

Cómo se establece la relevancia clínico-farmacológica de polimorfismos

Rocio Prieto-Pérez; Teresa Cabaleiro; Francisco Abad-Santos.

La secuenciación completa del genoma humano, iniciada en la década de los 90 y concluida en 2003 [1], supuso una nueva era de investigación basada en la genómica que afectará crucialmente a la biología, a la salud y a la sociedad. El proyecto Internacional HapMap ha sido el siguiente gran paso tras la secuenciación del genoma humano; este es un “catálogo” de variantes genéticas comunes que se encuentran en el ADN humano cuya información es de acceso libre [2]. Describe cuáles son esas variantes, dónde ocurren en el ADN, sus frecuencias y correlaciones entre ellas, en muestras de ADN de poblaciones de diferentes partes del mundo (África, Asia, América y Europa). Este proyecto permite realizar estudios de asociación genotipo-fenotipo con la implicación que supone para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento personalizado de las enfermedades [3]. En este contexto es muy importante el desarrollo de la bioinformática, como herramienta que permita extraer toda información contenida en bases de datos para generar nuevos conocimientos. Así como el desarrollo de las llamadas “ómicas”: genómica, proteómica y metabolómica entre otras.

La mayoría de las enfermedades se deben a varios factores desencadenantes, donde están implicados múltiples genes e incluso factores ambientales. Por ello, es necesario analizar varios biomarcadores, para obtener un perfil molecular de una determinada enfermedad [4]. Los biomarcadores se pueden describir como biomoléculas, características específicas o indicadores de un cambio en cualquier estructura biológica que puede ser objetivamente medida en un organismo vivo [5]. Dentro de estos se encuentran los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Existen aproximadamente 10 millones de SNPs que diferencian unos individuos de otros en la población. Recientes avances en tecnologías de genotipado a gran escala han proporcionado una oportunidad para identificar dichos SNPs [4].

La búsqueda de nuevos biomarcadores es necesaria para acelerar el desarrollo de nuevos fármacos e incluso para predecir la respuesta de estos en un determinado paciente, tanto a nivel de eficacia como de seguridad. De este último punto, se encarga la farmacogenética, que estudia la influencia que tienen los marcadores genéticos sobre el mecanismo de acción de los fármacos [6]. Entre las finalidades de la farmacogenética se encuentra predecir la respuesta de cada paciente a un determinado fármaco, de esta forma se puede

limitar la toxicidad al tratamiento, aumentando su eficacia y reduciendo la incidencia de efectos adversos [7].

Muchos han sido los esfuerzos para facilitar la búsqueda de biomarcadores, suponiendo una revolución en el campo de la farmacogenética el desarrollo de los llamados “microarrays” o biochips. Esta herramienta permite analizar miles de genes a la vez y reproducir los datos obtenidos [8]. Los microarrays pueden utilizarse para diversas aplicaciones, ya que además de permitir el análisis de secuencias específicas de ADN, como los SNPs, también son de utilidad para obtener información de perfiles de expresión génica bajo determinadas condiciones (por ejemplo, comparar un tejido sano con uno enfermo) o de cantidades de proteína, así como del grado que han sido modificadas por adición de otras moléculas [5]. Por tanto, el desarrollo de esta tecnología ha proporcionado una oportunidad para identificar biomarcadores de pronóstico y predictivos de la eficacia de un determinado fármaco en el tratamiento de una enfermedad. Marcadores genéticos que pueden ser utilizados para reajustar dosis de fármacos o excluir a aquellos pacientes que no van a responder a una determinada terapia e incluso a aquellos que tienen un alto riesgo a desarrollar efectos adversos graves a consecuencia del tratamiento [9].

Rocio Prieto-Pérez,
Teresa Cabaleiro,
Francisco Abad-Santos.
Servicio de Farmacología
Clínica, Hospital
Universitario de la
Princesa, Instituto Teófilo
Hernando, Instituto de
Investigación Sanitaria
Princesa (IP), Madrid,
Spain.

APLICACIÓN CLÍNICA DE LA FARMACOGENÉTICA

Existe un alto porcentaje de pacientes (entre el 50 y el 75%) que no responden a un determinado tratamiento [7]. Además de no responder muchos de ellos desarrollan efectos adversos a consecuencia de éste [10]. Por ejemplo, en EEUU se ha estimado que las reacciones adversas, muchas de ellas explicadas desde el modo de acción del fármaco, afectan a cerca de 2 millones de pacientes y causan la muerte de unas 100.000 personas cada año [11]. De ahí la importancia del desarrollo de test genéticos que identifiquen aquellos pacientes que son respondedores o no-respondedores a un determinado fármaco.

Uno de los ejemplos más característicos de la aplicación de la farmacogenética en la práctica clínica habitual es el caso del alelo HLA-B*5701 que está asociado a hipersensibilidad en pacientes VIH positivos tratados con abacavir [12]. Otro ejemplo, es la variabilidad de la respuesta a warfarina ligada en diversos estudios a las variantes del gen CYP2C9 y VKORC1 [13]. El conocimiento de polimorfismos en dichos genes unido a otras variables del paciente, como son la edad y el índice de masa corporal, pueden ayudar a seleccionar la dosis inicial de warfarina adecuada para cada paciente, logrando una mayor eficiencia del anticoagulante y disminuyendo el riesgo de efectos adversos [14]. Otros polimorfismos en el gen TPMT, que codifica la enzima tiopurina S-metiltransferasa, son responsables de deficiencia o baja actividad de dicha enzima aumentando el riesgo de mielotoxicidad tras el tratamiento con azatioprina o 6-mercaptopurina [15]. Por otro lado, se ha demostrado que variaciones en genes involucrados en la respuesta inmune, como el gen de la IL28b, existe una fuerte asociación con la respuesta al tratamiento utilizado en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C (interferon pegilado más ribavirina) [16]. Tanto la determinación del genotipo IL28b como de la TPMT son recomendados por la FDA, este último se utiliza para reajustar la dosis del fármaco y evitar efectos adversos a consecuencia del tratamiento [13]; ¿Pero cómo han llegado estos biomarcadores a la práctica clínica habitual?.

CÓMO LLEGA UN BIOMARCADOR A LA CLÍNICA

Una vez que los biomarcadores han sido descubiertos y seleccionados, es importante considerar no sólo la significancia estadística si

no también su potencial para resolver realmente un problema clínico y la relación coste-efectividad [17].

En el caso de los SNPs, para descubrir un biomarcador se pueden seguir dos estrategias diferentes. Por un lado, se encuentran los estudios de asociación de genoma completo (GWAS del inglés "Genome-wide association studies"), que como su propio nombre indica analizan el genoma completo sin ninguna predilección por determinadas regiones, genes o variantes de estos. Por tanto, en el caso de los GWAS no partimos de un gen candidato en concreto, lo cual ofrece la oportunidad de superar las barreras impuestas por la limitación del conocimiento que existe de la etiopatogenia de una determinada enfermedad [18]. En estos estudios generalmente se genotipan desde 300.000 hasta 1 millón de SNPs en más de 1.000 casos y 1.000 controles.

Por otro lado, para la mayoría de las enfermedades existe una gran cantidad de publicaciones que pueden ser utilizadas para identificar genes y regiones cromosómicas de interés. Estas publicaciones incluyen estudios de ligamiento, de genes candidatos y de la patogénesis de la propia enfermedad [19]. Por tanto, una revisión exhaustiva de los estudios de asociación de polimorfismos con una determinada enfermedad puede servirnos como punto de partida para la búsqueda de un biomarcador con posible aplicación clínica. En este caso, a diferencia de los GWAS, primero habría que seleccionar los SNPs candidatos. Posteriormente se genotiparían en una muestra de pacientes y controles determinada y se analizarían los resultados obtenidos. Además del análisis estadístico de dichos resultados, en un estudio farmacogenético debe cumplirse el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), que establece que las frecuencias alélicas en la población se mantienen estables de generación en generación. De este forma se garantiza que los resultados encontrados no se deben a mecanismos que ocasionan cambios en las frecuencias alélicas en la población, como son la selección, mutación, migración y la deriva genética [20]. Desviaciones en HWE pueden indicar fallos en uno o varios supuestos, como por ejemplo no aleatoriedad en el apareamiento, estratificación y selección parcial de la población o incluso puede indicar errores en el genotipado de las muestras. Si la desviación en dicho equilibrio es fuerte puede indicar que es necesario repetir o volver a chequear el genotipado realizado [21].

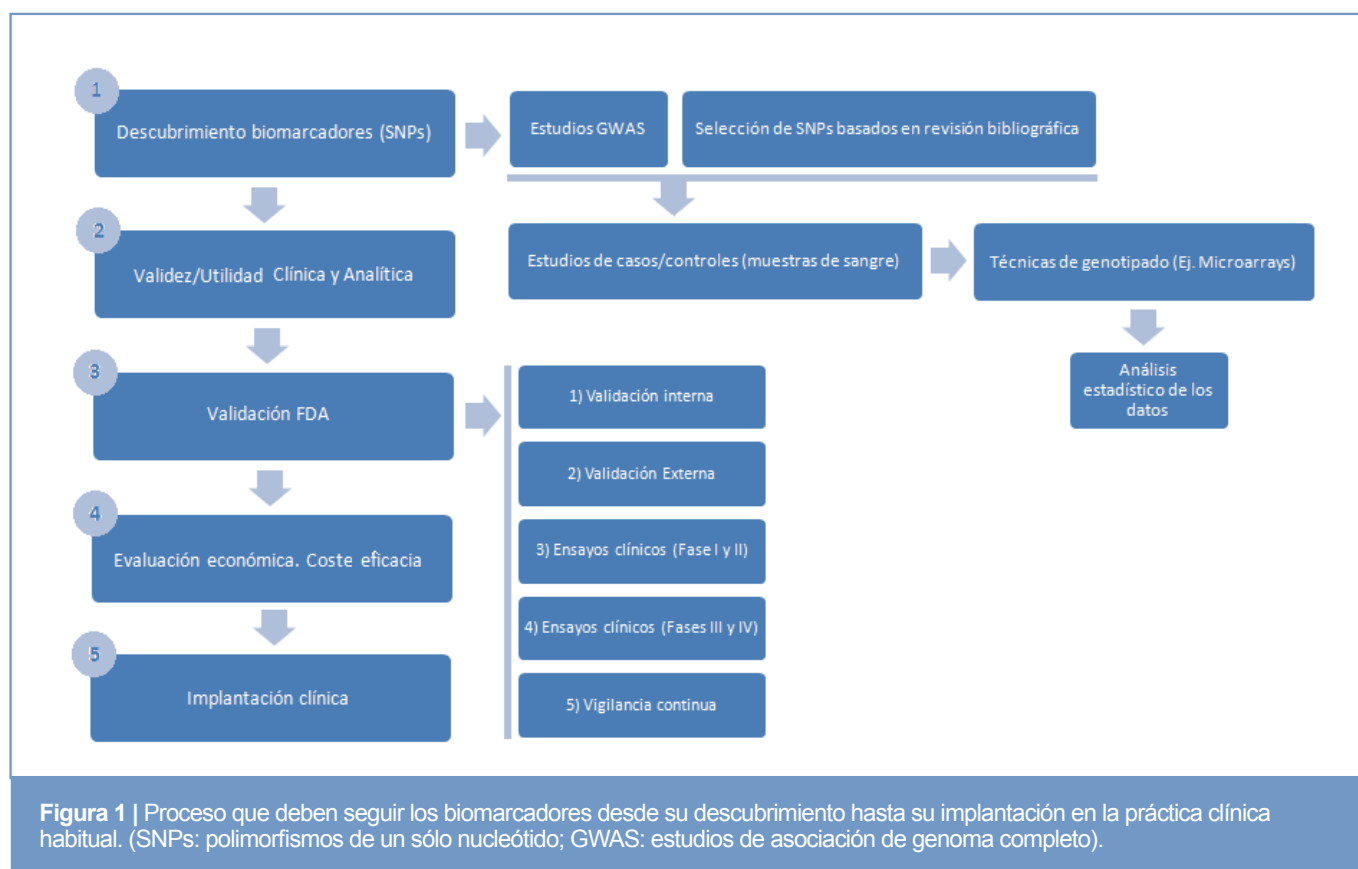
La decisión de continuar con el proceso de implantación de un biomarcador depende de su

utilidad en la práctica clínica habitual [17]. Por lo tanto, los biomarcadores han de pasar por un largo y complejo proceso de validación (Figura 1). De forma resumida, las fases por las que debe de pasar un biomarcador para ser aceptado son: validación interna (con una cohorte inicial, a menudo se evalúa en esta fase la sensibilidad y especificidad de un biomarcador seleccionado); validación externa (se utiliza el mismo tipo de plataforma y análisis estadístico o informático de la validación interna, pero en una segunda cohorte externa independiente); fases I y II de ensayos clínicos, seguidos por otros ensayos de mayor tamaño muestral (fase III y IV) y una vigilancia continuada [17].

La FDA (Food and Drug Administration) es la encargada de la validación y aprobación de los biomarcadores en la práctica clínica. En la última década se ha producido un incremento considerable en los biomarcadores que son requeridos o se recomienda que se analicen para tomar una decisión clínica. Según la FDA un biomarcador genómico puede ser de utilidad en la identificación de pacientes respondedores y no-respondedores, evitando la toxicidad y ajustando la dosis del fármaco para optimizar su

eficacia y seguridad. Los biomarcadores pueden ser clasificados en varias categorías: respuesta clínica y diferenciación, riesgo de identificación, selección de dosis, susceptibilidad, resistencia y diferente diagnóstico de la enfermedad y dianas de fármacos polimórficos. Sin embargo, son pocos los biomarcadores recogidos en la FDA en los que realmente se recomienda realizar un test genético a la hora de tomar una decisión terapéutica [13]. La FDA recoge la definición del término de biomarcador validado en la guía llamada "Guidance for Industry: Pharmacogenomic Data Submission". Un biomarcador validado es descrito como "un biomarcador que es medido mediante un sistema analítico cuyo procedimiento está bien establecido y cuyo significado científico en el campo biológico, toxicológico, farmacológico o clínico está bien establecido" [22]. Actualmente en la página de la FDA hay 114 fármacos para los cuales se requiere, se recomienda o se proporciona información para la utilización de ciertos biomarcadores para predecir o reajustar la dosis de los fármacos en función del paciente [13]. Esta tabla se actualiza periódicamente.

En la actualidad es mucho mayor la tasa



de descubrimiento de biomarcadores que la velocidad a la que están siendo validados. Esta situación ha ralentizado el desarrollo y translación de los biomarcadores a la clínica. La FDA para intentar solventar esta limitación ha creado otra guía ("Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation"), donde se recogen los principios de los métodos de validación bioanalítica establecidos [17]. Los parámetros fundamentales que debe de cumplir un biomarcador para ser validado son precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad [23]. La reproducibilidad debe realizarse en laboratorios diferentes con distinto personal [5]. A la hora de evaluar un biomarcador también se tiene en cuenta su verdadera aplicación clínica, es decir, que verdaderamente solucione un problema al personal médico, si por si sólo es válido o hay que considerar otros biomarcadores, así como su valor predictivo [7]. De esta forma, los biomarcadores pueden ser una herramienta de utilidad en el diagnóstico clínico o en el tratamiento de una determinada enfermedad.

RETOS EN EL FUTURO

A pesar de los grandes avances conseguidos hasta el momento aún queda un largo camino por recorrer para que la aplicación de las pruebas farmacogenéticas en la práctica clínica habitual no sea tan limitada. De manera, que para conseguir una verdadera medicina personalizada aún queda por resolver retos

importantes.

Los test de genotipado son complejos y la interpretación de resultados requiere un alto nivel de conocimiento científico. Lo ideal es que la técnica que se utilice en clínica sea fácil de realizar y de la misma forma debería proporcionar resultados que puedan ser fácilmente comprendidos por el médico [7] o incluso que se proporcione una formación médica adecuada para la correcta interpretación de los resultados [14].

Además, para facilitar la implantación de biomarcadores en clínica, son necesarias mejoras en las técnicas genómicas utilizadas como la automatización, preparación de las muestras, rapidez de determinación y los costes necesarios para llevarlas a cabo [7].

Analíticamente un test debe tener la precisión adecuada, repetitividad y reproducibilidad para detectar los biomarcadores, independientemente del laboratorio en el que se analice [7]. Por tanto, es muy importante la estandarización de la metodología empleada. Además, otros retos relevantes son cambios en las políticas reguladoras y económicas así como en la legislación relacionada con la protección de datos. Sin olvidar que la integración de diferentes disciplinas es necesaria para el avance en el entendimiento de la etiopatogenia de cualquier enfermedad o de la respuesta a un determinado fármaco.

BIBLIOGRAFÍA

- Hayashizaki, Y., Discovery of the "RNA continent" through a contrarian's research strategy. *Genes Genet Syst*, 2011. 86(4): p. 221-9.
- Página web HapMap. Available from: <<http://www.hapmap.org/index.html.en>>.
- International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*, 2003. 426(6968): p. 789-96.
- Robeson, R.H., A.M. Siegel, and T. Dunckley, Genomic and Proteomic Biomarker Discovery in Neurological Disease. *Biomark Insights*, 2008. 3: p. 73-86.
- Silberring, J. and P. Ciborowski, Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends Analyt Chem*, 2010. 29(2): p. 128.
- Rioux, P.P., Clinical trials in pharmacogenetics and pharmacogenomics: methods and applications. *Am J Health Syst Pharm*, 2000. 57(9): p. 887-98; quiz 899-901.
- Spear, B.B., M. Heath-Chiozzi, and J. Huff, Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*, 2001. 7(5): p. 201-4.
- Bhasker, C.R. and G. Hardiman, Advances in pharmacogenomics technologies. *Pharmacogenomics*, 2010. 11(4): p. 481-5.
- Soh, T.I., W.P. Yong, and F. Innocenti, Recent progress and clinical importance on pharmacogenetics in cancer therapy. *Clin Chem Lab Med*, 2011. 49(10): p. 1621-32.
- Lazarou, J., B.H. Pomeranz, and P.N. Corey, Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 1998. 279(15): p. 1200-5.
- Nakamura, Y., Pharmacogenomics and drug toxicity. *N Engl J Med*, 2008. 359(8): p. 856-8.
- Pirmohamed, M., Genetics and the potential for predictive tests in adverse drug reactions. *Chem Immunol Allergy*, 2012. 97: p. 18-31.
- US Food and Drug Administration. Table of Valid Genomic Biomarkers in the context of approved drug labels. Accessed June 2012; Available from: <<http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>>
- Amur, S., et al., Integration and use of biomarkers in drug development, regulation and clinical practice: a US regulatory perspective. *Biomark Med*, 2008. 2(3): p. 305-11.
- Krynetski, E.Y. and W.E. Evans, Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology*, 2000. 61(3): p. 136-46.
- Thomas, D.L., et al., Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 2009. 461(7265): p. 798-801.
- Lin, D., et al., Searching for "omic" biomarkers. *Can J Cardiol*, 2009. 25(Suppl A): p. 9A-14A.
- Kitsios, G.D. and E. Zintzaras, Genome-wide association studies: hypothesis-"free" or "engaged"? *Transl Res*, 2009. 154(4): p. 161-4.
- Xu, Z. and J.A. Taylor, SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(Web Server issue): p. W600-5.
- Andrews, C., The Hardy-Weinberg Principle. *Nature Education Knowledge*, 2010. 1(8): p. 65.
- Salanti, G., et al., Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur J Hum Genet*, 2005. 13(7): p. 840-8.
- US Food and Drug Administration. Guidance for Industry Pharmacogenomic Data Submissions. March 2005; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm126957.pdf>
- US Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. May 2001; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>

*Asociación del alelo HLA-B*5701 con reacciones de hipersensibilidad por abacavir*

Teresa Cabaleiro; Manuel Román; Francisco Abad-Santos.

*Existe una asociación entre alelos HLA y la predisposición a desarrollar reacciones adversas por fármacos (1-3). Hace 10 años se demostró el fuerte valor predictivo del alelo HLA-B*5701 para la hipersensibilidad por abacavir, un inhibidor de la transcriptasa inversa usado para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (4). Estos autores estudiaron 18 pacientes VIH+ de origen caucásico con síndrome de hipersensibilidad inducido por abacavir, y revelaron que la frecuencia del alelo HLA-B*5701 en estos pacientes era significativamente mayor comparada con los sujetos control tolerantes a abacavir (n=167) (78% versus 2%).*

En 2008 se realizó un ensayo clínico prospectivo (2), que reveló que el test genético para la determinación del alelo HLA-B*5701 se asociaba a una reducción de la incidencia de la hipersensibilidad por abacavir del 7,8% al 2,7%. En base a los resultados obtenidos por dicho ensayo clínico, la FDA (Food and Drug Administration) y la EMA (Agencia Europea del Medicamento) actualizaron la ficha técnica del abacavir para incluir la recomendación de que todos los pacientes sean analizados para el alelo HLA-B*5701 antes de iniciar el tratamiento. Además, se ha demostrado que este test genético es coste-efectivo (5).

En el Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa realizamos la determinación de la presencia del alelo HLA-B*5701 en pacientes VIH+ antes de ser tratados con abacavir. Esta tarea asistencial se inició en mayo de 2008, y desde entonces hasta ahora hemos analizado 445 pacientes. A partir de una muestra de sangre, se extrae el ADN,

se cuantifica, y mediante hibridación alelo-específica se determina la presencia/ausencia del alelo HLA-B*57. Si el paciente resulta positivo para el alelo HLA-B*57 se confirma que se trata del subtipo HLA-B*5701 mediante secuenciación. De los 445 pacientes analizados hasta la actualidad en el Servicio de Farmacología Clínica, 14 resultaron positivos para el alelo HLA-B*5701 (3,1%) (Tabla 1), frecuencia similar a la de otras poblaciones caucásicas (6). A estos pacientes se les recomienda que no debe prescribirse abacavir a menos que no exista otra opción terapéutica y bajo un estricto control clínico para detectar reacciones de hipersensibilidad.

Conclusión: Con el test genético HLA-B*5701 se logra una reducción del riesgo de desarrollar hipersensibilidad por abacavir, y el médico tiene la información necesaria para prescribir un fármaco alternativo.

*Teresa Cabaleiro;
Manuel Román;
Francisco Abad-Santos.*

*Servicio de Farmacología
Clínica, Hospital
Universitario de la
Princesa, Instituto Teófilo
Hernando, Instituto de
Investigación Sanitaria
Princesa (IP), Madrid,
Spain.*

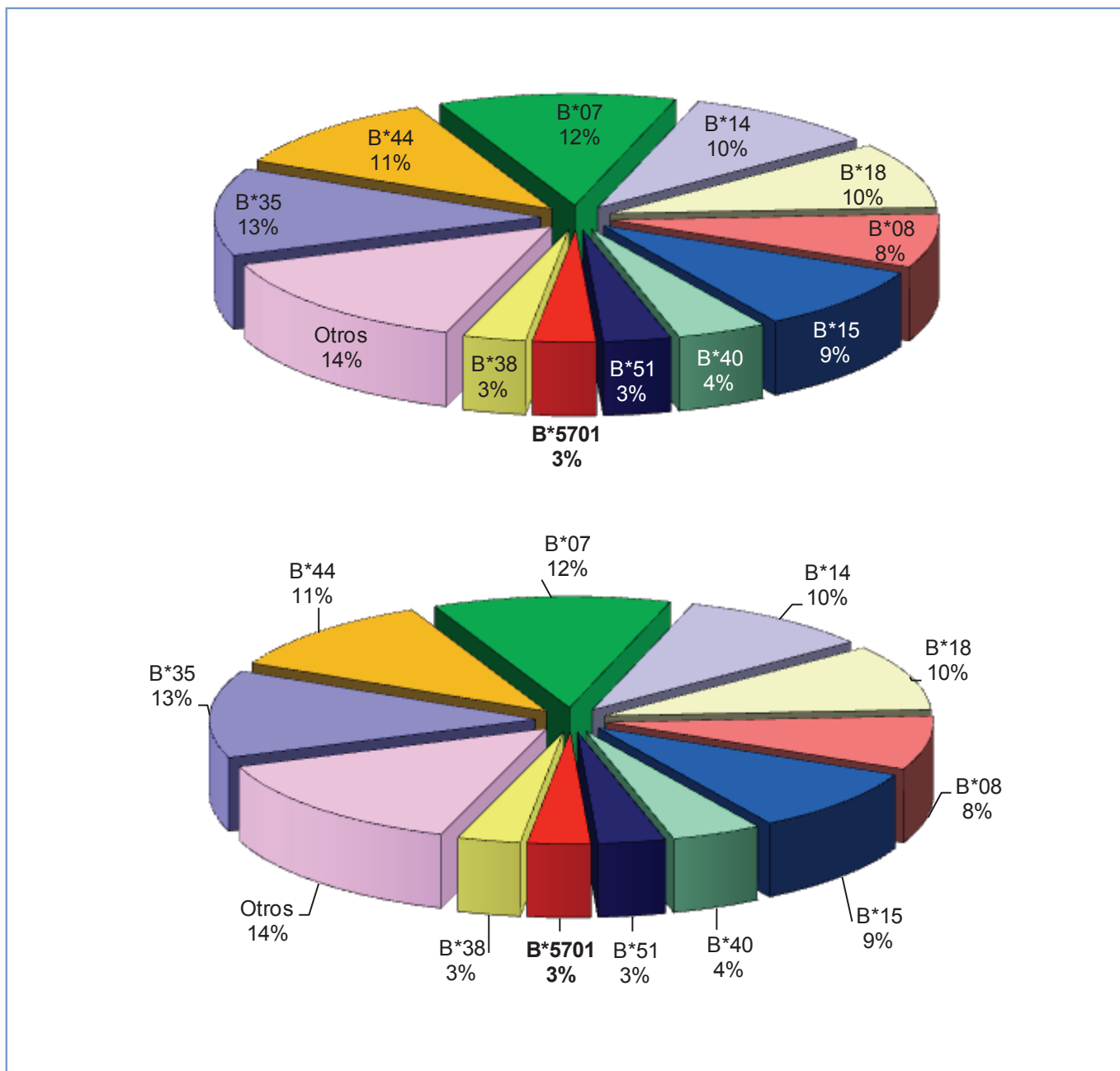


Figura 1 | Frecuencias alélicas del HLA-B. El alelo HLA-B*5701 asociado con hipersensibilidad a abacavir tiene una frecuencia del 3.1% en nuestra población de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chung WH, Hung SI, Hong HS, et al Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* 2004; 428: 486.
2. Mallal S, Phillips E, Carosi G, et al PREDICT-1 Study Team. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med* 2008; 358: 568-79.
3. Donaldson PT, Daly AK, Henderson J, et al. Human leucocyte antigen class II genotype in susceptibility and resistance to co-amoxiclav-induced liver injury. *J Hepatol* 2010; 53: 1049-53.
4. Mallal S, Nolan D, Witt C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 2002; 359: 727-32.
5. Schackman BR, Scott CA, Walensky RP, Losina E, Freedberg KA, Sax PE. The cost-effectiveness of HLA-B*5701 genetic screening to guide initial antiretroviral therapy for HIV. *AIDS* 2008; 22: 2025-33.
6. Allele Frequency Database. Available at: <http://www.allele frequencies.net>.