



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

**“ERCC1, RRM1 Y HENT1 COMO BIOMARCADORES  
PREDICTIVOS DE RESPUESTA EN PACIENTES CON  
MESOTELIOMA PLEURAL MALIGNO AVANZADO, TRATADOS  
CON QUIMIOTERAPIA A BASE DE GEMCITABINA”**

**TÉSIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO  
DE ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA:**

AUTOR: DENISSE EUGENIA LEE CERVANTES

TUTOR: OSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ

**Médica  
Sur.**

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL

AGOSTO 2015.



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.

*Contraportada*

## AUTORIZACIÓN

TÉISIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA  
MÉDICA PRESENTA AUTOR: DENISSE EUGENIA LEE CERVANTES

DR. ALBERTO LIFSHITZ GUINZBERG  
JEFA DE ENSEÑANZA  
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

DR. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ  
TUTOR DE TESIS  
ONCOLOGÍA MÉDICA  
CENTRO ONCOLÓGICO INTEGRAL “ DIANA LAURA RIOJAS DE COLOSIO”  
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

DR. DANIEL MOTOLA KUBA  
PROFESOR TITULAR DE ONCOLOGÍA MÉDICA  
CENTRO ONCOLÓGICO INTEGRAL “ DIANA LAURA RIOJAS DE COLOSIO”  
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

## AGRADECIMIENTOS

Durante la realización este trabajo es importante mencionar aquellas personas que de una u otra forma se vieron involucradas y me permitieron poder llevar a cabo esta investigación.

Primero quisiera agradecer al Dr. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez por todas esas horas que con tanta paciencia me asesoró, las brillantes ideas que me brindó para la realización de este trabajo, el tiempo que dedicó a responder las incesantes sesiones de preguntas y corrección de errores, brindando siempre el consejo acertado con su amplia experiencia, cumpliendo cabalmente el concepto de maestro.

Otra persona que más que un profesor titular, ha sido una guía y un ejemplo a seguir es el Dr. Daniel Motola Kuba a quién sin duda alguna estaré siempre en deuda, ya que gracias a sus enseñanzas y orientación pude adquirir los conocimientos necesarios para mi formación como residente de Oncología.

Por último aunque no por ello con menor importancia, quisiera agradecer a mis compañeros residentes de Oncología: Ileana MacKinney Novelo, Santiago Cano Cancela, Orlando García Acevedo, José Manuel Ruíz Morales y Maricela García Gacrés por su amistad, su ayuda, consejos y apoyo durante la residencia de Oncología Médica.

## DEDICATORIA

La realización de éste estudio de investigación, así como el obtener un grado de especialización se lo dedico a las personas que son lo más importante en mi vida y mi fuente de inspiración: mi hijo, mi novio y mis padres, sin ellos no podría haber llegado hasta aquí ni ser quien soy, les estaré siempre agradecida. A mis amigos: Toño, Lizbeth, Emilia y Yamilet, gracias por su apoyo.

## TABLA DE CONTENIDOS

### INTRODUCCIÓN

#### I. MARCO TEÓRICO

- a. Mesotelioma Pleural Maligno
- b. Tratamiento del Mesotelioma Pleural Maligno
- c. Gemcitabina
- d. ERCC1 y RRM1, su asociación pronóstica y de respuesta a tratamiento con cisplatino
- e. Transportador de nucleosidos equilibrador humano 1 (hENT1) y su papel como posible biomarcador

#### II. JUSTIFICACIÓN

#### III. HIPÓTESIS

- a. Hipótesis alterna
- b. Hipótesis nula

#### IV. OBJETIVOS

- a. Primario
- b. Secundarios

#### V. DISEÑO METODOLÓGICO

- a. Universo y muestra
- b. Criterios de inclusión y exclusión
- c. Tipo de estudio
- d. Variables
- e. Material y métodos

#### VI. RESULTADOS

#### VII. DISCUSIÓN

#### VIII. CONCLUSIONES

#### IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## INTRODUCCIÓN

El mesotelioma maligno es un tumor agresivo de la superficie serosa, de la pleura, pericardio y peritoneo. Hace tiempo era una entidad rara pero su incidencia se está incrementando a lo largo del mundo, probablemente como consecuencia de la exposición a asbestos, el principal factor con el que está asociado.

Existe un interés sustancial en esta enfermedad por parte de la comunidad médica y el público en general, debido a que millones de personas han sido expuestas de manera inadvertida a fibras de asbesto.

Además del sustancial costo personal y médico, el mesotelioma representa un serio problema tanto para el sistema de salud como para el gobierno, ya que genera gastos elevados. Los tratamientos actuales contra el mesotelioma pleural maligno tienen un alto costo y desafortunadamente la población que desarrolla esta neoplasia corresponde a la clase media-baja, siendo esta condición una limitante para la accesibilidad a las terapias. Se calcula que el costo por tratamiento de esta neoplasia es de más de 300 mil pesos, y debido a que no existe cura, es un tratamiento con fines paliativos.

La investigación en el tratamiento de mesotelioma avanzado es difícil, debido al pobre pronóstico del mismo, por lo cual hasta el momento no existe un tratamiento estándar.

Los mejores resultados en pacientes con mesotelioma pleural maligno se han reportado con la terapia multimodal, incluyendo la resección completa macroscópica con pneumonectomía extrapleural o la pleurectomía extensa con decorticación.

Dentro del manejo multimodal, está considerado el uso de quimioterapia de inducción con platinos en combinación con gemcitabina o pemetrexed, seguido de cirugía y radioterapia. Sin embargo, la supervivencia con este tratamiento es muy variable, en algunos pacientes logrando supervivencia meses o años superior a la mediana y en otros sin lograr obtener ningún beneficio.

Esto implica que existen factores pronósticos adicionales que afectan los desenlaces de supervivencia, los cuales es necesario conocer para poder tomar decisiones en cuanto al tratamiento más apropiado.

Los marcadores moleculares se han utilizado de manera exitosa para estratificar poblaciones de pacientes de acuerdo al riesgo y para predecir la respuesta a la terapia en diversos tipos de cáncer; aunque en el mesotelioma se han propuesto algunos biomarcadores su utilidad clínica ha sido limitada.

hENT1, RRM1 y ERCC1 han sido estudiados a partir de neoplasias pancreáticas, biliares y en cáncer de pulmón de células no pequeñas, demostrando una correlación en cuanto al grado de expresión y la respuesta a quimioterapia con gemcitabina.

Se han propuesto como biomarcadores útiles en la predicción de respuesta a la terapia con análogos de nucleósidos, sin embargo hasta ahora su perfil de expresión y su valor pronóstico en mesotelioma es desconocido.

# I. MARCO TEÓRICO

## MESOTELIOMA PLEURAL MALIGNO

Es una neoplasia rara y altamente agresiva, que se origina a partir de las células de la superficie serosa de la pleura, peritoneo y pericardio.

En Estados Unidos de América (EUA) la incidencia de mesotelioma plural maligno es de aproximadamente 3300 casos por año<sup>1</sup>. En otros países, como Gran Bretaña, la incidencia de mesotelioma se piensa que llegará a un pico máximo estimado entre el año 2014 al 2020<sup>2</sup>.

En México ocupa el lugar 34 en frecuencia entre las neoplasias malignas, con predominio en hombres hasta en 80%<sup>3</sup>. La tasa de crecimiento del mesotelioma ha aumentado desde 1979 de 23 casos a 153 por año. Aun así, la realidad actual es distinta, ya que cabe señalar que existe un subregistro del 70%, donde se puede inferir que el promedio anual es hasta de 500 casos, además de que a la fecha no ha sido reconocida como una enfermedad ocupacional.

De acuerdo a estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 43, 000 personas alrededor del mundo mueren cada año a causa del mesotelioma<sup>4</sup>.

Una alta proporción de pacientes con esta neoplasia se encuentra en países en vías de desarrollo; debido principalmente a que los pacientes con exposición a asbesto son en su mayoría de un nivel socio económico bajo<sup>5</sup>.

México es uno de los principales países importadores de asbestos, y existen múltiples compañías manufactureras; el asbesto es utilizado por la industria de la construcción, textil y cementera; entre otras. De aquí que la población que desarrolla mesotelioma, pertenezca a la clase obrera, quienes se encuentran continuamente expuestos a los diferentes componentes de este mineral. De acuerdo con los datos de la OMS, se calcula que en los próximos años la incidencia continuará aumentando dramáticamente.

Se ha establecido al asbesto como el principal factor etiológico del mesotelioma maligno, observando que aquellos pacientes con mesotelioma, han tenido exposición en algún momento de su vida hasta en un 17-90%. La principal asociación del asbesto con el mesotelioma se estableció en 1960, a partir de la exposición ocupacional en mineros en Sud-África<sup>6</sup>.

Existen 2 tipos principales de fibras de asbestos: los anfíboles que son fibras largas y delgadas; los crisotilos que son fibras en forma de pluma. De todos los distintos tipos de asbestos, los anfíboles son los mejor estudiados con potencial carcinógeno.



Las células mesoteliales normales en condiciones fisiológicas facilitan el movimiento libre de las superficies pleurales durante la respiración, al producir glicoproteínas lubricantes. Estas células, proliferan rápidamente como respuesta al daño y a la producción de factores de crecimiento.

Entre los mecanismos fisiopatológicos para el desarrollo del mesotelioma, se ha propuesto que una vez inhaladas las fibras de asbesto, estas alcanzan los alveolos y salen hacia la superficie pulmonar produciendo daño, irritación y fricción de manera repetitiva, lo que a su vez va a generar inflamación y reparación, con formación de cicatrices<sup>7</sup>.

Existe una producción aumentada de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) a partir de las células mesoteliales y macrófagos expuestos. La activación de la vía de NF $\kappa$ B va a generar que las células mesoteliales puedan sobrevivir al insulto tóxico generado por el asbesto, lo que les permite a estas células genéticamente dañadas proliferar hasta convertirse en mesotelioma.

Otro mecanismo por el cual el asbesto produce cáncer es debido a que las fibras pueden segmentar o perforar el huso mitótico, causando disrupción de la mitosis, resultando en aneuploidia y otras formas de daño cromosómico<sup>8</sup>.

El asbesto también se ha visto que induce la generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales causan daño al Acido Desoxirribonucleico (DNA). Los asbestos también van a inducir la fosforilación de MAPK y ERK 1 y 2, lo cual va a aumentar la expresión de proto-oncogenes que codifican miembros de la familia activadora de proteínas-1 (AP)-1, favoreciendo la división celular y el crecimiento de las células malignas.

Otro cofactor implicado en el desarrollo del mesotelioma es el virus simiano 40 (SV40), el cual es un virus DNA que se encarga de bloquear genes supresores de tumor, siendo así un potencial virus oncogénico en humanos. La infección con este virus probablemente se ocasionó de manera accidental a través de vacunas contaminadas para la poliomielitis hace 30 o 40 años.

Una vez que este virus se encuentra dentro del huésped, el SV40 produce 2 proteínas asociadas con la oncogénesis: el antígeno largo (Tag) y corto (tag) tumorales.

Tag va a inducir la expresión de IGF, va a inhibir p53 y RB; induciendo también c-met lo que ocasiona proliferación celular. tag estimula la actividad de MAPK y AP-1, también contribuye a la inhibición de p53 y RB; en conjunto van a inducir Notch-1 y la actividad de las telomerasas las cuales son requeridas para la transformación maligna. Aun no está establecido si el SV 40 actúa como un cofactor con el asbesto o es un carcinógeno independiente capaz de producir mesotelioma<sup>9</sup>.

Otros factores de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia son la exposición previa a radiación en el tórax y abdomen, exposición a thorostrast, exposición a nanopartículas de carbón, etc<sup>10</sup>.

Existen estudios en modelos animales en los cuales se estableció el papel de la radiación como un factor causal, aunque la cantidad de mesoteliomas originados por esta causa es mínima.

Se ha observado que el cariotipo del mesotelioma es complejo, con extensa aneuploidia y rearrreglos estructurales en distintos genes. La pérdida del cromosoma 22 es uno de los cambios que ocurren con mayor frecuencia, pero también van a ocurrir rearrreglos estructurales de 1p, 3p, 9p y 6q<sup>11</sup>.

El crecimiento del mesotelioma es estimulado por mecanismos autocrinos, las células mesoteliales muestran crecimiento indiscriminado, debido a la producción de factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas A y B, factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformador B<sup>12</sup>.

El 90% de los mesoteliomas expresan telomerasa, que les permite a las células evitar el acortamiento de los telómeros y continuar con la división celular<sup>13</sup>. La actividad antiapoptótica de la molécula BCL-XL se encuentra elevada en el mesotelioma. También va a existir producción de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que incrementan la vascularidad del tumor.

El mesotelioma induce respuestas en el huésped, generando inflamación crónica manifestada por la presencia de citocinas y células inflamatorias, tanto por las fibras de asbesto como por las células neoplásicas<sup>14</sup>. El huésped generalmente monta una débil respuesta inmune antitumoral que no logra ser suficiente para eliminarlo.

El mesotelioma es una enfermedad caracterizada por un periodo de latencia prolongado, se han reportado periodos de latencia de entre 30 y 40 años posteriores a la exposición<sup>15</sup>.

Se sabe que el tiempo de exposición es un factor determinante en el desarrollo de esta neoplasia, independientemente de la dosis de exposición. Existen reportes que indican que sólo el 10% o menos de la población expuesta a dosis altas durante un periodo de tiempo corto podría desarrollar mesotelioma<sup>16,17,18</sup>.

Generalmente se presenta en personas de 50 a 70 años, esto debido al prolongado periodo de latencia que presenta<sup>19</sup>. La relación hombre a mujer es 5:3<sup>20</sup>.

El tiempo de supervivencia desde el momento del diagnóstico es de 4 a 13 meses en pacientes sin tratamiento, y de 6 a 18 meses con tratamiento.

Se ha observado un peor pronóstico en hombres, en pacientes con mal estado funcional por Karnofsky o ECOG, leucocitosis y anemia<sup>21</sup>.

La mayoría de los pacientes muere por complicaciones de la enfermedad local, con compromiso respiratorio progresivo, neumonía, disfunción miocárdica con presencia de arritmias e involucro pericárdico, disfagia por compresión tumoral, obstrucción de órganos adyacentes, generando síndrome de vena cava,

tamponade cardiaco, extensión subcutánea y compresión de la médula espinal<sup>22</sup>.

Las metástasis extratorácicas ocurren de manera tardía conforme la enfermedad progresa, siendo los órganos más frecuentes el hígado, glándulas suprarrenales, riñón y el pulmón contralateral. Las metastasis intracraneales se presentan en sólo el 3% de los pacientes, sobre todo en el subtipo sarcomatoide<sup>23</sup>.

La forma más común de presentación es con derrame pleural en 95% y disnea 50 a 70%, generalmente acompañados de dolor de la pared torácica en más del 60% de los casos<sup>23</sup>.

El lado derecho se afecta con mucho mayor frecuencia que el lado izquierdo, 60 vs 40%. El pulmón contralateral puede estar afectado de manera sincrónica, hasta en 10 a 20% de los casos.

La pérdida de peso y fatiga es más común que aparezcan posteriormente durante la progresión, solo el 30% se presentan con estos síntomas al momento del diagnóstico. Entre 5 y 25% de los pacientes se encuentran con enfermedad metastásica al momento del diagnóstico<sup>23</sup>.

El diagnóstico en la mayoría de las veces se hace de manera incidental mediante una radiografía de tórax, tomada por alguna otra causa.

Generalmente el diagnóstico citológico se hace hasta 2 o 3 meses posterior al inicio de los síntomas.

Conforme el mesotelioma progresa, la pared torácica afectada se vuelve fija, con incapacidad para expandirse, lo cual puede generar complicaciones como la neumonía.

En ocasiones puede haber una masa subcutánea en el sitio afectado, la cual generalmente está asociada con el sitio de punción o drenaje, causada por siembra tumoral directa<sup>24</sup>.

Durante el curso de la enfermedad los pacientes pueden desarrollar el "síndrome de cáncer", caracterizado por pérdida de peso, fatiga, caquexia, fiebre, diaforesis, trombocitosis, hipoalbuminemia, velocidad de sedimentación globular elevada y anemia. Dicho síndrome ocurre como consecuencia de aumento en los niveles de interleucina-6 (IL-6) circulante<sup>24</sup>.

El mesotelioma se origina principalmente en la superficie parietal y no en la superficie visceral del mesotelio pleural.

Histológicamente, el mesotelioma puede presentar una morfología epitelioide en el 50-60% de los casos y se asocia con buen pronóstico; fibroso o sarcomatoide en el 15%, el cual es extremadamente agresivo y con peor pronóstico, se caracteriza por la formación de grandes masas tumorales, con ausencia o mínimo derrame pleural y una mayor frecuencia de metástasis hematógenas; el resto es la combinación de ambos patrones.

Se han visto diferencias importantes en cuanto al comportamiento biológico de cada uno de los subtipos, como en el caso del tipo sarcomatoide que es altamente resistente a la quimioterapia y tiene supervivencia media menor a un año.

Por otro lado, la variedad epitelioide, particularmente los bien diferenciados, se asocian a supervivencia prolongada de hasta 2 años a partir del momento del diagnóstico.

El diagnóstico patológico del mesotelioma se hace a partir del líquido pleural en 33 a 84% de los casos.

La aspiración por aguja fina se puede realizar para obtener el diagnóstico, sobre todo en aquellos casos en que no existe derrame.

Los marcadores de inmunohistoquímica encontrados en mesotelioma son calretinina, el antígeno del tumor de Wilms 1 (WT1), el antígeno de membrana epitelial (EMA), citoqueratina 5/6 y mesotelina en el 85%<sup>25</sup>.

En la radiografía de tórax convencional se puede observar derrame pleural y en ocasiones una masa dependiente de la pleura.

En aquellos pacientes con enfermedad más avanzada, se puede observar un anillo tumoral o masas tumores lobuladas, extensas, dependientes de la pleura.

Por tomografía los hallazgos más comunes son: en el 92% masas dependientes de pleura y en el 74% de los casos derrame pleural, con o sin engrosamiento de los septos interlobulares, hasta en 86% de los casos.

La invasión a la pared del tórax se ve únicamente en 18% y generalmente ocurre después de una intervención.

Las principales escalas pronósticas utilizadas en mesotelioma son la del grupo de cáncer y Leucemia B (CALGB) y la de la organización europea para la investigación y tratamiento del cáncer (EORTC), las cuales utilizan una combinación de factores biológicos y clínicos.

El pobre estado funcional, histología no epitelioide, sexo masculino, hemoglobina baja, trombocitosis, leucocitosis y niveles elevados de lactato deshidrogenada se encontraron como los principales indicadores de mal pronóstico<sup>25</sup>.

## **TRATAMIENTO DEL MESOTELIOMA PLEURAL MALIGNO**

No existe un estándar de tratamiento para el manejo del mesotelioma, la resección quirúrgica es posible en la minoría de los pacientes y menos del 15% viven más de 5 años.

En aquellos pacientes en que no se puede realizar una resección curativa, la supervivencia con mejores cuidados de soporte es de 6 meses<sup>26</sup>.

Una serie de fármacos han sido utilizados en estudios fase 2 como monodroga, incluyendo cisplatino, doxorubicina y gemcitabina, sin embargo, debido a la falta de evidencia, no se recomienda su uso como monoterapia, ya que sólo han alcanzado supervivencia de 6 a 8 meses.

En un meta análisis publicado en el año 2002 el cisplatino demostró ser el medicamento con mayor actividad en pacientes con mesotelioma<sup>27</sup>; sin embargo, el carboplatino también ha demostrado buenas respuestas<sup>28</sup>, por lo que los platinos se consideran parte importante en el tratamiento.

Se ha estudiado el beneficio de la terapia de combinación, platinos con nuevos medicamentos, como pemetrexed<sup>29</sup>, raltitrexed<sup>30</sup>, gemcitabina<sup>31</sup> y doxorubicina liposomal pegilada<sup>32</sup>.

En el estudio fase 3 de Vogelzang et al., se demostró la utilidad de la quimioterapia de combinación cisplatino con pemetrexed vs cisplatino<sup>33</sup>. Los resultados de este estudio mostraron un aumento significativo de la supervivencia media de 12.1 meses con la combinación vs 9.3 meses con cisplatino,  $p=0.20$ , mediana del tiempo hacia la progresión de 5.7 meses vs 3.9 meses,  $p=0.001$  y tasas de respuesta de 41.3% vs 16.7%  $p<.0001$ .

En aquellos pacientes en los que existe contraindicación para tratamiento con cisplatino, se puede utilizar carboplatino en combinación con pemetrexed, con tasa de respuesta de 25% y supervivencia de 14 meses<sup>34</sup>.

A partir de estos estudios se recomienda el uso de pemetrexed en combinación con platino como primera línea. Cabe mencionar que su costo es elevado, alrededor de \$30 000 por ciclo.

Como alternativa se puede utilizar cisplatino en combinación con gemcitabina. Existen estudios fase II de gemcitabina en primera línea como monodroga en pacientes con mesotelioma pleural maligno, demostraron cierto beneficio con respuestas del 0-7% y supervivencia global media de 4.7 a 8 meses<sup>35</sup>.

Basado en estos resultados se han realizado estudios de combinación gemcitabina con un platino.

Tres estudios fase II han mostrado que la combinación cisplatino con gemcitabina tienen una respuesta de 12 a 33% con una supervivencia global de 10 a 13 meses<sup>36-38</sup>.

La combinación de gemcitabina y carboplatino ha mostrado respuestas del 26% con supervivencia global de 16 meses<sup>39</sup>.

La combinación de gemcitabina y oxaliplatino también ha mostrado respuestas del 40% y una supervivencia global de 12 meses<sup>40</sup>.

## a. Gemcitabina

La gemcitabina (2',2'-difluorodeoxicitidina), forma parte del grupo de los antimetabolitos, análogos de pirimidina. Tiene actividad en una serie de tumores sólidos como páncreas, pulmón, mama y vejiga<sup>41</sup>.

La gemcitabina se administra vía intravenosa y a nivel sanguíneo es metabolizada de forma extensa a su catabolito metabólico (difluorodeoxiuridina), 90% del cual es excretado por vía urinaria. La vida media de la gemcitabina es de 3.6 a 19 horas<sup>42</sup>.

La gemcitabina es un medicamento habitualmente bien tolerado cuya toxicidad limitante de dosis es la hematológica, principalmente neutropenia y trombocitopenia. Otras toxicidades menos frecuentes son fiebre, fatiga, cefalea, artralgias, mialgias, disnea y síndrome urémico-hemolítico <sup>43</sup>.

Es un medicamento que requiere activación intracelular para ejercer su actividad citotóxica.

La enzima deoxicitidina cinasa es responsable de la activación metabólica de la gemcitabina, mediante la fosforilación la convierte en gemcitabina monofosfato, y posteriormente gracias a otras cinasas de nucleótidos, es fosforilada hasta convertirse en metabólicos activos como la gemcitabina trifosfato, la cual se incorpora al ADN inhibiendo su función.

La gemcitabina difosfato va a inhibir la ribonucleotido reductasas y a su vez la síntesis de DNA de novo. También inhibe la función de la DNA polimerasa alterando la síntesis y reparación del ADN.

Debido a que los blancos farmacológicos de los análogos de nucleósidos son intracelulares, el primer paso obligado para lograr la citotoxicidad es la entrada de los análogos a través de la membrana plasmática.

Sin embargo, ya que la gemcitabina y los nucleósidos fisiológicos son hidrofílicos, su difusión a través de la membrana de doble capa lipídica es lenta.

Para que exista una captación celular eficiente, se requiere de la presencia de proteínas transportadoras de nucleósidos en la membrana.

Se han identificado 2 procesos generales de transporte de nucleósidos: los facilitadores bidireccionales equilibrativos y los simportadores concentrativos de sodio/nucleósidos.

Las proteínas equilibrativas de transporte de nucleósidos (ENT) difieren en su capacidad de inhibición; ENT1 humana (hENT1) es sensible a concentraciones nanomolares de ribonucleosido nitrobenzilmercaptapurina, mientras que hENT2 no se inhibe por esa enzima.

Las proteínas ENT están presentes en la mayoría de los tipos celulares. Se han identificado 3 proteínas dependientes de sodio, concentrativas transportadoras de nucleósidos (CNT).

CNT1 humana (hCNT1) transporta nucleósidos de pirimidina de manera más ávida, mientras que hCNT2 transporta nucleósidos de purina y uridina.

Diversos estudios cinéticos han demostrado que la captación intracelular de gemcitabina es mediada por hENT1, hENT2, hCNT1 y hCNT3; siendo de todas estas la vía principal hENT1.

La subunidad M1 de la ribonucleotido reductasa (RRM1) es un componente del complejo ribonucleotido reductasa, localizado en el cromosoma humano 11p15.5, el cual muestra pérdida de la heterocigocidad en pacientes con cáncer.

Los niveles de expresión RRM1 se han asociado como marcadores de la capacidad de reparación del DNA en células tumorales y sensibilidad a platino<sup>44</sup>.

El grupo 1 de complementación cruzada de reparación por excisión (ERCC1) juega un papel importante en varias vías de reparación del DNA, especialmente en la reparación por excisión de nucleótidos.

hENT1 y RRM1 se han propuesto como marcadores productivos de sensibilidad a quimioterapia en pacientes con cáncer de páncreas y cáncer de pulmón<sup>45</sup>.

## **b.ERCC1 y RRM1, su asociación pronóstica y de respuesta a tratamiento con cisplatino**

La inducción de daño al DNA es el principal mecanismo de acción antineoplásica de los compuestos de platino.

La investigación de los mecanismos 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 entre la formación de aductos y su reparación.

La vía NER (Reparación por Escisión de Nucleótidos) es la vía de reparación del daño al DNA causado por compuestos de platino. El proceso de reparación por esta vía consiste en:

- a) Reconocimiento del daño 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.
- e) Complementación del DNA que sintetiza al oligonucleótido usando la cadena complementaria como un molde, involucrando la polimerasa delta y/o polimerasa épsilon.

ERCC1 (Excision Repair Cross Complementation group-1) es una exonucleasa 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 19q13.2-13.3, su región codificante comprende 10 exones y tiene 1.1 Kb de longitud <sup>46,47</sup>.

Estudios en una variedad de neoplasias, han demostrado que la expresión de ERCC1 correlaciona directamente con la resistencia a tratamiento con cisplatino y que su expresión tisular incrementada se asocia a resultados mixtos en cuanto a respuesta y supervivencia.

Un estudio que incluyó 783 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, que recibieron adyuvancia basada en cisplatino, mostró que aquellos pacientes con tumores ERCC1-negativos tenían mayor supervivencia libre de enfermedad y global comparados con los ERCC1-positivos <sup>48</sup>.

RRM1 es la subunidad catalítica larga de la ribonucleotido reductasa (RR), la principal enzima para la síntesis de novo de la mayoría de los deoxiribonucleotidos, los cuales son los sustratos directos de la DNA polimerasa.

Se conoce que RRM1 es el blanco molecular de la gemcitabina <sup>48</sup>.

Estudios sugieren que pacientes que muestran baja expresión de RRM1 intratumoral tienen mejor supervivencia cuando son tratados con terapia basada en gemcitabina.

En estudios realizados con líneas tumorales se ha observado que la exposición continua de concentraciones crecientes de gemcitabina genera un incremento en el nivel de expresión de RRM1.

En un estudio realizado con pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas se sugirió que la expresión de RRM1 puede funcionar como un predictor de la respuesta con un esquema de quimioterapia con gemcitabina/platino <sup>49</sup>.

En un estudio realizado recientemente, en un grupo de pacientes con diagnóstico de mesotelioma pleural maligno, sometidos a quimioterapia de inducción seguida de neumonectomía extrapleural, se evaluó la expresión de ERCC1 y RRM1 en tejido; se encontró que pacientes con una alta expresión



nuclear de RRM1 ó baja expresión del ERCC1, mostraron de manera independiente un mayor periodo libre de recurrencia <sup>50</sup>.

A la fecha el papel como biomarcador de ambas moléculas sigue en investigación, debido a que no existen datos concluyentes de su participación e importancia en diferentes neoplasias; además de que los datos mostrados en los distintos estudios son contradictorios.

### **c.Transportador de nucleosidos equilibrador humano 1 (hENT1) y su papel como posible biomarcador**

Una molécula con potencial como biomarcador de respuesta a tratamiento con gemcitabina es el transportador de nucleosidos equilibrador humano 1 (hENT1), el cual permite el paso bidireccional al interior de las células de análogos y nucleosidos de pirimidina.

En el estudio de Spratlin et al. con 21 pacientes con cáncer pancreático, se determinó por inmunohistoquímica los niveles de expresión de hENT1; se encontró que aquellos pacientes con tumores que sobreexpresan hENT1 muestran una supervivencia mayor<sup>51</sup>.

En contraste otro estudio realizado en pacientes con cáncer pancreático irresecable, no demostró diferencias significativas en la supervivencia global entre los pacientes tratados con gemcitabina con niveles bajos o altos de RNA mensajero; sin embargo, se encontró que aquellos con niveles altos de expresión de hENT1 presentaron mayor tiempo a la progresión <sup>52</sup>.

Los marcadores moleculares se han utilizado de manera exitosa para estratificar poblaciones de pacientes de acuerdo al riesgo y para predecir la respuesta a la terapia en diversas neoplasias. Actualmente el determinar que moléculas pudieran servir como posibles biomarcadores es un área importante de investigación.

Se ha propuesto a hENT1 como uno de los marcadores predictivos de supervivencia más confiables en pacientes con cáncer de páncreas y vía biliar. hENT1 es la principal vía de entrada de la gemcitabina a las células y su deficiencia se asocia a pobre respuesta y resistencia.

Particularmente en mesotelioma, no se ha establecido el papel que puede tener hENT 1 como biomarcador predictivo de respuesta a tratamiento con quimioterapia a base de gemcitabina, sin embargo se extrapola la información obtenida a partir del cáncer de pulmón de células no pequeñas<sup>53</sup>.

Para probar de manera predictiva la utilidad de hENT1 se requieren estudios prospectivos con correlación molecular en los cuales los pacientes sean aleatorizados a tratamiento con gemcitabina o a terapia con no nucleósidos y comparar los desenlaces clínicos.

## II. JUSTIFICACIÓN

El mesotelioma pleural maligno es una neoplasia poco frecuente, sin embargo representa un reto en cuanto a su tratamiento, ya que a pesar del manejo con quimioterapia y quirúrgico, cuando es posible realizarlo; los pacientes continúan teniendo un pobre pronóstico, con un deterioro importante en su calidad de vida y recurrencia temprana o progresión de la enfermedad.

Si bien el aspecto económico no debería considerarse el factor principal en la elección del tratamiento en pacientes con cáncer, es importante tomarlo en cuenta debido a que más del 90% de los pacientes con diagnóstico de mesotelioma maligno son personas de nivel socioeconómico bajo y no pueden cubrir el costo del tratamiento.

El empleo de quimioterapia a base de cisplatino y gemcitabina reduce el costo de la quimioterapia aproximadamente 8 veces que cuando se utilizan esquemas con pemetrexed.

Además de disminuir el costo del tratamiento, se busca co-relacionar la expresión intratumoral de marcadores como ERCC1, RRRM1 y hENT1, con una respuesta favorable con el tratamiento basado en gemcitabina como ya se ha realizado en otros tumores de origen pulmonar, biliar y pancreático.

Esto permitiría una nueva estrategia en la selección de pacientes y permitiría tomar decisiones más dirigidas en cuanto al tratamiento óptimo con quimioterapia en mesotelioma, orientado en biomarcadores.

## III. HIPÓTESIS

### a. Hipótesis Alterna

En nuestro proyecto de investigación nos planteamos la siguiente hipótesis alterna: la sobreexpresión intratumoral de hENT-1, RRM1 y ERCC1 en muestras de pacientes con diagnóstico de mesotelioma pleural maligno, favorecerá la respuesta al tratamiento basado en gemcitabina, así como la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.

### b. Hipótesis Nula

No existe diferencia en cuanto a la tasa de respuesta ni en la supervivencia global y libre de progresión en pacientes con mesotelioma pleural maligno con sobreexpresión intratumoral de hENT-1, RRM1 y ERCC1, tratados con esquemas basados en gemcitabina, con respecto a los que no los sobreexpresan.

## IV.OBJETIVOS DEL ESTUDIO

### a. Objetivo Primario

Caracterizar el perfil de expresión a nivel genético y proteico de hENT, RRM1 y ERCC1, y evaluar su utilidad como biomarcadores pronósticos de supervivencia global en pacientes con mesotelioma pleural maligno, en estadios avanzados, tratados con quimioterapia con gemcitabina.

### b. Objetivos Secundarios

- Analizar por inmunohistoquímica mediante anticuerpos comerciales, la expresión de hENT, RRM1 y ERCC1, en cortes de biopsias de mesotelioma pleural maligno.
- Análisis de la expresión de los genes de hENT, RRM1 y ERCC1 a partir de RNAm de tejido tumoral, mediante PCR en tiempo real, utilizando sondas específicas para cada uno de los genes.
- Correlación de la expresión de los biomarcadores con las características clínico-patológicas de la población en estudio.
- Se relacionará la expresión de los marcadores hENT, RRM1 y ERCC1 con la tasa de respuesta, bajo los esquemas de tratamiento de los pacientes con mesotelioma pleural maligno
- Análisis de correlación entre la supervivencia libre de progresión con la expresión de los biomarcadores.

## V. DISEÑO METODOLÓGICO

### **a. Universo y Muestra**

Se incluyeron pacientes con diagnóstico histológico inicial de mesotelioma pleural maligno avanzado, en seguimiento o con datos de progresión o recurrencia evaluados en la Clínica de Oncología Torácica del Instituto Nacional de Cancerología, así como aquellos pacientes valorados en el Centro Oncológico Integral “Diana Laura Riojas de Colosio” del Hospital Médica Sur.

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica completa y exploración física, incluyendo la edad, estado socioeconómico, ECOG, bromearía hemática con diferencial y cuenta planetaria, perfil bioquímico, examen de orina y tomografía computada de tórax y abdomen o Tomografía por emisión de positrones (PET/CT). La determinación del estadio se realizó de acuerdo al manual AJCC 6ta ed. La categoría de grupo de riesgo se determinó mediante

la escala de la Organización Europea para la Investigación y tratamiento del cáncer (EORTC).

Los pacientes recibieron manejo con quimioterapia a base de Gemcitabina a dosis: a) 250 mg/m<sup>2</sup> SC en infusión de 6 horas los días 1 y 8 de ciclos de 3 semanas, b) 1250-1500 mg/m<sup>2</sup> SC en infusión de 30 minutos en los días 1, 8 y 15 en ciclos de 4 semanas, combinado con cisplatino a 35 mg/m<sup>2</sup> SC los días 1 y 8 del ciclo, por 6 ciclos; o carboplatino (AUC 5) en caso de contraindicación para el uso de cisplatino (deterioro de la función renal, con una depuración de creatinina menor de 60 mL/min).

La evaluación de la toxicidad se hizo mediante los criterios de toxicidad común del Instituto de cáncer v.4 (CTCAE). Se realizó reducción de la dosis del 20% o se permitió un retraso en la aplicación de quimioterapia cuando existía toxicidad grado 3-4.

Se valoró la respuesta tumoral al tratamiento con quimioterapia en base a los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) modificados para mesotelioma pleural maligno.

Dicha respuesta se valoró cada 2 ciclos de tratamiento, al terminarlo cada 2 meses se realizaron estudios de imagen y laboratorio de seguimiento.

## **b. Criterios de Inclusión y Exclusión**

### Criterios de inclusión

- Pacientes con mesotelioma pleural maligno avanzado, histológicamente confirmado con enfermedad irresecable que no hubieran recibido tratamiento previo o con progresión de la enfermedad posterior a uso de quimioterapia.
- Edad 18 - 75 años.
- Karnofsky mayor o igual a 70, ECOG 0-2
- Adecuado funcionamiento de la médula ósea: leucocitos 3.5 x 10<sup>9</sup>/L; plaquetas 100 x 10<sup>9</sup>/L; hemoglobina 10.0 g/dL.
- Adecuado funcionamiento renal: depuración de creatinina mayor de 40 ml/min.
- Adecuado funcionamiento hepático: bilirrubina menor de 2.0 µmol/L; transaminasas menos del doble de límite superior normal.

### Criterios de Exclusión

- No candidatos o que rehusaron tratamiento con quimioterapia.
- No aceptan inclusión en estudio.
- Datos de síndrome de vena cava superior, dolor óseo severo o metástasis a sistema nervioso central que requiriera manejo urgente con otras modalidades de tratamiento.
- Pacientes sin material histológico disponible

### **c. Tipo de Estudio**

Se realizó un estudio de cohorte retrospectivo.

### **d. Variables**

Se tomaron distintas variables como la edad, sexo, antecedente de tabaquismo, tipo de tabaquismo, índice tabáquico, exposición a asbestos, a humo de leña, histología, estado funcional por Karnofsky al inicio, ECOG al inicio, esquema de quimioterapia en 1ª línea, 2ª línea, 3ª línea y sus tasas de respuesta; inicio de gemcitabina, no. de ciclos, tasa de respuesta, respuesta por RECIST modificado, fecha de diagnóstico, fecha de progresión, fecha de muerte, uso de radioterapia, cirugía, estadio clínico, escala pronóstica por EORTC, determinación de ERCC1, RRM1 por inmunohistoquímica y por PCR, determinación de hENT1 por inmunohistoquímica, supervivencia libre de progresión y supervivencia global.

### **e. Material y Métodos**

Los datos de la muestra se capturaron en una base de datos y posteriormente se analizaron utilizando el software estadístico SPSS v22.0 de IBM.

Las variables continuas se describen como media, mediana y desviación estándar, y se compararon utilizando T de student o U de Mann Whitney.

Las variables categóricas se describen con valores y porcentajes, con intervalo de confianza del 95%, estas variables fueron comparadas por medio de Chi cuadrada ( $X^2$ ) o prueba exacta de Fisher.

La supervivencia libre de progresión se definió como el intervalo de tiempo desde el momento del diagnóstico hasta la confirmación de progresión tumoral basado en el primer signo de aumento de la enfermedad (clínico, radiológico o histológico) y la supervivencia global como el intervalo de tiempo desde el momento del diagnóstico hasta la última fecha de seguimiento o la muerte por cualquier causa.

Los análisis de supervivencia se determinaron usando el método de Kaplan Meier y la influencia de la expresión de ERCC1, RRM1 y hENT1 con la prueba estadística de Long Rank.

Para valorar los factores independientes de supervivencia se utilizó la regresión de Cox

La significancia estadística se consideró a partir de un valor de  $P < 0.05$ , en una prueba de 2 colas.

El tamaño de muestra se calculó en base al número total de pacientes atendidos en consulta en el periodo de estudio y considerando un nivel de confianza de 99% con un intervalo de confianza de 95%.

### Análisis de Biomarcadores por PCR en tiempo real

Se tomaron muestras de tejido tumoral del banco de tumores del departamento de patología del INCan y del Hospital Médica Sur; se utilizaron muestras que fueron utilizadas para el diagnóstico inicial del paciente.

Se obtuvo RNAm a partir de biopsias en parafina para realizar el análisis de expresión de los marcadores ERCC1 y RRM1.

Para la obtención del material genético se utilizó el kit DNA/RNA PFFE (Qiagen).

EL RNA obtenido se cuantificó y analizó su pureza por espectrometría, con un nanodrop 2000 y se guardó a -70°C hasta su uso.

Las determinaciones de expresión se realizaron utilizando los siguientes primers, por PCR tiempo cuantitativa, utilizando el fluorocromo SYBR Green.

Marcador	Secuencia	
ERCC1	5' -GGC AAA ATC CAA CAG CAT CA-3'	Sense
	5' -TAG CGG AGG CTG AGG AAC AG-3'	Antisense
RRM1	5' -TCT GCT GGA GGA ATT GGT GTT-3'	Sense
	5' -ACG CTT GTT CCC ACC TTG AT-3'	Antisense

### Análisis de Biomarcadores en muestras de tejido tumoral

Evaluación de la expresión de ERCC1, RRM1 y hENT1, en tejido tumoral(Figura 1).

La expresión de los marcadores se realizó por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos comerciales, ERCC1(genetex, GTX22356), RRM1 (genetex, GTX100758) y hENT1 ( santa cruz, sc48489), en cortes de tejido tumoral embebido en parafina.

Brevemente, los cortes de tejido de 4µm de grosor, se desparafinaron en horno seco a 60°C, y se re-hidrataron secuencialmente en xilol-etanol. Seguidamente, se realizó una liberación de antígenos con un buffer de citratos, se lavó y se

colocó el anticuerpo primario por 2hr, se lavó y se incubó 1hr con el anticuerpo secundario.

Después del tiempo de la incubación se reveló con el kit de DAB (Dako), hasta tener desarrollo de color. Las muestras se colocaron en medio de montaje, para su análisis al microscopio óptico.

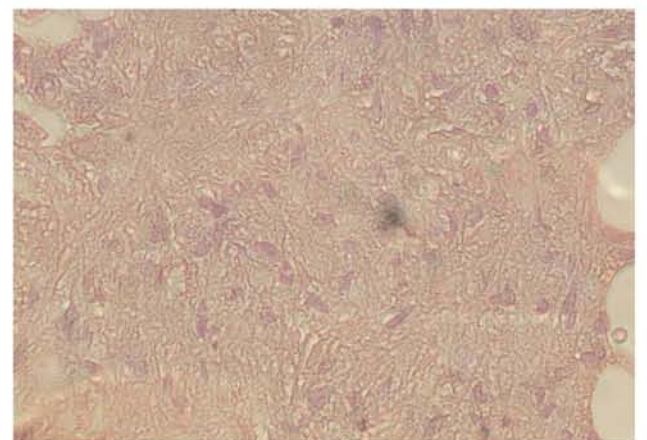
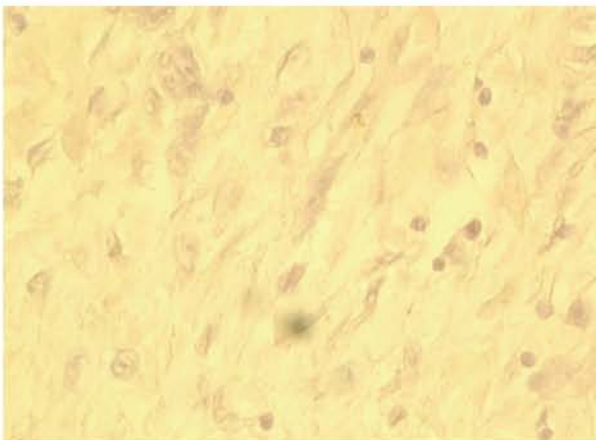
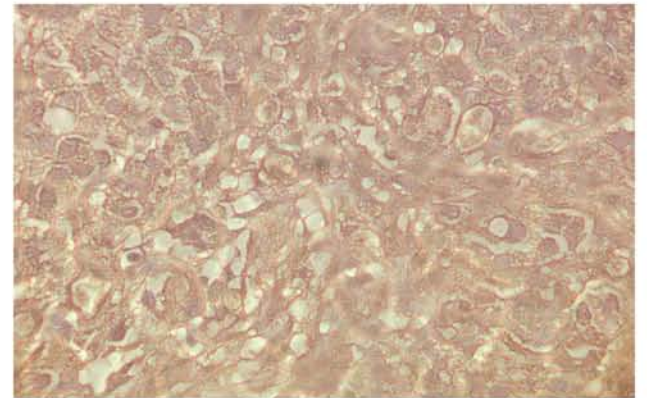
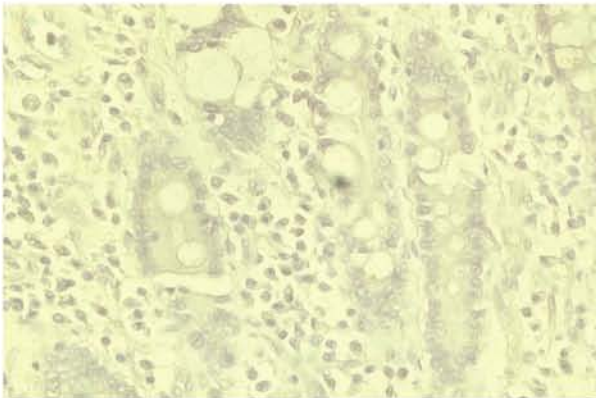
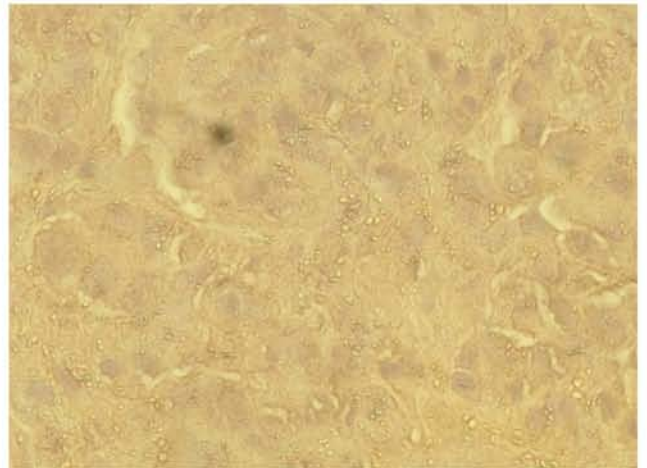
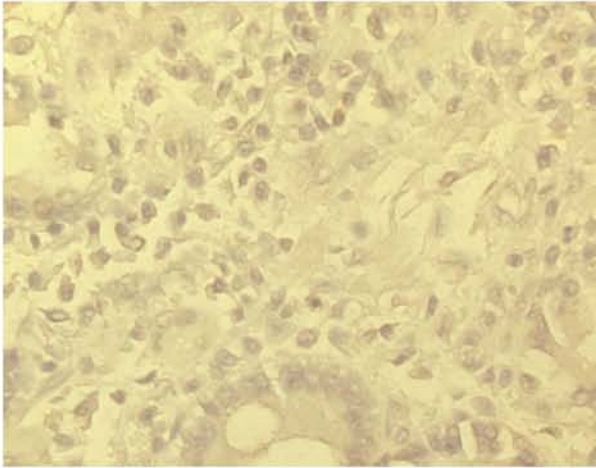


Figura1. A y B Inmunohistoquímica de ERCC1 de baja y alta intensidad. C y D Inmunohistoquímica de RRM1 de baja y alta intensidad; Inmunohistoquímica de hENT1 de baja y alta intensidad.

## VI. RESULTADOS

La muestra final fue de 61 pacientes de la Clínica de Oncología Torácica del Instituto Nacional de Cancerología y del Centro Oncológico Integral “Diana Laura Riojas de Colosio” del Hospital Médica Sur de periodo de Enero 2006 a Julio de 2014.

El 65.5% de los pacientes eran hombres, la edad media al momento del diagnóstico fue de 61+/-11.59 años, el 55.7% eran fumadores con índice tabáquico promedio de 27, 42.6% tenían el antecedente de exposición a asbestos, el 37.7% a humo de leña.

El estado funcional de los pacientes al momento del diagnóstico por Karnofsky fue de 90% en el 49% de los pacientes y por ECOG fue de 1 en el 72%.

Como quimioterapia en primera línea se utilizó platino+pemetrexed en 15.9% de los pacientes, platino+gemcitabina en 72%, platino+doxorubicina liposomal 11.4%.

Como segunda línea se utilizó platino+pemetrexed en 11.5% de los pacientes, platino+gemcitabina en 18.1%, platino+doxorubicina liposomal 3.3% y platino+vinorelbine 3.3%. Se utilizó radioterapia en el 40.7% de los pacientes y cirugía en 30.5%.

El 49% se encontraban en estadio III y 51% en estadio IV; la histología más común fue la epitelioide en 80%, seguido de sarcomatoide en el 8% y bifásico en el 3.5%.

De acuerdo a la escala pronóstica de riesgo de EORTC 82% fueron de buen pronóstico y 18% de pobre pronóstico. Se determinó por PCR el grado de sobre expresado o no sobre expresado para los marcadores ERCC1 y RRM1. En 52% se encontró sobre expresión para ERCC1 y RRM1, en 48% no sobre expresión.

Por medio de inmunohistoquímica también se determinó la sobre expresión de ERCC1, RRM1 y hENT1. ERCC1 se encontró sobre expresado en 26% y 46% no sobreexpresados; RRM1 se encontró sobre expresado en 41% y no sobre expresado en 50% y hENT1 sobre expresado en 44% y no sobre expresado en 56% (Tabla 1).



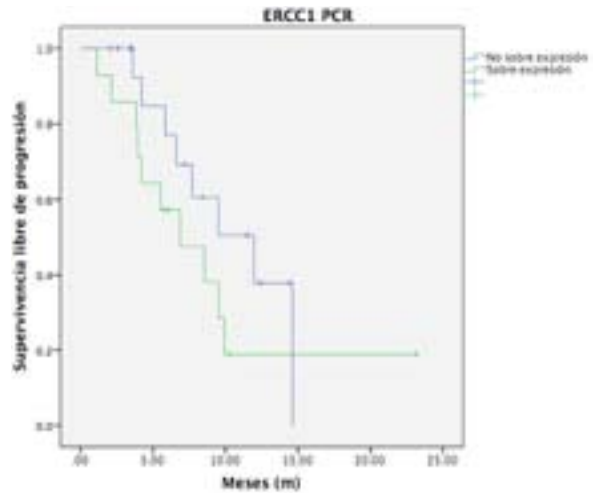
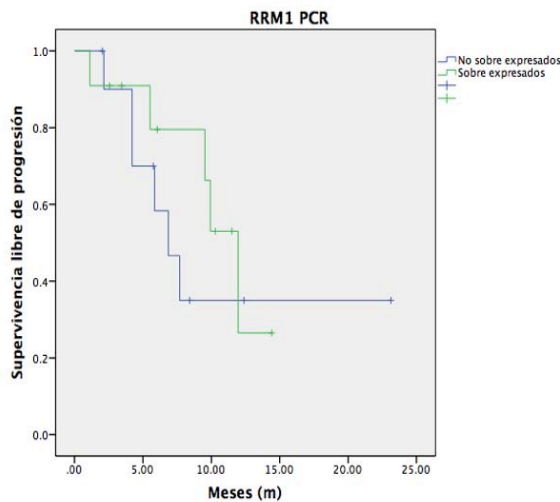
<b>Tabla 1. Características demográficas de la población</b>	
Características	N=61
<b>Género[n(%)]</b>	
Masculino	40(65.6%)
Femenino	21(34.4%)
Edad (Años) [mediana(intervalo)]	61 (33-84)
<b>Estado de tabaquismo[n(%)]</b>	
No fumadores	27(44.3%)
Tabaco	34(55.7%)
IT	26.8 (0.3-160)
Asbesto[n(%)]	26(42.6%)
Humo de leña[n(%)]	23(37.7%)
<b>Karnofsky[n(%)]</b>	
100	7 (11.5%)
90	30 (49.2%)
80	20 (32.8%)
70	4 (6.6%)
<b>ECOG[n(%)]</b>	
0	7 (11.5%)
1	44(72.1%)
2	10 (16.4%)
<b>1ª línea de quimioterapia[n(%)]</b>	
Platino+Pemetrexed	10(15.9)
Platino+gemcitabina	44(72.1)
Platino+ Doxorrubina liposomal	7(11.4)
<b>2ª línea de quimioterapia[n(%)]</b>	
Platino+pemetrexed	7(11.5)
Platino+gemcitabina	13(18.1)
Platino+Doxorrubina liposomal	2 (3.3)
Platino+Vinorelbine	2 (3.3)
Radioterapia	24(40.7%)
Cirugía	18(30.5%)
<b>Estadios[n(%)]</b>	
III	30(49.2%)

IV	31(50.8%)
Histología[n(%)]	
Subtipo epitelioides	49(80.3%)
Subtipo sarcomatoide	5 (8.2%)
Subtipo bifásico	2 (3.3%)
No especificado	5 (8.2%)
Escala pronóstica EORTC[n(%)]	
Grupo de buen pronóstico	50(82%)
Grupo de pobre pronóstico	11(18%)
ERCC1 por PCR	
Sobre expresado	12(52.2%)
No sobreexpresado	11(47.8%)
RRM1 por PCR	
Sobre expresado	12(52.2%)
No Sobre expresado	11(47.8%)
ERCC1 por IHQ	
Sobre expresado	9(25.7%)
No sobre expresado	16(45.7%)
RRM1 por IHQ	
Sobre expresado	14(41.2%)
No sobreexpresado	17(50%)
hENT1 por IHQ	
Sobre expresado	7(43.8%)
No sobre expresado	9(56.3%)

En cuanto a los desenlaces principales del estudio, la supervivencia libre de progresión para aquellos con sobre expresión por PCR de RRM1 fue de 11.9 meses en comparación con lo que no tuvieron sobre expresión 6.8 meses (IC 95%7.7-12.8)  $p=0.36$ .

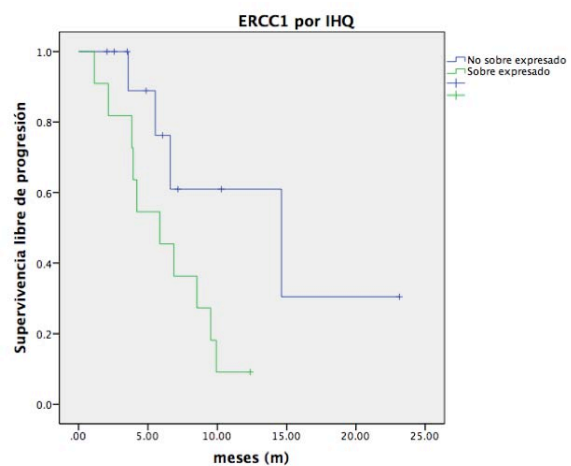
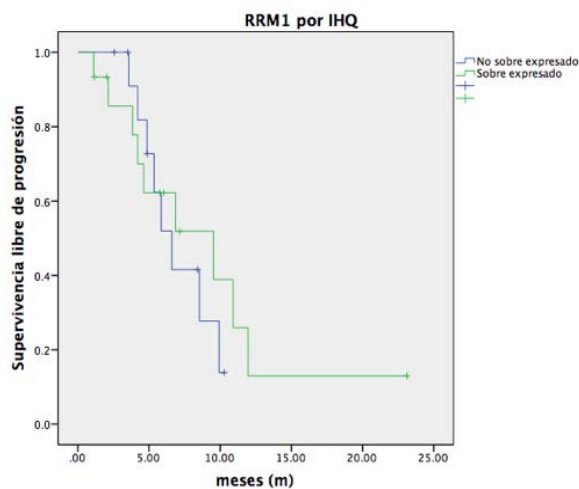
Para ERCC1 por PCR la supervivencia libre de progresión en aquellos con sobre expresión fue 6.8 meses y sin sobre expresión 11.9 meses, (IC 95% 7.7-12.7),  $p=0.13$ . (Figuras 2 y 3)

Figura 2.SLP RRM1 por PCR y Figura 3. SLP ERCC1 por PCR.



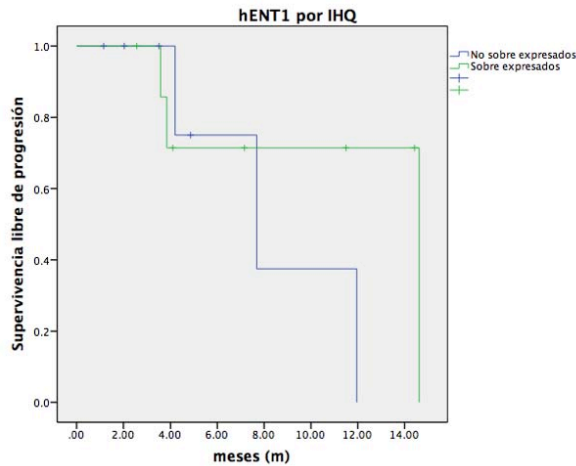
Por medio de inmunohitoquímica, la supervivencia libre de progresión para RRM1 sobre expresado fue de 9.5 meses vs 6.6 meses para no sobreexpresado (IC 95% 5.1-13)  $p=0.90$ , para ERCC1 fue significativamente mayor para pacientes sin sobre expresión de 14.6 meses vs 5.8 meses con sobre expresión (IC 95 % 4.2-8.2)  $p=0.04$ .(Figuras 4 y 5)

Figura 4. SLP RRM1 por IHQ y Figura 5. SLP ERCC1 por IHQ.



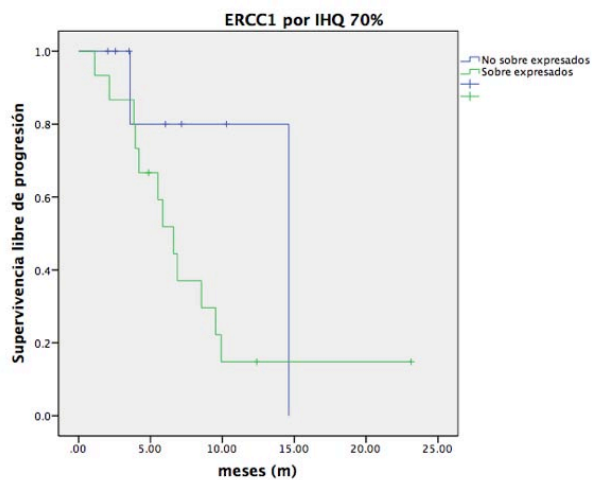
También por medio de inmunohistoquímica se determinó la sobreexpresión de HENT1 y la supervivencia libre de progresión para los sobre expresados fue de 14.6 meses vs 7.6 para los no sobre expresados, (IC 95% 7-15.9)  $p=0.9$ .(Figura 6)

Figura 6. SLP hENT 1 por IHQ



Cuando se analizó la supervivencia libre de progresión en cuanto a la intensidad por inmunohistoquímica se observó que para ERCC1 existe diferencia estadísticamente significativa a partir de 80%, siendo superior para aquellos sin sobreexpresión; con 70% de intensidad no existe diferencia, en sobre expresados fue de 6.6 meses vs 14.6 en no sobre expresados con  $p=0.16$ . (Figura 7)

Figura 7. SLP ERCC1 por IHQ 70%



En cuanto al desenlace de supervivencia global no existieron diferencias, para sobre expresión por PCR de RRM1 no fue alcanzada vs 15.7 meses para no sobreexpresión (IC 95% 11.3-24.2) p=0.79, para PCR de ERCC1 fue de 12.1 meses para sobreexpresados vs 21.7 meses para no sobre expresados (IC 95% 11.3-31.2) p=0.8.

Por inmunohistoquímica la supervivencia global para RRM1 sobreexpresado fue de 11.4 meses vs 20.6 meses para no sobre expresado, (IC 95% 10.6-25.5) P=0.5. Para ERCC1 sobre expresado fue de 12.1 meses vs 21.7 meses para no sobre expresado (IC 95% 9.4-23.6) p=1. Para hENT1 sobre expresado fue de 12.1 meses vs 11.4 meses para no sobre expresado (IC 95% 7.9-19.7) p=1.

En el análisis por subgrupos, la única variable estadísticamente significativa para supervivencia libre de progresión fue la escala pronóstico de EORTC, en la cual aquellos de bajo riesgo tenían una supervivencia libre de progresión de 9.9 meses en comparación con los de alto riesgo 4.6 meses (IC 95% 8.4-13.5) p=0.02. (Tabla 2)

Tabla 2.

<b>Supervivencia Libre de Progresión</b>		
Variable	Mediana de supervivencia libre de progression, meses (IC95%)	P
<b>Edad</b>		
<63	9.5 (7.7-14.57)	0.82
≥63	8.5 (6.9-12.38)	
<b>Sexo</b>		
Masculino	9.9 (7.8-13.2)	0.31
Femenino	7.6 (5.7-11.24)	
<b>Tabaquismo</b>		
Positivo	9.9 (7.3-13.8)	0.71
Negativo	7.6 (6.3-12.2)	
<b>Asbestos</b>		
Positivo	11.9 (8.8-16.4)	0.56
Negativo	6.6 (6.5-10.1)	
<b>Karnofsky</b>		
≤80	9.9 (7.1-11.4)	0.88
>80	7.6 (7.9-14.7)	
<b>ECOG</b>		
≤1	8.54	0.9
>1	9.52	
<b>Escala EORTC</b>		
Bajo riesgo	9.9	0.02
Alto riesgo	4.6	
<b>Estadio</b>		
III	7.2	0.36
IV	11.9	

En el análisis por subgrupos para supervivencia global, la única variable independiente fue la histología epiteloide, la cual es un predictor de una mayor

supervivencia. Aquí cabe la pena destacar que la cirugía no impactó en la supervivencia así como tampoco la radioterapia. (Tabla 3)

Tabla 3.

<b>Supervivencia Global</b>		
<b>Variable</b>	<b>Mediana de supervivencia global, meses (IC95%)</b>	<b>P</b>
<b>Edad</b>		
<63	20.6 (15.5-27.6)	0.85
≥63	21.7 (14.1-23.9)	
<b>Sexo</b>		
Masculino	21.7(16.8-28)	0.37
Femenino	14(11.6-23)	
<b>Asbestos</b>		
Positivo	32.4 (20.2-33.9)	0.6
Negativo	12.1 (11.7-19.3)	
<b>Cirugía</b>		
Si	26.9(14.6-30.2)	0.63
No	15.7 (14.5-24.6)	
<b>Histología</b>		
Epitelioide	21.78 (17-26.8)	0.04
Sarcomatoide	9.9 (5-12.1)	
Mixto	3.9 (3-9.6)	
<b>RT</b>		
Si	15.7 (12.1-22)	0.26
No	26.9 (18.4-33.3)	
<b>Estadio</b>		
III	14 (13.8-26)	0.36
IV	21.7 (16-28.7)	

## VII.DISCUSIÓN

El mesotelioma a pesar de ser una neoplasia poco frecuente, su incidencia continúa aumentando a lo largo del tiempo y es probable que en los próximos años veamos un incremento considerable debido a la exposición inadvertida de un gran número de personas.

Plantea un gran reto para el médico oncólogo, ya que generalmente se diagnostica en etapas avanzadas y no existe un tratamiento estándar para esta neoplasia.

El uso de quimioterapia con distintos fármacos ha logrado buenas tasas de respuesta, sin embargo la mayoría de los pacientes en algún punto presenta progresión de la enfermedad y un deterioro importante en cuanto a su calidad de vida.

En los últimos años se ha intentado identificar algún marcador que no solamente tenga utilidad pronóstica, sino que sea predictivo de respuesta al tratamiento con quimioterapia para poder realizar una selección más adecuada de los pacientes que se benefician.

Se ha identificado en cáncer pancreático, de vía biliar y de pulmón de células no pequeñas el valor pronóstico de niveles elevados de RRM1, lo cual correlaciona con un tiempo mayor hasta la recurrencia, en pacientes tratados con gemcitabina.

Sin embargo, de manera contradictoria en otros estudios de cáncer de pulmón de células no pequeñas la expresión baja de RRM1 se ha asociado a un mejor pronóstico en aquellos pacientes que reciben quimioterapia con gemcitabina/cisplatino.

En el estudio de Frischknecht et al. en pacientes con mesotelioma pleural maligno, la sobre expresión nuclear de RRM1 se asoció con una supervivencia libre de recurrencia significativamente mayor en aquellos pacientes tratados con gemcitabina.

Así mismo, se identificó que una expresión baja de ERCC1 es un marcador pronóstico de una mayor supervivencia libre de progresión y una mejor respuesta, en aquellos pacientes tratados con quimioterapia.

Sin embargo, los resultados hasta ahora han sido inconsistentes ya que en ese mismo estudio en aquellos pacientes que no recibieron quimioterapia, los que tenían una alta expresión de ERCC1 tuvieron una supervivencia mayor.

hENT1 es el principal encargado de la captación intracelular de gemcitabina, un biomarcador que se ha utilizado para predecir la respuesta al tratamiento en pacientes con tumores pancreáticos y de vía biliar; de todos los biomarcadores es uno de los más confiables para predecir supervivencia. Además, en varios estudios se ha establecido su papel pronóstico en cáncer biliar avanzado.

Con respecto a los resultados obtenidos en nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los desenlaces de supervivencia global ni libre de progresión entre los pacientes con sobre expresión de RRM1 y hENT1 con respecto a aquellos no sobre expresados, únicamente se encontró diferencia estadísticamente significativa en los que tenían niveles bajos de ERCC1 determinados por medio de inmunohistoquímica, lo cual concuerda con los resultados obtenidos previamente en estudios.

La falta de correlación de la expresión de RRM1 con la mejoría en supervivencia libre de progresión puede ser debida al tamaño de la muestra ya que es una neoplasia poco frecuente, además de que existe una variabilidad considerable dependiendo del método que se utilice para su determinación, ya sea inmunohistoquímica o PCR.

En cuanto a supervivencia global no se encontraron diferencias en cuanto al grado de expresión de los marcadores, sin embargo hENT1 se pudo determinar en sólo una pequeña parte de la muestra, para poder descartar su utilidad se requerirá analizarlo en una muestra mayor de pacientes.

En cuanto a las variables pronósticas, se observó que la que tiene mayor valor pronóstico en cuanto a supervivencia libre de progresión es la escala de EORTC, la cuál ha sido validada en varios estudios y el nuestro no fue la excepción.

Otra variable pronóstica para supervivencia global fue la histología, la cual se conoce bien habla de distintas entidades con comportamiento y pronóstico distinto, englobadas bajo el mismo nombre de mesotelioma.

Llama la atención que la cirugía no tuvo ningún impacto en la supervivencia supervivencia global, así como tampoco la radioterapia.

## VIII.CONCLUSIONES

Se corroboró el valor pronóstico y predictivo del marcador ERCC1 determinado por inmunohistoquímica en pacientes con mesotelioma pleura maligno tratados con quimioterapia a base de gemcitabina, encontrándose una mejoría en la supervivencia libre de progresión con niveles bajos de expresión.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa con el uso de marcadores RRM1 y hENT1 en los desenlaces de supervivencia global ni libre de progresión. Sin embargo, este es el primer estudio en el que se utiliza hENT1 como biomarcador de respuesta en mesotelioma.

Probablemente, la falta de significancia es debido a que el tamaño de la muestra es reducido, por lo que deberá estudiarse con un tamaño de muestra adecuado para poder conocer su utilidad.

El uso de biomarcadores pronósticos cada día está más evidente que es necesario en el tratamiento de las distintas neoplasias, para poder caracterizar mejor subexpuso de pacientes que se benefician de un tratamiento en particular.

En el caso del mesotelioma aun hay un campo vasto de investigación en cuanto a los marcadores más útiles para predecir respuesta a tratamiento con distintos fármacos de quimioterapia.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.-Teta MJ, Mink PJ, Lau E, Scurman BK, Foster ED. US mesothelioma patterns 1973-2002: indicators of change and insights into background rates. *Eur J Cancer Prev*. 2008 Nov;17(6):525-34.
- 2.-Hodgson JT, McElvenny DM, Darnton AJ, Price MJ, Peto J. The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *British journal of cancer*. 2005 Feb 14;92(3):587-93.
- 3.-Luis Dominguez GC, Oscar Arrieta, Edgardo Jimenez, Alejandro Padilla. *Manual de Oncología: Procedimientos médico quirúrgicos*; 2010.
- 4.-Delgermaa V, Takahashi K, Park EK et al (2011) Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. *Bull World Health Organ* 89(10): 716-724. Doi:10.2471/BLT.11.086678 724<sup>a</sup>-724C
- 5.-Park EK, Takahashi K, HPark EK, Takahashi K, Hoshuyama T et al (2011) Global magnitude of reported and unreported mesothelioma. *Environ Health Perspect* 119(4):514–518. doi: 10.1289/ehp.1002845
- 6.-Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Dif- fuse pleural mesothelioma. *Br J Ind Med* 1960;17:260-71.
- 7.-Sebastien P, Janson X, Gaudichet A, Hirsch A, Bignon J. Asbestos retention in human respiratory tissues: comparative measurements in lung parenchyma and in parietal pleura. *IARC Sci Publ* 1980;30: 237-46.
- 8.-Kamp DW, Israbian VA, Preusen SE, Zhang CX, Weitzman SA. Asbestos causes DNA strand breaks in cultured pulmonary epithelial cells: role of iron-catalyzed free radicals. *Am J Physiol* 1995;268:471-80.
- 9.-Bocchetta, M. et al. Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10214–9 (2000).
- 10.-van Kaick G, Dalheimer A, Hornik S, et al. The German Thorotrast Study: recent re- sults and assessment of risks. *Radiat Res* 1999;152:Suppl:S64-S71.
- 11.-Bjorkqvist AM, Tammilehto L, Anttila S, Mattson K, Knuutila S. Recurrent DNA copy number changes in 1q, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q and 22q detected by comparative genomic hybridization in malignant mesothelioma. *Br J Cancer* 1997;75:523-7.
- 12.-Hanahan D, Weinberg RA. The hall- marks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- 13.-Versnel MA, Claesson-Welsh L, Ham- macher A, et al. Human malignant mesothe- lioma cell lines express PDGF beta-receptors whereas cultured normal mesothelial cells express predominantly PDGF alpha-recep- tors. *Oncogene* 1991;6:2005-11.
- 14.-Dazzi H, Hasleton PS, Thatcher N, Wilkes S, Swindell R, Chatterjee AK. Malig- nant pleural mesothelioma and epidermal growth factor receptor (EGF-R): relation- ship of EGF-R with histology and survival using fixed paraffin embedded tissue and the F4, monoclonal antibody. *Br J Cancer* 1990;61:924-6.
- 15.-Luis Dominguez GC, Oscar Arrieta, Edgardo Jimenez, Alejandro Padilla. *Manual de Oncología: Procedimientos médico quirúrgicos*; 2010.
- 16.-Selikoff IJ, Hammond EC, Seidman H. Latency of asbestos disease among insulation workers in the United States and Canada. *Cancer*. 1980 Dec 15;46(12):2736-40.
- 17.-Arrinda Yeregui, J. M. & Sanz Anquela, J. M. Historia natural del mesotelioma pleural: El asbesto como factor causal necesario. [conganat.cs.urjc.es/ojs/index.php/conganat/issue/view/2.html](http://conganat.cs.urjc.es/ojs/index.php/conganat/issue/view/2.html) 1–20 (2006).
- 18.-Pérez Rodríguez, E. & Villena Garrido, M. V. Enfermedades de la Pleura. 132–138 (2003).
- 19.-Rogli VL, Sharma A, Butnor KJ, Sporn T, Vollmer RT. Malignant meso helioma and occupational exposure to asbestos: a clinicopathological cor relation of 1445 cases. *Ultrastruct Pathol* 2002;26:55.
- 20.-Whitaker D. The cytology of malignant mesothelioma. *Cytopathology* 2000;11: 139-51.
- 21.-O'Byrne KJ, Edwards JG, Waller DA. Clinico-pathological and biological prog- nostic factors in pleural malignant meso- thelioma. *Lung Cancer* 2004;45:Suppl 1: S45-S48.
- 22.-Lee YC, Light RW, Musk AW. Manage- ment of malignant pleural mesothelioma: a critical review. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6:267-74.
- 23.-Astoul P. Pleural mesothelioma. *Curr Opin Pulm Med* 1999;5:259-68.
- 24.-Bielefeldt-Ohmann H, Marzo AL, Him- beck RP, Jarnicki AG, Robinson BWS, Fitzpatrick DR. Interleukin-6 involvement in mesothelioma pathobiology: inhibition by interferon alpha immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 1995;40:241-50.

- 25.-Edwards JG, Abrams KR, Leverment JN, Spyt TJ, Waller DA, O'Byrne KJ. Prognostic factors for malignant mesothelioma in 142 patients: validation of CALGB and EORTC prognostic scoring systems. *Thorax* 2000;55: 731-5.
- 26.-Ruffie PA: Pleural mesothelioma. *Curr Opin Oncol* 3:328-334, 1991
- 27.-Berghmans T, Paesmans M, Lalami Y, Louviaux I, Luce S, Mascaux C, et al. Activity of chemotherapy and immunotherapy on malignant mesothelioma: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2002 Nov;38(2):111-21.
- 28.-Vogelzang NJ, Goutsou M, Corson JM, Suzuki Y, Graziano S, Aisner J, et al. Carboplatin in malignant mesothelioma: a phase II study of the Cancer and Leukemia Group B. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1990;27(3):239-42.
- 29.-Scagliotti GV, Shin DM, Kindler HL, Vasconcelles MJ, Keppler U, Manegold C, et al. Phase II study of pemetrexed with and without folic acid and vitamin B12 as front-line therapy in malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2003 Apr 15;21(8):1556-61.
- 30.-Baas P, Ardizzoni A, Grossi F, Nackaerts K, Numico G, Van Marck E, et al. The activity of raltitrexed (Tomudex) in malignant pleural mesothelioma: an EORTC phase II study (08992). *Eur J Cancer*. 2003 Feb;39(3):353-7.
- 31.-van Meerbeeck JP, Baas P, Debruyne C, Groen HJ, Manegold C, Ardizzoni A, et al. A Phase II study of gemcitabine in patients with malignant pleural mesothelioma. European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group. *Cancer*. 1999 Jun 15;85(12):2577-82.
- 32.-Skubitz KM. Phase II trial of pegylated-liposomal doxorubicin (Doxil) in mesothelioma. *Cancer investigation*. 2002;20(5-6):693-9.
- 33.-Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *Clin Oncol* 2003;21 :2636-44.
- 34.-Taylor P, Castagneto B, Dark G, et al. Single-agent pemetrexed for chemonaive and pretreated patients with malignant pleural mesothelioma: results of an International Expanded Access Program. *J Thorac Oncol* 2008;3:764.
- 35.-Kindler HL, Millard F, Herndon JE, 2nd, Vogelzang NJ, Suzuki Y, Green MR. Gemcitabine for malignant mesothelioma: A phase II trial by the Cancer and Leukemia Group B. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2001 Feb-Mar;31(2-3):311-7.
- 36.-Castagneto B, Zai S, Dongiovanni D, Muzio A, Bretti S, Numico G, et al. Cisplatin and gemcitabine in malignant pleural mesothelioma: a phase II study. *American journal of clinical oncology*. 2005 Jun;28(3):223-6.
- 37.-Kalmadi SR, Rankin C, Kraut MJ, Jacobs AD, Petrylak DP, Adelstein DJ, et al. Gemcitabine and cisplatin in unresectable malignant mesothelioma of the pleura: a phase II study of the Southwest Oncology Group (SWOG 9810). *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2008 May; 60(2):259-63.
- 38.-Nowak AK, Byrne MJ, Williamson R, Ryan G, Segal A, Fielding D, et al. A multicentre phase II study of cisplatin and gemcitabine for malignant mesothelioma. *British journal of cancer*. 2002 Aug 27;87(5):491-6.
- 39.-Favaretto AG, Aversa SM, Paccagnella A, Manzini Vde P, Palmisano V, Oniga F, et al. Gemcitabine combined with carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma: a multicentric phase II study. *Cancer*. 2003 Jun 1;97(11):2791-7.
- 40.-Schutte W, Blankenburg T, Lauerwald K, Schreiber J, Bork I, Wollscgkaeger B, et al. A multicenter phase II study of gemcitabine and oxaliplatin for malignant pleural mesothelioma. *Clinical lung cancer*. 2003 Mar;4(5):294-7.
- 41.-Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia (Bal- timore)* 2001;15:875-90.
- 42.-Burriss HA III, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1995;15:2403-13.
- 43.-DeVita V LT, Rosenberg S. *Cancer: Principles and practice of oncology*. 10th ed: Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins; 2013.
- 44.-Besse B, Olausson KA and Soria JC. ERCC1 and RRM1: ready for prime time? *J Clin Oncol* 2013; 31: 1050-1060.
- 45.-Bepler G, Williams C, Schell MJ, Chen W, Zheng Z, Simon G, Gadgeel S, Zhao X, Schreiber F, Brahmer J, Chiappori A, Tanvetyanon T, Pinder- Schenck M, Gray J, Haura E, Antonia S and Fischer JR. Randomized international phase III trial of ERCC1 and RRM1 expression-based chemotherapy versus gemcitabine/carboplat- in in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2404-2412.

- 46.-Abbruzzese JL, Grunewald R, Weeks EA, Gravel D, Adams T, Nowak B, et al. A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. *J Clin Oncol.* 1991 Mar;9(3): 491-8.
- 47.-Grunewald R, Abbruzzese JL, Tarassoff P, Plunkett W. Saturation of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate accumulation by mononuclear cells during a phase I trial of gemcitabine. *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 1991;27(4):258-62.
- 48.-Zwitter M, Kovac V, Smrdel U, Vrankar M, Zadnik V. Gemcitabine in brief versus prolonged low-dose infusion, both combined with cisplatin, for advanced non-small cell lung cancer: a randomized phase II clinical trial. *J Thorac Oncol.* 2009 Sep;4(9):1148-55.
- 49.-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
- 50.-Frischknecht L, Meerang M, Soltermann A, Stahel R, Moch H, Seifert B, Weder W, Opitz I. Importance of excision repair cross-complementation group 1 and ribonucleotide reductase M1 as prognostic biomarkers in malignant pleural mesothelioma treated with platinum-based induction chemotherapy followed by surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015 Jun;149(6): 1539-1547.e1.
- 51.-Kim R, Tan a, K. Lai K, Jiang J, Wang Y, Rybicki L, Liu X. Prognostic roles of human equilibrative transporter 1 (hENT1) and ribonucleoside reductase subunit M1 (RRM1) in resected pancreatic cancer. *Cancer* 2011; jul 15; 3126-3134.
- 52.-Greenhalf W1, Ghaneh P, Neoptolemos JP, Palmer DH, Cox TF, Lamb RF, Garner E, Campbell F, Mackey JR, Costello E, Moore MJ, Valle JW, McDonald AC, Carter R, Tebbutt NC, Goldstein D, Shannon J, Dervenis C, Glimelius B, Deakin M, Charnley RM, Lacaine F, Scarfe AG, Middleton MR, Anthony A, Halloran CM, Mayerle J, Oláh A, Jackson R, Rawcliffe CL, Scarpa A, Bassi C, Büchler MW; European Study Group for Pancreatic Cancer.G Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial. *J Natl Cancer Inst.* 2014. 106(1): djt347.
- 53.-Oguri T, Achiwa H, Muramatsu H, Ozasa H, Sato S, Shimizu S, Yamazaki H, Eimoto T, Ueda R. *Cancer Lett.* 2007 Oct 18;256(1):112-9. Epub 2007 Jul 19.