

**ESTUDIO FARMACOGENÉTICO EN PACIENTES
CON CARCINOMA RECTAL TRATADOS CON
QUIMORRADIOTERAPIA NEOADYUVANTE
BASADA EN CAPECITABINA**

Trabajo de Investigación realizado por :

ANA SEBIO GARCIA

Departamento de Medicina / Universitat Autònoma de Barcelona

Servicio de Oncología Médica / Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Director del Trabajo: Dr. Agustí Barnadas Molins

Codirector del Trabajo: Montserrat Baiget Bastus

Barcelona, 26 Mayo de 2011

**CERTIFICAT DEL DIRECTOR O CO-DIRECTOR DEL TREBALL
DE RECERCA**

D. AGUSTÍ BARNADAS MOLINS, Professor del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Director del Servei de Oncologia Mèdica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

FA CONSTAR,

que el treball titulat ha estat realitzat sota la meva direcció pel llicenciat ANA SEBIO GARCIA, ***"Estudio farmacogenético en pacientes con carcinoma rectal tratados con quimorradioterapia neoadyuvante basada en Capecitabina"*** trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna (curs 2010-2011), a la convocatòria de juny.

Barcelona, 26 juny 2011.

ÍNDICE

- 1. RESUMEN**
- 2. INTRODUCCIÓN**
- 3. MATERIALES Y MÉTODOS**
- 4. RESULTADOS**
- 5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN**
- 6. BIBLIOGRAFÍA**

1.RESUMEN

Objetivo: diversos estudios han sido realizados para evaluar la utilidad del tratamiento neoadyuvante basado en oxaliplatino y 5-fluorouracilo en carcinoma rectal localmente avanzado. Sin embargo, no se han identificado marcadores biológicos predictivos de respuesta al tratamiento preoperatorio. En este estudio se analizan los polimorfismos de la TS (tiimidilato sintasa), y diversos genes reparadores del ADN para evaluar su utilidad como marcadores farmacogenéticos, en una muestra de 56 pacientes con carcinoma tratados con quimiorradioterapia basada en capecitabina.

Materiales y métodos: el ADN fue extraído de células nucleadas presentes en sangre periférica de un total de 56 pacientes con estadios II y III de carcinoma rectal. Los polimorfismos estudiados fueron: TS (VNTR/5'UTR, 2R G>C SNP, 3R G>C SNP), ERCC1 (118 C>T) y XRCC1 (Arg399Gln). Los pacientes fueron tratados con radioterapia (dosis total de 45 Gys durante 5 semanas) y capecitabina 825 mg/m²/12h/day 5 días a la semana +/- oxaliplatino 50 mg/m² una vez por semana. La respuesta patológica, la regresión patológica y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) fueron evaluadas para cada genotipo.

Resultados: El genotipo ERCC1 118 T/T se asoció con una mayor respuesta patológica completa (48% in T/T vs. 21% en C/T and 0% en C/C; p=0.014) y una mayor probabilidad de descenso de estadio (96% en T/T vs. 79% en C/T y 56% en C/C; p=0.025). La SLE fue de 54 meses para ERCC1 T/T, 35 meses para C/T y 21 meses para el genotipo C/C (p=0.007). El genotipo *3/*3 de la timidilato sintasa se asoció con un mayor descenso de estadio (94%) comparado con *2/*3 (86%) y *2/*2 (50%) (p< 0.010).

Conclusiones: El genotipo ERCC1 118 C>T y los polimorfismos de la timidilato sintasa pueden ayudar a identificar estadios II y III de carcinoma colorectal que presentarán una mayor respuesta al tratamiento de quimiorradioterapia basada en capecitabina.

Objectiu. S'han realitzat varis estudis per avaluar la utilitat del tractament neoadjuvant basat en oxaliplatí i 5-fluoracil en el carcinoma rectal localment avançat. No obstant, no s'han identificat marcadors biològics predictius de resposta al tractament preoperatori. En aquest estudi s'analitzen els polimorfismes de la TS (timidilat sintasa), i diversos gens reparadors de l'ADN per tal d'avaluar la seva utilitat com a marcadors farmacogenètics, en una mostra de 56 pacients amb carcinoma rectal tractats amb quimioradioteràpia basada amb capecitabina.

Materials i Mètodes. L'ADN fou extret de cèl·lules nucleades presents en sang perifèrica d'un total de 56 pacients amb estadis II i III de carcinoma rectal. Els polimorfismes estudiats foren: TS (VNTR/5'UTR, 2R G>C SNP 3R G>C SNP), ERCC1 (118 C>T) y XRCC1 (Arg399Gln). Els pacients foren tractats amb radioteràpia (dosis total de 45Gy durant setmanes) i capecitabina 825mg/m²/12h/dia durant 5 dies a la setmana +/- oxaliplatí 50mg/m² un cop per setmana. La resposta patològica, la regressió patològica i la supervivència lliure de malalaltia (SLM) foren avaluades per cada genotip.

Resultats. El genotip ERCC1 T/T es va associar amb una major resposta patològica completa (48% en T/T vs 21% en C/T i 0% en C/C; p=0.014) i una

major probabilitat de descens d'estadi (96% en T/T vs 79% en C/T i 66% en C/C; $p=0.025$). La SLM fou de 54 mesos per ERCC1 T/T, 35 mesos per C/T i 21 mesos pel genotip C/C ($p=0.007$). El genotip *3 / *3 de la timidilat sintasa es va associar amb un major descens de l'estadi (94%) comparat amb *2/*3 (86%) i *2 / *2 (50% ($p<0.010$)).

Conclusions. El genotip ERCC1 118 C>T i els polimorfismes de la timidilat sintasa poden ajudar a identificar estadis II i III de carcinoma colorectal que presentaran una major resposta al tractament de quimioradioteràpia basada amb capecitabina.

2. INTRODUCCIÓN

El carcinoma colorrectal representa la primera causa de mortalidad por cáncer en España, considerando ambos sexos conjuntamente. Su incidencia es de 20-22 casos/100000 habitantes/año y se encuentra en aumento en los países industrializados.

En los últimos años se ha observado un descenso en la mortalidad gracias a programas de screening y mejoras en el tratamiento.

El cáncer colorrectal se clasifica siguiendo, como la mayoría de los tumores, la clasificación TNM (tumor, node, metastases) en cuatro estadios (I a IV), siendo el I el más inicial y el IV aquellos tumores que presentan diseminación metastásica al diagnóstico.

Alrededor de dos tercios de los pacientes con Cáncer colorrectal presentan tumores sin diseminación metastásica al diagnóstico y en estos, la opción quirúrgica es la única que plantea posibilidad de curación. Se han abordado diferentes estrategias terapéuticas con el fin de disminuir el número de recaídas locales, aumentar la supervivencia de los pacientes y reducir el número de pacientes que necesitarán una colostomía permanente. Aproximadamente un 40% de pacientes presentan un estadios II o III al diagnóstico, y estos son considerados como localmente avanzados (Ref 0).

El tratamiento más comúnmente aceptado en estos estadios consiste en quimiorradioterapia preoperatoria o neoadyuvante basada en fluoropirimidinas. Las ventajas del tratamiento combinado preoperatorio son la reducción de la masa tumoral con la consiguiente facilitación de la resección quirúrgica

completa, el aumento de porcentaje de preservación de esfínter y la mayor sensibilidad a la radioterapia de un tejido virgen (sobre el que no se ha realizado cirugía). Por el contrario, el tratamiento preoperatorio presenta como desventajas el posible sobretratamiento de pacientes. A pesar de que el tratamiento preoperatorio es la opción más empleada, no ha sido demostrado un aumento en la supervivencia con respecto al tratamiento postoperatorio, sin embargo sí que ha conseguido disminuir el porcentaje de recidivas locales (Ref 1).

La respuesta patológica completa (pCR) se define como la ausencia de células tumorales viables en la pieza quirúrgica tras tratamiento neoadyuvante. La pCR se asocia con un mejor pronóstico para pacientes con estadios II y III de cáncer de recto (Ref 2). Con el objetivo de aumentar la pCR se han publicado recientemente varios ensayos clínicos (Ref 3, 4) que exploran la adición de un 2º quimioterápico (oxaliplatino) a las fluoropirimidinas, sin encontrarse diferencias significativas respecto a la respuesta pero sí en cuanto a la toxicidad aportada por la combinación de 2 quimioterápicos.

Paralelamente se ha sugerido que pacientes con menor riesgo de recidiva local o a distancia (T3, gánglios negativos) podrían ser tratados sólo con cirugía primaria y quimioterapia adyuvante.

Respecto al tipo de quimioterapia administrada, las fluoropirimidinas han sido la base del tratamiento en cáncer colorrectal desde los años 70. El fármaco más ampliamente utilizado en el tratamiento quimioterápico de los pacientes con cáncer de recto es el 5-fluorouracilo (5-Fu). Se trata de un profármaco análogo del uracilo con un átomo de flúor en el carbono 5 del anillo de pirimidina. Se

han estudiado diversas formas de administrar el fármaco mediante infusión continua, bolus o modulación con leucovorin, sin encontrarse hasta la fecha diferencias en cuanto a la efectividad. Sin embargo se ha observado una mayor toxicidad hematológica con la administración en forma de bolus.

La capecitabina es una fluoropirimidina oral aprobada para su uso en cáncer colorrectal en España desde 2001. En la actualidad la capecitabina es el quimioterápico estándar en neoadyuvancia en estadios localmente avanzados de cáncer colorrectal en muchos centros hospitalarios en Europa y EEUU.

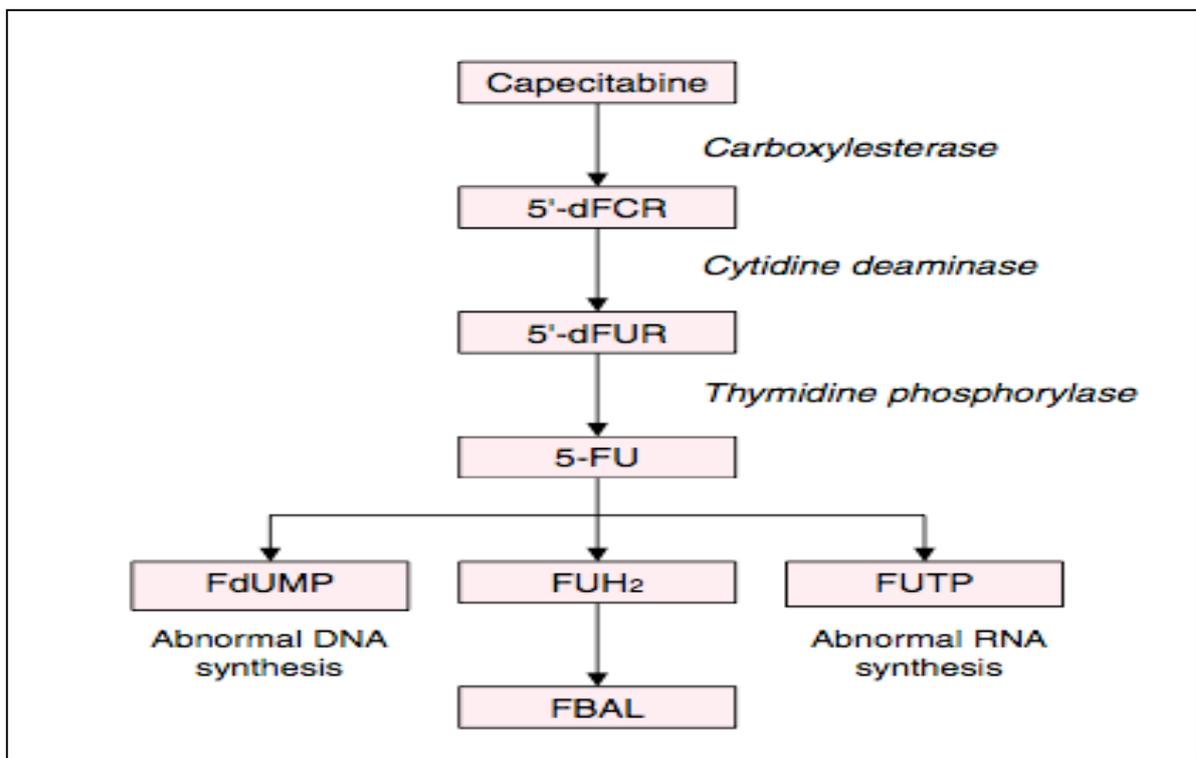
Varios estudios han comparado la capecitabina frente al 5-Fluorouracilo en el tratamiento preoperatorio del cáncer de recto (Ref 5). Los resultados ponen de manifiesto una no inferioridad con el tratamiento oral con respecto a la toxicidad y a la respuesta tumoral en comparación con el tratamiento endovenoso.

La capecitabina, fue especialmente diseñada para reducir la exposición sistémica de los tejidos sanos al 5-Fu y aumentar su concentración en las células tumorales. La conversión de capecitabina en fluorouracilo precisa de un cascada enzimática de 3 pasos que da lugar a la liberación intratumoral de 5-Fluorouracilo (5-Fu). En primer lugar, la capecitabina es absorbida a través de la mucosa gastrointestinal como una molécula intacta. En el hígado es metabolizada a 5'-deoxyfluorocitidina (5'-dFCR) y posteriormente a 5'-deoxifluorouridina (5' dFUR) gracias a la acción de la citidina deaminasa. 5'-dFUR es entonces metabolizado por la timidina fosforilasa (TP) que se encuentra en mayores concentraciones en el tejido tumoral que en tejido sano, resultado en la liberación intratumoral de fluorouracilo. **(Figura 1)**.

En los tumores colorrectales, los niveles de timidina fosforilasa son significativamente superiores en tejido tumoral que en los tejidos normales

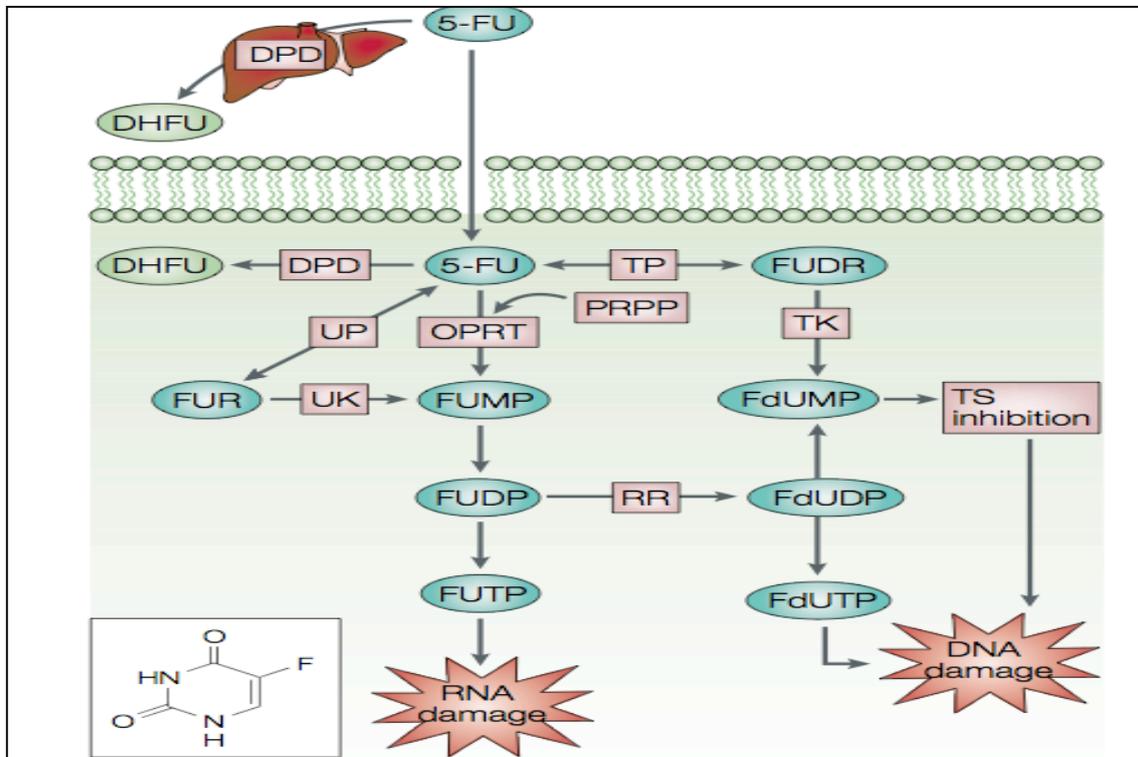
adyacentes, resultando en un tratamiento más tumor selectivo. Además, se ha postulado que la radioterapia aumenta la actividad de la timidina fosforilasa en las células tumorales pero no en el tejido normal, dando lugar a un sinergismo entre la radioterapia y la capecitabina. (Ref 6)

Figura 1. Metabolismo de capecitabina



El Fluorouracilo es catabolizado a fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) y fluorouridina trifosfato (FUTP). Estos metabolitos causan daño celular mediante 2 mecanismos: el primero, FdUMP, inhibe la timidilato sintasa (necesaria para la síntesis de pirimidinas) a través de la formación de un complejo ternario junto con metilentetrahidrofolato; segundo, FUTP se incorpora al ARN como un falso nucleótido interfiriendo con la síntesis y la función del ARN (**Figura 2**).

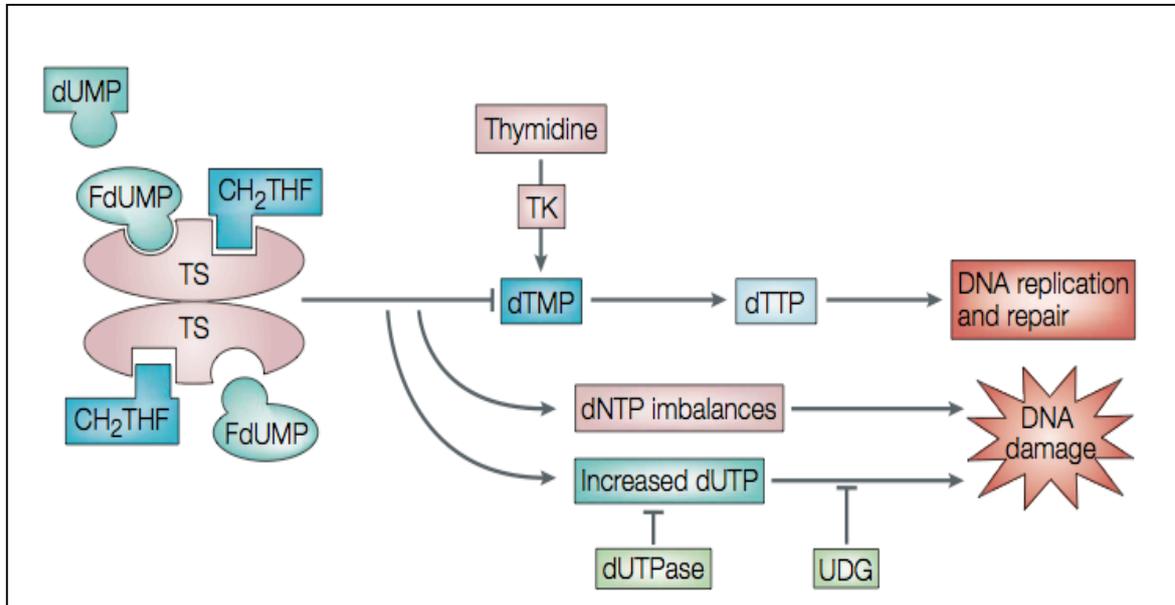
Figura 2. Metabolismo 5 fluorouracilo



La Timidilato Sintasa es una enzima clave en el metabolismo de los folatos ya que cataliza la metilación de deoxiuridina monofosfato (dUMP) a deoxitimidina monofosfato (dTMP) con el metiltetrahidrofolato (CH₂THF₄) como donante de metilos. Esta reacción proporciona la fuente de timidilato, necesaria para la síntesis y reparación de ADN.

El metabolito del 5-Fluoracilo, FdUMP, inhibe a la TS formando un complejo ternario estable con el enzima y el cofactor CH₂THF₄. Esta inhibición impide la replicación del ADN y por lo tanto el crecimiento tumoral (**Figura 3**).

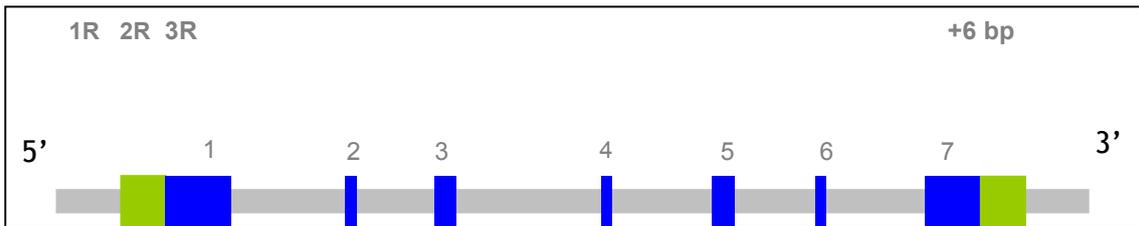
Figura 3. Mecanismo de inhibición de la TS



La TS es un enzima en el que se ha descrito varios polimorfismos.

El primero (Ref 7) consiste en una secuencia variable de repeticiones en tándem (VNTR) de 28 pares de bases en la región promotora del gen. Los alelos con 2 y 3 repeticiones de dicha secuencia son los más comunes (TS*2 y TS*3). El número de repeticiones se asocia con los niveles de expresión proteica. **(Figura 4).**

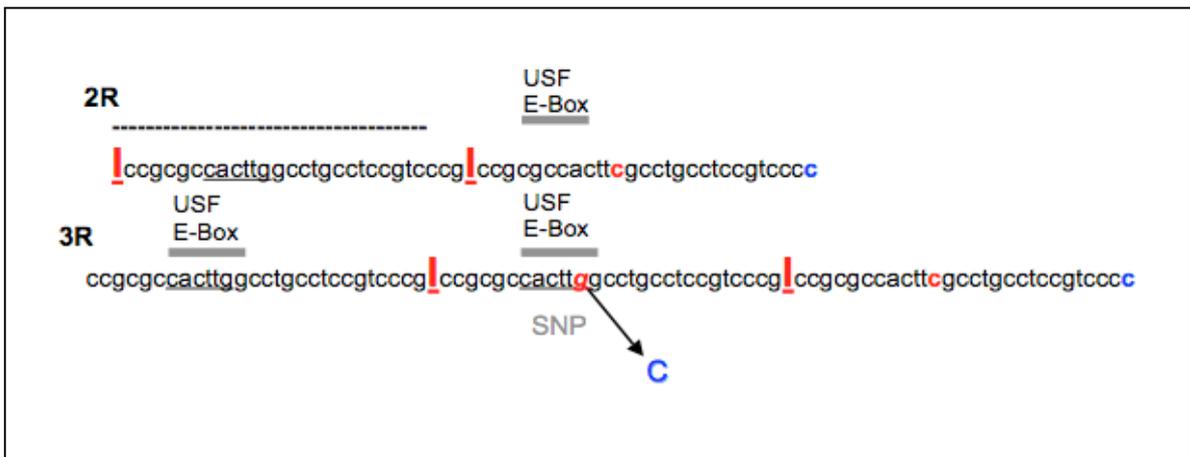
Figura 4. Gen de la TS



El segundo (Ref 8) consiste en un cambio G>C (SNP single nucleotide polymorphism) en el 12º nucleótido de la segunda repetición en los alelos con TS*3 (**Figura 5**). Esta sustitución provoca una alteración en una secuencia consenso de unión a factores de transcripción (USF E-box), y por tanto en la actividad transcripcional de gen TS. Este polimorfismo implica que la presencia de una tercera repetición de los 28 pb (TS*3) no es suficiente para el aumento de la transcripción de la TS, sino que se ha de acompañar de una USF E Box funcionante. Agrupando ambos polimorfismos podemos distinguir genotipos de TS de alta expresión (2R/3G, 3C/3G, 3G/3G) y de baja expresión (2R/2R, 2R/3C, 3C/3C).

Otros polimorfismos descritos como el que consiste en una delección de 6pb en la posición 1949 asociado con un descenso de los niveles intratumorales del ARNm de la TS.

Figura 5. Polimorfismos de la TS



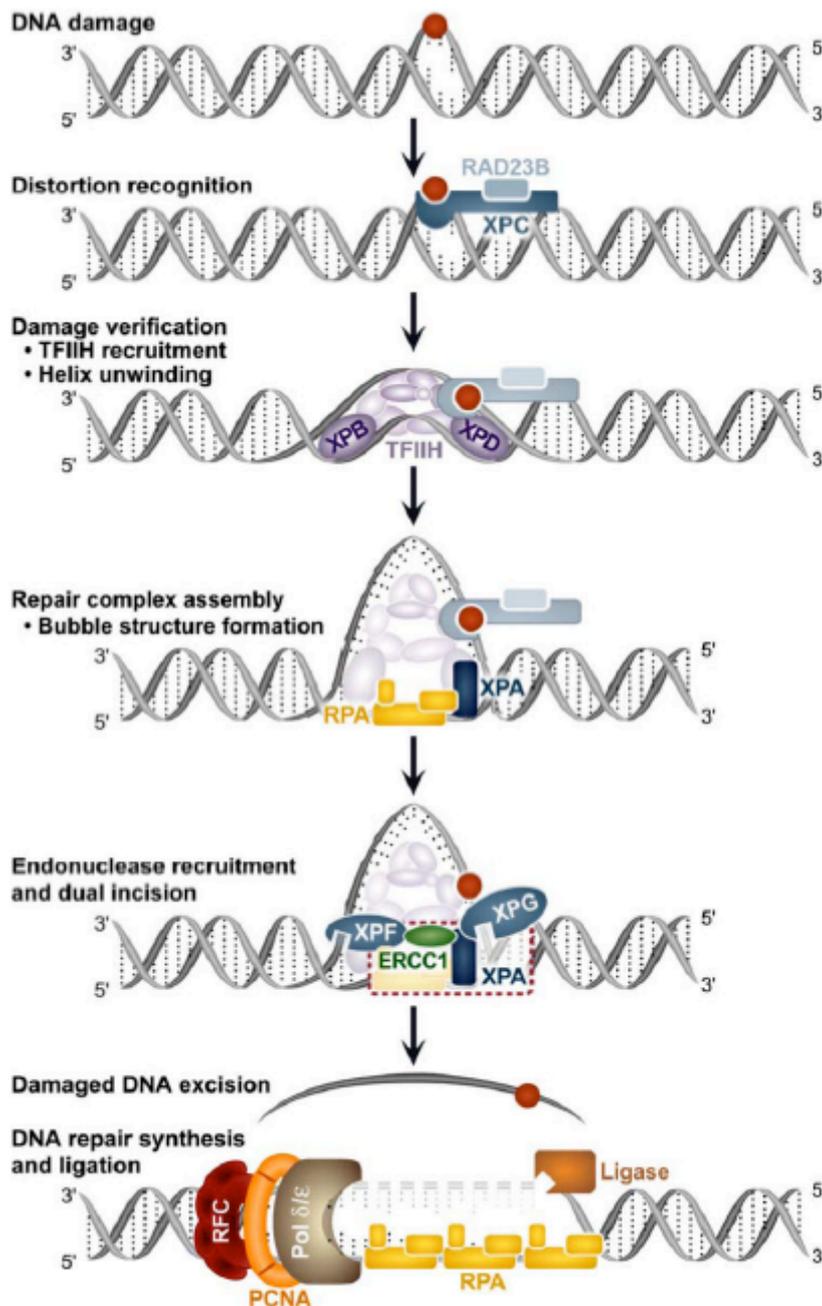
Existen varios estudios que han correlacionan la expresión de la TS con la respuesta al tratamiento neoadyuvante en cáncer de recto con resultados contradictorios, pero los estudios más recientes apuntan a los genotipos de alta expresión o a los genotipos 2*/3* y 3*/3* como factores predictivos de mayor respuesta patológica y como factor pronóstico independiente para supervivencia (Ref 19).

El ERCC1 es un gen que se localiza en el cromosoma 9 (19q13.32) y que es necesario para la reparación del ADN. Existen 5 vías principales de reparación del ADN: reparación por escisión de Nucleótidos (NER), reparación por escisión de bases (BER), reparación de desapareamiento de bases (Mismatch Repair), recombinación homóloga (HR) y reparación por enlace de extremos no cohesivos (NHEJ).

La proteína que codifica ERCC1 interviene fundamentalmente en la vía de reparación por excisión de nucleótidos (NER). Forma un heterodímero con el XPF (Xeroderma Pigmentario tipo F) endonucleasa (conocido como ERCC4) que cataliza la incisión en 5' de aproximadamente 5 nucleótidos en el ADN

dañado, permitiendo así la eliminación de los nucleótidos dañados y el posterior reparación y la síntesis del nuevo ADN por parte de las ADN polimerasa y ligasa. (Figura 6).

Figura 6. Mecanismo de reparación del ADN por excisión de nucleótidos

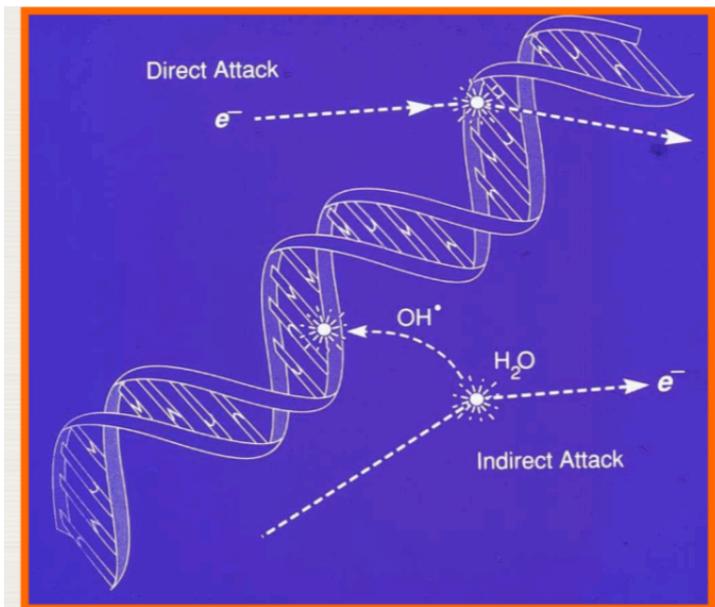


Datos preclínicos recientes indican que el ERCC1 en combinación con el XPF, tiene funciones adicionales a parte de su participación en NER. Concretamente, estaría implicado en la reparación de la rotura de doble cadena y el “single strand annealing”, procesos muy importantes en el daño inducido por las radiaciones ionizantes (Ref 9). Las roturas de la doble cadena son citotóxicas debido a que ambas cadenas del ADN están afectadas y este mecanismo es considerado el mecanismo principal por el que la radioterapia lleva a cabo su efecto. ERCC1-XPF facilita la reparación de la rotura de doble cadena y protege frente a radiaciones ionizantes “in vivo” (Ref 10).

El oxaliplatino ejerce su efecto citotóxico provocando la rotura de las cadenas de ADN y la formación de uniones intra e intercadena que impiden la replicación y transcripción de los genes.

La radioterapia también provoca rotura de la doble cadena de ADN (daño directo) produciendo además un daño indirecto por radicales libres (**Figura 7**).

Figura 7. Mecanismos de daño al ADN por radioterapia



Polimorfismos que alteran la expresión de este gen han sido implicados en la carcinogénesis así como en la resistencia a tratamientos con citostáticos como los derivados de los platinos (Ref 11). Niveles altos de expresión de ERCC1, mRNA y proteína se han correlacionado con un peor pronóstico por sí solos en diferentes tipos de tumores y como factor pronóstico de resistencia a tratamiento quimioterapico basado en platinos (Ref 12).

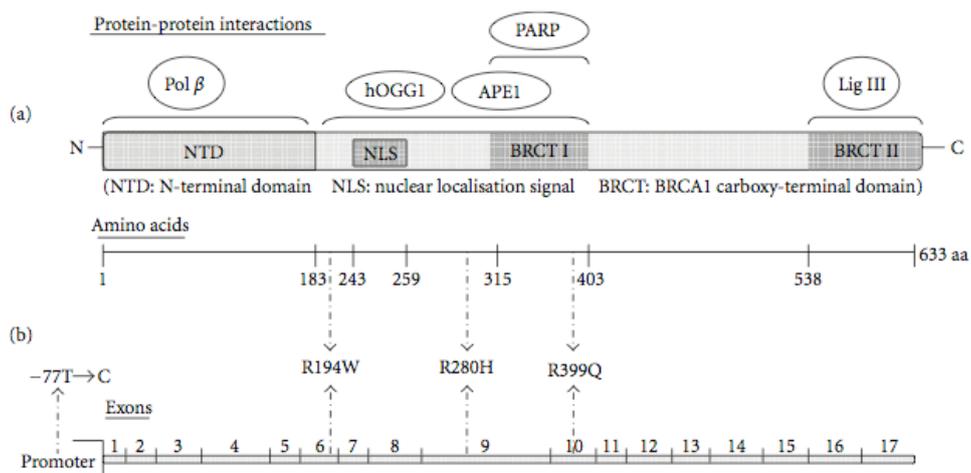
Uno de los polimorfismos (SNP: single nucleotide polimorfismo) del ERCC1 más estudiados es la substitución de una C>T en el codón 118 que no provoca cambio en la secuencia polipeptidica (N118N). Yu y colaboradores (Ref 13) han sugerido que este polimorfismo silente provocaría disminución de los niveles de mRNA y de proteína confiriendo esta baja expresión mayor respuesta a quimioterapia basada en platinos en varios tipos de tumores (ovario, pulmón y cabeza y cuello). Así mismo, el SNP ERCC1 C118T ha sido propuesto como predictor de resistencia a radioterapia (Ref 14).

Estudios realizados en tumores de cabeza y cuello tratados con radioterapia han implicado los polimorfismos en el ERCC1 como factores relevantes en la respuesta al tratamiento exclusivo con radioterapia en estadios iniciales (Ref 15).

El gen XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1) se localiza en el cromosoma 9q13.2, y codifica para una proteína de 633 aminoácidos. Juega un papel importante en el BER (reparación por escisión de bases) y en la reparación de las roturas de cadena simple de ADN (SSBR) que se producen tras exposición a radicales libres o agentes alquilantes. Además el XRCC1 parece jugar también un papel en en las roturas de doble cadena.

Hasta la fecha se han descrito varios polimorfismos en este gen, siendo 3 los más importantes: 1) sustitución C → T en el codon 194 del exon 6 (Arg to Trp); 2) sustitución G → A en el codon 280 del exon 9 (Arg to His) y 3) sustitución G → A en el codon 399 del exon 10 (Arg to Gln). **(Figure 8).**

Figura 8. Gen ERCC1 y sus polimorfismos



Todos estos SNPs (single nucleotide polymorphisms) podrían alterar la reparación del ADN y consecuentemente modificar la susceptibilidad al tratamiento con radioterapia o agentes alquilantes.

Estos polimorfismos han sido valorados en diversos estudios de cancer colorectal (Ref 19,20) y de los tres descritos el XRCC1 (Arg399Gln) genotipo G/G se ha postulado como predictor de respuesta al tratamiento con quimiorradioterapia preoperatoria en cáncer de recto.

El objetivo de este trabajo es estudiar los polimorfismos de la TS y los genes reparadores del ADN ERCC1 y XRCC1 en pacientes con carcinoma colorrectal localmente avanzado tratados con quimiorradioterapia basada en capecitabina. Hasta la fecha, todos los estudios realizados en este contexto han incluido pacientes tratados con 5-fluorouracilo endovenoso. Este es el primer estudio, que intenta evaluar si los datos publicados hasta la fecha en relación a al posible valor predictivo de respuesta al tratamiento de estos polimorfismos, se cumple también para el nuevo tratamiento estandar, las fluorouropirimidinas orales (capecitabina).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de pacientes

Se estudiaron un total de 56 pacientes con carcinoma de recto localmente avanzado (estadios II y III) diagnosticados entre marzo de 2007 y septiembre de 2010 y tratados con quimiorradioterapia basada en capecitabina.

Otros criterios de elegibilidad fueron los siguientes: estado funcional (EF) del *Eastern Cooperative Oncology Group* de 0 -2; ≥ 18 años de edad; función hematológica adecuada (hemoglobina ≥ 9 g/dl [5,6 mmol/l], recuento de neutrófilos $\geq 1.500/\mu\text{l}$ y recuento de plaquetas $\geq 100.000/\mu\text{l}$); función renal adecuada (creatinina sérica $< 1,5$ x el límite superior de la normalidad); y función hepática adecuada (bilirrubina $\leq 1,5$ x el límite superior de la normalidad, AST y ALT ≤ 5 x el límite superior de la normalidad).

2.2. Protocolos de tratamiento

Todos los pacientes recibieron radioterapia externa un total de 45 Gy a razón de 1.8 Gy por sesión 5 días a la semana durante 5 semanas. Concomitante al tratamiento con radioterapia los pacientes recibieron los siguientes esquemas de quimioterapia:

- 23 pacientes recibieron el esquema XELOX (capecitabina $825 \text{ mg/m}^2/12\text{horas}$ x 5 días a la semana + oxaliplatino 50 mg/m^2 1 día a la semana)
- 33 pacientes fueron tratados con Capecitabina en monoterapia ($825 \text{ mg/m}^2/12\text{horas}$ x 5 días a la semana).

La cirugía se planificaba entre 6 y 8 semanas tras la finalización del tratamiento de quimiorradioterapia

2.3. Valoración de respuesta

La valoración de la respuesta fue llevada a cabo mediante dos parámetros:

- 1- El descenso de estadio según la clasificación TNM (Ref 16).
- 2- Grado de regresión patológica obtenido tras el análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica tras cirugía radical. Clasificación de los grados:

Grado 1	No evidencia de carcinoma residual (ypT0N0).
Grado 2	Presencia de microfocos residuales de carcinoma (micR)
Grado 3	Regresión parcial con predominio de fibrosis sobre el tumor
Grado 4	Predominio de carcinoma sobre fibrosis.

La supervivencia global se ha calculado desde el inicio del tratamiento hasta el éxito, independientemente de su causa. La supervivencia libre de enfermedad se ha calculado desde el inicio del tratamiento hasta la recidiva de la neoplasia.

2.4. Técnicas de farmacogenética

El ADN fue extraído de leucocitos de sangre periférica utilizando la técnica de “salting out” (Ref 17).

Para el estudio de los polimorfismos de la TS se amplifica un fragmento de la región 5'-UTR del gen y se observan fragmentos de ADN de 242 pb (*3/*3), 214 pb (*2/*2) o ambos (*2/*3). Posteriormente se secuencia dicho fragmento permitiendo la identificación de G o C en el nucleotido doceavo en la segunda repetición de los 28 pb.

Los polimorfismos en los genes reparadores de ADN (XRCC1 y ERCC1) se realizaron utilizando la técnica de discriminación alélica mediante TaqMan[®] con PCR a tiempo real.

2.5. Análisis estadísticos

Las variables categóricas se han comparado usando el test de la χ^2 .

El método de regresión de Cox se empleará para los análisis multivariados de la Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Enfermedad. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de p fueron menores de 0.05.

3. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 56 pacientes de los cuales 42 (75%) eran hombres y 14 (25) eran mujeres. La edad media fue de 68 años. Previo al tratamiento un 6% de los pacientes presentaban tumores T2, un 18% T3 y un 74% T4. El 15% eran ganglios negativos_(**Tabla 1**).

La resección ultra baja fue practicada en 9 pacientes (13.6%), 36 pacientes (64.2%) fueron tratados con resección abdominal baja y 11 (19.6 %) pacientes fueron intervenidos mediante amputación abdominoperineal.

En 16 pacientes (28.5 %) se objetivó una respuesta completa patológica tras analizar la pieza quirúrgica. El resto de respuestas anatomopatológicas se exponen en la **Tabla 2**. Del total de pacientes un 18 % presentaron recidiva siendo la localización más frecuente de la misma a nivel hepático (6 pacientes).

Tabla 1. Características de los pacientes.

Características pacientes	Nº	%
Edad media	68	
Sexo		
Varón	42	75
Mujer	14	25
Performance status		
0-1	51	91
2	5	9
Estadio tumor		
T2	3	6
T3	10	18
T4	43	76
Afectación ganglionar	15	27
N0	41	73
N1-N2		
CEA pre-tto		
<6	43	76
>6	13	24
Tratamiento		
XELOX	23	43
Capecitabina	33	57

Tabla 2. Respuesta anatomopatológica

	Nº	%
Respuesta completa	16	28.5
Grado Regresión patológica		
Grado 1	16	28.5
Grado 2	16	28.5
Grado 3	15	26.7
Grado 4	9	16.2
Descenso de estadio		
SI	47	83.9
NO	9	16.1

En las muestras de ADN estudiadas se encontraron las siguientes frecuencias de los polimorfismos analizados. **Tabla 3.**

Tabla 3. Polimorfismos encontrados

	Número	Porcentaje %
<u>TS</u>		
2/2	10	18
2/3	28	50
3/3	18	32
<u>TS expresión</u>		
Alta	33	59
Baja	23	41
<u>ERCC1</u>		
C/C	9	16
C/T	24	43
T/T	23	41
<u>XRCC1</u>		
G/G	22	39
G/A	24	43
A/A	6	11

En cuanto a los resultados de los polimorfismos de la timidilato sintasa, un 94% de los pacientes con genotipo *3/*3 del gen TS presentaron un descenso de estadio en comparación al 86% de los pacientes *2/*3 y al 50% de los pacientes 2/2 ($p < 0.010$). No se hallaron diferencias en cuanto a la respuesta patológica medida mediante el grado de regresión patológica. No se encontró ninguna asociación entre la respuesta al tratamiento y los genotipos de alta expresión. **Tabla 4.**

El polimorfismo ERCC1 C118T se asoció a una mayor respuesta patológica completa (grado de regresión patológica 1) con un 48% en /T vs. 21% en C/T y

0% in C/C; $p=0.014$ (**Tabla 4**). Así mismo la supervivencia libre de enfermedad (SLE) para los pacientes homocigotos T/T fue también estadísticamente superior (54 meses para ERCC1 T/T, 35 meses para C/T y 21 meses para el genotipo C/C ($p<0.007$).

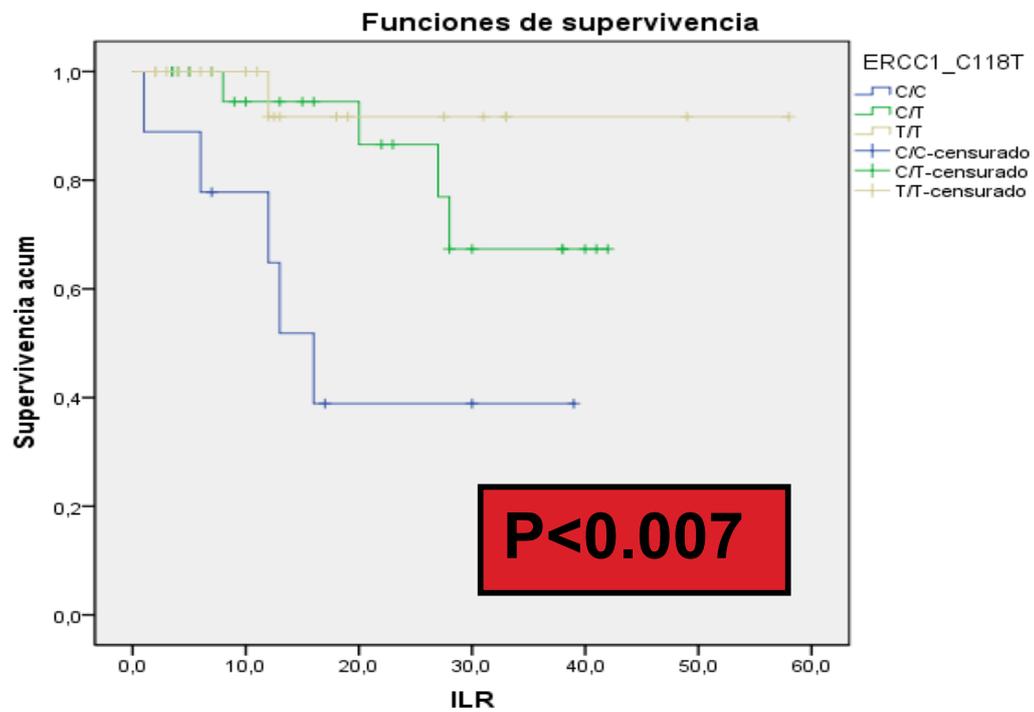
En el modelo de regresión de Cox, el genotipo T/T mantiene su valor predictivo independiente para la supervivencia.

En cuanto al polimorfismo del gen XRCC1 G399A no se encontraron diferencias significativas respecto al descenso del estadio o al grado de regresión patológica. (**Tabla 4**).

Tabla 4. Respuesta según genotipo: descenso de estadio y respuesta patológica.

	<u>Descenso de estadio</u>		<u>p valor</u>	<u>Respuesta patológica</u>		<u>p valor</u>
	%			%		
	Si	No		GR1 vs GR2,3,4		
<u>TS</u>			0.010			0.302
2/2	50	50		10	90	
2/3	85.7	14.3		35.7	64.3	
3/3	94.4	5.6		27.8	72.2	
Ex. Alta	75.2	24.8	0.135	30.4	69.6	0.797
Ex. Baja	8.7	91.3		27.3	73.7	
<u>ERCC1</u>			0.025			0.028
C/C	44.5	56.5		0	100	
C/T	20.8	79.2		20.8	79.2	
T/T	95.5	4.5		47.8	52.2	
<u>XRCC1</u>			0.528			0.491
G/G	20.8	79.2		20.8	79.2	
G/A	12.0	88.0		36	64	
A/A	17.2	82.1		33	66	

Gráficas 1. Funcion de supervivencia. ERCC1



4. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En este estudio realizado con 56 pacientes afectados de carcinoma rectal localmente avanzado tratados con quimiorradioterapia basada en capecitabina podemos concluir que:

- los pacientes con genotipos 2*/3* y 3*/3* del gen TS se asociaron con un mayor descenso de estadio ($p < 0.010$)
- los genotipos T/ T y C/T del polimorfismo ERCC1 C118T se asociaron con:
 - o un mayor descenso de estadio ($p < 0.025$)
 - o una mayor tasa de respuesta completa patológica ($p < 0.028$)
 - o una mayor SLE ($p < 0.007$)
- los polimorfismos para el gen XRCC1 estudiados no han resultado estadísticamente significativos para los parámetros de respuesta ni supervivencia estudiados.

En los últimos años diversos estudios se han centrado en el papel de los polimorfismos de la TS y los genes reparadores del ADN como factores biológicos predictores de respuesta a los tratamientos de quimio y radioterapia en el carcinoma colorrectal.

Hasta la fecha, todos los estudios realizados en el contexto neoadyuvantes han sido con quimioterapia basada en 5 fluorouracilo. Este estudio intenta evaluar si los resultados descritos se reproducen en los pacientes tratados con una fluoropirimidina oral (capecitabina).

En cuanto a los polimorfismos del gen de la TS, un estudio publicado por Villafranca et al en 2003 (Ref 18) fue uno de los primeros en apuntar la importancia de los polimorfismos de este gen en el tratamiento neoadyuvante de cáncer de recto. En este estudio los pacientes 3*/3* tenían una menor probabilidad de descenso de estadío tras el tratamiento con quimiorradioterapia (22% en genotipo 3*/3* vs 60 % en genotipos 2*/3* y 3*/3*;p< 0.036).

Sin embargo, estudios más recientes publicados por Páez et al (Ref 19) y Balboa et al. (Ref 20) han apuntado a los genotipos de alta expresión de TS como factores predictivos de respuesta al tratamiento neoadyuvante en cáncer de recto basado en fluoropirimidinas. En el primero, el genotipo 3*/3* se asocian a mayor respuesta patológica (61% en 3*/3* vs 22% en 2/3* y 2/2) y es también un factor pronóstico independiente para supervivencia (p<0.05).

En el segundo estudio, los genotipos de alta expresión 2R/3G, 3C/3G, 3G/3G se asociaron a mayor respuesta patológica.

Probablemente las diferencias en los resultados entre los estudios más iniciales y los más recientes se deban a diferencias en la metodología empleada por los diferentes estudios.

Los polimorfismos del XRCC1 A399G se han correlacionado en cáncer colorrectal con una mayor respuesta patológica tras el tratamiento neoadyuvante con quimiorradioterapia. En la misma línea, dos trabajos muy recientes publicados por Balboa et al. (Ref 20) y Páez et al (Ref 19) han apuntado el genotipo A/A del XRCC1 A399G como predictor de respuesta patológica tras neoadyuvancia con quimiorradioterapia y traducción de esta mayor respuesta en mayor supervivencia libre de progresión.

Sin embargo, hasta la fecha ninguno de los estudios que han valorado los polimorfismos del gen ERCC1 en carcinoma rectal en el contexto del tratamiento neoadyuvante ha relacionado dicho gen con la respuesta al tratamiento o la SLP (supervivencia libre de progresión).

En otros tumores como el carcinoma de ovario, se ha relacionado con el riesgo de progresión y muerte. (Ref 21). En tumores de cabeza y cuello en estadios iniciales y tratados exclusivamente con radioterapia el gen ERCC1 y sus polimorfismos, principalmente el ERCC1 y el ERCC5, se han asociado con la respuesta a la radioterapia (Ref 15). Se ha propuesto en estos y otros estudios, que el genotipo T/T presenta una menor capacidad en la reparación del ADN.

En el contexto neoadyuvante en cancer de recto, este es el primer estudio que correlaciona de forma estadísticamente significativa los polimorfismos del ERCC1 con la respuesta al tratamiento basado en capecitabina. En estudios previamente realizados, con quimioterapia basada en 5-fluorouracilo, los resultados observados en relación con la respuesta al tratamiento y la SLE no han alcanzado la significación estadística.

El gen ERCC1 juega un papel esencial en la reparación del ADN de los daños causados por quimioterapia y radioterapia. La mayoría de estudios publicados en carcinoma colorrectal el estudio del ERCC1 se centra en la reparación del daño generado por agentes citostáticos (derivados de platinos). Sin embargo ERCC1 está implicado también en los procesos de reparación del daño inducido por radioterapia.

Una justificación de los resultados de nuestro estudio, podría ser el postulado sinergismo de la capecitabina y la radioterapia y la potenciación de efecto de la radioterapia, junto con la importancia del ERCC1 en la reparación del daño inducido por las radiaciones ionizantes (Ref 9).

Los resultados de nuestro estudio deben ser interpretados como una hipótesis a ser confirmada en un estudio prospectivo. De confirmarse estos resultados los estudios farmacogenéticos previos al tratamiento con quimiorradioterapia neoadyuvante, podrían contribuir a un diseño más personalizado del tratamiento en carcinoma rectal localmente avanzado.

5. BIBLIOGRAFIA

Ref 0. De Vita, Lawrence, Roberts. Principles and Practice of Oncology. Eighth Edition.

Ref 1. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R et al; German Rectal Cancer Study Group. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Oct 21;351(17):1731-40

Ref 2. Smalley SR, Benedetti JK, Williamson SK, Robertson JM, Estes NC, Maher T et al. Phase III trial of fluorouracil-based chemotherapy regimens plus radiotherapy in postoperative adjuvant rectal cancer: GI INT 0144. *J Clin Oncol.* 2006 Aug 1;24(22):3542-7.

Ref 3. Gérard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, Martel-Laffay I, Hennequin C, Etienne PL et al. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 1;28(10):1638-44. Epub 2010 Mar 1.

Ref 4. Sanghera, D.W.Y. Wong, C.C. McConkey†, J.I. Geh and A. Hartler. Chemoradiotherapy for Rectal Cancer: An Updated Analysis of Factors Affecting Pathological Response. *Clinical Oncology.* Volume 20, Issue 2, March 2008, Pages 176-183

Ref 5. Ramani VS, Sun Myint A, Montazeri A, Wong H. Preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer: a comparison between intravenous 5-fluorouracil and oral capecitabine. *Colorectal Dis.* 2010 Aug;12 Suppl 2:37-46.

Ref 6. Sawada N, Tohru Ishikawa, Fumiko Sekiguchi, et al. X-Ray Irradiation Induces Thymidine Phosphorylase and Enhances the Efficacy of Capecitabine (Xeloda) in Human Cancer Xenografts Noriaki. *Clin Cancer Res* 1999;5:2948-2953

Ref 7. 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 Jun;20(3):191-7.

Ref 8. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, et al. 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 Jun 1;63(11):2898-904

Ref 9. M. Audebert, B. Salles, and P. Calsou, "Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 53, pp. 55117– 55126, 2004.

Ref 10. Ali Z. Al-Minawi, Nasrollah Saleh-Gohari, Thomas Helleday. The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 2008, Vol. 36, No. 11–9 doi: 10.1093.

Ref 11. Kristina Kirschner and David W. Melton. Multiple Roles of the ERCC1-XPF Endonuclease in DNA. Repair and Resistance to Anticancer Drugs. Review. *Anticancer Research*. 30: 3223-3232 (2010).

Ref 12. Simon GR, Sharma S, Cantor A, Smith P, Bepler G. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with nonsmall cell lung cancer. *Chest* 127: 978-983, 2005.

Ref 13. Yu JJ, Lee KB, Mu C, Li Q, Abernathy TV, Bostick-Bruton F, et al. Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol* 16: 555-560, 2000.

Ref 14. Smith S, Su D, Rigault de la Longrais IA, Schwartz P, Puopolo M, Rutherford TJ, et al. ERCC1 genotype and phenotype in epithelial ovarian cancer identify patients likely to benefit from paclitaxel treatment in addition to platinum-based therapy. *J Clin Oncol* 25: 5172-5179, 2007

Ref 15. Carles J, Monzo M, Amat M, Jansa S, Artells R, Navarro A, et al. Single-nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Nov 15;66(4):1022-30. Epub 2006 Sep 18.

Ref 16. National Comprehensive Cancer Network. Rectal Cancer Versión 3.1.1.

Ref 17. Miller SA, Dykes DD, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1989;**16**: 1215.

Ref 18. Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, Jesús García-Foncillas, Ignacio Azinovic, Enrique Martínez, et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the TS gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;**19**:1779-1786.

Ref 19. Páez D, Paré L, Altés A, Sancho-Poch FJ, Petriz L, Garriga J, et al. Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-fluorouracil. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010 Feb 18.

Ref 20. Lamas MJ, Duran G, Gomez A, Balboa E, Anido U, Bernardez B, et al. X-Ray Cross-Complementing Group 1 and Thymidylate Synthase Polymorphisms Might Predict Response to Chemoradiotherapy in Rectal Cancer Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010 Dec 16.

Ref 21. Smith S, Su D, Rigault de la Longrais IA, Schwartz P, Puopolo M, Rutherford TJ, et al. ERCC1 genotype and phenotype in epithelial ovarian cancer identify patients likely to benefit from paclitaxel treatment in addition to platinum-based therapy. *J Clin Oncol.* 2007 Nov 20;**25**(33):5172-9.

