



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado e Investigación

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

Polimorfismos de *Mad1* (G558A) y *Erccl* (C8092A) y su
posible asociación con la resistencia a quimioterapia en cáncer
de ovario avanzado

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

ONCOLOGÍA MÉDICA

P R E S E N T A :

PEDRO FIGUEROA MARTÍNEZ

TUTORES:

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
DRA. FLAVIA MORALES VÁSQUEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

POLIMORFISMOS DE MAD1 Y ERCC1 Y SU POSIBLE ASOCIACIÓN CON LA
RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA EN CÁNCER DE OVARIO AVANZADO

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA

DR. PEDRO FIGUEROA MARTÍNEZ

TUTOR

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

DRA. FLAVIA MORALES VÁSQUEZ

POLIMORFISMOS DE MAD1 Y ERCC1 Y SU POSIBLE ASOCIACIÓN CON LA RESISTENCIA
A QUIMIOTERAPIA EN CÁNCER DE OVARIO AVANZADO

DR. PEDRO FIGUEROA MARTÍNEZ.

Médico Residente Especialización en Oncología Médica

Autor

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO.

Subdirector de Investigación Básica Instituto Nacional de Cancerología

Tutor Ciencias Básicas

DR. EDUARDO EMIR CERVERA CEBALLOS.

Director de Docencia Instituto Nacional de Cancerología

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por brindarme su bendición y ser refugio en los momentos difíciles.

A MI FAMILIA, principalmente a mis padres por su apoyo incondicional en mis triunfos y fracasos, en la vida y formación profesional, sin ellos ninguno de mis logros hubiera sido posible ni tuviera razón de ser.

A MIS MAESTROS, que han participado en mi formación profesional día a día, especialmente al Dr. Arturo Guel Pañola por ser mi ejemplo en San Luis Potosí para optar ser oncólogo; a los doctores Fernando Lara, Germán Calderillo, Oscar Arrieta y José Luis Aguilar Ponce, maestros más influyentes e involucrados en la formación de los residentes de Oncología Médica en el Instituto Nacional de Cancerología. Asimismo, al Programa Universitario de Investigación en Salud, al Dr. Luis Alonso Herrera, a la Dra. Flavia Morales, a la Dra. Dolores Gallardo, a la Dra. Laura Leticia Tirado, a la Maestra Clementina Castro y al Biólogo Miguel Santibáñez por creer, involucrarse y lograr que este proyecto de investigación culmine satisfactoriamente.

A MIS COMPAÑEROS, que buscamos en un futuro próximo ser punta de lanza en el combate del cáncer, especialmente a los de Oncología Médica y los más allegados durante ésta travesía de 3 años en el Instituto Nacional de Cancerología: Miguel Álvarez, Rafael Huerta, Javier Aguirre, Omar Leyva, Enrique Vaca, Alejandro Crismatt, Alma Astorga y Consuelo Díaz, entre otros. A los que compartieron conmigo de la aventura que representó participar en la investigación: Miguel, Julia, Julieta, Diddier, Rodrigo, Alex, Marco y Eunice. Sin olvidar claro a todos mis amigos potosinos que siempre me han apoyado y siguen en contacto.

A HEPHZIBAH, que siempre está conmigo y ha sido fundamental para enfrentar los retos, soportar los fracasos y festejar los triunfos que se han presentado en mi formación de especialista.

ÍNDICE

RESÚMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Generalidades de Cáncer de Ovario Avanzado.....	8
1.2 Tratamiento de Cáncer de Ovario Avanzado y papel de la quimioterapia de inducción.....	9
1.3 Mecanismo de acción y resistencia a cisplatino y sus análogos.....	12
1.4 Mecanismo de acción y resistencia a taxanos.....	13
1.5 Factores pronósticos en Cáncer de Ovario Avanzado.....	14
1.6 Polimorfismo C8092A de ERCC1.....	16
1.7 Polimorfismo G558 de Mad1.....	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	23
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
7. RESULTADOS.....	32
8. DISCUSIÓN.....	42
9. REFERENCIAS.....	49

RESÚMEN

Antecedentes. El cáncer de ovario representa el 5% de las muertes por cáncer a nivel mundial. En México, de acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas del año 2003 se informaron 2907 casos, lo que corresponde a 2.64% de todas las neoplasias. El tratamiento de las etapas avanzadas es con citorreducción quirúrgica, sabiendo que el tamaño del residual impacta en la supervivencia más quimioterapia basada en platino y taxanos, con respuesta global al manejo sistémico de 80%. Aunque teóricamente todos los casos con enfermedad avanzada son candidatos a cirugía citorréductora primaria, existen casos en los cuales la citorreducción no puede ser realizada inicialmente y la quimioterapia debe ser prescrita inicialmente, a lo que se denomina quimioterapia de inducción. La evaluación de diversos factores pronósticos en cáncer de ovario y el entendimiento de la patogénesis molecular de la enfermedad ha sido útil para identificar nuevos biomarcadores que faciliten el diagnóstico temprano así como la predicción de respuesta al tratamiento y pronóstico. Recientemente se ha incrementado la investigación oncológica enfocada a predecir la eficacia y toxicidad de fármacos en base a un perfil genético, en afán de encontrar biomarcadores para individualizar y optimizar las intervenciones terapéuticas. Esta búsqueda incluye a polimorfismos genéticos de un nucleótido (SNP) que pueden presentarse en regiones que codifican para proteínas que interactúan con fármacos antineoplásicos, como enzimas de biosíntesis y metabolismo del DNA, enzimas reparadoras de daño al DNA y proteínas del huso mitótico. Los polimorfismos C8092A de ERCC1 y G558A de Mad1 se encuentran asociados a la vía NER reparadora de daño al DNA y a la modulación de la segregación cromosómica en el huso mitótico, respectivamente, por lo que pueden influenciar la respuesta al tratamiento basado en cisplatino y taxanos en cáncer de ovario avanzado. En este estudio se determinó la influencia de estos polimorfismos genéticos en la respuesta a la quimioterapia de inducción basada en cisplatino y taxanos en cáncer de ovario avanzado.

Material y Métodos. Es un análisis preliminar de un estudio de cohorte de 47 pacientes con cáncer de ovario avanzado sometidos a quimioterapia de inducción con carboplatino y paclitaxel. Se realizó la determinación de la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos C8092A de ERCC1 y G558A de Mad1 en muestras de DNA aisladas de leucocitos mediante la técnica de PCR y la digestión con enzimas de restricción específica. Inicialmente se compararon las frecuencias de estos polimorfismos en nuestras muestras de cáncer de ovario con muestras de DNA aisladas de población mexicana sana. Como propósito principal de nuestro estudio, los resultados obtenidos se correlacionaron con la respuesta al tratamiento de quimioterapia de inducción basado en cisplatino más taxanos.

Resultados. Para el análisis se incluyeron 47 pacientes evaluadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 01 de enero al 30 de julio de 2008. La mediana de edad fué de 53 años, el 40% eran mayores de 60 años, las etapas clínicas III se presentaron en 70% de los casos y el 93% de las histologías fue seroso papilar con predominio de tumores de alto grado. Más del 80% de las pacientes fueron sometidas de manera inicial a laparotomía diagnóstica, lo que apoya la falta de criterios predictores de resecabilidad al diagnóstico. Para el polimorfismo G558A detectamos una mayor frecuencia del alelo polimórfico (A) en pacientes con cáncer de ovario con respecto a los encontrados en población sana, 60.63% y 48.60% respectivamente. Este es el primer estudio clínico que detecta la posibilidad que este polimorfismo sea un marcador de riesgo para un posible incremento en la susceptibilidad a cáncer de ovario. De manera contraria, la variante polimórfica de C8092A de ERCC1 resultó menor en pacientes con cáncer de ovario al compararlos con individuos sanos e incluso, el genotipo homócigo silvestre resultó casi el doble de la frecuencia de homócigos polimórficos.

La evaluación de respuesta a la quimioterapia se realizó exclusivamente con determinaciones seriadas del marcador tumoral CA 125. La respuesta global fue de 91.49%. De acuerdo a lo esperado, para el polimorfismo G558A de Mad1 el grupo no polimórfico presentó respuesta en 7/7 casos (100%) y el no polimórfico en 36/40 casos (90%), sin embargo, esta tendencia a favor

de los no polimórficos no fue estadísticamente significativa ($p=0.348$); esto ocurrió de manera similar al asociar la respuesta para el genotipo: AA de 88%, GA de 91.3% y GG de 100% ($p=0.643$). Para el polimorfismo C8092A de ERCC1, nuestro estudio falló en demostrar mayor respuesta en pacientes polimórficos. La respuesta para el grupo polimórfico C8092A de ERCC1 fue de 91.3% y de 93.33% para el no polimórfico ($p=0.756$). Curiosamente, para los genotipos de éste polimorfismo encontramos respuestas de 60% para AA, 96.2% para CA y de 93.33% para CC, incluso, la respuesta del genotipo homócigo mutante fue menor ($p=0.027$).

Conclusiones. Las nuevas estrategias de manejo del cáncer en general incluyen la identificación de factores que faciliten el diagnóstico temprano, así como la predicción de respuesta al tratamiento y pronóstico. Este es el primer estudio clínico de pacientes con cáncer de ovario que investiga dos SNP, uno de ellos involucrado en el punto de monitoreo del huso mitótico que garantiza la fidelidad de la segregación cromosómica en mitosis y otro en la vía NER que corrige el daño inducido por cisplatino. Asimismo, es el primero en identificar una posible asociación con susceptibilidad a cáncer para el polimorfismo G558A de Mad1 y demuestra un incremento no estadísticamente significativo en la respuesta a quimioterapia en cáncer de ovario para la variante no polimórfica de este gen. Además, se suma a los estudios con resultados contradictorios con respecto a la asociación de un polimorfismo de la vía NER con susceptibilidad a cáncer, fallando en demostrar que una reducción de la actividad de ésta vía en individuos con la variante polimórfica del gen resulte en mejor respuesta al tratamiento basado en cisplatino, en éste caso el polimorfismo C8092A de ERCC1. Concluir que estos polimorfismos afecten *in vivo* la función del punto de monitoreo y de la vía NER con repercusión clínica requiere tomar en cuenta factores adicionales y antes que puedan ser aplicados rutinariamente en la práctica clínica deben ser validados en más estudios. Es innegable que estamos en las fases iniciales del desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en factores genéticos para mejorar las opciones de tratamiento de los pacientes con cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de Cáncer de Ovario Avanzado

El cáncer de ovario representa el 5% de las muertes por cáncer a nivel mundial. En México, esta neoplasia representó un 2.64% del total con 2907 casos totales de los 100094 informados en el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas del año 2003. Los datos del periodo comprendido entre 2000-2004 en el Instituto Nacional de Cancerología no solo lo coloca entre los cánceres más frecuentes de la mujer, sino también a nivel global, ocupando el quinto y tercer lugar respectivamente (3.9% con 754 casos). La gran mayoría de los casos se diagnostica en mujeres posmenopáusicas con una mediana de edad al diagnóstico de 63 años y los tumores epiteliales corresponden al 80-90% de los casos. Debido a la falta de escrutinio efectivo y a que la enfermedad temprana es difícil de diagnosticar, aproximadamente 70% de los casos se presentan con enfermedad avanzada al diagnóstico, con poca probabilidad de curación.^{1,2,3,4}

Dentro de las herramientas útiles para el diagnóstico, así como para determinar la extensión de la enfermedad, se encuentran el marcador tumoral CA 125 y los estudios de imagen. El CA 125 se incrementa en más del 80% de cánceres de ovario epitelial, aunque puede elevarse también en una variedad de condiciones benignas y otras neoplasias no ginecológicas. El CA 125 es útil como indicador de actividad tumoral y puede utilizarse para evaluar la respuesta al tratamiento y detectar recurrencias tempranas.⁵ En cuanto a los estudios de imagen, el ultrasonido, la tomografía computada y la resonancia magnética, son de utilidad, especialmente la tomografía, que se considera altamente sensible para detectar ascitis, carcinomatosis y enfermedad mesentérica, aunque tiene limitaciones en lo referente a implantes esplénicos, enfermedad vesical e implantes peritoneales menores de 2cm, este método diagnóstico tiene una sensibilidad de 92.3%, especificidad de 79.3%, valor predictivo positivo de 67% y negativo de 96%.^{6,7}

Es una enfermedad estadiada quirúrgicamente con el sistema FIGO establecido en 1988 y actualizado en 1998. De acuerdo a esta clasificación las etapas avanzadas corresponden a los estadios clínicos III y IV, el primero incluye casos en donde se involucra uno o ambos ovarios con implantes peritoneales fuera de la pelvis y/o con afección ganglionar retroperitoneal o inguinal; la etapa clínica IV incluye metástasis a distancia.⁸ (TABLA 1).

Tabla 1. Estadificación Quirúrgica del Cáncer de Ovario de acuerdo a la FIGO. Las etapas avanzadas corresponden a las etapas III y IV de esta clasificación.

ETAPA	CARACTERÍSTICA
IA	Limitado a un ovario, sin ascitis, sin afección superficial externa y cápsula intacta
IB	Limitado a ambos ovarios, sin ascitis, sin afección superficial externa y cápsula intacta
IC	Tumor IA o IB, pero con afección superficial externa de uno o ambos ovarios o con cápsula rota o con ascitis maligna o con lavados peritoneales positivos
IIA	Extensión o metástasis a útero o trompas de Falopio
IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos
IIC	Tumor IIA o IIB, pero con afección superficial externa de uno o ambos ovarios o con cápsula rota o con ascitis maligna o con lavados peritoneales positivos
IIIA	Tumor limitado a la pelvis verdadera con ganglios negativos pero con diagnóstico histológico confirmatorio de implantes microscópicos en la superficie peritoneal incluyendo la superficie hepática
IIIB	Tumor de uno o ambos ovarios con ganglios negativos pero con diagnóstico histológico confirmatorio de implantes peritoneales incluyendo la superficie hepática, pero que ninguno de ellos exceda 2cm de diámetro
IIIC	Implantes abdominales mayores de 2cm de diámetro o ganglios positivos retroperitoneales o inguinales
IV	Extensión a uno o ambos ovarios, con metástasis a distancia incluyendo metástasis hepáticas parenquimatosas; si hay derrame pleural debe confirmarse malignidad en citológico

1.2 Tratamiento del cáncer epitelial de ovario avanzado y el papel de la quimioterapia de inducción.

El cáncer de ovario es único, ya que se encuentra entre los tumores en los que la citorreducción de la enfermedad avanzada confiere un beneficio probado en la supervivencia. Además, es inusualmente quimiosensible, más de 70% de los pacientes con enfermedad avanzada responden a quimioterapia primaria, pero la quimioterapia es más efectiva en enfermedad de volumen pequeño. La combinación de cirugía citorréductora, quimioterapia

efectiva y el incremento de opciones de tratamiento sistémico para enfermedad recurrente han contribuido a un incremento en la supervivencia de las pacientes. Actualmente la supervivencia a 5 años para los estadios clínicos III y IV se ha incrementado hasta casi un 30%.^{8,9} (FIGURA 1).

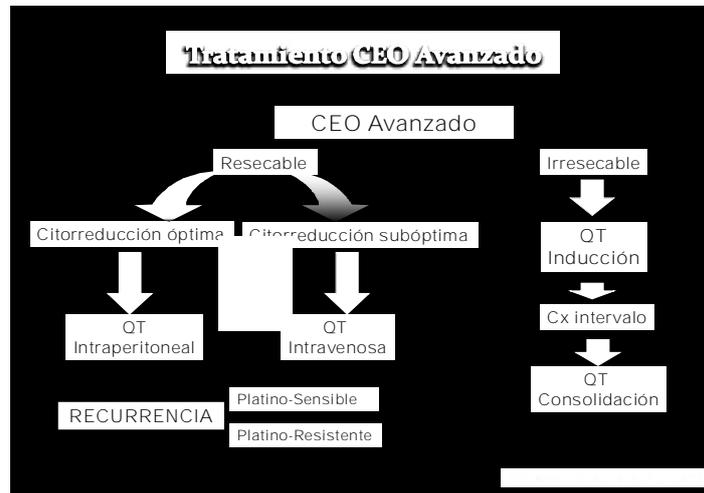


Figura 1. Modalidades de tratamiento para cáncer de ovario en etapas avanzadas. El tratamiento estándar en cáncer de ovario avanzado consiste en cirugía citorréductora para remover todo el tumor visible y quimioterapia complementaria basada en carboplatino y paclitaxel.

El beneficio de la citorreducción quirúrgica es remover tumores necróticos voluminosos con pobre aporte sanguíneo que se encuentran en fase de crecimiento lento con el afán de dejar enfermedad que es más sensible a la quimioterapia. El término citorreducción óptima ha sido definido de manera diferente a través de los años, pero actualmente la cirugía con enfermedad residual menor de 1 cm es ampliamente aceptado y utilizado por el GOG (Grupo Oncológico Ginecológico) en el reporte y análisis de resultados de ensayos clínicos. Diversos informes han demostrado que el tamaño del tumor residual más grande correlaciona con la supervivencia libre de progresión y global. Un estudio reciente realizado por Bristow y colaboradores encontró que por cada incremento del 10% en la citorreducción la mediana de supervivencia aumenta 5.5%.^{10,11}

Teóricamente todas las pacientes con enfermedad avanzada son candidatas a cirugía citorreductora, sin embargo, existen casos en los cuales la citorreducción no puede ser realizada. Y aunque no existen criterios definitivos de irresecabilidad, un buen porcentaje de pacientes deben someterse primero a quimioterapia y después de 2 o 3 ciclos de quimioterapia de inducción podrán ser llevadas a laparotomía de intervalo con intento de citorreducción. El juicio clínico dicta que la quimioterapia debe ser indicada previo a la cirugía, a lo que se denomina quimioterapia de inducción. Por ejemplo, pacientes con pobre estado funcional, incapaces de someterse a un tratamiento quirúrgico agresivo, o en algunos casos, pacientes con estadio clínico IV con enfermedad hepática parenquimatosa, involucro ganglionar retrocrurol o supraclavicular, metástasis mediastinales y pacientes con metástasis pulmonares, pueden no ser candidatos a citorreducción primaria. Además, con la disponibilidad de equipos tomográficos modernos y técnicas de radiología intervencionista muchos pacientes con cáncer de ovario avanzado son evaluados antes de planear una intervención quirúrgica. Esto ha abierto la puerta al concepto de quimioterapia de inducción que difiere del término neoadyuvante, reservándose el concepto de neoadyuvante a aquellos casos con alta probabilidad de citorreducción óptima y en quienes se desea probar la eficacia de la quimioterapia. Las diferencias de definición entre quimioterapia neoadyuvante y de inducción se encuentran bajo cuestionamiento. Sin embargo, los dos consensos nacionales mexicanos para el tratamiento del cáncer epitelial de ovario realizan esta diferencia. El debate se mantiene con respecto a cuando la quimioterapia seguida de cirugía es un equivalente e incluso una estrategia mejor en el manejo de esta enfermedad.¹²

Las ventajas potenciales de la quimioterapia de inducción son: reducción del impacto negativo de la cirugía debido a un decremento en el volumen tumoral, mejoría del estado funcional y nutricional con la regresión tumoral, y resolución de la ascitis con mejoría en la recuperación posquirúrgica. Aunque las pacientes con cirugía citorreductora subóptima no muestran un beneficio en supervivencia al compararlas con aquellos que recibieron sólo quimioterapia, ha

sido difícil establecer criterios para predecir cuáles pacientes serán irreseccables con tratamiento quirúrgico inicial. Actualmente, el nivel de CA 125, el volúmen de ascitis y varios criterios radiológicos no identifican realmente a estos pacientes. Resultados recientes de un estudio realizado por EORTC comparando cirugía primaria contra quimioterapia de inducción apoyan el valor del tratamiento con inducción.¹³ El tratamiento de quimioterapia estándar en enfermedad avanzada es a base de carboplatino y paclitaxel por 6 ciclos, resultando en una mediana de supervivencia libre de enfermedad de 20.7 meses, y una mediana de supervivencia global de 56.7 meses. Como tratamiento de inducción y quimioterapia adyuvante posterior a la citorreducción primaria óptima se ofrecen esquemas basados en sales platinadas y taxanos, como inducción 3 ciclos previos al tratamiento quirúrgico y 3 ciclos posterior a la citorreducción o 6 ciclos posteriores a la citorreducción óptima. Asimismo, las tendencias actuales muestran una mejoría en el análisis de supervivencia con la administración de quimioterapia intraperitoneal basada en cisplatino.^{14, 15, 16}

1.3 Mecanismos de acción y resistencia de cisplatino y sus análogos

El potencial para ocasionar muerte celular de los compuestos de platino fue descubierto por Rosenberg a mediados de la década de los sesentas. Dar utilidad clínica a éste concepto básico llevó al desarrollo del cisplatino en los setentas, posteriormente carboplatino, oxaliplatino y más recientemente satraplatino. Cisplatino, cis-diamino-dicloroplatino(II), es el prototipo de esta familia de agentes y el carboplatino tiene el mismo rango de actividad clínica que el cisplatino pero es menos nefrotóxico y emetogénico. Aunque existe diferencia entre las moléculas de cisplatino y carboplatino, una vez que sus grupos residuales son disociados funcionan de manera similar. Cada uno de ellos induce muerte celular principalmente a través de la formación de aductos covalentes bifuncionales con el DNA celular, los grupos reactivos están fijos en el espacio, asociados a un núcleo de platino a una distancia promedio de 0.33nm entre los sitios de unión. Con respecto a los tipos de aductos formados, el aducto

intracatenario N7-d (GpG) corresponde casi al 60%, el aducto N7-d (ApG) al 30%, el aducto N7-d (GpXpG) representa el 10% y otros aductos son menos del 2% del total. No hay respuesta definitiva acerca de que tipo de aducto es más letal, pero se ha observado consistentemente que el nivel de DNA dañado se relaciona directamente con el nivel de muerte celular independientemente del tipo de lesión. La resistencia a platino es mediada por dos grandes mecanismos: primero, falla en la cantidad suficiente para lograr dañar al DNA y segundo, falla para lograr muerte celular una vez formados los aductos. Muchas células resistentes muestran un fenotipo con alteración de diversas vías involucradas en captar la droga, reconocimiento-reparación del daño al DNA y apoptosis.^{8, 17}

1.4 Mecanismos de acción y resistencia a taxanos.

Los microtúbulos son estructuras vitales y dinámicas con un papel crítico en la división celular, transporte de organelos y vesículas, señalización, citoesqueleto y polaridad. Los microtúbulos están compuestos por 13 protofilamentos lineares de heterodímeros de tubulina polimerizados arreglados en forma paralela alrededor de un eje cilíndrico. Las funciones biológicas específicas de los microtúbulos son debidas a su única polimerización dinámica, esta es mediada por un mecanismo de nucleación-elongación. Un extremo del microtúbulo es cinéticamente más dinámico que el otro. Su dinámica es gobernada por dos mecanismos: el primero consiste en el crecimiento neto en un extremo y el acortamiento del extremo opuesto. El segundo, llamado mecanismo de inestabilidad dinámica, es un proceso en el cual el extremo del microtúbulo cambia espontáneamente entre estados de crecimiento lento sostenido y acortamiento rápido.¹⁸

En 1971, el paclitaxel se identificó como el constituyente activo de la planta *Taxus brevifolia*, y a pesar de las dificultades iniciales para aislar y extraer un producto natural en gran escala por lo limitado de su fuente y su pobre solubilidad en agua, se mantuvo el interés una vez que se caracterizó su mecanismo de acción. Este mecanismo fué definido por Schill en 1979

mostrando que el paclitaxel se unía a la superficie interior del lumen del microtúbulo, en sitios completamente distintos a los requeridos para recambio de GTP, para colchicina, podofilotoxina y alcaloides de la vinca. Los taxanos alteran el índice de disociación de tubulina en ambos extremos del microtúbulo, suprimiendo los mecanismos dinámicos principales y su capacidad de inducir arresto mitótico ocurre a concentraciones submicromolares de las que se obtienen en la práctica clínica. Con respecto a resistencia a taxanos, se encuentran asociados el transportador ABC1 (adenosine triphosphate binding cassette 1) o P-gp, ABCB4 (MDR2), alteraciones estructurales en tubulina, mutaciones en genes para isotipos de tubulina, amplificaciones genéticas y cambios de isotipos.^{8, 19}

1.5 Factores pronósticos en cáncer epitelial de ovario avanzado.

Diversos factores pronósticos han sido evaluados incluyendo los relacionados al paciente y a las características del tumor; asimismo, el entendimiento de la patogénesis molecular de la enfermedad ha sido útil para identificar nuevos biomarcadores que faciliten el diagnóstico temprano, la predicción de respuesta al tratamiento y el pronóstico.²⁰

La etapa clínica sigue siendo la variable pronóstica más importante, los estadios clínicos III y IV se asocian con supervivencia a largo plazo de 35 y 10% respectivamente. El grado histológico, la histología de mucinoso o células claras han demostrado conferir un pronóstico adverso y el tamaño del residual tras la cirugía citorreductora impactan significativamente en la supervivencia. En pacientes sometidos a citorreducción óptima la mediana varía de 25-40 meses disminuyendo hasta 10-18 meses en caso de enfermedad residual mayor. La supervivencia a 4 años con quimioterapia adyuvante en el estadio clínico III con citorreducción óptima es aproximadamente de 60%. El significado pronóstico de la edad ha sido reconocido, la mediana de supervivencia es al menos 2 años mayor en pacientes de 65 o más años.^{8, 21}

En oncología, la respuesta al tratamiento necesita ser evaluada de acuerdo a definiciones estándar como los criterios de RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), sin

embargo, en ausencia de enfermedad medible el CA 125 es una opción. El nivel sérico de CA 125 refleja el volumen tumoral y se ha utilizado como variable predictora de respuesta a quimioterapia. En quimioterapia de inducción este marcador tumoral podría ser valioso para optimizar el manejo al ser un indicador temprano de respuesta al tratamiento.^{22, 23} Un estudio de 553 casos de cáncer de ovario estadios clínicos IIC-IV encontró que los valores de CA 125 antes del primer curso de inducción, la vida media, el nadir y el tiempo al nadir son factores pronósticos independientes para la supervivencia.²⁴ Asimismo, los autores del estudio previo evaluaron 494 pacientes con las mismas etapas clínicas encontrando que un nivel sérico normal de CA 125 antes de la quimioterapia de inducción o disminución del 50% tras el primer ciclo con valor normal previo al segundo ciclo se asociaba a buen pronóstico. Los niveles de CA 125 mayor a 35UI antes del tercer ciclo de quimioterapia se asociaron con una supervivencia de 1.9 años vs 4.9 años en caso de ser iguales o menores de esta cifra (HR: 2.7 y p=0.0001).²⁵

Una serie de nuevos factores pronósticos moleculares han sido evaluados, la mayoría han sido identificados en estudios retrospectivos, otros durante estudios experimentales de biología tumoral del cáncer de ovario. Por ejemplo, el significado pronóstico de la ploidía del DNA y fracción celular en fase S se evalúa como criterio de alto riesgo para elegir a pacientes candidatos a quimioterapia adyuvante. No obstante, ninguno de estos marcadores es utilizado de manera rutinaria para la toma de decisiones terapéuticas.^{26, 27, 28}

Por otro lado, el epitelio ovárico se transforma en maligno entre otras cosas por el daño periódico y persistente derivado de hormonas, factores de crecimiento y estimulación del parénquima ovárico. Este es un proceso de múltiples fases donde se acumulan diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas que llevan al fenotipo maligno. Estas alteraciones llevan a la pérdida de control sobre la proliferación celular, inestabilidad genética, resistencia a apoptosis, capacidad de invasión local, metástasis y angiogénesis. Algunas de estas alteraciones pueden no sólo estar asociadas al desarrollo tumoral sino también a la resistencia al tratamiento antitumoral, de hecho, casi el 20% de los cánceres de ovario epitelial son

resistentes al tratamiento de primera línea a base de carboplatino y paclitaxel. La búsqueda de factores predictivos ha incluido determinación de polimorfismos genéticos, que son cambios en la secuencia del DNA que se manifiestan en al menos el 1% de la población, predominantemente los llamados polimorfismos de un nucleótido (SNP), que pueden presentarse en regiones genéticas que codifican para proteínas que interactúan con fármacos antineoplásicos, incluyendo enzimas de biosíntesis y metabolismo del DNA, enzimas reparadoras de daño al DNA y proteínas del huso mitótico.²⁹

1.6 Polimorfismo C8092A de ERCC1.

1.6.1 Polimorfismo C8092A de ERCC1 y la vía NER.

La inducción de daño al DNA es el principal mecanismo de acción antineoplásica de los compuestos de platino. La investigación de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la resistencia a cisplatino y su efecto biológico sugiere la posibilidad de identificar a los pacientes que tienen mayor probabilidad de responder o no al tratamiento de acuerdo a la medición de la cantidad de aductos formados en leucocitos de sangre periférica, la cantidad de aductos se asocia tanto a respuesta como a mielosupresión. La presencia y nivel de complejos cisplatino-DNA representa un balance neto entre la formación de aductos y su reparación.³⁰

NER (Nucleotid Excision Repair) es la vía de reparación del daño al DNA producido por sales platinadas, el proceso de reparación consiste en: a) reconocimiento del daño al a través de la proteína XPC que actúa como sensor del sitio dañado, uniéndose al DNA dañado y ayudando al reclutamiento de otras proteínas de la vía; b) delimitación del daño del DNA: la doble hélice se desenrolla alrededor del DNA dañado y la proteína de replicación A (RPA) se une al XPA sirviendo de soporte para la actividad del factor de transcripción IIH (TFIIH), formando una burbuja, esta última es un complejo de proteínas donde dos de ellas, XPB y XPD, tienen actividad de helicasas (3´-5´ y 5´-3´ respectivamente) delimitando el daño del DNA; c) incisión

de las cadenas dañadas: XPG corta la cadena 5-6 nucleótidos hacia abajo del DNA dañado y es seguida por la incisión del complejo XPF-ERCC1 20-22 nucleótidos hacia arriba del DNA dañado; d) extracción del DNA dañado, el cual contiene 22-29 oligonucleótidos; y e) complementación del DNA que sintetiza al oligonucleótido usando la cadena complementaria como un molde, involucrando la polimerasa delta y/o polimerasa épsilon. (FIGURA 2).

ERCC1 (Excision Repair Cross Complementation group-1) es una exonucleasa que forma parte del complejo que escinde el aducto del DNA, siendo el paso limitante de la vía NER. El gen ERCC1 que codifica esta exonucleasa, se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.2-q13.3, su región codificante comprende 10 exones y tiene 1.1 Kb de longitud.^{31, 32, 33, 34, 35, 36}

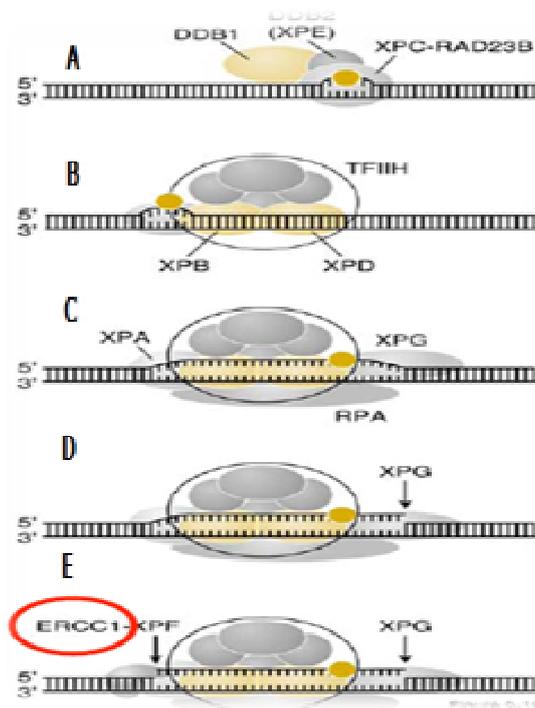


Figura 2. Vía NER: A) Reconocimiento del daño a través de la proteína XPC. B) Actividad del factor de transcripción IIH (TFIIH) y reclutamiento de proteínas. C) Formación del complejo abierto y delimitación del daño. D) XPG incide extremo 3', 5-6 nucleótidos hacia abajo del DNA dañado. E) Incisión 5' del complejo XPF-ERCC1 20-22 nucleótidos hacia arriba del DNA dañado, luego se extrae, complementa y corrige.

1.6.2 Asociación del polimorfismo C8092A de ERCC1 con cáncer y respuesta al tratamiento con cisplatino.

Estudios en una variedad de neoplasias, incluyendo las de ovario, han demostrado que la expresión de ERCC1 correlaciona directamente con la resistencia a terapias basadas en cisplatino y que su expresión tisular incrementada (RNAm o proteína) se asocia a resultados mixtos en cuanto a respuesta y supervivencia. Otro estudio en 783 individuos con cáncer pulmonar de células no pequeñas que recibieron adyuvancia basada con cisplatino, mostró que los pacientes con tumores ERCC1-negativos pero no los ERCC1-positivos eran beneficiados con supervivencia libre de enfermedad y global prolongadas.³⁷ Shen et al en 1998, identificaron 31 polimorfismos de nucleótido sencillo de ERCC1, ERCC2/XPD y ERCC4/XPF. Dado que estos polimorfismos pueden asociarse a una diferencia en la capacidad de reparación del daño al DNA se postuló que podrían influir en la susceptibilidad al cáncer. Generalmente, los polimorfismos del gen ERCC1 resultan en mutaciones silenciosas donde no se observan sustituciones de aminoácidos y los efectos funcionales no han sido completamente elucidados. Sin embargo, algunas de las variantes alélicas se han asociado con un decremento en la capacidad de reparación del DNA y tienen una relación con la supervivencia en pacientes con cáncer de colon (polimorfismo Asn118Asn, T19007C) y cáncer de pulmón (polimorfismo C8092A).^{38, 39} El polimorfismo C8092A fue descrito por Chen en la región no codificante 3' del gen ERCC1 sin encontrar la secuencia alterada ni su repercusión funcional. Posteriormente van Duin et al encontraron que los genes ERCC1 y ASE1/CAST (gen que codifica dos proteínas, una involucrada en la mitosis y la otra, llamada CAST asociada a activación de receptores de linfocitos T) se encuentran en relación estrecha y superpuestos en sus extremos 3'. El polimorfismo C8092A efectivamente no afecta la región codificante de ERCC1, pero origina un cambio en el aminoácido 504 de lisina a glutamina en el gen ASE1/CAST sin aparente alteración funcional.

Los estudios iniciales de asociación de este polimorfismo con susceptibilidad a cáncer realizados por Chen, lo involucraron en un mecanismo de carcinogénesis en gliomas cerebrales, determinando la frecuencia alélica en 159 individuos caucásicos sanos (alelo A 27% y alelo C 73%), luego, Sturgis demostró frecuencia alélica similar pero falló en demostrar una asociación a incremento de riesgo en cáncer de cabeza y cuello.^{40, 41} Un estudio retrospectivo de 58 pacientes con cáncer de células germinales de testículo llevado a cabo en el Laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología de México, evaluó la sensibilidad a cisplatino y su asociación con las proteínas XPA, ERCC1, mtTFA de la vía NER y el polimorfismo C8092A de ERCC1. En cuanto al polimorfismo, se observó que el hecho de poseer el alelo no polimórfico (alelo C) conlleva un incremento en el riesgo de mortalidad y resistencia al tratamiento con cisplatino.⁴²

1.7 Polimorfismo G558 de Mad1

1.7.1 Polimorfismo G558A de Mad1 y punto de monitoreo de mitosis.

La segregación cromosómica durante la mitosis en las células eucariontes es un proceso que ocurre en fases consecutivas, cuya secuencia está supervisada de manera muy precisa por una serie de proteínas que en conjunto forman lo que se conoce como el punto de monitoreo del huso mitótico. Cualquier alteración en este punto de monitoreo ocasiona inestabilidad cromosómica, lo cual puede causar la pérdida o ganancia de cromosomas en las células afectadas, fenómeno conocido como aneuploidía, muy común en enfermedades como el cáncer.⁴³ Mad1 (mitotic arrest defective 1) y Mad2 son proteínas que forman parte de la compleja estructura del punto de monitoreo y su unión es clave para el funcionamiento eficaz de este mecanismo que controla la segregación cromosómica. (FIGURA 3).

Un aspecto interesante de los genes que codifican a las proteínas que participan en el control de la segregación cromosómica es que prácticamente no se han detectado mutaciones en células cancerosas, las cuales en su gran mayoría son aneuploides.^{44, 45}

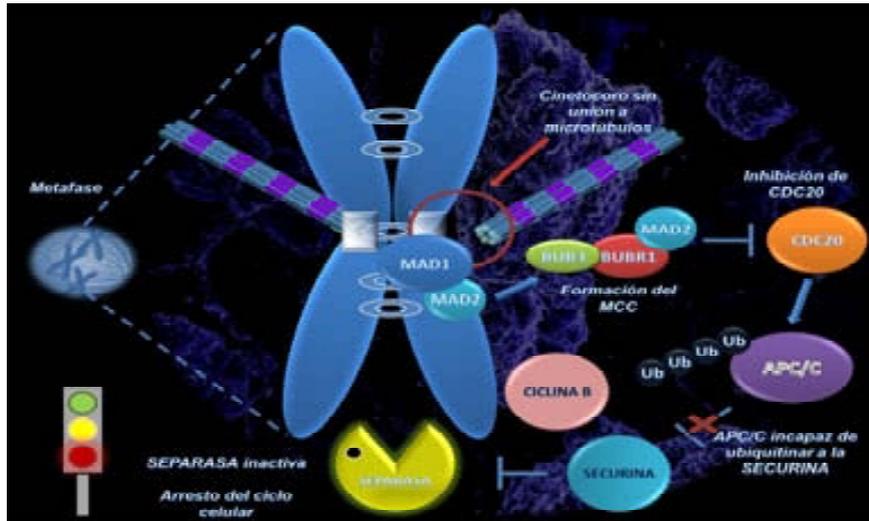


Figura 3. Punto de Monitoreo del Huso Mitótico. El punto de monitoreo modula a CDC20, un cofactor del complejo APC/C (Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma). Específicamente, regula negativamente la capacidad de CDC20 para activar la ubiquitinización de dos sustratos claves, ciclina B y securina, mediada por APC/C y con esto, prevenir su destrucción por el proteosoma 26S. Securina es un inhibidor de la proteasa llamada separasa, requerida para partir el complejo de cohesina que mantiene unidas ambas cromátides hermanas, la separación de cohesina es requerida para ejecutar la anafase. Por otro lado, la proteólisis de ciclina B inactiva a CDK1 lo que promueve la salida de la fase de mitosis. Al modular a CDC20, el punto de monitoreo previene esta cadena de eventos prolongando la prometáfase hasta que todos los cromosomas estén perfectamente alineados, cuando ocurre esto, finaliza el arresto mitótico y se lleva a cabo la anafase. La interacción entre Mad1 y Mad2 asegura una función adecuada del punto de monitoreo.

El estudio inicial de la relevancia de Mad1 fue realizado por Iwanaga en líneas celulares de cáncer, este autor informó un polimorfismo en el codón 558 del gen Mad1, que sustituye una G por una A, provocando el cambio de una arginina (R) por una histidina (H). La frecuencia alélica en las células cancerosas fue de 67% para el alelo A y 33% para el alelo G. Se propuso que el fenotipo AA, presente exclusivamente en estas líneas celulares podría afectar la unión de Mad1 a Mad2 y con ello intervenir en la activación del punto de monitoreo de la segregación cromosómica. El resultado fenotípico de la variante polimórfica es que Mad1 presenta una capacidad menor para reclutar a Mad2, lo que al final repercute en que la célula portadora de este genotipo es menos eficiente para detenerse en el punto de monitoreo

cuando está expuesto a compuestos que inhiben la maquinaria de segregación cromosómica, varios de ellos usados en el tratamiento del cáncer. Según estos investigadores, esta situación ocurre exclusivamente en células cancerosas, mientras que en las células de individuos sanos esto parece ser un evento más bien raro.⁴⁶

1.7.2 Asociación del polimorfismo G558A de Mad1 con cáncer y respuesta al tratamiento con taxanos.

A diferencia de los resultados obtenidos en los estudios iniciales del polimorfismo de Mad1, investigaciones llevadas a cabo por el grupo del Dr. Herrera en el Laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología de México, encontraron individuos sanos homocigotos para la variante polimórfica y determinaron la frecuencia del polimorfismo G558A del gen Mad1 en una muestra de población mexicana y su influencia en el control de la segregación cromosómica en células de individuos sanos. Los resultados mostraron una frecuencia genotípica del 26% (GG), 49% (GA) y 25% (AA) y alélica de 51% para el alelo G y 49% para el alelo A. Por otro lado, el tratamiento con nocodazol en cultivos de linfocitos mostró un mayor índice mitótico en los cultivos de los individuos con genotipo GG, siguiendo los individuos heterocigotos GA y finalmente los homocigotos AA. Estos datos demuestran que la variante polimórfica del gen Mad1 es frecuente en la población mexicana sana, y que por lo tanto no es resultado del proceso de transformación maligna como se había propuesto. Además, esta variante de Mad1 tiene una influencia en la respuesta celular al tratamiento con agentes que alteran la segregación cromosómica. Una posible repercusión clínica de este polimorfismo es que pacientes con cáncer portadores de la variante polimórfica no respondan apropiadamente a la quimioterapia basada en compuestos cuyo mecanismo de acción se base en la detención del ciclo celular en metafase, como los derivados de la vinca y taxanos.⁴⁷

1. JUSTIFICACIÓN

No existen estudios clínicos que evalúen factores pronósticos e indicadores de respuesta al tratamiento con quimioterapia de inducción en el cáncer de ovario avanzado en la población mexicana. Recientemente ha habido un incremento en la investigación oncológica enfocada a predecir la eficacia y toxicidad de fármacos basada en un perfil genético tanto del paciente como el tumoral en el afán de encontrar biomarcadores para la individualización y optimización de las intervenciones terapéuticas. Los estudios más relevantes han incluido polimorfismos genéticos de un nucleótido (SNP) que pueden presentarse en regiones que codifican para proteínas que interactúan con fármacos antineoplásicos, como enzimas de biosíntesis y metabolismo del DNA, enzimas reparadoras de daño al DNA y proteínas del huso mitótico.

El manejo sistémico de las pacientes con cáncer de ovario avanzado, incluyendo la quimioterapia de inducción, esta basado en sales platinadas y taxanos. Los polimorfismos de ERCC1 y Mad1, se encuentran asociados a la vía NER reparadora del DNA y en la modulación de la segregación cromosómica en el huso mitótico, respectivamente, por lo que, pueden estar relacionados a la respuesta al tratamiento con quimioterapia de inducción de cáncer de ovario avanzado que incluye carboplatino y paclitaxel. La determinación de los polimorfismos C8092A de ERCC1 y G558A de Mad1 sería de utilidad como predictores de resistencia o sensibilidad a carboplatino y paclitaxel en cáncer de ovario avanzado. Existe evidencia suficiente que apoya el concepto de predecir la eficacia y toxicidad a drogas mediante la genotipificación de SNP y la aplicación clínica rutinaria de éstos conceptos farmacogenéticos brindará recomendaciones para decisión terapéutica y evaluación del riesgo individualizado en cada paciente con el propósito de estratificar individualmente a los pacientes basado en su probabilidad de responder a una terapia en particular.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Influirán los polimorfismos C8092A del gen de ERCC1 y G558A del gen Mad1 en la respuesta a la quimioterapia de inducción de las pacientes con cáncer epitelial de ovario avanzado tratadas con Carboplatino y Paclitaxel?

3. HIPÓTESIS

Las pacientes con cáncer de ovario epitelial avanzado portadoras del genotipo AA del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 (homócigo polimórfico) o GG del polimorfismo G558A del gen Mad1 (homócigo silvestre) tendrán una mejor respuesta al tratamiento de inducción basado en carboplatino y paclitaxel en comparación con otras variantes genotípicas. En general, en cáncer de ovario con enfermedad avanzada las respuestas globales al tratamiento de quimioterapia de inducción son del 85% y planteamos un incremento en la respuesta del 10% para los genotipos mencionados.

4. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la presencia de las variantes genotípicas AA del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 y GG del gen Mad1 se asocian con una mayor respuesta a la quimioterapia de inducción de pacientes con cáncer de ovario avanzado tratados con Carboplatino y Paclitaxel.

5.1 Objetivos secundarios

- A) Valorar la frecuencia de los polimorfismos de interés en las pacientes analizadas y contrastar estos resultados con los observados en población mexicana sana;
- B) Describir en la población estudiada la edad, etapa clínica, tipo histológico, grado de diferenciación, marcador tumoral CA 125 basal y resultado de resección del tumor primario;

C) Relacionar las variables edad, etapa clínica, tipo histológico, grado de diferenciación, marcador tumoral CA 125 basal, resultado de resección del tumor primario, supervivencia mediana y libre de enfermedad con los polimorfismos de interés.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño

Para contestar la pregunta de investigación se realizó un estudio tipo cohorte de pacientes con cáncer epitelial de ovario avanzado manejadas con quimioterapia de inducción para evaluar los polimorfismos como marcadores de respuesta al tratamiento.

6.2 Población

Nuestra población de estudio estuvo constituida por todas las pacientes con cáncer de ovario epitelial avanzado que fueron evaluadas dentro del Instituto Nacional de Cancerología de México que hayan recibido al menos 3 ciclos de quimioterapia de inducción basada en carboplatino y paclitaxel como primera línea a partir del periodo comprendido entre el 01 de enero al 30 de julio de 2008. De acuerdo a la frecuencia alélica de los polimorfismos de ERCC1 y Mad1 se calculó el tamaño de muestra para obtener un poder estadístico del 90%, en el primer caso corresponde a 100 pacientes con un $\alpha=0.05$ y una $\beta=0.90$ y en el caso de Mad1 se requieren 87 pacientes. Por lo que una vez concluido el proyecto se estima tener un total de 100 casos incluidos y así obtener un poder estadístico adecuado para los 2 polimorfismos.

6.3 Criterios de inclusión

A) Pacientes con cáncer epitelial de ovario histológicamente confirmado con enfermedad irreseccable o sometido a citorreducción primaria subóptima.

B) Haber recibido al menos 3 ciclos de quimioterapia de inducción y que cuenten con archivo completo que incluya, incluso, bloques de parafina para extracción de DNA tisular en caso de ser requerido.

C) No haber recibido quimioterapia o radioterapia previo a la inclusión.

D) Edad 18-75 años.

E) Karnofsky mayor o igual a 70.

F) Adecuado funcionamiento de la médula ósea: leucocitos $3.5 \times 10^9/L$; plaquetas $100 \times 10^9/L$; hemoglobina 10.0 g/dL.

G) Adecuado funcionamiento renal: depuración de creatinina mayor de 40 ml/min.

H) Adecuado funcionamiento hepático: bilirrubina menor de $2.0 \mu\text{mol/L}$; transaminasas menos del doble de límite superior normal.

6.4 Criterios de exclusión

a) No candidatas o que rehusaron tratamiento con quimioterapia.

b) No aceptan inclusión en estudio.

6.5 Criterios de eliminación

a) Pacientes con muestra de DNA insuficiente o en estado no apto para la determinación del polimorfismo.

b) Pacientes que expresen su deseo de no continuar con el estudio.

c) Iniciar quimioterapia de inducción sin haber completado al menos 3 ciclos.

6.6 Variables Independientes

6.6.1 Polimorfismos. En base a su genotipo analizado en muestras de sangre periférica los pacientes se agruparon en homocigos silvestres (CC para ERCC1 y GG para Mad1), homocigos polimórficos (AA para ERCC1 y Mad1) o heterocigos (CA para ERCC1 y GA para Mad1).

Operacionalmente consideramos a los pacientes homócigos silvestres como no polimórficos y a los pacientes portadores de por lo menos un alelo mutado como polimórficos.

6.7 Variables Dependientes

6.7.1 Respuesta a quimioterapia: Evidencia de respuesta parcial o completa por criterios de RECIST en caso de enfermedad medible y/o respuesta de al menos 50% en nivel sérico del marcador tumoral CA 125 de acuerdo a los criterios de Rustin posterior a 3 ciclos de quimioterapia de inducción.

6.7.1.1 Respuesta evaluada por criterios de RECIST

A) Completa: Desaparición de todas las lesiones medibles.

B) Parcial: Disminución de 30 % en la suma de los diámetros mayores de lesiones medibles confirmado por estudio de imagen después de 4 semanas de última quimioterapia.

C) Progresión: Incremento 20 % en la suma de los diámetros mayores de lesiones medibles respecto al estudio previo al tratamiento o aparición de nuevas lesiones medibles confirmado por estudio de imagen después de 4 semanas de última quimioterapia.

D) Enfermedad Estable: No cumple criterios de respuesta o progresión de la enfermedad.

6.7.1.2 Definición de respuesta por CA-125 (Criterios de Rustin)

Para ambas definiciones la muestra final necesita ser analizada al menos 28 días después de la muestra previa y el valor inicial de CA-125 debe ser igual o mayor de 40 unidades/ml:

A) Respuesta del 50%: Una disminución de 50% del nivel sérico de CA-125 desde 2 muestras iniciales elevadas, la muestra que mostró el decremento del 50% deberá confirmarse con una cuarta muestra.

B) Respuesta del 75%: Una disminución de 75% del nivel sérico de CA-125 en determinaciones seriadas en 3 muestras.

6.7.2 Citorreducción óptima: No evidencia de enfermedad o enfermedad residual menor de 1 cm tras la realización de cirugía citorreductora de intervalo.

6.7.3 Citorreducción subóptima: No cumple criterios de citorreducción de intervalo óptima.

6.7.4 Sensibilidad a Platino: No evidencia de progresión durante el tratamiento o recaída de la enfermedad después de al menos 6 meses de haber concluido la quimioterapia basada en platino.

6.7.5 Tiempo libre de recaída o progresión: período comprendido entre el inicio del tratamiento y la documentación de recaída o progresión de la enfermedad, ya sea por criterios clínicos, de laboratorio o de imagen.

6.8 Detección de los polimorfismos de ERCC1 y Mad1

6.8.1 Obtención de muestras de sangre periférica

Se solicitará mediante una carta de consentimiento informado aprobada por los Comités de Investigación y de Ética del Instituto Nacional de Cancerología una muestra de 5 ml de sangre periférica a cada una de las pacientes que cumplan con los criterios de inclusión para llevar a cabo la determinación de los polimorfismos C8092A de ERCC1 y G558A de Mad1.

6.8.2 Amplificación de los polimorfismos de mediante PCR

Para determinar el polimorfismo C8092A del gen ERCC1, se amplificó un fragmento 255pb del gen con los siguientes primers:

Sentido: 5' TAG TTC CTC AGT TTC CCG 3'

Antisentido: 5' TGA GCC AAT TCA GCC ACT 3'

Para el polimorfismo G558A de Mad1 se amplificó un fragmento del exón 17 de 241pb con los siguientes primers:

Sentido: 5'-GTGTGAGAATTCCTGCAGGGTGACTATGACCAG-3'

Antisentido: 5'GAGTCTGGATCCCTGCCACCTCCTTGGACGATGGCAGAC-3'

Para la reacción de PCR se utilizaron los siguientes componentes, especificando los volúmenes para cada reacción:

Componente PCR	Volúmen/Reacción ERCC1 (ul)	Volúmen/Reacción Mad1 (ul)
Buffer 10x (Invitrogen)	1.0	1.0
DNTP's	0.2	0.2
MgCl2 50Mm	1.5	0.3
Sentido 10 µM	0.2	0.2
Antisentido 10 µM	0.2	0.2
Templado (DNA)	1.0	1.0
Platinum Taq polimerasa	0.1	0.1
H ₂ O	7.0	7.0
Volúmen total	10.0	10.0

Los ciclos de PCR se llevaron acabo en un termociclador PCR Sprint thermal Cycler de Thermo como se muestra a continuación:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización	2 min	94°C
	Desnaturalización	30 seg	94°C
40	Alineamiento	30 seg	52°C
	Extensión	30 seg	72°C
1	Extensión final	5 min	72°C

El producto de PCR de cada muestra de DNA se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio. Los fragmentos obtenidos para ERCC1 y Mad1 fueron de 255pb y 241pb, respectivamente.

6.8.3 Identificación de los genotipos de los polimorfismos

Para identificar los genotipos de ambos polimorfismos se digirieron los productos de PCR con enzimas de restricción específicas. (FIGURA 4).

Para ERCC1, la enzima Mbo II (New England Biolabs), reconoce el sitio 5'GAAGA (N)₈3' que se genera en el gen ERCC1 por la transversión A:G en la posición 8092 del extremo 3' terminal, las condiciones para la restricción del fragmento fueron las siguientes: 2µl de producto de PCR, 1µl de buffer NEB2 10x y 0.25U de enzima en 10µl de reacción, incubando a 37°C durante 3 horas. El sitio del polimorfismo cambia una C por una A y se genera el sitio de corte. El fragmento de DNA del genotipo homócigo silvestre (genotipo CC) tiene dos sitios de restricción para la enzima por lo que se generan 3 fragmentos de 158pb, 91pb y 6pb. En el homócigo polimórfico (genotipo AA) se genera un sitio en el fragmento de 158pb resultando dos fragmentos de 117pb y 41pb como puede verse en la secuencia. Los sitios de restricción y secuencia de Mad1 son:

TGAGCCAATTCAGCCACTAGAGCCTGAACTGCCAGGGGAGGGACAGCCTGA

91pb.

AGCCAGGGCAACTCCGGGATCCACCAAGAAGAGGAAGAAG/CAGAGT/CAGG

6pb.

AAAGCCGGATGCCAGAGACAGTGCCCCAAGAGGAGATGCCAGGGCCGCCAC

158pb. (sin digerir)

TGAATTCAGAGTCTGGGGAGGAGGCTCCACAGGCCGGGACAAGAAGCGGA

117pb. (digerido)

AGCAGCAG/CAGCAGCCTGTGTAGTCTGCCCCGGGAACTGAGGAACTA

41pb.

Para Mad1 se realizó digestión alelo-específica con la enzima de restricción BstUI (New England Biolabs), la cual reconoce el sitio CGCG, las condiciones para la restricción del fragmento fueron las siguientes: 3µl de producto de PCR, 1µl de buffer NEB2 10x y 3UI de enzima en 10µl de reacción. La reacción de digestión se llevó a cabo a 60°C, 16 horas. Las muestras digeridas se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio. Dentro de la secuencia amplificada de un individuo que no presenta el polimorfismo (Genotipo GG) existen 4 sitios CGCG, lo que da origen a 5 fragmentos de diferente longitud (94, 50, 43, 42 y 12pb). La sustitución de una G:A presente en el polimorfismo modifica un sitio de restricción (el que se presenta entre el fragmento de 94 y 42pb), de manera que la secuencia en este caso es CACG. Este cambio inhabilita el reconocimiento y corte enzimático dando como resultado un fragmento de 136pb en el homócigo polimórfico (Genotipo AA).

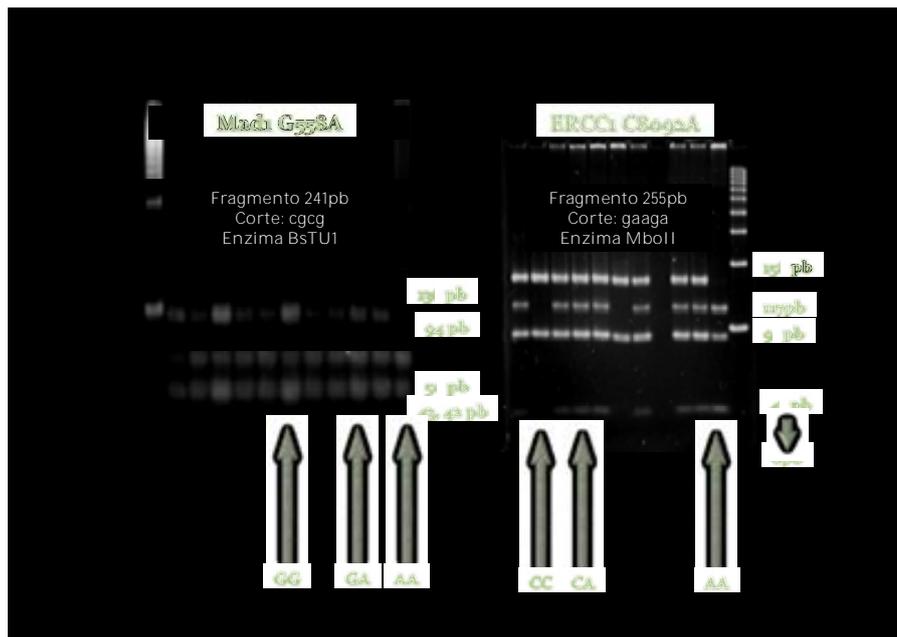


Figura 4. Genotipificación de los polimorfismos. Mad1 corresponde a un fragmento de 241pb, en el homócigo mutante (AA) no se reconoce un sitio de corte y se genera un fragmento de 136pb en lugar de 2 fragmentos de 94 y 42pb como en el homócigo normal (GG). ERCC1 corresponde a un fragmento de 255pb, en el homócigo mutante (AA) se genera un sitio adicional que origina 2 fragmentos de 117 y 41pb en lugar de un solo fragmento de 158pb como en el homócigo normal (CC). Los individuos heterócigos presentan los fragmentos de los dos homócigos.

6.9 Estadística

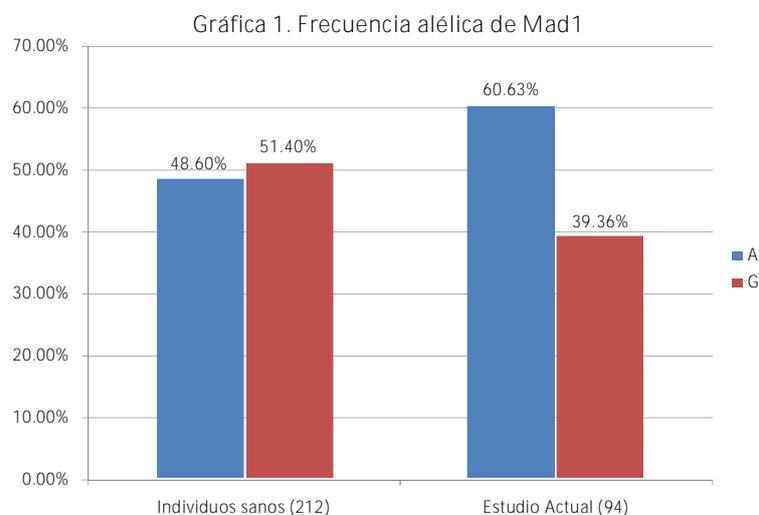
Se evaluaron en función del genotipo (variable independiente) los indicadores de respuesta mencionados con anterioridad y las características clínico-patológicas inherentes al paciente y la enfermedad (variables dependientes), se realizó una prueba de χ^2 , agrupando a las pacientes de dos maneras. En primera instancia, se analizaron con respecto al genotipo de Mad1 y ERCC1 en tres grupos: homocigos silvestres, heterocigos y homocigos polimórficos; posteriormente, se formaron dos grupos, el primer grupo, denominado no polimórfico estuvo formado por pacientes homocigos silvestres, el segundo grupo denominado polimórfico incluyó a pacientes que presentan al menos un alelo polimórfico. El análisis estadístico para cada polimorfismo se realizó con el paquete estadístico STATS[®] con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

1. RESULTADOS

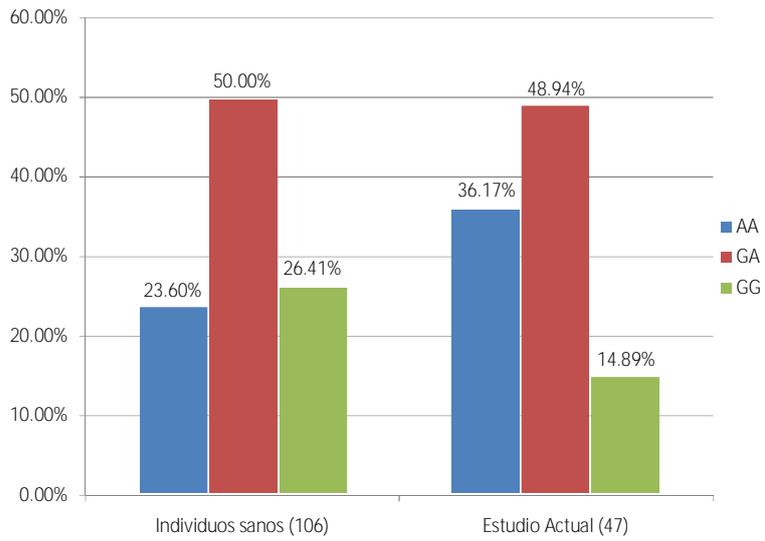
Para el análisis del estudio se revisaron 57 casos de pacientes con diagnóstico de cáncer de ovario avanzado manejados con quimioterapia de inducción, evaluados en consulta externa de primera vez o subsecuente en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo comprendido entre el 01 de enero al 31 de julio del 2008 a quienes se les realizó extracción de muestra de sangre periférica para determinación de los polimorfismos de interés. De éstos 57 casos, 47 pacientes cumplieron los criterios de inclusión para evaluación de la respuesta a quimioterapia en razón de los polimorfismos.

A pesar de haberse determinado los polimorfismos en todos los casos, se excluyeron 10 pacientes del análisis preliminar por las siguientes razones: 9 de ellos no habían recibido al menos tres ciclos de quimioterapia y una paciente no acudió a su tratamiento subsecuente tras haber recibido un ciclo de quimioterapia. La frecuencia alélica y del genotipo para ambos polimorfismos en los 47 casos incluidos se analizan de forma comparativa con las encontradas en el Banco de DNA del Laboratorio de Carcinogénesis. (GRÁFICAS 1-4).

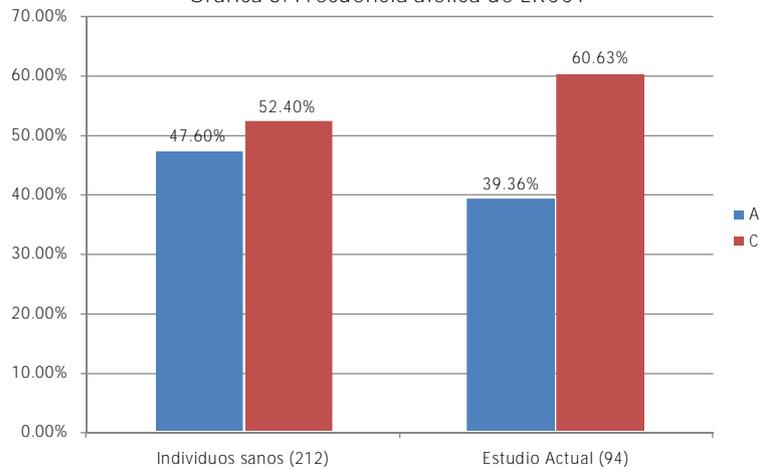
Existe una mayor prevalencia del alelo A y del genotipo polimórfico de Mad1 en pacientes con cáncer de ovario al compararse con individuos mexicanos sanos, a diferencia de lo que ocurre con ERCC1 donde el alelo silvestre (C) está más expresado en población sana e incluso, el genotipo homocigo silvestre es el doble del genotipo homocigo polimórfico.



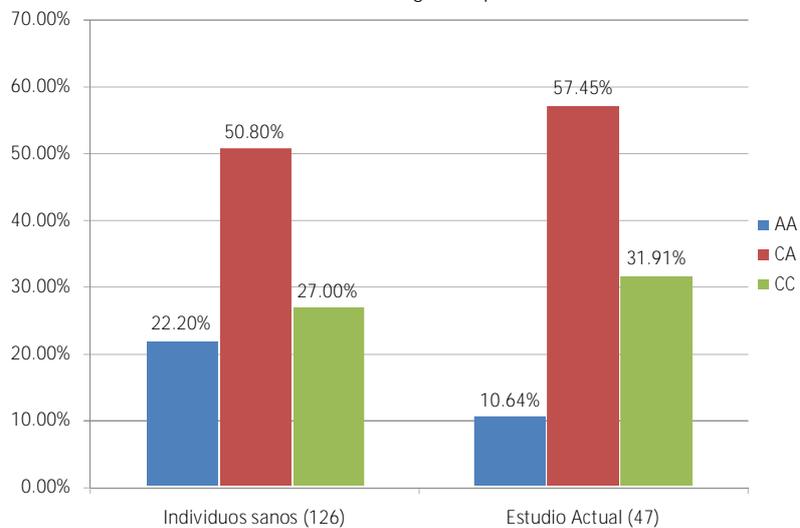
Gráfica 2. Frecuencia genotípica de Mad1



Gráfica 3. Frecuencia alélica de ERCC1

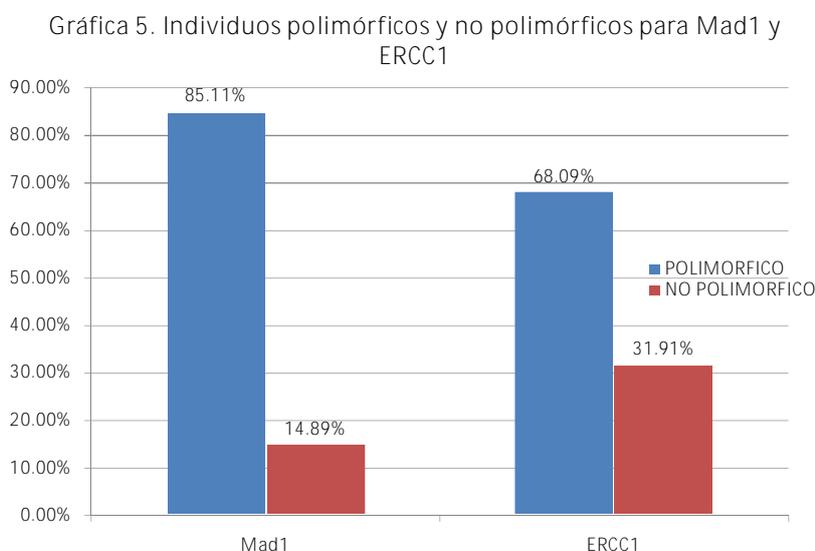


Gráfica 4. Frecuencia genotípica de ERCC1



En los 47 pacientes analizados se detectó una distribución de los polimorfismos de la siguiente manera: para Mad1 encontramos 7 homócigos normales GG (14.89%), 23 heterócigos GA (48.94%) y 17 homócigos mutantes AA (21%) y para ERCC1 detectamos 15 homócigos normales CC (31.91%), 27 heterócigos CA (57.45%) y 5 homócigos mutantes (10.64%).

Los pacientes se dividieron en dos grupos, los polimórficos (homócigos mutantes y heterócigos) y los no polimórficos (homócigos normales) resultando 40 y 7 individuos para Mad1 y 32 y 15 individuos para ERCC1 respectivamente. (GRÁFICA 5).



Con respecto a las características generales de los pacientes (TABLA 2), la mediana de edad de ambos grupos fue de 53.78 ± 14.19 años (rango 23-83 años), 19 pacientes eran mayores de 60 años (40.43%). Con respecto al estadiaje tumoral se presentaron 33 casos con EC III (70.21%) y 14 casos con EC IV (29.79%) y 36 casos habían sido sometidos a laparotomía diagnóstica previo al inicio del tratamiento con quimioterapia de inducción. Con respecto a las características histopatológicas del tumor, el tipo histológico predominante fué seroso papilar (93.62%) y solamente 3 casos (6.38%) se identificaron con la estirpe de células claras, asimismo, 36 pacientes fueron de alto grado histológico. El nivel sérico del marcador tumoral CA 125 tuvo una variabilidad en el rango de 22.7 hasta 27441UI, con una mediana de 1797UI.

Tabla 2. Características generales de los pacientes.

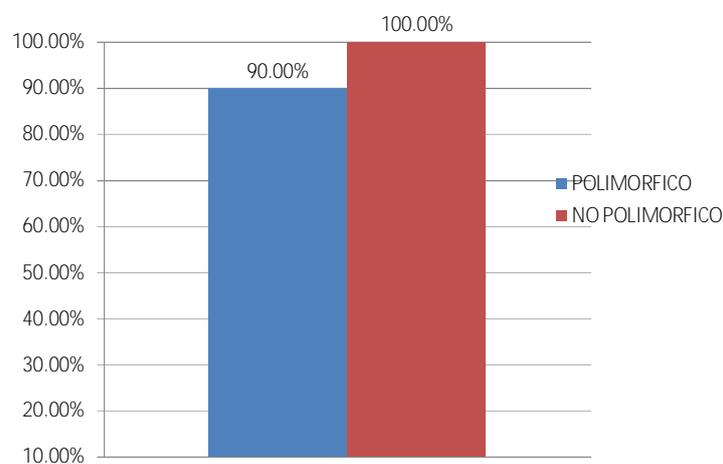
	Polimórfico Mad1 n=40	No Polimórfico Mad1 n=7	P	Polimórfico ERCC1 n=32	No Polimórfico ERCC1 n=15	P
EDAD			0.472			0.968
<60 años	23/28	5/28		19/28	9/28	
>60años	17/19	2/19		13/19	6/13	
ETAPA			0.331			0.315
III	27 /33	6/33		21/33	12/33	
IV	13/14	1/14		11/14	3/14	
HISTOLOGÍA			0.354			0.957
Céls Claras	2/3	1/3		2/3	1/3	
Seroso papilar	38/44	6/44		30/44	14/44	
GRADO			0.537			0.718
Alto	30/36	6/36		25/36	11/36	
Bajo y mod.	10/11	1/11		7/11	4/11	
LAPE INICIAL			0.788			0.632
Si	25/29	4/29		19/29	10/29	
No	15/18	3/18		13/18	5/18	
CA125 BASAL			0.731			0.166
35	3/3	0/3		1/3	2/3	
36-1000	14/17	3/17		14/17	3/17	
>1000	23/27	4/27		17/27	10/27	

Aunque para determinar la influencia de los polimorfismos C8092A del gen de ERCC1 y G558A del gen Mad1 en la respuesta a la quimioterapia de inducción de las pacientes con cáncer epitelial de ovario avanzadas tratadas con Carboplatino y Paclitaxel propósito de éste estudio se contempló la utilización de los criterios de RECIST en ninguno de los casos se contó con los estudios de imagen pertinentes para llevar a cabo la evaluación de respuesta por este método. El panel de evaluación incluyó las determinaciones seriadas del nivel sérico del marcador tumoral CA 125 de acuerdo a los criterios de Rustin y la negativización del marcador tumoral (<35UI) tras 3 ciclos de quimioterapia de inducción, principalmente.

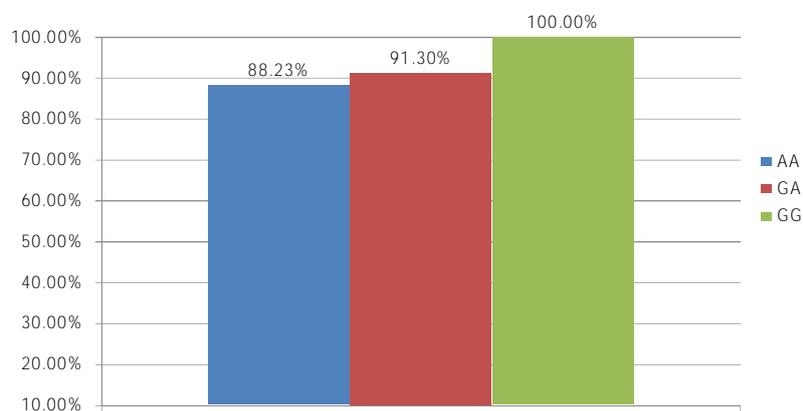
Con respecto al objetivo principal, se detectó un 91.49% de respuesta global al tratamiento con quimioterapia de inducción (43/47 casos) y sólo 8.51% casos sin respuesta de acuerdo a los criterios de Rustin (4 casos). Con respecto al polimorfismo G558A de Mad1, de los 43 respondedores correspondieron a 36/40 casos polimórficos y 7/7 casos no polimórficos ($p=0.348$) y de los genotipos: 15/17 casos genotipo AA, 21/23 casos genotipo GA y 7/7 casos genotipo GG ($p=0.643$). Con respecto al polimorfismo C8092A de ERCC1, los respondedores

correspondieron a 29/32 polimórficos y 14/15 no polimórficos ($p=0.756$) y de los genotipos: 3/5 casos genotipo AA, 26/27 casos genotipo CA y 14/15 casos genotipo CC ($p=0.027$). Evidentemente los resultados se encuentran influenciados por el tamaño de muestra y la mayor frecuencia de individuos polimórficos para ambos genes. (GRAFICAS 6-9).

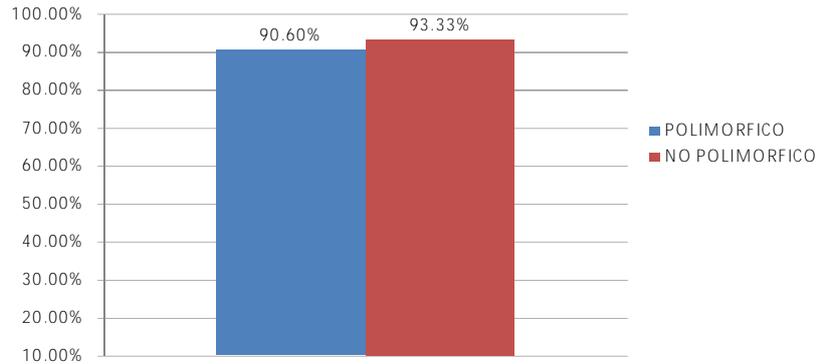
Gráfica 6. Polimorfismo Mad1 y respuesta a QT definida por Criterios de Rustin



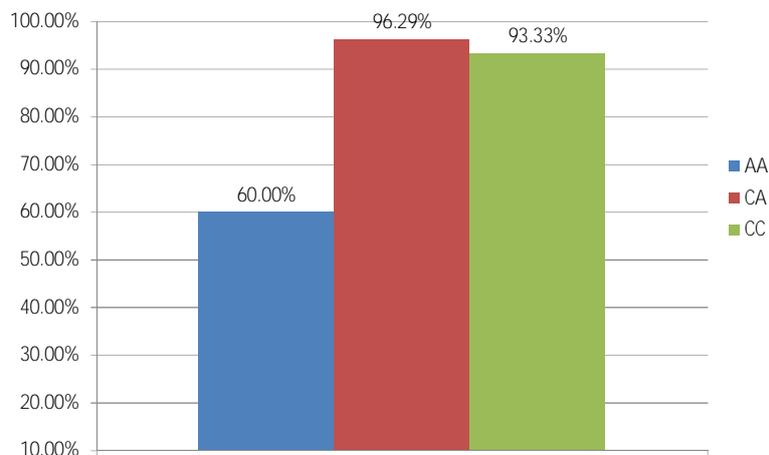
Gráfica 7. Genotipos de Mad1 y respuesta a QT definida por Criterios de Rustin



Gráfica 8. Polimorfismo ERCC1 y respuesta a QT definida por Criterios de Rustin

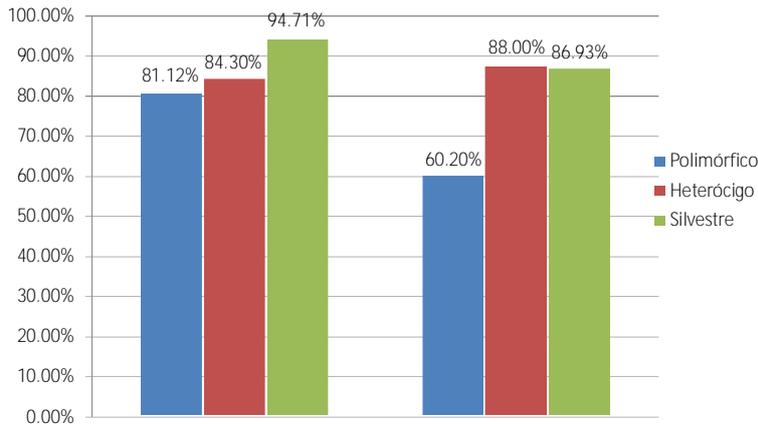


Gráfica 9. Genotipos de ERCC1 y respuesta a QT definida por Criterios de Rustin



Al realizar un análisis exhaustivo encontramos que de los 47 casos incluidos, 27 son polimórficos (homócigo mutante y heterócigo) para Mad1 y ERCC1, 24/27 fueron considerados respondedores (55.81%) y 3/27 no respondedores. Sólo 2 casos son homócigos normales para ambos (no polimórficos) y los 2 se consideraron respondedores, asimismo, 3 casos son homócigos mutantes para ambos polimorfismos y 2 de ellos presentaron respuesta a la quimioterapia. Con respecto al porcentaje promedio de respuesta considerando la reducción del CA 125 basal después de 3 ciclos de inducción se encontró la misma tendencia observada en el análisis de respuesta global. (GRÁFICA 10).

Gráfica 10. Porcentaje de descenso de CA 125 tras 3 ciclos de inducción de acuerdo a los genotipos de Mad1 y ERCC1, respectivamente.



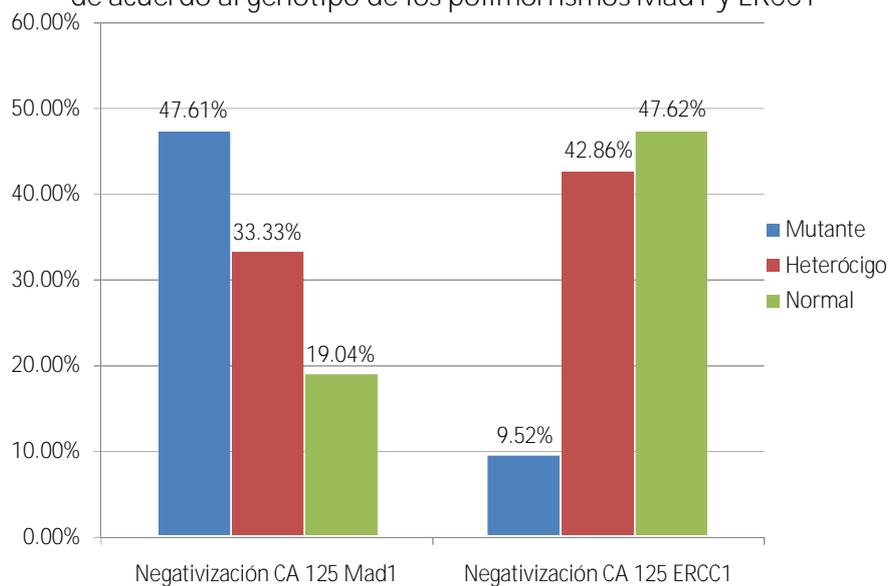
El análisis univariado no mostró diferencia significativa en cuanto a la respuesta al tratamiento con quimioterapia de inducción al evaluar las variables pronósticas clásicas como edad, etapa clínica, histología, grado y nivel de marcador tumoral CA 125, sin embargo, al comparar la presencia o ausencia del polimorfismo y los genotipos se detectó una mayor respuesta al tratamiento en los pacientes con el genotipo CA de ERCC1 ($p=0.027$). (TABLA 3).

TABLA 3. Análisis univariado de la respuesta al tratamiento de quimioterapia de inducción de acuerdo a los criterios de Rustin. Se consideró respuesta la disminución de al menos un 50% en el valor sérico del marcador tumoral CA 125 tras 3 ciclos de quimioterapia.

Variables	Respuesta a QT (%) n=43	No Respuesta a QT (%) n=4	P
Edad <60 años	27 (62.79%)	1 (25%)	0.141
Edad >60 años	16 (37.20%)	3 (75%)	
EC III	31 (72.09%)	2 (50%)	0.355
EC IV	12 (27.90%)	2 (50%)	
Células Claras	2 (4.65%)	1 (25%)	0.111
Seroso Papilar	41 (95.34%)	3 (75%)	
Poco diferenciado	33 (76.74%)	3 (75%)	0.937
Bien o mod. Dif.	10 (23.25%)	1 (25%)	
CA 125 basal < 35	3 (6.97%)	0 (0%)	0.759
CA 125 basal 35-1000	15 (34.88%)	2 (50%)	
CA 125 basal > 1000	25 (58.13%)	2 (50%)	
Mad1 AA	15 (34.88%)	2 (50%)	0.643
Mad1 GA	21 (48.83%)	2 (50%)	
Mad1 GG	7 (16.27%)	0 (0%)	
ERCC1 AA	3 (6.97%)	2 (50%)	0.027
ERCC1 CA	26 (60.46%)	1 (25%)	
ERCC1 CC	14 (32.55%)	1 (25%)	
Mad1 Polimórfico	36 (83.72%)	4 (100%)	0.382
Mad1 No Polimórfico	7 (16.27%)	0 (0%)	
ERCC1 Polimórfico	29 (67.44%)	3 (75%)	0.756
ERCC1 No Polimórfico	14 (32.55%)	1 (25%)	

El análisis de otras variantes relacionadas con respuesta a la quimioterapia de inducción, fue realizado con la negativización de CA 125, sensibilidad o resistencia a cisplatino en el caso de ERCC1, realización de citorreducción quirúrgica óptima y tiempo a la recaída o progresión de la enfermedad. La negativización del marcador tumoral CA 125 (<35UI) se documentó en 21/47 casos (44.68%), éste parámetro se ha utilizado en estudios previos como marcador pronóstico muy sensible de respuesta a la quimioterapia de inducción. De estos 21 casos, con respecto a Mad1 lo negativizaron 10 pacientes con genotipo AA, 7 pacientes con genotipo GA y 4 pacientes con genotipo GG ($p=0.157$) y con respecto a ERCC1 lo negativizaron 2 casos con genotipo AA, 9 con genotipo CA y 10 casos con genotipo CC ($p=0.112$), sin ser estadísticamente significativo. (GRÁFICA 11).

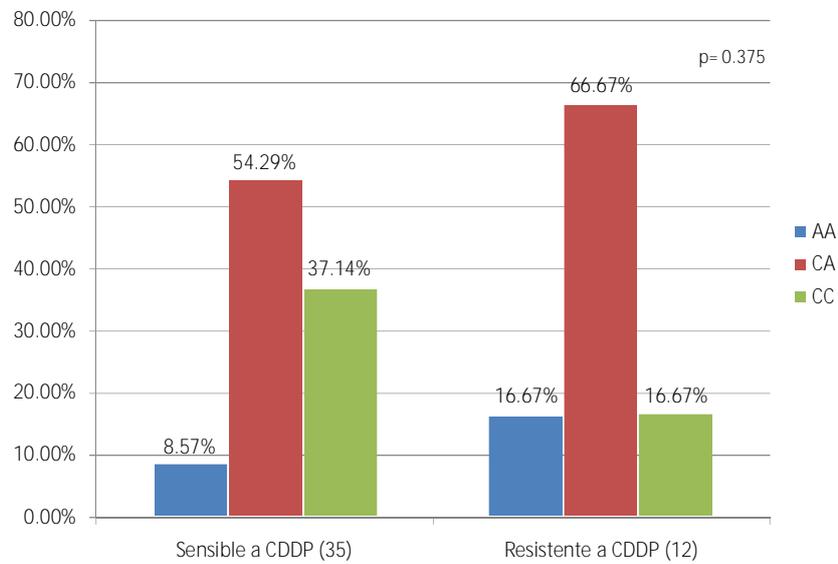
Gráfica 11. Negativización de CA 125 tras 3 ciclos de QT de inducción de acuerdo al genotipo de los polimorfismos Mad1 y ERCC1



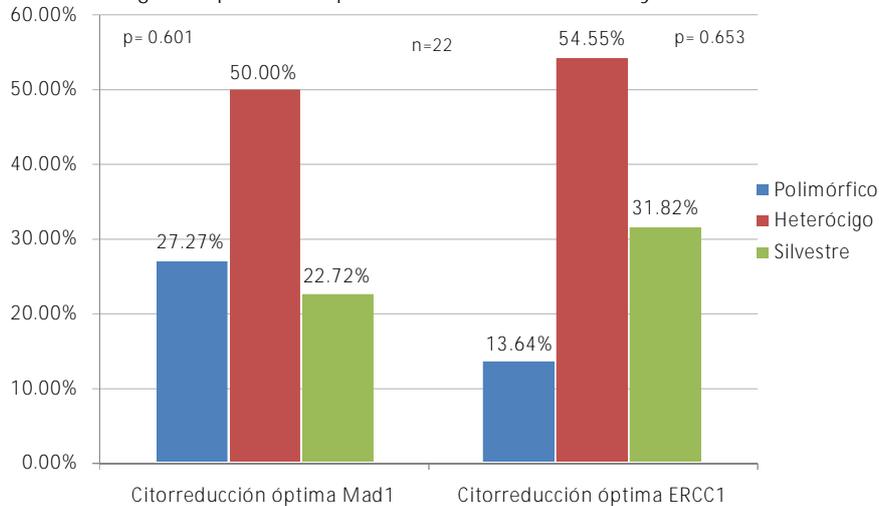
De manera adicional se realizaron asociaciones de los polimorfismos con marcadores indirectos de respuesta al tratamiento que incluyeron: resistencia o sensibilidad clínica a cisplatino, presencia de recaída o progresión estimando el tiempo a dichos eventos y eventualmente la posibilidad de llevar a citorreducción de intervalo óptima al concluir la quimioterapia de inducción.

En el análisis de sensibilidad clínica a cisplatino se detectó a 35 casos platino sensibles, con respecto a Mad1 15 casos correspondieron al genotipo GA, 13 casos al genotipo AA y 7 casos al genotipo GG ($p=0.176$) y para ERCC1 hubo 19 casos con genotipo CA, 13 casos con genotipo CC y 3 casos para el genotipo AA ($p=0.375$). De los 31 casos llevados a cirugía en 22 de ellos se logró citorreducción óptima, sin existir diferencia estadísticamente significativa con respecto a los genotipos de ambos polimorfismos. (GRÁFICAS 12-13).

Gráfica 12. Respuesta clínica a CDDP de acuerdo al genotipo de ERCC1

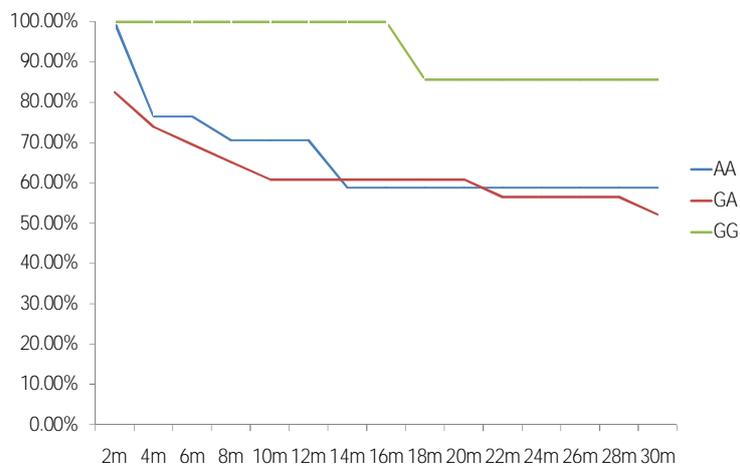


Gráfica 13. Distribución de Citorreducción Óptima de acuerdo al genotipo de los polimorfismos de Mad1 y ERCC1

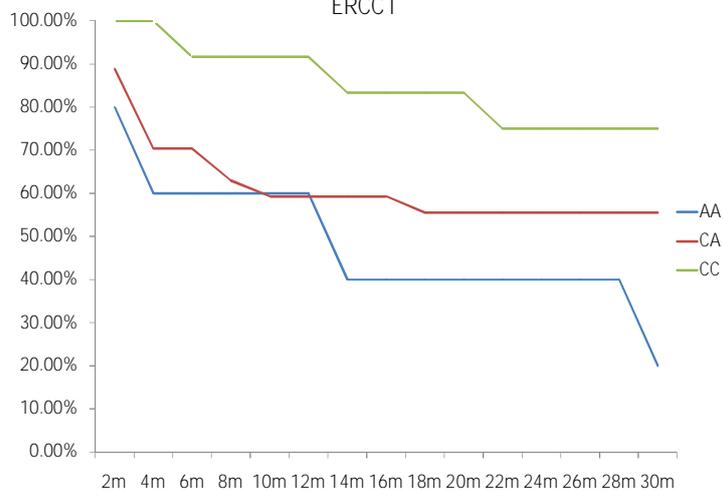


Exploramos también 19 casos en los que se detectó recaída o progresión de la enfermedad, para Mad1 se presentaron 11 casos con genotipo GA, 7 casos con genotipo AA y 1 caso con genotipo GG ($p=0.285$) y con respecto a ERCC1 hubo 12 casos con genotipo CA, 4 casos con genotipo AA y 3 casos para genotipo CC ($p=0.049$). La mediana de tiempo para dicho evento fue de $8.31 \pm 7.5m$ y el comportamiento para los genotipos de cada uno de los polimorfismos se encuentra ilustrado. (GRÁFICAS 14-15).

Gráfica 14. Tiempo a la progresión o recaída de acuerdo al genotipo de Mad1



Gráfica 15. Tiempo a la progresión o recaída de acuerdo al genotipo de ERCC1



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cáncer de ovario representa la más desafiante de las neoplasias ginecológicas, ya que hasta 70% son diagnosticadas en etapas avanzadas y solo 35% de los pacientes sobrevive a 5 años, con un índice de mortalidad no modificado por muchos años. El tratamiento de las etapas avanzadas combina cirugía y quimioterapia.³ El máximo esfuerzo quirúrgico en la citorreducción primaria con la meta de no dejar enfermedad residual debe realizarse y la quimioterapia estándar recomendada para enfermedad avanzada es carboplatino AUC 5-7mg/ml/min y paclitaxel 175mg/m²/3hrs cada tres semanas por 6 ciclos y se obtienen respuestas globales de al menos 80% en etapas avanzadas. La quimioterapia de inducción para pacientes considerados inicialmente no resecables de manera óptima ya sea por las características del tumor o factores relacionados al paciente es una alternativa viable y brinda resultados aceptables.^{4, 11, 12, 14}

El carboplatino induce muerte celular principalmente a través de la formación de aductos covalentes bifuncionales con el DNA celular y el paclitaxel es un taxano que se une a la superficie interior del lumen del microtúbulo alterando el índice de disociación de tubulina en ambos extremos del microtúbulo, suprimiendo los dos mecanismos dinámicos funcionales de estas estructuras.^{8, 19}

Las nuevas estrategias de manejo del cáncer en general incluyen la identificación de factores que faciliten el diagnóstico temprano, así como la predicción de respuesta al tratamiento y el pronóstico. La variación interindividual en la respuesta al tratamiento con quimioterapia no puede ser explicada satisfactoriamente solo por factores como la función renal y hepática, la edad, comorbilidades, estilo de vida, interacciones medicamentosas o adherencia al tratamiento. Por lo tanto, los factores genéticos son determinantes para la eficacia y toxicidad a quimioterapia. Entonces, es primordial determinar cuál agente o combinación de fármacos es mejor para un tumor individual. La probabilidad de un resultado terapéutico se establece por los resultados de múltiples estudios clínicos, sin embargo, no es posible predecir cuanto

responderá un tumor de manera individual. Aunque los factores clinicopatológicos clásicos son de valor para determinar el pronóstico, son de menor utilidad para desarrollar opciones terapéuticas personalizadas. Los biomarcadores son deseables para estratificar a los pacientes en grupos de diferente posibilidad de respuesta tumoral o toxicidad en órganos normales.^{48, 49}

Los polimorfismos representan variaciones comunes en la secuencia del DNA que pueden llevar a actividad reducida del producto de un gen, pero en otros casos, también a incremento en su actividad. A diferencia de las mutaciones somáticas, estos son estables y heredables. Un polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) representa un cambio de una base que puede o no causar un cambio de aminoácido en la proteína resultante, su frecuencia es mayor del 1% en la población y corresponde a casi el 90% de la variación genética en el genoma humano. El número de SNP en el genoma humano se ha estimado en un rango de 1 a 10 millones y solo entre 50000 y 250000 se distribuyen dentro y alrededor de genes codificantes. La mayoría de ellos no confieren alteraciones fenotípicas pero están agregados a ciertos haplotipos.^{50, 51, 52}

El propósito de este estudio fue analizar la influencia de dos polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) de los genes Mad1 y ERCC1 en la respuesta al tratamiento con quimioterapia de inducción a base de carboplatino más paclitaxel.

El polimorfismo G558A, fue caracterizado por primera vez en el estudio de Iwanaga et al en 17 tumores sólidos y 6 casos de células transformadas de HTLV-1, encontrando una frecuencia alélica en células cancerosas de 67% para el alelo polimórfico y de 33% para el alelo silvestre, sin encontrar homocigos polimórficos en individuos sanos. Al utilizar nocodazol, un agente que altera microtúbulos e induce actividad del punto de monitoreo encontraron consistentemente que el alelo polimórfico se asocia a una reducción en la eficiencia del arresto mitótico inducido por el fármaco de 8-10% al compararlo con el alelo silvestre.⁴⁶ A diferencia de este estudio, los resultados del Laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología de México detectaron por primera vez individuos sanos homocigos polimórficos y corroboraron no solamente que ésta variante no es exclusiva de células cancerosas sino que es muy frecuente

en la población mexicana sana y condiciona una capacidad menor de Mad1 para reclutar a Mad2, lo que traduce menor eficiencia del punto de monitoreo cuando se expone a compuestos que inhiben la maquinaria de segregación cromosómica. La posible repercusión clínica de esto es que los pacientes con cáncer portadores de la variante polimórfica no respondan apropiadamente a la quimioterapia basada en compuestos cuyo mecanismo de acción se base en la detención del ciclo celular en metafase, lo que alentó a realizar el presente estudio.⁴⁷

Los resultados de nuestro estudio encuentran una mayor frecuencia del alelo polimórfico (A) en pacientes con cáncer de ovario con respecto a los encontrados en población sana, 60.63% y 48.60% respectivamente. Los trabajos anteriores con este polimorfismo se han enfocado en determinar la frecuencia en líneas celulares de cáncer, en población sana, investigar la influencia en el control de la segregación cromosómica y la generación de aneuploidías como un marcador indirecto de susceptibilidad genética a cáncer. Este es el primer estudio clínico que detecta la posibilidad que este polimorfismo sea de marcador de riesgo para un posible incremento en la susceptibilidad a cáncer de ovario.

En éste mismo sentido se realizó el análisis del polimorfismo C8092A de ERCC1. Como sabemos, el efecto citotóxico del cisplatino se ha atribuido a la formación de aductos y la resistencia parece asociarse a la remoción de esos aductos por la vía NER. ERCC1 juega un papel preponderante en la vía NER y un incremento en su nivel de expresión es probable que cause un fenotipo resistente a cisplatino. Niveles tumorales elevados de su RNAm se han asociado con resistencia clínica a quimioterapia basada en cisplatino en cánceres de ovario, gástrico, cervicouterino, colon y pulmón.^{38, 39}

El polimorfismo C8092A de ERCC1 fue descrito por Chen en la región no codificante 3' del gen ERCC1, luego, Van Duin encontró que se encontraba en relación estrecha con el gen ASE1/CAST (gen que codifica proteínas involucrada en la mitosis y activación de receptores de linfocitos T) superpuestos en sus extremos 3'. El polimorfismo no afecta la región codificante

de ERCC1, pero origina un cambio en el aminoácido 504 de lisina a glutamina en el gen ASE1/CAST sin aparentes consecuencias funcionales.^{40, 41}

Aunque se postula que la variante polimórfica del gen de ERCC1 implica menor eficacia de la vía NER e incremento en la respuesta a cisplatino, existen realmente pocos estudios que evalúen el papel del polimorfismo C8092A de ERCC1 en la respuesta a la terapia con cisplatino y nuestro estudio se suma a un estudio retrospectivo realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología que encontró proclividad del alelo silvestre (alelo C) para un incremento en el riesgo de mortalidad y de resistencia al tratamiento con cisplatino.⁴²

La capacidad de reparación del DNA se ha asociado a susceptibilidad a cáncer, individuos con 65-80% de la capacidad promedio se encuentran más frecuentemente en cohortes con cáncer que cohortes controles y la disminución de la capacidad de reparación constituye un factor de riesgo para cáncer con OR de 1.6-10.0 en varios estudios.⁵³

Los estudios clínicos previos de asociación de este polimorfismo con susceptibilidad a cáncer son contradictorios, al realizar nuestro análisis existe un incremento de la variante polimórfica en pacientes con cáncer de ovario al compararlos con individuos sanos e incluso, el genotipo homócigo silvestre resultó casi el doble de la frecuencia de homócigos polimórficos.

Las características generales de la cohorte analizada se encuentran de acuerdo a lo informado en la literatura, destaca: la mediana de edad fué de 53 años, el 40% eran mayores de 60 años, las etapas clínicas III se presentaron en 70% de los casos y el 93% de las histologías fue seroso papilar con mayoría de tumores poco diferenciados. Llama la atención que más del 80% de las pacientes fueron sometidas de manera inicial a laparotomía diagnóstica, hallazgo que apoya la necesidad de determinar de manera más eficiente que pacientes son candidatas de inicio para realizar citorreducción quirúrgica primaria y cuáles se benefician realmente de recibir quimioterapia de inducción en primera instancia. Detectamos valores basales de CA 125 muy variables (rango de 22-27441) con valores mayores de 1000UI en los pacientes considerados

polimórficos (G558A Mad1 de 85% y C8092A ERCC1 de 62%), sin embargo, esta tendencia no fue estadísticamente significativa, aunque, apoya el hecho de que la mayoría de las pacientes no hayan obtenido una citorreducción quirúrgica óptima primaria y que previo al tratamiento con quimioterapia de inducción sólo se les realizó laparotomía diagnóstica.

Con respecto al objetivo principal de nuestro estudio de determinar la influencia de los polimorfismos G558A de Mad1 y C8092A de ERCC1 con la respuesta al tratamiento de quimioterapia de inducción, al revisar cada uno de los casos se detectó que los estudios de imagen necesarios para evaluación de respuesta por RECIST no son realizados de manera rutinaria y no fue posible la evaluación por éste método en ninguno de los casos. Sabemos que en la mayoría de los casos de cáncer de ovario no es técnicamente factible demostrar enfermedad medible por estudios de imagen por lo que la realización de determinaciones seriadas del marcador tumoral CA 125 adquiere una relevancia crítica. Actualmente se acepta de manera generalizada que este marcador tumoral es un factor predictivo y pronóstico en cáncer de ovario.

En series grandes con seguimiento a largo plazo que evalúan respuesta a quimioterapia de inducción se han detectado factores pronósticos independientes con respecto a la cinética de CA 125 que incluyen: valores de CA 125 antes del primer curso de inducción, la vida media, el nadir, el tiempo al nadir, un nivel sérico normal de CA 125 antes de la quimioterapia de inducción, disminución del 50% tras el primer ciclo con valor normal previo al segundo ciclo y los niveles de CA 125 antes del tercer ciclo de quimioterapia menores de 35 UI.^{24, 25}

Nuestro estudio evaluó la respuesta de acuerdo a los criterios clásicos establecidos por Rustin y adicionalmente se establecieron asociaciones de los polimorfismos con otras variables que de manera indirecta pueden asociarse al resultado del tratamiento con quimioterapia: negativización de CA 125 tras 3 ciclos de tratamiento, posibilidad de realización de citorreducción quirúrgica de intervalo, sensibilidad o resistencia clínica a cisplatino y recaída o progresión al tratamiento.

La respuesta global al tratamiento sistémico fue de 91.49%, discretamente mayor a la informada en la literatura. Al realizar el análisis de respuesta para cada una de las variantes polimórficas los hallazgos detectados fueron muy interesantes. De acuerdo a lo esperado para el polimorfismo G558A de Mad1 el grupo no polimórfico presentó respuesta en 7/7 casos (100%) y el no polimórfico en 36/40 casos (90%) sin embargo, esta tendencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.348$); esto ocurrió de manera similar al asociar la respuesta para el genotipo: AA de 88%, GA de 91.3% y GG de 100% ($p=0.643$). Contrario a lo esperado para el polimorfismo de ERCC1, nuestro estudio fue incapaz de demostrar una mayor respuesta en pacientes con ésta variante genética. La respuesta para el grupo polimórfico C8092A de ERCC1 fue de 91.3% y de 93.33% para el no polimórfico ($p=0.756$). Para los genotipos de éste polimorfismo encontramos respuestas de 60% para AA, 96.2% para CA y de 93.33% para CC, siendo ésta tendencia de menor respuesta del genotipo homócigo mutante significativa ($p=0.027$).

Otras tendencias similares sin significancia estadística para las variantes polimórficas con respecto a negativización del marcador tumoral, posibilidad de citorreducción óptima y tiempo a la recaída y progresión, apoyan los resultados esperados para pacientes no polimórficos para G558 de Mad1 y corroboran la presencia de menor respuesta al tratamiento en los pacientes polimórficos para C8092A de ERCC1, incluyendo sensibilidad clínica al tratamiento para cisplatino.

La limitante principal de nuestro estudio que puede influenciar los resultados obtenidos es un tamaño de muestra reducido al tratarse de un análisis preliminar de 47 casos de los 100 casos contemplados para un análisis final.

La conclusión de que estos polimorfismos afecten *in vivo* la función del punto de monitoreo y de la vía NER con repercusión clínica requiere tomar en cuenta factores adicionales. Tanto la eficacia como la toxicidad de fármacos es multifactorial, los SNP varían entre diferentes grupos étnicos y los resultados de los estudios clínicos realizados en una población pueden no ser

necesariamente válidos para otros grupos, además, la concordancia entre el genotipo, la expresión genética y la actividad enzimática puede variar considerablemente por lo que la determinación de éstos 3 parámetros puede ofrecer resultados con predicciones más reales del efecto farmacológico, sin embargo, se requiere de herramientas sofisticadas de bioinformática y tecnología de genotipificación. A pesar de todo esto, nuestro estudio nos demuestra que nos estamos acercando a una nueva era de Medicina basada en genética. La construcción de mapas reales y entendibles de SNP y haplotipos del genoma humano facilitará individualizar el manejo de los pacientes de acuerdo a genotipos predictores, pero antes que estos marcador puedan ser aplicados rutinariamente en la práctica clínica deben ser validados en más estudios. Un punto de vista realista es que estamos en las fases iniciales del desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en factores genéticos para mejorar las opciones de tratamiento de los pacientes con cáncer.

9. REFERENCIAS

1. Registro Histopatológico Nacional de Neoplasias Malignas. *Compendio Mortalidad/Morbilidad/ RHNM 2003*.
2. Rizo P, Sierra MI, Vázquez G et al. Registro Hospitalario de Cáncer: Compendio de Cáncer 2000-2004. *Cancerología 2007; 2: 203-87*.
3. Cannistra S. Cancer of the ovary. *N Engl J Med 2004; 351: 2519-29*.
4. NIH consensus conference. Ovarian cancer: screening, treatment, and follow-up. *JAMA 1995; 273*.
5. Rustin G, Bast R, Kelloff J et al. Use of CA 125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research 2004; 10: 3919-26*.
6. Mironov S, Akin O, Pandit-Taskar N, Hann L. Ovarian Cancer. *Radiol Clin N Am 2007; 45: 149-65*.
7. Nelson BE et al. Preoperative abdominopelvic computed tomographic prediction of optimal cytoreduction in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol 1993; 11: 166-72*.
8. Marlon B, Markman M, Eifel P. Ovarian cancer, peritoneal carcinoma, and fallopian tube carcinoma. *Cancer Principles and Practice of Oncology. LWW 7th Edition 2005: 1364-97*.
9. Chi DS, Franklin CC, Levine DA et al. Improved optimal cytoreduction rates for stages III and IV epithelial ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer: a change in surgical approach. *Gynecol Oncol 2004; 94: 650-4*.
10. Hoskins WJ, Bundy BN, Thigpen JT et al. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small volume stage III epithelial ovarian cancer: a GOG study. *Gynecol Oncology 1992; 47: 159*.
11. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK et al. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol 2002; 20: 1248-59*.

12. Suh-Burgmann E, Powell B. Cytoreductive surgery for gynecologic malignancies- new standards of care. *Surg Oncol Clin N Am* 2007; 16: 667-82.
13. Bristow RE, Eisenhauer EL, Santillán A et al. Delaying the primary surgical effort for advanced ovarian cancer. A systematic review of neoadjuvant chemotherapy and interval cytoreduction. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 480-90.
14. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3194-200.
15. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Eng J Med* 2006; 354: 34-43.
16. Hess LM, Benham-Hutchins M, Herzog TJ et al. A meta-analysis of the efficacy of intraperitoneal cisplatin for the front-line treatment of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 561-70.
17. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 573-84.
18. Rowinsky EK. Antimicrotubule agents. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 237.*
19. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(4): 253.
20. Goff BA, Mandel L, Muntz HG et al. Ovarian carcinoma diagnosis: results of a national ovarian cancer survey. *Cancer* 2000; 89: 2068.
21. Omura GA, Brody MF, Homesley HD et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinomas: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1138.
22. Jaffe C. Measures of response: RECIST, WHO and new alternatives. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3245-51.

23. Fayers PM, Rustin G, Wood R et al. The prognostic value of serum CA 125 in patients with advanced ovarian carcinoma: an analysis of 573 patients by the Medical Research Council Working Party on gynaecological cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1993; 3: 285.
24. Riedinger J, Wafflart J et al. CA 125 half life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study. *Annals of Oncology* 2006; 17: 1234-8.
25. Riedinger J, Bonnetain F et al. Change in CA 125 levels after the first cycle of induction chemotherapy is an independent predictor of epithelial ovarian cancer outcome. *Annals of Oncology* 2007; 18: 881-5.
26. Duesberg P, Rasnick D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motility and the cytoskeleton* 2000; 47: 81-107.
27. Kaern J, Trope CG, Kristensen JB et al. Evaluation of DNA ploidy and S-phase fraction as prognostic parameters in advanced ovarian epithelial carcinoma: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 479.
28. Matel D, Graeber TG, Baldwin RL et al: Gene expression in epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 2002; 21: 6289.
29. Legge F, Fernandina G et al. Biological characterization of ovarian cancer: prognostic and therapeutic implications. *Annals of Oncology* 2005; 16 (suppl 4): 95-101.
30. Darcy K, Tian Ch, Reed E. A Gynecologic Oncology Group Study of platinum-DNA adducts and Excision Repair Cross-Complementation Group 1 expression in optimal, stage III epithelial ovarian cancer treated with platinum-taxane chemotherapy. *Cancer Research* 2007; 67, 4474-81.
31. Leibel D. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Hist* 2006; 37: 225-38.
28. Reed E. Nucleotide excision repair and anti-cancer chemotherapy. *Cytotechnology* 1998; 27: 187-201.
32. Sharova NP. How does a cell repair damaged DNA?. *Biochemistry* 2005; 70: 341-59.

33. Wood RD. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 23465-8.
34. Moggs JG. Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(3): 480-91.
35. Hara R. DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20: 9173-81.
36. Olausson KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 983-91.
37. Yu JJ, Mu C, Lee KB et al. A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues. *Mutat Res* 1997; 382: 13-20.
38. Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G et al. Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4939-43.
39. Suk R, Gurubhagavatula S, Park S et al. Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1534-8.
40. Chen P, Wiencke J, Aldape K et al. Association of an ERCC1 Polymorphism with Adult-Onset Glioma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 843-7.
41. Sturgis E, Dahlstrom K, Spitz M et al. DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 1084-8.
42. Hernández C, Castro C, Herrera L et al. *El papel de XPA, ERCC1 y mtTFA en la supervivencia de pacientes con tumores germinales de testículo tratados con cisplatino.*
43. Musachio A, Salmon E. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8: 379-93.
44. Bharadwaj R, Yu H et al. The spindle checkpoint, aneuploidy and cancer. *Oncogene* 2004; 23: 2016-27.

45. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(10): 773-85.
46. Iwaganaga Y, Kasai T, Kibler K, Jeang KT. Characterization of regions in hsMAD1 needed for binding HsMAD2. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 31005-13.
47. Santibañez M, Castro C, Herrera L et al. Estudio del polimorfismo G558A del gen MAD1 en la población mexicana y su relación con la generación de aneuploidías.
48. Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacology and Therapeutics* 2005; 107: 155-76.
49. Cortazar P, Johnson B et al. Review of the efficacy of individualized chemotherapy selected by in vitro drug sensitivity testing for patients with cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1625-31.
50. Evans W, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286: 487-91.
51. Marsh S, McLeod HL. Cancer pharmacogenetics. *Br J Cancer* 2004; 90: 8-11.
52. Marsh S, Kwok P, McLeod HL. SNP databases and pharmacogenetics: great start, but a long way to go. *Human Mutat* 2002; 20: 174-9.
53. Ulrich CM, Robien K, McLeod HL. Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 912-20.
54. Middleton MR, Margison GP. Improvement of chemotherapy efficacy by inactivation of a DNA-repair pathway. *Lancet Oncol* 2003; 4: 37-44.