

Estudio farmacogenético en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado tratados con quimioterapia basada en platino

Facultad de Medicina / Universidad Autónoma de Barcelona

Trabajo de fin de Máster en Investigación clínica aplicada
en Ciencias de la Salud.

Convocatoria Junio 2013

Autor:

Ivana Gabriela Sullivan

Médico especialista en Oncología Médica

Dirección:

Dr. Agustí Barnadas Molins



Contenido	Página
Resumen	3
Introducción	4
Material y métodos.	9
Resultados.	10
Discusión	14
Conclusiones	14
Referencias	15



Resumen

La Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha definido Farmacogenética como la disciplina que estudia la relación entre las diferencias en la secuencia de ADN y la respuesta que presentan los pacientes a los fármacos. Con el abordaje farmacogenético se pretende la sustitución del actual sistema de “ensayo y error” en la selección y dosificación de los medicamentos por otro en el cual, partiendo de un correcto diagnóstico clínico, sea posible evaluar el genotipo del paciente y determinar qué medicamento y a qué dosis conseguirá un balance más adecuado entre su nivel de eficacia y el riesgo de producir reacciones adversas en ese paciente en concreto.

Los estudios farmacogenéticos realizados en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado son escasos y poco concluyentes. En consecuencia, no se han definido biomarcadores capaces de predecir ni la respuesta ni la toxicidad a la quimioterapia sola o en combinación con radioterapia en pacientes con CPNM avanzado.

En estos pacientes, únicamente se dispone de material tumoral procedente de biopsias en un 60% de los casos. Además, el ADN obtenido del material fijado en formol e incluido en parafina es escaso y de baja calidad para realizar técnicas moleculares.

Por este motivo, hemos obtenido ADN genómico a partir de las células nucleadas de sangre periférica de 103 pacientes y se ha estudiado el genotipo de dos grupos de genes: i) de la vía metabólica del ácido fólico (Timidilato Sintetasa (TS), Metil-tetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) y, ii) de la vía de reparación del ADN (*Excision repair cross-complementing group 1 (ERCC1)* y *Xeroderma pigmentosum group D (XPD)*).



Introducción

El cáncer de pulmón es el tumor maligno más frecuente en el mundo, estimándose más de 1,7 millones de casos diagnosticados en el año 2007 y más de 1,5 millones de pacientes que murieron por esta enfermedad. Es la principal causa de mortalidad por tumores malignos en el mundo y su incidencia sigue aumentando en algunos países industrializados [1].

El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) representa aproximadamente el 80% de todos los casos y alrededor de dos tercios de los pacientes son diagnosticados en una fase avanzada de la enfermedad, en la que el tratamiento habitual son las combinaciones de quimioterapia y radioterapia. El factor pronóstico más importante en la supervivencia es el estadio (clasificación TNM-AJCC) y factores clínicos como el estado general, la pérdida de peso y las comorbilidades cardio-respiratorias [2]. El estadio basado en el TNM tiene un buen valor pronóstico en estadios tempranos sin embargo, en la enfermedad avanzada, los factores clínicos (estado general, pérdida de peso, comorbilidades) adquieren mayor importancia, existiendo una importante variabilidad de pronóstico entre pacientes con estadio similar no discriminada por la clasificación TNM.

A pesar de los avances en el tratamiento en los últimos 20 años, menos del 30% de los pacientes responden a la quimioterapia y la supervivencia se mantiene entre el 10 y el 12% a los cinco años [3]. La estrategia del tratamiento con quimioterapia se basa en la combinación de dos drogas: un derivado de platino (cisplatino o carboplatino) en combinación con un fármaco de tercera generación (gemcitabina, vinorelbina, o taxanos).

En los últimos años, algunos estudios de farmacogenética y farmacogenómica han relacionado algunos biomarcadores con el pronóstico y la respuesta al tratamiento, como los genes *ERCC1*, *BRCA1*, *RRM1* y *RRM2*, pero todos ellos precisan de estudios de confirmación prospectiva [4, 5]. La necesidad de diseñar nuevos estudios basados en estas disciplinas emergentes, podrían permitir personalizar los tratamientos basados en los genotipos individuales de los pacientes, mejorando su eficacia y reduciendo su toxicidad. Recientemente un fármaco antimetabolito denominado pemetrexed ha demostrado una eficacia superior en el subgrupo de pacientes con CPNM de histología no escamosa, probablemente debido a la presencia de niveles inferiores de timidilato sintetasa (TS) en estos tumores [6]. En este sentido se cree que los polimorfismos de la TS podrían influir en la respuesta a pemetrexed.



Algunos estudios han descrito que los polimorfismos en ciertos genes, especialmente en los genes reparadores del ADN, juegan un papel importante tanto en la respuesta tumoral a la quimioterapia como en la evolución de los pacientes [7].

La individualización del tratamiento basada en la búsqueda de marcadores genéticos como factores de resistencia a los distintos agentes quimioterápicos es uno de los objetivos prioritarios de la investigación aplicada al enfermo oncológico, basados en el análisis de ADN, ARN y proteínas. La escasa disponibilidad y baja calidad de las muestras tumorales, son las limitaciones más importantes para estos estudios: en el cáncer de pulmón avanzado, no tributario a tratamiento quirúrgico, únicamente se dispone de material tumoral procedente de la biopsia en un 60% de los pacientes y además, este material obtenido de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, contiene un número muy bajo de células tumorales. Por este motivo se han desarrollado nuevas técnicas para la búsqueda y el análisis de diferentes polimorfismos y en concreto de SNPs, (Single Nucleotide Polymorphisms) a partir del ADN obtenido de células nucleadas de sangre periférica. Existen muchos genes polimórficos que han demostrado un importante papel en la eficacia de la quimioterapia en diferentes tumores, como por ejemplo TS y respuesta a 5-Fluorouracilo, UGT1A1 y toxicidad a irinotecán, e incluso en patología no neoplásica, como los relacionados con fenómenos trombóticos (p.ej., MTHFR) o la enfermedad de Alzheimer.

Así pues, conocer los factores pronósticos moleculares y predictivos de respuesta podría ayudar a una mejor individualización del tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón. Los genes conocidos que podrían estar relacionados con la respuesta o la toxicidad al tratamiento quimioterápico en el cáncer de pulmón son los siguientes:

1. Polimorfismos en genes de reparación del ADN:

1.1. Los genes de la vía de reparación por escisión de nucleótidos: "NER" (Nucleotide Excision Repair)

Este proceso de reparación de la molécula de ADN es un mecanismo de defensa celular que se activa en reacción a los efectos citotóxicos de la quimioterapia basada en derivados del platino eliminando los aductos que distorsionan la doble hélice de ADN [8]. El complejo proteico reparador está codificado entre otros por:

- El gen de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1 (ERCC1)
- El gen de la xeroderma pigmentosa grupo F (XPF) y el gen de la xeroderma pigmentosa grupo D (XPD)



El sistema NER se divide en dos sub-vías: TCR (transcription-coupled repair) y GGR (global genomic repair). La vía GGR actúa en las lesiones de DNA en todo el genoma, tanto en áreas de genes sin transcripción en DNA activo, como en DNA inactivo; la vía TCR sólo repara lesiones en áreas de DNA de genes activos en transcripción [9].

a) El gen de la reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1 (ERCC1)

El gen ERCC1 se localiza en el cromosoma 19q13.2-q13.3 y codifica una proteína de 297 aminoácidos. Se han identificado varios polimorfismos en este gen:

- a) un polimorfismo en el codón 118, posición 19007, que provoca un cambio C>T y no modifica el aminoácido resultante, la asparragina (Asn)
- b) un segundo SNP, C>A, localizado en la posición 8092 de la región no traducida 3' UTR y
- c) un SNP localizado en el intrón 3, posición 19716, que implica un cambio G>C.

El factor pronóstico de *ERCC1* fue por primera vez reportado en 2005 por Simon et al, que demostraron la correlación entre niveles elevados de mRNA de *ERCC1* y un aumento de supervivencia en pacientes con CPNM resecados (mediana de 94.6 meses versus 35.5 meses, $p=0.01$) [10]. Este hallazgo fue confirmado un año más tarde por el International Adjuvant Lung Trial-bio (IALT-bio), estudio en el que se determinaron los niveles de *ERCC1* por IHQ en 867 pacientes con CPNM. Entre los pacientes que no recibieron quimioterapia adyuvante, aquellos con tumores *ERCC1* positivos sobrevivieron más tiempo que aquellos con tumores *ERCC1* negativos (hazard ratio=0.66; 95% IC:0.49-0.90; $p=0.009$) [4, 5]. En el mismo estudio se evaluó el valor predictivo de la expresión de *ERCC1* en cuanto a la respuesta a la QT basada en platino, revelando una supervivencia significativamente superior en los pacientes con tumores *ERCC1* negativos (HR=0.65; 95% IC:0.50-0.86; $p=0.002$) comparados con los pacientes con tumores *ERCC1* positivos (HR=1.14; 95% IC:0.84-1.55; $p=0.40$), sugiriendo que los pacientes con tumores *ERCC1* positivos no se beneficiarían de una QT adyuvante [11].

En el escenario de la enfermedad avanzada y/o metastásica, el valor predictivo de *ERCC1* para la supervivencia y la sensibilidad al tratamiento con derivados del platino ha sido estudiada extensamente, aunque los resultados han sido variables y en ocasiones contradictorios. Un reciente meta-análisis de 12 estudios que incluyó un total de 836 pacientes en el que se analizó el estado de *ERCC1* por IHQ o RT-PCR, reportó una mediana de supervivencia significativamente mayor en los pacientes con niveles bajos o negativos para *ERCC1*, siendo la respuesta a la QT basada en platinos también superior en esta misma población de pacientes [12].



b) Gen de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 2 (ERCC2) o gen de la xeroderma pigmentosa grupo D (XPD)

Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.3 y consta de 21.14 kb del ADN genómico. Se han descrito una serie de polimorfismos, algunos infrecuentes y otros más comunes. Uno de ellos es el SNP A751C, que conlleva una sustitución

de un residuo Lisina (Lys) por una Glutamina (Gln). Diferentes polimorfismos de XPD han sido correlacionados con baja capacidad de reparación de ADN. En un estudio epidemiológico que incluyó 341 pacientes-casos con cáncer de pulmón y 360 controles fumadores sanos, se evidenció que aproximadamente la mitad de la población estudiada tenía el genotipo 751 Lys/Lys. Estos pacientes tenían una buena capacidad de reparación de ADN, y presumiblemente serían resistentes a cisplatino. Los pacientes con la variante 751 Gln/Gln tenían una capacidad de reparación subóptima y por tanto serían más sensibles a los compuestos derivados del platino [13].

2. Polimorfismos en genes involucrados en el metabolismo de folatos:

2.1. El gen de la Timidilato Sintetasa (TS)

La timidilato sintetasa es la diana farmacológica del Pemetrexed. Es una enzima citosólica con una estructura dimérica que tiene un papel clave en el metabolismo del ácido fólico y cataliza la metilación reductiva de desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) a desoxitimidina-5'-monofosfato (dTDP) en presencia del cofactor de folatos reducidos metil-tetrahidrofolato (CH₂THF4), que actúa como un grupo donador de metilos. Esta reacción es la única fuente "de novo" de dTDP, nucleótido indispensable para la síntesis de ADN.

El gen de la TS, localizado en el cromosoma 18p, contiene 7 exones y ocupa unas 15,84 Kb del ADN genómico. En la región promotora del gen de la TS se han descrito tres polimorfismos funcionales. El primero de ellos consiste en un número variable de repeticiones en tandem o VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) de 28 pares de bases (pb). A pesar de que se han descrito alelos que contienen dos, tres, cuatro, cinco y hasta nueve repeticiones de la secuencia de VNTR, los alelos con dos (TS*2) y tres (TS*3) repeticiones son los más frecuentes. Experimentos *in vitro* realizados mediante el ensayo de luciferasa han demostrado que el alelo TS*3 presenta una actividad enzimática superior respecto a la del alelo TS*2 [14, 15, 16]. El segundo polimorfismo descrito por Mandola et al, es un SNP que consiste en una sustitución de G>C en el 12vo nucleótido de la segunda repetición en el alelo TS*3. Estas sustituciones polimórficas G>C cambian el residuo crítico en la secuencia consenso de la familia USF E-Box, eliminando o creando el dominio de unión a USF-1 y alterando la actividad transcripcional [17]. Kawakami confirmó la presencia del polimorfismo G>C y clasifica cada alelo como *2G, *2C, *3G y *3C en concordancia con la combinación del polimorfismo y el VNTR [18].



Recientemente se ha descrito la existencia de un tercer polimorfismo en la región promotora muy poco frecuente en el alelo TS*2, que consiste en un cambio de base de G>C en el 12vo nucleótido de la primera repetición de 28pb [19].

En la región 3' UTR del gen TS, se ha descrito otro polimorfismo frecuente que consiste en la delección de 6 pb en la posición 1494 (TTAAAG). Este polimorfismo se identificó haciendo una búsqueda en la base de datos pública “Expressed Sequence Tag” (EST) [20]. Se ha descrito que esta variación genética causa inestabilidad en el ARNm y está asociada con una disminución de los niveles intratumorales del ARNm de la TS [21].

Pemetrexed es un antineoplásico que actúa como un antimetabolito del ácido fólico, bloqueando todas las enzimas para las que el ácido fólico es un cofactor necesario. Concretamente inhibe la TS, la dihidrofolatoreductasa (*DHFR*) y la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (*GARFT*), todas ellas esenciales en los procesos de síntesis de novo de la timidina y de los nucleótidos de tipo purínicos [22, 23]. En un reciente estudio *in vitro* se mencionó que la baja regulación de los genes *DHFR* y *TS* se relacionó con un incremento de la sensibilidad a pemetrexed en líneas celulares de cáncer de pulmón [24].

Los niveles bajos de ARNm de TS, determinados por RT-PCR (real time polymerase chain reaction) se asociaron con un aumento en la supervivencia libre de progresión (SLP) en los pacientes con estadios I y II resecados [25]. En cuanto a los pacientes con enfermedad avanzada, un estudio reciente reportado por Chang et al no mostró diferencias significativas en la SLP y la supervivencia global (SG) entre los pacientes tratados con pemetrexed, según la expresión positiva o negativa de TS [26]. Ellos evaluaron el nivel de expresión de TS teniendo en cuenta la intensidad de la tinción de TS en las células tumorales. En un estudio posterior reportado por Chen et al se correlacionó un aumento de la SLP en aquellos pacientes tratados con pemetrexed que presentaban niveles bajos de TS. El análisis en este caso estuvo determinado por el grado de intensidad y el porcentaje de células positivas [27]. En ambos estudios el beneficio fue para el subgrupo de pacientes con histología no escamosa.

La diferencia en la medición de los niveles de expresión de TS puede llevar a resultados dispares. Es necesario establecer un sistema de puntuación estandarizado para el estudio sobre la expresión de TS y su relación con la eficacia del tratamiento.

2.2. El gen de la Metil-tetrahidrofolato Reductasa (*MTHFR*)

La concentración intracelular de 5,10-metil-tetrahidrofolato (CH₂FH₄) está regulada por la actividad de la metil-tetrahidrofolato reductasa. Esta enzima participa en la regulación de los niveles de folato intracelular (esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos) y cataliza la conversión irreversible de 5,10-metil-tetrahidrofolato (5,10CH₂FH₄) a 5-metil-tetrahidrofolato (5 CH₃FH₄), que actúa como un donante de radicales metil.



Se han descrito varios polimorfismos en el gen MTHFR que se encuentra localizado en el cromosoma 1p, y contiene 11 exones [28]. El polimorfismo más frecuente consiste en la transición de C>T en la posición 677, en el exón 4 (codón 222), que da lugar a una sustitución de alanina por valina en un dominio al que se le ha atribuido actividad catalítica [29]. Este polimorfismo está asociado a una baja actividad enzimática y a valores de folato alterados. La variante T provoca un aumento en la termolabilidad de la enzima que comporta una reducción de la actividad de un 70% en los individuos homocigotos y de un 30% en los heterocigotos. En la población caucásica la frecuencia de homocigotos mutados es del 10-16% [30, 31].

El segundo polimorfismo más frecuente en el gen MTHFR es la transición de A>C en la posición 1298, en el exón 7 (codón 428), que resulta en la sustitución de ácido glutámico por alanina en un dominio proteico probablemente regulador [32]. La variante C también comporta una reducción de la actividad enzimática. La frecuencia de los homocigotos CC es del 12% en población caucásica [31], similar a la población española [33]. Los individuos que son heterocigotos para estas dos variantes (677T y 1298C) tienen una reducción del 40-50% de la actividad del gen MTHFR y un perfil bioquímico similar al observado en los homocigotos 677T.

Material y métodos

Pacientes

Se incluyeron de forma retrospectiva 103 pacientes diagnosticados cito o histológicamente de Carcinoma de Pulmón No Microcítico (CPNM) estadios III y IV (TNM-AJCC 2010) tratados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre los años 2007 y 2011. Todos los pacientes fueron evaluados con tomografía computarizada de tórax y abdomen antes de iniciar el tratamiento y se les realizó una historia clínica y examen físico, así como analítica completa. Se recogieron los datos correspondientes a edad, género y hábito tabáquico al momento del diagnóstico.

Quimioterapia, Radioterapia y Respuesta clínica

Los pacientes recibieron quimioterapia (QT) con cisplatino 75 mg/m² o carboplatino AUC5 administrados el día 1 cada 3 semanas en combinación con un fármaco de tercera generación: pemetrexed 500 mg/m² (día 1), vinorelbina 25 mg/m² (días 1 y 8), paclitaxel 175 mg/m² (día 1), docetaxel 60 mg/m² (día 1) o gemcitabina 1250 mg/m² (días 1 y 8). Los pacientes con estadios III (A y B) recibieron radioterapia (RT) de un modo concomitante o secuencial.

La respuesta se evaluó tras tres ciclos de QT, o bien al finalizar el tratamiento de quimioradioterapia. La mejor respuesta se estableció de acuerdo con los criterios RECIST v1.1 (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) [34] y fue reportada como respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), progresión de la enfermedad (PE) o enfermedad estable (EE).



Estudios farmacogenéticos

Se obtuvo ADN genómico a partir de las células nucleadas de sangre periférica usando el procedimiento automático de precipitación con sales (Autopure, Qiagen, Hilden, Alemania), método de “salting-out” [35].

El genotipado de las muestras se realizó utilizando metodologías establecidas como RT-PCR y técnicas de secuenciación automática para el estudio de los siguientes polimorfismos: A) Polimorfismos en genes de reparación del ADN: ERCC1: Asn118Asn, C>T (rs13181) y ERCC2/XPD: Lys751Gln, A>C (rs11615); B) Polimorfismos en genes involucrados en el metabolismo de folatos: TS: VNTR en 5'-UTR, 2R G>C; 3R G>C (rs45445694) y C>G SNP en la segunda repetición (rs183205964) y MTHFR: A1298C, Glu428Ala (rs1801133) y C677T, Ala222Val (rs1801131)

Análisis estadístico

Estudio descriptivo de las variables clínicas e histológicas. Para las variables cualitativas se utilizó la frecuencia relativa en porcentajes y para las cuantitativas la media y la desviación estándar o la mediana. Para el estudio de la asociación entre variables cualitativas se utilizó el test del chi-cuadrado o test de Fisher. Para analizar el valor predictivo de los polimorfismos en cuanto a la progresión de la enfermedad y la supervivencia global se utilizó el método de Kaplan-Meier. Para analizar las diferencias se utilizó el test de log-rank.

El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico SPSS (versión 17).

Resultados

Características de los pacientes y relación con los genotipos

Las características clínicas y patológicas de los 103 pacientes están recogidas en la Tabla 1. La mediana de edad fue de 65 años; 74% eran hombres y el 62% correspondían a un estadio IV. Los pacientes recibieron quimioterapia basada en platino: cisplatino 75 mg/m² (82 pacientes) o carboplatino AUC5 (21 pacientes) mas un fármaco de tercera generación, separándose, en el grupo de cisplatino, los que recibieron pemetrexed (14 pacientes) de los que no (68 pacientes).

En la Tabla 2 se expone la relación entre los diferentes genotipos y las características clinicopatológicas de los pacientes.

**Tabla 1: Características clinicopatológicas de los pacientes**

	No.	%
Mediana de edad (años)	65	
Rango	36-85	
Sexo		
Hombre	76	74
Mujer	27	26
ECOG performance status		
0-1	93	90
2	10	10
Hábito tabáquico		
Fumador	84	81
No fumador	19	19
Tipo histológico		
Adenocarcinoma	49	47
Carcinoma escamoso	42	41
Carcinoma de célula grande	12	12
Estadio		
IIIA	18	18
IIIB	21	20
IV	64	62
Regimen de quimioterapia		
Cisplatino + fármaco 3a generación	82	79
Combinación sin pemetrexed	68	83
Combinación con pemetrexed	14	17
Carboplatino + fármaco 3a generación	21	21
Radioterapia	62	60
Secuencial	30	48
Concomitante	14	22
Paliativa	18	29

**Tabla 2: Relación de los SNPs con las características de los pacientes**

Genotipo	N(%)	Hombre (%)	Mujer (%)	Escamoso (%)	No escamoso (%)	Fumador (%)	No fumador (%)
Total	103	76	27	42	61	84	19

ERCC1 118

C/C	12(12)	10(13)	2(7)	5(12)	7(11)	11(13)	1(5)
C/T	41(40)	24(32)	17(63)	12(29)	29(48)	28(33)	13(68)
T/T	50(48)	42(55)	8(30)	25(59)	25(41)	45(54)	5(27)

XPD 751

A/A	42(41)	34(45)	8(30)	22(52)	20(33)	36(43)	6(32)
A/C	51(49)	34(45)	17(63)	17(40)	34(56)	39(46)	12(63)
C/C	10(10)	8(10)	2(7)	3(8)	7(11)	9(11)	1(5)

TS

2/2 + 2/3C + 3C/3C	51(49)	45(59)	6(22)	24(57)	27(44)	45(54)	6(32)
2/3G + 3C/3G	44(43)	26(34)	18(67)	14(33)	30(49)	34(40)	10(52)
3G/3G	8(8)	5(7)	3(11)	4(10)	4(7)	5(6)	3(16)

TS expresión

Baja	51(49)	45(59)	6(22)	24(57)	27(44)	45(54)	6(32)
Alta	52(51)	31(41)	21(78)	18(43)	34(56)	39(46)	13(68)

MTHFR 677

C/C	34(33)	31(41)	3(11)	16(38)	18(29)	30(36)	4(21)
C/T	52(51)	36(47)	16(59)	21(50)	31(51)	42(50)	10(52)
T/T	17(16)	9(12)	8(30)	5(12)	12(20)	12(14)	5(27)

MTHFR 1298

A/A	50(48)	31(41)	19(70)	20(48)	30(49)	36(43)	14(73)
A/C	46(45)	38(50)	8(30)	17(40)	29(48)	41(49)	5(27)
C/C	7(7)	7(9)	0	5(12)	2(3)	7(8)	0



Polimorfismos y supervivencia

La mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) fue significativamente mayor en los pacientes con genotipos C/T o T/T de ERCC1: 13 meses y 10 meses, respectivamente, frente a 6 meses para los pacientes con genotipo C/C ($p=0,034$) (Fig. 1A). Para el mismo gen, los pacientes con genotipos C/T o T/T mostraron tendencia a una mayor supervivencia global (20 meses) frente a los genotipo C/C (10,5 meses) ($p=0,1$) (Fig. 1B). En el análisis multivariado ajustado por edad, sexo, histología y hábito tabáquico, se encontró que aquellos pacientes varones ($p=0,005$) (Fig. 2A), fumadores ($p=0,036$) (Fig. 2B) y menores de 70 años ($p=0,012$) (Fig. 2C) con genotipos C/T o T/T de ERCC1 presentaron una mayor SLP. Los pacientes con los genotipos A/A o A/C en el codón 751 de XPD mostraron tendencia a una mayor supervivencia global (SG) frente a los pacientes con genotipo C/C ($p=0,09$), sin diferencias en SLP. No se encontró ninguna asociación entre los polimorfismos de TS y MTHFR y la SLP o SG en la población general.

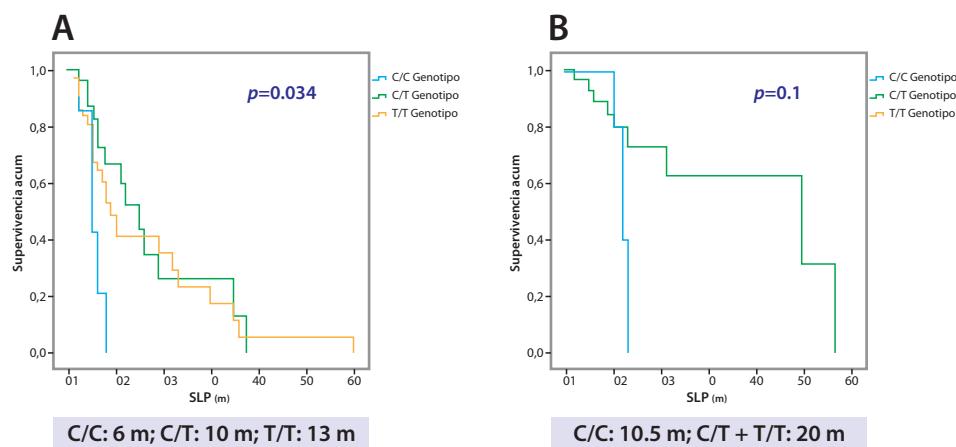


Figura 1: A, Kaplan-Meier de SLP para los 103 pacientes con CPNM de acuerdo con los polimorfismos de ERCC1 ($p=0,034$). B, Kaplan-Meier de SG para los 103 pacientes con CPNM de acuerdo con los polimorfismos de ERCC1 ($p=0,1$).

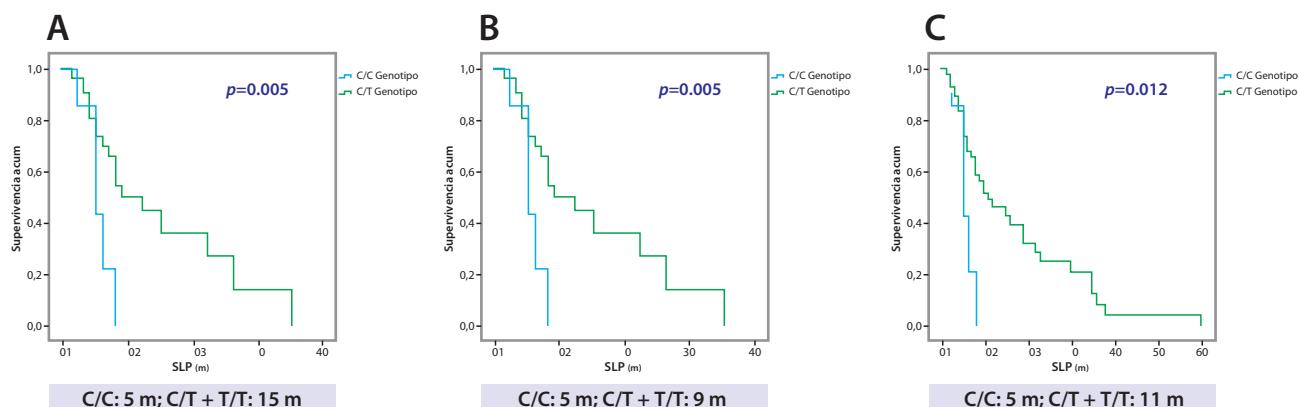


Figura 2: Kaplan-Meier de SLP de acuerdo con los polimorfismos de ERCC1. A: en varones ($p=0,005$) B: en menores de 70 años ($p=0,036$) C: en fumadores ($p=0,012$).



Discusión

El CPNM en estadios avanzados sigue siendo una enfermedad mortal con bajas tasas de respuesta y breve supervivencia. Está claro que el desarrollo de biomarcadores predictivos que identifiquen a un subgrupo de pacientes con más probabilidades de beneficiarse de la quimioterapia basada en platino es una prioridad fundamental en la investigación del cáncer de pulmón. Los estudios farmacogenéticos se fundamentan en la utilización de los conocimientos derivados de los estudios genómicos para que los pacientes puedan someterse a tratamientos farmacológicos eficaces y poco tóxicos.

Este tipo de estudios tiene una especial relevancia en el campo de la oncología, puesto que la aparición de efectos adversos y la difícil predicción de la eficacia caracterizan a los tratamientos quimioradioterápicos.

Se ha señalado la asociación de la expresión del ARNm de ERCC1 con la respuesta al tratamiento basado en platino en el cáncer gástrico [36] y colorrectal [37]. En esta línea, desde el Grupo Español de Cáncer de Pulmón, se diseñó un estudio fase III randomizado que incluía pacientes con CPNM estadio IIIB-IV, a los que se aleatorizaba a recibir quimioterapia con cisplatino más docetaxel (grupo control) frente a cisplatino/docetaxel o gemcitabina/docetaxel, de acuerdo a la expresión de ARNm de ERCC1 (baja o alta, respectivamente). Dicho estudio demostró que las concentraciones de ARNm de ERCC1 predicen la respuesta al tratamiento basado en platino en el CPNM avanzado [38]. La mayoría de los estudios reportados hasta la fecha se llevaron a cabo analizando la expresión de los genes a partir de una muestra de tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina. En 2012 se reportó un estudio que analizó en más de 300 pacientes con CPNM estadios IIIB-IV, la asociación de 12 SNPs pertenecientes a 9 genes con la supervivencia. Al igual que en nuestro estudio, el ADN se obtuvo a partir de células nucleadas de sangre periférica. En este estudio se concluyó que los genotipos C/T o T/T en ERCC1 pueden predecir una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia basada en platino [39].

Conclusiones

El presente estudio, basado en el análisis de dos polimorfismos en dos genes involucrados en la vía de reparación del ADN y tres polimorfismos pertenecientes a dos genes involucrados en el metabolismo de folatos, demuestra que los pacientes tratados con quimioterapia basada en platino y genotipos C/T o T/T en ERCC1 presentan una mayor supervivencia libre de progresión, principalmente en el subgrupo de varones, fumadores y menores de 70 años. No se encontró ninguna asociación entre los polimorfismos en XPD, TS o MTHFR y la supervivencia de los pacientes.

Se necesitan estudios prospectivos para validar el papel de los polimorfismos como factores predictivos de respuesta a la quimioterapia en cáncer de pulmón.



Referencias

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D. GLOBOCAN 2008 Cancer Incidence and Mortality. IARC Cancer Base No 10. Lyon.
2. Edge SB, Byrd DR, Compton CC et al., eds: AJCC Cancer Staging Manual, 7th ed. New York, NY: Springer, 2010.
3. Verdecchia A, Santaquilani M, Sant M. Survival for cáncer patients in Europe. EUROCARE 4. Ann Ist Super Sanita. 2009; 45(3):315-24.
4. Olaussen KA, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. N. Engl. J. Med. 2006; 355:983-991.
5. Olaussen KA, Fouret P, Kroemer G. ERCC1-specific immunostaining in non-small cell lung cancer. N. Engl. J. Med. 2007; 357:1559-1561.
6. Ceppi P, Volante M, Saviozzi S, Rapa I, Novello S, Cambieri A, et al. Squamous cell carcinoma of the lung compared with other histotypes shows higher messengerRNA and protein levels for thymidylate synthase. Cancer 2006; 107:1589–96.
7. Postel-Vinay S, Vanhecke E, Olaussen KA, Lord CJ, Ashworth A, Soria JC. The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. Nat Rev Clin Oncol 2012; 9(3): 144-55.
8. Reed E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. Clin Cancer Res 2005; 11:6100-6102.
9. Furuta T, Ueda T, Aune G, et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. Cancer Res 2002; 62:4899-4902.
10. Simon GR, Sharma S, Cantor A, Smith P, Bepler G. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. Chest 2005; 127:978-983.
11. Bepler G, et al. ERCC1 and RRM1 in the international adjuvant lung trial by automated quantitative *in situ* analysis. Am. J. Pathol. 2011; 178:69-78.
12. Chen S, Zhang J, Wang R, Luo X, Chen H. The platinum-based treatments for advanced non-small cell lung cancer, is low/negative ERCC1 expression better than high/positive ERCC1 expression? A meta-analysis. Lung cancer 2010; 70:63-70.
13. Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphism in lung cancer patients. Cancer Res 2001; 61:1354-7.
14. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. Cell Struct Funct 1995; 20: 191-197.
15. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. Anticancer Res 1999; 19:3249-3252.
16. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. Clin Cancer Res 2001; 7:4096-4101.



17. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, LenzHJ, Ladner RD. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003; 63:2898-2904.
18. Kawakami K and Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 2003; 63:6004-6007.
19. Gusella M, Bolzonella C, Crepaldi G, Ferrazzi E, Padrini R. A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. *Pharmacogenomics J* 2006; 6:421-424.
20. Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:1381-1385.
21. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, LenzHJ, Ladner RD. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 2004; 14:319-327.
22. Solomon B, Bunn Jr PA. Clinical activity of pemetrexed: a multitargeted antifolate anticancer agent. *Future Oncol* 2005; 1:733-46.
23. Joerger M, Omlin A, Cerny T, Früh M. The role of pemetrexed in advanced non- small cell lung cancer: special focus on pharmacology and mechanism of action. *Curr Drug Targets* 2010; 11:37-47.
24. Wu MF, Hsiao YM, Huang CF, Huang YH, Yang WJ, Chan HW, Chang JT, Ko JL. Genetic determinants of pemetrexed responsiveness and non-responsiveness in non-small cell lung cancer cells. *J Thorac Oncol* 2010; 5:1143-51.
25. Kido T, Miyoshi S, Matsuda H. New prognostic indicator for non-small-cell lung cancer, quantitation of thymidylate synthase by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 2003; 104:790-5.
26. Chang MH, Ahn JS, Lee J, Kim KH, Park YH, Han J, Ahn MJ, Park K. The efficacy of pemetrexed as a third- or fourth-line therapy and the significance of thymidylate synthase expression in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010; 69:323-9.
27. Chen Chung-Yu, Chang Yih-Leong, Shih Jin-Yuan, Lin Jou-Wei, Chen Kuan-Yu, Yang Chih-Hsin, Yu Chong-Jen, Yang Pan-Chyr. Thymidylate synthase and dihydrofolate reductase expression in non-small cell lung carcinoma: The association with treatment efficacy of pemetrexed. *Lung cancer* 2011; 74:132-38.
28. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and Mouse methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998; 9:652-656.
29. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-113.
30. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22:195-201.



- 31.** Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF, United Kingdom Childhood Cancer Study investigators. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:4004-4009.
- 32.** van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62:1044-1051.
- 33.** Martinez-Frias ML, Bermejo E, Perez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Mansilla E, Martinez-Fernandez ML, Rodriguez-Pinilla E, Rodriguez L, Ugarte M, Grupo de Trabajo del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC). Analysis of the frequencies of genotype combinations of 4 polymorphisms of genes acting on the folate cycle in the Spanish population. *Med Clin (Barc)* 2008; 131:81-88.
- 34.** Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) version 1.1. *European Journal of Cancer* 2009; 45:228-247.
- 35.** Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
- 36.** Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998; 16:309-316.
- 37.** Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2001; 19:4298-4304.
- 38.** Manuel Cobo, Dolores Isla, Bartomeu Massuti, et al. Customizing Cisplatin Based on Quantitative Excision Repair Cross-Complementing 1 mRNA Expression: A Phase III Trial in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:2747-2754.
- 39.** Ren S, Zhou S, Wu F, et al. Association between polymorphisms of DNA repair genes and survival of advanced NSCLC patients treated with platinum-based chemotherapy. *Lung Cancer* 2012; 75:102-109.