

POLIMORFISMOS EN EL GEN  
DIHIDROPIRIMIDINA DEHIDROGENASA  
(*DPYD*) Y CITIDINA DEAMINASA (*CDA*)  
COMO FACTORES DE PRONÓSTICO EN  
PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO  
RESECADO TRATADOS CON  
QUIMIOTERAPIA ADYUVANTE CON  
FLUOROPIRIMIDINAS

Tesis presentada por  
Carmen Muñoz Garcia  
BIENIO 2006/2007

Director de tesis: Prof. J.J. Grau de Castro  
SERVICIO DE ONCOLOGIA MÉDICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

A mis padres por su apoyo y amor  
A la Farmacia Ana M<sup>a</sup> de la Cuadra por su paciencia

## **Agradecimientos**

Esta tesis es el resultado del trabajo personal y colaboración de otras personas que han hecho posible su realización y a las que quiero expresar mi gratitud.

Al Prof. M. Monzó, por su inestimable ayuda y por facilitarme las instalaciones de su laboratorio donde ha transcurrido la mayor parte de mi trabajo y al Prof. J.J. Grau, director de esta tesis, por su apoyo constante.

A los integrantes del Departamento de Anatomía y Embriología Humana, por su paciencia, sobre todo al iniciar el estudio en que necesité su estrecha colaboración para la utilización del material de laboratorio, sobre todo a Sònia Jansà y l'Alfons Navarro que fueron los que me ayudaron a su uso cuando comencé y a Rosa Artells por estar ahí. A Ana Gaya, Miquel Granell. Y a las nuevas incorporaciones, como Aina Pons, Tania Díaz, Silvia Pairet, Bernat Gel..

Al Prof. J.A. Bombí por el suministro de las muestras que han formado parte del estudio.

A todos ellos mi agradecimiento.

## **ÍNDICE GENERAL**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
1.1. Epidemiología.....	9
1.2. Causas del cáncer gástrico.....	10
1.3. Clasificación del cáncer gástrico.....	16
1.4. Tratamientos en el cáncer gástrico.....	17
1.4.1. Tratamiento con 5-FU.....	28
1.4.2. Tegafur como profármaco del 5-FU.....	64
1.4.3. Otras profármacos del 5-FU.....	80
1.4.4. Efectos adversos de las fluoropirimidinas.....	87
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>90</b>
2.1. Hipótesis.....	91
2.2. Objetivos.....	91
<b>3. PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>93</b>
3.1. Pacientes. Selección de pacientes.....	94
3.2. Variables clínicas.....	94
3.3. Métodos. Concepto de polimorfismo (SNP).....	96
3.4. Técnicas de laboratorio.....	97
3.4.1. Material de estudio.....	97
3.4.2. Extracción de DNA de tejido parafinado.....	97
3.4.3. Análisis de la calidad del DNA.....	99
3.4.4. Dilución de las muestras.....	99
3.4.5. Discriminación alélica por PCR cuantitativa a tiempo real.....	99
3.5. Estadística.....	106
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>107</b>
4.1. Características clínicas de los pacientes.....	108
4.2. Toxicidad.....	110
4.3. Recidivas.....	111

4.4. Estudio de polimorfismos.....	112
4.5. Supervivencia.....	116
4.6. Distribución de genotipos favorables y desfavorables.....	148
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>150</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>160</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>162</b>

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer gástrico es la 2ª causa más frecuente de muerte debida al cáncer en el mundo. En mujeres, es el cáncer más frecuente después del cáncer de mama, colorectal, pulmón y de cuello uterino. En hombres, después del cáncer de pulmón, próstata, colorectal y vejiga. La ratio entre hombres y mujeres en tasas de incidencia es de 1,6:1, con tendencia a disminuir más rápidamente entre las mujeres. La disminución en la incidencia entre hombres se hace patente a partir de los 55 años de edad y, en general, esta tendencia a la baja ha sido ligeramente más notoria en términos de mortalidad que de incidencia.

Japón es el país del mundo con mayor incidencia del mundo, con lo que es aquí donde tienen más desarrollados los programas de cribaje de la población con el objetivo de detectar tempranamente la enfermedad.

En Europa representa el 23% de las neoplasias malignas, siendo en Europa mayor en los países del este y del sur que en el oeste y norte. A su vez, esta incidencia va aumentando con la edad (el 60% de los pacientes con cáncer gástrico están por encima de los 65 años). La incidencia es mayor entre las clases sociales más bajas.

En Europa, la supervivencia para ambos sexos es, aproximadamente, del 42% para 1 año y del 23% para 5 años (más elevada para edades por debajo de 45 años, que asciende al 35% y por encima de los 74 años baja rápidamente para situarse en un 17%).

Lógicamente, la supervivencia va decreciendo a medida que pasa mayor tiempo desde el inicio de un tratamiento, y cuando la edad del individuo es mayor. También dependerá del estadio en que se encuentra el tumor a la hora de ser diagnosticado (pacientes con un mayor estadio del cáncer, tendrán menor supervivencia que aquellos en que fue detectado precozmente) y si éste tiene metástasis o por el contrario, está localizado (las metástasis se relacionan con un estadio más avanzado del cáncer). De esta manera, la supervivencia a 5 años para pacientes con metástasis, es sólo de un 3%, mientras que si la enfermedad está localizada, esta misma supervivencia sube a un 61%. Por lo tanto, el pronóstico para pacientes con cáncer gástrico avanzado resulta fatal.

Además del estadio del cáncer gástrico, también es importante para la supervivencia, la localización de la neoplasia en el estómago. De este modo, cánceres en el cardias y en la unión gastroesofágica, que vienen a representar entre un 2-3% de los cánceres gástricos en casi todos los países, presentan mal pronóstico, mientras que cánceres en la zona pilórica, antro y en la curvatura del estómago, que suelen variar de un país a otro, tienen mejor pronóstico.



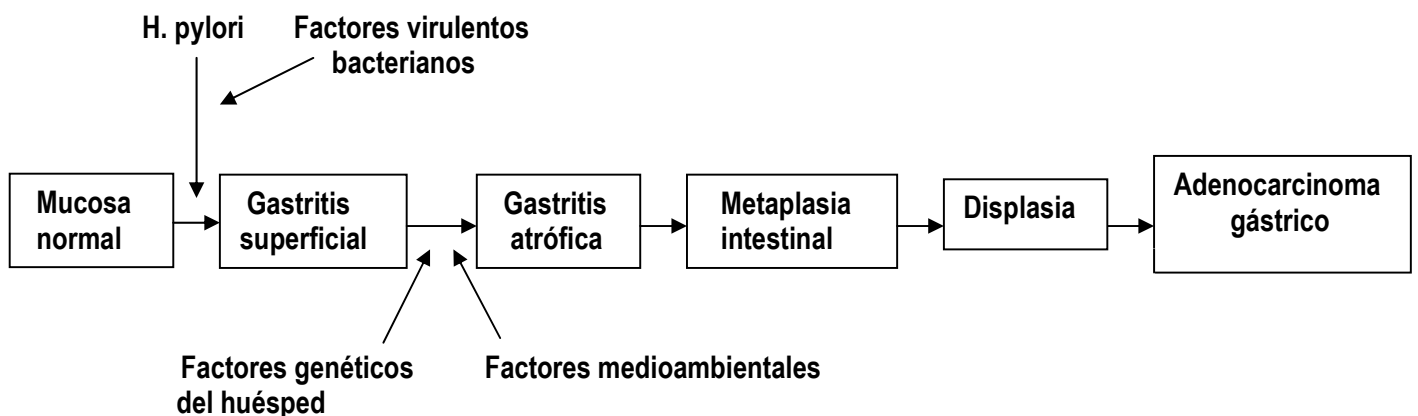
La prevalencia del cáncer de estómago es el número de personas que viven con el diagnóstico de la enfermedad. Suele expresarse en términos generales, a los 5 años, ó supervivientes con este diagnóstico a largo plazo cuando sobrepasa este tiempo. Estos últimos representan menos del 50% de todos los pacientes con cáncer de estómago [1].

## 1.2. CAUSAS DEL CÁNCER GÁSTRICO

### FACTORES ETIOLÓGICOS

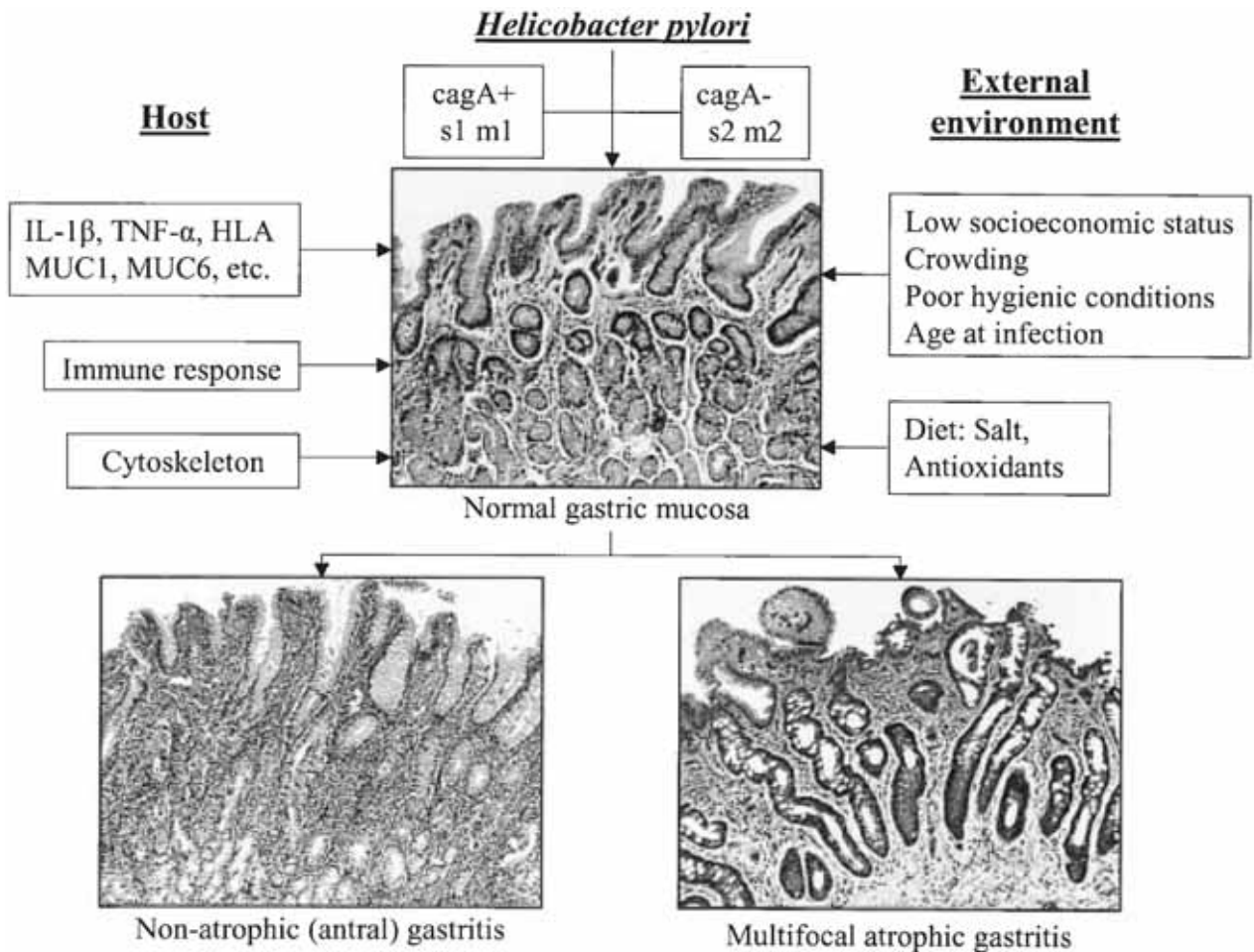
El cáncer gástrico es un proceso multifactorial. Es el resultado de la interacción de 3 principales factores: factores medioambientales, el agente bacteriano *Helicobacter pylori* y factores del huésped [2].

El tejido diana donde convergen estos factores es la mucosa gástrica. Otro punto importante a destacar serían las medidas preventivas como manera de evitar la aparición del cáncer, mediante la administración de suplementos antioxidantes evitando el daño oxidativo y erradicación de *Helicobacter pylori*.



[3]

Representación esquemática de factores que interactúan para determinar el pronóstico de la infección por *Helicobacter pylori* :



Globalmente, la incidencia de cáncer gástrico disminuye en el mundo. Esto se debe a una reducción de los casos de tumor de cuerpo y antro, principalmente por el cambio de hábitos en la conservación de alimentos. No obstante, se observa un aumento de los casos de neoplasia de cardias, del que se desconoce el origen, pero se asocia con los estilos de vida y la obesidad (Diario Médico, 12 de diciembre de 2006).

## **Factores medioambientales**

Entre los principales factores externos medioambientales se encuentran:

- Bajo nivel socioeconómico.
- Superpoblación.
- Pobres condiciones higiénicas.
- La edad en que se adquirió la infección por *Helicobacter pylori*.
- El hecho de emigrar a zonas de alta incidencia hace aumentar el riesgo de padecer cáncer gástrico, y, por el contrario, si es a zonas de bajo índice de morbilidad, lo reduce.
- Dieta:
  - Elevado consumo de sal. Esta tendencia está decreciendo debido a las campañas de mejora de sistemas de conservación de los alimentos (refrigeración en vez de alimentos conservados salados), ó a los tratamientos cada vez más habituales de hipertensión por existencia real del problema y por la mayor concienciación de la población por conseguir un mayor bienestar en términos de salud, que hacen que el consumo en la mesa de sal sea menor como manera de prevenir valores elevados en la presión arterial, retención de líquidos...
  - Dietas pobres en proteínas.
  - Dietas pobres en frutas y verduras. Hay evidencia que verduras crudas y frutas cítricas tienen un efecto protector del cáncer gástrico, mientras que los cereales y el té verde disminuyen el riesgo de padecerlo (se cree que, probablemente debido a la vitamina C y carotenoides contenidos en las frutas y verduras y no está tan claro si la vitamina E puede intervenir en este efecto).
  - Consumo de alcohol. No está clara su relación con un supuesto aumento del riesgo de padecer cáncer gástrico. Mayor evidencia existe entre individuos fumadores.
  - Ingesta de compuestos N-nitrosos de nitratos de la dieta.

## **Factores del huésped**

Existen numerosos factores dependientes del huésped que serán decisivos a la hora de incrementar el riesgo de padecer un cáncer, en este caso gástrico.

Entre estos factores se encuentran:

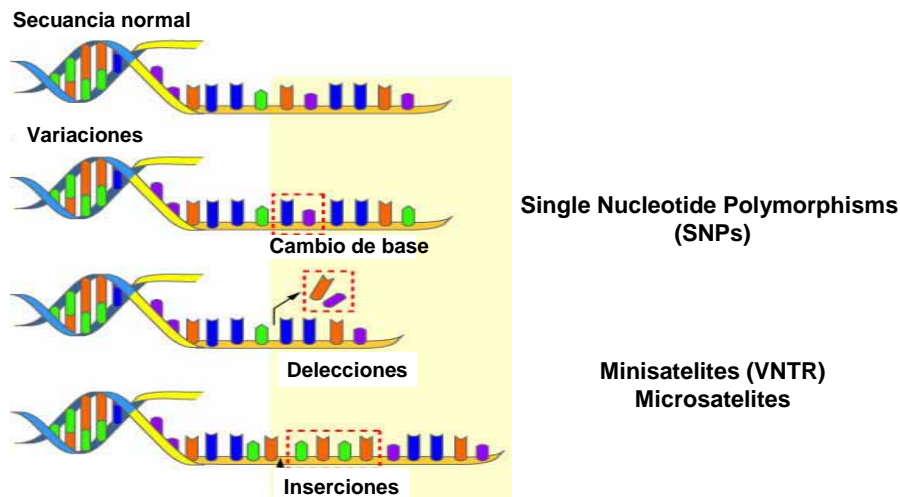
- El estado en que se encuentre la mucosa gástrica para servir de protección frente a la infección por *Helicobacter pylori* u otros carcinógenos.
- La respuesta inflamatoria, que condiciona el mantenimiento, severidad y resultado de la infección por la bacteria.
- Además de la naturaleza de la respuesta inmune, son importantes las respuestas apoptóticas así como los factores de crecimiento tales como la gastrina que se encuentra aumentada en patologías que preceden al cáncer; TGF-1 (“trefoil factor”) cuya supresión da lugar a anomalías a nivel gástrico y entre ellas a carcinomas intramucosales; ó el TGF- $\alpha$ , cuya sobreexpresión provoca la pérdida de células parietales e hiperplasia foveolar con susceptibilidad aumentada a padecer cáncer gástrico inducido por el carcinógeno MNU (N-methyl-N-nitrosourea).
- La detección de la bacteria, para implantar un tratamiento eficaz antibiótico para su erradicación y evitar que sea uno de los factores de riesgo para el desarrollo a cáncer gástrico.
- El funcionamiento de la detoxificación del carcinógeno y protección antioxidante.
- La variabilidad intrínseca en cuanto a los procesos de reparación del DNA.
- La habilidad del paciente para la proliferación celular.
- El grupo sanguíneo del individuo. Se ha comprobado que el grupo O contribuye a la adherencia de *Helicobacter pylori* a la mucosa gástrica con lo que ello conlleva, mientras que el grupo A se ha asociado a una mayor probabilidad de padecer cáncer gástrico de tipo difuso.
- Los niveles de pepsinógeno del individuo también fueron determinantes a la hora de tener un mayor riesgo de padecer cáncer gástrico de cualquiera de los dos tipos. Se vio que la concentración de pepsinógeno I era indicadora de gastritis atrófica de tal manera que niveles por debajo de 50 ng/ml por parte de las células de las glándulas fúndicas incrementaban el riesgo de que ésta se desarrollara con la consecuente posible evolución a cáncer gástrico. Estos valores reducidos también disminuyeron la magnitud de la asociación entre cagA y cáncer [4].
- Tener un determinado gen ó genes, que tienen la capacidad de ser un factor de riesgo potencial para la aparición del cáncer (marcadores tumorales). Ejemplo: la existencia del gen Her-2/neu en cáncer de mama. También pueden ser factores de pronóstico tener alguna alteración en la expresión de un determinado gen, como puede ser el hecho de la inactivación de la cromatina por acetilación de las histonas que la envuelven, con la

consecuente represión de la transcripción de varios genes supresores de tumores como el gen p21; la metilación del DNA que tiene también el efecto de silenciar la transcripción de genes supresores de tumores que impedirán frenar el desarrollo de la enfermedad; la sobreexpresión de algún factor de transcripción como del CDAX1 ó CDAX2 (citidina deaminasa); la sobreexpresión de factores ó receptores de crecimiento como el EGF (factor de crecimiento endotelial); tener determinados oncogenes tal como el *c-met* ó el *K-sam*; ó tener mutado ó haber perdido el carácter heterocigótico determinado oncogen ó un gen supresor del tumor como que exista una mutación en la  $\beta$ -catenina.

Todos estos conceptos serán ampliados más adelante.

- La existencia de polimorfismos como factor de pronóstico. Un polimorfismo es una variación de la secuencia de DNA que aparece en al menos un 1% de la población. SNP (“Single Nucleotide Polymorphisms”) es un polimorfismo que se da en un único nucleótido y se debe a un cambio de base. Los SNP son la variación más frecuente del genoma humano y aparece en más de un 90% de todas las secuencias polimórficas, en un promedio de 1 por cada 1000 nucleótidos. Estas variaciones no implican un fenotipo patológico, mientras las mutaciones puntuales suelen estar asociadas a fenotipos patológicos. La mayoría de polimorfismos aparecen en DNA no codificante (Intrón) y alrededor de la mitad de los SNP que se dan en el DNA codificante (Exón) hay cambios de codón sinónimos que no afectan a la función de la proteína por existir una variación en el nucleótido que codifica para la misma proteína. Además de afectar a un nucleótido de la secuencia de DNA, los polimorfismos pueden presentarse en forma de deleciones, inserciones, variación del número de “tandem repeats” (VNTRs) y pueden actuar a nivel de enzimas metabolizadores de fármacos, de transformación de un profármaco en su metabolito activo (como es el caso del profármaco capecitabina), de transportadores de fármacos, de receptores de fármacos...

**Polimorfismo:** Variación de secuencia de DNA que aparece en al menos un 1% de la población.



Mientras que en la mutación, el cambio genotípico se asocia a un fenotipo patológico, en el SNP, este cambio no se asocia a un fenotipo patológico. La mutación será la causante de la aparición del cáncer mientras que el polimorfismo puede por ejemplo, alterar la farmacocinética ó farmacodinamia de un determinado fármaco, y hacer que un determinado tratamiento sea ó no efectivo.

Estas variaciones pueden afectar a la respuesta del paciente a la quimioterapia contra el cáncer además de suponer una mayor probabilidad de padecer la enfermedad. Nos centraremos en el cáncer gástrico pero estos polimorfismos pueden darse en genes responsables de muchas otras patologías. La farmacogenética se dirige al uso del conocimiento de estas variaciones para dar con el tratamiento de mejor respuesta y menor toxicidad. Determinan la respuesta de un individuo a un tratamiento farmacológico. Lo ideal antes de cualquier tratamiento sería determinar la existencia ó no de estos polimorfismos con tal de iniciar el tratamiento correcto. Más adelante describiremos los polimorfismos encontrados en el cáncer gástrico, así como con más detalle, los que han sido objeto de nuestro estudio.

### 1.3. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER GÁSTRICO

Existen hoy día varias clasificaciones del cáncer gástrico. Sin embargo, entre todos los tipos, el adenocarcinoma representa sobre el 90% de todas las neoplasias gástricas. Por lo tanto, generalmente, cuando se hable del cáncer gástrico nos estaremos refiriendo al adenocarcinoma de estómago.

Según lo definido anteriormente, los estadios del carcinoma gástrico pueden ser:

<b>ESTADIOS</b>	<b>INFILTRACIÓN DEL TUMOR (T)</b>	<b>GANGLIOS LINFÁTICOS (N)</b>	<b>METÁSTASIS (M)</b>
<b>0</b>	Tis	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
<b>IA</b>	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
<b>IB</b>	T <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
<b>II</b>	T <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
<b>IIIA</b>	T <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
<b>IIIB</b>	T <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
<b>IV</b>	T*	N*	M <sub>1</sub>

T\*: cualquier T; N\*: cualquier N

[5]

## 1.4. TRATAMIENTOS

### Tratamiento quirúrgico

El principal tratamiento aplicable en un tumor primario gástrico es la cirugía y la extirpación de los nódulos linfáticos regionales, que no siempre estarán afectados. Éste será el primer tratamiento ó bien después de quimioterapia neoadyuvante previa al tratamiento quirúrgico. Con la quimioterapia neoadyuvante se quiere conseguir que la cirugía sea más efectiva al tener la posibilidad de disminuir el tamaño del tumor y empezar a tratar posibles micrometástasis. Normalmente se recomienda la gastrectomía total para pacientes con lesiones en el tercio proximal ó medio del estómago ó en casos de cáncer gástrico difuso. No está tan claro para pacientes con tumores en el estómago distal ó antro sin ninguna aparente ventaja de la gastrectomía total frente a la gastrectomía subtotal.

### Quimioterapia neoadyuvante

Está sobre todo dirigida a pacientes diagnosticados de cáncer gástrico avanzado (T3-4N0-2M0), consiguiendo de esta manera prolongar la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia total, disminuir el estadio con lo que la invasión será menor y erradicar procesos metastásicos ocultos.

Uno de los regímenes que se asignaron a pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante, fue el que consistía en cuatro ciclos de 5-FU, doxorubicina y metotrexato (FAMTX) con escasos beneficios y elevada toxicidad, con tasas de respuesta conseguidas del 20-25%. Lo mismo ocurrió con el uso de 5-FU previo a la cirugía. En los años 90, el régimen FAMTX fue considerado el tratamiento de referencia cuando ningún otro régimen fue superior.

En el régimen FAMTX, el primer día, los pacientes se hidrataron durante 24 horas con 3 litros de bicarbonato sódico isotónico. El segundo día, el metotrexato ( $1500 \text{ mg/m}^2$ ) se dio en una infusión de una hora y el 5-FU ( $1500 \text{ mg/m}^2$ ), también en una infusión de una hora, comenzando una hora después de administrar el metotrexato. El tercer y cuarto día, se administraron 30 mg de leucovorín cada 6 horas (intravenoso u oral). En el día 15 del ciclo, se administraron  $30 \text{ mg/m}^2$  de doxorubicina en bolo intravenoso. El tratamiento se dio cada 4 semanas por un máximo de cuatro ciclos. En el comienzo de cada ciclo, el tratamiento se retrasó durante una semana en caso de leu-



copenia o trombocitopenia de grado 2 ó más ó se redujo la dosis por mucositis ó nefrotoxicidad de grado 2 ó más.

Más favorable resultó el régimen consistente en 3 ciclos de quimioterapia con epirubicina, cisplatino y 5-FU (ECF), con toxicidad tolerable y en el que se incluyeron tanto pacientes en estadio avanzado como en fases tempranas.

Otro ensayo que resultó seguro y que parece disminuir las tasas de recurrencia del carcinoma gástrico y aumentar la supervivencia, fue el que consistía en dos ciclos de infusión de 5-FU con leucovorín y cisplatino semanal, seguido por cirugía, para recibir 2 ciclos de 5-fluoro-2'-deoxiuridina y cisplatino después de ésta (CDADP-FU, post-op. ip. CTx). La quimioterapia pre-operativa sistémica con cisplatino y 5-FU comenzó el día 1. El cisplatino en una dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> se administró a razón de 1 mg/minuto inmediatamente después que el 5-FU intraperitoneal con 200 mg/m<sup>2</sup>/día se comenzara a pautar y se continuara durante 21 días, usando una bomba de infusión ambulatoria. Se dio leucovorín intravenoso en una dosis de 20 mg/m<sup>2</sup> el primer día de la terapia con 5-FU y se repitió semanalmente mientras el paciente estaba recibiendo 5-FU. El día 29 se dio el 2º ciclo de cisplatino, 5-FU IP y leucovorín semanal.

El régimen EAP consistente en 3 ó 4 ciclos planeados de quimioterapia neoadyuvante con etopósido, doxorubicina y cisplatino se dieron previos a la gastrectomía total en comparación a aquellos que recibieron sólo cirugía. El ciclo quimioterápico consistió en 20 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicina los días 1 y 7, 40 mg/m<sup>2</sup> de cisplatino, los días 2 y 7, y 120 mg/m<sup>2</sup> de etopósido de los días 4 al 6 del ciclo. Los ciclos se repetían cada 28 días, una vez el paciente se había recuperado de los efectos adversos. En el 50% de los pacientes sufrieron marcada leucocitopenia y trombocitopenia. Como ocurría con el régimen 5-FU/adriamicina/metotrexato (FAMTX), las tasas de respuesta son de un 20-25%; sin embargo, las toxicidades son sustanciales requiriendo muchas veces hospitalización.

Ensayos en fase II usando paclitaxel, incluso menos tóxico que los regímenes basados en cisplatino, muestran tasas de respuesta entre un 32 y un 65% con resultados prometedores [6].

Un estudio randomizado en fase III por la EORTC (ensayo nº 40954), que compara quimioterapia pre-operativa con cisplatino, ácido fólico y fluorouracilo (PLF) con cirugía sola para cáncer gástrico avanzado localmente está todavía vigente. El régimen PLF consiste en 50 mg/m<sup>2</sup> de cisplatino, altas dosis de ácido fólico (HD-FA: 500 mg/m<sup>2</sup>) y 2000 mg/m<sup>2</sup> de HD-5-FU. El cisplatino fue dado los días 1, 15 y 29 en 1 hora de infusión; HD-FA se administró los días 1, 8, 15, 22, 29 y 36 en infusión durante 2 horas, seguido por HD-5-FU en una infusión continua durante 24

horas. Se planearon 2 ciclos para cada paciente. El 2º ciclo se administró después de 2 semanas de descanso tras el primer ciclo. Se observó una baja toxicidad con una elevada actividad antitumoral. Mostró adecuadas tasas de respuesta y una consecuente elevada tasa de resección completa, con una baja morbilidad postoperatoria y ninguna mortalidad después de la intervención. Los pacientes que responden al tratamiento, presentan un excelente pronóstico.

En el Congreso de la American Society Of Clinical Oncology (ASCO) del año 2003 se presentaron los resultados del estudio “MAGIC” conducido por la “Medical Research Council” (MRC) en United Kingdom. Éste es el primer gran estudio randomizado que demuestra la eficacia de la quimioterapia preoperatoria en el cáncer gástrico. 503 pacientes con estadios II y III fueron randomizados a recibir cirugía sola ó tres ciclos de quimioterapia preoperatoria con epirubicina, cisplatino y fluorouracilo (ECF) seguido por cirugía y por tres ciclos postoperatorios de ECF [7].

Otro pequeño estudio incluyó cisplatino, etopósido y 5-FU (EFP) antes de la cirugía, con resultados positivos. El etopósido fue administrado con una dosis inicial de 90 mg/m<sup>2</sup> dados intravenosamente sobre 2 horas los días 1, 3 y 5; el 5-FU se administró con una dosis inicial de 900 mg/m<sup>2</sup> dados como una infusión intravenosa continua de 20 horas de los días 1 al 5; y el cisplatino se administró en una dosis inicial de 20 mg/m<sup>2</sup> dados intravenosamente sobre una hora de los días 1 al 5. Los ciclos de quimioterapia se repitieron cada 24 a 28 días [8].

Sin beneficio respecto al grupo control resultó el régimen consistente en cisplatino, mitomicina C, UFT y etopósido.

La quimiorradiación preoperatoria usando 5-FU continuo (300 mg/m<sup>2</sup>) con 45 Gy para cáncer gástrico potencialmente resecable, mostró una supervivencia media de 34 meses y fue mayor al 60% a los 4 años, con reducción del tumor y sin toxicidad preoperatoria significativa.

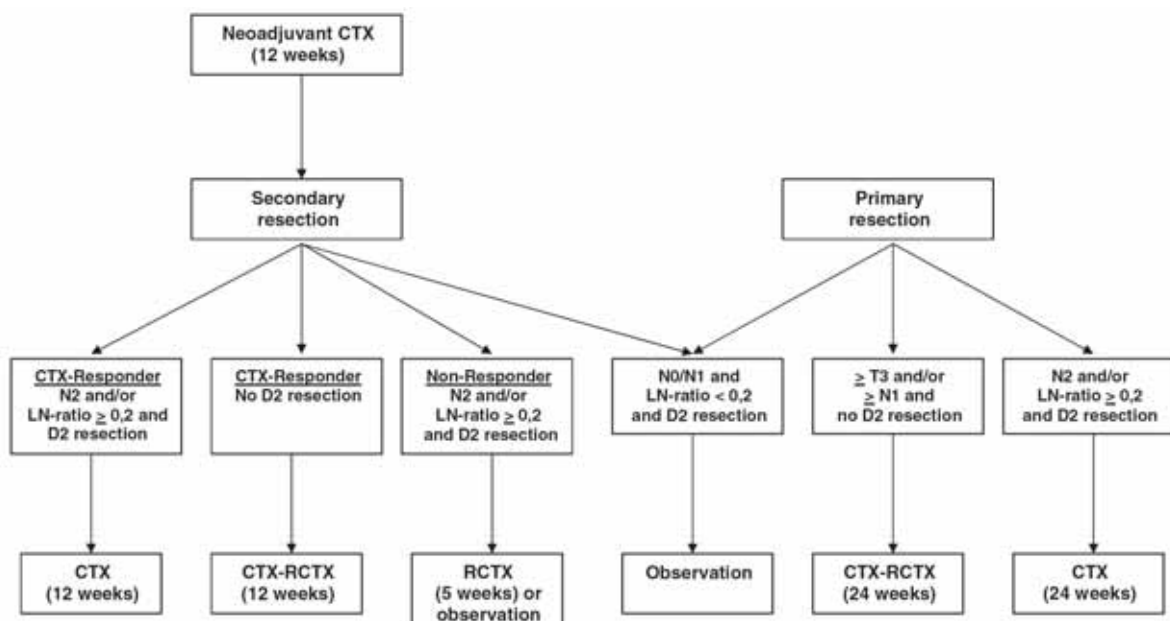
Hoy día se están incluyendo nuevos agentes activos tales como el docetaxel, paclitaxel e irinotecan.

También se ha probado la posibilidad de administrar radioterapia neoadyuvante ó inmunoterapia neoadyuvante previa al tratamiento quirúrgico con resultados significativos.

Quimioterapia neoadyuvante para cáncer gástrico: resultados de estudios en fase II y III:

Estudio (1° autor)	Régimen	n° pacientes	Resección (R0)	Supervivencia media	Supervivencia a los 2 años
Wilke 1989 [9]	EAP	34	10 (29%)	18 meses	26%
Ajani 1991 [10]	EFP	25	18 (72%)	15 meses	44%
Alexander 1993 [11]	FU-FA-INFalfa2a	22	18 (82%)	18 meses	52%
Kelsen 1996 [12]	pre-op.FAMTX Post-op. ip. CDADP/FU; iv. FU	56	34 (61%)	15 meses	40%
Crookes 1997 [13]	CDADP-FU post-op. ip. CTx	59	40 (68%)	>4 años	64%
Siewert 1997 [14]	CDADP-FU-FA	41	30 (73%)	NS	56%
Schuhmacher 2001 [15]	EAP	42	31 (74%)	19 meses	40%
Ott 2003 [16]	PLF	42	32 (76%)	25 meses	NS
Hartgrink 2004 [17]	FAMTX	27	18 (67%)	18 meses	44%

Recomendación individualizada para estrategias de tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer gástrico que han recibido quimioterapia neoadyuvante ó para aquellos que se les ha practicado resección primaria :



## Quimioterapia adyuvante para cáncer gástrico no metastásico

La quimioterapia adyuvante se hace necesaria en pacientes de alto riesgo después de la cirugía. Existen diferentes combinaciones con resultados dispares tales como el régimen consistente en thiotepa ó 5-fluorodeoxiuridina; regímenes que contienen 5-FU/nitrosourea; ó 5-FU/mitomicina C como el que consistió en 200 mg/día de FU oral diario durante 1 año y 6 mg/m<sup>2</sup> de MMC intravenosa cada 4 semanas y repetido 4 veces; quimioterapia basada en mitomicina; regímenes que contienen 5-FU/antraciclina y otros que contienen 5-FU, como el que consistió en 200 mg de FU diario oral. Más recientemente se ha incluido cisplatino a regímenes basados en 5-FU pero no se ha observado beneficio. Lo mismo ocurre con la terapia adyuvante consistente en 2 ciclos de etopósido, doxorubicina y cisplatino (EAP) más 2 ciclos de 5-FU y leucovorín (Régimen Machover). El régimen consistente en cisplatino, epirubicina, leucovorín y 5-FU (PELF) redujo la mortalidad pero no alcanzó significancia estadística.

Para pacientes en estadio III, se valoraron los resultados obtenidos de la administración de un grupo control frente a quimioterapia consistente de una dosis única de mitomicina C (20 mg/m<sup>2</sup> el primer día) seguido por tegafur oral (400 mg, comenzando el día 30 y continuando durante 3 meses). La supervivencia en general, y la supervivencia tanto a los 2 años como a los 5 años, fue favorable para el grupo que recibió la quimioterapia y la toxicidad fue tolerable.

Otro estudio de cinco años de seguimiento fue el realizado a pacientes a los que se les administró 75 mg/m<sup>2</sup> de epidoxorubicina (EPI) el primer día del tratamiento, y 200 mg/m<sup>2</sup> de leucovorín (LV) y 450 mg/m<sup>2</sup> de 5-FU desde el primer día hasta el tercero, repetido cada 3 semanas durante 7 meses. La supervivencia media de los pacientes que se les practicó la cirugía sólo fue de 18 meses comparados a los 31 meses del grupo con quimioterapia (p<0,01). Algo más tóxico que el régimen descrito anteriormente con toxicidades de grado III y IV.

Existen numerosos metaanálisis de estudios con quimioterapia adyuvante.

Es posible la combinación de quimioterapia adyuvante con inmunoterapia, combinada con radioterapia, la administración de quimioterapia intraperitoneal, ó la administración de radioterapia adyuvante como alternativas a la quimioterapia adyuvante clásica.

Un ejemplo de quimioradioterapia es el estudio del Grupo Oncológico SWOG que consistió en un ciclo de 425 mg/m<sup>2</sup> de 5-FU diario y 20 mg/m<sup>2</sup> de leucovorín durante 5 días consecutivos, seguido 1 mes más tarde por radiación a una dosis de 4500 cGy en 25 fracciones dados con 400 mg/m<sup>2</sup>/día de 5-FU y 20 mg/m<sup>2</sup>/día de leucovorín de los días 1 al 4 y los últimos 3 días de radio-

terapia sola (del día 23 al 25). Un mes después de completar la radiación, se administraron 2 ciclos adicionales de quimioterapia con 425 mg/m<sup>2</sup> de 5-FU y 20 mg/m<sup>2</sup> de leucovorín, diariamente durante 5 días distribuidos 1 ciclo cada mes, mejorándose la supervivencia. Los autores aconsejaron esta combinación a todos los pacientes con alto riesgo. Es el régimen más tóxico de los descritos hasta ahora con un 41% de toxicidad de grado III y un 32% de toxicidad de grado IV.

Los tratamientos a aplicar dependerán del estadio del tumor primario. La invasión de la capa subserosa por el tumor se considera el límite entre pacientes de alto y bajo riesgo. Tumores que invadan la muscularis propia se caracterizan por un buen pronóstico.

No existe recomendación para el uso de quimioterapia adyuvante en pacientes en estadios tempranos de la enfermedad.

Debido a que una elevada proporción de pacientes (hasta un 50%) después de la cirugía desarrollan carcinomatosis peritoneal, es frecuente el uso de terapia intraperitoneal, basadas en regímenes que contienen cisplatino, mitomicina ó 5-FU, con los que no siempre se obtienen resultados satisfactorios (en caso de metástasis peritoneal instaurada, muchas veces es debido a que estos pacientes tienen peor estado general, con la ingesta oral afectada y complicaciones tales como obstrucción intestinal e hidronefrosis, que pueden prolongar la eliminación de los agentes con la consecuente toxicidad).

## **RESUMEN EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER GÁSTRICO NO METASTÁSICO**

En conclusión, dependiendo del estadio del cáncer, las opciones de tratamiento serán diferentes:

- Estadío I: T1N0M0 y T1N1M0: estadios tempranos del cáncer gástrico; T2N0M0:
  - GT (gastrectomía total) si la lesión está en el cuerpo ó en el estómago proximal; esofagectomía distal si la lesión afecta a la unión cardioesofágica.
  - GST (gastrectomía subtotal) si la lesión sale desde el antro.
  - GT si el tumor envuelve al tumor difusamente.
  - Se recomienda una linfadenectomía D1.
  - La endoscopia de la mucosa ó la laparoscopia para tumores de la mucosa se están investigando.

- Los tratamientos después de la cirugía (quimiorradioterapia, quimioterapia) no están recomendados.

– Estadío II: T1N2M0, T2N1M0, T3N0M0:

- GT si la lesión está en el cuerpo ó en el estómago proximal; esofagectomía distal si la lesión afecta a la unión cardioesofágica.
- GST si la lesión sale desde el antro.
- GT si el tumor envuelve el estómago difusamente.
- Se recomienda una linfadenectomía D1 con al menos 15 ganglios linfáticos extirpados. Se debe considerar una linfadenectomía D2 cuando se sospeche la existencia de ganglios N2 positivos.
- Se puede considerar el tratamiento con quimioterapia adyuvante (regímenes basados en terapias con 5-FU) en cánceres con ganglios linfáticos positivos.
- Se puede aplicar quimiorradioterapia después de la cirugía en pacientes con linfadenectomía D0.
- La terapia neoadyuvante se está investigando.

– Estadío III: T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0, T4N0M0 :

- GT si la lesión está en el cuerpo ó en el estómago proximal; esofagectomía distal si la lesión afecta a la unión cardioesofágica.
- GST si la lesión sale desde el antro.
- GT si el tumor envuelve el estómago difusamente.
- Se recomienda una linfadenectomía para la mayoría de pacientes en estadio III en que hay una sospecha de ganglios N2; de otra manera se ha de considerar una linfadenectomía D1.
- Quimioterapia adyuvante (regímenes basados en 5-FU).
- Quimiorradioterapia después de la cirugía para pacientes D0 y D1.
- Terapia neoadyuvante (preoperativa) para cáncer gástrico avanzado inoperable.

- Todos los pacientes con cánceres en estadio III son candidatos para regímenes adyuvantes y neoadyuvantes.

– Estadío IV M0: T1-3N3M0, T4N1-3M0:

- Gastrectomía radical con extirpación de los órganos involucrados adyacentes.
- Se recomienda una linfadenectomía D2-3.
- Puede ser considerada quimioterapia adyuvante (regímenes basados en 5- FU) en cánceres con ganglios linfáticos positivos.
- Quimioradioterapia después de la cirugía.
- Se puede considerar quimioterapia preoperativa para cáncer gástrico avanzado inoperable.
- Todos los pacientes con estadio IV M0 son candidatos para terapias adyuvantes y neoadyuvantes.
- Quimioterapia sistémica aplicable a enfermedad metastásica.

Cabe comentar que la quimioradioterapia es una nueva posibilidad para la terapia adyuvante en el cáncer gástrico. La supervivencia es similar al tratamiento con TG-MMC pero ésta última es más fácil de administrar y es bien aceptada por los pacientes. Datos sobre los lugares de recaída mostraron que la quimioradioterapia redujo las recurrencias locales en un 10%, las recurrencias regionales (carcinomatosis abdominal) en un 7% y metástasis distantes en un 15%. La radioterapia adyuvante se ha comprobado que previene las recaídas locales pero no las regionales ni las metástasis distantes. Estos dos hechos se pueden prevenir mediante la quimioterapia.

### **Quimioterapia adyuvante para cáncer gástrico metastásico**

5-FU sigue siendo el citotóxico más ampliamente utilizado, sólo ó en combinación con otros fármacos. Su administración en monoterapia alcanza sobre un 20-30% de tasa de respuesta en forma de inyecciones intravenosas en bolo ó bien como infusión continua. Sus efectos adversos más destacables son mucositis, diarrea, mielosupresión y, cuando fue usado como infusión continua, puede dar lugar al síndrome de la mano-pie (“hand-foot syndrome”).

Otros agentes activos en monoterapia usados en el tratamiento del cáncer gástrico son la mitomicina C, las antraciclina (doxorubicina, epirubicina), cisplatino ó etopósido con unas tasas de respuesta que oscilan del 6-30%. Se han identificado nuevos agentes activos en cáncer gástrico metastásico tales como los taxanos, paclitaxel y docetaxel, irinotecan, UFT, aunque generalmente la terapia con un único agente como tratamiento no presenta ventajas frente a la combinación de varios antineoplásicos.

Los regímenes en politerapia que se utilizan son los siguientes:

– Régimen ECF:

5-FU se administró en infusión continua i.v. en dosis de 200 mg/m<sup>2</sup>/día llevando una bomba portátil durante 6 meses. Además, epirubicina i.v. en dosis de 50 mg/m<sup>2</sup> y cisplatino i.v., en dosis de 60 mg/m<sup>2</sup> cada 3 semanas en un máximo de 8 ciclos, durante 24 semanas. La toxicidad observada fue alopecia, neutropenia y nauseas y vómitos.

– Régimen DCF:

Docetaxel en dosis de 75 mg/m<sup>2</sup> el primer día; cisplatino con 75 mg/m<sup>2</sup> el día 1; y 5-FU, 750mg/m<sup>2</sup>/día i.v. en infusión continua de los días 1-5, cada 3 semanas. Se vio toxicidad hematológica con neutropenia de grado 3-4 y neutropenia febril, estomatitis y diarrea.

– Régimen PELF:

Cisplatino en una dosis de 40 mg/m<sup>2</sup> los días 1,5; epirubicina, 30 mg/m<sup>2</sup>, los días 1,5; 6S-leucovorín, 250 mg/m<sup>2</sup> en bolus i.v. del día 1-4; 5-FU, 300 mg/m<sup>2</sup> en bolus i.v., de los días 1-4; los ciclos se repiten cada 3 semanas. Se ha observado con este régimen, toxicidad hematológica de grado 1-2, nauseas y vómitos, estomatitis y diarrea.

– Régimen PELF semanal:

Administración semanal de cisplatino, 40 mg/m<sup>2</sup>; 35 mg/m<sup>2</sup> de epirubicina; 250 mg/m<sup>2</sup> de



6S-leucovorín; 500 mg/m<sup>2</sup> de 5-FU; 1,5 g/m<sup>2</sup> de glutatión el primer día, seguido por 5µg/Kg de filgrastim subcutáneo de los días 2-7. Un ciclo de este régimen consistió de 8 tratamientos de una semana. Se dio toxicidad grave consistente en anemia, neutropenia, trombocitopenia ó mucositis y una elevada tasa de respuesta.

– Régimen FOLFOX:

100 mg/m<sup>2</sup> de oxaliplatino y 400 mg/m<sup>2</sup> de leucovorín, administrado simultáneamente en infusión i.v. de 2 horas, seguido por un bolus de 400 mg/m<sup>2</sup> de 5-FU durante 10 minutos y una infusión continua de 3000 mg/m<sup>2</sup> de 5-FU durante 46 horas. La toxicidad observada fue neutropenia, trombocitopenia, anemia y neuropatía periférica debida al oxaliplatino.

– Régimen PF:

Infusión continua i.v. de 1g/m<sup>2</sup>/día de 5-FU durante 5 días consecutivos e infusión de 1 hora de 100 mg/m<sup>2</sup> de cisplatino. Los ciclos se repiten cada 4 semanas. Es un régimen poco utilizado. Las toxicidades principales son neutropenia, vómitos y nauseas y mucositis.

– Régimen FAMTX:

Metotrexato i.v. de 1500 mg/m<sup>2</sup>, seguido por 1500 mg/m<sup>2</sup> de 5-FU una hora más tarde el primer día y 30 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicina i.v. el día 15. Los ciclos se repiten cada 29 días. La principal toxicidad es la neutropenia.

– Régimen ELF:

Infusión i.v de 300 mg/m<sup>2</sup> de leucovorín durante 10 minutos, seguido rápidamente por 120 mg/m<sup>2</sup> de etopósido i.v. durante 50 minutos, seguido por 500 mg/m<sup>2</sup> de bolus de 5-FU durante 3 días consecutivos. Este ciclo se repite cada 3 semanas.

– Régimen FAM:

600 mg/m<sup>2</sup> i.v. de 5-FU los días 1, 8, 29 y 36; 30 mg/m<sup>2</sup> i.v. de doxorubicina los días 1 y 29; y 10 mg/m<sup>2</sup> de mitomicina el día 1. Este ciclo se repite cada 8 semanas. Fue muy utilizado en la década de los 80.

De los regímenes citados, la tasa de respuesta y la supervivencia para FAMTX fue muy superior que para FAM, con toxicidades similares. Para disminuir la toxicidad, se pensó en administrar el régimen ELF, recomendado sobre todo en pacientes de edad avanzada ó en pacientes con riesgo cardíaco pudiéndose presentar en algunos casos, mielosupresión.

Son habituales también tratamientos combinados con cisplatino.

La combinación de etopósido, doxorubicina y cisplatino (EAP) presentó una actividad similar a FAMTX, pero fue más tóxica que esta última.

Régimen de 5-FU y cisplatino (PF) mostró mejor tasa de respuesta que aquel que sólo llevaba 5-FU ó el régimen FAM.

En otro estudio se comparó el régimen basado en cisplatino, epirubicina y etopósido (EEP) con 5-FU, epirubicina y cisplatino (FEP), con tasas de respuesta muy similares.

Se vio una escasa eficacia clínica con tasas de respuesta modestas cuando se compararon ELF ó PF con FAMTX.

El régimen ECF mostró mejor tasa de respuesta, mayor supervivencia, mayor intervalo libre de enfermedad y mejor y más larga calidad de vida que FAMTX.

Sustituyendo epirubicina por mitomicina (régimen ECF por MCF), se comprobó que ambos tenían similar supervivencia, tasa de respuesta e intervalo libre de enfermedad pero la calidad de vida era superior con epirubicina (ECF).

Comparando los regímenes FAM y PELF, éste último mostró mayor toxicidad no hematológica que el primero aunque también mayor tasa de respuesta.

Entre PELF y FAMTX, la mayor tasa de respuesta fue para el primero, siendo similares el tiempo de progresión, la duración de respuesta, la supervivencia y la toxicidad exceptuando las náuseas y vómitos y diarrea que fueron más severas en el régimen PELF y la mucositis que fue más acentuada en el grupo con FAMTX.

Se han incorporado nuevos fármacos en el tratamiento del cáncer gástrico, tales como irinotecan ó docetaxel.

Los taxanos docetaxel y paclitaxel inhiben la despolimerización de los microtúbulos y presentan moderada actividad frente al cáncer gástrico.

El oxaliplatino es un agente alquilante que inhibe la replicación del DNA formando aductos entre dos guaninas contiguas ó entre una molécula de adenina y una de guanina. El régimen basado en la combinación de oxaliplatino, 5-FU y ácido folínico mostró una buena tasa de respuesta y eficacia. La combinación de irinotecan/LV5FU2 (leucovorín y 5-FU según Gramont) mostró mejor tasa de respuesta que cisplatino/LV5FU2 ó LV5FU2 sólo. Entre DCF (docetaxel, cisplatino y 5-FU) y CF (cisplatino y 5-FU), el primero mostró mejor tasa de respuesta y mejor supervivencia que el segundo.

Un régimen parecido a éste es el que está compuesto por docetaxel, 5-FU y leucovorín., entre 75 y 100 mg/m<sup>2</sup> de docetaxel en una infusión intravenosa de 1 hora el primer día cada 28 días. Los pacientes además, recibieron 5-FU (1800 mg/m<sup>2</sup>) y leucovorín (500 mg/m<sup>2</sup>), por infusión intravenosa continua durante 24 horas, los días 1, 8 y 15 cada 28 horas. Se realizaron 2 ciclos. Se vio beneficio en pacientes con cáncer gástrico avanzado y buena tolerancia. La principal toxicidad fue la neutropenia.

En Europa hay otro estudio con oxaliplatino usado en combinación con epirubicina y capecitabina. Los pacientes fueron asignados a uno de los siguientes regímenes: ECF (epirubicina/CDADP/ FU), EOF (epirubicina/oxaliplatino/5-FU), ECX (epirubicina/CDADP/capecitabina) y EOX (epirubicina/ oxaliplatino/capecitabina). Las tasas de respuesta fueron del 31%, 33%, 35% y 52%, respectivamente.

Dependiendo del avance de la enfermedad, se ha de individualizar el tratamiento, considerando la necesidad de iniciar tratamiento de quimioterapia ó por el contrario, desechando tal posibilidad y empezar con tratamientos paliativos por el estado avanzado del proceso neoplásico. Lo que sí está claro es que en pacientes en que todavía la quimioterapia puede ser eficaz, la supervivencia será mayor después de su administración y no sólo con los cuidados paliativos.

#### **1.4.1. TRATAMIENTO CON 5-FU**

En el centro donde se lleva a cabo el estudio existe una amplia experiencia en el estudio de quimioterapia adyuvante para cáncer gástrico, primero con mitomicina sólo y después con mitomicina más el derivado de 5-FU, Tegafur.

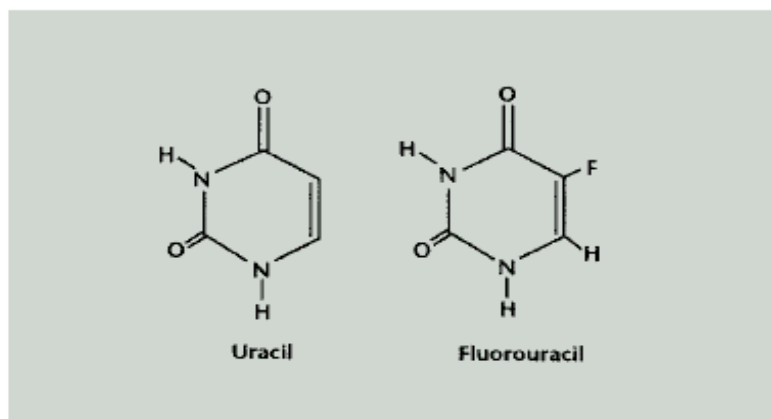
Si bien existen tratamientos estandarizados, ha habido una evolución en cuanto al tratamiento adyuvante así como un perfeccionamiento en las técnicas de cirugía y en la habilidad por parte de los cirujanos. En un estudio que se realizó con 426 pacientes desde 1975 a 2002 y en el que se

dividieron en dos grupos por períodos de tiempo en que se llevó a cabo el tratamiento (antes de 1990 y otro teniendo en cuenta a partir de 1990) se comprobó cómo la supervivencia había aumentado por tratamientos más adecuados y efectivos (gastrectomía parcial y linfadenectomía D1 con ensayos clínicos como quimioterapia adyuvante ó sin tratamiento adyuvante frente a gastrectomía total y linfadenectomía D2 con tratamiento adyuvante a base de 4 ciclos de mitomicina C, 10-20 mg/m<sup>2</sup> iv ó MMC y 500 mg/m<sup>2</sup> de tegafur durante 6 meses). Este hecho se hizo más patente para pacientes en estadio II Y IIIA y pacientes con nódulos linfáticos positivos.

Algunos polimorfismos actúan a nivel de metabolismo del 5-fluorouracilo. Para llegar a entender el mecanismo de intervención y sus consecuencias en la efectividad del tratamiento y posible toxicidad, primero pasaremos a describir las rutas en que participa el 5-FU, para después ver a qué nivel actúan los polimorfismos hallados hasta el momento y, en concreto los que son objeto de nuestro estudio.

### Estructura química

La molécula de 5-FU se trata de una molécula de uracilo en la que en la posición 5 existe un átomo de fluor.



**Estructuras químicas del uracilo y 5-fluorouracilo**

## Mecanismo de acción

Se trata de una pequeña molécula con un  $pK_A$  (8.0) de la que, en principio, se esperaría una buena absorción y biodisponibilidad. Sin embargo, tiene una absorción irregular cuando se administra por vía oral. Los niveles de plasma del FU son bastante impredecibles después de la administración oral con marcadas diferencias inter e intraindividuales debido a la actividad variable del enzima DPYD, especialmente en la mucosa gastrointestinal, por lo tanto, no tan sólo entre diferentes pacientes con la misma dosis sino en un mismo paciente después de la administración de diferentes ciclos de terapia basada en FU. Esta biodisponibilidad se ha visto que puede ir de un 0% a un 80% y que puede estar influida también por los ritmos circadianos.

Las variaciones observadas en el aclaramiento del 5-FU, en la respuesta del tumor y la toxicidad, se puede explicar en parte por diferencias genéticas en las concentraciones de DPYD.

El FU ha llegado a ser uno de los fármacos anticáncer más ampliamente utilizados en diferentes neoplasias tales como las de colon, mama, piel, y cabeza y cuello.

A pesar de la extensa experiencia clínica con FU y su efectiva actividad antitumoral, quedan muchas cuestiones sobre el óptimo uso de este agente, sobre todo en lo referente a la toxicidad de éste, las modestas tasas de respuesta del fármaco sólo, la amplia variabilidad farmacocinética inter/intra-pacientes y los inciertos factores bioquímicos responsables del metabolismo del FU. A lo largo de los años, los investigadores han introducido diferentes métodos para intentar mejorar el índice terapéutico de esta fármaco, incluyendo la modulación con leucovorín y otros agentes y varios esquemas de administración. El mejor entendimiento de la farmacología clínica y bioquímica del 5-FU y otras pirimidinas han facilitado la aparición de nuevas estrategias para conseguir buenos resultados terapéuticos con estos agentes.

El 5-FU está sujeto a anabolismo y catabolismo. La actividad citotóxica del 5-FU depende de su anabolismo, que ejerce sus efectos a través de la inhibición de la actividad de la timidilato sintasa ó la incorporación a RNA y/o DNA. Por catabolismo del 5-FU, éste es enzimáticamente inactivado reduciéndose el anillo de pirimidina a 5,6-dihidrofluorouracilo por el enzima dihidropirimidina dehidrogenasa (DPYD), el enzima inicial y limitante y que, eventualmente resulta en la formación de un metabolito neurotóxico con una larga vida media ( $t_{1/2} = 33$  h), la  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina (FBAL). Se ha demostrado que, aproximadamente el 85% del 5-FU administrado, se degrada a través de la ruta catabólica en el hígado y en tejidos extrahepáticos, mientras que, un 10% se excreta por el riñón. Parece ser que variando las concentraciones de DPYD en humanos se puede

ver afectada la biodisponibilidad del 5-FU y explicar las diferentes respuestas a éste en pacientes con cáncer. Los productos del catabolismo del 5-FU se han asociado a toxicidad del 5-FU, que incluyen neurotoxicidad, al acelerarse su descomposición, y resultando en resistencia a este tratamiento. Se ha demostrado que DPYD no ha mostrado ninguna correlación con factores clínico-patológicos [18].

El mecanismo de acción antitumoral del 5-FU es una consecuencia de la formación del 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) que previene la formación de la deoxitimidina monofosfato (dTMP) a partir de la deoxiuridina monofosfato (dUMP) por inhibición del enzima TS (TS) y, en última instancia, inhibe la síntesis de DNA. Además, el anabolismo del 5-FU a fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) resulta en la incorporación de ese metabolito en el RNA, resultando en la formación de un RNA aberrante. Una vez que el 5-FU se ha catabolizado, es incapaz de ejercer el efecto antitumoral al no estar biodisponible. Las concentraciones de DPYD determinan la cantidad de 5-FU anabolizado a metabolitos activos.

El descubrimiento de la importancia del DPYD en el metabolismo del 5-FU animó a continuar con el estudio de este enzima, resultando en el desarrollo de varios compuestos administrados oralmente que inhiben ó aumentan la actividad de la DPYD. Estos agentes, cuando se combinan con el 5-FU tienen el potencial de incrementar la eficacia de éste y reducir ciertas toxicidades, ofreciendo mayor facilidad de administración, a la vez que pueden ofrecer comodidad y una reducción en el coste.

El FU en el tratamiento anticáncer se administra como tal ó en forma de profármaco, transformándose en la fármaco activa, normalmente una parte en el hígado y en el lugar de acción, que será la que nos interesará para su actividad terapéutica (además de distribuirse a otros tejidos ó eliminarse).

Hasta recientemente, el régimen standard para el tratamiento con FU era 400-600 mg/m<sup>2</sup> administrado por bolus intravenoso (i.v.) una vez a la semana durante seis semanas, ó durante 5 días consecutivos cada 4 ó 5 semanas. Sin embargo, debido a que la  $t_{1/2}$  del FU es baja (de 5 a 20 minutos), las células del tumor están expuestas al principio activo durante un corto tiempo. El desarrollo de mecanismos de acceso venoso y bombas de infusión portables ha permitido la infusión continua de FU durante períodos prolongados, con el objetivo de prolongar la exposición de las células al fármaco y así conseguir una mayor actividad.

La toxicidad de FU es dosis-dependiente. Se han observado toxicidades severas, incluyendo la muerte, en pacientes que eran deficientes en DPYD. Para el régimen en bolus ó después de la

terapia con 5-FU en pacientes deficientes en DPYD, la toxicidad incluyó mielosupresión, mucositis oral y molestias gastrointestinales tales como diarrea, náuseas, vómitos...debido a la fosforilación del FU a FUMP por el enzima OPRT en el tracto digestivo en la vía anabólica. Para pacientes con una deficiencia homocigótica en *DPYD* tienen elevado riesgo de desarrollar toxicidad severa al 5-FU a causa de una marcada reducción en el aclaramiento. La vida media ( $t_{1/2}$ ) del 5-FU en pacientes deficientes en DPYD es larga ( $> 2,5$  h vs 8-22 min.) y estos pacientes excretan hasta un 90% de la dosis por orina. Pacientes con concentraciones de DPYD  $< \text{ó} = 0,1$  nmol/min/mg de proteína parecen estar predispuestos a toxicidad severa del 5-FU y pueden requerir reducción en la dosis de este agente. Para el régimen en infusión continua, las reacciones tóxicas incluyeron el síndrome “hand-foot” (HFS, dolor dérmico en manos y pies) en la mayoría de los casos, y menor toxicidad hematológica y gastrointestinal [19].

Se puede observar también cardiotoxicidad y neurotoxicidad durante el tratamiento con FU (2-5% de los casos), pero los síntomas desaparecen cuando se detiene el tratamiento y la reanudación del tratamiento con dosis más bajas es normalmente bien tolerado.

El tratamiento por infusión continua i.v. presenta, además, ventajas comparado al tratamiento por bolus i.v. con respecto tanto a la tasa de respuesta como a la toxicidad, aunque la supervivencia no es mejor. A pesar de estos beneficios, la naturaleza compleja del tratamiento (la necesidad de bombas de infusión continua), su alto coste y otros riesgos añadidos hacen que sea poco utilizado y el tratamiento convencional sea por bolus i.v.

Para incrementar la actividad del FU, se ha propuesto la utilización de moduladores bioquímicos. Un modulador bioquímico es un agente farmacológico destinado a aumentar el efecto biológico de un determinado fármaco, incrementando selectivamente la acción antitumor ó protegiendo al huésped selectivamente. Un modulador para el FU puede actuar a dos niveles: 1º sobre las vías anabólicas incrementando selectivamente la actividad antitumor, ó, 2º sobre el catabolismo para aumentar la biodisponibilidad del principio activo así como minimizar los efectos tóxicos. Se ha visto que el más eficiente durante el tratamiento con FU es la sal cálcica del ácido folínico, también denominada leucovorín (LV). El LV actúa sobre el anabolismo del FU. Es una fuente intracelular de folatos reducidos que estabiliza el complejo ternario que ellos forman con la TS y el FdUMP, además de incrementar y prolongar la inhibición de TS y así incrementar la eficacia de la fármaco.

Una vez la molécula de 5-FU se encuentra en el lugar de acción (Farmacodinamia), penetra en la célula tumoral, atravesando la membrana celular. En el citoplasma celular, el 5-FU sigue dos

rutas metabólicas: una ruta anabólica, responsable de la formación de los metabolitos activos del 5-FU (20%) y una ruta catabólica, por la que el 80% del 5-FU restante es degradado por enzimas específicos y que es idéntica a la que siguen el uracilo y la timina.

El anabolismo del FU es bastante complejo, con varias reacciones paralelas, idénticas a las vías de novo seguidas por el uracilo [20]. El 5-FU puede seguir tres vías diferentes interconectadas entre ellas: 1) Una de ellas está catalizada inicialmente por la timidina fosforilasa (TP) dando lugar a la 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FdUrd); 2) Una segunda vía, que da lugar a la 5-fluorouridina (FUrd) mediante el enzima uridina fosforilasa, que mediante una uridina-quinasa, da lugar a 5-fluorouridina-5'-monofosfato (FUMP); y 3) Una tercera vía, catalizada por la orotato fosforibosil transferasa (OPRT) que también da lugar al 5-fluorouridina-5'-monofosfato (FUMP) con uso preferencial de esta vía y relacionándose con una sensibilidad mayor a 5-FU en líneas celulares de cáncer humano [21]. Por lo tanto, la vía 2 y 3 desemboca en la formación de una molécula común (FUMP) y a partir de aquí siguen una vía común.

El metabolismo del 5-FU por la timidina fosforilasa (TP) resulta directamente en la producción de deoxiribonucleósido [22]. Sin embargo, una elevada expresión intratumoral de TP ha sido asociada frecuentemente con una falta de respuesta a quimioterapia del 5-FU. La correlación inversa entre la respuesta quimioterápica al 5-FU y la expresión de TP se debe probablemente a dos causas: (1) TP es importante en la angiogénesis y su expresión es elevada en tumores agresivos; (2) La actividad enzimática de TP es reversible y además puede deglicosilar FdU. La actividad de deglicosilación de TP y su elevada expresión en tumores agresivos se utilizó en tratamientos con profármacos para llevar el 5-FU específicamente a las células del tumor. Los profármacos capecitabina y tegafur son dos ejemplos de profármacos disponibles oralmente que requieren TP para su actividad. La TP, además, se ha visto que tiene una alta homología con el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF). Se ha demostrado que está correlacionado con la profundidad en la invasión del tumor y con la invasión venosa y linfática. Siguiendo esta primera vía, a partir del FdUrd, mediante la timidina quinasa, da lugar al 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), un inhibidor de la timidilato sintasa (TS) al formar un complejo ternario FdUMP-timidilato sintasa-folato. La timidilato sintasa es un enzima necesario para la síntesis de DNA, con lo que se detendrá la producción de DNA. *TS* ha sido presentado como un oncogen cuya sobreexpresión causa transformación a fenotipo maligno. Por ello, pacientes con baja expresión del gen *TS* en tumores sobrevivieron durante más tiempo que aquellos que tenían una elevada expresión. *TS* ha mostrado una correlación significativa sólo con la invasión venosa. También



se ha visto que, la inhibición de TS que sigue al tratamiento con 5-FU continúa con inducción de TS. La inducción de TS resulta de una regulación translacional del gen. TS es una proteína de unión al RNA y se une a su propio RNA así como al RNAm de otras proteínas, que incluyen el p53. La unión del metabolito inhibitorio de TS, FdUMP, altera la afinidad de TS por el RNAm y resulta en la expresión elevada de TS.

Siguiendo la cascada común para la vía 2 y 3, por un lado la 5-fluorouridina-5'-monofosfato (FUMP) puede seguir dos fosforilaciones sucesivas. Bajo la acción de la pirimidina monofosfato quinasa, el FUMP se transforma en 5-fluorouridina-5'-difosfato (FUDP) y éste en 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) por el enzima pirimidina difosfato quinasa, que se incorpora en el RNA, en vez del uridina-5'-trifosfato (UTP). El FUTP también se puede conjugar con azúcares dando un complejo bajo la acción de la UDP glucosa (ó N-acetilglucosamina) fosforilasa.

Otra posibilidad es, en vez de seguir la FUMP las dos fosforilaciones sucesivas, que sólo se produzca una, formándose la 5-fluorouridina-5'-difosfato (FUDP). En este punto, la ribonucleótido reductasa dehidroxila la ribosa de este compuesto en posición 2' para dar 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP). FdUDP también se forma por la fosforilación de la FdUMP proveniente de la primera vía por la pirimidina monofosfato quinasa. Todas estas reacciones son reversibles por lo que se darán tanto en un sentido como en el otro. FdUDP puede ser fosforilado a 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) por la pirimidina difosfato quinasa. La FdUTP actúa entonces como un sustrato de DNA polimerasa y puede ser incorporado en el DNA alterando su estructura, poniendo freno al desarrollo del cáncer.

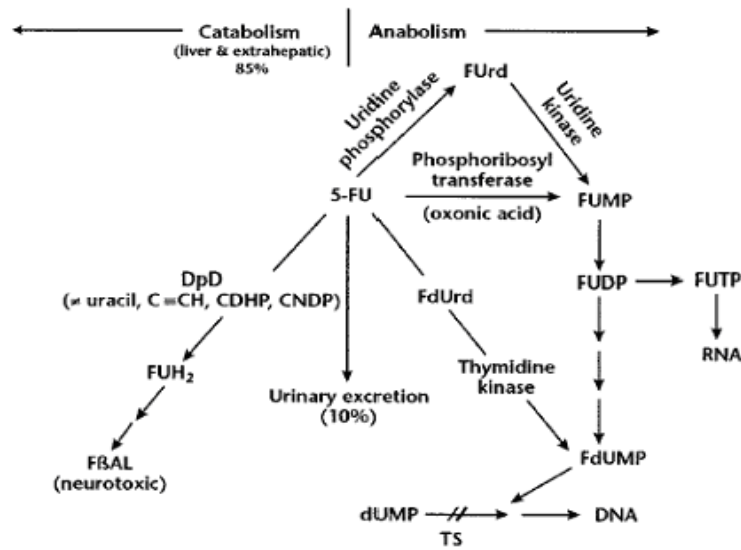
En la cascada de reacciones anabólicas que se producen una vez que ha penetrado el 5-fluorouracilo en la célula, y que provocarán la incorporación al DNA, la incorporación al RNA ó la inhibición de la síntesis de DNA al inhibirse la timidilato sintasa se pueden dar algunos polimorfismos que serán determinantes a la hora de la actuación del fármaco. Uno de los enzimas que puede verse afectado por polimorfismo en uno ó en los dos alelos es la timidina fosforilasa (TP), en la primera reacción que se da en una de las vías anabólicas del FU, que convierte éste en 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FdUrd). Otro de los enzimas que puede verse involucrado en la existencia de estos polimorfismos es la uridin fosforilasa que provoca el paso del Fluorouracilo a 5-fluorouridina (FUrd) en la segunda vía del anabolismo del FU y también el orotato fosforibosil transferasa (OPRT) que da lugar al 5-fluorouridina-5'-monofosfato (FUMP) a partir del FU en la tercera de las vías. La ribonucleótido reductasa también puede sufrir polimorfismo. Este enzima es común para las tres vías y participa en una reacción reversible que forma 5-fluoro-2'-

deoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP) a partir de 5-fluorouridina-5'-difosfato (FUDP) ó viceversa. El último polimorfismo que se ha descubierto hasta el momento en la cascada de reacciones del 5-FU es el que puede darse en el enzima timidilato sintasa (TS), cuya inhibición por el derivado uridínico 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), además, evita la síntesis de novo de DNA.

La existencia de polimorfismos en cualquiera de los genes que codifican para estos enzimas provocará variación de la actividad de éstos, con lo que se estarán bloqueando ó, por contrario, favoreciendo los pasos para la formación de metabolitos activos que actúen sobre la célula tumoral, aunque, al tratarse todas, de reacciones anabólicas reversibles, pueden seguirse otros caminos alternativos para conseguir el objetivo del tratamiento en caso de bloqueo de la vía.

Mediante la ruta catabólica del FU, éste es degradado en un 80% de su concentración. El primer paso de esta degradación ocurre muy rápidamente. Bajo la acción de la dihidropirimidina dehidrogenasa (DPYD) y, en presencia de la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), el FU es reducido a 5,6-dihidro-5-fluorouracilo (FUH<sub>2</sub>). Mediante el enzima dihidropirimidinasas, se produce la hidrólisis del anillo de pirimidina entre las posiciones 3 y 4 para dar el ácido  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -ureidopropiónico (FUPA). Una tercera reacción conduce a la formación de  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina (FBAL), el mayor catabolito del FU, por la liberación concomitante del amoniaco del nitrógeno en posición 3 y dióxido de carbono del carbón 2 del anillo de pirimidina, que puede dar lugar a neurotoxicidad sistémica. La urea se forma por el ciclo de la urea desde el ión amonio (NH<sub>4</sub>) y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

La mayoría de los esquemas catabólicos del FU se detienen en estos metabolitos, aunque recientes estudios usando métodos analíticos más sofisticados han identificado otros catabolitos del FU incluyendo: un ión F<sup>-</sup> de la unión C-F del FBAL mediante una alanina-glioxilato transferasa; el N-carboxil- $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina (CFBAL) derivado de la N-carboxilación de FBAL en presencia de iones bicarbonato (HCO<sub>3</sub>) (esta reacción es un equilibrio); 3 conjugados de FBAL con ácidos biliares mediante la N-acilCoa transferasa y, por último, dos metabolitos de FBAL por transaminación: el ácido 2-fluoro-3-hidroxiopropanoico (FHPA) y fluoroacetato (FAC), se cree que por la acción del enzima alanina transferasa.



**Biotransformación del 5-FU (anabolismo y catabolismo).**  
**C=CH = radical etinil (p.ej. 5-etiniluracilo); CDAHP = 5-cloro-2,4-**  
**dihidroxipiridina; CNDP = 3-ciano-2,6-dihidroxipiridina; DPYD =**  
**dihidropirimidina dehidrogenasa; FβAL = fluoro-β-alanina;**  
**FUH<sub>2</sub> = 5'-6'-dihidrofluorouracilo.**

Por lo tanto, el FU puede actuar 1º incorporándose al RNA de la célula tumoral, 2º inhibiendo la timidilato sintasa con lo que estaremos evitando la formación de nuevo DNA y 3º, incorporándose al DNA de la célula tumoral. También se cree que se produce una alteración de la función de la membrana de las células tratadas con FU debido a una disminución en la síntesis de glicoproteína por la formación de FUDP-azúcares y a su incorporación en las membranas.

1º El átomo de fluor que sustituye el átomo de hidrógeno en la posición 5 del uracilo es de tamaño comparable, y, durante la transcripción, FUTP mimetiza el UTP que es reconocido por la RNA-polimerasa. Esto da lugar a la incorporación de FU en todas las clases de RNA.

2º El FdUMP es un inhibidor de la TS, que está envuelto en la síntesis de DNA. La TS es una diana para los agentes citotóxicos ya que la timidina es el único nucleótido precursor específico de DNA. En presencia del cofactor 5,10-metilentetrahidrofolato (MeTHF), que actúa como un donador de metilos, la TS y el 2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) forman un complejo ternario que permite transferir un grupo metilo sobre el átomo de carbono en posición 5 del dUMP para formar timidina-5'-monofosfato (dTMP). Después de la exposición con FU y la formación adecuada de FdUMP, la transferencia del grupo metilo no se lleva a cabo debido a que el átomo

de fluor en la posición C5 del FdUMP está más fuertemente unido que el átomo de hidrógeno, con lo que la formación de dTMP estará bloqueada, además de disminuir la disponibilidad de la timidina-5'-trifosfato (dTTP) para la replicación y reparación de la molécula de DNA. El stress genotóxico resultante de la inhibición de la TS puede activar vías de muerte celular programadas.

3° El uracilo no es un normal constituyente del DNA y varios enzimas protegen el DNA de incorporar esta pirimidina: por un lado, la deoxiuridina trifosfato pirofosforilasa que hidroliza la 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) en dUMP; y por otro lado, la uracil-DNA-glicosilasa que reconoce y escinde el uracilo del DNA. Se cree que la FdUTP no es reconocida por el primer enzima, con lo que no habrá el paso a FdUMP, pudiéndose producir la incorporación al DNA. Asimismo se piensa que el segundo enzima no reconoce el FU y por lo tanto no lo escindirá de las cadenas de DNA.

No se conoce cual de estas vías predomina en tumores humanos. Es probable que varíe entre diferentes tipos de tumor y con diferentes modos y dosis de administración de fármacos. Hoy día se cree que la exposición prolongada a dosis bajas de FU conduce a la muerte celular sobre todo por el mecanismo dirigido por la TS, mientras que la administración de bolus de FU resulta en el proceso mediado por el RNA de muerte celular.

La actividad del FU está limitada por su rápida degradación a FUH<sub>2</sub> por la acción del enzima citosólico DPYD en un 80%. El resto pasa a formar metabolitos activos por anabolismo.

Se ha visto que existe una variabilidad considerable en la actividad de este enzima entre tejidos normales y del tumor en un mismo paciente y entre diferentes pacientes. La biodisponibilidad de FU, especialmente después de la administración oral, es, además impredecible. En algunos casos, la DPYD posee una fuerte actividad con lo que estará disponible una pequeña cantidad de FU y su eficacia será, consecuentemente baja. Si, por el contrario, la DPYD posee una actividad débil, los niveles de FU serán elevados y puede conducir a toxicidad por sobredosificación.

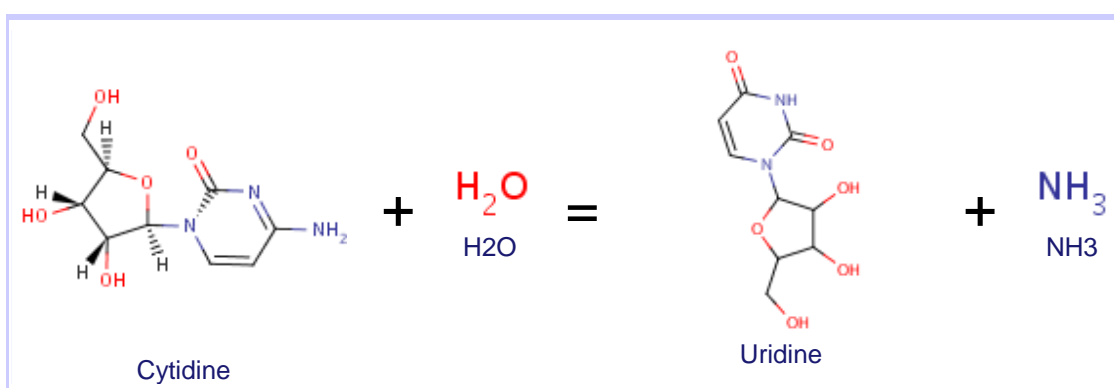
Existen además, otros determinantes de la sensibilidad a FU. Entre éstos, la actividad de enzimas envueltos en el anabolismo del FU (además de polimorfismos que se pueden dar en algunos de los enzimas implicados en alguna de las tres vías: timidina fosforilasa, uridina fosforilasa, orotato fosforil transferasa, ribonucleotido reductasa ó timidilato sintetasa); la disponibilidad de cofactores necesarios para la activación de FU (por ejemplo, el PRPP, cofactor necesario para el paso de FU a FUMP, mediante el enzima orotato fosforibosil transferasa en una de las rutas anabólicas); el nivel de actividad de la TS ó de su expresión; el tamaño de folato reducido intracelu-

lar y endógeno dUMP; la extensión en la incorporación en el RNA y del FdUTP en el DNA y la actividad intratumoral de la DPYD.

Es conocido y ampliamente estudiado el polimorfismo que puede afectar al enzima DPYD, en la primera reacción del catabolismo del FU. Este polimorfismo (se han descubierto para diferentes puntos de la secuencia de DNA. En nuestro trabajo, se han estudiado para dos cambios de base concretos en dos posiciones de la secuencia del gen) provocaría pérdida parcial ó total de la actividad del enzima, con la consecuente reducción ó eliminación de metabolización del enzima y acumulo del fármaco (FU) en el lugar de acción. Esto podría producir una mayor eficacia del fármaco ó exceder los niveles terapéuticos y provocar toxicidad.

### Influencia de la CDA en el tratamiento con 5-FU

Los nucleótidos pirimidínicos son sintetizados ó bien *de novo* ó por vías desde compuestos pirimidínicos preformados [23]. Las vías pirimidínicas realizan dos funciones principales: una de ellas es formar compuestos pirimidínicos para la síntesis de nucleótidos y otra, degradar y conducir a la generación de compuestos que sirven como fuentes de carbono y nitrógeno. La citosina, la citidina y la deoxicitidilato deaminasas pertenecen a la familia de enzimas que deaminan substratos mononucleotídicos y están envueltos en el mantenimiento de los nucleótidos pirimidínicos en la célula. Estos enzimas catalizan la deaminación hidrolítica irreversible de la citosina, citidina y deoxicitidina y algunos de sus análogos útiles terapéuticamente a sus correspondientes derivados uridínicos:



Los residuos citidina/histidina y dos cisteínas intervienen en la unión del zinc en el lugar de acción, un requerimiento para la actividad catalítica, y el residuo de glutamina en el movimiento de los protones durante la catálisis. La familia de enzimas de la CDA tiende a ser un complejo de varias subunidades. Mientras, por ejemplo, el enzima en *E. coli* es un homodímero con dos sitios activos formado por contribuciones desde cada monómero, el enzima CDA humano forma un homotetrámero con subunidades de 16,2 kDa, cada una con un sitio activo. Se ha encontrado este enzima similar a la CDA humana en el *Bacillus subtilis* de 58 kDa, con estructura de homotetrámero con cuatro subunidades idénticas de 14 kDa.

Además, este enzima tetramérico consiste en dos tipos de subunidades, M y H, que se pueden combinar para dar 5 isoenzimas diferentes: M<sub>4</sub>; M<sub>3</sub>H<sub>1</sub>; M<sub>2</sub>H<sub>2</sub>; M<sub>1</sub>H<sub>3</sub>; H<sub>4</sub> [24].

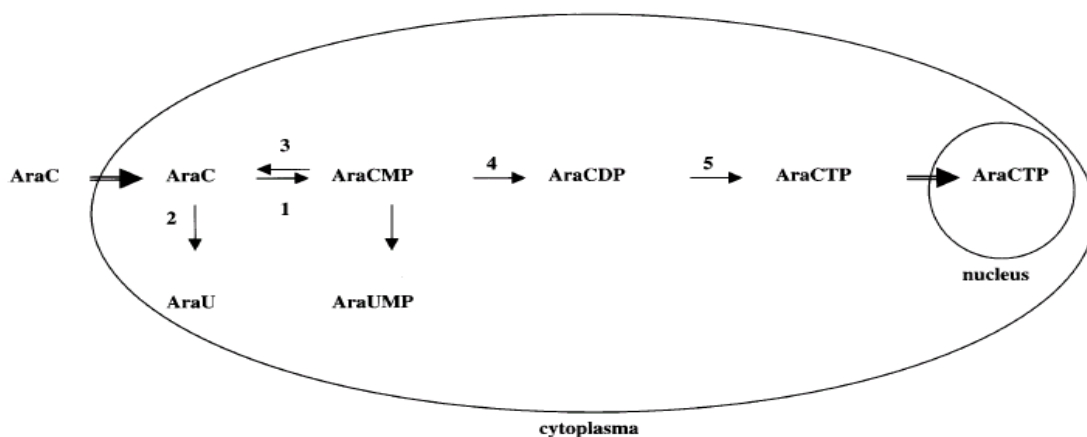
El gen que codifica para la CDA se encuentra en el cromosoma 1p36.2-p35, tiene una longitud de 31 kb y consta de cuatro exones. Contiene 438 pares de bases que codifican para un polipéptido de 146 aminoácidos con una masa molecular de 16,2 kDa. Las uniones entre exón e intrón no soportan dominios funcionales para la proteína a la que codifican, y la unión entre los exones 2 y 3 interrumpe el dominio donde se encuentra el zinc, importante para la actividad catalítica del enzima. La región 5' del gen contiene un promotor dependiente de la orientación y se caracteriza por la presencia de lugares de unión de factores de transcripción. Todos los intrones comienzan con GT y acaban con AG. Existe un largo intrón que supone casi la mitad de la longitud del gen y que separa el exón 1 del 2. El exón 4 codifica para la región terminal carboxílica de la proteína y para la región 3' del correspondiente mRNA. Los aminoácidos importantes para la función catalítica se encuentran entre el exón 1, 2 y 3.

Se ha sugerido que la expresión del CDA puede ser atribuible a la regulación en el nivel transcripcional. El promotor proximal del gen *CDA* contiene sitios de unión para diferentes factores de transcripción que regulan la expresión del CDA in vivo y que tienen actividad en el promotor in vitro.

El enzima resultante cataliza la deaminación de la citidina y deoxicidina a uridina y deoxiuridina, respectivamente. Además cataliza la deaminación de los análogos de citosina, agentes antineoplásicos para el tratamiento de la leucemia, lo que da lugar a una pérdida de su función citotóxica y anti-tumor (resistencia al tratamiento). La actividad antileucémica depende de la fosforilación por la deoxicidina quinasa del agente antineoplásico. De hecho, lo que hace la CDA es deaminar e inactivar la 1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Ara-C) y la 5-aza-2'-deoxicidina (Aza deoxi-C), que son dos agentes anticáncer usados muy habitualmente contra la leucemia. Por lo que niveles elevados del enzima están implicados en mecanismos de resistencia de la célula leucémica a Ara-C. Ocurre de

forma similar para individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (SIDA) que presentan resistencia a los análogos de citosina. La manera de solucionar este problema es administrando inhibidores de la CDA.

El Ara-C biodisponible y que no ha sido degradado por el enzima CDA, no puede ser incorporado en el DNA en su forma nativa. Como indica el siguiente esquema, y siguiendo el transporte intracelular, la molécula de Ara-C se convierte en el compuesto activo citosina arabinósido trifosfato (ara-CTP) y transportado dentro del núcleo donde compete con el dCTP, molécula que participa en la síntesis de DNA, con lo que esta síntesis se ve frenada y con ello la progresión de la leucemia. Las células no malignas se ha visto que están protegidas de los efectos de Ara-C a través de la transferencia viral de CDA en estas células, que es el efecto que queremos evitar en las células malignas para evitar la resistencia a estos derivados por metabolización de éstos y paso a metabolitos inactivos frente a la patología.



**Metabolismo celular de araC. AraC es transportado al citoplasma y fosforilado a los nucleótidos activos. El agente es también deaminado a los metabolitos inactivos. 1. Deoxicitidina deaminasa. 2. citidina deaminasa. 3. 5' nucleotidasa. 4. deoxicitidilato quinasa. 5. nucleótido difosfato quinasa.**

Se ha estandarizado que una unidad del enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la deaminación de 1  $\mu\text{mol}$  de citidina por minuto a 37°C.

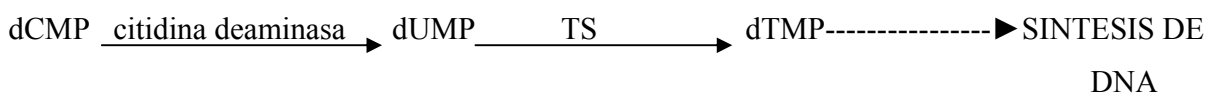
Los niveles más elevados para la actividad enzimática del CDA se encuentran en el bazo, el hígado, la placenta, la mucosa del intestino grueso y en el pulmón. Para la actividad del enzima, se requiere zinc que se cree, juega un papel esencial en la catálisis uniendo y activando una molécula de

agua. Además se piensa que se encuentra bajo la forma de un tetrámero con cuatro subunidades idénticas de aproximadamente 16 kDa cada una [25].

Una de las funciones que podría desempeñar la CDA, es la de ser utilizada en terapia contra el cáncer para proteger las células normales contra los efectos citotóxicos de los análogos de citosina. Se ha visto que la CDA juega un papel importante en el metabolismo análogos nucleosídicos citosínicos antitumorales y antivirales que conducen a su inactivación farmacológica. La deaminación del arabinósido de citosina, uno de los agentes quimioterápicos más útiles usados en el tratamiento del cáncer, da lugar a una pérdida importante de actividad antineoplásica.

Las CDAs están ampliamente distribuidas en los tejidos eucariotas. Se encuentran bajo control alostérico y transcripcional. Se ha demostrado la inducción de la transcripción en respuesta a la diferenciación y al tratamiento con vitamina D<sub>3</sub> e interferón  $\gamma$ . Se ha sugerido un papel importante de la deoxicidilato (dCMPD) en la replicación del DNA por varias observaciones en que se ha visto alta actividad en tejidos con elevada división, y en particular en la fase S de la mitosis. La dCMP deaminasa es el mayor abastecedor de dUMP para la TS. Por analogía, la CDA puede ser importante en proveer sustrato para la biosíntesis de RNA. Además, la CDA humana (HCDA) es un potente inhibidor de crecimiento de las células formadoras de colonias de macrófagos.

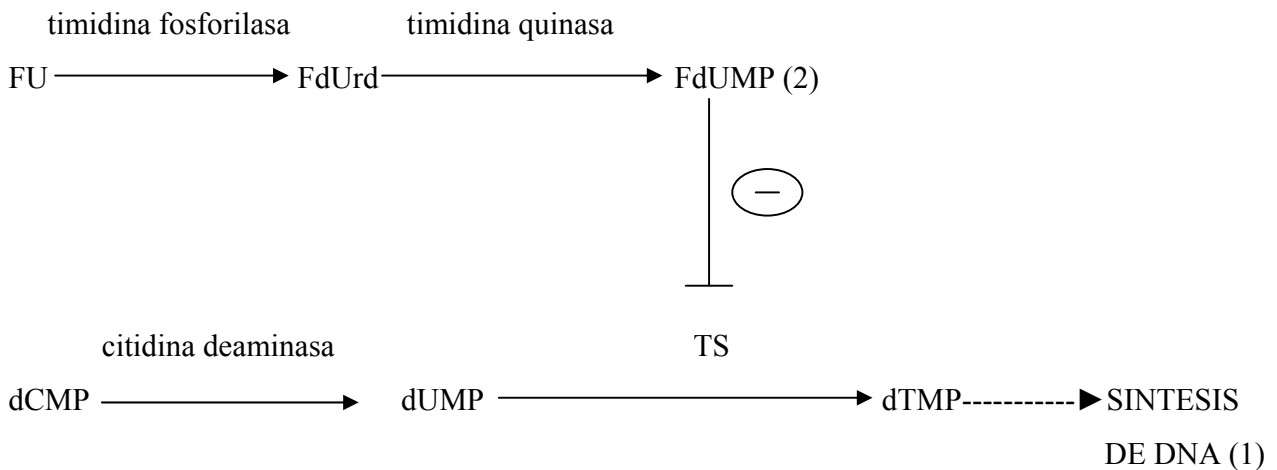
Una de las funciones descritas importantes de la CDA, hemos comentado, es la de abastecer deoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) para la TS. Lo que hace es convertir el derivado citidínico deoxicitidina 5'-monofosfato (dCMP) en el derivado uridínico dUMP, sustrato de la TS, que mediante este enzima lo transforma en deoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP), necesario para la síntesis de DNA. Por lo tanto, las implicaciones pronósticas en la expresión de la TS se puede atribuir al hecho que está asociada con la proliferación celular (síntesis de DNA), ocurriendo su máxima expresión durante la fase S del ciclo celular [26]:



El 5-FU con que se ha tratado a los pacientes que presentan cáncer gástrico y que son objeto de nuestro estudio actúa a diferentes niveles. Uno de ellos sería inhibiendo la TS. Con esta inhibición se estará evitando la transformación del dUMP en dTMP y, por lo tanto la síntesis del DNA, en este

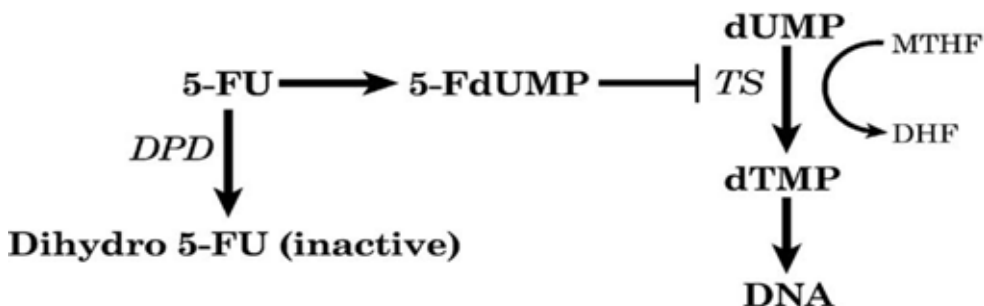


caso tumoral. De esta manera estaremos consiguiendo frenar en cierta medida la progresión del cáncer. A este hecho se puede unir que exista polimorfismo en el gen TS, que también impedirá que se produzca este paso además de la inhibición por el FU:

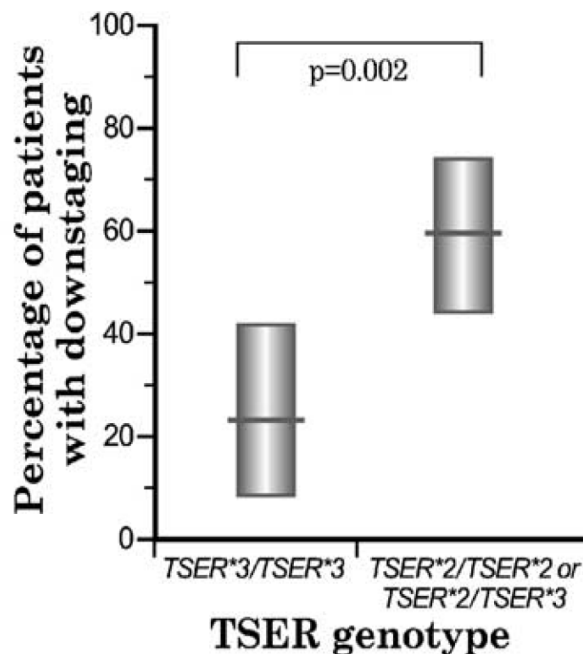


FU, 5-fluorouracilo; FdUrd, 5-fluorodeoxiuridina; FdUMP, 5-fluorodeoxiuridina 5'-monofosfato; dCMP, deoxicitidina 5'-monofosfato; dUMP, deoxiuridina 5'-monofosfato; dTMP, deoxitimidina 5'-monofosfato.

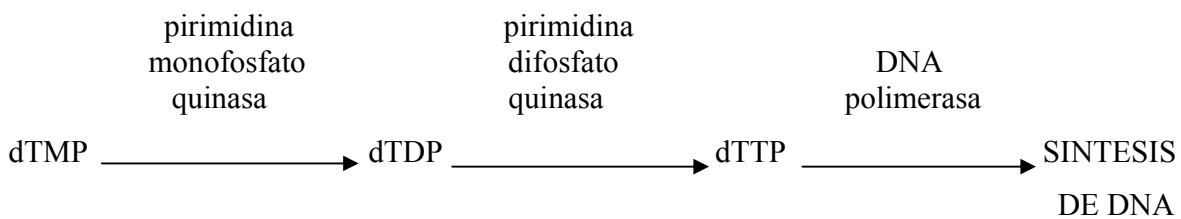
La inhibición de la TS en la transformación de la molécula de dUMP en dTMP por el FU da lugar a acumulación de dUMP y de dUrd celular y extracelular. Al estar disminuida la producción de dTMP, también lo estará la de dTTP y, por lo tanto, de la molécula de DNA. También se ha visto un efecto sobre la molécula de dCTP, con una disminución en su concentración.



Una de las enzimas claves para la síntesis de DNA es la TS. Polimorfismos en el gen que codifica para la TS también han demostrado influir en la respuesta al tratamiento con 5- FU [27]. Varios estudios han demostrado que, tanto el mRNA TS como los niveles de proteína están inversamente relacionados con la respuesta antitumoral (para niveles elevados de TS, tanto su RNAm como el enzima resultante de la traducción responsable de una de las reacciones intermedias que darán lugar a la síntesis de DNA, estarán relacionados con un peor pronóstico de la enfermedad y con peor respuesta al tratamiento) así como la supervivencia en pacientes con cáncer colorectal avanzado siendo inferior si la expresión de TS es elevada. La expresión de TS está controlada por un polimorfismo. Este polimorfismo se caracteriza por un número determinado de “tandem repeats” de una secuencia de 28 pares de bases en la región 5’ del promotor del gen (*TSER*). Se han descrito alelos conteniendo dos, tres, cuatro, cinco y nueve copias de la secuencia repetida (*TSER*\*2, *TSER*\*3, *TSER*\*4, *TSER*\*5 y *TSER*\*9) siendo predominantes aquellos con *TSER*\*2 y *TSER*\*3. Se ha visto que, a medida que aumenta el número de repeats aumentan los niveles de TS mRNA y la expresión de la proteína. Por lo tanto, pacientes homocigotos para *TSER*\*3 tendrán mayor actividad TS, peor pronóstico y una peor respuesta al tratamiento con 5-FU que pacientes homocigotos para *TSER*\*2.



(1) Una vez se tiene la molécula de deoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP), mediante varias reacciones se puede llegar a sintetizar DNA. El dTMP mediante la pirimidina monofosfato quinasa se transforma en 2'-deoxitimidina-5'-difosfato (dTDP), que, gracias a la pirimidina difosfato quinasa se convierte en 2'-deoxitimidina-5'-trifosfato (dTTP). El dTTP es necesario para la síntesis de DNA. La DNA polimerasa es la enzima encargada de sintetizar DNA a partir del dTTP:



Esta deoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP) puede ser sintetizada “de novo” a partir de la timidina (ó deoxitimidina en este caso) mediante la reacción de la timidina quinasa ó en la reacción de la TS por metilación del dUMP. Se ha visto que, además del abastecimiento de dUMP a través de la dCMP deaminasa a partir del dCMP, hay otras dos maneras de producir dUMP que son inhibidas por dTTP (podrán ser deducidas por los esquemas reproducidos a continuación): 1° mediante la fosforilación de la deoxiuridina (dUrd), catalizada por la timidina quinasa e inhibida por la dTTP (uracilo ↔ dUrd ↔ dUMP, la primera de las reacciones catalizada por la timidina fosforilasa) y 2°, mediante la reducción de la uridina-5'-difosfato (UDP) a 2'-deoxiuridina-5'-difosfato (dUDP) por la ribonucleótido reductasa y que, también es inhibida por el dTTP.

La mayor consecuencia de la elevada concentración de dTTP producido a partir del dUMP por cualquiera de las tres vías citadas con anterioridad, es el efecto inhibitorio que ejerce éste sobre la dCMP deaminasa.

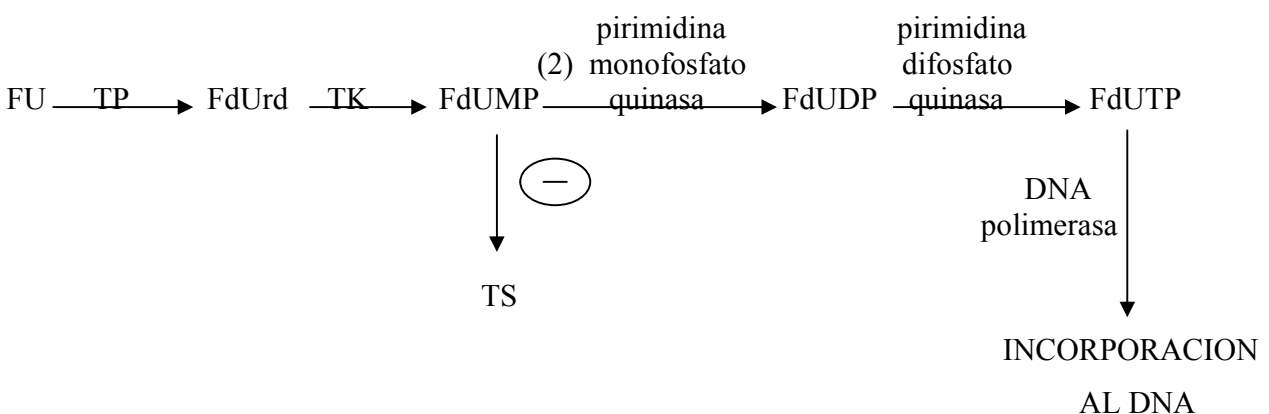
La vía de producción de dUMP en que participa el enzima deoxicitidina deaminasa (dCMP) (CDAP → dCDAP → dCMP → dUMP) puede ser inhibida por el dTTP en dos sitios diferentes : en la reacción de la ribonucleótido reductasa (CDAP reductasa) por la que se produce la reducción del compuesto citidínico (CDAP) al compuesto deoxicitidínico (dCDAP), que, en el caso de *Escherichia coli* requiere la presencia de ATP ,y, puede además ser inhibida en la reacción de la deoxicitidilato deaminasa por la que el derivado citidínico (dCMP) se transforma en el derivado uridínico (dUMP).

Hay evidencia que la producción de dUMP a través de la reacción en que participa la deoxicitidina deaminasa (dCMP) es la más importante cuantitativamente.

La actividad de la dCMP deaminasa es muy elevada en tejidos con elevada tasa de crecimiento como pueden ser los tumores. La elevada tasa de actividad de este enzima desembocaría en la producción de dUMP, y en la cascada de reacciones que darían como resultado la síntesis de DNA, que estaría amplificada y que puede ser uno de los responsables del crecimiento incontrolado de estas células. Además, se ha podido comprobar que la CDAP reductasa es sobre unas cinco veces más activa que la UDP reductasa.

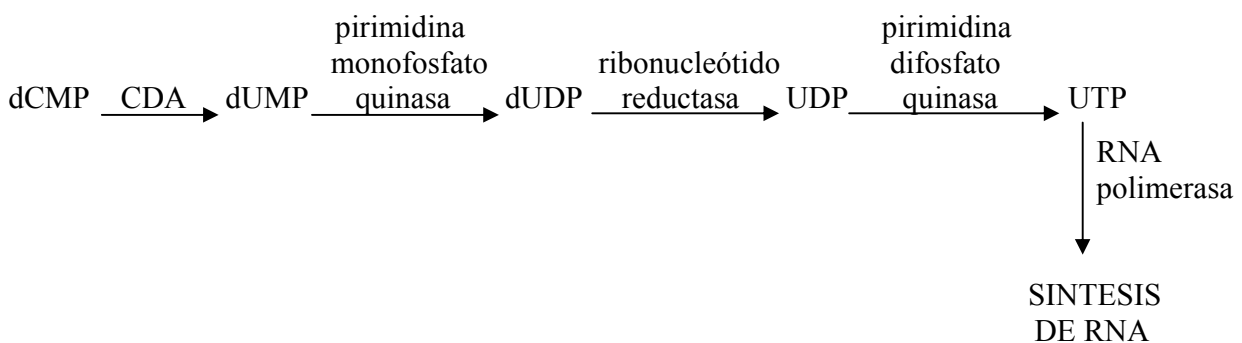
Además se ha visto que la dCMP deaminasa se veía inhibida por la dTTP, molécula precursora de la síntesis de DNA, más fuertemente de lo que lo estaba la timidina quinasa ó la CDAP reductasa por esta misma molécula (dTTP). Sin embargo, la TS no fue inhibida por dTTP, pero era regulada indirectamente por la disponibilidad del sustrato del enzima, dUMP. Si se provocaba la inhibición de la TS, se producía acumulación de dUMP. Y, por último, en este estudio se vio que la acumulación de la molécula de dUMP causó débil inhibición de la deoxicitidilato deaminasa (dCMP).

(2) El FU, además de actuar inhibiendo la TS, tiene otro nivel de actuación incorporándose al DNA frenando la progresión de la enfermedad. El 5-fluorodeoxiuridina 5'-monofosfato (FdUMP), mediante la pirimidina monofosfato quinasa (uridina monofosfato quinasa), se transforma en 5-fluorodeoxiuridina 5'-difosfato (FdUDP), que, a su vez, mediante la pirimidina difosfato quinasa (uridina difosfato quinasa) pasa a 5-fluorodeoxiuridina 5'-trifosfato (FdUTP). El FdUTP, mediante la DNA polimerasa se incorpora a la molécula de DNA:



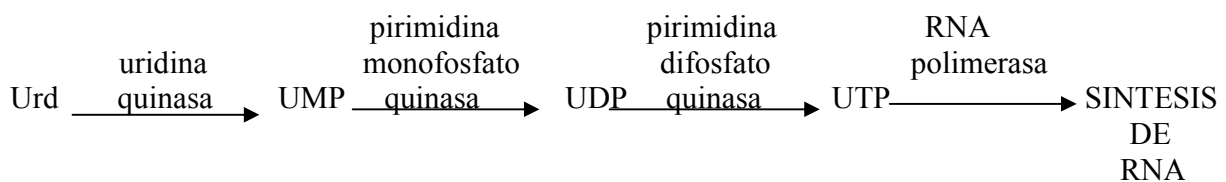
El uracilo no es un normal constituyente del DNA y varios enzimas protegen el DNA de incorporar esta pirimidina: por un lado, la deoxiuridina trifosfato pirofosforilasa que hidroliza la 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) en dUMP; y por otro lado, la uracil-DNA glicosilasa que reconoce y escinde el uracilo del DNA. Se cree que la FdUTP no es reconocida por el primer enzima, con lo que no habrá el paso a FdUMP, pudiéndose producir la incorporación al DNA. Asimismo se piensa que el segundo enzima no reconoce el FU y por lo tanto no lo escindir  de las cadenas de DNA.

De la misma manera, además de abastecer dUMP para la síntesis de DNA, siguiendo otra cascada de reacciones, puede provocar la síntesis de RNA. Por analogía a lo anteriormente comentado, la citidina 5'-monofosfato (CMP), mediante la CDA, se convierte en uridina 5'-monofosfato (UMP), una de las moléculas intermedias para sintetizar UTP necesario para la síntesis de RNA por mediación del enzima RNA polimerasa. Para la síntesis de DNA, por mediación de la TS, el derivado uridínico pasaba a derivado timid nico, y en concreto a deoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP). Aquí, para la síntesis de RNA, este paso no es necesario, ya que en la molécula de RNA sí puede existir el uracilo como base complementaria de la adenina (A) (en la molécula de DNA, el uracilo es sustituido por la timina (T)). En cualquier punto de la vía, el compuesto desoxirribosa puede convertirse en ribos dico y continuar el proceso, necesario para la síntesis de RNA (dUMP, dUDP   dUTP en UMP, UDP   UTP) mediante una ribonucleótido reductasa. El dUMP, mediante una pirimidina monofosfato quinasa (en este caso se tratar a de una uridina monofosfato quinasa), se transformar a en 2'-deoxiuridina-5'-difosfato (dUDP). El enzima ribonucleótido reductasa se encargar a de reducir el derivado deoxirribos dico dUDP en derivado ribos dico uridina-5'-difosfato (UDP). El UDP se convierte en uridina-5'-trifosfato (UTP) mediante una pirimidina difosfato quinasa (uridina difosfato quinasa), que, a través de una RNA polimerasa, se producir a la síntesis de RNA:

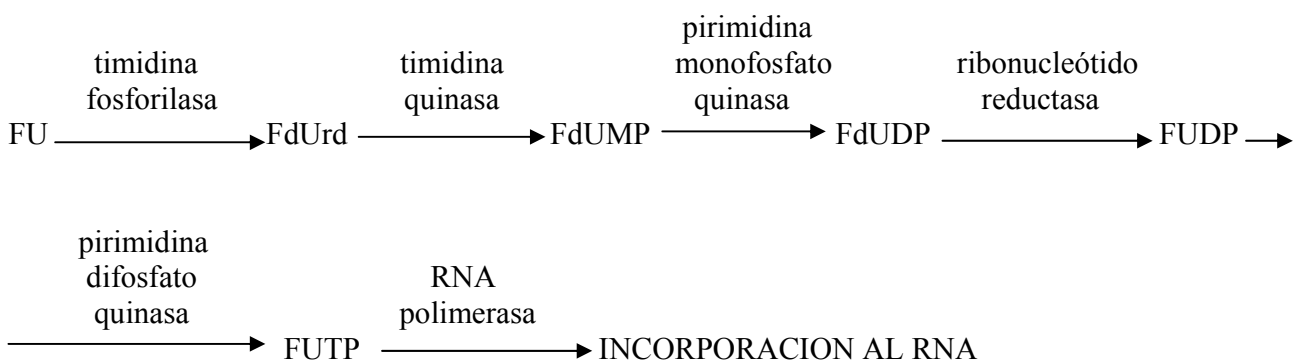


Otro proceso posible para la síntesis de RNA, es a través del uridina y no deoxiuridina como anteriormente se ha descrito. La uridina (Urd), previa transformación de la citidina en ésta (mediante el enzima citidina deaminasa), mediante la uridina quinasa, se transforma en uridina-5'-monofosfato (UMP). A la UMP se le une una molécula de fosfato y se convierte en uridina-5'-difosfato (UDP) mediante la pirimidina monofosfato quinasa (en concreto, la uridina monofosfato quinasa), que a su vez, este UDP, mediante la pirimidina difosfato quinasa (uridina difosfato quinasa), se transforma en uridina-5'-trifosfato (UTP).

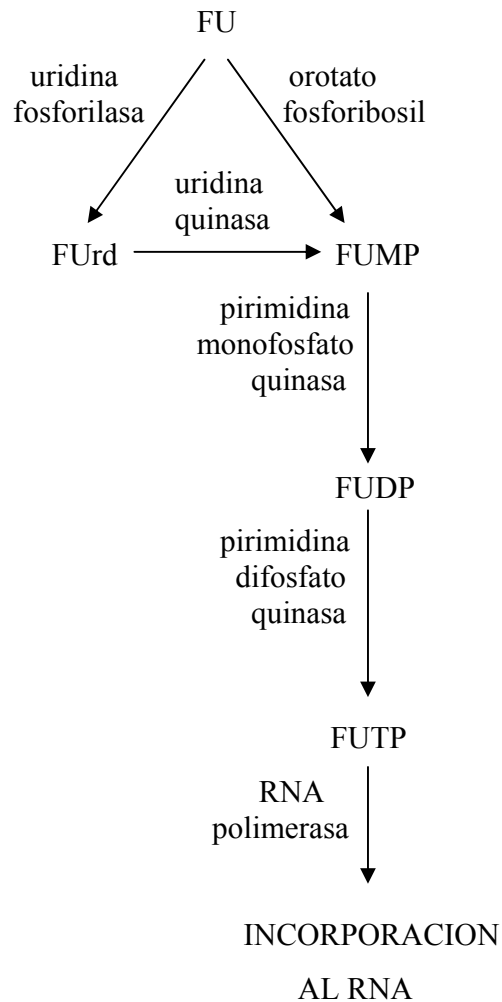
El UTP ya está en disposición de dar lugar a la síntesis de RNA gracias a la colaboración de la RNA polimerasa:



Cuando se trata a los pacientes con FU, éste se puede incorporar en la molécula de RNA. Por la primera de las posibilidades anteriormente descritas, el FdUMP, previa pérdida del grupo deoxi en la posición 2 del anillo, se incorpora en la molécula de RNA en forma de FUTP. El átomo de fluor que sustituye el átomo de hidrógeno en la posición 5 del uracilo es de tamaño comparable, y, durante la transcripción, FUTP mimetiza el UTP que es reconocido por la RNA-polimerasa. Esto da lugar a la incorporación de FU en todas las clases de RNA:

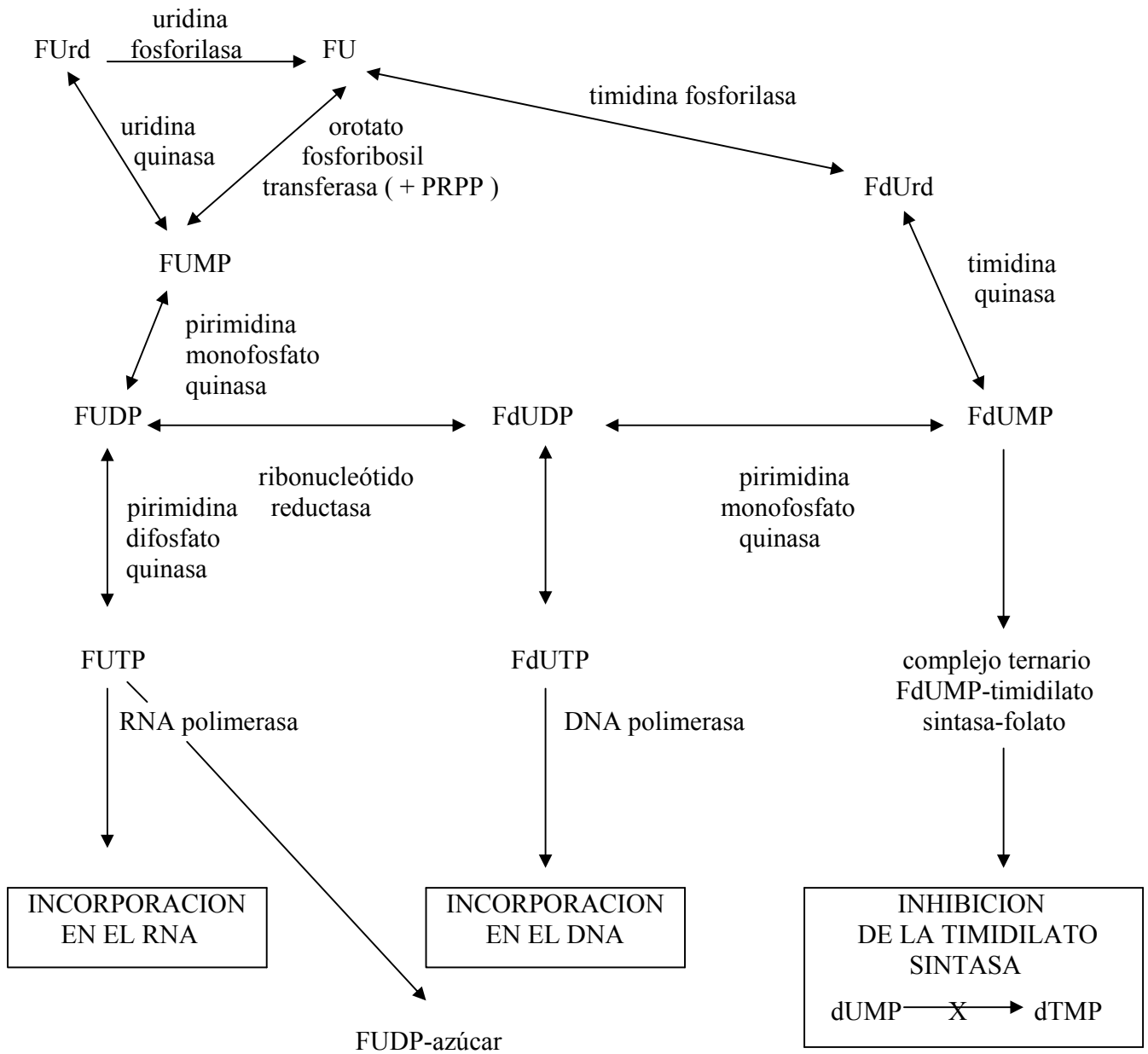


En la segunda de las posibilidades, el FU se convierte en FUMP, para llegar a formar FUTP que es reconocido por la RNA polimerasa y es incorporado en la molécula de RNA:



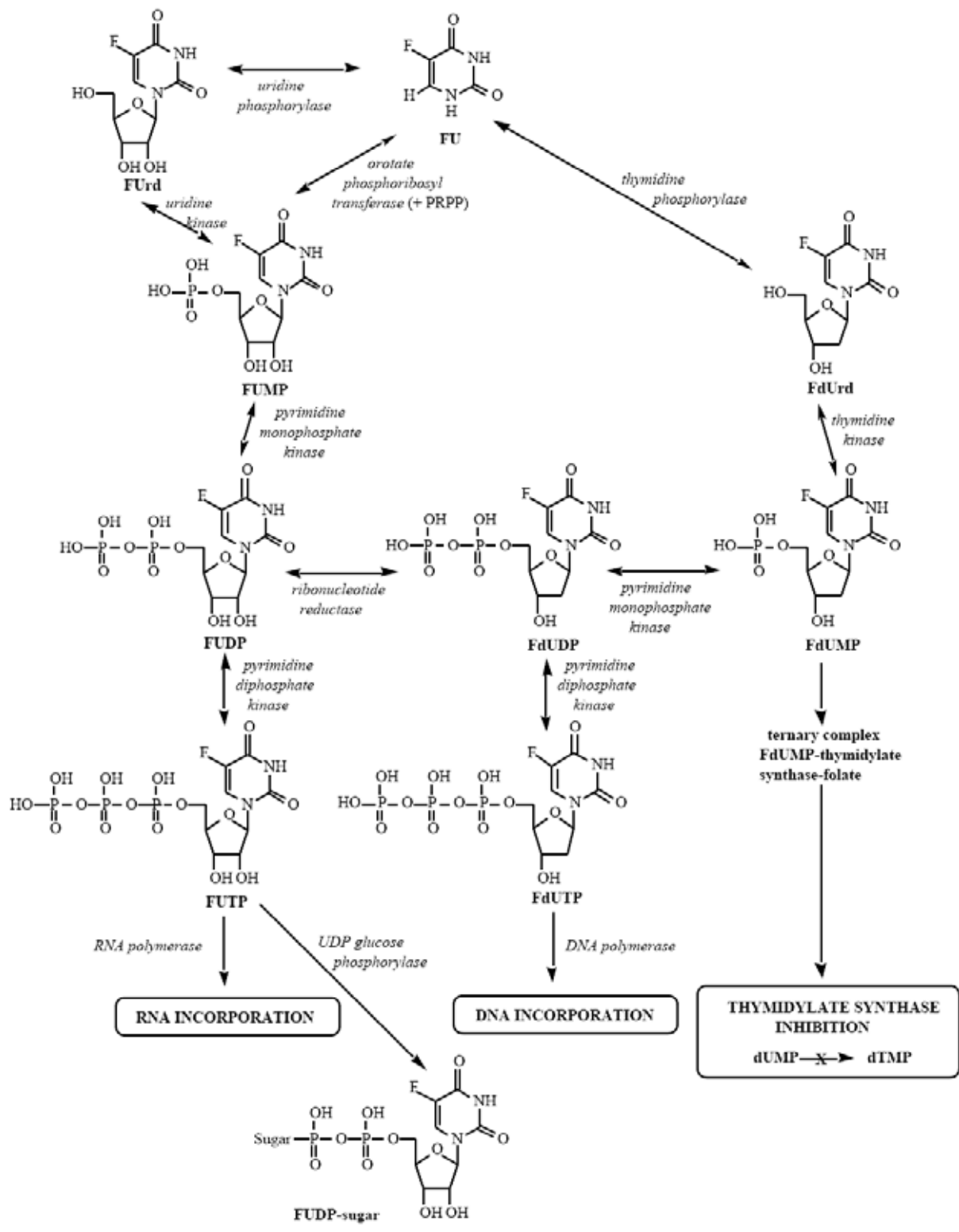
Además de la incorporación al RNA mediante el enzima RNA polimerasa, el FUTP se puede conjugar a azúcares dando lugar a azúcares FU-nucleótidos (FUDP-azúcares) bajo la acción de la UDP glucosa (ó N-acetilglucosamina) pirofosforilasa.

Todo lo descrito anteriormente se puede resumir en el siguiente esquema:



FU, 5-fluorouracil; FUrd, 5-fluorouridina; FUMP, 5-fluorouridina-5'-monofosfato; FUDP, 5-fluorouridina-5'-difosfato; FUTP, 5-fluorouridina-5'-trifosfato; FdUrd, 5-fluoro-2'-deoxiuridina; FdUMP, 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato, FdUDP, 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-difosfato; FdUTP, 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato; PRPP, 5'-fosforibosil-1-pirofosfato.





En la cascada de reacciones que tienen lugar hasta la incorporación del FU en la cadena de DNA, en la cadena de RNA ó bien hasta la inhibición del enzima TS, pueden existir polimorfismos a diferentes niveles. Estas variaciones en el genotipo del gen codificante para el enzima responsable de una determinada reacción pueden provocar variaciones de la actividad de dicho enzima que, en algunos casos, puede desembocar en la ineficacia del tratamiento con 5-FU (en determinados genes, la existencia de un polimorfismo puede suponer un aumento en la actividad del enzima). En realidad, la pérdida de la actividad del enzima puede no siempre comportar la ineficacia del tratamiento ya que existen vías alternativas que pueden desembocar en la función esperada, aunque la eficacia puede ser menor.

Uno de los enzimas que puede ser objeto de polimorfismo es la uridina fosforilasa que convierte el FU en FUrd (Ver esquema anterior). El hecho de ser homocigoto para el polimorfismo puede suponer la pérdida de la actividad del enzima, pero este hecho no se ha estudiado. Sin embargo, si así fuese, se puede llegar a la formación del FUMP a través de otro enzima, el OPRT. Pero, a nivel del orotato fosforibosil transferasa, también se puede dar polimorfismo. En este caso puede no producirse ó sólo parcialmente el paso de FU a FUMP, aunque se pueden dar vías alternativas, como la anteriormente mencionada ó bien la que comporta la transformación del FU en FdUrd mediante la timidina fosforilasa. También se podría dar una actividad aumentada del enzima. Pero la timidina fosforilasa también puede sufrir polimorfismo. A medida que se produzcan mayor número de polimorfismos a nivel de cualquiera de los tres anteriormente citados enzimas, la posibilidad de actuación del 5-FU será el resultado de la suma de los distintos efectos que provocan los polimorfismos sobre cada uno de éstos (uridina fosforilasa, orotato fosforibosil transferasa y timidina fosforilasa). Otro polimorfismo a destacar se da en el enzima ribonucleótido reductasa, que convierte el FdUDP en FUDP y viceversa. Polimorfismos a este nivel pueden dar lugar que esta conversión se produzca en mayor ó menor medida. Si partimos del FUDP, la existencia del polimorfismo supondrá variación en el paso a FdUDP y, por lo tanto, que haya mayor ó menor incorporación del FU en la molécula de DNA. Si no se produjese esta incorporación se habrá de conseguir por la vía en la que el FU pasa a FUrd por la timidina fosforilasa... Si, por el contrario, partimos del FdUDP, y existe este polimorfismo, habrá variación en la incorporación del FU en la molécula de RNA. Si no se incorporara el FU en la molécula de RNA, también se habrá de buscar una vía alternativa para que se produjese, en concreto aquella que transforma el FU en FUMP... Por último, otro enzima sobre el que se ha descubierto que puede existir polimorfismo, es sobre la TS, que, además, se encuentra ampliamente estudiado. Se pueden dar diferentes polimorfismos dependiendo del número de “tandem repeats” en una

determinada secuencia de 28 pares de bases en la región 5' del promotor del gen (2, 3, 4, 5 ó 9, siendo predominantes 2 ó 3). A mayor número de repeticiones en la secuencia, habrá una mayor expresión de la proteína y mayor actividad produciéndose un aumento en la síntesis de DNA. Si supone una disminución en la actividad, este efecto se verá aumentado con la inhibición propia que provoca el FU sobre el enzima TS, que vendrá a inhibir la acción de éste. El 5-FU se relaciona indirectamente con la CDA a través de la timidilato sintetasa. El 5-FU se ha visto inhibe la TS. La TS necesita del substrato que le provee la CDA (dUMP) para que se produzca la síntesis de DNA. Mediante la inhibición de la TS, se produce se produce la inhibición en la síntesis de DNA, con lo que estaremos frenando la síntesis de DNA tumoral y por lo tanto, el cáncer.

En ambos casos, tanto en la síntesis de DNA como en la síntesis de RNA, el enzima CDA ha convertido el derivado citidínico en derivado uridínico, necesario para las posteriores reacciones.

Es lógico pensar que elevada expresión de citidina deaminasa aumentará la síntesis de DNA y RNA, en este caso tumoral, que conllevará un peor pronóstico de la enfermedad.

El 5-FU actuará a nivel de inhibición de la TS, y por analogía a las reacciones llevadas a cabo por el uracilo, el 5-FU, además, se incorporará al DNA engañando a la DNA polimerasa ya que el uracilo es una base que no es propia de la cadena de DNA, y además, se incorporará al RNA.

La CDA existe en forma de dos variantes: CDA1 y CDA2, con una sustitución de un aminoácido en el codón 27: CDA1 lleva un residuo de glutamina (Gln) y CDA2 un residuo de lisina (Lys), y parece no ser importante en la actividad del enzima. CDA2 tiene menor migración electroforética que CDA1 [28].

Respecto a la relación que puede existir entre la expresión de CDA y cáncer gástrico, se ha investigado (John Wiley & Sons, Ltd, 2002) que CDA1 se expresó en todos los lugares donde existía metaplasia intestinal (IM), y en el 41% de los carcinomas gástricos; en el caso de CDA2 se expresó en 17/18 lugares con metaplasia y en el 54% de los cánceres gástricos.

Un punto de acción del enzima citidina deaminasa es la transformación de la profármaco capecitabina (Xeloda) en su metabolito activo (5-FU) después de su administración en pacientes con cáncer gástrico. La capecitabina (N<sup>4</sup>-pentiloxicarbonilo-5'-deoxi-5-fluorocitidina), una vez en el hígado, se transforma, mediante el enzima carboxilesterasa, en el 5'dFCR (5'-deoxi-5-fluorocitidina), que, mediante la citidina deaminasa (CDA)-que tiene su lugar de acción tanto en hígado como en el propio tumor-pasa a 5'dFUrd (5'-deoxi-5-fluorouridina). El 5'dFUrd en el tumor (también actúa a nivel del hígado), gracias al enzima timidina fosforilasa, pasa a FU, que será el metabolito activo. Por lo tanto, personas que no dispongan de uno de estos enzimas ó tengan reducida su expresión, impedirán el

paso a FU, con lo que no habrá respuesta al tratamiento. Uno de los motivos de esta pérdida de actividad puede estar en la existencia de polimorfismos para cualquiera de ellos. En nuestro estudio se ha estudiado en concreto un polimorfismo que puede afectar al enzima citidina deaminasa. En teoría, pacientes con este polimorfismo, si éste provocara disminución de la expresión de la proteína ó diese como resultado una proteína con actividad reducida, deberían tener menor ó ninguna acción, por lo tanto, no serían capaces de convertir el profármaco capecitabina en su metabolito activo, 5-FU, con la imposibilidad de que éste actuase. Por tanto, no existiría respuesta a este tratamiento. Si de antemano, hubiéramos sabido de la existencia de este polimorfismo, hubiéramos prescindido desde el inicio de este tratamiento con el correspondiente ahorro de tiempo, y nos habríamos dirigido hacia aquel que el paciente sabemos que responde. Sin embargo, se ha visto que el hecho de presentar el polimorfismo, no varía en gran medida la actividad del enzima y su expresión se encuentra aproximadamente en la misma proporción en cáncer gástrico tanto si se trata de uno u otro genotipo (tanto se tiene el polimorfismo como si no).

Otro profármaco del 5-FU es el ftorafur. Este profármaco necesita de un enzima de la familia del citocromo P450, en concreto, el CYP2A6 para ser metabolizado. Este enzima metabólico es predominantemente hepático. Tiene como sustratos, la nicotina ó la cumarina y ningún fármaco anticáncer, a excepción de la conversión del ftorafur en fluorouracilo. Por lo tanto, polimorfismos ó deficiencias en este enzima, harán que el profármaco no se convierta en el metabolito activo y por lo tanto el 5-FU no sea efectivo como tratamiento. Ó, por el contrario, si el citocromo tiene genotipo wild-type, pasará todo el profármaco a fármaco activo y el tratamiento es efectivo. Esta circunstancia, unido al hecho de tener algún otro polimorfismo que provoque acúmulo de FU, como por ejemplo, tener un polimorfismo que reduzca la actividad del enzima DPYD, podría provocar toxicidad y mermar la seguridad del fármaco, aunque todo son suposiciones y se habría de disponer de un número suficiente de pacientes para hacer este estudio.

La metaplasia intestinal, como se ha descrito con anterioridad, es uno de los pasos intermedios para la aparición de cáncer gástrico, con la colaboración de *Helicobacter pylori* (gastritis→atrofia→metaplasia→displasia→cáncer gástrico). Se ha visto que existe cierta tendencia por desarrollar metaplasia en la zona del antro. Se caracteriza por la presencia de marcadores de diferenciación intestinal tales como la apomucina MUC2, junto con CDA1 y CDA2. Se han investigado enzimas, factores de crecimiento y proteínas para caracterizar las diferentes fases de diferenciación de la metaplasia. Enzimas y mucinos, estos últimos sobre todo de forma sulfatada, se encuentran normalmente en el epitelio intestinal y están asociados con la transición a metaplasia intestinal, ade-

más de la sucrasa-isomaltasa, la fosfatasa alcalina, la vilina y la “trefoil family factor 3” (TGf3). La expresión del factor de crecimiento alfa está aumentada en la metaplasia intestinal gástrica y esofágica respecto a la mucosa normal. Dos moléculas relacionadas con la adhesión celular, la E-caderina y la conexina, están disminuidas en la metaplasia intestinal de la mucosa gástrica. Esta disminución puede estar asociada con la progresión a carcinoma causada por la pérdida de interacciones entre célula y célula.

Las proteínas CDA1 y CDA2 se expresan en el epitelio del intestino delgado y en el colon, donde juegan un papel crucial en la regulación de la proliferación celular y diferenciación. CDA1 está predominantemente expresado en las células indiferenciadas de las criptas intestinales, mientras que CDA2 está presente en los “villi” ó en células diferenciadas del intestino delgado [29].

Según un estudio de Silberg et al, la expresión aberrante de CDA1 se observó en áreas del estómago y del esófago que tenían metaplasia intestinal (IM), y más concretamente en el núcleo de las células, mientras sí que existían en el citoplasma de las células gástricas. CDA1 jugaría un papel en la transdiferenciación de la mucosa en un tipo intestinal, característico de la metaplasia intestinal y CDA2 en el mantenimiento de la diferenciación intestinal. De hecho, se ha visto que en ratones en que se ha inactivado un alelo del gen CDA2, se produce una pérdida parcial de la diferenciación intestinal.

Por lo tanto, CDA1 y CDA2 está ausente del núcleo de las células de la mucosa gástrica normal, y sólo se encuentra en esta disposición de forma aberrante cuando existe metaplasia intestinal (IM). CDA1 sí se encuentra normalmente en el citoplasma de las células de las glándulas del antro en la mayoría de los casos, mientras que CDA2 se observó en la región supra-nuclear (Golgi) en las glándulas gástricas, así como en la mayoría de células del epitelio foveolar del antro en todos los casos.

Se ha investigado la fuerte asociación existente entre la expresión de CDA1 y CDA2, así como entre CDA2 y MUC2, que es más fuerte que entre CDA1 y MUC2.

Según lo expuesto anteriormente, en aquellos individuos que tengan por algún motivo deficiencia en el gen, la expresión del enzima CDA estará disminuida y la posibilidad de aparición de cáncer será menor. Al estar relacionada la expresión de este gen con la aparición de metaplasia intestinal, desencadenante de cáncer gástrico, sería lógico pensar que pacientes que tengan menor expresión de CDA tendrán menor probabilidad de padecerla y, por lo tanto, la neoplasia.

Éstas son las dos variantes que se han encontrado del enzima CDA hasta el año 2003. Según un estudio realizado posteriormente por Fitzgerald SM et Al. se han identificado 6 nuevos polimorfismos en el gen que codifica para este enzima [30]: -92A>G, -205C>G, -451C>T, -897C>A, -

1075A>G y -1181G>A. Según la base de datos TRANSFAC disponible a través de las páginas Web <http://www.gene-regulation.com> ó <http://www.genomatrix.de> muestra que 5 de los 6 SNPs identificados conducen a la pérdida ó ganancia de un sitio de unión a un factor de transcripción. De este modo, el polimorfismo en -92A>G lleva a la ganancia de un sitio AP2A y AP2G; el -451C>T conduce a la pérdida del sitio ETS1 y a la ganancia de LYF1; el cambio -897C>A conduce a la pérdida del sitio de unión FOXF2 y a la ganancia del sitio IK2; el cambio que da lugar al polimorfismo -1075A>G conduce a la ganancia del sitio NYK3.2 y, por último, -1181G>A conduce a la pérdida del sitio FXR.

Como ya se ha dejado entrever con anterioridad, la citidina deaminasa pertenece a la familia de enzimas que catalizan la deaminación hidrolítica de su substrato citidínico al correspondiente producto uridínico. En un principio se pensó que tan sólo existía a en el citoplasma. Posteriormente se ha comprobado que también puede encontrarse en el núcleo. De hecho, se han identificado dos grupos aminoacídicos de naturaleza básica cerca del extremo amino de la secuencia del gen que tienen similitud a la clásica señal de localización nuclear, denominada NLS (“Nuclear localization signal”). Estas señales de localización nuclear son regiones cortas existentes en algunas proteínas que, mediante un determinado mecanismo son capaces de introducirse en el núcleo. Estas señales tienen un elevado contenido de aminoácidos básicos arginina y lisina y pueden contener residuos tales como la prolina. Constan de dos series de aminoácidos básicos separados por una región entre ellos. Las NLSs, a diferencia de otras señales, pueden estar en cualquier posición de la secuencia primaria de la proteína. Las proteínas nucleares que llevan un NLS básico son reconocidas por un receptor denominado importina, compuesto por 2 subunidades: la importina  $\alpha$  y la importina  $\beta$ . La identificación de una NLS en el enzima de la citidina deaminasa llevó a considerar si este enzima podría ser nuclear en su localización. Además, la localización nuclear de la citidina deaminasa puede ser importante a la hora de proporcionar substrato para la biosíntesis de RNA. Las proteínas nucleares (en concreto la citidina deaminasa que se ha estudiado) se acumulan en el núcleo de la célula ya que contienen señales que provienen de éste que permiten entrar selectivamente a través del complejo del poro nuclear. De hecho, la región amino-terminal del gen que codifica para el enzima de la citidina deaminasa contiene la NLS. Provocando la delección de los primeros 10 aminoácidos de la citidina deaminasa, que incluye la primera serie de residuos aminoacídicos de la NLS, se vio que la localización de la proteína mutante era citoplasmática, con la exclusión completa del núcleo, confirmándose así que la distribución de la citidina deaminasa no es debida a difusión pasiva. Estos resultados sugirieron que la primera serie de aminoácidos en el extremo amino del gen es esencial para la localiza-

ción nuclear de la secuencia y que la región amino-terminal del enzima es determinante para esta localización. El transporte de proteínas nucleares que contienen una NLS clásica comporta la unión a un complejo de receptor citoplasmático heterodimérico (importina  $\alpha$ - $\beta$ /kariopherin  $\alpha$ - $\beta$ ) y el paso a través del poro nuclear. Una de las subunidades de este complejo de 60 kDa, la importina  $\alpha$ , reconoce y se une a proteínas que contienen una NLS. Se ha comprobado cómo la citidina deaminasa interacciona con la importina  $\alpha$  y entra en el núcleo por la maquinaria de transporte importina  $\alpha$ / $\beta$  ó por una vía análoga. Específicamente la “señal de localización nuclear” (NLS) del enzima citidina deaminasa consta de una serie que contiene un residuo de lisina y un residuo de arginina, una región de 19 aminoácidos de separación y una segunda serie de dos residuos de lisina. La presencia de un residuo de prolina en la NLS indica la presencia de un giro en el esqueleto del polipéptido. Si se mutaba el residuo de prolina situado tras la primera serie de residuos aminoacídicos básicos, no se producía ningún efecto sobre la localización nuclear. Aunque la presencia del residuo de prolina no es siempre esencial para la función de la NLS, se cree que en la citidina deaminasa el residuo de prolina que sigue la primera serie de aminoácidos podría jugar un papel de compensar la longitud de la región separadora entre las dos series de aminoácidos, ajustando la NLS en la conformación requerida y así las dos series básicas sean capaces de adherirse a los puntos de unión del receptor.

Existen diferentes tipos del enzima CDA, cada uno con una función concreta sobre la secuencia del gen ó como se verá, sobre la molécula de RNA. Una base de datos reveló la presencia del lugar activo para el enzima como hemos descrito con anterioridad, que se conserva en la amplia familia de la citidina deaminasa. De hecho, el efecto inhibitorio de THU (3, 4, 5, 6- tetrahidrouridina) y de la quelación del zinc sobre la actividad del enzima sugiere que el proceso de deaminación puede ser similar en los diferentes tipos de CDA. La familia se puede clasificar en deaminasas “RNA-editing”, en citidina deaminasas y en CMP deaminasas, basadas en la especificidad por el substrato y por homología de la secuencia en el lugar activo. La APOBEC-1 (“RNA-editing”) y la citidina deaminasa tienen un grupo pseudoactivo en el extremo del carbono, que es necesario para formar un homodímero, mientras al otro grupo, la CMP deaminasa, le falta tal grupo y forma homotetrámeros. Uno de los subgrupos que existen, la AID (“Activation-induced Cytidine Deaminase”) está más cercana al subgrupo de las deaminasas “RNA-editing” más que a las citidina deaminasas ó a las CMP deaminasas. La región rica en leucina localizada en el extremo carbono del gen APOBEC-1 se ha propuesto ser importante para la interacción entre proteína y proteína. El AID también contiene la región C-terminal rica en leucina, en que cuatro leucinas de AID se conservan entre varias especies de

animales y el APOBEC-1 humano. Esta secuencia es más corta pero similar a la del grupo pseudoactivo de APOBEC-1, indicando que AID pertenece al grupo de la citidina deaminasa de APOBEC-1.

El “editing” del RNA es la modificación post-transcripcional del RNAm que altera su secuencia nucleotídica y consecuentemente, su capacidad codificante [31]. Este mecanismo para regular la expresión del gen se encontró en primer lugar en la mitocondria de protozoos. Posteriormente se ha encontrado en otros organismos, que incluyen plantas y paramixovirus. Se han descubierto un elevado número de RNAm que pueden ser “editados” en mamíferos, incluyendo la apolipoproteína B (apoB) RNAm, el receptor glutamato RNAm, el Wilms tumor-1 RNAm, la  $\alpha$ -galactosidasa RNAm, la neurofibromatosis tipo-1 RNAm y el tRNA<sup>ASP</sup>. La APOBEC-1, uno de los componentes de la familia de las citidina deaminasas, deamina el RNAm de la apolipoproteína B para generar un “stop codon” prematuro. La apolipoproteína (apo) B48 es producida en el intestino de mamíferos por un mecanismo específico en el tejido de “RNA-editing”, que media la conversión de una citosina (C) en un uracilo (U) en la posición 6666 del RNAm del apoB, con la aparición de un “stop codon” (UAA) en lugar de una glutamina (CAA) en la posición 2153. La apoB48 es una proteína de 242 kDa. El “editing” del RNAm conduce a la producción de la apoB48 que comprende los residuos 1-2152 de la apoB100. La apoB100 es sintetizada en el hígado, contiene 4536 aminoácidos y 512 kDa y es producido desde una apoB RNAm “unedited”. La apoB100 y la apoB48 son productos de traslación del apoB RNAm ineditado y editado, respectivamente, y estas proteínas tienen funciones fisiológicas completamente diferentes. Ambas proteínas son las mayores constituyentes de las lipoproteínas del plasma. Se ha visto que la subunidad p27 del enzima “editing” RNAm de la apolipoproteína B es la subunidad catalítica y se cree que contiene un átomo de zinc en su centro activo. APOBEC-1 tiene un grupo que contiene 2 residuos de fenilalanina y residuos de 4 aminoácidos a lo largo del centro activo. Este grupo se encuentra presente en los miembros de la familia de APOBEC, incluyendo la “activation-induced cytidine deaminase” (AID), la APOBEC2, y la APOBEC3A junto con la APOBEC3G. AID es esencial para iniciar la “class-switch recombination”, la hipermutación somática y la conversión del gen. La familia APOBEC3 es única en primates. La APOBEC3G es capaz de proteger las células del virus de inmunodeficiencia humana (SIDA) y de otras infecciones virales. Esta función no es única de APOBEC3G; otros miembros de la familia APOBEC3 también tienen esta habilidad. La sobreexpresión de enzimas de esta familia puede causar cáncer, sugiriendo que genes para la familia de proteínas APOBEC son proto-oncogenes [32].

Independientemente a lo expuesto hasta ahora y relacionado con la actividad de la CDA, se han usado bacterias recombinantes tales como *Clostridium* y *Salmonella* atenuada para transferir CDA



selectivamente al entorno del tumor de ratón, resultando en efectos antitumor debido a la conversión de la 5-fluorocitosina (5-FC) en el citostático 5-FU. El 5-FU y sus metabolitos pueden ser detectados en tumores no invasivos y en hígado mediante espectroscopia de resonancia magnética (F-MRS) asociándose la concentración de 5-FU con el resultado del tratamiento. En animales en los que se detectó concentración de 5-FU durante el período de seguimiento se consideraron como sensibles al tratamiento, mostrándose un significativo retraso en el crecimiento del tumor. Para la misma cantidad de 5-FC, mismo nivel de colonización (mismas bacterias viables), misma expresión de CDA y mismo nivel de hipoxia del tumor, se detectaron diferencias significativas en la cantidad de 5-FU entre animales que respondieron al tratamiento y aquellos que no respondieron, siendo menor en aquellos que no respondieron. Se creyó era debido a la presencia de un factor inhibitorio en los tumores de los que no respondieron ó por la falta de factores necesarios para la actividad de la CDA. Cofactores tales como  $Fe^{2+}$  u otros iones divalentes necesarios para la actividad catalítica de la CDA no presentaban diferencias significativas. Sin embargo, un pH intratumoral bajo ó altas concentraciones de citosina endógena que pudieran competir con el 5-FC en el lugar activo podrían reducir la actividad de la citidina deaminasa. Mediante cromatografía en capa fina se comprobó que, al añadir medio nutritivo al tumor de los que no respondieron se produjo la conversión de 5-FC a 5-FU. Por lo tanto, el diferente comportamiento frente al enzima CDA podría deberse a la falta de nutrientes necesarios para su actividad catalítica [33].

En conclusión, se puede considerar que el enzima citidina deaminasa participa en procesos anabólicos. Por un lado, independientemente del tratamiento aplicado, favoreciendo la síntesis de DNA y RNA en la célula tumoral, con la participación del enzima TS, que supondrá un aumento de la división celular y, por otro lado, cuando se aplica a pacientes en tratamiento a base de FU, la citidina deaminasa favorece, por analogía, la incorporación de éste en la molécula de DNA y en la molécula del RNA, provocando la aparición de DNA y RNA aberrante inactivando el DNA tumoral, además de proveer sustrato para la acción de la TS, que, a su vez se encuentra inhibida por el 5-FU, impidiendo la formación de DNA tumoral.

Por el contrario, el enzima DPYD, que también se ha estudiado, participa en procesos catabólicos, y en concreto en la metabolización del antineoplásico administrado (FU), como se describirá posteriormente.

## Influencia de la DPYD en el tratamiento con 5-FU

1° Dihidropirimidina dehidrogenasa es el enzima inicial y limitante que cataliza la reducción de uracilo y timina a 5,6-dihidrouracilo y 5,6-dihidrotimina, respectivamente, mediante una ruta metabólica de tres pasos. Uno de los productos finales de esta vía es la  $\beta$ -alanina, que en mamíferos es la única manera de obtener este aminoácido. La deficiencia del DPYD da lugar a timina-uraciluria, cuyos síntomas más comunes son convulsiones (epilepsia), microcefalia y retraso mental. 2° También es responsable del catabolismo y consecuente inactivación del agente anticancer 5-FU por la vía anteriormente citada. Su deficiencia puede provocar acúmulo del 5-FU con la consiguiente toxicidad que se manifiesta por neutropenia, trombopenia y daño neurológico. Se ha visto que la toxicidad observada a 5-FU es del mismo rango en individuos heterocigotos y homocigotos para la mutación. Debido a este hecho sería conveniente, antes de instaurar el tratamiento con 5-FU, determinar si el paciente con cáncer presenta deficiencia del enzima por haberse producido una mutación en el gen que haya dado lugar a una proteína mutada, así se determinará si el tratamiento puede ser efectivo ó por el contrario hemos de iniciar otro diferente. Además, es la manera de ahorrar tiempo a la hora de intentar frenar el desarrollo de la enfermedad. 3° Los efectos y toxicidad del 5-FU están relacionados con el anabolismo del fármaco a sus nucleótidos, que pueden producir citotoxicidad a través de la inhibición de la actividad de la timidilato sintasa ó la inhibición de la síntesis de RNA y/o de DNA.

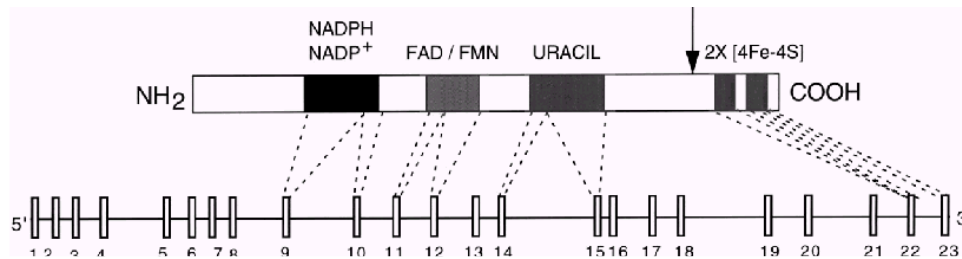
La actividad del enzima se expresa como nanomoles de catabolitos totales formados a lo largo del tiempo por miligramo de proteína.

La determinación de la actividad del enzima DPYD antes de la administración del 5-FU sería aconsejable a causa de la potencial toxicidad que puede producir este agente.

Estas deficiencias en el gen *DPYD* pueden ser debidas a mutaciones en uno de los alelos (heterocigotos para la mutación) ó en los dos alelos (homocigotos para la mutación).

DPYD es un enzima citosólico que forma homodímeros con una masa molecular de aproximadamente 200 a 216 kDa, dependiendo de la especie. La secuenciación del cDNA humano y porcino reveló que se trataba de una proteína de 1025 aminoácidos con una masa molecular de 111 kDa. Se encontró que el gen *DPYD* estaba situado en el cromosoma 1p22 y contenía 23 exones, con diferentes tamaños que van desde las 69 pares de bases del exon 15 a los 961 pares de bases del exón 23 [34], con un total de 3075 bp. El gen *DPYD* tiene por lo menos 950 kb de longitud con 3 kb de “coding sequence” y un promedio de tamaño de intrón de aproximadamente 43 kb [35]. En la secuencia de la proteína se identificaron lugares de unión para la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato

(NADPH), para la flavin-adenina dinucleótido (FAD), para el uracilo y dos grupos hierro-sulfuro, colocados desde el grupo amino terminal hasta el grupo carboxílico terminal, respectivamente. El lugar proteolítico está localizado cerca del grupo carboxílico y abarca los centros hierro-sulfuro.



**Diagrama esquemático del *DPYD* humano y dominios funcionales en la proteína DPYD. La relación entre los dominios de la proteína DPYD y los exones *DPYD* se indica por las líneas intermitentes. La flecha marca el locus sensible proteolítico para la proteína DPYD.**

La actividad del enzima ha sido detectada en numerosos tejidos humanos, pero es mayor en el hígado y en los linfocitos.

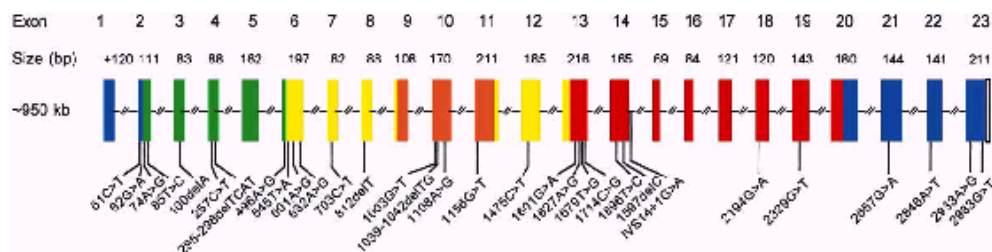
Antes de explicar con más detenimiento el mecanismo de acción del 5-FU y el punto en que actúa el enzima que estudiaremos (DPYD), se pasará a enumerar algunas de las mutaciones de éste y que dan lugar a que no pueda actuar, haya acúmulo de 5-FU con la consecuente toxicidad, además de producirse timina-uraciluria en estos individuos. Los polimorfismos que son objeto de nuestro estudio son el *DPYD* Arg29Cys y el *DPYD* Ile543Val. Mientras la primera de las mutaciones no es muy habitual, no ocurre lo mismo con el *DPYD* Ile543Val, que está ampliamente extendida. EL *DPYD* Ile543Val es el cambio de una adenina por una guanina (A/G) que da lugar al cambio de una isoleucina por una valina (Ile/Val). El *DPYD* Arg29Cys es el cambio de una citosina por una timina (C/T) dando lugar a un cambio de aminoácido: Arginina por Cisteína (Arg/Cys). Por último, la mutación en el *CDA* es provocada por el cambio de una adenina por una citosina que da lugar a un cambio de aminoácido: lisina por glutamina (Lys/Gln).

Hasta 2004 se han identificado 39 diferentes mutaciones y que incluyen 1 “splice-site mutation”, 5 “frameshift mutations”, 2 “nonsense mutations”, 23 mutaciones/polimorfismos y 8 mutaciones intrónicas:

Exón 2: 61C>T; 62 G>A; 74 A>G ; 85T>C.

Exón 3: 100delA.

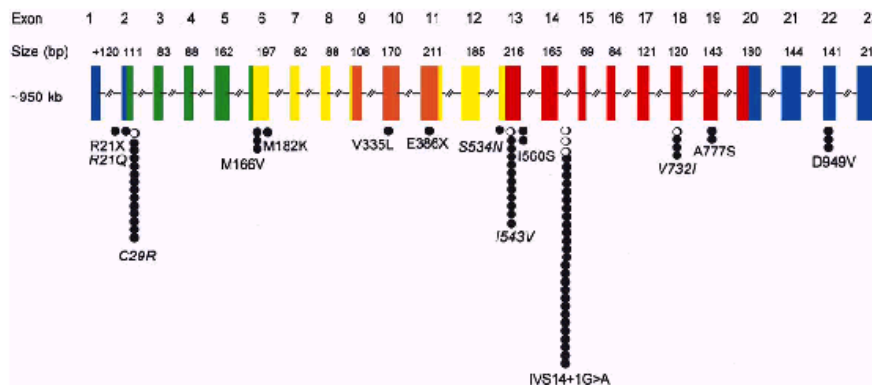
- Exón 4: 257C>T; 295-298delTCAT.
- Exón 6: 496 A>G; 545T>A; 601 A>G; 632 A>G.
- Exón 7: 703C>T.
- Exón 8: 812delT.
- Exón 10: 1003G>T ; 1039-1042delTG ; 1108 A>G.
- Exón 11: 1156G>T.
- Exón12: 1475C>T.
- Exón 13: 1601G>A ; 1627A>G ; 1679T>G ; 1714C>G.
- Exón 14: 1896T>C ; 1897delC ; IVS14+1G>A.
- Exón 18: 2194G>A.
- Exón 19: 2329G>T.
- Exón 21: 2657G>A.
- Exón 22: 2846 A>T.
- Exón 23: 2933A>G ; 2983G>T.



**Organización del gen *DPYD* (DPYD). Los colores representan los 5 dominios funcionales: verde para el dominio I (grupos Fe-S N-terminales), amarillo para el dominio II (unión FAD), naranja para el dominio III (unión NADPH), rojo para el dominio IV (unión FMN/pirimidina) y azul para el dominio V (grupos Fe-S C-terminales). Se indican las diferentes mutaciones y polimorfismos identificados en pacientes con una deficiencia parcial ó completa en el gen.**

El enzima DPYD actúa a nivel de catabolismo del FU. Al contrario de lo que pasa con la CDA, que actúa a nivel de anabolismo y en concreto favoreciendo la síntesis de DNA y RNA ó de incorporación en la molécula de DNA ó de RNA en el caso de pacientes tratados con FU, la DPYD, la función que tiene es la de metabolizar el FU y favorecer su degradación, y así evitar que éste actúe ó hacerlo en menor grado dependiendo de la velocidad de degradación. Un polimorfismo a este nivel, tendrá el efecto contrario, o sea, la de evitar que se metabolice el FU y haya mayor concentración del

antineoplásico en el lugar de acción, hecho que es positivo para el freno de la progresión del cáncer aunque también es posible un aumento de la toxicidad por acumulación del FU.



**Mutaciones y polimorfismos en *DPYD* de pacientes que padecen toxicidad severa asociada al 5-FU. Cada símbolo representa un paciente homocigoto (o) ó heterocigoto (●) para la mutación indicada.**

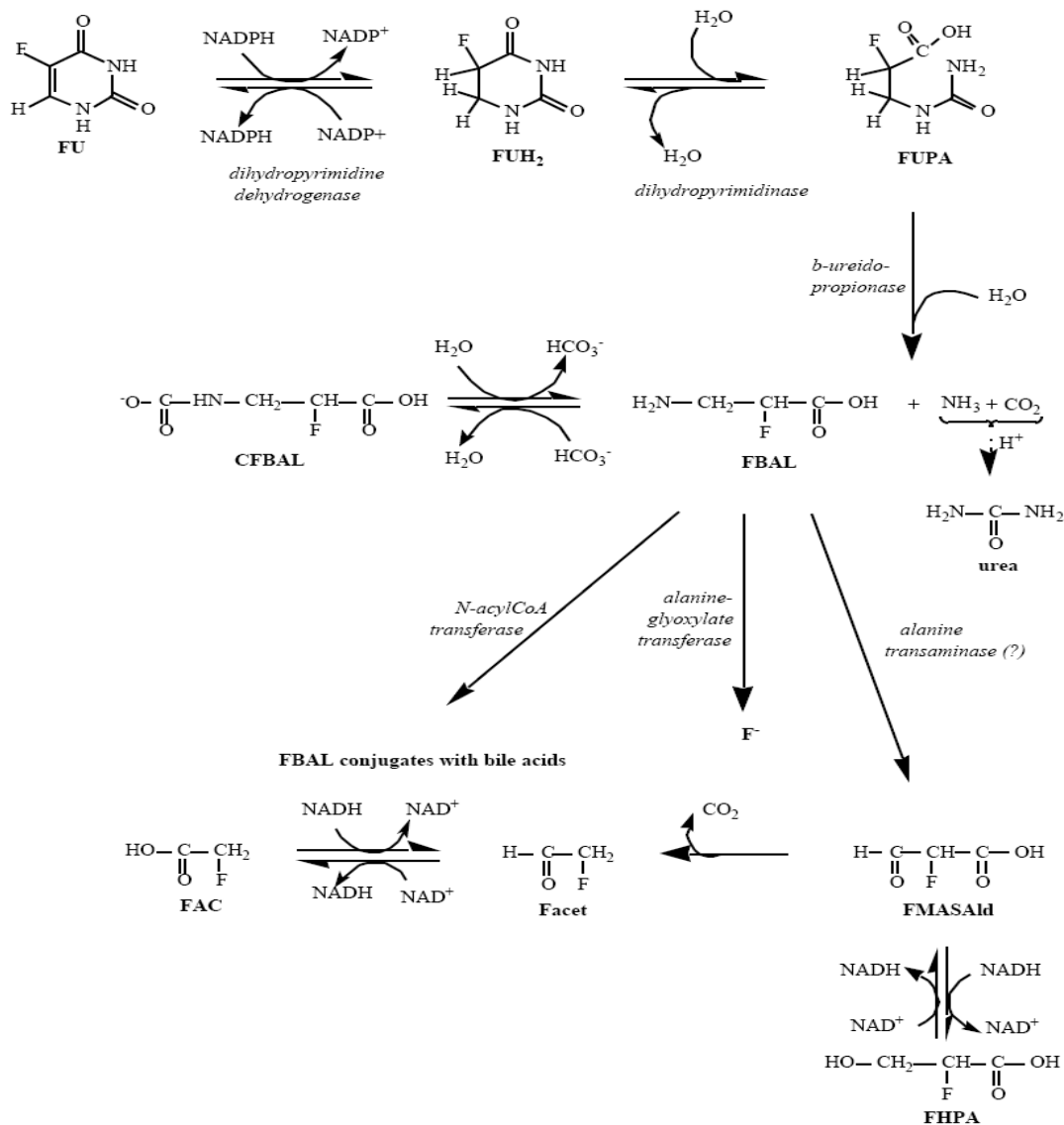
En el caso del enzima CDA, un polimorfismo en el gen también supondría un efecto favorable al dejar de actuar como convertidor del derivado citidínico al derivado uridínico del dCMP ó CMP a dUMP ó UMP necesario para la síntesis de DNA y RNA, respectivamente en el caso que esta variación de base diera lugar a una disminución ó una pérdida de la actividad.

En la siguiente página se puede ver detallado todo el proceso de catabolismo del FU, en que el enzima DPYD actúa a nivel de la primera reacción de reducción de FU a FUH<sub>2</sub> (5,6-dihidro-5-fluorouracilo) en presencia de la forma reducida del fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH).

Después de la administración del 5-FU, más del 80% de la dosis inyectada se degrada.

Parece ser que variando las concentraciones de DPYD en humanos se puede ver afectada la biodisponibilidad del 5-FU y dar lugar a diferentes respuestas al 5-FU en pacientes con cáncer.

Los productos del catabolismo del 5-FU se han relacionado con varias toxicidades al 5-FU que incluyen neurotoxicidad.



En el estudio realizado, se verán los individuos tanto homocigotos para el “wild-type”, heterocigotos que tengan un alelo mutado y otro wild-type y los individuos que son homocigotos para la mutación para los tres diferentes genes (*DYPD* Ile543Val, *DYPD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln). Estadísticamente, se comprobará si el hecho de tener determinado genotipo es significativo a la hora de tener mayor ó menor supervivencia ya que se está trabajando con pacientes que padecen cáncer gástrico (en el caso de que no lo padecieran, también se podría comprobar si el hecho de tener un determinado polimorfismo supone un incremento en el riesgo de padecer cáncer gástrico). Además, en el caso de la DPYD, al ser un enzima responsable del catabolismo del agente antineoplásico 5-FU, el hecho de estar mutado, dará como resultado que no se produzca esta reacción, con lo que el 5-FU no se

metabolizará y su concentración en plasma será mayor con lo que habrá una mayor respuesta al tratamiento así como una mayor toxicidad.

No sólo será importante determinar el genotipo del enzima DPYD sino que saber qué variante es la que se da en el enzima de la TS (TSER) podría ser útil para seleccionar pacientes que puedan tolerar y responder a la terapia con 5-FU. Y, en el caso que el tratamiento con 5-FU no fuese el adecuado, existen disponibles otros agentes antitumorales como pueden ser irinotecan, oxaliplatino..., que pueden ser aplicados solos ó en combinación con 5-FU en el caso que la concentración del enzima TS sea elevada ó se detecten deficiencias en el enzima DPYD (bien sea por deficiencia congénita ó por la existencia de polimorfismos).

#### **1.4.2. TEGAFUR COMO PROFÁRMACO DEL 5-FU**

Hasta ahora se ha comentado el anabolismo y catabolismo del FU y su mecanismo de acción, pero no siempre se administra la fármaco como tal, sino que se hace en forma de profármaco. Como se ha dicho con anterioridad, el FU es relativamente eficiente ya que puede presentar varios inconvenientes. En primer lugar, es relativamente tóxico, causando mielosupresión y molestias gastrointestinales, debido principalmente a la fosforilación del FU en el aparato digestivo. Esta toxicidad también se debe a la falta de selectividad del fármaco en los tumores. Tiene una eficacia limitada por su corta  $t_{1/2}$  en el plasma, por su baja biodisponibilidad debido a la actividad del enzima DPYD (catabolismo) y por la resistencia al FU de algunos tumores con fuerte expresión de TS, ó bajas reservas de folatos reducidos. Su modo de administración es también un problema. Cualquier administración i.v., sea en bolus ó en infusión continua, requiere la presencia del paciente en el hospital, mientras el tratamiento oral se puede llevar a cabo en casa con un descenso del stress. Además, la administración i.v. puede dar complicaciones como trombosis venosa ó infección alrededor del catéter.

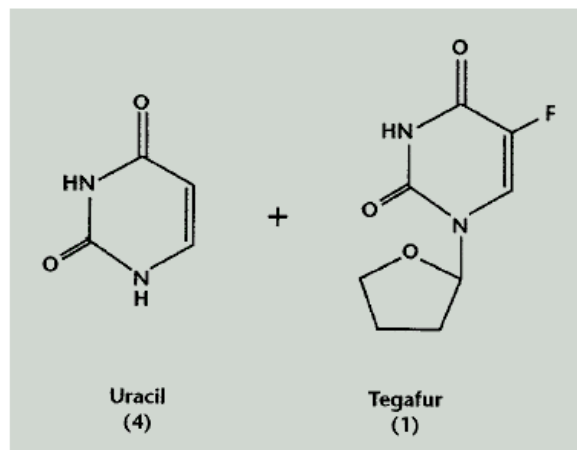
Por todos estos motivos citados, uno de los objetivos de la investigación oncológica está encaminado al desarrollo de profármacos del FU que disminuyan algunas de estos inconvenientes: reducción de la toxicidad evitando ciertas rutas de degradación (el profármaco no es sustrato de los enzimas de degradación) ó haciendo selectiva la diana del fármaco sobre el tumor (profármacos que liberan el principio activo selectivamente en las células del tumor); aumento de la actividad reduciendo el catabolismo (uso de inhibidores de DPYD) ó incrementando el anabolismo; mejora en la calidad de vida del paciente desarrollando profármacos orales.

El profármaco es un compuesto farmacológicamente inactivo que se convierte en un agente activo por una biotransformación metabólica. Por la acción del enzima, este profármaco se descompone liberando el principio activo. En la mayoría de los casos, un grupo químico se une covalentemente al principio activo. Este grupo no debe ser tóxico e inactivo biológicamente. Este grupo a menudo condiciona la solubilidad del fármaco, su estabilidad, la tasa en que se libera el principio activo y el enzima requerido para la transformación.

El profármaco es diseñado para ser absorbido intacto por el tracto gastrointestinal y convertido enzimáticamente en FU en el hígado ó en el propio tumor para exponer el fármaco en el lugar de acción durante un largo período de tiempo pero en más bajas concentraciones que aquellas observadas después de bolus i.v., minimizando la toxicidad.

### Estructura química

Ftorafur (FTO), el 1-(2-tetrahidrofuril)-5-fluorouracilo, también denominado Tegafur (FT) ó Futraful es el profármaco administrado a los pacientes de nuestro estudio. Este profármaco está compuesto de 5-FU y uracilo, previniendo de esta manera la degradación del FU y asegurando así que la concentración de 5-FU permanece en niveles sostenidos tanto en plasma como en el tumor.

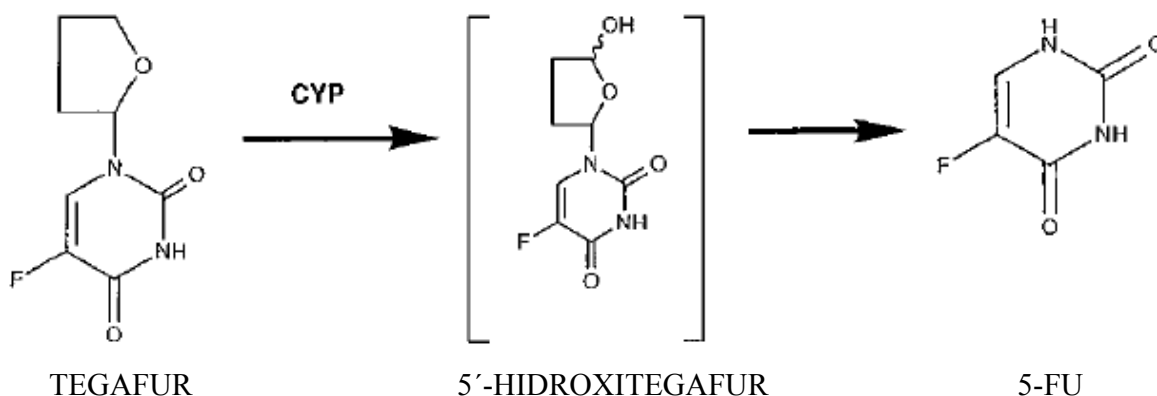


Estructura química del UFT



## Mecanismo de acción

Después de la administración oral, el FT se absorbe rápidamente e intacto por el organismo. Es metabolizado principalmente en el hígado por el citocromo P-450 A6, produciéndose una hidroxilación en la posición 5' del anillo de furano para producir 5'-hidroxitegafur.



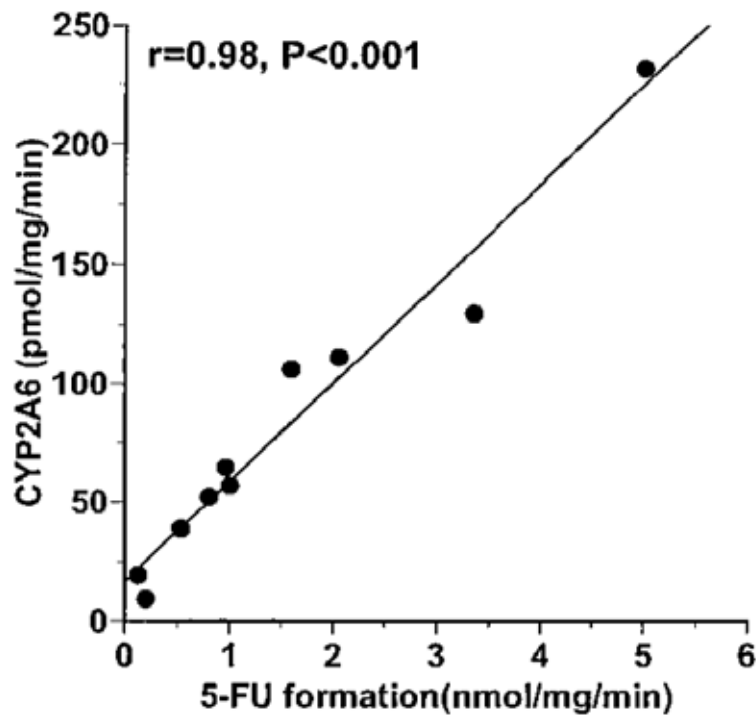
### Vías metabólicas propuestas de conversión de Tegafur en 5-FU vía CYP.

Tegafur es hidroxilado por el enzima CYP a 5'-hidroxitegafur, que es inestable y espontáneamente se degrada a 5-FU y aldehído succínico.

Este proceso de bioactivación se cree que está mediado por CYP, ya que se requiere NADPH para la conversión de FT a 5-FU en los microsomas del hígado, y su tasa de conversión se ha demostrado que se puede acelerar con el pretratamiento de ratones con fenobarbital, un conocido inductor de CYP. Sin embargo, la isoforma encargada de este proceso de bioactivación del tegafur no está clara. La identificación de la isoforma humana de CYP responsable del metabolismo de ésta como de cualquier otra fármaco que se esté estudiando, es útil para valorar la variabilidad interindividual en su metabolismo, particularmente cuando esta isoforma presenta polimorfismo genético. Además, existen datos disponibles del número de compuestos que inhiben ó inducen isoformas específicas de CYP así como de la variabilidad en el metabolismo ó en interacciones del fármaco [36].

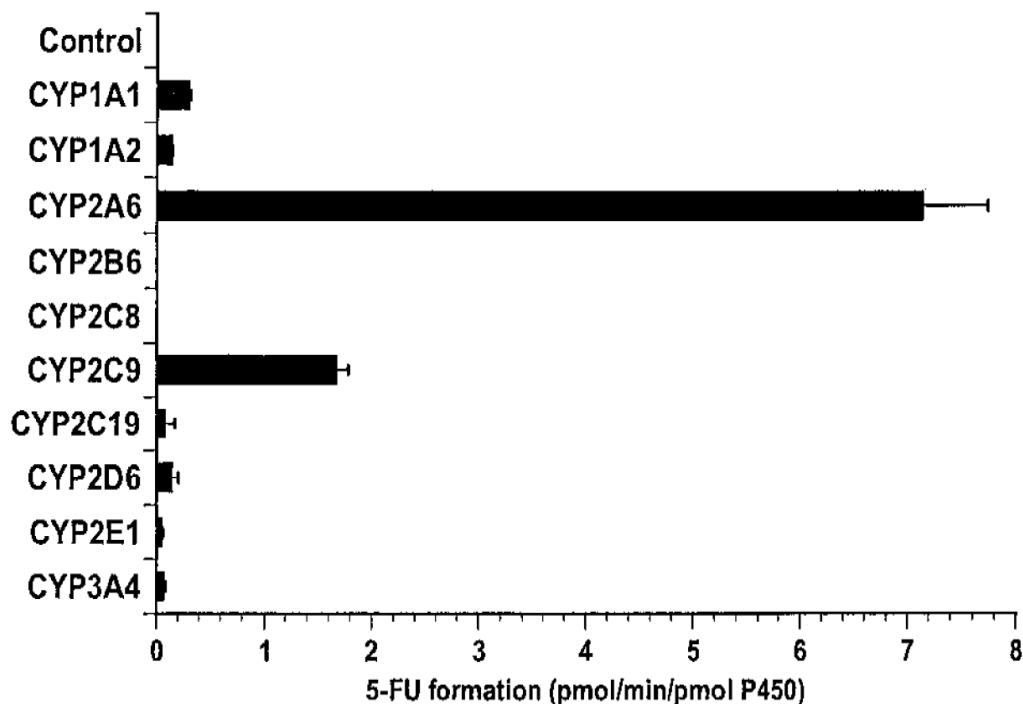
La participación del enzima CYP2A6 en la bioactivación de la molécula de tegafur se evidencia por: (a) la tasa de formación de 5-FU desde el FT en 10 muestras de microsomas de hígado

humano se correlacionó con la actividad de la cumarina 7-hidroxilasa, un marcador de la actividad del CYP2A6, pero no está correlacionado con otras actividades de CYPs (ver gráfica);



**Correlación entre la formación de 5-FU y la actividad del enzima CYP2A6 en microsomas hepáticos humanos en comparación con la actividad de la cumarina 7-hidroxilasa catalizada también por el CYP2A6.**

(b) la cumarina, un sustrato específico de CYP2A6, inhibió la formación de 5-FU en los microsomas del hígado humano de una manera dependiente de la concentración; (c) el anticuerpo anti-CYP2A6 inhibió la formación de 5-FU en un 90% en los microsomas del hígado humano; (d) el cDNA a partir del CYP2A6 mostró la actividad más elevada para la formación de 5-FU entre los 10 cDNA de los CYPs con una  $K_m$  similar a aquella encontrada para el componente de mayor afinidad en los microsomas del hígado humano. Aunque el cDNA para el CYP2C9 mostró la segunda más alta actividad para la formación de 5-FU desde el tegafur, no parece contribuir significativamente a la bioactivación del FT en los microsomas del hígado humano, a causa que el aclaramiento intrínseco ( $V_{max}/K_m$ ) para la formación de 5-FU desde el tegafur era mucho más pequeña que para el CYP2A6.



**Tasa de formación de 5-FU desde Tegafur en microsomas de células  $\beta$ -linfoblásticas que expresan CYPs humanos.**

Según este gráfico, los enzimas que mayoritariamente participan en el metabolismo por el citocromo P-450 son el CYP2A6 y el CYP2C9, mientras que en algún otro artículo se indica que el tegafur se transforma en el fármaco activo 5-FU por los citocromos P450 1A2, 2A6 y 2C8 en los microsomas del hígado humano así como que se han encontrado polimorfismos genéticos en el CYP1A2 y en el CYP2A6 [37]. También existe contribución a este paso por el enzima timidina fosforilasa (TP) en el citosol del hígado. La TP, purificado de tejidos de tumor gástrico humano, se ha visto que cataliza la formación de 5-FU desde el tegafur así como la formación de timina desde la timidina ó de 5-FU desde el 5'-dFUrd (sin embargo, la formación de uracilo desde uridina no la realiza este enzima sino el enzima UrdPase). Los niveles ó actividades de TP en tejidos de cáncer de mama ó de pulmón son de 10-20 veces más elevados que en tejidos normales, así como en estómago, colon y ovario. Se conoce la existencia de polimorfismos genéticos en la TP. Además, hay grandes variaciones interindividuales en los niveles de TP (de 10 a 320 veces más elevado) en varios tejidos de cáncer que incluyen el hígado. Se ha visto que los niveles de TP se pueden ver aumentados por algunos factores como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y fármacos anticancer tales como el paclitaxel ó la ciclofosfamida [38].

La formación de 5-FU a partir del FT en los microsomas del hígado humano se realiza en presencia de un sistema generador de NADPH. Sin embargo, la formación de 5-FU en el citosol del hígado humano se realiza en ausencia de NADPH.

La conversión de FT a fluorouracilo ocurre principalmente en el hígado. El FT supone un depósito de FU, que libera lentamente 5-FU en el organismo, comparable a la administración de FU por infusión i.v. continua. Por lo tanto, cabría esperar efectos adversos comparables a los observados en infusión continua, pero con la ventaja que la administración oral es de reducido coste, representa mayor comodidad para el paciente y un menor riesgo de complicaciones. Desafortunadamente, los ensayos clínicos no han demostrado una eficiencia superior de FT administrado por la vía oral respecto a la infusión i.v. continua. Además, FT frecuentemente presenta molestias gastrointestinales severas y su liposolubilidad da lugar a un aumento de la concentración del fármaco en el fluido cerebroespinal conduciendo a neurotoxicidad severa.

Por ser el CYP2A6 el principal enzima responsable del proceso de bioactivación del FT, polimorfismos genéticos de este enzima ó interacciones del fármaco afectan la formación de 5-FU desde el FT y pueden modificar el resultado de la quimioterapia del cáncer usando FT/uracilo.

El citocromo CYP2A6 es un enzima que muestra polimorfismo genético. Se han encontrado cuatro alelos mutados, designados como CYP2A6\*2, \*3, \*4 y \*5, además del alelo “wild-type” (CYP2A6\*1). CYP2A6\*2 presenta una mutación en una base (T→A), conduciendo a un cambio de una Leucina a una Histidina en la posición 160 en el exón 3, que resulta en la formación de un enzima inactivo. CYP2A6\*3 es también inactivo, a causa que estaba formado por la conversión del gen “wild-type” en los exones 3, 6 y 8, aunque su funcionalidad no está del todo clara a causa de la baja prevalencia de los homocigotos para este alelo mutante. CYP2A6\*4 es un alelo con una delección parcial ó completa del gen CYP2A6. Los microsomas preparados del hígado de un homocigoto con la delección de CYP2A6 están desprovistos de la proteína. Por último, CYP2A6\*5 es un nuevo alelo defectuoso.

Las vías para el metabolismo del FT a 5-FU envuelven la oxidación en C-5 por los enzimas microsomales y una hidrólisis en C-2 por los enzimas citosólicos. Los enzimas responsables del metabolismo del FT de momento son desconocidos. Los productos de oxidación en C-3' y en C-4' (los metabolitos hidroxí-FT) y el metabolito dihidro-FT (localización indefinida de la doble cadena en el anillo tetrahidrofurano) también han sido aislados como productos de excreción urinarios en ratas, conejos y humanos pero son componentes metabólicos minoritarios. Además, estos metabolitos no son citotóxicos y sólo el metabolito C-4 hidroxí-FT se convierte a 5-FU en

una proporción de un 5% en humanos por la TP. Por lo tanto, el metabolismo del 5-FU parece ser la ruta predominante para el aclaramiento del FT.

Se ha comentado la transformación que ha de producirse desde el profármaco sea cual sea ésta, hasta que tenemos la molécula de 5-FU, pero éste también ha de transformarse para que actúe sobre la célula tumoral, por lo que podremos considerar al 5-FU como un profármaco que requiere la activación a 5-fluoro-2'-deoxiuridina monofosfato (5-FdUMP). Será el 5-FdUMP la molécula encargada de inhibir la replicación de la célula tumoral a través de la inhibición de la TS (TS), un enzima necesario para la síntesis *de novo* de pirimidinas.

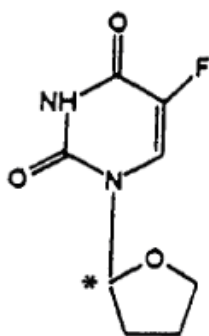
Una vez se tiene el FU en el lugar de acción, el 20% pasará a la ruta del anabolismo para formar metabolitos activos, mientras que el 80% restante se catabolizará para ser degradado. El principal enzima responsable del catabolismo del FU es la DPYD. Se ha demostrado que la expresión de los genes *TS* y *DPYD* en el cáncer gástrico era diferente dependiendo de la diferenciación histológica; mientras el gen *TS* estaba más expresado en adenocarcinomas diferenciados, el gen *DPYD* lo estaba en adenocarcinomas indiferenciados. También se ha visto que al añadir un inhibidor del enzima DPYD tal como el 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina aumentó la cantidad de 5-FU formado. Polimosfismos en este enzima disminuirán ó eliminarán su actividad, con lo que el fármaco se metabolizará en menor medida ó no se metabolizará, con el consecuente aumento de la actividad y/ó posible toxicidad.

Con el objetivo de mejorar el índice terapéutico del FT, se preparó una formulación especial de FT, denominada UFT, una mezcla de FT y uracilo (U) en proporciones molares de 1:4. El uracilo (U) actúa como un modulador del catabolismo del FU. Siendo, como se ha comentado anteriormente, un substrato natural para el enzima DPYD, éste compite con el FU (en la forma de FT). Debido a que su concentración molar es mucho más elevada que la de FU (en la forma de FT, sólo una pequeña cantidad de FU se degradará por la DPYD y por lo tanto será más disponible a la ruta anabólica de activación. Por lo tanto, la coadministración de FT (lenta liberación de FU en el organismo) y U (degradación reducida de FU) produce una reserva constante de FU y de sus metabolitos activos, minimizando tanto la producción de metabolitos inactivos como de metabolitos potencialmente tóxicos. El uracilo modula bioquímicamente el 5-FU inhibiendo la DPYD, conduciendo a concentraciones más elevadas de 5-FU en sangre y mayor actividad antitumoral. Se comprobó que en pacientes que recibieron dosis equimolares de FU por infusión continua (en este caso 250 mg/m<sup>2</sup>/día durante 5 días) ó UFT oral (370 mg/m<sup>2</sup>/día durante 28 días), se obtuvo una exposición al FU similar medida como área bajo la curva (AUC). Además, este estudio de-

mostró una prolongada vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ) de FU después de la administración oral de UFT. Estudios recientes demuestran que el tratamiento con UFT fue bien tolerado y tuvo actividad significativa en pacientes con cánceres de colon, estómago y mama.

Mientras el 5-FU no tiene un centro de rotación, FT contiene un carbón asimétrico en la posición 2' del anillo tetrahidrofurano y tiene dos estereoisómeros, el R-FT y el S-FT.

Dependiendo de una configuración u otra, la molécula tendrá mayor disponibilidad a ser atacada por determinados enzimas y producirse ciertas reacciones. El R-FT se metaboliza 5,6 veces más rápido que el S-FT por los microsomas del hígado por lo que su vida media ( $t_{1/2}$ ) es menor y existirá eliminación preferencial de este isómero. De esta manera, la cantidad de FU formado a partir del profármaco será mayor para el compuesto racémico, seguido por el R-FT (debido a esta rapidez en su metabolización) y, por último, el S-FT. Sin embargo, las concentraciones en el plasma así como su concentración máxima ( $C_{max}$ ) y el tiempo necesario para conseguir esta  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ) fueron similares para los dos isómeros, por lo que no presentan diferencias importantes en cuanto a su cinética de absorción. La vida media ( $t_{1/2}$ ) del estereoisómero S-FT fue similar a la del compuesto racémico que indicó que la cinética del racemato es gobernada por el S-FT, mientras que la vida media del FU es similar a la del estereoisómero S-FT. La inhibición en el crecimiento del tumor se produjo en mayor medida en el estereoisómero S-FT seguido del R-FT y, por último del racémico [39].



**Estructura del tegafur.**

A continuación se muestran varias tablas en las que se pueden observar ensayos en fase I de pacientes tratados con UFT, en fase II para pacientes con cáncer colorectal tratados con UFT, en fase I y II tratados en combinación con otros agentes para cáncer colorectal, ensayos en fase I y II

tratados con UFT en combinación con LV ó LV junto a radioterapia, y, por último, ensayos en fase II en pacientes con cáncer gástrico combinado con otros agentes.

Ensayos en fase I en pacientes tratados con UFT:

Estudios	Número de pacientes evaluados	MTD del UFT	Dosis de LV	Principales efectos adversos	Dosis recomendada para la fase II
Muggia <i>et al.</i> (1996) [40]	26	400 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>a</sup>		fatiga diarrea náuseas	400 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>a</sup>
Pazdur <i>et al.</i> (1996) [41]	19 23	800 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup> 400 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup>		granulocitopenia diarrea	800 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup> 360 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup>
Spicer <i>et al.</i> (1991) [42]	14	300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>d</sup>	20 mg/m <sup>2</sup> iv los días 1,8,15,22 a partir del 2 <sup>o</sup> ciclo	vómitos estomatitis diarrea leucopenia	
Gonzalez-Baron <i>et al.</i> (1993) [43]	24	390±10mg/m <sup>2</sup> /d <sup>e</sup>	d1: 500 mg/m <sup>2</sup> iv d2-d14: 30 mg/d oral	estomatitis diarrea epigastralgia	mg/m <sup>2</sup> /d <sup>e</sup>
Meropol <i>et al.</i> (1996) [44]	26	350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup>	60+45+45mg/d en 3 dosis ora- les	diarrea náuseas,vómitos fatiga	350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup>
Pazdur <i>et al.</i> (1997) [45]	14	350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>f</sup>	150 mg/d en 3 dosis orales	diarrea	350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>f</sup>
Pazdur <i>et al.</i> (1998) [46]	18	350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup>	150 mg/d en 3 dosis orales	diarrea	300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup>

**MTD:** “Maximum tolerated doses”(Máxima dosis tolerada)

- a : administrado oralmente durante 28 días en 3 dosis diarias cada 6 semanas
- b : administrado oralmente durante 5 días en 3 dosis diarias cada 3 semanas
- c : administrado oralmente durante 28 días en 3 dosis diarias cada 5 semanas
- d : administrado oralmente durante 28 días cada 5 semanas
- e : administrado oralmente durante 14 días en 2 dosis diarias cada 4 semanas
- f : administrado oralmente durante 14 días en 3 dosis diarias cada 4 semanas

Ensayos en fase II en pacientes tratados con UFT en cáncer colorectal:

Estudios	Nº de pacientes evaluados	Dosis de UFT	Dosis de LV	Tasa de respuesta (95% IC)	MDR MST	Principales efectos adversos
Malik <i>et al.</i> (1990) [47]	36	600 mg/d <sup>a</sup>		17% (6%-33%)	MST 34 sem.	erupción cutánea
Pazdur <i>et al.</i> (1994) [48]	45	300-350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup>	150 mg/d en 3 dosis orales	42% (28%-58%)	MST 15,8 m	diarrea
Saltz <i>et al.</i> (1995) [49]	20	350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup>	15 mg/d en 3 dosis orales	25% (6%-44%)	MDR: 7 m MST: 12+m	diarrea mucositis
Gonzalez-Baron <i>et al.</i> (1995) [50]	75	390 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>d</sup>	d1:500 mg/m <sup>2</sup> iv d2-d14: 30 mg/d oral	39% (28%-50%)	MDR: 10 m MST: 13,5 m	diarrea mucositis náuseas, vómitos Abad <i>et al.</i> (1997) [51] 77(≥72a) 400 mg/d 45 mg/d 17% (9%-27%) MST 14,4 m náuseas, vómitos, diarrea Feliu <i>et al.</i> (1997) [52] 38 (>70a) 390 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>d</sup> d1: 500 mg/m <sup>2</sup> iv d2-d14: 30 mg/d oral 29% (15%-46%) MDR 9m MST 12,5 m diarrea, mucositis, náuseas, vómitos



Meropol <i>et al.</i> (1999) [53]	18 cáncer colorectal resistente a bolo de FU	300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup>	90 mg/d en 3 dosis orales	0%		diarrea pancreatitis náuseas, vómitos hiperbilirubine- mia
Aranda <i>et al.</i> (1999) [54]	111	300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup>	150 mg/d en 3 dosis orales	21% (14%-30%)	MST 13m	diarrea nauseas, vómitos
Lin <i>et al.</i> (2000) [55]	40	300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup>	30+15+ 15 mg/d en 3 dosis orales	33% (18%-47%)		náuseas,vómitos diarrea
Ichikawa <i>et al.</i> (2000) [56]	20	400 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>e</sup>	15 mg/d en 3 dosis orales	35% (14%-56%)	MDR: 95d MST: 228+d	diarrea mucositis

**MDR:** “Median duration of response”(Duración media de respuesta); **MST:** “Median survival time”(Tiempo de supervivencia medio)

a : administrado oralmente en 3 dosis diarias; duración media de tratamiento:10 semanas

b : administrado oralmente durante 28 días en 3 dosis diarias cada 5 semanas

d : administrado oralmente durante 14 días en 2 dosis diarias cada 4 semanas

e : administrado oralmente 2 dosis diarias durante 5 días, seguido por un período de 2 días de descanso, cada 4 semanas

Resultados recientes de ensayos en fase I/II y en fase II en pacientes tratados con UFT combinado con otros agentes anticáncer para carcinoma colorectal :

Estudios	MTD ó dosis escaladas	Dosis de LV	Toxicidades dependientes de dosis	Número de pacientes evaluados Tasa de respuesta Tiempo de supervivencia media (MST)	Dosis recomendadas para fase II
----------	-----------------------	-------------	-----------------------------------	---	---------------------------------

Hill <i>et al.</i> (2000) [57]	UFT 250 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>a</sup> CPT-11 300 mg/m <sup>2</sup> <sup>b</sup>	90 mg/d oral <sup>a</sup>	fiebre neutropénica diarrea	16(UFT 250mg/m <sup>2</sup> /d <sup>a</sup> CPT-11 250 mg/m <sup>2</sup> <sup>b</sup> ) 25%	UFT 250 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>a</sup> LV 90 mg/d oral CPT-11 250 mg/m <sup>2</sup> <sup>b</sup>
Escudero <i>et al.</i> (2000) [58]	UFT 250 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup> CPT-11 120 mg/m <sup>2</sup> <sup>d</sup>		diarrea fatiga	18 0%	UFT 250 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup> CPT-11 110 mg/m <sup>2</sup> <sup>d</sup>
Gravalos <i>et al.</i> (2000) [59]	UFT 300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>e</sup> CPT-11 300 mg/m <sup>2</sup> <sup>f</sup>	45 mg/d <sup>e</sup>	diarrea	13 54%	
Mel <i>et al.</i> (2000) [60] Vazquez Estevez <i>et al.</i> (2000) [61]	UFT 200-350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>g</sup> raltritexato 2-3 mg/m <sup>2</sup> <sup>h</sup>		diarrea	28 21%	
Dorta <i>et al.</i> (2000) [62]	UFT 390 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>i</sup> oxaliplatino 85 mg/m <sup>2</sup> <sup>j</sup>	d1:250 mg/m <sup>2</sup> 2h infusion iv d2-d14:15mg/d oral	diarrea náuseas, vómitos	34 35%	UFT 300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>i</sup> LV d1:250 mg/m <sup>2</sup> 2h infusion iv
Jakobsen <i>et al.</i> (2001) [63]	UFT 300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>k</sup> hidroxiurea 0,5 g/d <sup>k</sup>	levoLV 22,5 mg/d <sup>k</sup>	gastrointestinal	63 22% MST 11m	

a : administrado oralmente durante 14 días cada 3 semanas

b : administrado i.v. en día 1 cada 3 semanas

c : administrado oralmente durante 21 días en dosis diarias divididas cada 4 semanas

d : administrado en infusión i.v. durante 60 minutos los días 1, 8 y 15 cada 4 semanas

e : administrado oralmente durante 14 días en 3 dosis diarias durante 3 semanas

f : administrado en infusión i.v. durante 90 minutos en día 1 cada 3 semanas

g : administrado oralmente durante 28 días en 3 dosis diarias cada 6 semanas

h : administrado en infusión i.v. durante 15 días los días 1 y 21 cada 6 semanas

i : administrado oralmente durante 14 días en 2 dosis diarias cada 4 semanas

j : administrado los días 1 y 14 cada 4 semanas

k : administrado oralmente durante 28 días cada 5 semanas

Ensayos en fase I y II en pacientes con carcinoma rectal tratados con UFT combinado con LV ó LV y radioterapia :

<b>Estudios</b>	<b>Dosis UFT</b>	<b>Otro compuesto y/ó tratamiento administrado</b>	<b>Toxicidades dependientes de dosis</b>	<b>Número de pacientes evaluados Tasa de respuesta (95% IC)</b>	<b>Dosis recomendada para fase II</b>
Sanchiz & Milla [64]	600 mg/m <sup>2</sup> <sup>a</sup>	LV 90 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>a</sup>	leucopenia	52 40%	
de la Torre <i>et al.</i> (1999) [65]	300 mg/m <sup>2</sup> /d d8-d35	LV 30mg/d oral d8-d35 radioterapia 45Gy	diarrea	32 82%	
Feliu <i>et al.</i> (1999)[66]	300 ó 350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup>	LV d1:500 mg/m <sup>2</sup> infusion iv d2-d14:30 mg/d oral radioterapia 45Gy	diarrea vómitos mucositis	28 71% (54%-86%)	UFT 300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup> LV d1:500 mg/m <sup>2</sup> infusion iv d2-d14: 30 mg/d oral radioterapia 45Gy
Pfeiffer <i>et al.</i> (2000) [67]	150-300 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup>	levoLV 22,5 mg/d <sup>c</sup>	diarrea	18 89% pacientes vivos después de una media de 45 sem	
Hoff <i>et al.</i> (2000) [68]	250-400 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>d</sup> preoperativo	LV 90 mg/d <sup>d</sup> radioterapia 45Gy preoperativo	diarrea anorexia náuseas	14 21% (respuesta completa) <sup>e</sup>	UFT 350 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>d</sup> LV 90 mg/d <sup>d</sup> radioterapia 45Gy preoperativo

a : administrado oralmente durante 14 días en 3 dosis diarias cada 4 semanas

b : administrado oralmente durante 14 días en 2 dosis diarias cada 4 semanas, 3 ciclos

c : administrado oralmente en 3 dosis diarias durante 5 días (mismos días que la radioterapia) seguido por un descanso de 2 días

d : administrado oralmente en 3 dosis diarias durante 5 días (mismos días que la radioterapia)  
seguido por un descanso de 2 días durante 5 semanas consecutivas  
e : evaluación patológica de especímenes quirúrgicos

Estudios clínicos en fase II en pacientes con cáncer gástrico tratados con UFT y otros agentes anticáncer :

Estudios	Número de pacientes evaluados	Dosis de UFT	Otro/s compuestos administrado/s	Tasa de respuesta (95% IC)	MDR MST	Principales efectos adversos
Malik <i>et al.</i> (1990) [47]	18	600 mg/d <sup>a</sup>		6%(0,3%-30%)	MST 12sem	erupción cutánea
Hashimoto <i>et al.</i> (1993) [69]	13	400 mg/d d8-28	cisplatino 50 mg/d infusión continua d1-2 FU 500-750 mg/d infusión continua d2-7	31%		anorexia náuseas,vómitos leucocitopenia
Jin <i>et al.</i> (1994) [70]	93	450 mg/d	mitomicina C 20 mg iv 1 vez a la semana	60%		debilidad leucopenia
Sato <i>et al.</i> (1995) [71]	14	400 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>b</sup>	cisplatino 30 mg/m <sup>2</sup> iv durante 3 días cada 4 semanas	43%	MST 11,4m	anorexia diarrea náuseas,vómitos leucocitopenia
Feliu <i>et al.</i> (1996) [72]	46	390 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>c</sup>	VP16 d1:100 mg/m <sup>2</sup> iv d2,d3:200 mg/m <sup>2</sup> oral LV d1:500 mg/m <sup>2</sup> iv d2-d14:30 mg/d oral	35%(22%-51%)	MDR: 10m MST: 9m	diarrea anemia nauseas,vómitos

Kim <i>et al.</i> (1996) [73]	14	480 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>d</sup>	LV 25 mg/m <sup>2</sup> /d oral	29%(5%-52%)	MST:25 sem	diarrea mucositis náuseas,vómitos
Kim <i>et al.</i> (1997) [74]	37	360 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>d</sup>	LV 25mg/m <sup>2</sup> /d oral	27%(15%-43%)	MDR:30 sem MST:30 sem	diarrea mucositis náuseas,vómitos
Kim <i>et al.</i> (2000) [75]	46	360 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>d</sup>	d1 epirubicina 50 mg/m <sup>2</sup> y cisplatino 60 mg/m <sup>2</sup> iv d1-d21 LV 45 mg/d oral	54%(40%-69%)	MST: 10m	leucopenia náuseas,vómitos mucositis diarrea
Chaves <i>et al.</i> (2000) [76]	16	d1 300 mg/d	epirubicina 50 mg/m <sup>2</sup> y cisplatino 60 mg/m <sup>2</sup> iv	19%	MST: 10m	neutropenia náuseas,vómitos alopecia
Sato <i>et al.</i> (2000) [77]	41	400 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>e</sup>	d8 cisplatino 80 mg/m <sup>2</sup> iv	51%(35%-67%)	MDR:85d MST:8,3m	neutropenia

a : administrado oralmente en 3 dosis diarias; duración media del tratamiento: 6 semanas

b : administrado oralmente durante 28 días

c : administrado oralmente durante 14 días cada 4 semanas

d : administrado oralmente durante 21 días en dosis diarias divididas cada 4 semanas

e : administrado oralmente durante 21 días en 2 dosis diarias cada 4 semanas

Seguidamente se pasarán a comentar algunas características sobre el enzima citidina deaminasa (CDA). Este enzima interviene en la conversión del profármaco capecitabina (CAP) en su metabolito activo FU, pero no en el FT, aunque sí se cree que participa indirectamente en algún punto en el desencadenamiento de procesos que favorecen el desarrollo del cáncer. La CAP es metabolizada en principio por la carboxilesterasa en el hígado pasando a 5'-deoxi-5-fluorocitidina (5'dFCR), que, a su vez, se transforma bien sea en el hígado ó en la célula tumoral por la CDA (que se encargará de convertir el derivado citidínico en derivado uridínico) en 5'-deoxi-5-fluorouridina (5'dFUrd). El 5'dFUrd pasa también en el hígado ó en la célula tumoral por la TP a FU. Polimorfismos en el gen que codifica para la CDA, cuando se administra capecitabina, harán

disminuir la actividad del enzima ó lo inactivarán, con lo que no habrá paso del profármaco a FU y no actuará el fármaco. También se pueden dar polimorfismos en la TP que influyan en la conversión del profármaco FT y, en concreto de la 5'-deoxi-5-fluorouridina (5'dFUrd) en FU.

Se ha visto que la CDA provoca resistencia a los análogos nucleosídicos de la citosina al degradarse por esta vía, similar a lo que ocurre con la DPYD, que es el gen encargado del metabolismo ó degradación del FU. Sin embargo, también se sabe que estos compuestos presentan toxicidad hematopoiética que limita su efectividad en la terapia del cáncer.

Una estrategia para prevenir esta toxicidad sería insertar un gen para la resistencia del fármaco en las células de la médula ósea.

La CDA puede deaminar e inactivar 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA-CDAR), 2',2'-difluorodeoxicitidina (dFdC) y citosina arabinósido (ARA-C).

Por otro lado, se ha visto que el enzima CDA existe a nivel de las células del hígado y en las células del tumor.

Si al aplicar un inhibidor de la CDA estos compuestos tienen mayor efectividad, hace pensar que en las células del tumor existe este enzima. Por lo tanto, si en las células del tumor existe CDA, para prevenir la resistencia a estos análogos nucleosídicos de citosina, se puede administrar un inhibidor de la CDA, el 3, 4, 5, 6-tetrahidrouridina (THU). Existen además, nucleósidos derivados de pirimidina, que son reducidos por el mismo proceso que para el THU, que son también potentes inhibidores de la CDA. No se ha estudiado si el FT ó alguno de los productos intermedios de su degradación, así como el 5-FU, pueden actuar como inhibidores de la CDA pero podría ser factible que actuara mediante este mecanismo. En el caso del profármaco CAP, si se administrara un inhibidor de la CDA (en este caso el 5-FU en el caso que actuara como tal) estaríamos evitando su conversión al fármaco activo (5-FU) y por lo tanto que fuese efectivo el tratamiento. Esto no ocurre con el FT ya que este enzima no interviene en el paso de fármaco inactivo al fármaco activo.

Otro de los procesos que hacen que la actividad del enzima disminuya ó se inhiba es la existencia de polimorfismos en el gen que codifica para este enzima, que es objeto de nuestro estudio.

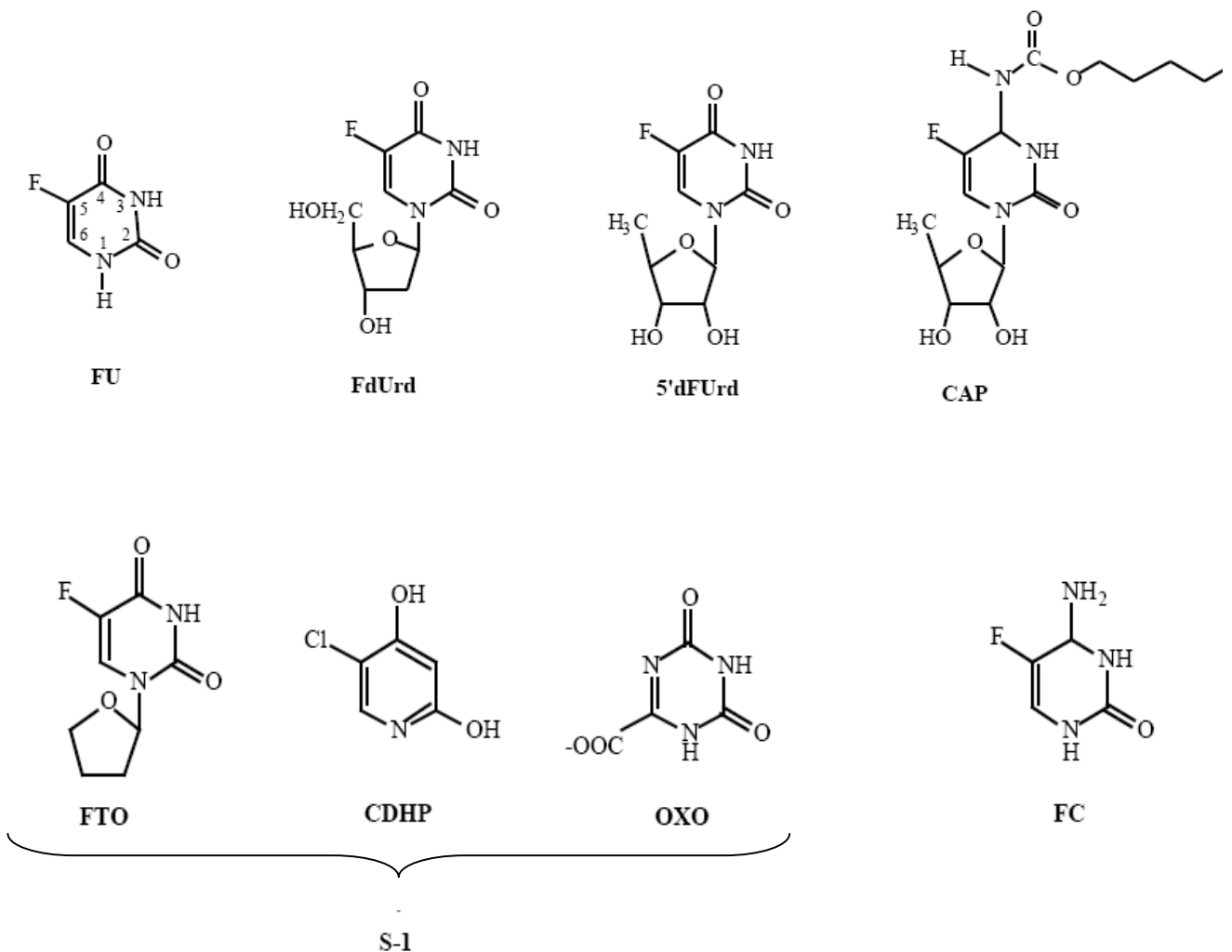
Independientemente del tratamiento aplicado, la alta expresión del enzima CDA es una característica de mal pronóstico en leucemias linfocíticas crónicas (CLL). Este hecho no ha sido estudiado para cáncer gástrico.

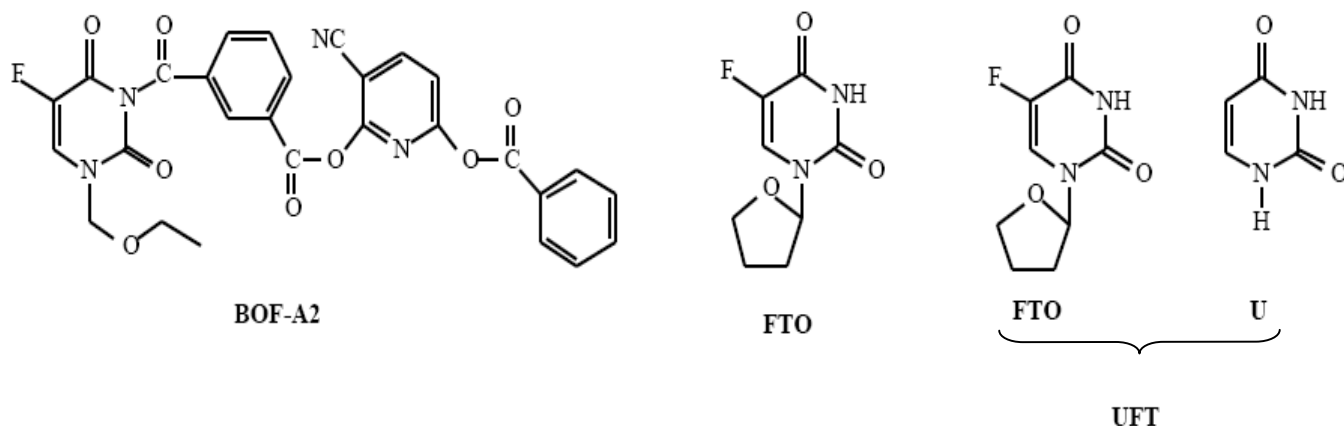
Existen numerosos ensayos posteriores a los enumerados en los que se ha estudiado la supervivencia variando los regímenes donde participaba el FT. Existe, por ejemplo un estudio publicado

en 2003, en el que se combinaba FT junto a mitomicina y se comparaba con un grupo que sólo había recibido como tratamiento adyuvante, mitomicina. Se demostró que la supervivencia era mayor cuando se administraba TG-MMC que la mitomicina sola, cuando el estadio era menor, con ganglios linfáticos negativos y el hecho de ser mujer frente a los varones.

En otro estudio del mismo año, se estudió la influencia que ejercía la expresión de la proteína TS en la eficacia del tratamiento con FT y mitomicina ó mitomicina sola.

### 1.4.3. OTROS PROFÁRMACOS DEL 5-FU

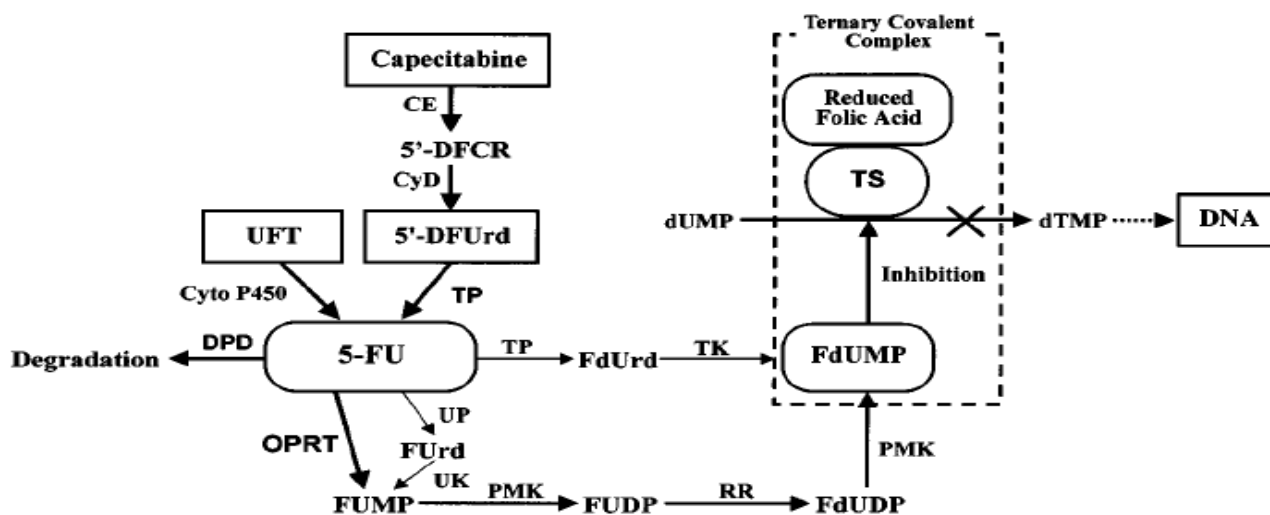




### Estructura del 5-FU y sus profármacos

Se han desarrollado nuevos agentes que parecen aumentar los efectos citotóxicos del 5-FU administrado oralmente sin potenciar los efectos tóxicos.

Estos agentes son clasificados como pirimidinas fluoradas ó fluoropirimidinas e incluyen CAP, un profármaco del 5-FU que se convierte en 5-FU en los tejidos del tumor; eniluracilo (etiniluracilo), un inhibidor selectivo irreversible de la DPYD; uracilo combinado con FT (florafur, FT-207, FTO) ó UFT, un inhibidor no selectivo de la DPYD y dos menos desarrollados pero prometedores inhibidores de la DPYD, S-1 (BMS-247616) y BOF-A2.



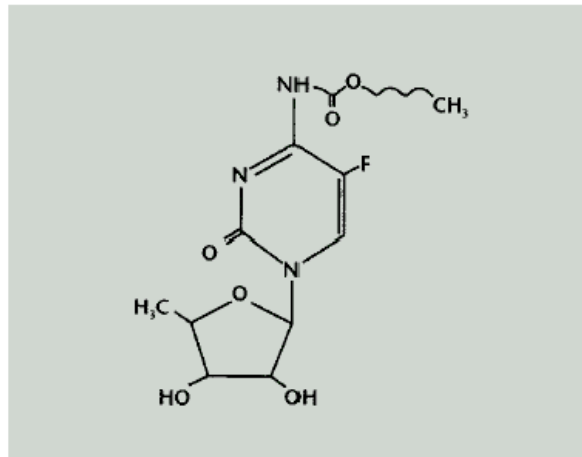
Vías metabólicas del 5-FU y sus prodrogas en relación a la inhibición de la síntesis de DNA



## Capecitabina

Es la N<sup>4</sup>-pentiloxycarbonil-5'-deoxi-5-fluorocitidina, conocida también como Xeloda<sup>®</sup>.

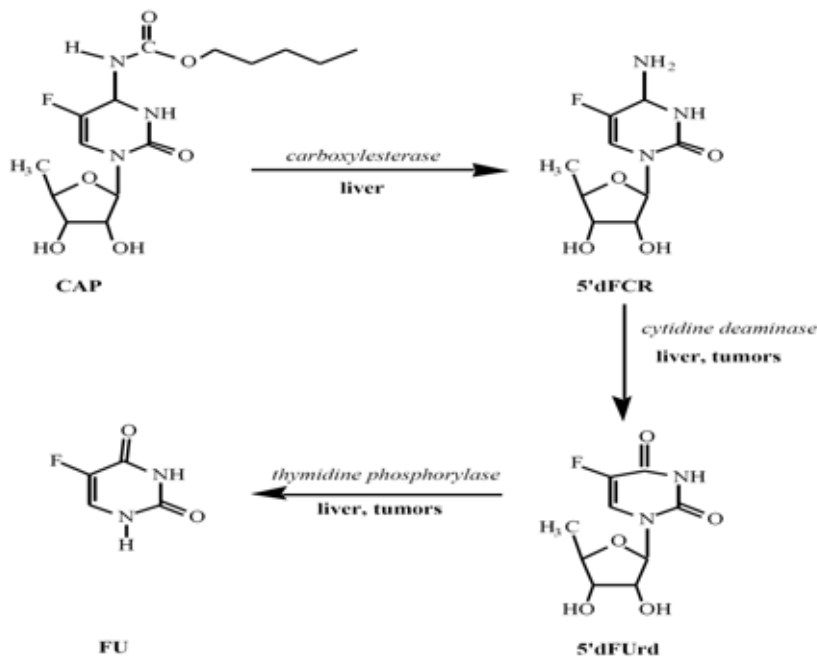
Siguiendo la administración oral, la CAP atraviesa la mucosa gastrointestinal, reduciendo la probabilidad de toxicidad gastrointestinal. Una vez en el hígado, la CAP se convierte en 5'-deoxi-fluorocitidina (5'dFCR) por la carboxilesterasa, que puede ser convertido en presencia de la CDA hepática ó del tumor a 5'-dFUR. En el tumor, el 5'-dFUR se convierte en 5-FU por el factor de angiogénesis TP, denominado también factor de crecimiento endotelial (“platelet-derived endotelial cell growth factor”).



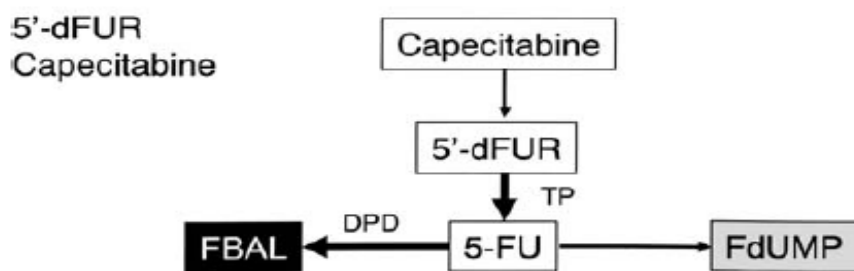
**Estructura química de la capecitabina**

Debido a que la conversión final de la capecitabina a 5-FU ocurre en el tumor, se evita el catabolismo del 5-FU en otros tejidos. Sin embargo, no se previene el catabolismo del 5-FU en el tumor que contiene DPYD.

Siguiendo la administración oral, la capecitabina atraviesa la barrera gastrointestinal reduciendo así la posibilidad de toxicidad gastrointestinal. Una vez en el hígado pasa a 5'dFCR por la carboxilesterasa que, en presencia de la CDA del tumor ó del hígado pasa a 5'dFUrd y finalmente a FU por el factor angiogénico TP.



La eficacia de la capecitabina depende de la conversión del 5'-dFUR a 5-FU por la TP en tejidos del tumor, e, inversamente, con la concentración de DPD del tumor, que cataboliza el 5-FU a metabolitos inactivos.



Debido al metabolismo de la CAP, ésta puede presentar varias ventajas. Una de ellas, ya mencionada anteriormente, se evita el metabolismo del 5-FU en el tracto gastrointestinal, reduciendo el riesgo de la toxicidad típica gastrointestinal inducida por el 5-FU. En segundo lugar, debido a que ciertos tumores contienen elevadas concentraciones de TP, se cree que el 5-FU se libera selectivamente en el tejido del tumor. Sin embargo, las concentraciones de TP en los tejidos del tumor son altamente variables, con lo que la conversión a FU es impredecible.

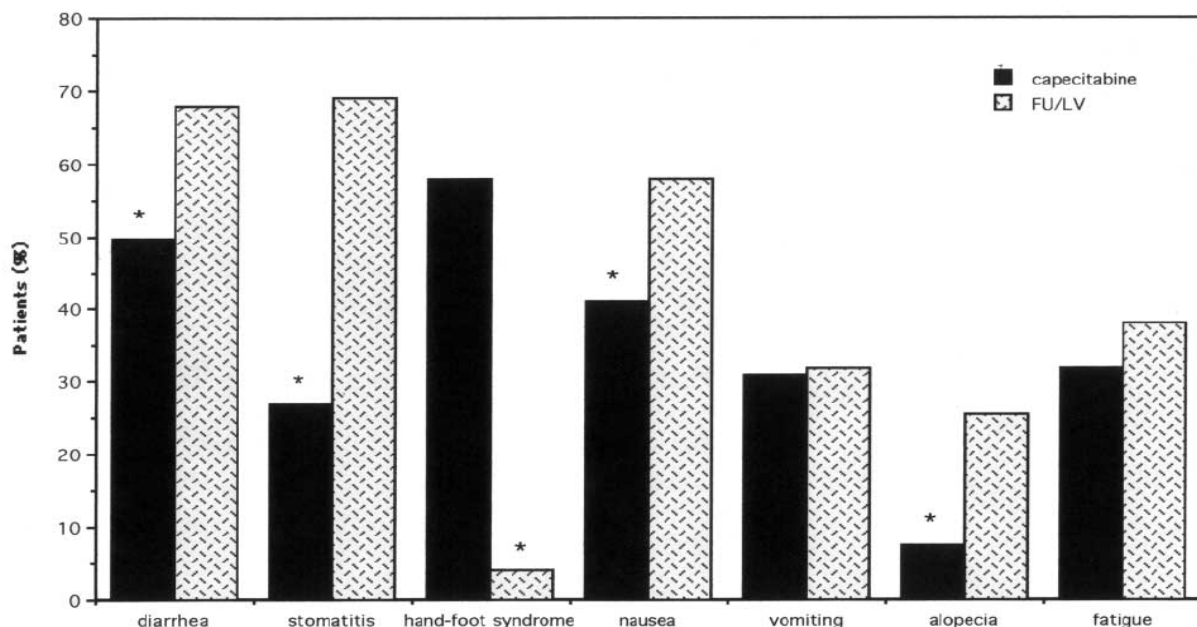
En pacientes con la función hepática comprometida, las concentraciones en plasma de CAP, 5-FU y 5'-dFUR fueron más elevadas, mientras que las de 5'dFCR más bajas.

La eficacia de la CAP debería teóricamente ser optimizada en tumores con altas concentraciones de TP y bajas concentraciones de DPYD.

Se han propuesto varios esquemas de administración que incluyen un esquema de dos veces diarias continuas, así como dosis intermitentes (dos veces diarias durante 14 días y descanso de 7 días) en tumores sólidos múltiples. Se ha estudiado tanto sólo como en combinación con leucovorín. Se ha demostrado efecto antitumoral positivo en cánceres de mama y colorectales, por lo menos igual que en la terapia convencional con FU. Las toxicidades observadas con la administración de CAP fueron de grado 3 a 4 y consistieron para cánceres de mama y colorectales en diarrea, náuseas, dolor abdominal, vértigo y síndrome "hand-foot".

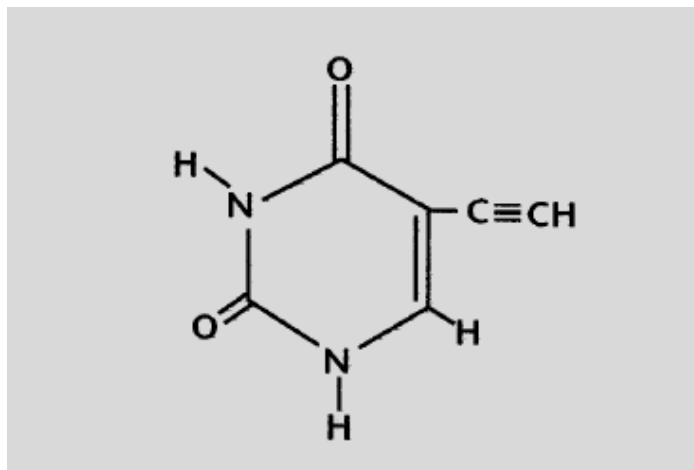
Los resultados de los ensayos en fase II mostraron que la administración de CAP sola tiene eficacia comparable a la combinación de ciclofosfamida, Metotrexato y 5-FU (CMF) en pacientes con cáncer de mama avanzado. Su actividad fue comparable al paclitaxel en pacientes con cáncer de mama. Tiene actividad antitumoral positiva en cáncer colorectal avanzado.

En la siguiente tabla quedan plasmadas las reacciones adversas de la CAP en comparación a la combinación de 5-FU/leucovorín:



**Reacciones adversas de cualquier grado en  $\geq 20\%$  de pacientes tratados con capecitabina ó la combinación de 5-FU/leucovorín. \* $p < 0,0002$ , significativo estadísticamente.**

## Eniluracilo



Estructura química del etiniluracilo

El eniluracilo ó 5-etiniluracilo es un compuesto pirimidínico con estructura similar al uracilo y al 5-FU. Es un potente inactivador del enzima DPYD, que se traduce en un incremento de uracilo en el plasma e inhibición de la actividad metabólica de la DPYD. De esta manera, existe un aumento de la actividad del uracilo y además de su toxicidad. La biodisponibilidad del 5-FU combinado con eniluracilo fue mucho mayor comparado a la que se conseguía con FU sólo. También se vio aumentada la vida media ( $t_{1/2}$ ) de 8 a 22 minutos a 4,5 horas. Debido a la inhibición del DPYD, la principal vía de eliminación fue la renal.

Se da un cambio en la transformación desde la vía catabólica neurotóxica a la vía anabólica citotóxica.

Existen diferentes ensayos en fase I, II y III. Un número de ensayos en fase I y II están evaluando la eficacia de la administración concomitante de eniluracilo y 5-FU en varios cánceres, sobre todo en tumores del tracto gastrointestinal.

Dada la participación en el metabolismo y la biodisponibilidad del 5-FU, la coadministración de eniluracilo con 5-FU podría tener beneficios en la farmacocinética y resultados terapéuticos. Por un lado, todos los pacientes recibirían dosis más bajas de 5-FU oral que el recibido por bolus intermitente ó infusión intravenosa continua. Las variaciones tanto individuales como del tumor por la eliminación del eniluracilo en la DPYD así como la influencia circadiana de esta DPYD desencadenaría una toxicidad previsible en los pacientes, y, especialmente en aquellos que genéticamente les falta la DPYD, además de incrementar el índice terapéutico de 5-FU. La eliminación

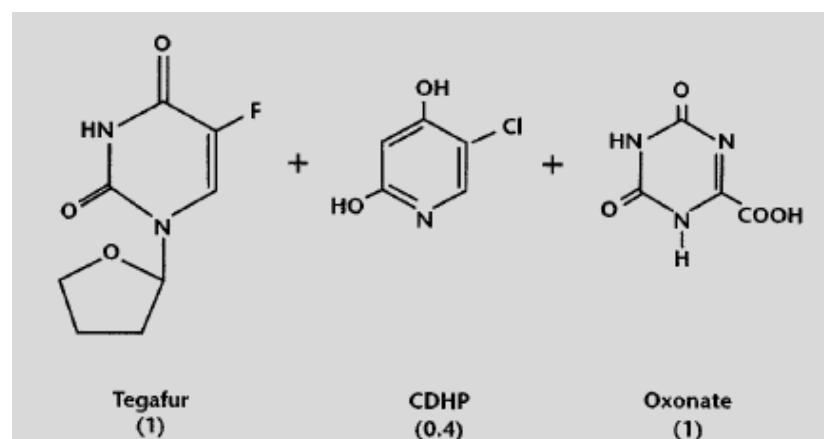
del 5-FU predominantemente por excreción renal en lugar de por metabolismo hepático contribuye a la obtención de mejores métodos de determinar ajustes en la dosis basados en la función renal.

## Emitefur

El BOF-S (EMITEFUR) se trata de la combinación de dos fármacos, el profármaco del 5-FU 1-etoximetil 5-fluorouracilo (EM-FU) y el inhibidor de la DPYD, 3-ciano-2,6-dihidroxipiridina (CNDP) en una ratio molar de 1:1. EM-FU es relativamente resistente a la degradación y es metabolizado a 5-FU por los microsomas del hígado. In vitro, CNDP es aproximadamente 2000 veces más potente que el uracilo en inhibir la degradación del 5-FU, sin apenas afectar las vías anabólicas del 5-FU. Su administración da lugar a una prolongada vida media ( $t_{1/2}$ ) del 5-FU.

## S-1

S-1 es una fluoropirimidina oral que combina el profármaco TG y dos moduladores del 5-FU, el 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina (CDAHP) ó gimeracilo y oxonato de potasio (OXO) u oteracilo, en una ratio molar de 1:0.4:1. Ni CDAHP ni OXO tienen actividad antitumoral por sí mismos. CDAHP es 200 veces más potente que el uracilo en inhibir el enzima DPYD. Esta combinación de agentes farmacológicos resulta en una eficacia antitumoral potente y una baja toxicidad.



Estructura química de S-1. CDAHP= 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina.

La exposición al 5-FU siguiendo la administración del TG está mediada por enzimas microsomales hepáticos, mientras que el CDAHP, un inhibidor competitivo de la DPYD, prolonga la vida media del 5-FU. Se ha visto que el OXO inhibe selectivamente la fosforilación del 5-FU sobre todo a nivel del tracto gastrointestinal, por el enzima orotato fosforibosil transferasa (OPRT) disminuyendo la formación del FUMP de una de las vías anabólicas del 5-FU proporcionando protección del riesgo de padecer diarrea u otras toxicidades gastrointestinales. Los niveles de FUMP se encuentran disminuidos, sobre todo en el intestino delgado, así como los niveles de FU incorporado en el RNA, resultado de esta vía anabólica, aunque se pueden dar vías alternativas.

OXO, además protege la actividad de la TS disminuyendo el FdUMP vía FUMP en tejido gastrointestinal, que conduce a la reducción de la toxicidad gastrointestinal.

S-1 presenta una inhibición en el crecimiento del tumor mucho mayor que la que presenta el UFT y una mayor supervivencia.

Ensayos en fase II han confirmado el gran potencial antitumoral de este compuesto y la baja toxicidad.

#### **1.4.4. EFECTOS ADVERSOS DE LAS FLUOROPIRIMIDINAS**

Las preferencias del paciente, la mejora en la calidad de vida y consideraciones económicas están conduciendo al desarrollo de quimioterapia administrada oralmente. Las pirimidinas fluoradas, que han sido usadas extensamente en Japón, están generando un interés cada vez mayor para proveer un tratamiento adecuado, menos tóxico sin afectar la eficacia. Las toxicidades asociadas a las fluoropirimidinas orales son generalmente bien toleradas. Las fluoropirimidinas orales pueden atenuar las toxicidades secundarias a la inyección del bolus del 5-FU. Además, prolongan la exposición al 5-FU con concentraciones con picos más bajos. Dependiendo de la dosis administrada, la farmacocinética de las fluoropirimidinas orales puede imitar la farmacocinética de la infusión continua de 5-FU [79].

Los perfiles de toxicidad pueden diferir entre los compuestos que compiten con el DPYD ó que inhiben irreversiblemente este DPYD (tales como UFT, eniluracilo, S-1, BOF-A2) y aquellos que no actúan por estos mecanismos (como la CAP).

## EFFECTOS ADVERSOS COMUNES DEL 5-FU Y FLUOROPYRIMIDINAS ORALES

Efecto adverso	5-FU	Capecitabina	Eniluracilo	UFT	S-1	BOFA-2
Diarrea	×	×	×	×	×	×
Naúseas/vómitos	×	×	×			×
Neutropenia	×		×		×	
Mucositis y estomatitis	×	×				
Síndrome “hand foot”		×				
Anemia					×	

5-FU = fluorouracilo; UFT = uracilo + tegafur

UFT y leucovorín no están asociados con una significativa mielosupresión, mucositis, síndrome “hand-foot”, ó alopecia; la diarrea es la toxicidad más destacable. Con la administración crónica de CAP, las toxicidades dependientes de la dosis son la mucositis, diarrea, y síndrome “hand-foot”, que ocurre generalmente después de un mes de tratamiento. Para el eniluracilo y el 5-FU, la supresión de la médula ósea es la toxicidad dependiente de la dosis, siendo la diarrea para S-1 y BOF-A2. Con inyecciones de bolus intermitentes de 5-FU, la toxicidad que se presenta es mielosupresión, y, cuando se administra junto a leucovorín, se da además diarrea, mucositis y neutropenia, de los que aproximadamente el 20-30% de pacientes requieren hospitalización. La administración de 5-FU por infusión intravenosa continua se asocia con estomatitis y síndrome de “hand-foot”.

En la tabla se puede ver cómo la diarrea es el efecto adverso que ocurre más frecuentemente tanto en el 5-FU como en las nuevas fluoropirimidinas orales, que se puede controlar con antidiarreicos, tales como la loperamida ó octreotida.

El tratamiento del síndrome “hand-foot”, observado en estudios con CAP es sintomático, e incluye crema de manos ó posiblemente vitamina B<sub>6</sub> oral.

La prevención de nauseas y vómitos incluye profilaxis con un antiemético, que puede darse en combinación con dexametasona.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2.1. HIPÓTESIS

Se han estudiado genes que participan en varios puntos de la vía del 5-FU, ó bien de progresión de la enfermedad como es en este caso del enzima CDA que convierte el derivado citidínico en uridínico, necesario para la síntesis de DNA, o bien en la metabolización del fármaco, que será responsable que este antineoplásico actúe en mayor ó menor medida al estar en mayor ó menor biodisponibilidad, respectivamente. Se ha hipotetizado que, al participar la enzima CDA en la síntesis de DNA de la célula tanto normal como tumoral, puede tener consecuencias para un paciente con cáncer por encontrarse activada dicha síntesis. Lo mismo ocurre con DPYD que, al intervenir en procesos metabólicos puede relacionarse con la eficacia del tratamiento con 5-FU al participar en la conversión del fármaco activo en metabolito inactivo.

Mientras, para el gen *DPYD*, el hecho de poseer un polimorfismo, supone una pérdida de actividad del enzima, no se producirá la metabolización del fármaco administrado, con la consiguiente mayor biodisponibilidad de éste para su actuación en la célula cancerosa del paciente (y también mayor probabilidad de toxicidad), para el gen *CDA*, supone que habrá una variación en la transformación del derivado citidínico en derivado uridínico con lo que se producirá la síntesis del DNA de la célula cancerosa en mayor ó menor medida.

## 2.2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es analizar polimorfismos de genes y comprobar si están implicados en el metabolismo celular del 5-fluorouracilo, en pacientes con cáncer gástrico, y comprobar si se relaciona con el pronóstico en pacientes tratados con quimioterapia adyuvante.

Se han tomado muestras del tumor de pacientes con cáncer gástrico que han recibido 5-FU (el análogo FT) y se han analizado los polimorfismos de los siguientes genes:

1. *DPYD* Ile543Val
2. *DPYD* Arg29Cys
3. *CDA* Lys27Gln

Mediante la técnica de discriminación alélica por PCR cuantitativa a tiempo real se ha determinado su estatus “wild-type”, heterocigoto u homocigoto para el polimorfismo. Estos cambios se han relacionado con las variables clínicas patológicas y toxicidad.

Se han estudiado estos genes por relacionarse con el metabolismo de estos fármacos y su implicación en otros tipos de cáncer, como en el cáncer colorectal y en leucemias. Se desconoce su acción en cáncer gástrico.

Se quiere demostrar si el hecho de tener un polimorfismo en el gen *DPYD* en un determinado punto de la secuencia de DNA (en concreto en el aminoácido 543 de la secuencia provocando el cambio Ile/Val al existir un cambio de bases A/G ó en el aminoácido 29 de la secuencia de DNA con el cambio Arg/Cys al haber un cambio de una citosina por una timina) y/ó en el gen *CDA* (en el aminoácido 27 de la secuencia del gen con el cambio de dicho aminoácido Lys por Gln al cambiar las bases A/C) es significativo en términos de supervivencia en pacientes con cáncer gástrico que han sido sometidos a gastrectomía parcial ó total y posterior quimioterapia adyuvante. Según sea *DPYD* Ile543Val ó *DPYD* Arg29Cys, el polimorfismo afecta a un nucleótido u otro en la secuencia génica.

Además de ver cómo afecta para cada gen ser homocigoto “wild-type”, heterocigoto ó homocigoto para el polimorfismo, se han estudiado diferentes combinaciones, teniendo en cuenta, ó bien los 3 genes ó 2 de ellos, y se ha comprobado si estadísticamente podía influir en la supervivencia y en la toxicidad después del tratamiento.

### **3. PACIENTES Y MÉTODOS**

### **3.1. PACIENTES. SELECCIÓN DE PACIENTES.**

El estudio se ha llevado a cabo con muestras de anatomía patológica de 53 pacientes consecutivos de cáncer gástrico, diagnosticados, tratados y revisados en el Servicio de Oncología del Hospital Clínic de Barcelona en el período comprendido entre mayo de 1985 y noviembre de 2003 y que han sido motivo de diversas publicaciones.

Se buscaron todas las biopsias a partir de una base de datos prospectiva de Oncología Médica del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona.

Se han revisado las historias clínicas para la obtención de las variables demográficas, clínicas e histopatológicas y se han recuperado muestras de tejido, para estudiar, mediante técnicas de Biología Molecular (BM), la presencia de polimorfismos en los genes *DPYD* y *CDA*.

El estudio realizado en esta tesis se corresponde a un estudio retrospectivo, descriptivo, no aleatorizado.

### **3.2. VARIABLES CLÍNICAS.**

De los 53 pacientes seleccionados con cáncer gástrico se han recogido los datos siguientes:

- Aspectos demográficos como edad, sexo..
- N° de historia.
- Localización del cáncer (antro, cuerpo ó cardias).
- Tipo de cirugía (gastrectomía total ó subtotal) y quién la realizó.
- La existencia ó no de ganglios positivos. En el caso de existir, n° de ganglios positivos.
- Tratamiento aplicado según protocolo terapéutico desarrollado por el Servicio de Oncología del Hospital Clínic de Barcelona. En este caso, el estudio se llevó a cabo con pacientes tratados con cirugía mediante gastrectomía total ó subtotal y quimioterapia basada en FU/MMC.
- El estadio TNM según el protocolo de la AJCC basada en el examen clínico, estudio radiológico mediante radiografía y Tomografía axial computerizada (TAC) del estómago.
- Fecha de inicio de la quimioterapia.
- Fecha de la última visita, sea por exitus, por remisión de la enfermedad, por abandono del tratamiento ó con seguimiento del mismo.

- Fecha de recaída, si la ha habido y en que órgano/s.
- Intervalo libre de enfermedad (Ile): tiempo que ha pasado entre el diagnóstico y la aparición de una nueva lesión local ó la última visita comprobada en el que el paciente estaba libre de enfermedad ó no había sufrido ninguna recaída.
- Supervivencia, que se consideró el tiempo entre el diagnóstico y la muerte del paciente ó hasta la última visita, con ó sin recaída.

Los pacientes sometidos a estudio han sido intervenidos quirúrgicamente mediante gastrectomía total ó parcial. Después de la cirugía, a todos los pacientes se les determinó el estadio según el sistema TNM del “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) publicado en 1988. La resección gástrica fue realizada según la localización del tumor primario y la resección de los nódulos linfáticos, siguiendo la clasificación y normas de la “Japanese Research Society for the Study of Gastric Cancer”. Dependiendo del tipo de intervención, se realiza un tipo de resección u otro. La gastrectomía subtotal se lleva a cabo con resección D1, incluyendo todos los nódulos linfáticos que están a menos de 3 cm desde el tumor primario, clasificados como nódulos linfáticos de Compartimento I. La gastrectomía total necesita de resección D2, incluyendo disección de nódulos linfáticos del Compartimento I y II más esplenectomía. El Compartimento II se compone de los nódulos linfáticos a lo largo de la arteria gástrica izquierda, de la arteria hepática común, alrededor del eje celíaco y a lo largo de la arteria esplénica. Cuando el cáncer se localiza en el tercio más bajo del estómago, los nódulos linfáticos a lo largo de la arteria esplénica se denominan de Compartimento III.

Fueron sometidos a tratamiento adyuvante con quimioterapia, habiendo recibido cuatro ciclos de 20 mg/m<sup>2</sup> de MMC el primer día de tratamiento y 500 mg/m<sup>2</sup> de FT oral del día 1 al 45 del inicio del ciclo cada 6 semanas.

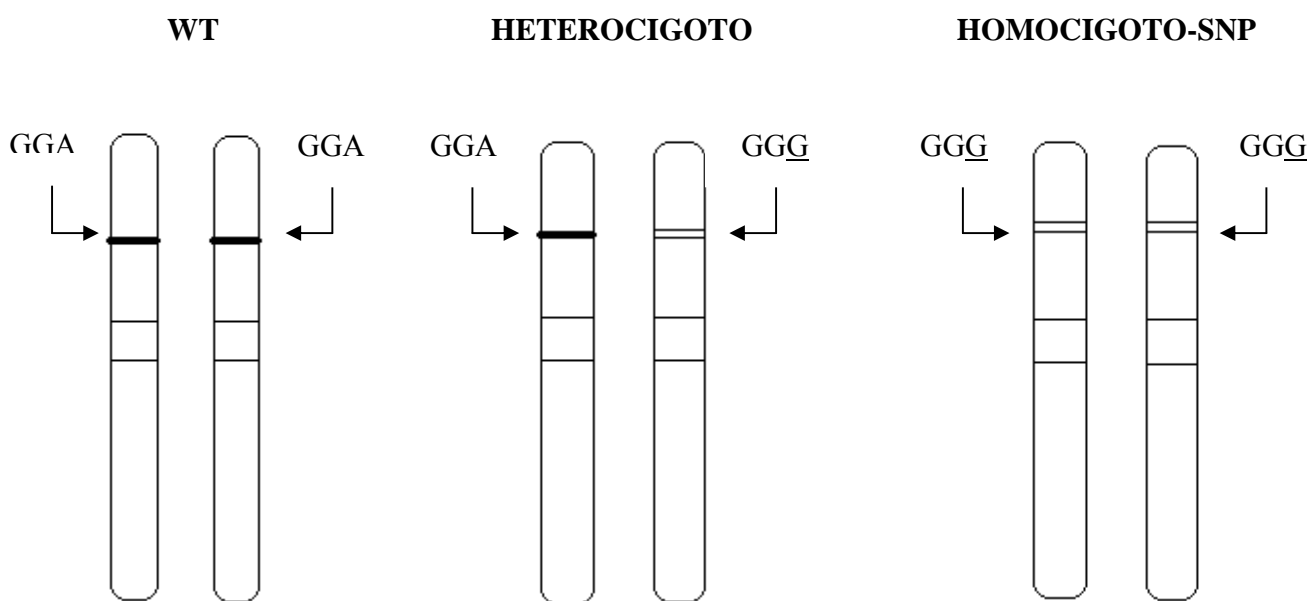
En un principio se dispuso de 60 muestras de cáncer gástrico, de las que 7 fueron excluidas al no haberse realizado en estos pacientes el tratamiento adyuvante completo debido a la negativa del paciente, recidiva precoz ó infección post-operatoria que impidió dicho tratamiento.

### 3.3. MÉTODOS. CONCEPTO DE POLIMORFISMO (SNP).

El estudio se basa en la identificación de polimorfismos en los genes *DPYD* y *CDA* y efecto que provocan en la supervivencia cuando se ha administrado un determinado tratamiento.

Los polimorfismos ó SNPs son variaciones de un solo nucleótido en la cadena de DNA que no implican un fenotipo patológico a diferencia de las mutaciones, que pueden ser cambios de un nucleótido pero que suelen estar asociadas a fenotipos patológicos. Los polimorfismos pueden influir en la efectividad a un determinado tratamiento al actuar sobre enzimas metabolizadores de fármacos, sobre transportadores, dianas de fármacos...

El siguiente sería un ejemplo de polimorfismo:



Los SNPs se pueden localizar en cualquier zona del genoma. Su importancia fenotípica dependerá de la localización del SNP:

- Zona promotora:
  - Aumento de la expresión génica.
  - Reducción de la expresión génica.
- Zona exónica:
  - Missense (la variación de una base supone cambio de aminoácido en la proteína resultante).

- Nonsense (cambio de base que trunca la síntesis proteica).
  - Silentes (cambio de base que no cambia ningún aminoácido en la proteína resultante).
- Zona intrónica:
- Sin efectos.
  - Efectos si se producen en áreas de splicing.

### **3.4. TÉCNICAS DE LABORATORIO.**

#### **3.4.1. MATERIAL DE ESTUDIO**

A partir de 53 muestras parafinadas de tumores gástricos, se ha procedido a la extracción del DNA. Previamente a su extracción, y a partir de las biopsias, se han efectuado 8-10 cortes del tejido parafinado de 5-6  $\mu\text{m}$ , que se han colocado en tubos eppendorf estériles y conservado en el congelador.

#### **3.4.2. EXTRACCIÓN DE DNA DE TEJIDO PARAFINADO**

Este proceso, basado en el Qit Qiagen y siguiendo el protocolo del fabricante:

- I– Desparafinación del tejido.
- II– Lisis del tejido.
- III– Purificación de restos de materia orgánica.

I– Desparafinación del tejido:

- 1 – Añadir 1200  $\mu\text{l}$  de xilol a cada una de las muestras para eliminar la parafina.
  - 2 – Vórtex fuerte durante 15-30 segundos.
  - 3 – Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
  - 4 – Eliminar el sobrenadante con pipeta sin tocar el pellet.
  - 5 – Añadir 1200  $\mu\text{l}$  de alcohol absoluto.
  - 6 – Vórtex fuerte durante 15-30 segundos.
  - 7 – Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
  - 8 – Eliminar sobrenadante con pipeta sin tocar el pellet, e
- } Como mínimo 2 veces para  
eliminar los restos de xilol



- 9 – incubar los tubos con la muestra en el baño a 55°C durante 5-10 minutos para eliminar los restos de alcohol y vigilar hasta que éste se evapore.

## II – Lisis del tejido:

- 10 – Resuspender el pellet en 180 µl de Buffer ATL.
- 11 – Añadir 20 µl de proteinasa K a cada una de las muestras.
- 12 – Vórtex fuerte durante 15 segundos.
- 13 – Incubar a 55°C durante toda la noche.
- 14 – Conectar un baño a 70°C sin apagar el de 55°C.
- 15 – Vórtex fuerte durante 15 segundos.
- 16 – Añadir 200 µl de Buffer AL.
- 17 – Vórtex fuerte durante 15 segundos.
- 18 – Incubar de las muestras a 70°C durante 10 minutos.
- 19 – Añadir 200 µl de Etanol absoluto hasta conseguir una solución homogénea.
- 20 – Vórtex fuerte durante 15 segundos.
- 21 – Pasar todo a una columna.
- 22 – Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto,
- 23 – Descartar filtrado ó tubo colector.

## III – Purificación de restos de materia orgánica:

- 24 – Añadir 500 µl de Buffer AW1.
- 25 – Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
- 26 – Descartar filtrado ó tubo colector.
- 27 – Añadir 500 µl de Buffer AW2,
- 28 – centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos.
- 29 – Descartar el tubo (para asegurar que no queda etanol).
- 30 – Centrifugar de la columna vacía durante 1 minuto a 14000 rpm.
- 31 – Pasar la columna a un tubo de 1,5 ml.
- 32 – Añadir 100 µl de Buffer AE precalentado a 55°C.
- 33 – Incubar las muestras a 55°C durante 5 minutos.

34 – Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.

### **3.4.3. ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL DNA**

- 1– Electroforesis en geles de agarosa.
- 2– Cuantificación espectrofotométrica.

- 1– Electroforesis en geles de agarosa:

Se preparan geles de agarosa al 1% en tampón TBE, se tiñen con bromuro de etidio y se transfieren electroforéticamente a 110 V durante 15 minutos.

- 2– Cuantificación de las muestras:

Mediante espectrofotómetro se cuantifican por duplicado las concentraciones de DNA. Se calcula la media de los dos valores, tanto de la concentración como de las ratios. Para que los valores se consideren correctos, la ratio nos ha de dar un valor entre 1,8-1,9. Con estos valores se considerará que el DNA está en condiciones de análisis.

### **3.4.4. DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Con la finalidad de trabajar con cantidades homogéneas de DNA se ha procedido a diluir las muestras en agua bidestilada. Se han homogeneizado todas las muestras a 50 ng/ml.

### **3.4.5. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA POR PCR CUANTITATIVA A T REAL**

Selección de primers:

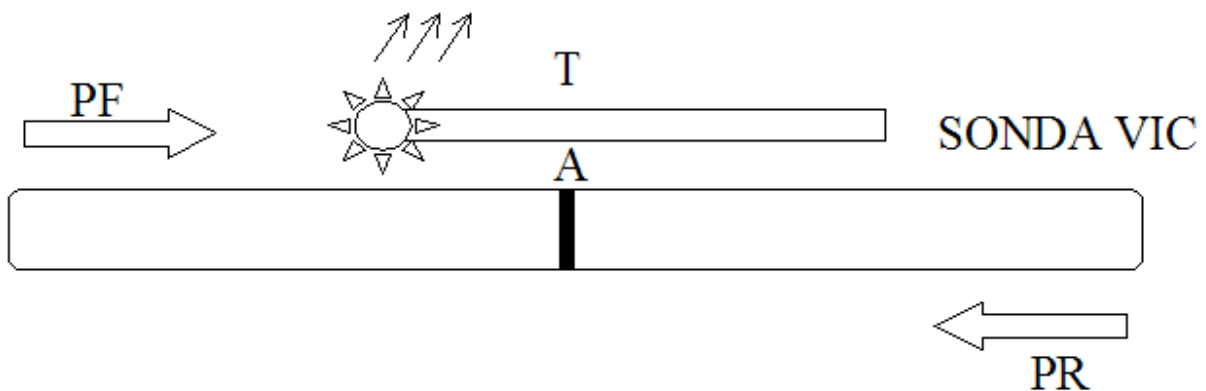
Se han escogido tres polimorfismos para el estudio, dos pertenecientes al gen *dihidropirimidina dehidrogenasa*, y otro polimorfismo perteneciente al gen *citidina deaminasa*.

En la tabla anterior se pueden observar cada una de las posiciones de cada uno de los polimorfismos en la secuencia de DNA y el cambio de base que supone en los tres casos también un cambio de aminoácido.

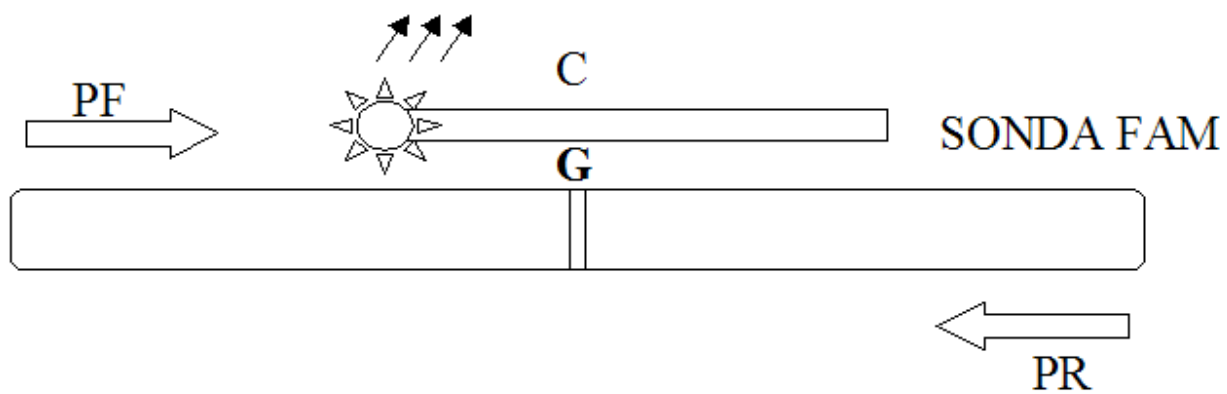
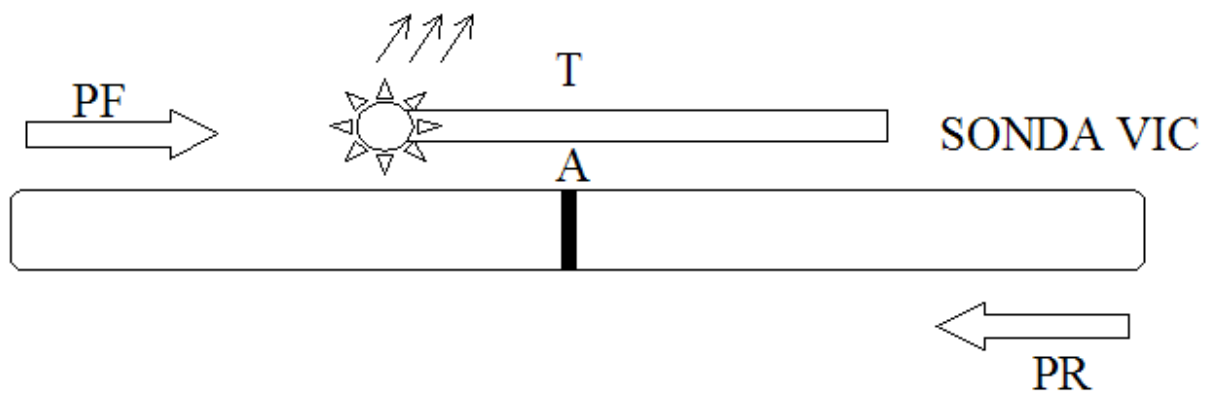
GEN	CROMOSOMA	POSICIÓN	CODÓN WT	AA	CODÓN SNP	AA	GENOTI- POS
<i>DPYD</i>	1p22	Exón 13	ATA	543Ile	GTA	Val	AA AG GG
<i>DPYD</i>	1p22	Exon 2	CGT	29Arg	TGT	Cys	CC CT TT
<i>CDA</i>	1p36.2-p35	Exón 1	AAG	27Lys	CAG	Gln	AA AC CC

La técnica usada en el estudio ha sido una amplificación por PCR de las muestras de DNA. La detección del polimorfismo en el DNA del paciente se realiza mediante lectura láser en sistema ABI Prism 7500 de Applied Biosystems. En el DNA de los individuos se pueden detectar estas variaciones en la secuencia de DNA para el gen que se quiere estudiar y en determinada posición, que precisará además de un sistema de Primers y sondas marcadas con fluorocromos que son liberados durante la PCR y leídos por el sistema láser.

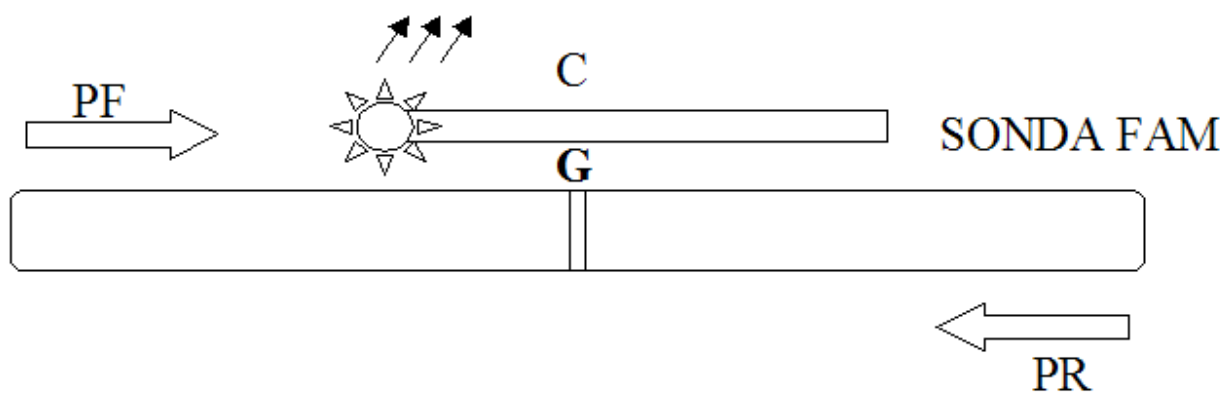
#### DETECCIÓN POBLACIÓN WT



## DETECCIÓN POBLACIÓN HETEROCIGOTA



## DETECCIÓN POBLACIÓN HOMOCIGOTA SNP

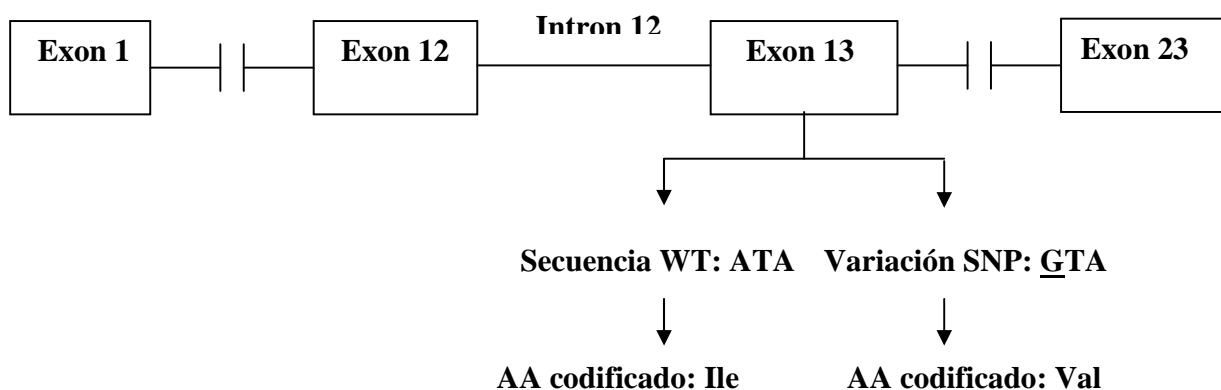


Mediante esta técnica se consigue, por un lado la discriminación alélica y por otro, la cuantificación de las cadenas homocigotas wild-type, las homocigotas para el polimorfismo y las heterocigotas para los tres tipos de SNP, dos de ellos en el gen *DPYD* (*dihidropirimidina dehidrogenasa*) y otro para el gen *CDA* (*citidina deaminasa*).

A continuación, pasaré a citar con detenimiento los polimorfismos descritos en la tabla anterior, denominación para cada uno de ellos, tanto el rs como el código que da Applied Biosystems al Primer y la secuencia de DNA contigua al cambio de base de cada uno de los polimorfismos.

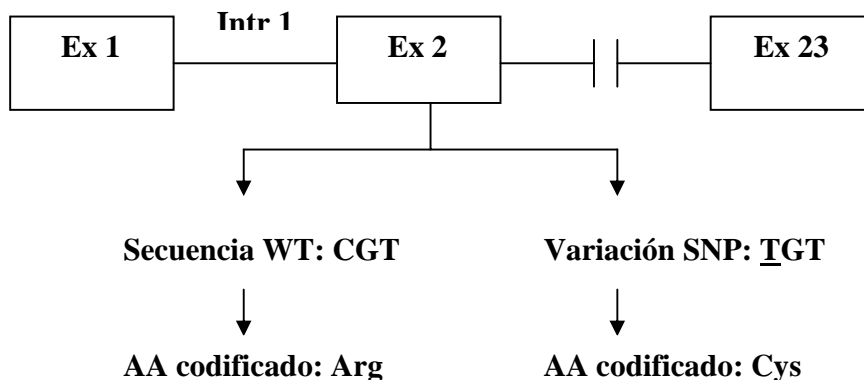
### Polimorfismo N°1 en *DPYD*:

- rs1801159.
- Comercializado por Applied Biosystems (AB) con el código C\_1823316.20 Assay on Demand.
- Los Primers y sondas están localizados en la siguiente secuencia:  
TGTAGAAATGGCCGGATTGAAGTTT (A/G) TAAATCCTTTTGGTCTTGCTAGCGC
- Localización cromosómica: 1p22.
- Gen formado por 23 exones y 22 intrones.
- SNP localizado en el exón 13 y en el aminoácido 543.
- Tipo de variación missense con cambio de una Isoleucina (Ile) por una Valina (Val).



### Polimorfismo N°2 en *DPYD*:

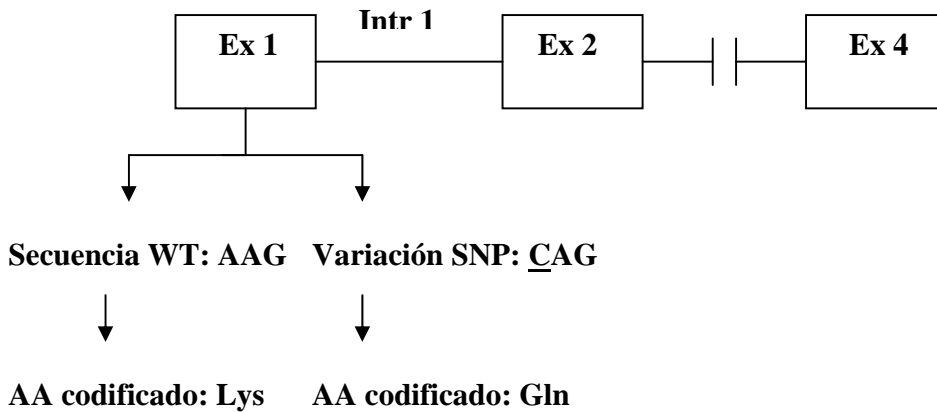
- rs1801265
- Comercializado por Applied Biosystems (AB) con el código C\_9491497.10 Assay on Demand.
- La secuencia donde están localizados los Primers y sondas es la siguiente:  
TCGAACACAAACTCATGCAACTCTG (C/T) GTTCCACTTCGGCCAAGAAATTAGA
- Localización cromosómica: 1p22.
- Gen formado por 23 exones y 22 intrones.
- SNP localizado en el exón 2 y en el aminoácido 29.
- Tipo de variación missense con cambio de una Arginina (Arg) por una cisteína (Cys).



### Polimorfismo N°3 en *CDA*:

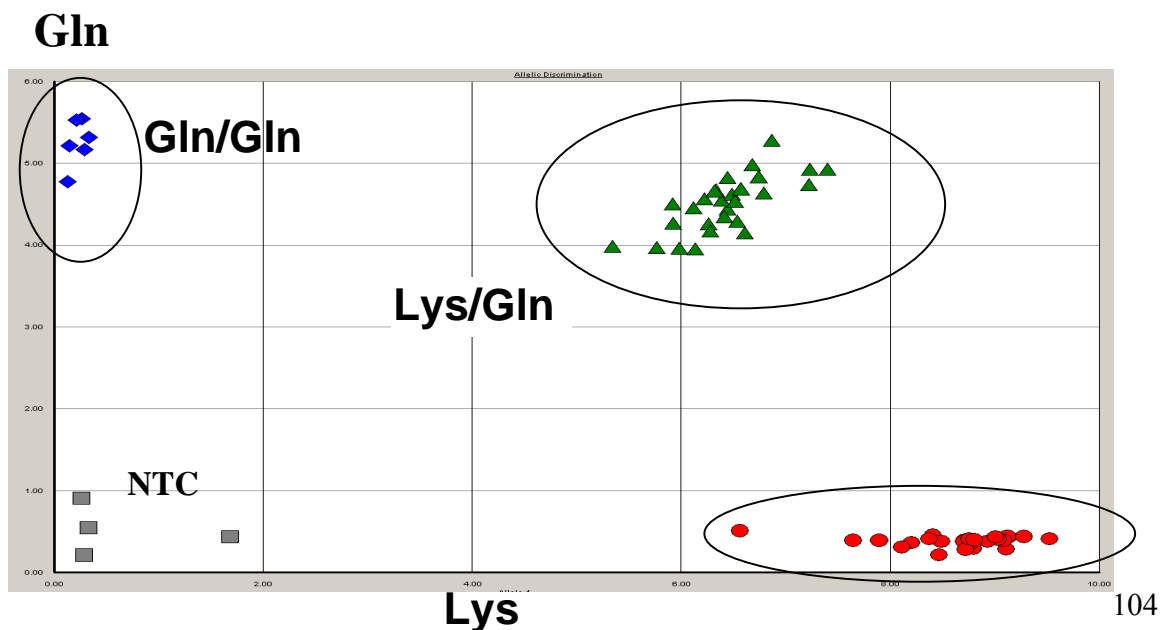
- rs2072671
- Comercializado por Applied Biosystems (AB) con el código C\_25472931.20 Assay on Demand.
- La secuencia donde están localizados los Primers y sondas es:  
GCTGGTTTGCTCCCAGGAGGCCAAG (A/C) AGTCAGCCTACTGCCCTACAGTCA
- Localización cromosómica: 1p36.2-p35.
- Gen formado por 4 exones y 3 intrones.

- SNP localizado en el exón 1 y en el aminoácido 27.
- Tipo de variación missense con cambio de una lisina (Lys) por una glutamina (Gln).



Una vez que se han hecho las diluciones, el siguiente paso es amplificar nuestras muestras con el objetivo de determinar, para los polimorfismos a estudiar (*DPYD* Ile543Val, *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln), si son homocigóticos para el gen (wild-type), heterocigóticos para el polimorfismo (con un alelo del gen y otro con el polimorfismo), u homocigotos para el polimorfismo (ambos alelos han sufrido un cambio de un nucleótido), para, posteriormente, mediante un análisis estadístico, medir la variable que nos interese.

El resultado final donde se ven plasmados los genotipos de las diferentes muestras examinadas sería del tipo:



siendo para el gen *CDA*, los puntos en rojo de la gráfica de la parte de abajo a la derecha, las muestras que son homocigotas para la lisina (Lys/Lys), los triángulos de color verde de la parte superior derecha, las muestras que son heterocigotas para el polimorfismo que contienen glutamina en vez de la lisina ó para el “wild type” (Lys/Gln) y, por último, los rombos en azul de la parte superior izquierda del gráfico, las muestras que son homocigotas para el polimorfismo (Gln/Gln).

En este trabajo, se ha estudiado la supervivencia según si el paciente pertenecía a cualquiera de estos 3 grupos para cada determinado SNP, y si era estadísticamente significativo teniendo en cuenta que había sido tratado después de la gastrectomía, con quimioterapia consistente en 4 ciclos de mitomicina C y tegafur. Por lo tanto, el poseer un determinado genotipo para un polimorfismo concreto, puede ser significativo en términos de supervivencia. Pueden también combinarse varios genotipos (para varios polimorfismos: por ejemplo, que *DPYD* Ile543Val y *DPYD* Arg29Cys sean heterocigotos para el polimorfismo). Por lo tanto, que hayan sobrevivido teniendo un determinado genotipo, y que tener este genotipo sea significativo estadísticamente, será indicio que el tratamiento aplicado en ese paciente ha sido efectivo, además de otros condicionantes dependientes del paciente tales como estado inmunológico antes del tratamiento...

## **Técnica de PCR**

De las muestras diluidas, se ha cogido una alícuota de 2,5 µl, que será fija para todos los pocillos de la placa de PCR. Se dejan los dos primeros para el agua como controles negativos ya que no contienen DNA y en el resto se irá introduciendo la muestra junto con los reactivos. Se prepara la Master que consistirá en 6,25 µl de solución Taqman, 3,5 µl de H<sub>2</sub>O y 0,25 µl de Primer (el Primer será el gen a estudiar).

Entre la Taqman, el H<sub>2</sub>O y el Primer han de sumar 10 µl. Teniendo en cuenta que son 53 muestras de pacientes, 2 de controles negativos con el H<sub>2</sub>O y 2 más por errores que se pueden producir a la hora de pipetear, la cantidad total de Taqman será de 356,25 µl, 199,5 de H<sub>2</sub>O y 14,25 µl de Primer. Por lo tanto, se tendrá un volumen total de 570 µl de la Master. Primero se pondrá la muestra de 2,5 µl de DNA en cada pocillo. Después los 10 µ correspondientes a la Master. Se pone a centrifugar. Una vez están las muestras centrifugadas, se han de poner a la máquina. Primero se prepara la “Pre-Read” en “Allelic Discrimination” para uno de los 3 genes de los que se quiere estudiar el polimorfismo. Se fijan VIC y FAM que serán las sondas que emiten la fluorescencia que será la que detectará la máquina PCR y nos indicará el genotipo, de tal manera que, en este caso VIC (1) en el eje de



las X, nos determinará “wild type” para el gen, FAM (2) en el eje de las Y, el homocigoto para el polimorfismo y, en el caso que sea heterocigoto para el polimorfismo, se dará una mezcla de los 2 (VIC/FAM: ½) que se verá en la gráfica en la parte central sin ubicación clara sobre el eje de las X ni de las Y. Se ha indicado un volumen final de 13 µl, que, aunque éste era de 12,5 µl, se ha puesto algo más por defecto. Luego se ha preparado la Carrera, que será la cuantificación en sí, en Absolute Quantification, para un volumen final también de 13 µl. Y esta operación se ha realizado para los tres genes en diferentes días. El proceso tarda 1½ horas hasta obtener los resultados. No siempre los resultados se han podido interpretar claramente con lo que, ha sido necesario repetir la PCR para estas muestras.

Se ha estudiado en primer lugar el gen *CDA Lys27Gln* para continuar con el gen *DPYD Arg29Cys* y posteriormente, con el gen *DPYD Ile543Val*.

En este estudio, los datos eran analizados retrospectivamente. Una vez obtenidos los resultados se han añadido a la base de datos.

### **3.5. ESTADÍSTICA**

Una vez se han obtenido los resultados, se hace un análisis estadístico con el objeto de saber si el hecho de poseer uno u otro genotipo es significativo en términos de supervivencia. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS (versión 11.0, SPSS Inc, Chicago). Para poder comparar los resultados en base a los diferentes genotipos en función de las características de los pacientes, se utilizó el test de la t-Student y test Chi.cuadrado ó el test de Fisher. El análisis del coeficiente de correlación de Spearman se usó para determinar la “correlación” entre los diferentes genotipos. Las probabilidades en cuanto a supervivencia se determinaron por el método de Kaplan-Meier y el test log-rank se utilizó para evaluar la diferencia entre curvas de supervivencia. Se consideró un valor de p de 0,05 como el límite de significancia para todos los análisis. Se aplicó el modelo proporcional de Cox con covariables para los diferentes valores pronósticos (género, nódulos linfáticos positivos y polimorfismos).

## **4. RESULTADOS**

## 4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Antes de pasar a enumerar los resultados de nuestro estudio, se han realizado unas curvas de supervivencia en las que se ha plasmado esta característica teniendo en cuenta la edad del paciente, el sexo, la localización en el estómago, el estadio del cáncer, el tipo de cirugía realizada, el hecho de haber sufrido una recidiva..., y si realmente han sido significativas ó decisivas en la evolución de la enfermedad. Estos datos se han reflejado en los siguientes puntos:

- EDAD: 16 pacientes con una edad < 61 años y 37 pacientes con  $\geq 61$  años. La supervivencia ha sido mayor para pacientes mayores ó de 61 años pero la p no es significativa ( $p = 0,2702$ ).
- SEXO: De los 53 pacientes que se han incluido en el estudio, 21 eran mujeres y 32, hombres. La mayor supervivencia ha correspondido a las mujeres, pero la p no es significativa ( $p = 0,5460$ ).
- LOCALIZACIÓN: Según sea la localización del cáncer gástrico (en antro, cuerpo ó cardias) se ha determinado la supervivencia con los datos de que disponíamos y se ha comprobado que la mayor supervivencia correspondía a pacientes con el cáncer en el antro ( $n = 18$ ), seguido de cuerpo ( $n = 26$ ) y, por último, de cardias ( $n = 8$ ) con una  $p = 0,3472$  (no significativa).
- ESTADIO: Teniendo en cuenta el estadio de la enfermedad, la supervivencia disminuye a medida que éste avanza, correspondiendo incomprensiblemente la menor supervivencia a un estadio II. El resto queda de la siguiente manera: mayor supervivencia para un estadio IB con 4 pacientes con esta característica, seguido por un estadio IIIA con 18 pacientes, un estadio IIIB ( $n = 9$ ), estadio IV ( $n = 8$ ) y, por último, estadio II ( $n = 14$ ). La p es muy significativa ( $p = 0,0010$ ), por lo que la supervivencia dependerá del estadio en que se encuentre la enfermedad.
- TNM: Esta variable está relacionada en gran medida con el estadio de la enfermedad, con lo que a medida que avanza el TNM, el estadio también es mayor. La p es 0,0001, de gran significancia. Los pacientes del estudio presentan los siguientes TNM: para T2N0M0, hay 4 pacientes; para T2N1M0, 2 pacientes; 1 paciente con T2N2M0; 12 pacientes con T3N0M0; 17 pacientes con T3N1M0; 9 pacientes con T3N2M0; 7 pacientes con T3N3M0 y, por último, 1 paciente, T4N1M0.

- CIRUGÍA: Dependiendo del tipo de cirugía aplicada, la supervivencia también varía, pero, en este caso, la p no es significativa ( $p = 0,2636$ ), correspondiendo la mayor supervivencia a pacientes a los que se ha realizado una gastrectomía subtotal + esplenectomía ( $n = 1$ ), seguido de aquéllos a los que se les realizó una gastrectomía total ( $n = 38$ ), una gastrectomía subtotal ( $n = 13$ ) y, por último, una gastrectomía total + esplenectomía ( $n = 1$ ).
- RECIDIVA: El hecho de haber padecido una recidiva influye en la supervivencia del paciente como lo demuestra la p resultante. De los 53 pacientes, 20 recidivaron, y éstos, claramente son los que tuvieron una menor supervivencia.

<b>NÚMERO</b>		53
<b>SEXO</b>	Mujeres	21
	Hombres	32
<b>EDAD</b>	40-55 años	10
	56-70 años	23
	71-85 años	20
<b>LOCALIZACIÓN</b>	Cardias	8
	Cuerpo	26
	Antro	19
<b>ESTADÍO</b>	IB	4
	II	14
	IIIA	18
	IIIB	9
	IV	8
<b>CIRUGÍA</b>	Gastrectomía total	39
	Gastrectomía parcial	14
	Resección ganglionar D0	1
	Resección ganglionar D1	4
	Resección ganglionar D2	48

## 4.2. TOXICIDAD

De los pacientes seleccionados para el estudio, no todos acabaron todos los ciclos de quimioterapia por presentar toxicidad (10 pacientes). En concreto, fueron los pacientes siguientes:

PACIENTE	TOXICIDAD PRESENTADA
A.A.O. (1)	Recibió 75% de quimioterapia. Toxicidad por plaquetopenia.
F.G.M. (3)	75% de quimioterapia. Toxicidad por leucopenia y plaquetopenia en grado I.
J.R.S. (9)	50% de quimioterapia. Exitus por infección provocada por quimioterapia.
C.V.P. (17)	Toxicidad por falta de tolerancia por edad avanzada.
L.A.B. (24)	80% de quimioterapia. Toxicidad por hepatotoxicidad.
M.L.O. (36)	75% de quimioterapia. Posibilidad de presentar astenia si recibía mayor dosis.
J.N.J. (41)	Toxicidad por leucopenia en grado 2.
M.O.R. (42)	50% de quimioterapia. Toxicidad por bilirubina elevada.
D.P.F. (43)	80% de quimioterapia. Toxicidad por leucopenia.
A.R.P. (51)	Parada de quimioterapia en el 3º ciclo por toxicidad gastrointestinal previa.

En general, el tratamiento con mitomicina y tegafur fue bien tolerado. La astenia leve ha sido el efecto tóxico más común. No se han dado diferencias estadísticas importantes según el genotipo debido al bajo grado de toxicidad en general aunque en algunos pacientes se ha reducido la dosis por toxicidad y en concreto en 10 pacientes (19%), debida en 5 de estos pacientes a diarrea, 2 por neutropenia, 2 por hepatotoxicidad y 1 por vómitos.

### 4.3. RECIDIVAS

Otros pacientes, habiendo recibido ó no todos los ciclos de quimioterapia, presentaron recidivas (20 pacientes):

PACIENTE	RECIDIVA
A.A.O. (1)	Metástasis hepática
M.C.R. (2)	Metástasis ósea
G.G.L. (4)	Metástasis ósea
J.H.G. (5)	Metástasis peritoneal
F.M.G. (6)	Metástasis peritoneal
M.O.B. (7)	Metástasis peritoneal
M.P.H. (8)	No especificada
J.R.S. (9)	No especificada
L.S.B. (10)	Metástasis hepática
F.A.N. (11)	Metástasis ósea
M.L.L. (12)	Metástasis renal
R.M.M. (13)	Metástasis ósea
M.M.D. (14)	Metástasis retroperitoneal
M.M.T. (15)	No especificada
R.M.A. (16)	Metástasis ósea
C.V.P. (17)	Metástasis hepática y peritoneal
M.V.A. (18)	Metástasis peritoneal
A.G.S. (21)	Metástasis peritoneal
A.D.V. (28)	Metástasis peritoneal
J.L.D.G. (52)	Metástasis peritoneal

#### 4.4. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS

Después de realizar la PCR, se ha visto que de las 53 muestras de los pacientes estudiados, 17 de ellas nos han salido que son homocigotos para el gen *CDA* (VIC; “wild type”; eje de las X: 1; Lys27Lys), 10 de ellas que son homocigotos para el polimorfismo (FAM; homocigoto para el SNP; eje de las Y: 2; Gln27Gln) y las 26 muestras restantes, heterocigotos para el polimorfismo (VIC/FAM; heterocigoto; no están claramente ni en el eje de las X ni en el de las Y: ½; Lys27Gln).

Posteriormente, se ha estudiado el gen *DPYD* Arg29Cys, con 28 muestras homocigotas para el gen (“wild type”), 7 muestras homocigotas para el polimorfismo y 18 heterocigotos.

Y, por último, para el gen *DPYD* Ile543Val, los resultados han sido: 37 pacientes homocigotos para el gen que no presentan el polimorfismo, 3 pacientes homocigotos para el polimorfismo con los dos alelos con el cambio de nucleótido, y, 13 pacientes heterocigotos para el polimorfismo.

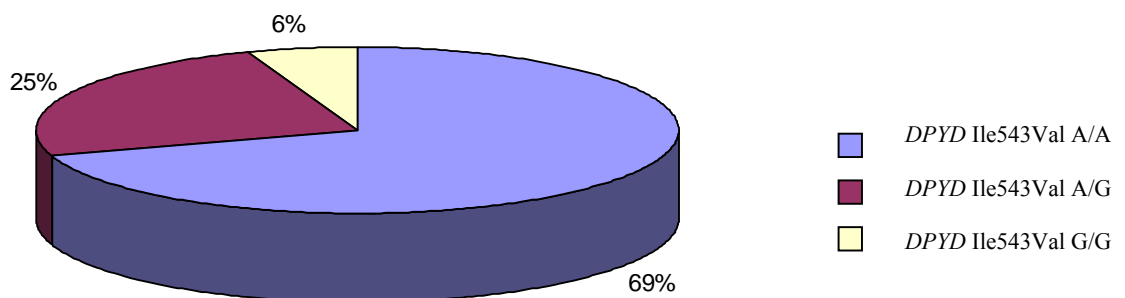
En la siguiente tabla se ven desglosados según los diferentes genotipos con sus frecuencias alélicas, los genes estudiados:

	<i>DPYD</i> Ile543Val	<i>DPYD</i> Arg29Cys	<i>CDA</i> Lys27Gln
<b>HOMOCIGOTO WILD-TYPE</b>	37 (70%)	28 (53%)	17 (32%)
<b>HETEROCIGOTO (1 alelo mutado)</b>	13 (24,5%)	18 (34%)	26 (49%)
<b>HOMOCIGOTO (mutados los 2 alelos)</b>	3 (5,5%)	7 (13%)	10 (19%)

En el siguiente esquema se pueden observar los posibles genotipos para los genes *DPYD* Ile543Val, *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln y sus frecuencias alélicas según los pacientes estudiados así como la p ó significancia de poseer una u otra:

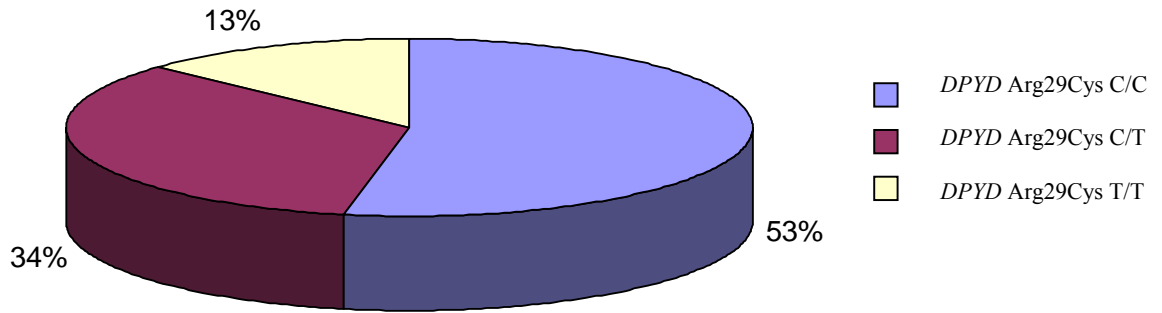
GEN AFECTADO POR EL SNP	GENOTIPO	AA	n (%)	p-value Survival
<i>DPYD</i>	AA	Ile543Ile	37 (70%)	p=0,0580
	AG	Ile543Val	13 (24,5%)	
	GG	Val543Val	3 (5,5%)	
<i>DPYD</i>	CC	Arg29Arg	30 (53%)	p=0,5379
	CT	Arg29Cys	19 (34%)	
	TT	Cys29Cys	7 (13%)	
<i>CDA</i>	AA	Lys27Lys	19 (32%)	p=0,1434
	AC	Lys27Gln	27 (49%)	
	CC	Gln27Gln	10 (19%)	

### *DPYD* Ile543Val

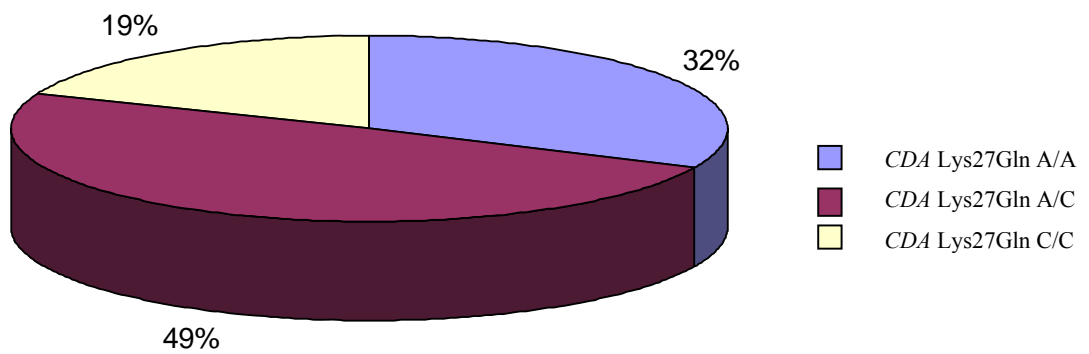




## DPYD Arg29Cys



## CDA Lys27Gln



Éstos son los resultados del estudio. A continuación, se pasará a comparar estas frecuencias respecto a la población mundial:

<b>SNP</b>	<b>GENOTIPOS</b>	<b>FRECUENCIAS DE NUESTRO ESTUDIO</b>	<b>FRECUENCIAS A NIVEL MUNDIAL</b>
<b><i>DPYD</i> Ile543Val rs1801159</b>	AA	70%	80%
	AG	24,5%	17%
	GG	5,5%	3% (caucasiano)
<b><i>DPYD</i> Arg29Cys rs1801265</b>	CC	53%	3%
	CT	34%	27%
	TT	13%	70% (europeo)
<b><i>CDA</i> Lys27Gln rs2072671</b>	AA	32%	40%
	AC	49%	50%
	CC	19%	10% (europeo)

Por lo observado en la tabla de frecuencias de los distintos genotipos para cada uno de los 3 polimorfismos, la mayor diferencia observada es para el polimorfismo en *DPYD* Arg29Cys, posiblemente debido al escaso número de pacientes.

## 4.5. SUPERVIVENCIA

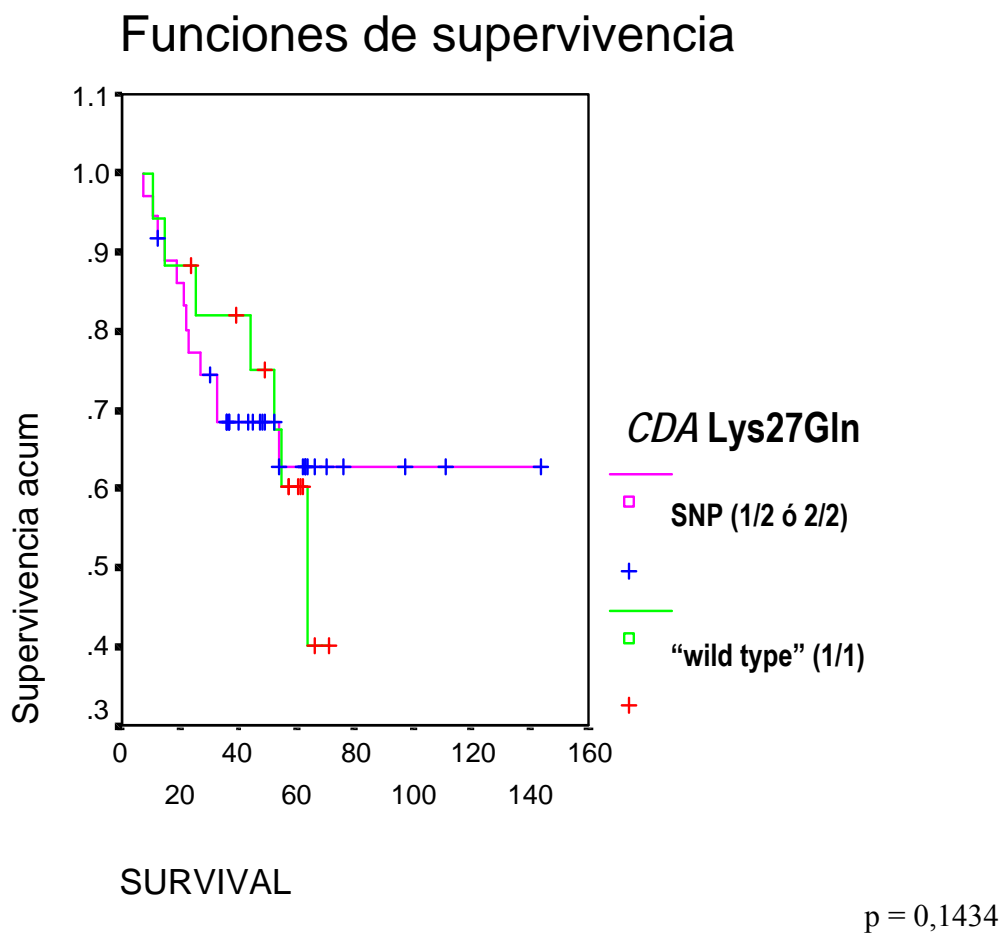
Se han estudiado las gráficas para cada genotipo individualmente (ser homocigoto para el “wild type”, heterocigoto u homocigoto para el polimorfismo) y se ha observado que sólo uno es significativo aisladamente en términos de supervivencia. En concreto, el genotipo que es significativo de cara a tener una mayor supervivencia es ser homocigoto para el “wild type” del *DPYD* en la posición 543 de la secuencia del gen frente a aquellos pacientes que tienen el polimorfismo, ya sean homocigotos para éste ó heterocigoto ( $p=0,0580$ ). También puede observarse cómo ser heterocigoto u homocigoto para el polimorfismo tiene tendencia a la significancia ( $p=0,1835$  y  $p=0,2296$ , respectivamente).

SNP	GENOTIPO	p-value Survival
<i>DPYD</i> Ile543Val	AA AG GG	p=0,0580 p=0,1835 p=0,2296
<i>DPYD</i> Arg29Cys	CC CT TT	p=0,5379 p=0,8406 p=0,2139
<i>CDA</i> Lys27Gln	AA AC CC	p=0,1434 p=0,7045 p=0,7500

También se observa tendencia a la significancia cuando *DPYD* Arg29Cys es homocigoto para el polimorfismo (T/T) y cuando *CDA* Lys27Gln es homocigoto para el “wild type” (A/A).

Para el gen *citidina deaminasa (CDA)*, se han cuantificado los genotipos para los pacientes incluidos en el estudio. Se ha observado cómo algunos de los pacientes experimentaban un cambio en una base en la secuencia de DNA, que resultaba en un cambio de aminoácido en el enzima resultante de la traducción del gen. El gen sin el polimorfismo presentaba una adenina en el triplete correspondiente al aminoácido (lisina) de la posición 27 de la proteína (triplete AAG), mientras que si tenían el polimorfismo, la adenina era sustituida por una citosina en esta posición (triplete CAG), que daba lugar a un cambio de aminoácido (glutamina).

La gráfica resultante de poseer un polimorfismo en el enzima CDA (heterocigoto: A/C u homocigoto: C/C) frente a no poseerlo (ser homocigoto para el “wild type”: A/A):

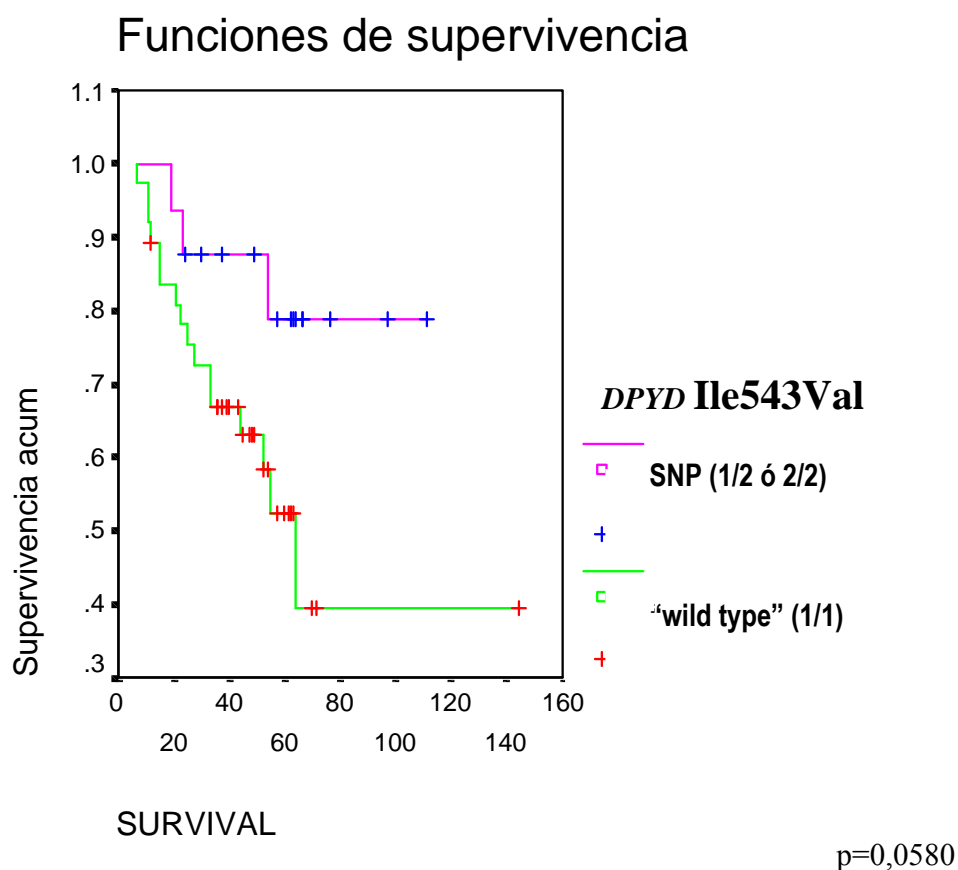


El número de pacientes con genotipo “wild type” (1/1) es de 17 y 36 de los 53 pacientes totales tienen polimorfismo: 10 que son homocigotos para el polimorfismo (2/2) y 26 heterocigotos para el polimorfismo (1/2).

Esta p no es significativa. Por lo tanto, el hecho de tener el polimorfismo, no influye en la supervivencia de los pacientes que han recibido el tratamiento con FTR-MMC.

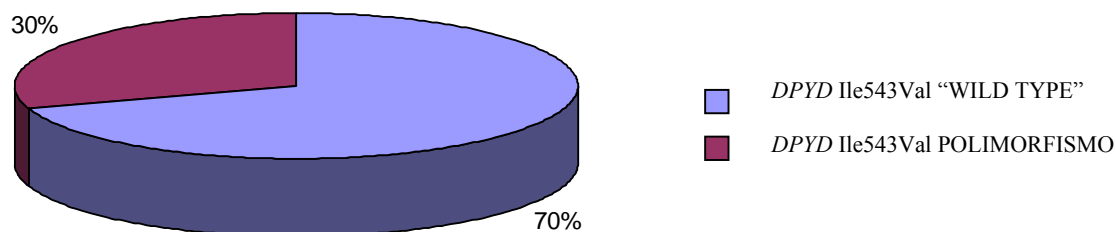
Se ha hecho lo mismo para la *dihidropirimidina dehidrogenasa* (tanto para el *DPYD* Ile543Val, como para el *DPYD* Arg29Cys). En el caso del *DPYD* Ile543Val:

El hecho de poseer un cambio de una adenina (A) por una guanina (G) supone un cambio de codón no sinónimo que provoca una alteración en la proteína, en este caso del enzima, al variar el aminoácido que codifica. De esta manera, en el *DPYD* Ile543Val, este cambio de nucleótido da lugar a un cambio de aminoácido: de una Isoleucina (Ile) por una Valina (Val), con alteración en la actividad del enzima (tripleto ATA → tripleto GTA).



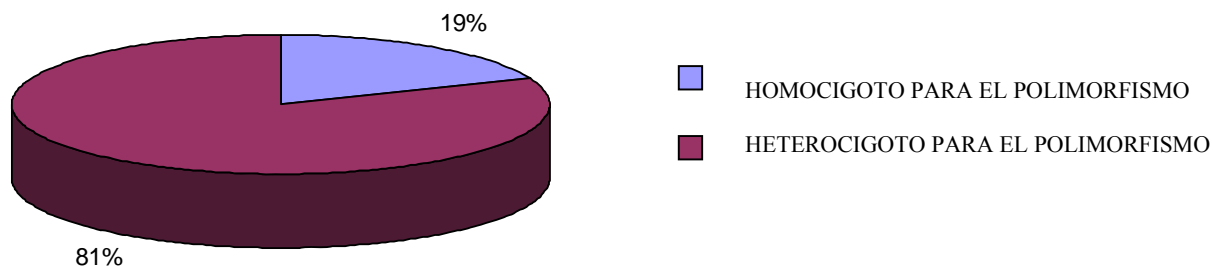
El número de pacientes con genotipo “wild type” (1/1) es de 37 (70%) y de individuos con polimorfismo, 16 (30%):

## ***DPYD* Ile543Val**



3 (19%) que son homocigotos para el polimorfismo (2/2) y los 13 restantes (81%), heterocigotos (1/2):

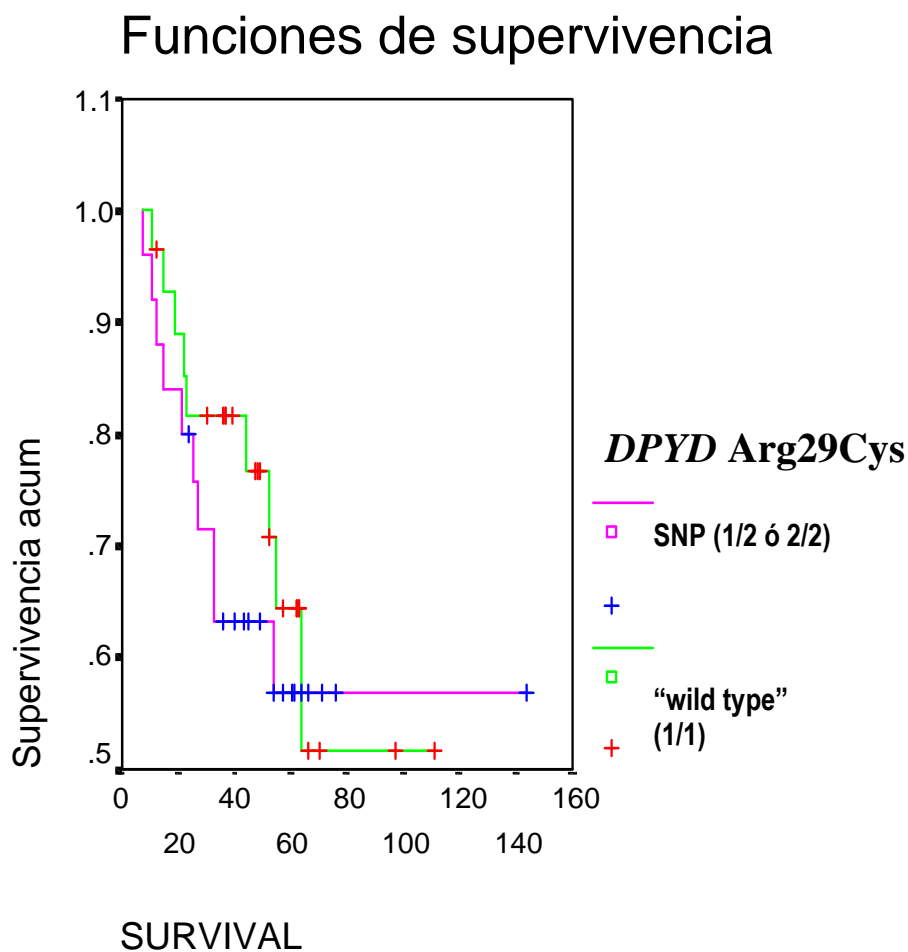
## **POLIMORFISMO EN *DPYD* Ile543Val**



En este caso ha salido significativo. Esto nos sugiere que el hecho de existir un polimorfismo en el *DPYD* Ile543Val (ser heterocigoto u homocigoto para el polimorfismo) influye en la supervivencia de los pacientes que se han visto sometidos al tratamiento con FTR-MMC. Por lo tanto, el hecho de producirse este cambio de aminoácido supone una alteración en la actividad del enzima que conduce a una menor metabolización del 5-FU con una mayor biodisponibilidad del fármaco. Al encontrarse el fármaco más biodisponible, también actuará en mayor medida frente al cáncer.

Por último, se ha realizado el mismo análisis estadístico para el *DPYD* Arg29Cys. Este polimorfismo supone un cambio de una citosina (C) por una timina (T) que da lugar a un cambio de aminoácido y por lo tanto, en la secuencia de la proteína. El cambio de nucleótido da lugar al cambio de una Arginina (Arg) por una Cisteína (Cys) ( triplete CGT→triplete TGT).

La gráfica resultante es la siguiente:



p=0,5379

28 pacientes son homocigotos para el genotipo “wild type” (1/1) y 26 pacientes tienen el polimorfismo: 7 son homocigotos para el polimorfismo (2/2) y 18, heterocigotos (1/2).

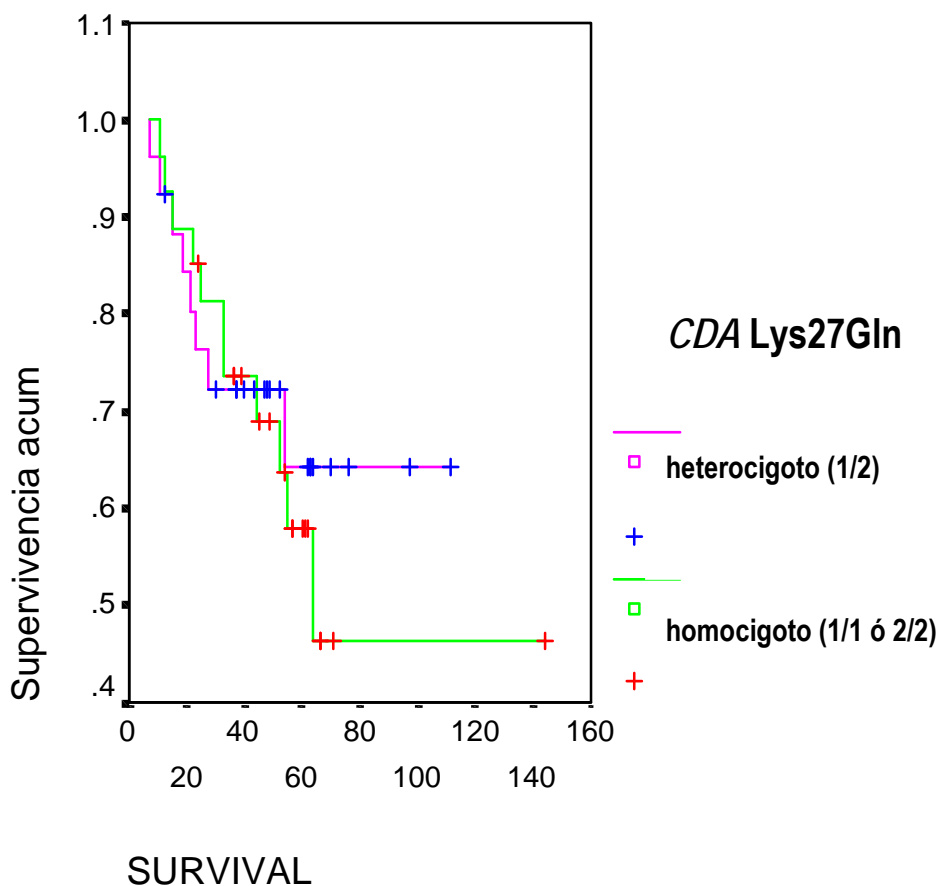
Viendo las dos gráficas para el gen *DPYD*, en el caso del *DPYD* Ile543Val se observa cómo la diferencia en la supervivencia entre pacientes sin y con el polimorfismo es mayor que en el caso del

*DPYD* Arg29Cys y que el hecho de poseer el polimorfismo en el caso del *DPYD* Arg29Cys no supone un cambio substancial para la supervivencia. Además, en este último caso, la p no ha salido significativa, con lo que este cambio de aminoácido no supone una variación importante en la actividad del enzima, que supondría una mayor ó menor metabolización del fármaco con la consecuente influencia en la supervivencia del paciente.

Haciendo el mismo tipo de análisis estadístico para los tres genes pero en este caso, no teniendo en cuenta el hecho de tener el polimorfismo (homocigoto ó heterocigoto), sino sólo el hecho de ser heterocigoto para cada uno (ser homocigoto para el “wild type” ó para el polimorfismo frente a heterocigoto):

Para la *CDA*:

### Funciones de supervivencia



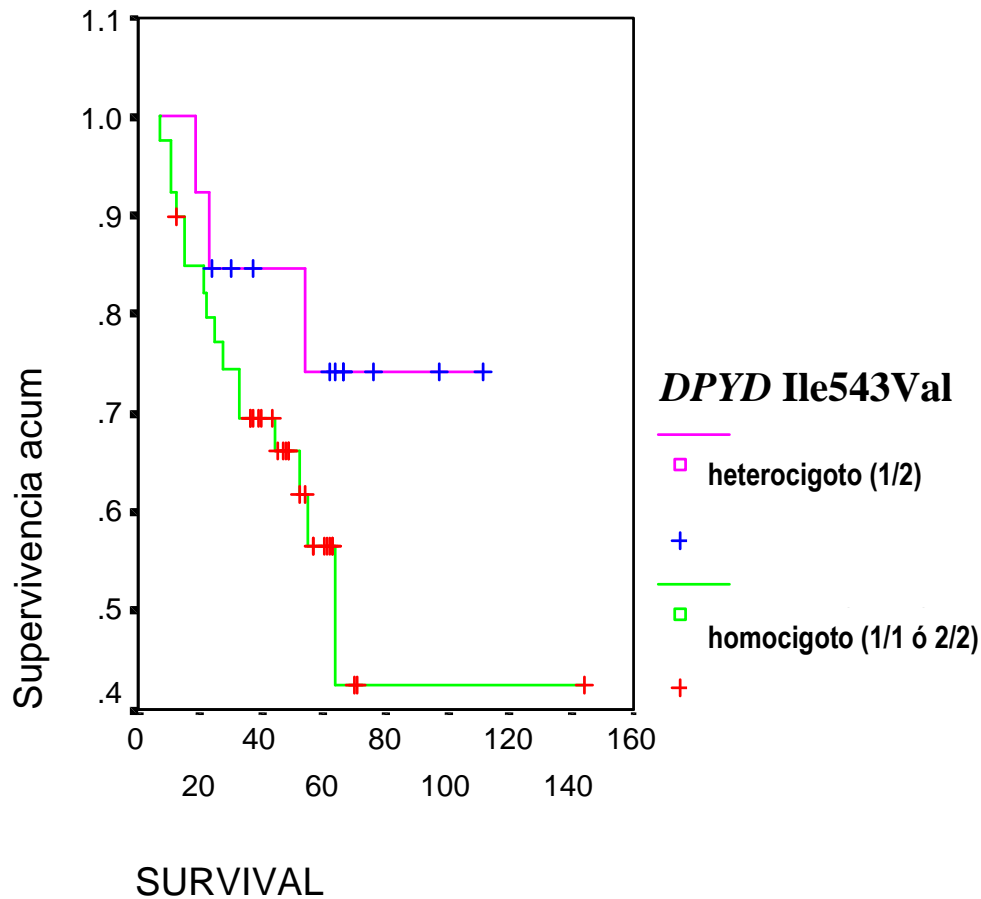


Para el enzima CDA, se observa que estadísticamente no es significativo. Se habría de disponer de un mayor número de pacientes para comprobar que este hecho es realmente así.

De los 53 pacientes de los que se dispone para nuestro estudio, n=27 para pacientes homocigotos para el genotipo “wild type” (1/1: A/A) ó para el polimorfismo (2/2: C/C). De estos 27 pacientes, 17 son “wild type” y 10 homocigotos para el polimorfismo. 26 pacientes son heterocigotos para el polimorfismo (1/2: A/C).

Para la *dihidropirimidina dehidrogenasa* con cambio en el aminoácido 543 del enzima (*DPYD* Ile543Val):

## Funciones de supervivencia



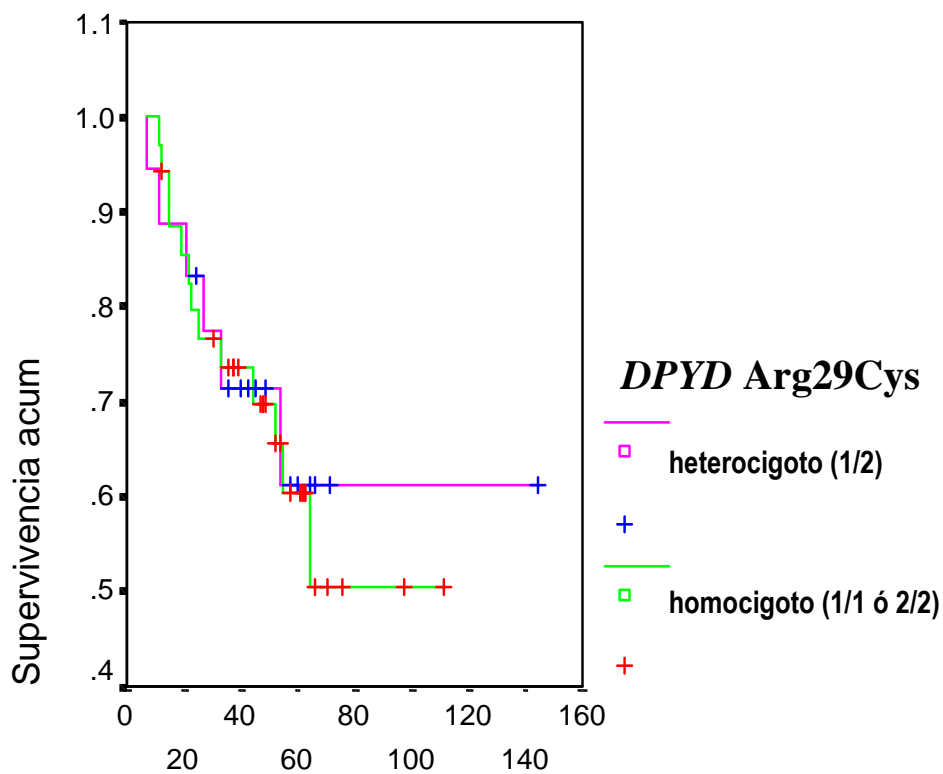
p=0,1835

Se observan 40 pacientes homocigotos: 37 homocigotos para el genotipo “wild type” (1/1: A/A) y 3 que son homocigotos para el polimorfismo (2/2: G/G). 13 individuos son heterocigotos (1/2: A/G).

No es significativo estadísticamente aunque sí tiene tendencia a la significancia. Si así lo fuese, el hecho de ser heterocigoto sería una característica favorable para que se aplicase el tratamiento a base de FU-MMC ya que la supervivencia sería mucho mayor, ó por el contrario, si se detectase que el paciente es homocigoto (para el “wild type” ó el polimorfismo) no sería conveniente aplicar el tratamiento a base de FU-MMC ya que la supervivencia sería mínima. Directamente se optaría por un tratamiento más efectivo avalado con otro tipo de estudios.

Para el enzima dihidropirimidina dehidrogenasa con un cambio en el aminoácido 29 de la secuencia proteínica (*DPYD* Arg29Cys):

## Funciones de supervivencia

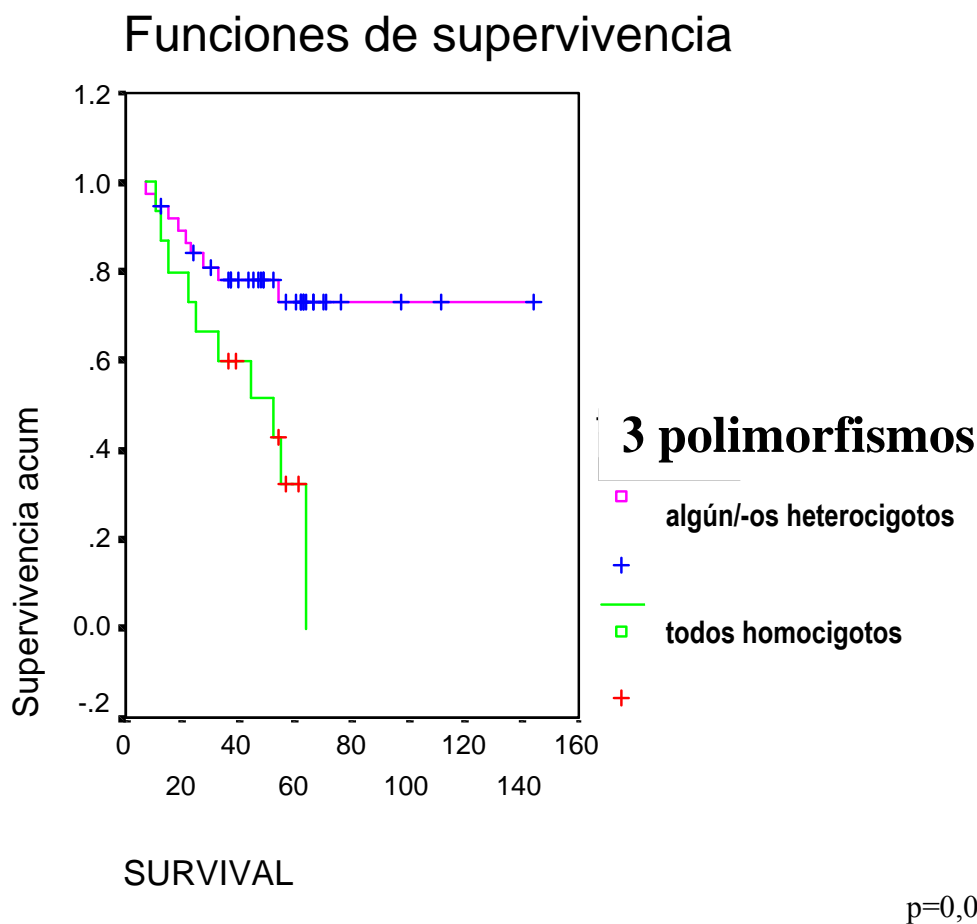


SURVIVAL

p=0,8406

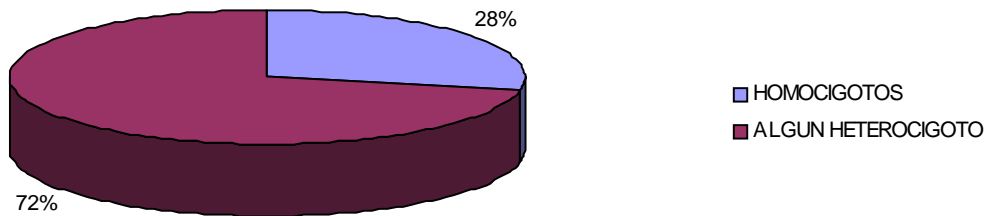
35 pacientes son homocigotos: 28 para el genotipo “wild type” (1/1: C/C) y 7 para el polimorfismo (2/2: T/T) y 18 son heterocigotos (1/2: C/T).

La gráfica no es válida estadísticamente. La supervivencia para el heterocigoto es mayor que para homocigotos, pero en menor cuantía que para el polimorfismo en *DPYD* Ile543Val. Aquí la diferencia entre las supervivencias es menor, pero el hecho de ser homocigoto da una supervivencia mayor que lo que ocurría con el *DPYD* Ile543Val que era casi nula. Ninguna de estas gráficas ha salido significativa. Lo que sí dio un resultado positivo fue el hecho que existiera algún heterocigoto para cualquiera de los tres polimorfismos:



15 pacientes no han tenido ningún heterocigoto (1/2) para ninguno de los 3 primers estudiados, a la vez que han presentado una menor supervivencia mientras que los 38 pacientes restantes han tenido al menos un heterocigoto para uno de los polimorfismos estudiados. La supervivencia en estos casos es significativamente mayor.

### 3 POLIMORFISMOS



Posteriormente, se ha tenido en cuenta las gráficas al unir los genes de dos en dos:

► En primer lugar, se ha tenido en cuenta el hecho de que los genes sean homocigotos para el “wild type” y haciendo las distintas combinaciones posibles (primero, que uno y otro gen tengan los alelos ambos homocigotos para el “wild type”; segundo, que uno y/o otro gen tenga los alelos homocigotos para el “wild type” y, tercero, que uno u otro alelo sea homocigoto para el “wild type”). Según esto, en primer lugar, se ha considerado que ambos alelos sean homocigotos:

- *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln sean homocigotos para el “wild type”:  $p=0,2538$  donde el número de pacientes que cumplen estas características son 8.
- *DPYD* Ile543Val y *DPYD* Arg29Cys sean homocigotos para el “wild type”:  $p=0,7394$  con  $n=18$ .
- *DPYD* Ile543Val y *CDA* Lys27Gln sean homocigotos para el “wild type”:  $p=0,2775$  con 13 pacientes con estas características.

Ninguno de estos genotipos nos ha dado significativo, con lo que se pasa a probar que uno y/o otro alelo del gen sea homocigoto para el “wild type”:

- *DPYD* Arg29Cys y/o *CDA* Lys27Gln sea homocigoto para el “wild type” con una  $p=0,1330$  y 37 pacientes incluidos en este grupo.
- *DPYD* Ile54Val y/o *DPYD* Arg29Cys sea homocigoto para el “wild type” con  $p=0,2191$  y 47 pacientes con estas características.
- *DPYD* Ile543Val y/o *CDA* Lys27Gln sea homocigoto para el “wild type”:  $p=0,2636$  y  $n=41$ .

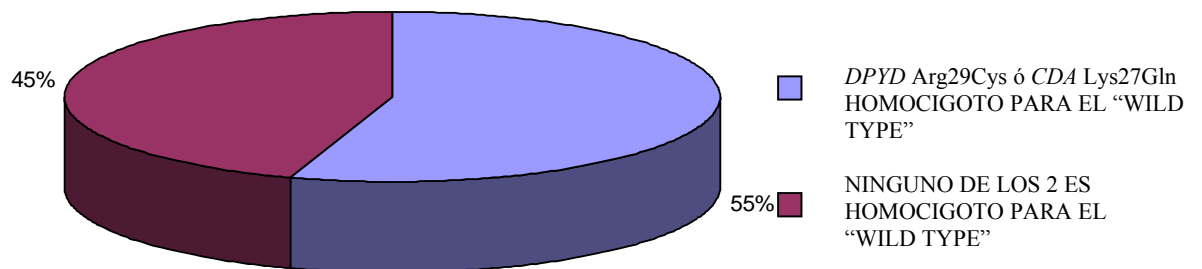
Tampoco ninguna de estas combinaciones ha salido significativa.

Por último, se comprobará si ha salido significativo el hecho de que uno u otro alelo sea homocigoto para el “wild type”:

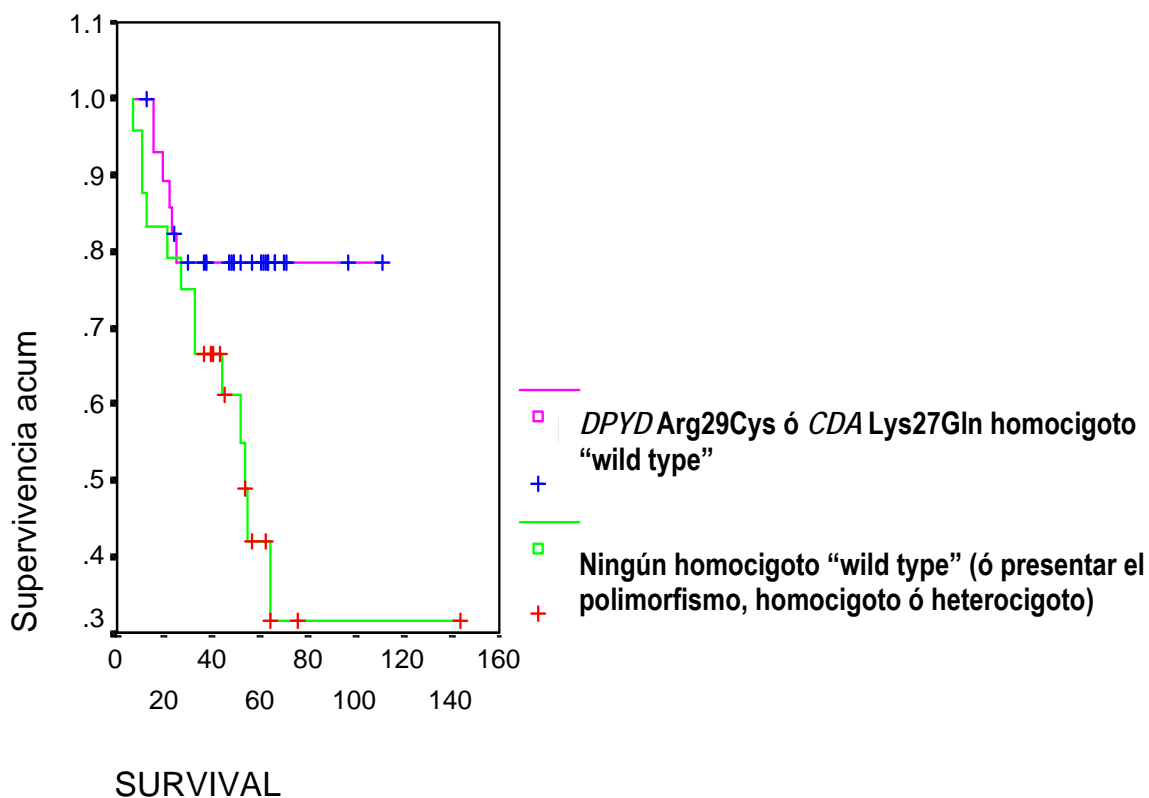
- *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln homocigoto para el “wild type” con una  $p=0,0280$  y con 29 pacientes.
- *DPYD* Ile543Val ó *DPYD* Arg29Cys homocigoto para el “wild type” con una  $p=0,5721$  y 29 pacientes con este genotipo.
- *DPYD* Ile543Val ó *CDA* Lys27Gln homocigoto para el “wild type” con  $p=0,9735$  y  $n=28$ .

Ahora sí que ha salido significativo el hecho de tener el gen *DPYD* Arg29Cys ó el *CDA* Lys27Gln homocigoto para el “wild type” (ó presentar el polimorfismo ya sea en forma homocigota ó heterocigota) con una  $p$  significativa ( $p=0,0280$ ):

## 2 POLIMORFISMOS (*DPYD* Arg29 y *CDA* Lys27Gln)



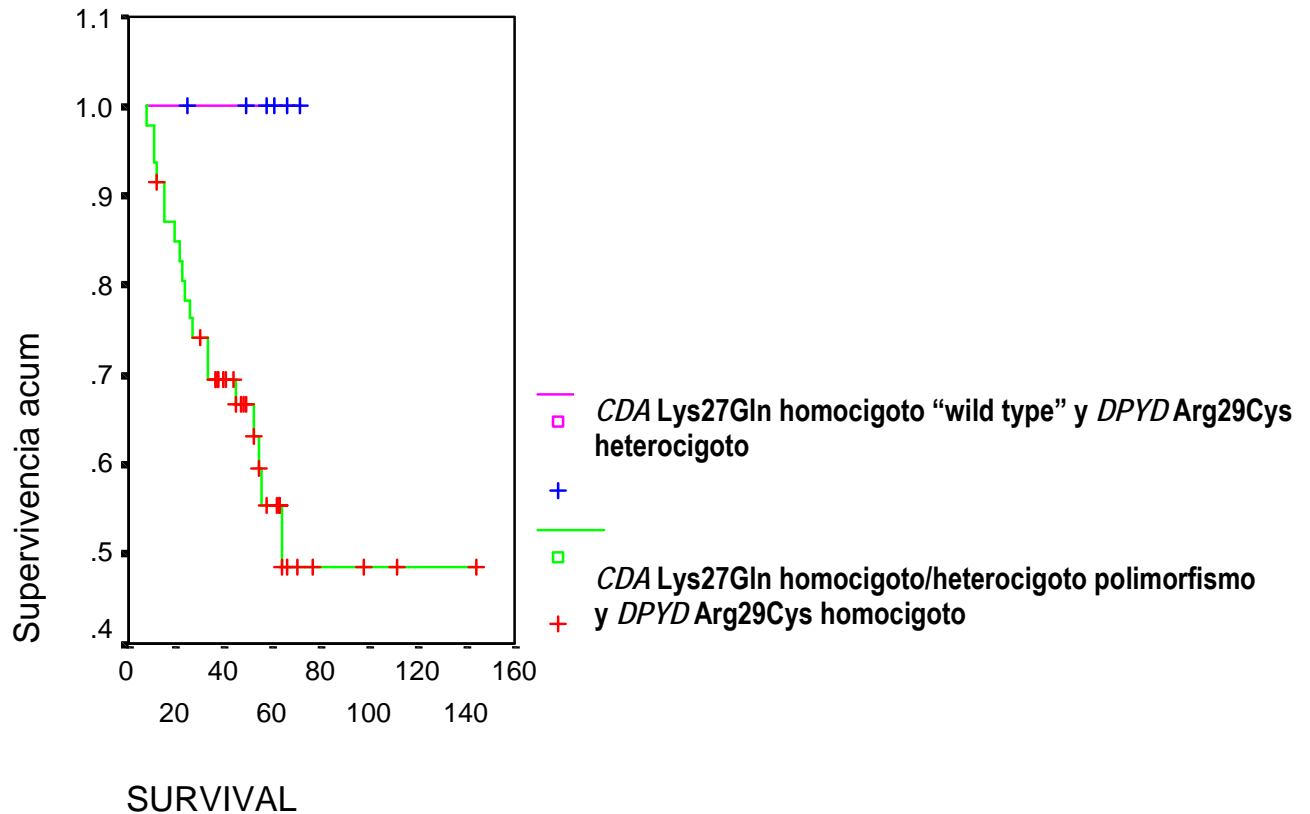
## Funciones de supervivencia



$p=0,0280$

Según la gráfica, se da una mayor supervivencia en aquellos pacientes que tienen ó el *DPYD Arg29Cys* ó el *CDA Lys27Gln* homocigoto para el "wild type" (o sea, para *DPYD* en el aminoácido 29, tener los alelos C/C en el gen que codifica para la arginina ó para *CDA* en el aminoácido 27, tener los alelos A/A en el gen que codifica para la lisina). Se han hecho combinaciones teniendo en cuenta que uno de los dos sea homocigoto para el "wild type" y cambiando el genotipo del otro gen (*DPYD Arg29Cys* homocigoto para el "wild type" y *CDA Lys27Gln*, homocigoto para el polimorfismo con  $p=0,9321$ ; *DPYD Arg29Cys* homocigoto para el "wild type" y *CDA Lys27Gln*, heterocigoto con  $p=0,1276$ ); *CDA Lys27Gln* homocigoto para el "wild type" y *DPYD Arg29Cys* homocigoto para el polimorfismo con  $p=0,1934$  y *CDA Lys27Gln* homocigoto para el "wild type" y *DPYD Arg29Cys*, heterocigoto con  $p=0,0734$ ). Así, la combinación más significativa ha sido cuando el *CDA Lys27Gln* era homocigoto para el "wild type" y el *DPYD Arg29Cys* era heterocigoto con una  $p$  con tendencia a la significancia aunque sólo con 6 pacientes con estas características:

## Funciones de supervivencia



$p=0,0734$

Posteriormente, y según este genotipo, se irá cambiando el *DPYD Ile543Val* para comprobar si puede influir que éste sea homocigoto para el “wild type”, homocigoto para el polimorfismo ó heterocigoto.

► Ahora se considerará que, combinados de dos en dos, los genes sean homocigotos para el polimorfismo (primero que uno y otro gen tengan los alelos ambos homocigotos para el polimorfismo; segundo, que uno y/ó otro tengan los alelos homocigotos para el polimorfismo y, tercero, que uno u otro alelo sea homocigoto para el polimorfismo). Primero, que ambos sean homocigotos para el polimorfismo:

- *DPYD Arg29Cys* y *CDA Lys27Gln* sean homocigotos para el polimorfismo, con una  $p=0,1826$  y 3 pacientes con estas características, con menor supervivencia para éstos.

- *DPYD* Ile543Val y *DPYD* Arg29Val sean ambos homocigotos para el polimorfismo. No existe ningún paciente que sea homocigoto para el polimorfismo en *DPYD* Ile543Val y *DPYD* Arg29Cys.
- *DPYD* Ile543Val y *CDA* Lys27Gln sean homocigotos para el polimorfismo. Tampoco existe ningún paciente que tenga ambos genes con polimorfismos y que ambos alelos sean homocigotos para éste.

Ninguna de las tres posibilidades es significativa, por lo que no influirán estos genotipos en la supervivencia de estos pacientes sometidos al tratamiento, si bien es cierto que el primero de los casos tiende a la significancia aunque el número de pacientes es pequeño.

Probando que uno y/o otro alelo sea homocigoto para el polimorfismo:

- *DPYD* Arg29Cys y/o *CDA* Lys27Gln sea homocigoto para el polimorfismo. 14 pacientes cumplían con estas características y nos ha salido una  $p=0,5612$ .
- *DPYD* Ile543Val y/o *DPYD* Arg29Cys sea homocigoto para el polimorfismo.  $n=10$  y la  $p=0,8039$ .
- *DPYD* Ile543Val y/o *CDA* Lys27Gln con 13 pacientes homocigotos y con una  $p=0,6745$ .

Ninguna de estas combinaciones ha salido significativa.

Se prueba ahora que uno u otro alelo sea homocigoto para el polimorfismo:

- *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln sea homocigoto para el polimorfismo, con 11 pacientes incluídos y una  $p=0,9672$ .
- *DPYD* Ile543Val ó *DPYD* Arg29Cys sea homocigoto para el polimorfismo, con una  $n=10$  y  $p=0,8039$ .
- *DPYD* Ile543Val ó *CDA* Lys27Gln sea homocigoto para el polimorfismo, con 13 pacientes con este genotipo frente a los 40 restantes.  $p=0,6745$ .

Ninguna de estas combinaciones nos ha dado una  $p$  significativa.

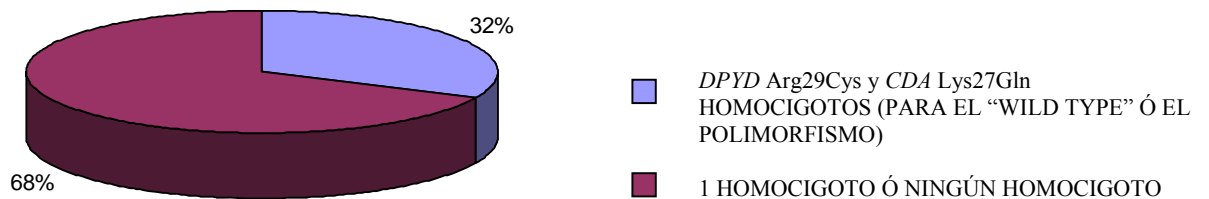
En conclusión para este segundo punto, ninguna combinación de dos genes objeto del estudio (homocigoto para el polimorfismo), ha salido significativo para la supervivencia de los pacientes.



► En tercer lugar, se tendrá en cuenta que exista cualquier homocigoto (para el “wild type” ó para el polimorfismo). Asimismo, se tendrá en cuenta que ambos genes tengan cualquier homocigoto, para pasar posteriormente a considerar que uno y/ó otro tengan cualquier homocigoto y, por último, que uno u otro tengan cualquier homocigoto. Por lo tanto, en principio, se considerará que ambos sean homocigotos:

- *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln sean ambos homocigotos para el “wild type” ó para el polimorfismo. En este caso el número de pacientes encontrado ha sido de 17 y ha dado una  $p=0,0416$  con menor supervivencia para los que presentan estas características.

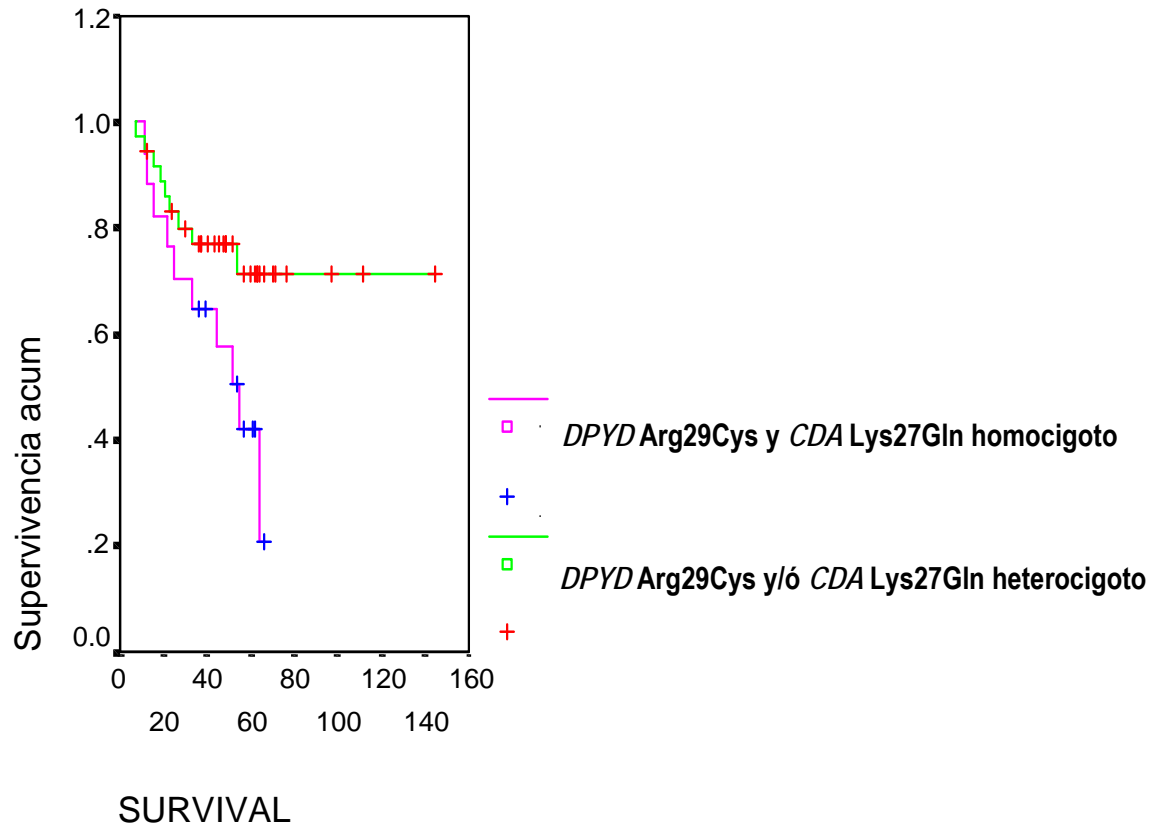
## 2 POLIMORFISMOS (*DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln)



- *DPYD* Ile543Val y *DPYD* Arg29Cys homocigotos, siendo  $n=26$  y  $p=0,3104$ .
- *DPYD* Ile543Val y *CDA* Lys27Gln sean ambos homocigotos, con 23 pacientes con estas características y una  $p=0,2094$ .

Como se puede observar, por los resultados obtenidos, en el primer caso, la  $p$  ha salido significativa ( $p=0,0416$ ) y se relaciona un peor pronóstico con aquellos pacientes que son homocigotos para el gen *DPYD* Arg29Cys y para el gen *CDA* Lys27Gln (sea para el “wild type” ó para el polimorfismo).

## Funciones de supervivencia

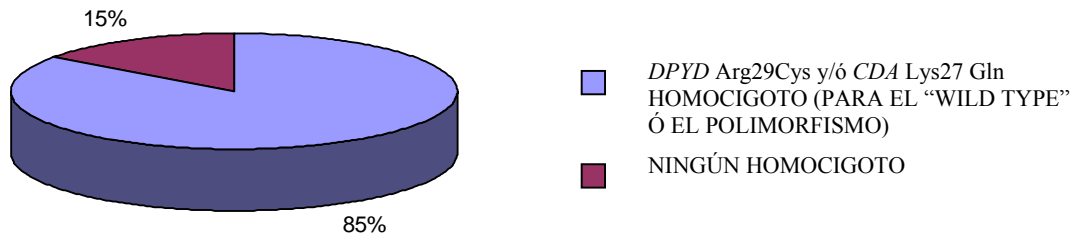


$p=0,0416$

Ahora se considerará el hecho que los dos o uno de ellos sea homocigoto para el “wild type” ó para el polimorfismo. De esta manera, se ha obtenido que:

- $\square$  *DPYD Arg29Cys y/o CDA Lys27Gln* sean homocigotos (para el “wild type” ó para el polimorfismo) con 45 pacientes que cumplen estas condiciones y una  $p=0,0372$ .

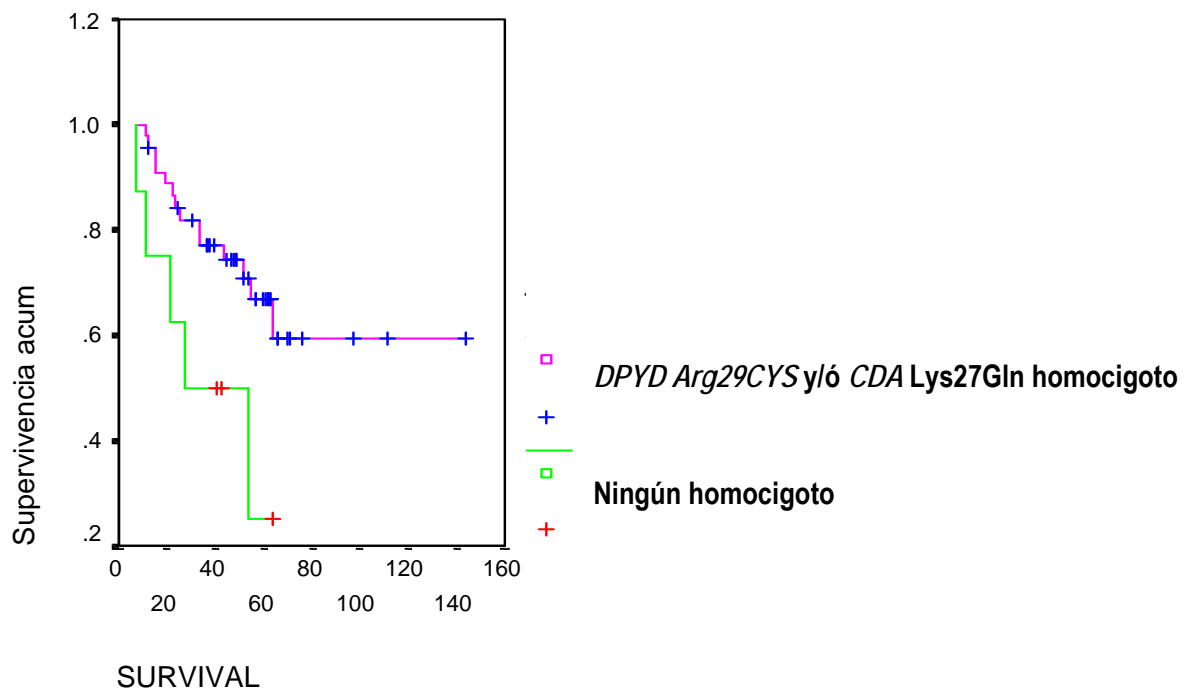
## 2 POLIMORFISMOS (*DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln)



- *DPYD* Ile543Val y/o *DPYD* Arg29Cys sean homocigotos con n=49 y p=0,5176.
- *DPYD* Ile543Val y/o *CDA* Lys27Gln sean homocigotos con 44 pacientes y p=0,6766.

En el primer caso, la gráfica ha dado una p significativa con una mayor supervivencia para los pacientes que presentan estas características (*DPYD* Arg29Cys y/o *CDA* Lys27Gln homocigotos para el "wild type" ó para el polimorfismo):

### Funciones de supervivencia

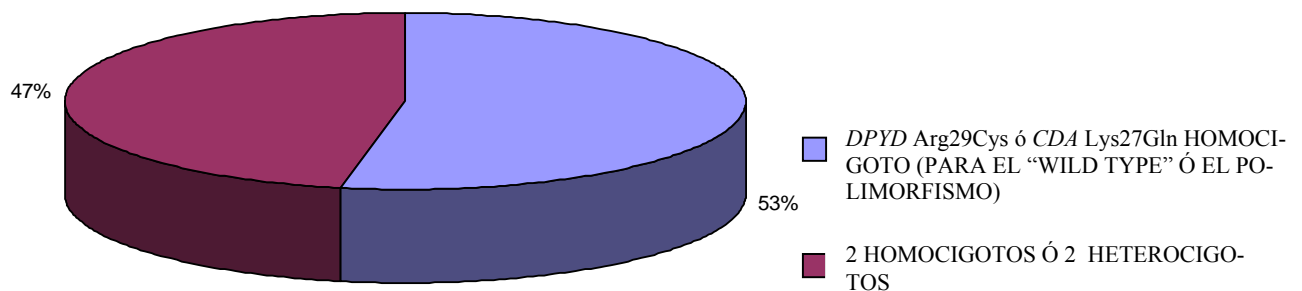


p=0,0372

Por último, se comprueba que uno u otro sea homocigoto (para el “wild type” ó el polimorfismo) y las p resultantes en la gráfica de Kaplan-Meier:

- *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln sea homocigoto para el “wild type” ó para el polimorfismo, o, dicho de otra forma, que exista algún heterocigoto. El número de pacientes ha sido de 28 y  $p=0,0012$ .

## 2 POLIMORFISMOS (*DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln)

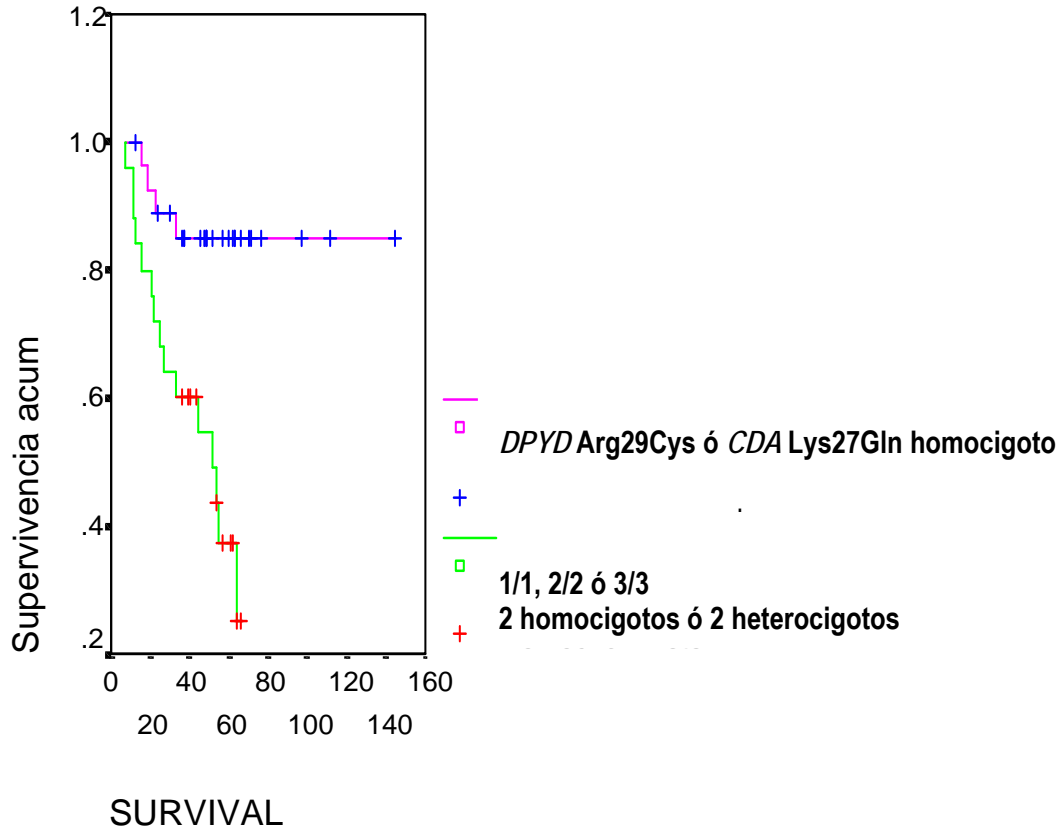


- *DPYD* Ile543Val ó *DPYD* Arg29Cys sea homocigoto para el “wild type” ó para el polimorfismo, ó uno de ellos sea heterocigoto.  $n=23$  y la  $p=0,5285$ .
- *DPYD* Ile543Val ó *CDA* Lys27Gln sea homocigoto (ó uno de ellos, heterocigoto). 21 son los pacientes que están dentro de este grupo y la  $p=0,3427$ .

De los tres, el único caso en que ha salido significativo es en el primero otra vez (cuando se estudiaban *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln conjuntamente). Esta característica se ha ido repitiendo durante las combinaciones de dos en dos cambiando los genotipos.

Ésta ha sido la gráfica resultante con  $p=0,0012$ :

## Funciones de supervivencia



La mayor supervivencia se ha dado en pacientes que eran homocigotos (para el “wild type” ó para el polimorfismo) para el *DPYD Arg29Cys* ó para el *CDA Lys27Gln*, o, dicho de otra manera, que, ó el *DPYD Arg29Cys* ó el *CDA Lys27Gln* fuese heterocigoto.

Si ahora se tiene en cuenta en el caso que el *DPYD Arg29Cys* ó el *CDA Lys27Gln* sea heterocigoto ( $p=0,0012$ ). De esta manera, si se considera que el *DPYD Arg29Cys* es homocigoto (para el “wild type” o para el polimorfismo), y que *CDA Lys27Gln* es heterocigoto, da un valor de 0,0761. Si ahora se considera que el *CDA Lys27Gln* es homocigoto (para el “wild type” o para el polimorfismo), y *DPYD Arg29Cys* es el heterocigoto, el valor de  $p$  es 0,0709.

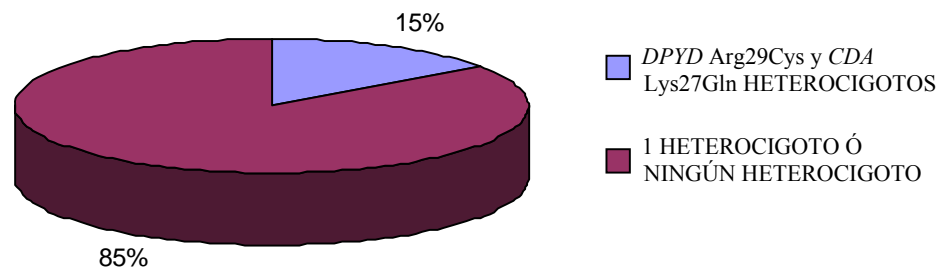
► En cuarto y último término, se considera el hecho de ser heterocigoto (primero, se tendrá en cuenta, que ambos genes sean heterocigotos; posteriormente, que uno y/ó otro sean

heterocigotos y, por último, que uno u otro sea heterocigoto):

Por lo tanto, siendo ambos heterocigotos, las gráficas resultantes darán unos resultados en número de pacientes y de p siguientes:

- *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln heterocigotos ambos: el número de pacientes con estas características ha sido de 8 y la  $p=0,0372$ .

## 2 POLIMORFISMOS (*DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln)

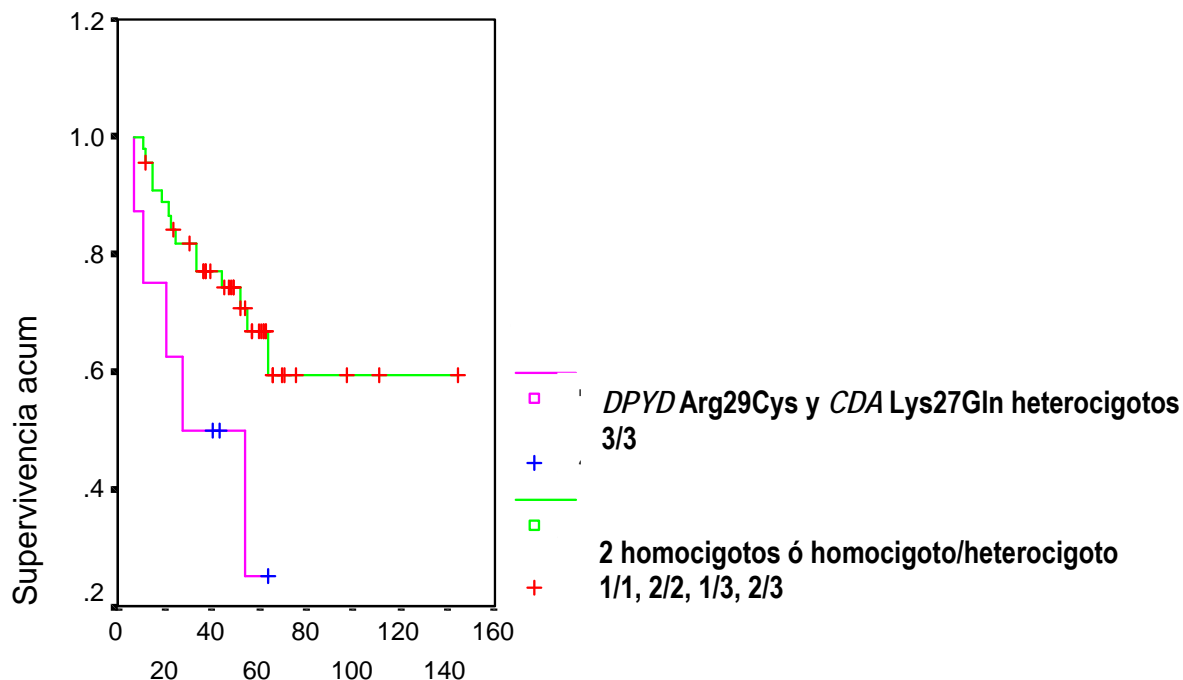


- *DPYD* Ile543Val y *DPYD* Arg29Cys heterocigotos con  $n=4$  y  $p=0,5176$ .
- *DPYD* Ile543Val y *CDA* Lys27Gln heterocigotos con  $n=9$  y  $p=0,6766$ .

La primera combinación (que *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln sean heterocigotos) ha dado una  $p$  significativa con menor supervivencia en el caso de ser *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln heterocigotos.

La gráfica resultante es la siguiente:

## Funciones de supervivencia



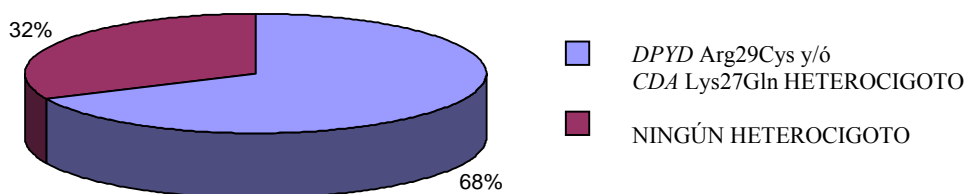
SURVIVAL

p=0,0372

El siguiente punto es que uno y/u otro sean heterocigotos:

- *DPYD Arg29Cys y/ó CDA Lys27Gln* sean heterocigotos. 36 pacientes incluidos en este grupo y p=0,0416.

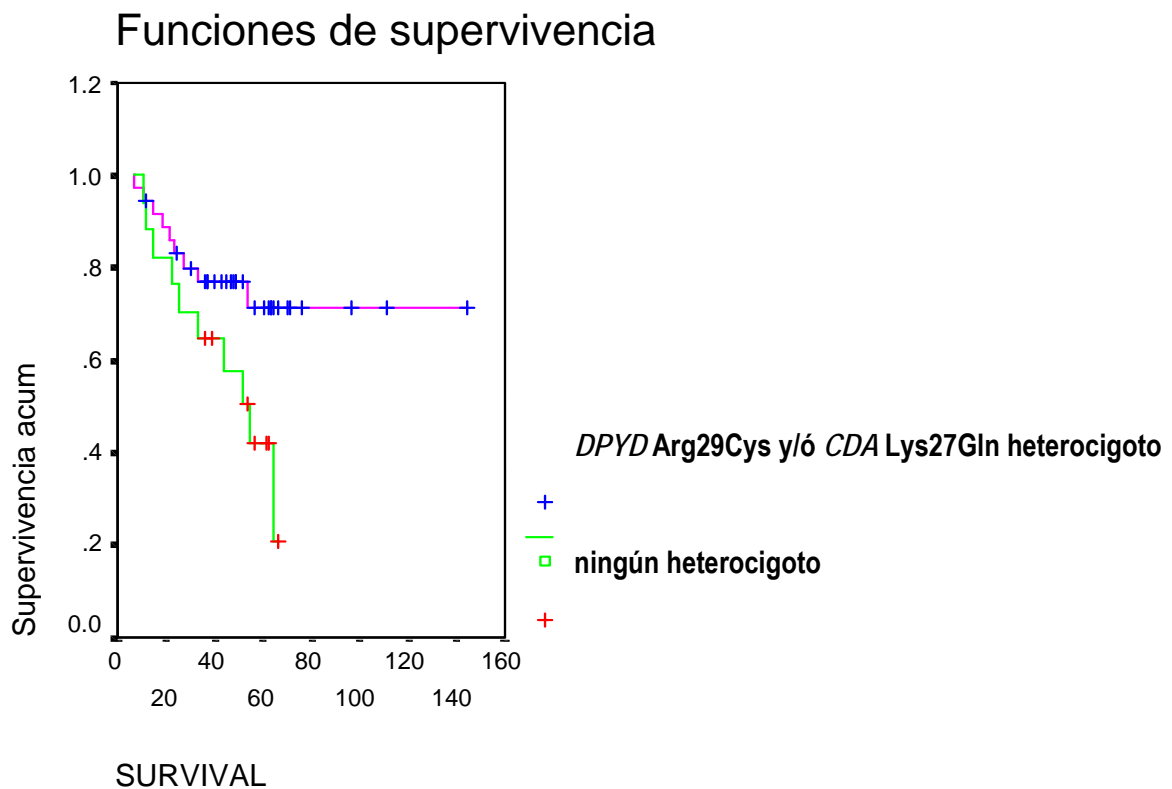
## 2 POLIMORFISMOS (*DPYD Arg29Cys y CDA Lys27Gln*)



- *DPYD Ile543Val y/ó DPYD Arg29Cys* sean heterocigotos, donde n=27 y p=0,3104.

- *DPYD* Ile543Val y/ó *CDA* Lys27Gln sean heterocigotos, con 30 pacientes con estas características y  $p=0,2094$ .

El primero de los casos ha dado una  $p$  significativa, de donde se puede deducir que pacientes con *DPYD* Arg29Cys y/ó *CDA* Lys27Gln heterocigotos, tendrán una mayor supervivencia:

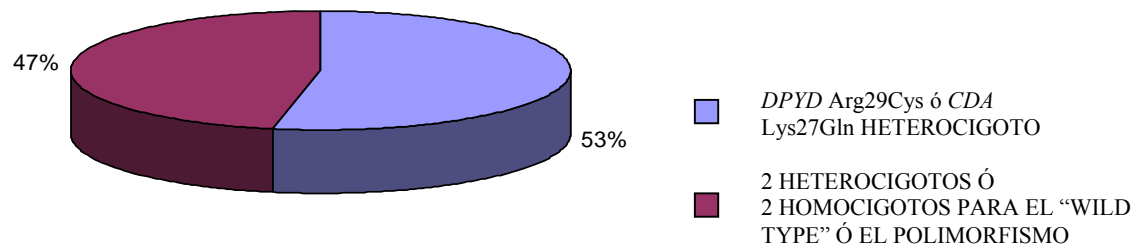


Por último, se considera el hecho que uno u otro sea homocigoto, con lo que:

- *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln sea heterocigoto, con 28 pacientes con este condicionante y  $p=0,0012$ .



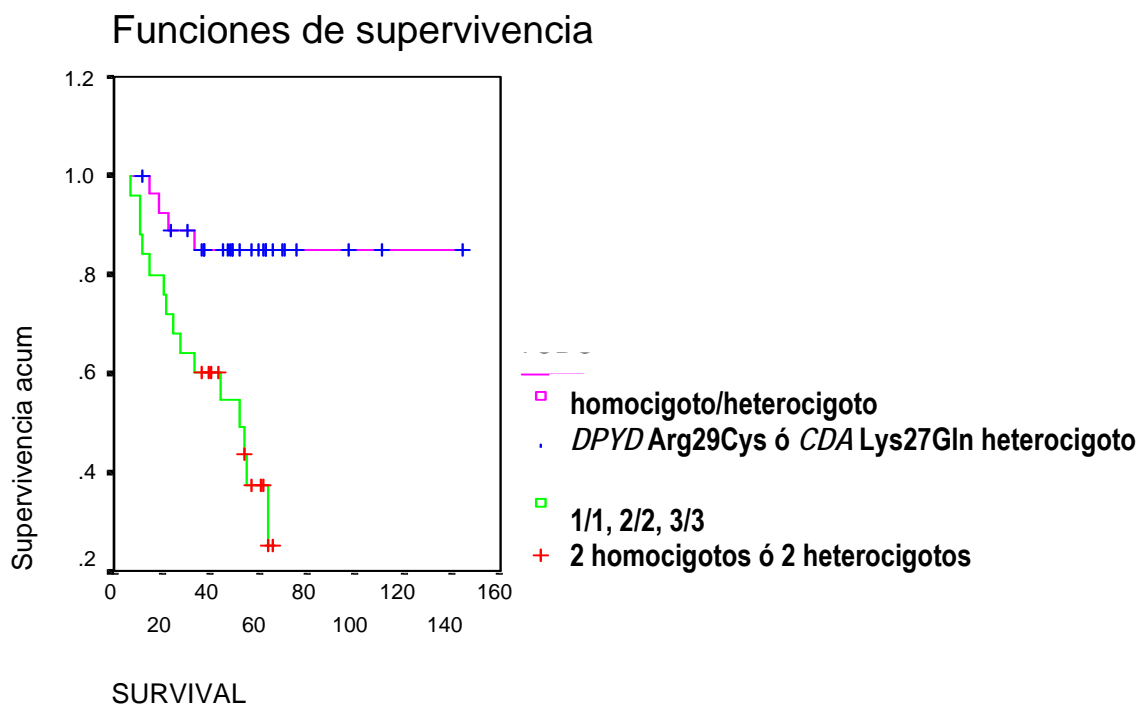
## 2 POLIMORFISMOS (*DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln)



- *DPYD* Ile543Val ó *DPYD* Arg29Cys sea heterocigoto, con n=23 pacientes
- *DPYD* Ile543Val ó *DPYD* Arg29Cys sea heterocigoto, con n=21 y p=0,3427.

Estos tres últimos casos se equivalen a cuando se había considerado el caso de pacientes que tenían un gen u otro con un homocigoto ("wild type" ó con el polimorfismo), con lo que, evidentemente el otro gen ha de ser heterocigoto.

Por tanto, la gráfica más significativa de las tres posibilidades, es la misma que se daba con anterioridad:



p=0,0012

El hecho de ser heterocigoto ha sido cada vez más significativo en el sentido desde el hecho de que los dos genes sean heterocigotos ( $p=0,0372$ ), los dos ó uno de ellos heterocigoto ( $p=0,0416$ ) y lo que nos ha dado una  $p$  más significativa es que uno de los dos genes sea heterocigoto con una  $p=0,0012$ .

Si ahora se considera que *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln es heterocigoto y se va cambiando el otro gen, se llega a la conclusión que, si *DPYD* Arg29Cys es heterocigoto y se va cambiando el genotipo del *CDA* Lys27Gln: si *CDA* Lys27Gln es homocigoto para el “wild type”, la  $p$  ha dado 0,0734 con tendencia a la significancia; si *CDA* Lys27Gln es homocigoto para el polimorfismo,  $p=0,6395$ . Si se considera *CDA* Lys27Gln heterocigoto, y *DPYD* Arg29Cys, homocigoto para el “wild type”,  $p=0,1276$ ; y si *DPYD* Arg29Cys es homocigoto para el polimorfismo, daría una  $p=0,4315$ .

La mayor significancia ha dado cuando *DPYD* Arg29Cys era heterocigoto y el *CDA* Lys27Gln, homocigoto para el “wild type”.

En la siguiente tabla se pueden ver esquematizados los resultados vistos por la combinación de dos genes, y en concreto aquellos que nos han dado significativos:

HOMOCIGOTOS “WILD TYPE”:

- *DPYD* Arg29Cys Ó *CDA* Lys27Gln homocigotos para el “wild type” con 29 pacientes y  $p=0,0280$ .

HOMOCIGOTOS PARA EL POLIMORFISMO:

- Ninguna combinación nos ha dado significativa.

CUALQUIER HOMOCIGOTO (“WILD TYPE” Ó POLIMORFISMO):

- *DPYD* Arg29Cys Y *CDA* Lys27Gln homocigoto ( para el “wild type” ó para el polimorfismo) con 17 pacientes y  $p=0,0416$ .
- *DPYD* Arg29Cys Y/Ó *CDA* Lys27Gln homocigoto con 45 pacientes y  $p=0,0372$ .
- *DPYD* Arg29Cys Ó *CDA* Lys27Gln homocigoto con 28 pacientes y  $p=0,0012$ .

HETEROCIGOTOS:

- *DPYD* Arg29Cys Y *CDA* Lys27Gln heterocigotos con 8 pacientes y  $p=0,0372$ .
- *DPYD* Arg29Cys Y/Ó *CDA* Lys27Gln con 36 pacientes y  $p=0,0416$ .
- *DPYD* Arg29Cys Ó *CDA* Lys27Gln con 30 pacientes y  $p=0,0012$ .

En términos de supervivencia:

HOMOCIGOTOS “WILD TYPE”:

- *DPYD* Arg29Cys Ó *CDA* Lys27Gln homocigotos para el “wild type”: mayor supervivencia.

HOMOCIGOTOS PARA EL POLIMORFISMO:

- Ninguna combinación ha salido significativa en términos de supervivencia.

CUALQUIER HOMOCIGOTO (“WILD TYPE” Ó POLIMORFISMO):

- *DPYD* Arg29Cys Y *CDA* Lys27Gln homocigoto (para el “wild type” ó para el polimorfismo): menor supervivencia.
- *DPYD* Arg29Cys Y/Ó *CDA* Lys27Gln homocigoto: mayor supervivencia.
- *DPYD* Arg29Cys Ó *CDA* Lys27Gln homocigoto ó que tengan un heterocigoto: mayor supervivencia.

HETEROCIGOTOS:

- *DPYD* Arg29Cys Y *CDA* Lys27Gln heterocigoto: menor supervivencia.
- *DPYD* Arg29Cys Y/Ó *CDA* Lys27Gln heterocigoto: mayor supervivencia.
- *DPYD* Arg29Cys Ó *CDA* Lys27Gln heterocigoto: mayor supervivencia.

Por los resultados obtenidos se puede deducir que sólo las combinaciones de *DPYD* Arg29Cys y de *CDA* Lys27Gln han dado significativas. No pasaba lo mismo cuando se tenían en cuenta *DPYD* Ile543Val y *DPYD* Arg29Cys ó *DPYD* Ile543Val y *CDA* Lys27Gln en ninguno de los casos. Para *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln, en términos generales, se observaba una mayor supervivencia cuando alguno de los dos genes era homocigoto para el “wild type”, cuando uno u otro era homocigoto (para el polimorfismo ó el “wild type”) ó cuando uno y/u otro era homocigoto (para el polimorfismo ó el “wild type”), así como, en contrapartida, que uno u otro fuese heterocigoto ó uno y/u otro, heterocigoto. Sin embargo, los pacientes tenían menor supervivencia cuando ambos genes eran homocigotos (ó para el “wild type” ó para el polimorfismo) ó, los dos heterocigotos.

Ahora, se comprobarán, de las gráficas significativas, si cambiando el genotipo del tercer gen, nos da más ó menos significativo:

► En primer lugar se comenzará por la gráfica que dio significativa en que se consideraba que *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln eran homocigotos para el “wild type”. La p mostró un valor de 0,0280. Ahora se tendrá en cuenta además el genotipo para el *DPYD* Ile543Val:

- *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln homocigoto para el “wild type”, y, además, *DPYD* Ile543Val, también homocigoto para el “wild type”. 17 han sido los pacientes que tenían este genotipo, y  $p=0,3396$ , por lo que no nos ha dado significativo. Querrá decir que el hecho de tener en cuenta el gen *DPYD*, y en concreto el hecho que sea homocigoto para el “wild type” no es trascendente para la supervivencia de los pacientes que han seguido este tratamiento.
- *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln homocigoto para el “wild type”, y, además, *DPYD* Ile543Val, homocigoto para el polimorfismo. El número de pacientes ha sido de 3 y  $p=0,2296$ , por lo que tampoco nos ha dado significativo el hecho de tener en cuenta el *DPYD* Ile543Val, ni que tenga este genotipo.
- *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln homocigoto para el “wild type”, y, además, *DPYD* Ile543Val, heterocigoto.  $n=9$  y  $p=0,3723$ , con lo que tampoco ha dado significativo tener en cuenta el gen *DPYD* Ile543Val, al tener este genotipo (aunque ya se ha comprobado que tener otro tampoco resulta significativo).

► Como se ha comprobado, no dio ninguna gráfica significativa cuando, uniendo de dos en dos los genes, se consideraba el hecho de que fuesen homocigotos para el polimorfismo (primero que ambos fuesen homocigotos, después que uno u otro fuesen homocigotos y, por último, que uno u otro gen fuese homocigoto para el polimorfismo).

► No ocurría lo mismo cuando los genes eran homocigotos (para el “wild type” ó para el polimorfismo) (uno y otro eran homocigotos, uno y/u otro eran homocigotos y cuando uno u otro eran homocigotos).

Ha dado significativo cuando *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln eran homocigotos (para el “wild type” ó para el polimorfismo) con  $p=0,0416$  y menor supervivencia. Casi significativo cuando *DPYD* Arg29Cys y/ó *CDA* Lys27Gln eran homocigotos con  $p=0,0372$  con mayor supervivencia, y se podría comprobar con un mayor número de pacientes si la p es más significativa.

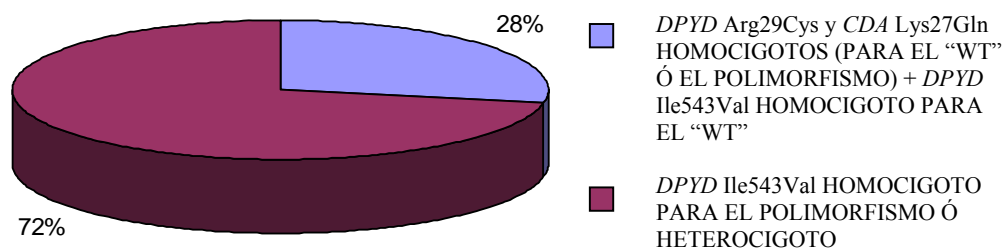
Y fue significativa cuando *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln era homocigoto para el “wild type” ó para el polimorfismo (ó que alguno de los dos sea heterocigoto) con  $p=0,0012$  y una mayor supervivencia.

Ahora se tendrá en cuenta para cada uno de los tres casos, qué pasaría al añadir *DPYD* Ile543Val e ir variando su genotipo.

En el caso de que *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln sean homocigotos (para el “wild type” ó para el polimorfismo) con una  $p=0,0416$  y menor supervivencia:

- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el “wild type”: 15 pacientes cumplen con estas características y nos ha dado una  $p$  muy significativa ( $p=0,0061$ ). Presentan una menor supervivencia.

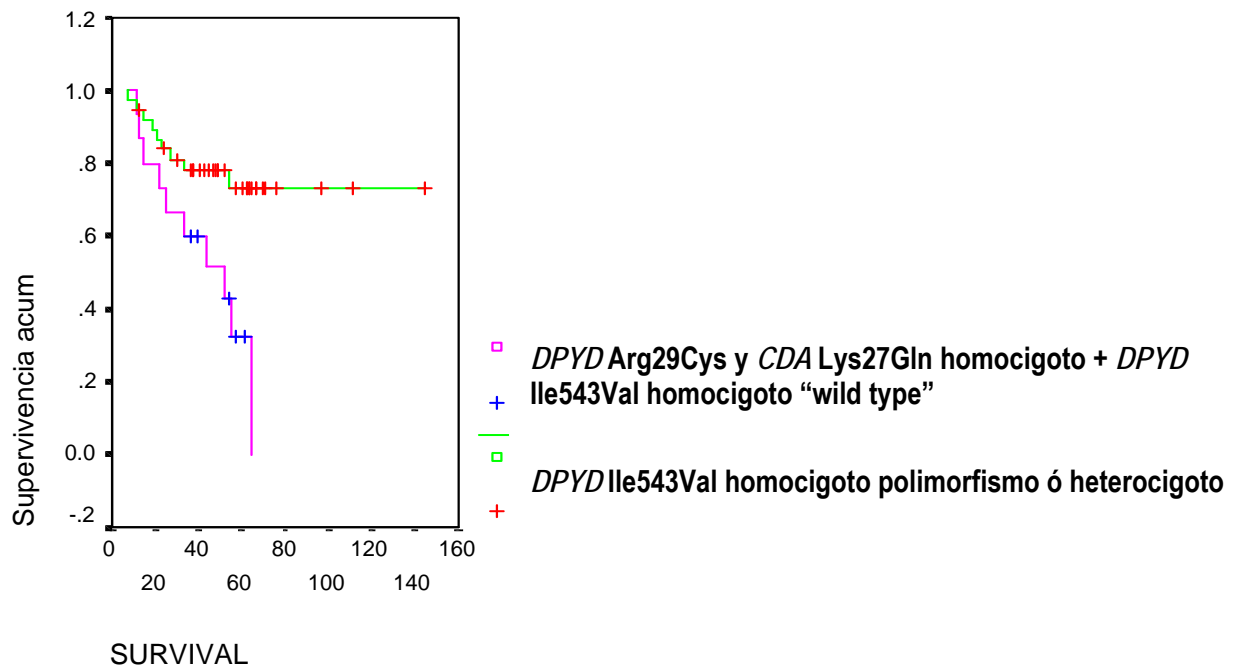
## 2 POLIMORFISMOS (*DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln)



- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el polimorfismo: No existe ningún paciente que presente estas características.
- *DPYD* Ile543Val heterocigoto: sólo existen dos pacientes con estas características y  $p=0,2814$ . No es una  $p$  significativa.

A continuación se muestra la gráfica resultante del primero de los casos:

## Funciones de supervivencia



En el caso de que *DPYD* Arg29Cys y/o *CDA* Lys27Gln sea homocigoto para el "wild type" ó para el polimorfismo ( $p=0,0372$ ) con mayor supervivencia y, además, se añada el *DPYD* Ile543Val con diferentes genotipos:

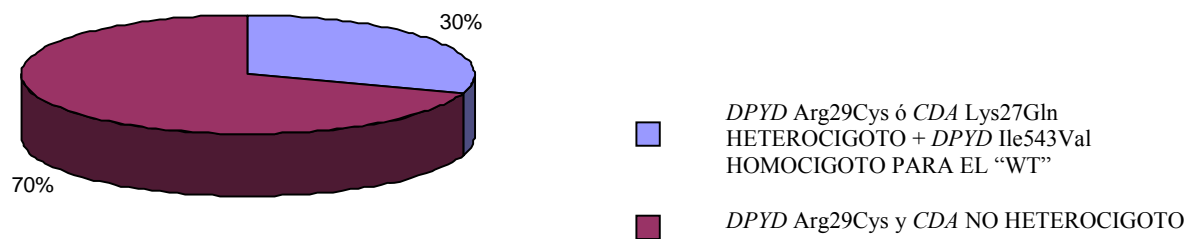
- *DPYD* Ile543Val sea homocigoto para el "wild type": están incluidos 31 pacientes y  $p=0,6288$ . No significativo.
- *DPYD* Ile543Val sea homocigoto para el polimorfismo: sólo tres pacientes están incluidos con estas características.  $p=0,2296$ . No es significativo este valor.
- *DPYD* Ile543Val sea heterocigoto: 11 pacientes son heterocigotos para *DPYD* Ile543Val y  $p=0,1617$  con lo que tampoco es significativo.

Cuando *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln era homocigoto (para el "wild type" ó para el polimorfismo) ó dicho de otra manera, que cualquiera de los dos sea heterocigoto, la gráfica ha dado significativa con una  $p=0,0012$  y una mayor supervivencia. Si además, se añade *DPYD* Ile543Val, se comprobará si sale más ó menos significativo. Se tendrán en cuenta cada uno de los genotipos (homocigoto para el "wild type", homocigoto para el polimorfismo o heterocigoto):

- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el "wild type": 16 pacientes están dentro de este grupo y

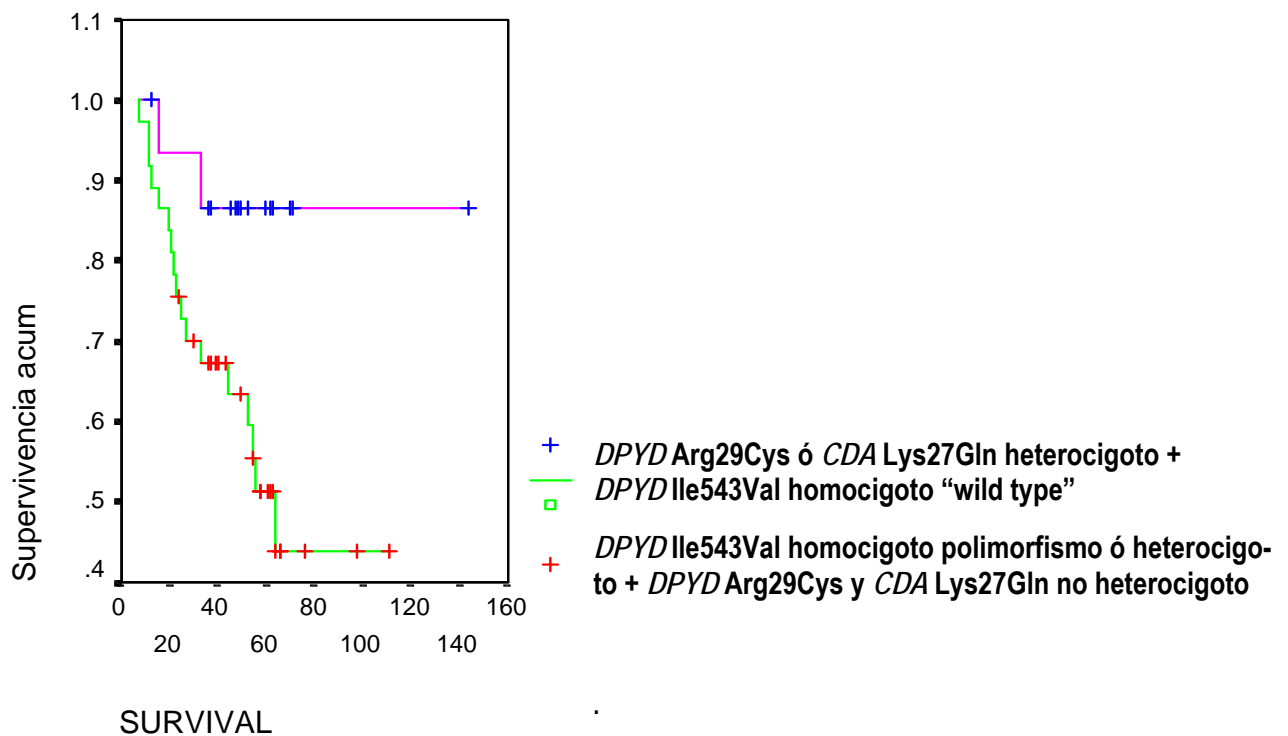
$p=0,0414$ , por lo que este resultado ha dado significativo con una mayor supervivencia para este grupo de pacientes. A continuación se puede observar la gráfica a la que hacemos mención.

### 3 POLIMORFISMOS



- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el polimorfismo: con 3 pacientes con estas características y una  $p$  no significativa ( $p=0,2296$ ).
- *DPYD* Ile543Val heterocigoto: con 9 pacientes y  $p=0,3723$ , no significativa.

### Funciones de supervivencia



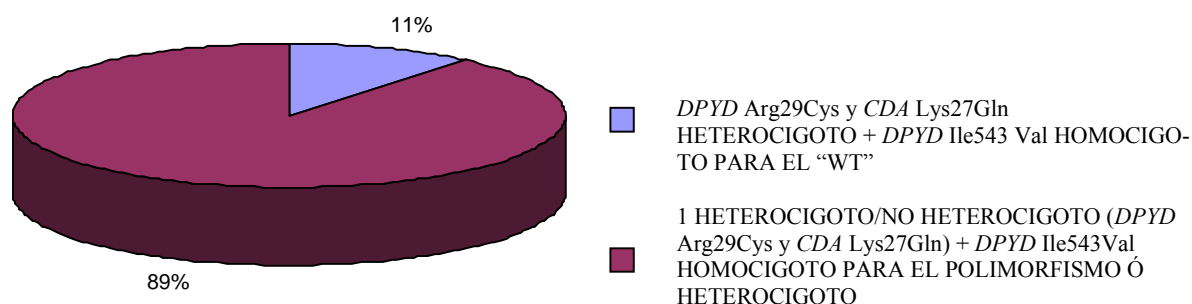
$p=0414$

► Por último, se tendrá en cuenta el hecho de añadir *DPYD* Ile543Val a las gráficas más significativas cuando, al unir de dos en dos los genes, se considera que sean heterocigotos (los dos heterocigotos, uno y/u otro heterocigoto y uno u otro heterocigoto). La gráfica fue significativa cuando los dos genes *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln eran heterocigotos ( $p=0,0372$ ) con menor supervivencia, cuando *DPYD* Arg29Cys y/o *CDA* Lys27Cys eran heterocigotos ( $p=0,0416$ ) y una mayor supervivencia, y cuando *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln era heterocigoto ( $p=0,0012$ ) con una mayor supervivencia para este grupo de pacientes.

Cuando *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln son heterocigotos, con  $p=0,0372$  y una menor supervivencia, si además, se añade *DPYD* Ile543Val, teniendo en cuenta que:

- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el “wild type”:  $n=6$  y  $p$  significativa ( $p=0,0043$ ) con una menor supervivencia para estos pacientes. A continuación se puede ver la gráfica.

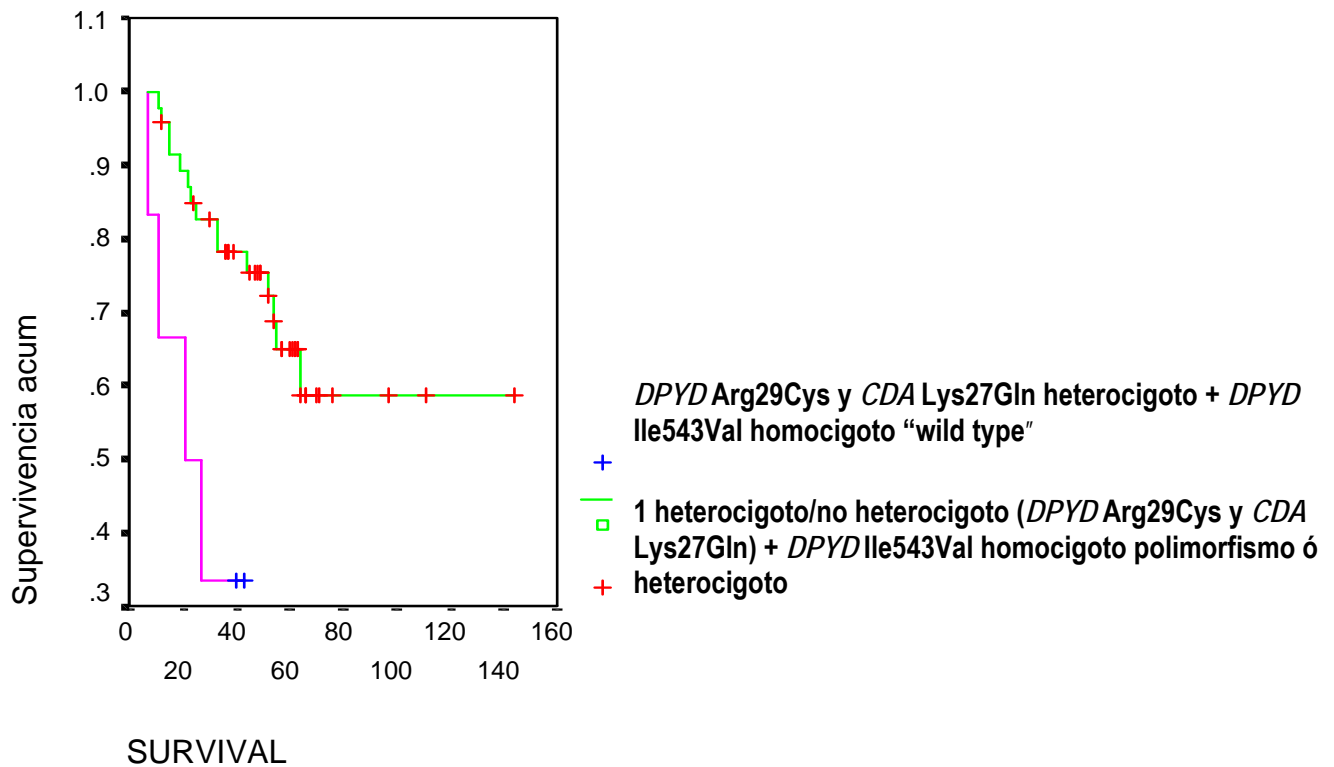
### 3 POLIMORFISMOS



- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el polimorfismo: No hay ningún paciente con estas características.
- *DPYD* Ile543Val heterocigoto: existen 2 pacientes heterocigotos para el gen *DPYD* Ile543Val con  $p=0,9790$ .



## Funciones de supervivencia



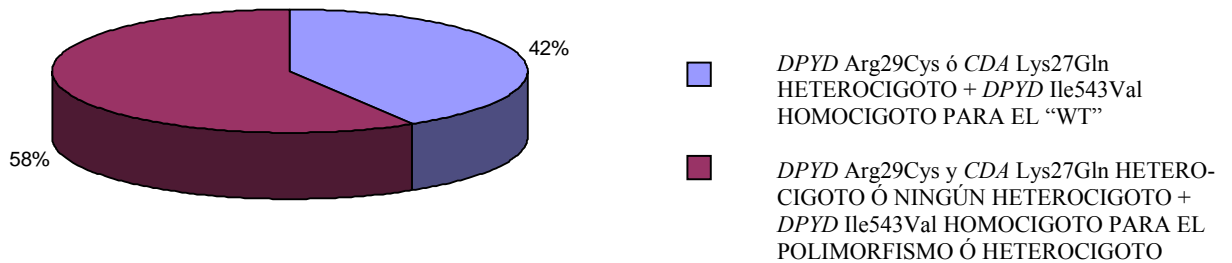
Cuando *DPYD* Arg29Cys y/o *CDA* Lys27Gln eran heterocigotos, con una  $p=0,0416$  y mayor supervivencia, al añadir el gen *DPYD* Ile543Val:

- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el "wild type":  $n=22$  y  $p=0,5506$  no significativa.
- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el polimorfismo: solo 3 pacientes han reunido estas características, y nos ha salido una  $p$  no significativa ( $p=0,2296$ ).
- *DPYD* Ile543Val heterocigoto:  $n=11$  y  $p$  no significativa ( $p=0,4080$ ).

Cuando *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln era heterocigoto daba una gráfica significativa con  $p=0,0012$  y mayor supervivencia para este grupo de pacientes. Añadiendo el gen *DPYD* Ile543Val:

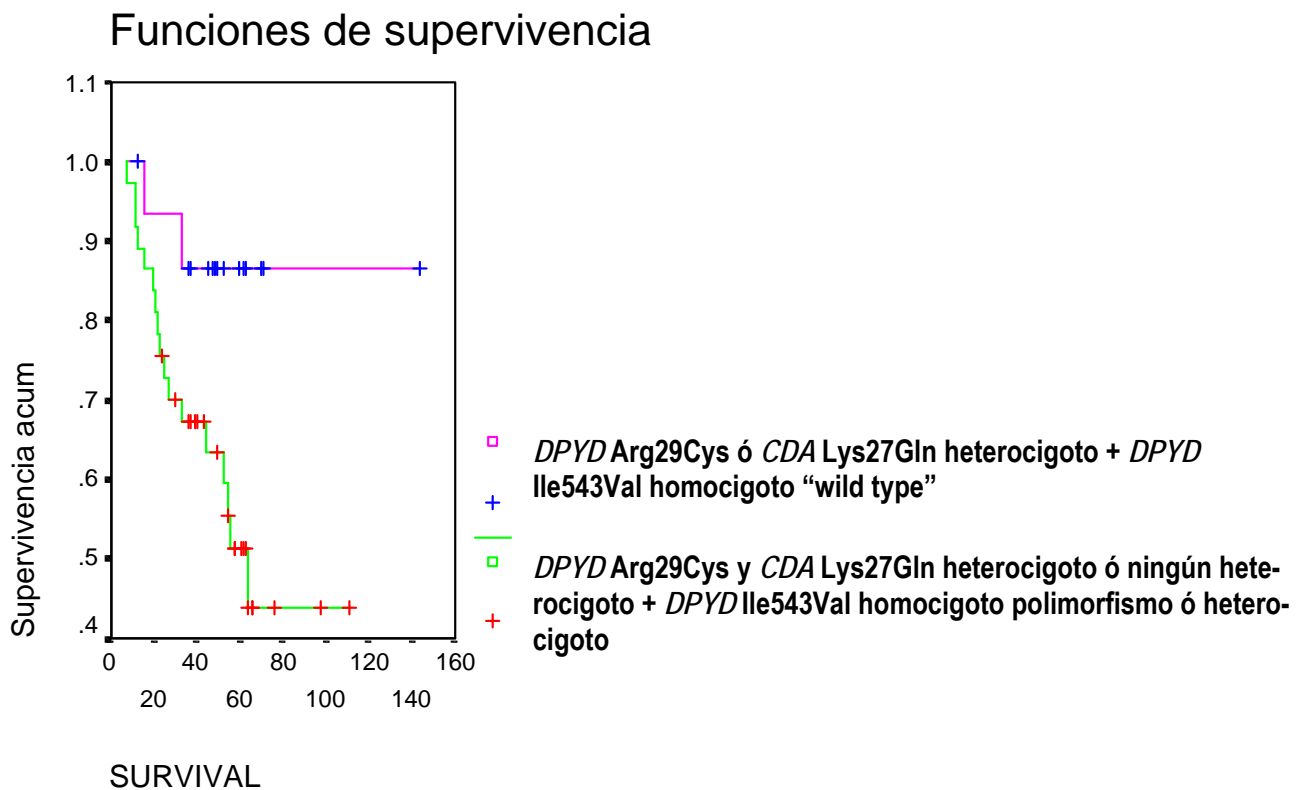
- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el "wild type":  $n=16$ ,  $p$  significativa con una  $p=0,0414$  y mayor supervivencia.

### 3 POLIMORFISMOS



- *DPYD* Ile543Val homocigoto para el polimorfismo: 3 pacientes presentan estos genotipos. p no significativa (p=0,2296).
- *DPYD* Ile543Val heterocigoto: n=9 y p=0,3723.

A continuación se puede observar la gráfica del primer caso significativo:



p=0,0414

En conclusión, lo más significativo del estudio es el hecho que por existir polimorfismo en el gen *DYPD* Ile543Val (siendo heterocigoto u homocigoto para el polimorfismo), habrá una mayor supervivencia en individuos que han sido tratados con 5-FU/MMC (p=0,0580), así como que exista al menos un heterocigoto en alguno de los tres genes estudiados, también será mayor esta supervivencia (p=0,0061). En algunos casos, haciendo combinaciones de dos genes ha habido consecuencias significativas en la supervivencia, y en concreto uniendo *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln. También se han enumerado otros posibles casos, que si bien no han sido significativos, pueden darse en determinados pacientes.

Resumiendo, en la siguiente tabla, se pueden ver esquematizados los genotipos más favorables para la supervivencia de los pacientes:

#### 4.6. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS FAVORABLES Y DESFAVORABLES

Gen	Genotipos favorables	Genotipos desfavorables
<i>DPYD</i> Ile543Val	AG-GG	AA
<i>DPYD</i> Ile543Val/ <i>DPYD</i> Arg29Cys/ <i>CDA</i> Lys27Gln	AG/CT/AC	AA-GG/CC-TT/AA-CC
<i>DPYD</i> Arg29Cys/ <i>CDA</i> Lys27Gln	CT-TT/AA CC/AC-CC CT+CC-TT/AA-CC+AC	CC-TT/AA-CC CT/AC

Por lo tanto, los genotipos más favorables serán:

- Que exista el polimorfismo para el gen *DPYD* en la posición 543, y, en concreto, una guanina (en vez de la adenina) en alguna en las dos posiciones alélicas (ser heterocigoto) ó en las dos

(o sea, ser homocigoto para el polimorfismo): AG ó GG.

- Cuando se combinan los tres genes para los que se estudian los polimorfismos (en realidad son dos genes: *DPYD* con posibles polimorfismos en dos posiciones: en la 543 ó en la posición 29 de la secuencia aminoacídica y el gen *CDA Lys27Gln*) y se da al menos un heterocigoto en cualquiera de ellos.
- Cuando se combinan el gen *DPYD* y se estudia el polimorfismo en la posición 29 de la secuencia aminoacídica de éste y el gen *CDA Lys27Gln*, es favorable el hecho de ser heterocigoto uno u otro (u homocigoto para el “wild type” ó el polimorfismo), que uno u otro fuese homocigoto para el “wild type” seguido de cuando uno y/u otro eran heterocigotos (ó uno y/u otro eran homocigotos para el “wild type” ó el polimorfismo).

Y, los genotipos desfavorables son los siguientes:

- Que *DPYD Arg29Cys* y *CDA Lys27Gln* sean heterocigotos.
- Que uno y otro sean homocigotos (para el “wild type” ó el polimorfismo).

## **5. DISCUSIÓN**

A pesar de los tratamientos aplicados en la actualidad, los pacientes con cáncer gástrico siguen recaendo y teniendo un mal pronóstico en todo el mundo. Teniendo en cuenta que el carcinoma gástrico presenta un mal pronóstico después del tratamiento sólo quirúrgico, se han desarrollado varias estrategias adyuvantes para reducir las tasas de recaídas y mejorar la supervivencia. Se observan tasas de supervivencia de hasta un 40% en pacientes que reciben quimiorradioterapia adyuvante postoperatoria en contraste con un 30% si eran tratados sólo con cirugía [80]. Investigadores japoneses propusieron que la mejora en la supervivencia puede ser conseguida también con cirugía combinada con quimioterapia adyuvante basada en mitomicina y derivados de fluorouracilo [81], y además, podría evitar los efectos adversos de la radioterapia. Estos estudios se ampliaron posteriormente. La mitomicina adyuvante presentaba ventajas frente al no tratamiento [82-84]. Precisamente, la fácil administración y los bajos niveles de toxicidad aguda severa, han hecho de la mitomicina, el fármaco más frecuentemente usado en la práctica clínica tanto en Japón como en España para pacientes con cáncer gástrico reseado [85-86]. Los pacientes seleccionados en este estudio fueron tratados con gastrectomía y a continuación por 6 meses de quimioterapia basada en mitomicina C y tegafur (un pro fármaco del 5-FU). Existen numerosos estudios en los que se comparan tratamientos adyuvantes de mitomicina sólo frente a mitomicina mas tegafur así como la administración de quimioterapia adyuvante a la cirugía frente a no administrarla. En un estudio publicado en 1998 [87], se llegaba a la conclusión que pacientes que se trataban con los dos antineoplásicos presentaban mejor supervivencia que aquéllos tratados con mitomicina sólo. Además se obtenía mayor beneficio de la quimioterapia si no presentaban ganglios linfáticos afectados y también en cáncer gástrico reseado en estadio inicial. Otro estudio publicado en 2003 por Grau et al. [88] incluyó 314 pacientes con adenocarcinoma gástrico reseado. A 151 de estos pacientes no se les administró quimioterapia adyuvante y a los 163 restantes sí. De los pacientes a los que se les administró quimioterapia adyuvante, 109 fue con mitomicina sólo (10-20 mg/m<sup>2</sup> cada 6 semanas) y a 54, MMC y tegafur (500 mg/m<sup>2</sup>/d durante 42 días consecutivos). Se llegó a la conclusión que la quimioterapia adyuvante redujo significativamente el riesgo de mortalidad y que el grupo de pacientes tratados con TG y MMC (54 pacientes) tenían mejor pronóstico que los tratados sólo con MMC. Estos resultados han sido corroborados recientemente por un grupo de investigadores japoneses que en un estudio randomizado con mas de 1000 pacientes han podido demostrar una gran mejoría de la supervivencia en pacientes tratados en adyuvancia con S1, un preparado vía oral de Tegafur con otros dos fármacos inhibidores de la degradación del 5-FU [89]. Además, la efectividad del tratamiento se puede ver alterada por las concentraciones del enzima timidilato sintetasa, de tal manera que bajos niveles de TS en células de cáncer

gástrico se asociaron a mejores resultados después del tratamiento con TG adyuvante mientras que cuando la concentración era elevada esto no ocurría [90,91].

El tratamiento, sea el aplicado en el estudio ó no, puede verse influenciado por la existencia de polimorfismos. Un polimorfismo es la variación en un gen (a menudo en un nucleótido) donde dos ó más alelos existen en una frecuencia de al menos un 1% de la población general. Estos polimorfismos pueden actuar a diferentes niveles como puede ser en el enzima responsable de la metabolización del fármaco e incluyen repeticiones de nucleótidos, deleciones, inserciones y mutaciones que influyen en la expresión del gen y/ó función. Recientemente, el metabolismo alterado del fármaco debido a polimorfismos genéticos ha sido complementado con estudios que asocian respuesta del tumor ó supervivencia del paciente con polimorfismos en transportadores de membrana (como por ejemplo, ABCB1 en pacientes con leucemia mieloide aguda) y enzimas de reparación (como ERCC2 ó XRCC1 en pacientes con cáncer colorectal) [92].

Se han estudiado 3 polimorfismos del tipo “missense” en la zona exónica, uno para el gen *CDA*, y 2 para el gen *DPYD*. El gen *DPYD* está situado en la posición 1p22 del cromosoma. Los dos polimorfismos estudiados son: Ile543Val en el exón 13 de la secuencia génica y Arg29Cys en el exón 2 de la secuencia génica [34]. El gen *CDA* está situado en la posición 1p36.2-p35 del cromosoma y el polimorfismo estudiado: Lys27Gln en el exón 1 de la secuencia génica [25].

El gen que codifica para la CDA se encuentra en el cromosoma tiene una longitud de 31 kb y consta de cuatro exones. Contiene 438 pares de bases que codifican para un polipéptido de 146 aminoácidos con una masa molecular de 16,2 kDa. El enzima para el que codifica el gen *CDA* es tetramérico y consiste en 2 tipos de subunidades, M y H, que se pueden combinar para dar 5 isoenzimas diferentes. Está implicado en procesos de síntesis de DNA, de RNA y, además, actúa como inhibidor de crecimiento de las células formadoras de colonias de macrófagos. Este enzima se encuentra en el hígado y en las células del tumor. Existen estudios que corroboran el hecho que pacientes con leucemia linfocítica crónica presentan una elevada concentración de CDA y que este hecho supone un mal pronóstico para estos individuos por suponer un aumento en la síntesis de DNA en el tumor. De igual manera, se puede pensar que pacientes con otro tipo de cáncer y con elevada expresión de CDA, pueden presentar un mal pronóstico al producirse un aumento en la síntesis de DNA, y consecuentemente de las células tumorales pero este hecho no se ha estudiado. Variaciones en la secuencia proteica, si este cambio supone una pérdida de la acción del enzima, podrían disminuir la capacidad de producir síntesis de DNA y evitar el desarrollo del cáncer. Al disminuir la actividad de la CDA, se provee de escaso substrato (dUMP) para la actuación de TS. En primer lugar actúa la CDA que

transforma el derivado citidínico (dCMP) en derivado uridínico (dUMP) para posteriormente encargarse la TS de formar el derivado timidínico (dTMP), precursor de la síntesis de DNA. Si alguno de estos procesos está inhibido ó alguna de estas acciones disminuía, no se producirá la síntesis de DNA. No sólo se puede ver influenciado por la concentración de CDA, sino por la de TS. Existen estudios que demuestran que variaciones en la expresión de la TS en las células del tumor pueden frenar este proceso y el desarrollo de cáncer. Este hecho se puede ver afectado por la acción del 5-FU que también inhibe la acción de la TS. La disminución en la concentración de la CDA podría inducir una disminución en la síntesis de DNA y una mejora en el pronóstico de pacientes afectados por esta patología. En el caso que se estudia para el polimorfismo en la *CDA*, la expresión del enzima no varía en gran medida del genotipo “wild type” respecto al polimorfismo por lo que se podría pensar que no es significativo el hecho de presentar polimorfismo para la supervivencia del paciente en vista de los resultados que se han obtenido.

Se ha estudiado para los tres genes, la existencia de polimorfismos en los enzimas que codifican. El hecho de tener un polimorfismo supone una disminución, aumento, una pérdida ó una actividad diferente del enzima. Para los enzimas que son objeto de estudio, en el caso de la *CDA*, supone la expresión de un enzima con diferente actividad y para la *DPYD*, una disminución ó pérdida de la actividad de ésta. Esto hace que en el caso de la *CDA* y debido a su implicación en la transformación de la CAP en el fármaco activo 5-FU, el enzima no pueda hacer esta conversión, con lo que el tratamiento no sea efectivo. Aquí el profármaco administrado ha sido el TG y, a diferencia de lo que ocurre con la CAP, el enzima *CDA* no influye en la conversión del profármaco en el fármaco activo. Se cree que en las células del tumor existe este enzima ó por lo menos de manera alterada, y que, de alguna manera puede influir en la supervivencia de los pacientes sometidos a este tratamiento después de la cirugía. La elevada concentración de *CDA* implica un aumento en la síntesis de DNA, así como de RNA, y por el hecho de encontrarse a nivel del tumor (y del hígado), provoca el crecimiento de la masa tumoral. Pero el hecho de presentar el polimorfismo no varía en gran medida la expresión de la proteína. Se ha comprobado que el gen que codifica para la lisina (“wild type”) en el aminoácido 27 de la secuencia proteica se encuentra expresado en el 54% de los cánceres gástricos, mientras que si en esta posición se ha producido un cambio por una glutamina, se expresa en el 41% de los cánceres gástricos. Así que, se supone que la supervivencia estará más en función de la concentración inicial de *CDA*, más que del hecho que exista ó no polimorfismo [28].

El gen *DPYD* es el primero y enzima limitante del catabolismo del uracilo y timina y la única vía catabólica para la síntesis de la  $\beta$ -alanina en mamíferos [93]. La actividad del enzima es altamente



variable entre pacientes. La deficiencia de DPYD predispone a una prolongada vida media ( $t_{1/2}$ ) y, por lo tanto, severas toxicidades neurológicas e intestinales [94]. Se ha descrito un síndrome farmacogenético, causado por mutaciones en el gen *DPYD* y dando como resultado una pérdida parcial ó total de actividad del enzima, en pacientes que recibían como tratamiento 5-FU [95,96]. Después de dosis convencionales de 5-FU, estos pacientes desarrollan toxicidad profunda que incluyen mucositis, neutropenia, síntomas neurológicos, y, en algunos casos, la muerte. El síndrome neurológico se denomina timina-uraciluria congénita con severidad variable de presentación clínica caracterizada por ataques, retraso mental y de muy baja a indetectable actividad de DPYD en fibroblastos ó células mononucleares. Basado en la actividad catalítica del enzima medida en células mononucleares en sangre periférica, aproximadamente un 3% de la población presenta actividad parcial de DPYD. En pacientes que desarrollan toxicidad relacionada con el 5-FU de grado 3-4 (hematopoiético, gastrointestinal ó neurológico) según la Organización Mundial de la Salud, la frecuencia de pacientes con actividad de DPYD disminuida en células mononucleares de sangre periférica varía del 36% al 59%. El gen *DPYD* se encuentra en el cromosoma 1p22 y está formado por 23 exones. La mutación más frecuente en pacientes con deficiencia parcial o completa de *DPYD* es el cambio de una guanina por una adenina con “splicing” en 5' en el intrón 14 (*DPYD\*2A*) que resulta en una pérdida del exón 14 y una proteína truncada por 55 aminoácidos y sin actividad del enzima (IVS14+1G>A). La frecuencia del genotipo *DPYD\*2A* en población caucásica es del 0,9% [97,98]. Teniendo en cuenta el tratamiento aplicado, el enzima DPYD participa en procesos de metabolismo del 5-FU. Después de la administración de 5-FU ó de su transformación a partir del profármaco, más del 80% de la dosis administrada se degrada. El catabolismo del FU es idéntico a la reducción de las pirimidinas, uracilo y timina. El primer paso de esta degradación tiene lugar muy rapidamente. El FU es reducido a FUH<sub>2</sub> (5,6-dihidro-5-fluorouracilo) bajo la acción de la DPYD (dihidropirimidina dehidrogenasa) y en presencia de la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Este primer paso es el que gobierna la tasa en que el FU está disponible para el anabolismo. El anillo de pirimidina del FUH<sub>2</sub> se escinde entre las posiciones 3 y 4 para dar ácido  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -ureidopropiónico (FU-PA). Un tercer paso conduce a la formación de  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina (FBAL), el mayor catabolito del FU, con liberación de amonio del nitrógeno en posición 3 y dióxido de carbono del carbono en posición 2 del antiguo anillo de pirimidina. Se forma urea a través del ciclo de la urea a partir del ión amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Por lo tanto, el enzima para el que codifica este gen dará lugar a metabolitos inactivos para el tumor de este antineoplásico que impedirán que éste continúe actuando. De este hecho, se puede deducir que, cuanto mayor sea la concentración del enzima en

el tumor, mayor metabolismo de 5-FU se dará y menor actuación de éste al haberse producido esta reacción. La mayoría de esquemas catabólicos del FU se detienen en estos metabolitos, aunque estudios recientes que utilizan métodos analíticos más sofisticados han identificado otros catabolitos del FU, que incluyen: el ión fluoruro ( $F^-$ ) que proviene de la escisión del enlace C-F del FBAL; el N-carboxilo- $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina (CFBAL) derivado de la N-carboxilación de FBAL en presencia de iones bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) produciéndose una reacción en equilibrio; tres conjugados de FBAL con ácidos biliares; dos metabolitos de FBAL por transaminación: ácido 2-fluoro-3-hidroxiopropanoico (FHPA) y fluoroacetato (FAC). El resto de 5-FU que no se degrada (20%) participa en procesos de anabolismo que definen la actividad del fármaco. Las principales vías de actuación del 5-FU son tres. La primera, que es cuantitativamente la menos importante, conduce en dos pasos a la formación de FdUMP (5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato). El primero de los pasos, la adición de deoxirribosa-1-fosfato sobre el FU bajo la acción de TP (timidina fosforilasa) da lugar a FdUrd (5-fluoro-2'-deoxiuridina). Esta reacción es seguida por la fosforilación por la timidina quinasa para obtener FdUMP, un inhibidor reconocido de la TS (timidilato sintasa). Las otras dos rutas forman FUMP (5-fluorouridina-5'-monofosfato). En una de ellas, se produce FUMP directamente en un único paso; bajo la acción del enzima OPRT (orotato fosforibosil transferasa), se traspa una ribosa 5'-monofosfato desde una molécula de PRPP (5'-fosforibosil-1-pirofosfato) al nitrógeno en posición 1 del FU para dar FUMP. La otra ruta alternativa tiene lugar en dos pasos; en el primero de ellos se añade una ribosa a la molécula de FU bajo la acción de la uridina fosforilasa para dar FUrđ (5-fluorouridina), que es fosforilado a FUMP por la uridina quinasa. En este punto, el FUMP pasa por dos fosforilaciones sucesivas. Se forma FUDP (5-fluorouridina-5'-difosfato) bajo la acción de la pirimidina monofosfato quinasa, que, gracias a la pirimidina difosfato quinasa, conduce a FUTP (5-fluorouridina-5'-trifosfato) que puede ser incorporado en el RNA en vez de la uridina-5'-trifosfato (UTP). El FUTP puede entonces conjugarse con azúcares dando FUDP-azúcares bajo la acción de la UDP glucosa (ó N-acetilglucosamina) fosforilasa. Después de la primera fosforilación de FUMP en FUDP, el enzima ribonucleótido reductasa dehidroxila la ribosa del FUDP en la posición 2' para dar FdUDP (5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-difosfato). FdUDP se puede formar también por la fosforilación de FdUMP. FdUDP se defosforila a FdUMP ó fosforilado a FdUTP (5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato) vía pirimidina monofosfato quinasa y pirimidina difosfato quinasa respectivamente. FdUTP actúa como substrato para DNAs polimerasas, pudiendo ser incorporado en el DNA. Al igual que a nivel de catabolismo, se pueden dar polimorfismos en el enzima DPYD, a nivel de anabolismo se pueden dar polimorfismos en los enzimas uridina fosforilasa, orotato fosforibosil

transferasa, timidina fosforilasa, ribonucleótido reductasa y timidilato sintasa, que pueden influir a nivel del metabolismo y actividad del FU, respectivamente.

En el caso de la *DPYD*, el hecho de tener el polimorfismo implica también disminución en la actividad del enzima con lo que el 5-FU no se podrá metabolizar ó en menor medida, éste se acumulará en el lugar de acción (hígado y tumor), implicando, ó bien actividad aumentada y mayor efectividad del FU, ó bien toxicidad por sobredosificación. En este caso, y conociendo la existencia del polimorfismo, se deberían disminuir las dosis de 5-FU para evitar esta toxicidad (ajustar las dosis). Estas conclusiones se deducen por la mayor supervivencia aparecida en pacientes que presentan el polimorfismo en el gen que hacen suponer que el enzima presenta menor actividad bajo estas condiciones con lo que se dará una menor metabolización y mayor biodisponibilidad del 5-FU y tratamiento más efectivo.

Primero se ha comprobado para los 3 genes si es significativo el hecho de contener el polimorfismo independientemente, para luego ver diferentes combinaciones.

En el caso de la *CDA* (*CDA* Lys27Gln) se ha comprobado el hecho de que exista el polimorfismo (tanto si es homocigoto como heterocigoto para el polimorfismo). La existencia del polimorfismo se hace patente por el cambio de una Adenina (A) por una Citosina (C), que, da lugar a un cambio de aminoácido en la secuencia proteica, que altera la actividad de ésta: Lisina por Glutamina (Lys→Gln). El genotipo “wild-type” tendrán los dos alelos ó secuencias de DNA que codificarán para la Lisina, por lo que no existirá ninguna variación respecto al gen primitivo. Sin embargo, el genotipo con el polimorfismo, tendrán, o los dos alelos con la variación en el nucleótido (en este caso, será homocigoto para el polimorfismo y los dos codificarán para la Glutamina), ó sólo uno de ellos y el otro sin el cambio (heterocigoto para el polimorfismo: uno de los alelos codificará para la Lisina y el otro, para la Glutamina). El hecho de existir el polimorfismo para el gen provoca un aumento de la supervivencia aunque no es significativo. Esto puede ser debido a la menor expresión de la *CDA* (41%) en cánceres gástricos que poseen el polimorfismo y presentan el aminoácido glutamina en la posición 27 de la secuencia proteica, frente al 54% de pacientes “wild type” que poseen una lisina en esta posición y peor pronóstico. Quizás si se dispudiera de mayor número de pacientes este hecho se podría confirmar.

Independientemente del tratamiento aplicado, la alta expresión del enzima *CDA* es una característica de mal pronóstico en leucemias linfocíticas crónicas (CLL). Este hecho no ha sido estudiado para cáncer gástrico pero por los resultados de nuestro estudio es probable que también pueda ocurrir en este tipo de cáncer. De hecho, después de la amplificación de la muestra con el “primer” que con-

tiene el polimorfismo para la *CDA*, las gráficas de supervivencia nos han sugerido este hecho aunque estos resultados no sean significativos ( $p=0,1434$ ). Quizás lo puedan ser con un mayor número de pacientes, aunque esto no se ha comprobado. Según podemos observar en la gráfica (Ver interpretación de los resultados) para los pacientes que son “wild-type” para el enzima *CDA*, es decir que poseen una adenina y no una citosina en la posición del gen (exón 1) que codifica para una lisina y no una glutamina en el aminoácido 27 de la secuencia proteica, la supervivencia es menor. Sin embargo, cuando existe polimorfismo en uno de los alelos de la secuencia de DNA (A/C: heterocigoto para el polimorfismo) ó en los dos alelos del gen (C/C: homocigoto para el polimorfismo), en la gráfica de supervivencia podemos observar cómo la supervivencia es mayor. Se postula que, igual que ocurre en la leucemia linfocítica crónica, en el cáncer gástrico puede sacarse la conclusión que la elevada expresión de la *CDA* puede ser indicativo de un mal pronóstico para la supervivencia de pacientes que padecen este tipo de cáncer (tanto el genotipo “wild type” como polimorfismos para el gen que codifica para el enzima).

Cuando se estudia el gen *DPYD* Ile543Val, sí resulta significativo poseer el polimorfismo para que el tratamiento con TG-MMC sea efectivo y suponga una mayor supervivencia para los pacientes con cáncer gástrico sometidos a este tratamiento. El hecho de poseer el polimorfismo supone que ha habido un cambio en el aminoácido 543 de la secuencia proteica, provocado por el cambio de una adenina por una guanina en el triplete codificante (ATA→GTA) pasándose de tener una isoleucina a tener una valina.

Se está demostrando que realmente el polimorfismo puede influir en la supervivencia de estos pacientes. Como se puede comprobar en la gráfica, los pacientes que tienen genotipo “wild type”, tienen una menor supervivencia después del tratamiento. La causa podría ser que el FU se encuentra menos biodisponible al ser metabolizado por el enzima dihidropirimidina dehidrogenasa. Sin embargo, cuando existe el polimorfismo, el FU no se metaboliza, existe mayor concentración en el lugar de acción y puede actuar frente al tumor. También este hecho puede suponer una mayor toxicidad para el paciente, con lo que, podría ser necesario el ajuste de la dosis administrada. Lo interesante sería saber antes de iniciar el tratamiento, si un determinado paciente presenta el polimorfismo para comenzar a tratar al paciente lo antes posible y con el tratamiento adecuado.

Para el *DPYD* Arg29Cys, la gráfica de supervivencia comparada no es significativa. Tener el polimorfismo supone un cambio del aminoácido 27 en la secuencia proteica pasándose de tener una arginina a tener una cisteína por existir un cambio de base del nucleótido correspondiente, y en concreto, una citosina por una timina (CGT→TGT). La diferencia de supervivencia entre poseer ó no el

polimorfismo es escasa, por lo que se puede sugerir que la actividad del enzima se mantiene aunque posea este cambio de nucleótido en la secuencia del gen. Por lo tanto, presentar el polimorfismo no supone casi pérdida de la actividad del enzima y el FU se seguirá metabolizando en gran medida. Esto nos sugiere que puede haber mayor supervivencia, en el caso del polimorfismo para el *DPYD* Ile543Val, con lo que el tratamiento será más efectivo, mayor concentración en el lugar de acción, el FU actuará en mayor medida, y la pérdida de actividad del enzima es mayor al producirse el cambio de nucleótido (SNP: polimorfismo) ya que el fármaco se metaboliza en menor proporción y además. De lo expuesto, se puede deducir, en el caso de *DPYD* Arg29Cys, que las supervivencias entre poseer el genotipo “wild type” y el polimorfismo son muy similares, por lo que la pérdida de actividad del enzima metabolizador es menor, menor concentración de FU al ser degradado en mayor medida por la *DPYD*.

Posteriormente, al comparar las gráficas de supervivencia de pacientes con los genes estudiados heterocigotos frente a homocigotos (para el “wild type” ó para el polimorfismo) hemos comprobado que no hay diferencias estadísticas significativas. De todas maneras en los tres casos la supervivencia ha sido mayor cuando el gen era heterocigoto para el polimorfismo. Si fuese estadísticamente significativo, se podría afirmar que, pacientes homocigotos sea tanto para el “wild type” como para el polimorfismo, tendrían menor supervivencia después de ser tratados con FU, mientras que aquellos que fuesen heterocigotos, tendrían mayor supervivencia. Por lo tanto, si supiésemos el genotipo antes de administrar el tratamiento, sería lógico administrar FU-MMC a pacientes heterocigotos y no en aquellos que fuesen homocigotos. De esta manera, estaríamos ahorrando tiempo y estaríamos administrando el tratamiento correcto desde un principio. La tasa de metabolización será muy similar para el homocigoto frente a heterocigotos, con lo que el fármaco biodisponible también lo será, si bien será mayor para el caso de los heterocigotos. La supervivencia es mayor y el tratamiento más efectivo para el caso de heterocigotos frente a homocigotos en pacientes con el polimorfismo.

No ocurre lo mismo cuando se unen los tres genes y se tiene en cuenta el mismo criterio. Poseer una expresión heterocigótica en cualquiera de los tres genes estudiados da como consecuencia una mayor supervivencia en estos pacientes. Por lo tanto, si se hiciera un estudio en el que se determinara el genotipo de los tres genes antes de iniciar el tratamiento, y en cualquiera de ellos se viera su heterocigosidad, el tratamiento con FU-MMC sería muy efectivo ya que, como demuestra la gráfica la supervivencia en estos pacientes se mejora. Sólo el hecho de tener un polimorfismo heterocigoto en cualquiera de los tres genes supone una gran ventaja de cara a la supervivencia después de este tratamiento, mientras que no tenerlo demuestra que este tratamiento no es el adecuado.

También se han analizado combinaciones de dos polimorfismos con su significado pronóstico.

Los genotipos que han mostrado significancia estadística han sido los siguientes: *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln que sean homocigotos para el “wild type”, *CDA* Lys27Gln homocigoto para el “wild type” y *DPYD* Arg29Cys heterocigoto, *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln homocigotos (para el polimorfismo ó para el “wild type”), *DPYD* Arg29Cys y/ó *CDA* Lys27Gln homocigoto para el “wild type” ó para el polimorfismo, *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln homocigoto (para el “wild type” ó el polimorfismo), *DPYD* Arg29Cys y/ó *CDA* Lys27Gln heterocigoto, *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln heterocigoto.

En un estudio recientemente publicado sobre la influencia del enzima CDA en el desarrollo de cáncer gástrico confirma la relación existente entre la infección por *Helicobacter pylori* cagA positivo y una sobreexpresión de CDA que resulta en una acumulación de alteraciones en el gen supresor de tumores p53 y todo este proceso se encuentra mediado por la activación del mecanismo dependiente del factor nuclear kB. Todo ello, explicaría que alteraciones del gen *CDA* podrían influir una diferente evolución del cáncer gástrico [99].

## **6. CONCLUSIONES**

1. El polimorfismo *DPYD* Ile543Val (A/G ó G/G) presenta significancia con un aumento de la supervivencia cuando se da aisladamente, con un valor de  $p=0,0580$ .
2. El enzima dihidropirimidina dehidrogenasa actúa a nivel de metabolismo del 5-FU. Tener mayor supervivencia en el caso de poseer el polimorfismo en *DPYD* Ile543Val podría deberse a la menor actividad del enzima con lo que el 5-FU se metabolizaría en menor medida y estaría más biodisponible para su actividad.
3. Independientemente del resto de polimorfismos, presentar polimorfismo en *CDA* Lys27Gln (A/C ó C/C) se asocia a una mayor supervivencia con una tendencia a la significancia, con un valor de  $p=0,1434$ .
4. No fue significativo para ninguno de los tres tipos aisladamente cuando se comparaban homocigotos para el “wild type” ó el polimorfismo y ser heterocigoto.
5. Cuando se estudian conjuntamente y existe algún heterocigoto sea cual sea el gen (*DPYD* Ile543Val, *DPYD* Arg29Cys ó *CDA* Lys27Gln), la supervivencia y tasa de curación (o de largos supervivientes) es mayor ( $p=0,0061$ ). También es mejor la supervivencia si existen polimorfismos combinados de *DPYD* Arg29Cys y *CDA* Lys27Gln, que no se ha demostrado si están presentes aisladamente.
6. Los polimorfismos estudiados aisladamente y en combinación pueden ser buenos precursores en las respuestas de pacientes tratados con fluoropirimidinas.
7. El estudio de polimorfismos puede ser de utilidad para determinar perfiles genéticos que puedan preveer respuestas a tratamientos oncológicos.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- 1– Catalano V, Labianca R, D.Beretta Giordiano. Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54: 209-241.
- 2– Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC. The Future of Gastric Cancer Prevention. *Gastric Cancer* 2004;7:9-16.
- 3– D.Mark Pritchard. Models of Gastric Cancer. Article in press: *Drug Discovery Today: Disease Models* 2005,2:21-26.
- 4– Parsonnet J, Friedman G D, Orentreich N. Risk for Gastric Cancer in People with CagA Positive or CagA Negative *Helicobacter pylori* Infection. *Gut* 1997;40:297-301.
- 5– AJCC Manual de diagnóstico de extensión del cáncer. Clasificación TNM de los tumores malignos (Sexta edición). Ediciones Mayo. 2004 Barcelona. pp 113-120.
- 6– Schuhmacher CP, Fink U, Becker K. Neoadjuvant Therapy for Patients with Locally Advanced Gastric Carcinoma with Etoposide, Doxorubicin, and Cisplatin. *Cancer* 2001;91:918-927.
- 7– Hartgrink H H, van de Velde CJH, Putter H, Songun I. Neo-adjuvant Chemotherapy for Operable Gastric Cancer: Long Term Results of the Dutch Randomized FAMTX trial. *J Cancer Surg* 2004;30:643-649.
- 8– Lordick F, Siewert JR. Recent Advances in Multimodal Treatment for Gastric Cancer: a Review. *Gastric Cancer* 2005;8:78-85.
- 9– Wilke H, Preusser P, Fink U. Preoperative Chemotherapy in Locally Advanced and Nonresectable Gastric Cancer: a Phase II Study with Etoposide, Doxorubicin and Cisplatin. *J Clin Oncol* 1989;7:1318-1326.
- 10– Ajani JA, Ota DM, Jessup JM. Resectable Gastric Carcinoma. An Evaluation of Preoperative and Postoperative Chemotherapy. *Cancer* 1991;68:1501-1506.
- 11– Alexander HR, Grem JL, Pass HI. Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Gastric Adenocarcinoma. *Oncology* 1993;7:37-42.
- 12– Kelsen D, Karpeh M, Schwartz G. Neoadjuvant therapy of high-risk gastric cancer: a phase II trial of preoperative FAMTX and postoperative intraperitoneal fluorouracil-cisplatin plus intravenous fluorouracil. *J Clin Oncol* 1996;14:1818-1828.
- 13– Crookes P, Leichman CG, Leichman L. Systemic chemotherapy for gastric carcinoma followed by postoperative intraperitoneal therapy. *Cancer* 1997;79:1767-1775.
- 14– Siewert JR, Fink U, Sandler A. Gastric Cancer. *Curr Probl Surg* 1997;34:835-839.
- 15– Schuhmacher CP, Fink U, Becker K. Neoadjuvant therapy for patients with locally advanced gastric carcinoma with etoposide, doxorubicin and cisplatin. *Cancer* 2001;91:918-927.

- 16– Ott K, Sendler A, Becker K. Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin, 5-FU, and leucovorin (PLF) in locally advanced gastric cancer: a prospective phase II study. *Gastric Cancer* 2003;6: 159-167.
- 17– Hartgrink HH, van de Velde CJH, Putter H. Neo-adjuvant chemotherapy for operable gastric cancer: long term results of the Dutch randomized FAMTX trial. *Eur J Surg Oncol* 2004;30: 643-649.
- 18– Grau JJ, Palmero R, Marmol M, Domingo-Domenech J, Monzo M. Time-related Improvement of Survival in Resectable Gastric Cancer: The Role of Japanese-style with D2 Lymphadenectomy and Adjuvant Chemotherapy. *World J Surg Oncol* 2006;4:1-9.
- 19– Terashima M, Fujiwara H, Takagane A. Prediction of Sensitivity to Fluoropyrimidines by Metabolic and Target Enzyme Activities in Gastric Cancer. *Gastric Cancer* 2003;6(Suppl 1): 71-81.
- 20– Kuhn JG. Fluorouracil and the New Oral Fluorinated Pyrimidines. *Ann Pharmacother* 2001; 35:217-227.
- 21– Malet-Martino M, Jolimaitre P, Martino R. The Prodrugs of 5- Fluorouracil. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002;2:267-310.
- 22– Ichikawa W. Prediction of Clinical Outcome of Fluoropyrimidine-based Chemotherapy for Gastric Cancer Patients, in terms of the 5-Fluorouracil Metabolic Pathway. *Gastric Cancer* 2006;9:145-155.
- 23– Somasekaram A, Jarmuz A, How A. Intracellular Localization of Human Cytidine Deaminase. *The J Biol Chem* 1999; 274:28405-28412.
- 24– Vincenzetti S, Cambi A, Neuhard J. Recombinant Human Cytidine Deaminase: Expression, Purification, and Characterization. *Protein Expr Purif* 1996;8:247-253.
- 25– Demontis S, Terao M, Brivio M. Isolation and characterization of the gene coding for human cytidine deaminase. *Biochim Biophys Acta* 1998;1443:323-333.
- 26– Grau JJ, Domingo-Domenech J, Morente V. Low Thymidylate Synthase Expression in the Primary Tumor Predicts Favorable Clinical Outcome in Resected Gastric Cancer Patients Treated with Adjuvant Tegafur. *Oncology* 2004;66:226-233.
- 27– Watters JW, McLeod HL. Cancer Pharmacogenomics: current and future applications. *Biochim Biophys Acta* 2003;1603:99-111.
- 28– Vincenzetti S, Mariani PL, Cammertoni N. Isoenzymatic Forms of Human Cytidine Deaminase. *Protein Eng Des Sel* 2004;17:871-877.

- 29– Almeida R, Silva E, Santos-Silva F . Expression of Intestine-Specific Transcription Factors, CDAX1 and CDAX2, in Intestinal Metaplasia and Gastric Carcinomas. *J Pathol* 2003;199:36-40.
- 30– Fitzgerald SM, Goyal RK, Osborne WRA. Identification of Functional Single Nucleotide Polymorphism Haplotypes in the Cytidine Deaminase Promoter. *Hum Genet* 2006;119:276-283.
- 31– Driscoll DM, Lakhe-Reddy S, Oleksa LM. Induction of RNA Editing at Heterologous Sites by Sequences in Apolipoprotein B mRNA. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13:7288-7294.
- 32– Navaratman N, Sarwar R. An Overview of Cytidine Deaminases. *Int J Hematol* 2006;83:195-200.
- 33– Dubois L, Dresselaers T, Landuyt W. Efficacy of Gene Therapy-delivered Cytosine Deaminase is Determined by Enzymatic Activity but not Expression. *Br J Cancer* 2007;96:758-761.
- 34– Wei X, Elizondo G, Sapone A. Characterization of the Human Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene. *Genomics* 1998;51:391-400.
- 35– van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine Dehydrogenase and the Efficacy and Toxicity of 5-Fluorouracil. *Eur J Cancer* 2004;40:939-950.
- 36– Gmeiner WH. Genetic Determinants for Activated Fluoropyrimidine Chemotherapy. *Drug Dev Res* 2006;67:119-129.
- 37– Ikeda K, Yoshisue K, Matsushima E. Bioactivation of Tegafur to 5-Fluorouracil Is Catalyzed by Cytochrome P-450 2A6 In Human Liver Microsomes *in Vitro*. *Clin Cancer Res* 2000;6:4409-4415
- 38– Komatsu T, Yamazaki H, Shimada N. Involvement of Microsomal Cytochrome P450 and Cytosolic Thymidine Phosphorylase in 5-Fluorouracil Formation from Tegafur in Human Liver. *Clin Cancer Res* 2001;7:675.
- 39– Damle BD, Narasimhan NI, Kaul S. Stereoselective Metabolism and Pharmacokinetics of Tegafur. *Biopharm. Drug Dispos* 2001;22:45-52.
- 40– Muggia FM, Wu X, Spicer D. Phase I and pharmacokinetic study of oral UFT, a combination of the 5-fluorouracil prodrug tegafur and uracil. *Clin Cancer Res* 1996;2:1461-1467.
- 41– Pazdur R, Lassere Y, Diaz Canton E. Phase I trials of uracil-tegafur (UFT) using 5 and 28 day administration schedules: demonstration of schedule-dependent toxicities. *Anticancer Drugs* 1996;7:728-733.
- 42– Spicer D, Muggia F, Tulpule A. Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-Fluorouracil (Ca-

- pecitabine, UFT, S-1): A Review. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 1991;10:abstract 342.
- 43– Gonzalez Baron M, Feliu J, Ordonez A. Phase I study of UFT plus leucovorin in advanced colorectal cancer: a double modulation proposal. *Anticancer Res* 1993;13:759-762.
- 44– Meropol NJ, Rustum YM, Petrelli NJ. A phase I and pharmacokinetic study of oral uracil, ftorafur, and leucovorin in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 37:581-586.
- 45– Pazdur R, Lassere Y, Diaz Canton E. Phase I trial of Uracil-Tegafur (UFT) plus oral leucovorin: 14-day schedule. *Invest New Drugs* 1997;15:123-128.
- 46– Pazdur R, Lassere Y, Diaz Canton. Phase I Trial of Uracil-Tegafur (UFT) plus Oral Leucovorin: 28-day Schedule. *Cancer Invest* 1998;16:145-151.
- 47– Malik STA, Talbot D, Clarke PI. Phase II trial of UFT in Advanced Colorectal and Gastric Cancer. *Br J Cancer* 1990;62:1023-1025.
- 48– Pazdur R, Lassere Y, Rhodes V. Phase II Trial of Uracil and Tegafur plus Oral Leucovorin: an Effective Oral Regimen in the Treatment of Metastatic Colorectal Carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12:2296-2300.
- 49– Saltz LB, Leichman CG, Young CW. A fixed-ratio Combination of Uracil and Ftorafur (UFT) with low dose leucovorin: An Active Oral Regimen for Advanced Colorectal Cancer. *Cancer* 1995;75:782-785.
- 50– Gonzalez-Baron M, Feliu J, de la Gandara I. Efficacy of Oral Tegafur Modulation by Uracil and Leucovorin in Advanced Colorectal Cancer. A phase II study. *Eur J Cancer* 1995;31A:2215-2219.
- 51– Abad A, Navarro M, Sastre J. A Preliminary Report of a Phase II Trial. UFT plus Oral Folinic Acid as Therapy for Metastatic Colorectal Cancer in Older Patients. Spanish Group for the Treatment of Gastrointestinal Tumors (TTd Group). *Oncology* 1997;11:Suppl 10,53-57.
- 52– Feliu J, Gonzalez Baron M, Espinosa E. Uracil and Tegafur modulated with leucovorin: An Effective Regimen with low Toxicity for the Treatment of Colorectal Carcinoma in the elderly. *Cancer* 1997;79:1884-1889.
- 53– Meropol NJ, Sonnichsen DS, Birkhofer MJ. Bioavailability and phase II study of oral UFT plus leucovorin in patients with relapsed or refractory colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43:221-226.
- 54– Aranda E, Anton-Torres A, Sastre J. UFT plus Leucovorin (LV) in Advanced Colorectal Cancer (CCR). A Phase II Trial. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 1999;18:abstract 940.

- 55– Lin JK, Wang WS, Hsieh RK. Phase II study of Oral Tegafur-Uracil and Folinic acid as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: Taiwan experience. *Jpn J Clin Oncol* 2000;30: 510-514.
- 56– Ichikawa W, Nihei Z, Uetake H. UFT plus leucovorin for metastatic colorectal cancer: Japanese experience. *Oncology* 2000;14:Suppl 9,41-43.
- 57– Hill M, Mackay H, Cunningham D, Glasspool R. Phase I/II Study of Oral Uracil/Tegafur (UFT(R)), Leucovorin and Irinotecan in Patients with Advanced Colorectal Cancer. *Ann Oncol* 2000;11:Suppl 4,abstract 193P.
- 58– Escudero P, Vicente A, Herrero A. Phase I-II Trial of Irinotecan (CPT-11) over a Short IV Weekly Infusion Combined with a Fixed Dose of UFT in Second Line Advanced Colorectal Carcinoma (ACRC). *Proc Amer Soc Clin Oncol* 2000;19:abstract 1136.
- 59– Gravalos C, Garcia-Alfonso P, Castellanos D. Phase I Trial of Escalating Doses of Irinotecan (CPT-11) in Combination with UFT/Folinic Acid (FA) in Patients with Advanced Colorectal Cancer (CRC). *Ann Oncol* 2000;11:Suppl 4,abstract 199P.
- 60– Mel JR, Vieitez JM, Garcia Alfonso P. Raltitrexed ('Tomudex') Combined with UFT: a Phase I/II Dose-Escalation Study in Metastatic CRC. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 2000;19:abstract 1108.
- 61– Vazquez Estevez S, Vieitez JM, Garcia AP. Raltitrexed Combined with UFT: a Phase I/II Dose Escalation Study in Metastatic Colorectal Cancer. *Ann Oncol* 2000;11:Suppl 4,abstract 229P.
- 62– Dorta FJ, Feliu J, Vicent J. Phase II Clinical Trial with the Combination of Oxaliplatin-UFT-LV (OXA-UFT,LV) for the First Line Treatment of Advanced Colorectal Cancer (ACC). Preliminary Results (Oncopaz Cooperative Group-Spain). *Ann Oncol* 2000;11:Suppl 4, abstract 220P.
- 63– Jakobsen A, Pfeiffer P, Hansen F. Dual Modulation of UFT with Leucovorin and Hydroxyurea in Metastatic Colorectal Cancer. *Acta Oncol* 2001;40:63-66.
- 64– Sanchiz F, Milla A. Tegafur-Uracil (UFT) plus Folinic acid in Advanced Rectal Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1994;24:322-326.
- 65– de la Torre A, Ramos S, Lalcarcel FJ. Phase II study of radiochemotherapy with UFT and low-dose oral leucovorin in patients with unresectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:629-634.
- 66– Feliu J, Calvillo J, Escribano A. Neoadjuvant Therapy of Rectal Carcinoma with UFT-Folinic Acid (LV) plus Radiotherapy. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 1999;18:abstract 917.

- 67– Pfeiffer P. Concurrent UFT/L-Leucovorin and Curative Intended Radiotherapy (60 GY) in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer (LARC): A Phase I/II Trial. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 2000;19:abstract 992.
- 68– Hoff PM, Janjan N, Saad ED. Phase I Study of Preoperative Oral Uracil and Tegafur plus leucovorin and Radiation Therapy in Rectal Cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:3529-3534.
- 69– Hashimoto T, Omura K, Ishida F. Clinical efficacy of cis-diamminedichloroplatinum [II] and 5-fluorouracil (UFT) in advanced cancer of the alimentary tract *Gan To Kagaku Ryoho* 1993;20:1333-1338.
- 70– Jin M, Yang B, Zhang W. High-dose mitomycin C-containing regimens in the treatment of advanced gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 1994;10:114-116.
- 71– Sato S, Hasegawa K, Kurihara M. Combination chemotherapy with tegafur-uracil (UFT) and cisplatin (CDDP) for advanced gastric cancer. UFTP Study Group *Gan To Kagaku Ryoho* 1995;22:1355-1362.
- 72– Feliu J, Gonzalez Baron M, Garcia-Giron C. Treatment of Patients with Advanced Gastric Carcinoma with the Combination of Etoposide plus Oral Tegafur modulated by Uracil and Leucovorin: a Phase II Study of the ONCOPAZ Cooperative Group. *Cancer* 1996;78:211-216.
- 73– Kim YH, Cheong SK, Lee JD. Phase II trial of Oral UFT and leucovorin in Advanced Gastric Carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1996;19:212-216.
- 74– Kim YH, Shin SW, Kim BS. A phase II trial. Oral UFT and leucovorin in patients with advanced gastric carcinoma. *Oncology* 1997;11:Suppl 10,119-123.
- 75– Kim YH, Shin SW, Kim BS. Phase II Trial of Epirubicin (E), Cisplatin (P), Oral UFT and Leucovorin (L) in Advanced Gastric Carcinoma (AGC) Patients. *Ann Oncol* 2000;11:Suppl 4, abstract 2740.
- 76– Chaves M, Bernabe R, Reina JJ. A Less Toxic Regime in the Treatment of Advanced Gastric Cancer: UFT, Epirubicin and Cisplatin (ECU). *Ann Oncol* 2000;11:Suppl 4,abstract 292P.
- 77– Sato A, Kurihara M, Koizumi W. A Phase II Study of UFT Plus Cisplatin (UFTP) Therapy in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 2000;19:abstract 1087.
- 78– Kamoshida S, Shiogama K, Shimomura R. Immunohistochemical Demonstration of Fluoropyrimidine Metabolizing Enzymes in Various Types of Cancer. *Oncol Rep* 2005;14:1223-1230.
- 79– MacDonald JS. Oral Fluoropyrimidines: A Closer Look at their Toxicities. *Am J Clin Oncol* 1999;22:475-480.

- 80– Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J. Chemotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001; 345:725-730.
- 81– Sakamoto J: Adjuvant chemotherapy for gastric cancer in Japan: global and Japanese perspectives. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54:Suppl 1:S25-31.
- 82– Alcobendas F, Milla A, Estapé J, et al.: Mitomycin C as an adjuvant in resected gastric cancer. *Ann Surg* 1983;198:13-17.
- 83– Estapé J, Grau JJ, Alcobendas F, et al.: Mitomycin C as an adjuvant treatment to resected gastric cancer. A 10 year follow-up. *Ann Surg* 1991;213:219-221.
- 84– Grau JJ, Estapé J, Alcobendas F, et al.: Positive results of adjuvant mitomycin-C in resected gastric cancer: A randomised trial on 134 patients. *Eur J Cancer* 1993;29A:340-342.
- 85– Cirera L, Balil A, Batiste E, et al.: Efficacy of adjuvant Mitomycin C plus Tegafur in Stage III Gastric Cancer. *Proc ASCO* 1997;16:278a.
- 86– Cirera L, Balil A, Batiste-Alentorn E, et al.: Randomized Clinical Trial of Adjuvant Mitomycin plus Tegafur in Patients with Resected Stage III Gastric Cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:3810-3815.
- 87– Grau JJ, Estape J, Fuster J. Randomized trial of adjuvant chemotherapy with mitomycin C plus ftorafur versus mitomycin C alone in resected locally advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1036-1039.
- 88– Grau JJ, Martin M, Fuster J. Impact of Adjuvant Chemotherapy in the Long-Term Outcome of Patients with Resected Gastric Cancer. *J Surg Oncol* 2003;82:234-240.
- 89– Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T et al. Adjuvant Chemotherapy for Gastric Cancer with S-1, an Oral Fluoropyrimidine. *N Engl J Med* 2007;357:1863-1865.
- 90– Bertino JR, Banerjee D. Is the Measurement of Thymidylate Synthase to Determine Suitability for Treatment with 5-Fluoropyrimidines Ready for Prime Time?. *Clin Cancer Res* 2003;9:1235-1239.
- 91– Grau JJ, Domingo-Domenech J, Morente V. Low Thymidylate Synthase Expresión in the Primary Tumor Predicts Favorable Clinical Outcome in Resected Gastric Cancer Patients treated with Adjuvant Tegafur. *Oncology* 2004;66:226-33.
- 92– Ulrich CM, Robien K, McLeod HL. Cancer Pharmacogenetics: Polymorphisms, Pathways and Beyond. *Nat Rev Cancer* 2003;3:912-920.
- 93– Nagasubramanian R, Innocenti F, Ratain J. Pharmacogenetics in Cancer Treatment. *Annu Rev*



- Med 2003;54:437-52.
- 94– Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for Individualized Cancer Chemotherapy. *Pharmacol Ther* 2005;107:155-176.
- 95– Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT. Familial Deficiency of Dihydropyrimidine Dehydrogenase. Biochemical Basis for Familial Pyrimidinemia and Severe 5-Fluorouracil-Induced Toxicity. *J Clin Invest* 1988;81:47-51.
- 96– Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guerin-Meller V et al. Correlation between Uracil and Dihydrouracil Plasma Ratio, Fluorouracil (5-FU) Pharmacokinetic Parameters, and Tolerance in Patients with Advanced Colorectal Cancer: a Potential Interest for Predicting 5-FU Toxicity and Determining Optimal 5-FU Dosage. *J Clin Oncol* 1999;17:1105-1112.
- 97– Raida M, Schwabe W, Hausler T et al. Prevalence of a Common Point Mutation in the Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Gene within the 5'-splice Donor Site of Intron 14 in Patients with Severe 5-Fluorouracil (5-FU)-Related Toxicity Compared to Controls. *Clin Cancer Res* 2001;7:2832-2839.
- 98– van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J et al. Lethal Outcome of a Patient with a Complete Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Deficiency after Administration of 5-Fluorouracil: Frequency of the Common IVS14+1G>A Mutation causing DPD Deficiency. *Clin Cancer Res* 2001;7:1149-1153.
- 99– Matsumoto y, Marusawa H, Kinoshita K. Helicobacter Pylori Infection Triggers Aberrant Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase in Gastric Epithelium. *Nat Med* 2007;13:470-476.

