(3):3469–3477
- Paré-Brunet L, Glubb D, Evans P, Berenguer-Llergo A, Etheridge AS, Skol AD et al (2014) Discovery and functional assessment of gene variants in the vascular endothelial growth factor pathway. Hum Mutat 35(2):227–235

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

