



# UNIVERSIDAD DE OVIEDO

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGIA  
DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS  
OBRA SOCIAL CAJASTUR

“Valor predictivo de la expresión del *reduced folate carrier (RFC)* en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico avanzado con pemetrexed”

Carlos Álvarez Fernández

11 de junio de 2012

**Máster Universitario en Investigación en Cáncer**

*Trabajo Fin de Máster*



# UNIVERSIDAD DE OVIEDO

## INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGIA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS OBRA SOCIAL CAJASTUR

“Valor predictivo de la expresión del *reduced folate carrier (RFC)* en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico avanzado con pemetrexed”

**Máster Universitario en Investigación en Cáncer**

*Trabajo Fin de Máster*

**Autor:**  
Carlos Álvarez Fernández

**Director:**  
Dr. Emilio Esteban González



Don Emilio Esteban González, Doctor en Medicina por la Universidad de Oviedo, del Programa de Investigación Clínica, Unidad de Oncología Clínica, del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias Obra Social Cajastur.

### **CERTIFICA**

Que el trabajo de investigación presentado por D. Carlos Álvarez Fernández, titulado “*Valor predictivo de la expresión del reduced folate carrier (RFC) en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico avanzado con pemetrexed*”, realizado bajo la dirección del Dr. Emilio Esteban González, dentro del programa del ***Máster Universitario en Investigación en Cáncer*** de la Universidad de Oviedo y el Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias Obra Social Cajastur, reúne las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Oviedo, a 11 de junio de 2012.

Fdo. Dr. D. Emilio Esteban González  
Director del Trabajo Fin de Máster

*“Lo peor no es cometer un error, sino tratar de justificarlo,  
en vez de aprovecharlo como aviso providencial de nuestra ligereza o ignorancia.”*

Santiago Ramón y Cajal

## **Agradecimientos:**

Quiero expresar mi más sentido agradecimiento a todos los que me han ayudado en este Trabajo Fin de Máster.

En primer lugar a Emilio Esteban González, por prestarme su tiempo, conocimiento y paciencia, sin él este trabajo no habría sido posible.

En segundo lugar a Aurora Astudillo por su disposición y conocimiento, a Aitana Vallina, Lucía Fernández y Laura Suárez por su trabajo con los *tissue arrays* y el anticuerpo, miembros todas ellas del Banco de Tumores del IUOPA.

A Martín Jiménez y Florentino Fresno, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias, por su ayuda incondicional para la lectura e interpretación de los resultados de la inmunohistoquímica.

A Norberto Corral, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Oviedo, por su inestimable ayuda con el análisis estadístico y la comprensión de los resultados.

Al Servicio de Archivos del Hospital Universitario Central de Asturias.

A los compañeros del Servicio de Oncología Médica, en especial a Pablo Pardo por su ayuda en la revisión de este trabajo.

Muy especialmente a Victoria y Carlos, por estar apoyándome y animándome constantemente para sacar adelante este trabajo.

Y sobre todo a los pacientes con cáncer que he tenido la oportunidad de tratar y ayudar en todo este tiempo. Ellos son el motivo y la razón de ser del esfuerzo y de las ganas para seguir luchando en la batalla contra el cáncer.

## Índice:

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	1
<b>1.1</b>	<b>Cáncer de pulmón</b>	2
1.1.1	Epidemiología	2
1.1.2	Factores de riesgo	2
1.1.3	Prevención y cribado	4
1.1.4	Clasificación	5
1.1.5	Evaluación histopatológica del cáncer de pulmón	5
1.1.6	Estadificación	7
1.1.7	Factores pronósticos y predictivos	8
1.1.8	Tratamiento del CPNM	11
1.1.9	Tratamiento sistémico en el CPNM avanzado	13
1.1.10	Tratamientos dirigidos	16
1.1.11	Tratamiento de mantenimiento	17
<b>1.2</b>	<b>Pemetrexed</b>	19
1.2.1	Mecanismo de acción de los antifolatos	20
1.2.2	Transporte intra y extracelular de los antifolatos	21
1.2.3	Mecanismos de resistencia a antifolatos	23
1.2.4	Eficacia terapéutica en el CPNM	24
1.2.5	Efectos adversos	26
<b>1.3</b>	<b>Transportador de folatos reducidos (RFC)</b>	27
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	30
<b>3</b>	<b>Material y métodos</b>	32
<b>3.1</b>	<b>Pacientes y características de las muestras</b>	33
<b>3.2</b>	<b>Estudio inmunohistoquímico</b>	33

3.3	Evaluación y análisis estadístico .....	34
4	Resultados .....	36
4.1	Características clínico-patológicas de los pacientes.....	37
4.2	Análisis de la supervivencia libre de progresión .....	40
4.2.1	Sexo, estadio clínico, tabaquismo e histología:.....	40
4.2.2	Expresión del <i>reduced folate carrier</i> :.....	40
4.3	Análisis de la supervivencia global .....	41
4.3.1	Sexo, estadio clínico, tabaquismo e histología:.....	41
4.3.2	Expresión del <i>reduced folate carrier</i> :.....	42
4.4	Análisis multivariante.....	43
5	Discusión.....	46
6	Conclusiones.....	50
7	Anexo .....	52
8	Bibliografía .....	54

# **1 Introducción**



## **1.1 Cáncer de pulmón**

### **1.1.1 Epidemiología**

El cáncer de pulmón ha sido la causa más común de cáncer en el mundo durante décadas. En 2008 se produjeron 1,61 millones de nuevos casos, representando el 12,7% de todos los nuevos cánceres. Asimismo fue la causa más común de muerte por cáncer con 1,38 millones de muertes (18,2% del total).<sup>1</sup>

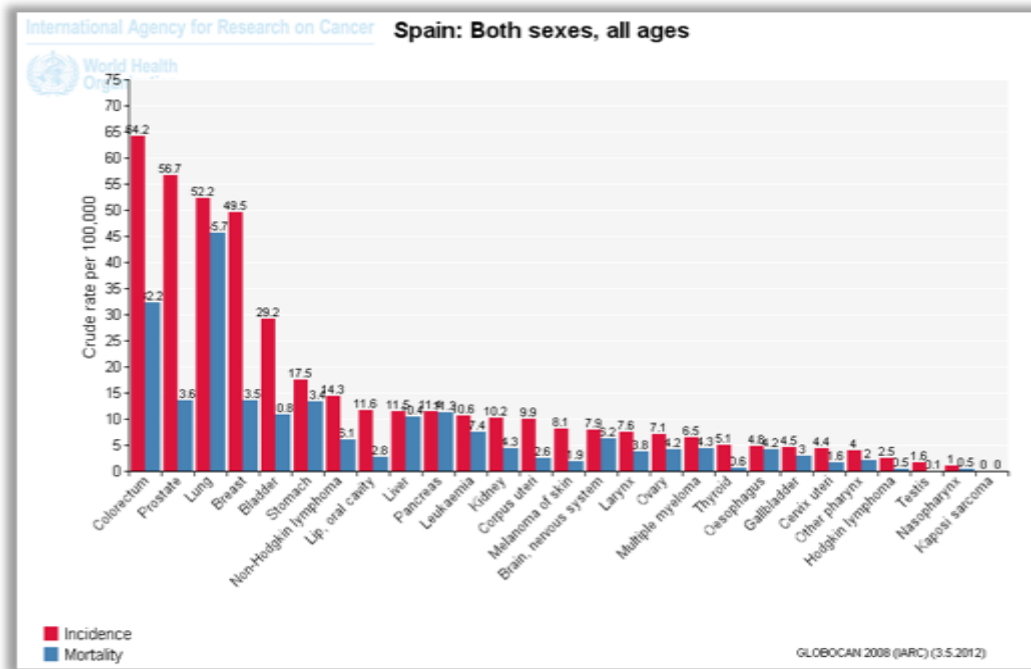
En Estados Unidos el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte. Se estima que 226.160 nuevos casos serán diagnosticados en 2012 (116.470 en hombres y 109.690 en mujeres) y 160.340 muertes debidas a este tumor. Solamente un 15,6% de todos los pacientes con cáncer de pulmón están vivos a los 5 años del diagnóstico.<sup>2</sup>

En España, la prevalencia total estimada en el año 2006 fue de 1.175 casos de cáncer por 100.000 habitantes, falleciendo en ese año 16.879 hombres con una media de edad de 68 años, así como un total de 2.634 mujeres con una media de edad de 66 años. Las cifras de incidencia y mortalidad presentan variaciones en las distintas áreas geográficas y de forma global las tasas de mortalidad por cien mil habitantes son de 121,5 para los hombres y 95,1 para las mujeres; las tasas estandarizadas por cien mil habitantes son de 137,7 y 92,1 respectivamente.

La agencia de la Organización Mundial de la Salud que estudia la incidencia del cáncer en el mundo -GLOBOCAN-, estimó en el año 2008 una tasa cruda de incidencia del cáncer de pulmón de 52,2 por 100.000 habitantes y una tasa de mortalidad de 45,7 (Figura 1). Es por tanto la 3ª causa de cáncer diagnosticado, y la 1ª causa de fallecimiento por cáncer en nuestro medio.

### **1.1.2 Factores de riesgo**

El principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón es el hábito tabáquico, el cual ocasiona de manera directa, entre el 85-90% de todas las muertes relacionadas con el cáncer de pulmón.<sup>3-4</sup> El humo del tabaco contiene muchos carcinógenos químicos (ej. nitrosaminas, benzopirenos).<sup>3, 5</sup> El riesgo de desarrollar cáncer de pulmón se incrementa con el número de paquetes de cigarrillos fumados al día y con el número de años que se ha estado fumando (lo que se conoce como “paquetes-



**Figura 1.** Incidencia y mortalidad por tumor en España. Tasa cruda por 10<sup>5</sup> habitantes. Fuente: GLOBOCAN.<sup>1</sup>

año”). Los no fumadores expuestos al humo del tabaco también tienen un riesgo relativo (RR) incrementado (RR=1,24) de padecer cáncer de pulmón.<sup>5-8</sup>

El gas radón, un gas radioactivo que se produce por la desintegración del radio 226, también parece ser un causante del cáncer de pulmón. La Agencia para la Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (*U.S. Environmental Protection Agency, EPA*) estima que el radón es la principal causa de cáncer de pulmón en no fumadores, aunque el ser fumador pasivo es otro factor importante.<sup>9-12</sup>

El asbesto, un compuesto mineral que se descompone en pequeños fragmentos que son llevados por el aire, es un carcinógeno conocido que incrementa el riesgo de cáncer en las personas expuestas a estas partículas, sobre todo en los individuos fumadores. Se estima que entre un 3-4% de los cánceres de pulmón son causados por la exposición a asbesto.<sup>13</sup>

Otros posibles factores de riesgo incluyen los procesos inflamatorios pulmonares, las cicatrices pulmonares secundarias a la tuberculosis, los antecedentes familiares y la exposición a agentes carcinógenos distintos de los mencionados (ej. hidrocarburos policíclicos aromáticos, cromo, níquel, compuestos orgánicos de arsénico).<sup>14-15</sup> La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) posee una lista detallada con todos los compuestos potencialmente cancerígenos en el pulmón, entre los que destacan: arsénico,

romo, asbesto, níquel, cadmio, berilio, sílice y humos de combustión.<sup>16-17</sup> El asbesto también es el causante del mesotelioma pleural maligno.

No está claro si el tratamiento hormonal sustitutivo (THS) afecta al riesgo de cáncer de pulmón en las mujeres. Se han publicado más de 20 estudios a este respecto, con resultados contradictorios. En un estudio aleatorizado<sup>18</sup> con un gran número de pacientes no se observó aumento de la incidencia de cáncer de pulmón entre las mujeres postmenopáusicas tratadas con THS a base de estrógenos y progestágenos; no obstante, el riesgo de muerte por cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) estaba aumentado.<sup>18</sup>

### **1.1.3 Prevención y cribado**

Aproximadamente el 85-90% de los casos de cáncer de pulmón están causados por el hábito tabáquico. Existe una relación causal entre el tabaquismo activo y el cáncer de pulmón, así como con otros tumores (esófago, cavidad oral, laringe, faringe, vejiga, páncreas, gástrico, riñón, ovario, colorrectal y cérvix) y diversas enfermedades. Las personas que viven con un fumador tienen entre un 20-30% más de riesgo de desarrollar cáncer de pulmón.

Los oncólogos debemos incidir en el cese del hábito tabáquico, sobre todo en los pacientes con cáncer. La persistencia en el tabaquismo se asocia con la aparición de segundas neoplasias, complicaciones del tratamiento y una disminución de la supervivencia. La estrategia más eficaz para conseguir dejar de fumar es el asesoramiento conductual (*counseling*) y el uso de medicaciones. Las sustancias que pueden colaborar en el cese del tabaquismo es el uso de suplementos con nicotina (ej. chicles, inhaladores, spray, parches), el bupropion de liberación mantenida y la vareniclina. Diversos estudios han demostrado que la vareniclina es mejor que el bupropion o los parches de nicotina<sup>19-21</sup>, aunque genera diversos efectos secundarios como náuseas, vómitos y en algunos casos síntomas neuropsiquiátricos, trastornos del movimiento o disminución del nivel de consciencia.

Uno de los motivos por los que el cáncer de pulmón es todavía la principal causa de muerte por cáncer es la tardanza en su diagnóstico.<sup>22-23</sup> Dado que el cáncer puede ser curado incrementando la supervivencia en otros tumores sólidos (ej. mama, cérvix, colon, próstata), parece necesario desarrollar estrategias que mejoren el cribado y el diagnóstico precoz. Algunos ensayos realizando tomografías computerizadas (TC) con bajas dosis como técnicas de cribado en cáncer de pulmón, han mostrado resultados

prometedores con una frecuencia de diagnóstico de cáncer de pulmón en estadio I mayor del 80%.<sup>24-26</sup> Los resultados publicados muestran que realizar TC de cribado en pacientes con alto riesgo de padecer cáncer de pulmón disminuye la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón un 20%, cuando se compara con el cribado por radiografías.<sup>27</sup> Los pacientes de alto riesgo son aquellos que fuman o han fumado, con un antecedente de 30 paquetes-año, sin evidencia de cáncer de pulmón.<sup>28-29</sup>

#### **1.1.4 Clasificación**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su clasificación de 2004, divide el cáncer de pulmón en 2 grandes clasificaciones basados en su biología, tratamiento y pronóstico: CPNM y cáncer de pulmón de células pequeñas (o microcítico, CPM). El CPNM da lugar a más del 85% de todos los casos de cáncer de pulmón, e incluye a su vez al carcinoma no-escamoso (adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y otros tipos) y el carcinoma escamoso (epidermoide). El adenocarcinoma es el tipo más frecuente de cáncer de pulmón y el que se observa con mayor frecuencia en los no fumadores.<sup>30</sup>

#### **1.1.5 Evaluación histopatológica del cáncer de pulmón**

En la evaluación histopatológica del cáncer de pulmón se determina la extensión de la invasión, si se trata de un tumor primario de pulmón o metástasis de otra localización, si afecta a los bordes de resección quirúrgica y se realizan estudios para el diagnóstico molecular de ciertas mutaciones genéticas (ej. receptor del factor de crecimiento epidérmico, *EGFR*). Los datos actuales muestran que las terapias dirigidas son potencialmente muy eficaces en aquellos pacientes que presentan mutaciones genéticas específicas o reordenamientos genéticos en el tumor.<sup>31-34</sup>

La evaluación preoperatoria incluye el lavado bronquial, punción-aspiración con aguja fina (PAAF), biopsia con aguja gruesa (BAG), biopsia endobronquial y biopsia transbronquial. Además se deben valorar sistemáticamente las adenopatías mediastínicas para una estadificación completa y valorar las posibilidades terapéuticas.

Las muestras de lobectomía o neumonectomía deben de ser valoradas intraoperatoriamente para determinar el margen quirúrgico de resección, se deben diagnosticar los nódulos incidentales hallados en el momento de la cirugía y evaluar los ganglios linfáticos regionales. En la evaluación postquirúrgica se diagnostican las características histopatológicas necesarias para la clasificación del tipo tumoral, la

estadificación y los factores pronósticos. El informe patológico debe reflejar la clasificación histológica de la OMS.<sup>30</sup>

Recientemente se ha revisado la clasificación de los adenocarcinomas por un panel de expertos.<sup>35</sup> Las categorías de carcinoma bronquioloalveolar y el subtipo mixto de adenocarcinoma ya no se usan. Las nuevas categorías incluyen 1) el adenocarcinoma in situ (AIS) (lo que se denominaba carcinoma bronquioloalveolar), que es una lesión preinvasiva; 2) el adenocarcinoma mínimamente invasivo (AMI); y 3) el adenocarcinoma invasivo (incluye el carcinoma bronquioloalveolar mucinoso). Tanto el AIS como el AMI están asociados con una excelente supervivencia si son resecaados. El panel de expertos recomienda el estudio de la mutación del *EGFR* y del reordenamiento del gen *anaplastic lymphoma kinase (ALK)* en todos los adenocarcinomas.

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica diagnóstica fundamental para diferenciar un adenocarcinoma primario de pulmón de las metástasis localizadas en el pulmón desde otros órganos (ej. mama, próstata, colorrectal), también permite diferenciar el adenocarcinoma pulmonar del mesotelioma y para determinar el estado neuroendocrino del tumor. Los carcinomas escamosos suelen ser TTF-1 negativo, p63 positivo y citoqueratinas (CK) 5/6 positiva; mientras que los adenocarcinomas suelen ser TTF-1 positivo.<sup>36</sup> Otros marcadores podrían ser útiles para diferenciar adenocarcinomas de carcinomas escamosos (ej. CK de elevado peso molecular [34βE12], napsina A, mucicarmin).<sup>37-38</sup>

Las tinciones positivas para adenocarcinoma son: CEA (antígeno carcinoembrionario), B72.3, Ver-EP4, MOC31 y TTF-1.<sup>39</sup> TTF-1 es un factor de transcripción que regula la expresión de las apoproteínas A, B y C del surfactante, el antígeno de células claras y T1α. El TTF-1 es habitualmente negativo para el carcinoma de células escamosas,<sup>36</sup> pero es positivo en los tumores de tiroides.<sup>40</sup> El adenocarcinoma de pulmón es CK7 positivo y CK20 negativo.

El diagnóstico del cáncer de pulmón microcítico (CPM) suele ser más complicado, desde el punto de vista histológico.<sup>41</sup> Los pacientes con CPM presentan características clínicas y radiológicas específicas (ej. linfangitis, invasión mediastínica). En cuanto a la IHQ, los CPM son positivos para TTF-1 y negativos para la CK 34βE12;<sup>42-43</sup> normalmente tienen positividad para marcadores de diferenciación neuroendocrina (ej. cromogranina A, enolasa neuroespecífica -*NSE*-, molécula de adhesión a células neurales -*NCAM*-, sinaptofisina). No obstante, estos marcadores

neuroendocrinos no pueden ser usados para distinguir un CPM de un CPNM porque aproximadamente el 10% de los CPNM presentan inmunorreactividad por alguno de ellos.<sup>44</sup> En estudios recientes se sugiere que la expresión de microRNAs (miRNA) puede ser útil para el diagnóstico diferencial entre microcítico y no microcítico.<sup>45</sup>

### 1.1.6 Estadificación

El sistema internacional de estadificación del cáncer de pulmón es adoptado por consenso y revisado periódicamente por el *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, la *Union Internationale Contre le Cancer (UICC)* y la *Association of the Study of Lung Cancer (IASLC)*.<sup>46-50</sup> Se basa en el sistema TNM (tumor, ganglio [node] y metástasis) y es publicado por la *AJCC*; en la actualidad la referencia es la 7ª edición, publicada en 2010.<sup>51</sup> La estadificación patológica se basa en la información clínica (anamnesis, exploración física y estudios de imagen) y en procedimientos diagnósticos invasivos (ej. toracotomía, mediastinoscopia). El esquema de la clasificación TNM se puede ver en las figuras 2 y 3.

Definitions		ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS	
<b>Primary Tumor (T)</b>		Overall Carcinoma	T1 N0 M0
<b>Tx</b> Primary tumor cannot be assessed, or tumor proven by the presence of malignant cells in sputum or bronchial washings but not visualized by imaging or bronchoscopy	<b>T3</b> Tumor more than 7 cm or one that directly invades any of the following: parietal pleural (PL3), chest wall (including superior sulcus tumors), diaphragm, pleural nerve, mediastinal pleura, parietal pericardium, or tumor in the main bronchus less than 2 cm distal to the carina <sup>1</sup> but without involvement of the carina; or associated atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung or separate tumor nodule(s) in the same lobe	Stage 0	Tis N0 M0
<b>T0</b> No evidence of primary tumor	<b>T4</b> Tumor of any size that invades any of the following: mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, catina, separate tumor nodule(s) in a different (ipsilateral) lobe	Stage IA	T1a N0 M0
<b>Tis</b> Carcinoma in situ		Stage IB	T1b N0 M0
<b>T1</b> Tumor 3 cm or less in greatest dimension, surrounded by lung or visceral pleura, without bronchoscopic evidence of invasion more proximal than the lobar bronchus (for example, not in the main bronchus) <sup>2</sup>		Stage IIA	T1a N1 M0
<b>T1a</b> Tumor 2 cm or less in greatest dimension		Stage IIB	T1b N1 M0
<b>T1b</b> Tumor more than 2 cm but 3 cm or less in greatest dimension		Stage IIIA	T1a N2 M0
<b>T2</b> Tumor more than 3 cm but 7 cm or less or tumor with any of the following features (T2 tumors with these features are classified T2a if 5 cm or less): involves main bronchus, 2 cm or more distal to the carina; invades visceral pleura (PL1 or PL2); associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung		Stage IIIB	T1b N2 M0
<b>T2a</b> Tumor more than 3 cm but 5 cm or less in greatest dimension		Stage IIIC	T1a N3 M0
<b>T2b</b> Tumor more than 5 cm but 7 cm or less in greatest dimension		Stage IVA	T1b N3 M0
		Stage IVB	T2a N3 M0
		Stage IVC	T2b N3 M0
		Stage V	T3 N3 M1a
			T4 N3 M1b
			Any T Any N M1a
			Any T Any N M1b

Distant Metastasis (M)	
<b>M0</b> No distant metastasis	
<b>M1</b> Distant metastasis	
<b>M1a</b> Separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe, tumor with pleural nodules or malignant pleural (or pericardial) effusion <sup>2</sup>	
<b>M1b</b> Distant metastasis (in extrathoracic organs)	

Notes	
<sup>1</sup> The uncommon superficial spreading tumor of any size with its invasive component limited to the bronchial wall, which may extend proximally to the main bronchus, is also classified as T1a.	
<sup>2</sup> Most pleural (and pericardial) effusions with lung cancer are due to tumor. In a few patients, however, multiple cytopathologic examinations of pleural (pericardial) fluid are negative for tumor, and the fluid is nonbloody and is not an ascites. Where these elements and clinical judgment dictate that the effusion is not related to the tumor, the effusion should be excluded as a staging element and the patient should be classified as M0.	

Figura 2. Estadificación TNM del cáncer de pulmón. Criterios de la AJCC.<sup>51</sup>

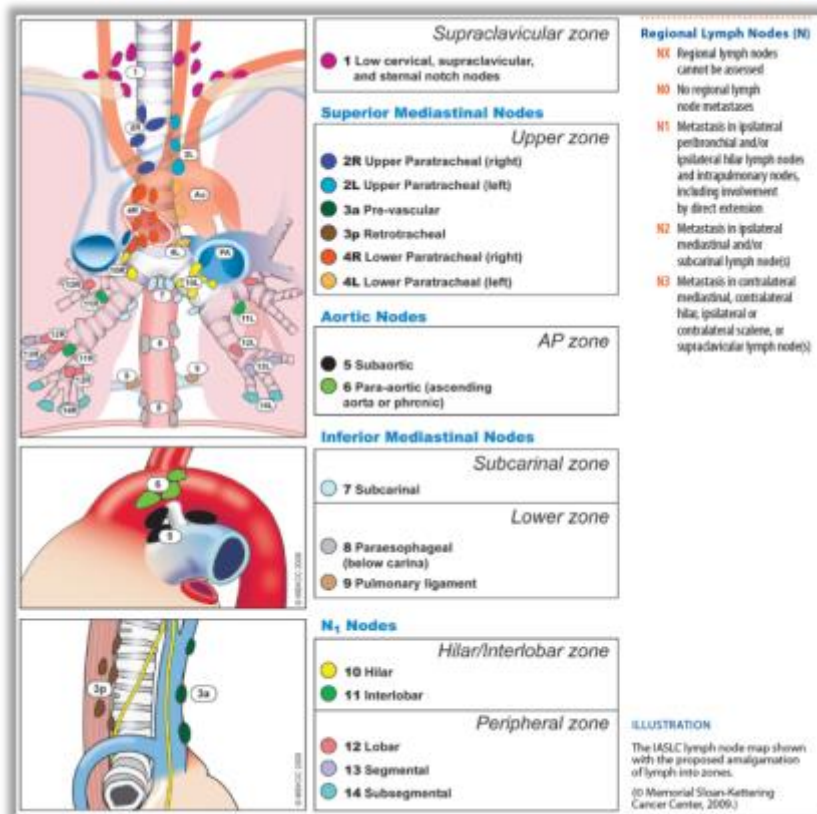


Figura 3. Ganglios linfáticos regionales de interés en la estadificación del cáncer de pulmón.<sup>51</sup>

### 1.1.7 Factores pronósticos y predictivos

Un marcador *pronóstico* es un indicador de la supervivencia del paciente con independencia del tratamiento que reciba, es decir, es un indicador de la agresividad innata del tumor. Un marcador *predictivo* es un indicador de la eficacia terapéutica, es decir, existe una relación entre la molécula y el tratamiento de cara al resultado terapéutico en el paciente.

Clásicamente, los factores relacionados con el pronóstico en cáncer de pulmón han sido el sexo, el hábito tabáquico, el estadio de la enfermedad y el estado general del paciente (o *performance status*, *PS* del *Eastern Cooperative Oncology Group*). Se sabe que son factores de buen pronóstico en el CPNM el diagnóstico en un estadio temprano, un buen estado general (o *PS* de 0, 1 o 2), la ausencia de pérdida de peso (menos del 5% del peso previo al diagnóstico) y el sexo femenino.<sup>52</sup>

En los últimos años han surgido múltiples marcadores pronósticos y predictivos para el CPNM. Entre éstos, los que mayor evidencia han demostrado son *EGFR*, la endonucleasa 5' del complejo reparador por excisión de nucleótidos (*ERCCI*), el oncogen k-ras, la subunidad reguladora de la reductasa de ribonucleótido (*RRMI*) y el

oncogen de fusión *EML4-ALK* (resultado de la fusión entre *echinoderm microtubule-associated protein-like 4 [EML4]* y *ALK*).

**Mutaciones de EGFR** – *EGFR* es un receptor transmembrana que se detecta en aproximadamente el 80-85% de los pacientes con CPNM. Las mutaciones más comúnmente encontradas son deleciones en el exón 19 (E19del, en el 45% de los pacientes) y una mutación en el exón 21 (L858R, en el 40%). Ambas mutaciones dan lugar a una activación del dominio tirosin kinasa, y en ambos casos se asocia con sensibilidad al tratamiento con inhibidores tirosin kinasa (ITKs): erlotinib y gefitinib.<sup>53-55</sup> Estas mutaciones se encuentran en aproximadamente el 10% de los pacientes caucásicos y en hasta el 50% de los asiáticos.<sup>56</sup> Otras mutaciones sensibles al tratamiento son las mutaciones puntuales en el exón 21 (L861Q) y el exón 18 (G719X).<sup>57</sup> La mutación T790M se asocia con resistencia al tratamiento con ITKs y se ha confirmado en el 50% de pacientes con progresión de la enfermedad.<sup>58-60</sup>

El análisis mutacional del ADN es el método preferido para conocer el estado del *EGFR*, aunque la hibridación in situ fluorescente (*FISH*, para determinar el número de copias del gen) y la IHQ (para determinar el nivel de expresión) también se usan.<sup>61-63</sup> Para determinar el estado mutacional del *EGFR* en las células tumorales se pueden usar varios mecanismos de detección de mutaciones en el ADN. La secuenciación directa del ADN en los exones 18-21 (o simplemente en los exones 19 y 21) es un procedimiento razonable, no obstante existen métodos más sensibles.<sup>56, 62, 64-66</sup> La técnica de screening de mutaciones múltiples (*SNaPshot Multiplex System*) puede detectar más de 100 mutaciones puntuales, incluyendo *EGFR*.<sup>67</sup> Sería mejor poder determinar el estado mutacional del *EGFR* en el tumor primario antes de iniciar el tratamiento que en las metástasis, aunque no existe un consenso a este respecto.

El efecto pronóstico de las mutaciones del *EGFR* -E19del y L858R- no está claro.<sup>53</sup> Sin embargo, sí está claramente definido su valor predictivo de respuesta al tratamiento con ITKs. La tasa de respuestas objetivas en pacientes con CPNM de histología no escamosa y mutación del *EGFR* (53% E19del, 26% L858R y 21% otras mutaciones) fue del 55%, con una mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) de 9,2 meses.<sup>55</sup> En pacientes tratados en primera línea con quimioterapia con o sin erlotinib, la mutación del *EGFR* fue predictiva de una mejor respuesta en los pacientes que recibieron el ITK (53% en pacientes con la mutación frente al 18% en aquellos sin



la mutación).<sup>32</sup> La tasa de respuesta en el grupo de los pacientes que sólo recibieron quimioterapia fue del 21% para los mutados y del 27% para los no mutados. Datos recientemente publicados sugieren que erlotinib podría ser usado como primera línea sistémica (en lugar de una primera línea estándar con quimioterapia) en pacientes con mutación del *EGFR*.<sup>68-71</sup> Los datos muestran que la SLP mejora con el uso de ITKs en pacientes con mutación del *EGFR* comparado con la quimioterapia estándar; la supervivencia global (SG) no es estadísticamente relevante.

**Reordenamiento de EML4-ALK** – Se estima que aproximadamente el 2-7% de los pacientes con CPNM presentan reordenamiento de los genes *EML4-ALK*.<sup>42</sup> Estos pacientes son resistentes a los ITKs frente al *EGFR* pero sus características son similares a los que la presentan (ej. adenocarcinoma, no fumadores) con la salvedad de que suelen ser más jóvenes y varones. En poblaciones seleccionadas con estas características hasta en el 30% de los casos se encontraría este reordenamiento génico.<sup>72</sup> Las mutaciones del *EGFR* y el reordenamiento *EML4-ALK* se consideran mutuamente excluyentes<sup>73</sup> (aunque se han comunicado casos en los que ambas alteraciones están presentes<sup>74</sup>), por este motivo los ITKs no serían eficaces en segunda línea de tratamiento en los pacientes con reordenamiento de *ALK* que progresan a crizotinib, un ITK frente a *ALK* y *MET*.<sup>72, 75</sup>

La detección del reordenamiento de *ALK* se puede realizar por IHQ o por *FISH*, aunque este último presenta una mayor sensibilidad.<sup>76-78</sup> Crizotinib ha demostrado una alta tasa de respuesta (> 80%) y una mejora de la supervivencia en pacientes con CPNM que presentan el reordenamiento *EML4-ALK* y que han progresado a los tratamientos previos.<sup>34</sup> Crizotinib es un fármaco oral con muy pocos efectos adversos: elevación de las transaminasas o neumonitis.<sup>79</sup> La respuesta alcanzada con este fármaco es rápida, aunque los pacientes suelen desarrollar resistencia al año del tratamiento.<sup>80</sup> Está en marcha un ensayo fase III (PROFILE-1007) comparando crizotinib con la quimioterapia estándar de segunda línea.

**Nivel de expresión de ERCC1** – *ERCC1* es la endonucleasa 5' del complejo reparador por excisión de nucleótidos. Se encuentra en todas las células tumorales aunque su nivel de expresión varía ampliamente. En los pacientes con CPNM resecao que no recibieron quimioterapia ni radioterapia perioperatoria, los niveles de ARNm de *ERCC1* fueron pronósticos de supervivencia.<sup>81-82</sup> Se han llevado a cabo múltiples estudios en los que se ha observado que los niveles de *ERCC1* son predictivos de la

eficacia de la quimioterapia basada en platino en el CPNM; niveles elevados se asocian con resistencia, mientras que niveles bajos se asocian con sensibilidad.<sup>82-83</sup>

**Mutaciones en K-ras** – K-ras es una proteína de unión al GTP que se encuentra asociada a una proteína G receptora. En su forma mutada, K-ras se encuentra activada y es capaz de promover la proliferación celular y aumentar la supervivencia de la célula. Los datos actuales muestran que aproximadamente el 25% de los adenocarcinomas de pulmón tienen mutaciones en K-ras.<sup>32, 54, 84</sup> Esta prevalencia de la mutación está asociada con el hábito tabáquico.<sup>85</sup> El estado mutacional de K-ras es un factor pronóstico de supervivencia, siendo menor en los pacientes mutados que en aquellos con K-ras salvaje (*wild-type*).<sup>84, 86-87</sup> La mutación de K-ras es predictivo de respuesta al tratamiento con ITKs frente al *EGFR*;<sup>32, 54</sup> la adición de erlotinib a la quimioterapia en pacientes con K-ras mutado parece interferir negativamente en la eficacia de la quimioterapia.<sup>32</sup>

**Nivel de expresión de RRM1** – *RRM1* es el gen que codifica la subunidad reguladora de la reductasa de ribonucleótido, que es crucial para la producción de desoxinucleótidos a partir de nucleótidos.<sup>88-89</sup> En los pacientes con CPNM resecaado que no recibieron quimioterapia ni radioterapia perioperatoria, los niveles de ARNm son pronósticos de supervivencia: aquellos que poseen niveles elevados viven significativamente más que los que tienen niveles bajos.<sup>90</sup> Si la expresión tumoral de *RRM1* es alta, la mediana de SG es mayor de 120 meses, comparado con los 60,2 meses para los pacientes con baja expresión tumoral de *RRM1*.<sup>91</sup> Asimismo se ha comprobado que los niveles in situ de proteína *RRM1* están correlacionados de forma inversa y significativa con la respuesta a gemcitabina o al doblete carboplatino/gemcitabina ( $P=0,001$ ,  $r=-0,41$ ); es decir, la respuesta es mejor en los pacientes con niveles bajos de expresión de *RRM1*.<sup>83</sup>

### 1.1.8 Tratamiento del CPNM

Las opciones de tratamiento en el CPNM son fundamentalmente cirugía, radioterapia (RT) y quimioterapia (QT). La indicación de cada uno de ellos, solos o en combinación, viene marcada por el estadio de la enfermedad al diagnóstico. La decisión terapéutica de todo paciente con CPNM debería ser tomada en el seno de un comité multidisciplinario donde estén representados los especialistas implicados en el diagnóstico y tratamiento del paciente con cáncer de pulmón (neumólogo, radiólogo,

anatomopatólogo, cirujano torácico, oncólogo radioterapéutico y oncólogo médico). Esto facilita la coordinación entre los diferentes especialistas implicados, disminuyendo los retrasos en el tratamiento del paciente y mejorando los resultados del mismo.

**Cirugía** – La cirugía es el principal medio para la curación de aquellos pacientes diagnosticados en estadios iniciales (I o II). En todo paciente con indicación de resección tumoral debe ser valorada la resecabilidad y la estadificación quirúrgica de la lesión tumoral. El tipo de procedimiento quirúrgico dependerá de la extensión del tumor y de la reserva funcional pulmonar del paciente. Se prefiere la realización de lobectomía sobre neumonectomía, siempre que anatómicamente sea posible y se logre una resección con márgenes quirúrgicos libres. Asimismo, la reserva funcional postquirúrgica ha de ser óptima.<sup>92-93</sup> Las resecciones de un segmento pulmonar (segmentectomía), o en cuña, pueden ser realizadas en pacientes seleccionados: mala reserva funcional pulmonar o alguna co-morbilidad que contraindique la lobectomía, y un nódulo periférico  $\leq 2$  cm con características de bajo riesgo (AIS puro,  $\leq 50\%$  de su tamaño tenga apariencia de vidrio deslustrado en el TC o que en el seguimiento radiológico se confirme un tiempo de duplicación del tamaño  $\geq 400$  días). El objetivo con estas técnicas menos agresivas ha de ser conseguir un margen de resección  $\geq 2$  cm o mayor o igual al tamaño del nódulo tumoral.<sup>94-95</sup> Si el tratamiento quirúrgico conlleva una neumonectomía, es imperativo realizar un muestreo sistemático de los ganglios linfáticos (uno o dos ganglios por cada estación mediastínica: 2R, 4R, 7, 8 y 9 si es del lado derecho; y 4L, 5, 6, 7, 8 y 9 si es del lado izquierdo).<sup>96</sup> En la figura 3 se muestran las estaciones ganglionares hiliares y mediastínicas.<sup>97</sup>

**Radioterapia** – La RT puede ser usada como tratamiento adyuvante para pacientes con CPNM tras la cirugía, como tratamiento local inicial en aquellos pacientes que no pueden ser operados o con tumores irresecables y/o como tratamiento paliativo en pacientes con CPNM incurable. La RT estereotáctica ablativa (*SABR*) se recomienda para pacientes con estadios iniciales de CPNM que son inoperables, para pacientes ancianos o en los que se contraindique la cirugía y en pacientes que no quieran ser operados. La quimio-radioterapia radical está indicada en pacientes con enfermedad localmente avanzada (estadios II-III) que son inoperables.<sup>98</sup> En pacientes con enfermedad avanzada (estadio IV) y metástasis a distancia, la RT paliativa se puede usar a nivel del primario o en localizaciones a distancia. Se debería evitar la quimio-radioterapia preoperativa de cara a evitar la toxicidad pulmonar post-neumonectomía.

No obstante, esto es controvertido.<sup>99-100</sup> La *SABR* se administra en ciclos cortos con muy altas dosis de radiación que actúan sobre la lesión.<sup>101-103</sup> En los pacientes con CPNM estadio I inoperables *SABR* consigue una mediana de SG de 32 meses y una SG a los 3 años del 43%, mientras que el tratamiento convencional consigue una SG a los 3 años del 20-35%.<sup>104-105</sup> Otra técnica radioterápica que ofrece buenos resultados en pacientes con estadios iniciales inoperables es la radiocirugía (*radiofrequency ablation, RFA*). Los candidatos óptimos a este tratamiento son aquellos que presentan una lesión única periférica menor de 3 cm, pudiendo ser utilizada sobre tejido previamente irradiado y en indicaciones paliativas.<sup>106</sup> En un estudio con 33 pacientes con CPNM se observó una SG del 70% (95%IC 51-83%) al año y del 48% (95%IC 30-65%) a los 2 años, llegando al 75% (95%IC 45-92%) a los 2 años en los pacientes con estadio I (n=13).<sup>107</sup> La tasa de mortalidad específica del procedimiento fue del 2,6%.<sup>108</sup>

En el tratamiento del CPNM, la cirugía ofrece las mayores posibilidades de curación para los pacientes con enfermedad en estadios iniciales (I y II) que puedan tolerar la cirugía y no presenten contraindicaciones. Asimismo, la *SABR* debe ser considerada en aquellos pacientes con estadio I irresecables o que rechazan la cirugía. En los pacientes en los que se logra una cirugía con resección completa del tumor, la quimioterapia (QT) ha demostrado mejoría en la supervivencia de los pacientes con enfermedad temprana<sup>109-111</sup> (las bases del tratamiento quimioterápico se desarrollaran en el apartado “Papel de la quimioterapia en el CPNM avanzado”). La quimio-radioterapia concomitante es superior al tratamiento secuencial para los paciente con estadios III irresecables.<sup>112-115</sup> En los pacientes con CPNM estadio IV y buen *PS* el tratamiento indicado es la QT basada en platino.<sup>115-118</sup> La cirugía raramente está indicada en pacientes con enfermedad avanzada, aunque la resección de metástasis única en glándula suprarrenal o en cerebro mejora la supervivencia de pacientes seleccionados.<sup>119</sup>

### **1.1.9 Tratamiento sistémico en el CPNM avanzado**

Los pacientes con CPNM estadio IV que tienen un buen *PS* se benefician del tratamiento con QT, por lo general un régimen basado en platino.<sup>116-117</sup> Muchos fármacos son eficaces en estadios avanzados de CPNM. Entre ellos se encuentran las sales de platino (cisplatino y carboplatino), los taxanos (paclitaxel y docetaxel), vinorelbina, vinblastina, etopósido, pemetrexed y gemcitabina. El uso combinado de varios de estos agentes da lugar a tasas de supervivencia a un año de entre el 30% al

40%, siendo mayores que el uso de los fármacos de manera individual. Entre estos regímenes se encuentran: carboplatino-paclitaxel, cisplatino-paclitaxel, cisplatino-vinorelbina, cisplatino-gemcitabina, cisplatino-pemetrexed o cisplatino-docetaxel.<sup>120-124</sup> Los ensayos fase III realizados han demostrado que la mayoría de los dobles con platino obtienen unas tasas objetivas de respuesta y una supervivencia similares.<sup>125-126</sup>

El tipo de tratamiento sistémico dependerá del tipo histológico, el estado mutacional del *EGFR* y el *PS*. El tratamiento indicado en las metástasis a distancia que provocan síntomas localizados es la RT externa.<sup>127</sup> En las metástasis óseas está indicado el uso del tratamiento con bifosfonatos, y en los últimos tiempos con denosumab, un anticuerpo monoclonal frente al ligando de *RANK*.<sup>128-129</sup>

En los pacientes con CPNM sin mutación del *EGFR* está indicado el tratamiento sistémico con cisplatino-pemetrexed.<sup>124</sup> Un estudio de no-inferioridad comparando cisplatino-gemcitabina frente a cisplatino-pemetrexed demostró una mayor SG en adenocarcinomas (12,6 vs 10,9 meses) favorable al grupo tratado con pemetrexed. Además, cisplatino-pemetrexed presentaba menores tasas de neutropenia grado 3-4, anemia, trombopenia, neutropenia febril y alopecia. Un análisis reciente de 3 ensayos fase III confirma que el pemetrexed mejora la SG de los pacientes con CPNM no-escamoso, tanto en primera línea, en segunda línea como en mantenimiento.<sup>130</sup>

El tratamiento con carboplatino-paclitaxel-bevacizumab en el ensayo ECOG 4599, mostró una mejoría en la mediana de SG (12,3 vs 10,3 meses) frente al grupo que no recibió bevacizumab.<sup>131</sup> La SG al año fue del 51% vs 44% y a los 2 años del 23% vs 15% respectivamente, a favor del brazo con bevacizumab. Un análisis reciente de este estudio encontró una asociación entre la histología de adenocarcinoma y una mayor supervivencia (14,2 vs 10,3 meses).<sup>132</sup> No obstante, el ensayo AVAiL que comparó cisplatino-gemcitabina con o sin bevacizumab, no demostró ningún beneficio en supervivencia al añadir bevacizumab.<sup>133</sup>

Los datos demuestran que el tratamiento combinado de dos quimioterápicos, uno de ellos un platino, es superior al mejor tratamiento de soporte en los pacientes con CPNM avanzado e incurable. Cisplatino y carboplatino han demostrado beneficio en asociación con docetaxel, etopósido, gemcitabina, paclitaxel, pemetrexed, vinblastina y vinorelbina.<sup>120-124, 134-135</sup> Otros regímenes sin platino pueden ser alternativas eficaces (gemcitabina-docetaxel, gemcitabina-vinorelbina).<sup>136-138</sup>

Los pacientes en tratamiento deben ser evaluados mediante TC. Aproximadamente un 25% de los pacientes presentan progresión de la enfermedad tras el primer ciclo de QT. Los pacientes con respuesta o estabilización de la enfermedad pueden continuar con el tratamiento hasta un total de 4-6 ciclos de QT<sup>139</sup> o hasta la progresión. Un meta-análisis reciente sugiere que continuar el régimen inicial más de 4-6 ciclos se asocia con un incremento de la SLP, aunque estos pacientes presentan más efectos adversos.<sup>140</sup> Otras revisiones sugieren que no existe beneficio en continuar la QT más allá de 4-6 ciclos, aunque hay que reseñar que en estos estudios, los pacientes nunca llegan a recibir el número planeado de ciclos de tratamiento.<sup>141</sup>

Para los pacientes con CPNM no escamoso con la mutación del *EGFR* negativa, el tratamiento de mantenimiento incluye bevacizumab, cetuximab, pemetrexed o gemcitabina.<sup>131, 142-143</sup> Los regímenes aceptados para hacer el *switch* para mantenimiento en estos pacientes incluye el pemetrexed o el erlotinib.<sup>144-145</sup> Otra opción válida es el seguimiento hasta la progresión. Para los pacientes con CPNM de histología escamosa, cetuximab o gemcitabina son los regímenes indicados como mantenimiento de continuación.<sup>144</sup> En el tratamiento de *switch* se encuentran el erlotinib o el docetaxel. También existe la opción del seguimiento. Un ensayo fase III con 663 pacientes con CPNM que habían recibido QT basada en platino en primera línea pero que no habían llegado a progresar, obtuvieron un aumento en la SG de 15,5 meses tras pemetrexed de mantenimiento, frente a 10,3 meses de los pacientes que recibieron placebo (p=,002).<sup>145</sup>

Se ha comprobado que los pacientes obtienen beneficio del tratamiento con erlotinib o gefitinib tras la progresión de la enfermedad. El cese en el tratamiento con estos ITKs genera una progresión más rápida de lo habitual (síntomas, tamaño tumoral y avidéz por el FDG en el PET-TC).<sup>146</sup> Los datos existentes apoyan el uso continuado del erlotinib o gefitinib en pacientes con adenocarcinoma de pulmón que presenta mutación del *EGFR* tras el desarrollo de resistencias adquiridas a estos ITKs, cuando se inicia la QT convencional. El mecanismo más habitual de resistencia es la aparición de una mutación secundaria en *EGFR* -T790M-.<sup>147-148</sup> La amplificación del oncogén *MET* es otro mecanismo de resistencia. La activación de la vía del *IGF-1R* se ha comprobado en modelos experimentales. Para tratar estos tres tipos de resistencia, es fundamental continuar inhibiendo *EGFR*. En el caso de la amplificación de *MET* y de la activación de *IGF-1R*, se deben administrar nuevos inhibidores. Asimismo, en el caso de tumores

sensibles al tratamiento con ITKs que progresan, el retirar el tratamiento de estos ITKs puede dar lugar a una progresión acelerada del tumor.<sup>146</sup>

En segunda línea del CPNM con enfermedad diseminada los medicamentos activos tienen tasas de respuesta de en torno al 10%. Docetaxel, pemetrexed, erlotinib o los dobles con platino se recomiendan como segunda línea de tratamiento en pacientes con buen estado general (*PS* 0-2) y que han progresado durante o al finalizar la primera línea de QT.<sup>149-152</sup> El docetaxel ha demostrado superioridad frente al mejor tratamiento de soporte (*best supportive care, BSC*), la vinorelbina o la ifosfamida, mejorando la supervivencia y la calidad de vida; el docetaxel puede ser usado en tercera línea de tratamiento.<sup>149-150</sup> Cuando se compara con el docetaxel, el pemetrexed tiene una mediana de supervivencia similar, pero es menos tóxico.<sup>151</sup> El pemetrexed se recomienda en pacientes con adenocarcinoma o histología de célula grande (no escamoso) tanto en segunda como en tercera línea.<sup>145</sup> Erlotinib ha demostrado mejoría frente al *BSC* con incremento significativo de la supervivencia y retraso en el tiempo a deterioro sintomático.<sup>152</sup> Erlotinib se recomienda para segunda o tercera línea de tratamiento en pacientes en progresión y mal estado general (*PS* 3-4) con mutación del *EGFR*.

Si se produce progresión a la enfermedad tras la tercera línea de QT, los pacientes con un *PS* de 0-2 podrían ser tratados con *BSC* u ofrecerles participar en un ensayo clínico.

#### **1.1.10 Tratamientos dirigidos**

En los últimos años se han desarrollado tratamientos frente a dianas específicas en el CPNM.<sup>153-154</sup> Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal recombinante que bloquea al factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*) aprobado para el tratamiento del CPNM no escamoso localmente avanzado, recurrente o metastásico. Se recomienda su uso en combinación con carboplatino y paclitaxel, basado en los resultados de un ensayo clínico fase II-III (ECOG 4599).<sup>131</sup> Erlotinib y gefitinib son dos ITKs frente al *EGFR* que se utilizan en el tratamiento del CPNM localmente avanzado o metastásico tras la progresión a un régimen de quimioterapia previo. También está aprobado su uso en primera línea de tumores no escamosos con mutación del *EGFR* o amplificación génica, con independencia del *PS*.<sup>32, 155-157</sup> Esta recomendación se basa en los resultados del estudio fase III *IPASS (Iressa® Pan-Asia study)* en el cual los

pacientes con mutación del *EGFR* que recibían gefitinib presentaban un aumento de la SLP (24,9 vs 6,7 meses), de la tasa de respuesta (71,2% vs 47,3%) y de la calidad de vida cuando se comparaban con los pacientes que recibían QT (carboplatino-paclitaxel).<sup>156</sup> Crizotinib es un ITK frente a *ALK* y *MET* que se ha aprobado en pacientes con CPNM localmente avanzado o metastásico que son positivos para el reordenamiento del gen *ALK*. Su aprobación se ha basado en un ensayo clínico fase II que demostró un incremento en la tasa de respuesta (> 80%) en pacientes que habían progresado al tratamiento previo.<sup>79</sup> Cetuximab es un anticuerpo monoclonal frente al *EGFR* que asociado al tratamiento quimioterápico con cisplatino-vinorelbina aumenta ligeramente la SG (11,3 vs 10,1 meses) (estudio FLEX).<sup>142</sup> Es una opción de tratamiento para el CPNM con independencia de la histología; aunque la dificultad para la administración, la mala tolerancia al mismo (40% de neutropenias grado 4) y el escaso beneficio clínico (aunque estadísticamente significativo) hacen que su uso sea escaso.

#### **1.1.11 Tratamiento de mantenimiento**

Los pacientes con CPNM avanzado tratados con QT en primera línea, que obtienen respuesta o estabilización de su enfermedad tras 4-6 ciclos, son candidatos a tratamiento de mantenimiento. Este tratamiento de mantenimiento puede ser *de continuación*, con uno de los agentes indicados en primera línea; o “*switch*”, con un agente diferente de los que se usaron en el régimen de primera línea. La selección del tratamiento de mantenimiento adecuado depende de varios factores (ej. histología tumoral, *PS*). En el tratamiento de continuación, un agente diana como el bevacizumab, podría mantenerse más allá de los 4-6 ciclos iniciales (asociado a un doblete con platino) hasta evidencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable, en pacientes con histología no escamosa.<sup>131, 158-159</sup> El pemetrexed también puede usarse como tratamiento de mantenimiento en CPNM no escamoso (sin mutación del *EGFR* o desconocida).<sup>158</sup> El estudio PARAMOUNT (un fase III) demostró que el tratamiento de continuación con pemetrexed aumenta la SLP cuando se compara con placebo (4,1 vs 2,8 meses).<sup>143</sup>

El uso del tratamiento de continuación depende de varios factores, el más importante es la toxicidad derivada de su administración. No existen ensayos aleatorizados que apoyen el tratamiento de continuación más allá de 6 ciclos.<sup>141</sup> La



mayoría de los oncólogos creen que el tratamiento debe mantenerse siempre que el paciente se encuentre en respuesta al tratamiento de QT y que la toxicidad derivada sea aceptable por el paciente.

En cuanto al tratamiento de *switch*, recientemente se han publicado dos ensayos aleatorizados fase III que muestran un beneficio en SLP y SG al iniciar pemetrexed o erlotinib tras completar 4-6 ciclos de la QT de primera línea en pacientes sin progresión de la enfermedad.<sup>144-145</sup> El *switch* con pemetrexed se podría iniciar en pacientes con histologías diferentes al carcinoma escamoso que sean *EGFR* no mutado o desconocido.<sup>145</sup> Por otra parte, el *switch* con erlotinib se podría realizar en pacientes con o sin mutación del *EGFR* o con carcinoma escamoso.<sup>160</sup>

## 1.2 Pemetrexed

Pemetrexed (P) es un antifolato sintético basado en una pirrolo[2,3-d]pirimidina, que posee un efecto antitumoral alterando los procesos metabólicos dependientes de folato que son fundamentales para la replicación celular (Figura 4).

La síntesis del pemetrexed tuvo lugar gracias al trabajo combinado de E.C. Taylor en Princeton y un equipo de químicos de Eli Lilly, liderados por Chuan Shih, quienes se encontraban desarrollando antifolatos sintéticos que pudieran inhibir enzimas dependientes del cofactor tetrahidrofolato (THF). Inicialmente desarrollaron un inhibidor de la síntesis de purinas *de novo*, el 5,10-dideazatetrahidrofolato (lometrexol).<sup>161</sup> Inicialmente se pensó que podía ser un inhibidor de timidilato sintasa (TS), aunque finalmente resultó ser un potente inhibidor del crecimiento de las células tumorales.<sup>162</sup> Posteriores estudios en laboratorio demostraron que lometrexol fue el primer antifolato inhibidor de la síntesis de purinas por acción directa sobre glicinamida ribonucleótido transferasa (GARFT). Lometrexol se realizó en un proceso complejo de 23 pasos, y el resultado era una molécula con una mezcla de diastereoisómeros en torno al carbono 6. Para intentar eliminar la quiralidad de este compuesto intentaron reemplazar el anillo 5-deazapteridina del lometrexol con un anillo de una pirrolopirimidina; esto dio lugar al compuesto LY231514 que posteriormente sería conocido como pemetrexed.<sup>163</sup> Los experimentos posteriores con cultivos celulares indicaron que el producto hallado era un potente inhibidor de la TS y también poseía una débil inhibición sobre otras dianas enzimáticas.<sup>164</sup>

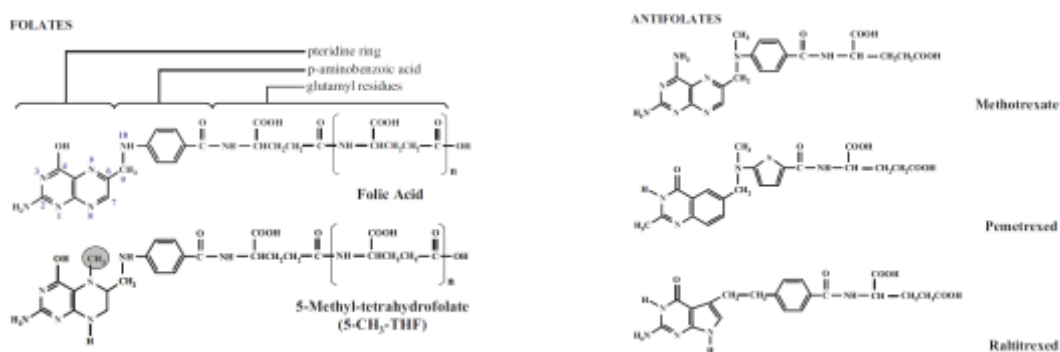


Figura 4. Estructura química de los folatos y antifolatos.<sup>165</sup>

### 1.2.1 Mecanismo de acción de los antifolatos

Los procariotas y las plantas poseen la capacidad de sintetizar folatos. Por el contrario, los mamíferos no pueden hacerlo y han de obtenerlos de la dieta. El tetrahidrofolato es esencialmente una vitamina, cuya forma más familiar es el ácido fólico. Los folatos que se encuentran en la naturaleza presentan tres componentes estructurales: un anillo pteridina, ácido p-aminobenzóico (PABA) y un residuo de glutamato (Figura 4).

Los coenzimas derivados del folato intervienen en la síntesis de purinas y timidilato, así como en la síntesis de grupos metilo. Los folatos que se encuentran en el interior de las mitocondrias se utilizan para el metabolismo de la glicina y la síntesis de proteínas mitocondriales.<sup>166</sup> El THF actúa como donante de unidades de carbono en una serie de reacciones metabólicas que tienen como fin la biosíntesis de purinas y timidilato, aminoácidos (metionina, serina y glicina), el catabolismo de la histidina y el ácido fórmico, y el metabolismo de grupos metilo como los que se encuentran en las regiones CpG del ADN metilado. La enzima GARFT participa en la formación del anillo imidazol de las purinas, mientras que AICARFT (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa) da lugar a una purina intermedia, el ácido inosínico. La TS cataliza la formación de timidina monofosfato (dTMP) a partir de dUMP. Colectivamente, todas estas enzimas dependientes de folato son responsables de la formación de nucleótidos de purina y timina *de novo* esenciales para la síntesis de ADN. El DHF (7,8-ácido dihidrofólico) es reducido para formar THF vía NADPH, mediado por la enzima dihidrofoloreductasa (DHFR). Esta reacción es una etapa importante en el reciclado de los cofactores THF que posteriormente serán reconvertidos en donantes de grupos metilo, dando lugar a un sistema cíclico (Figura 5).

La aminopterina (análogo del 4-amino ácido fólico) y el metotrexate (MTX, 4-amino-10-ácido metilfólico) fueron los primeros antimetabolitos que se ensayaron en la clínica oncológica para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de la infancia.<sup>167</sup> Posteriormente se han ido desarrollando nuevas generaciones de antifolatos, entre los que se incluye raltitrexed (ZD1694) y pemetrexed (LY231514). Aunque en 1948 el uso de la aminopterina inicialmente fue el de inhibir a DHFR, el mecanismo de acción exacto no fue conocido hasta 3 décadas después. Una vez los antifolatos son llevados hasta el interior de la célula por un sistema específico de transporte, éstos actúan bloqueando enzimas claves en el metabolismo del folato, dando lugar a una

síntesis anormal de purinas y timidilato, inhibiendo la replicación del ADN y conduciendo a la muerte celular. La aminopterina y el MTX inhiben de manera muy eficaz a DHFR. Los antifolatos de nueva generación presentan además una potente inhibición de otras enzimas importante en el metabolismo de los folatos: TS y AICARFT.<sup>165</sup> Es el caso del pemetrexed, que realiza su acción antineoplásica inhibiendo a la TS y secundariamente a GARFT.<sup>168</sup> Estudios recientes muestran que una diana importante también sería AICARFT.<sup>169</sup>

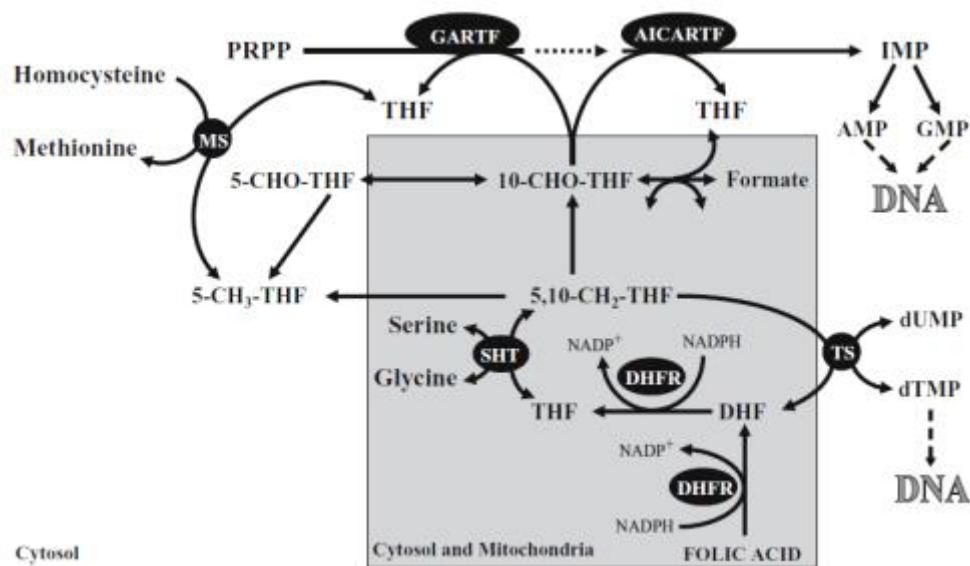


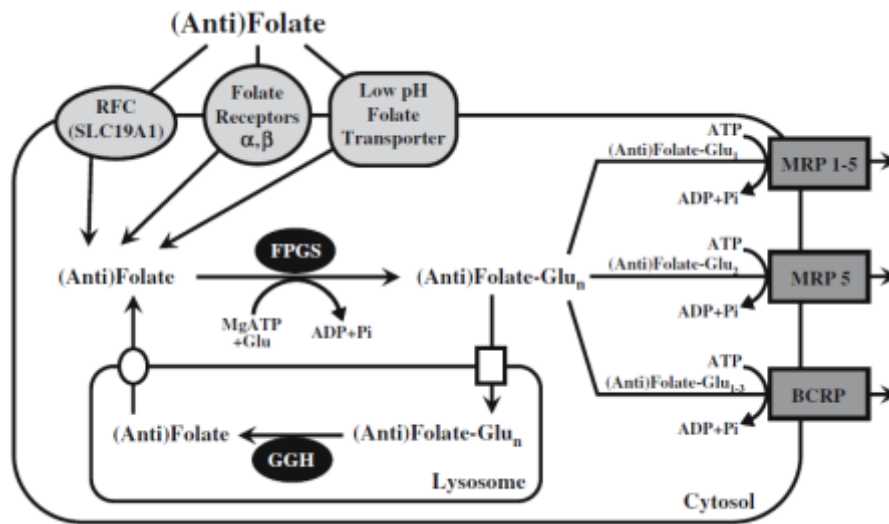
Figura 5. Metabolismo celular de los folatos y compartimentalización en la célula.<sup>165</sup>

### 1.2.2 Transporte intra y extracelular de los antifolatos

Tanto los folatos como los antifolatos son aniones divalentes en el pH fisiológico. Por este motivo, precisan de un sistema específico de transporte para atravesar la membrana celular. En el momento actual se conocen 3 sistemas de transporte que realizan esta función: el transportador de folatos reducidos (*RFC*, *reduced folate carrier*), el transportador de folato asociado a protones y los receptores de folatos (RFs) (Figura 6).

**Transportador de folatos reducidos** – Se trata de la principal vía de entrada de THF y antifolatos hidrofílico. [será comentado más adelante].

**Transportador de folato asociado a protones** – Descubierto recientemente, este transportador se expresa independientemente del *RFC* y funciona a pH ácido (5,5). Media la entrada de folatos oxidados (ej. ácido fólico) y reducidos (ej. 5-CH<sub>3</sub>-THF) así como varios antifolatos hidrofílicos, incluyendo el MTX y el pemetrexed. Se encuentra fundamentalmente en el intestino delgado.<sup>170-171</sup>



**Figura 6.** Influjos y eflujos de folatos/antifolatos mediados por transportadores. Síntesis e hidrólisis de la poliglutamilación.<sup>165</sup>

**Receptores de folatos** – Los RF designan a una familia de glicoproteínas de membrana que se unen a los folatos con gran afinidad. Se encuentran codificados por tres genes diferentes (RF $\alpha$ , RF $\beta$  y RF $\gamma$ ).<sup>172</sup> Los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  presentan una alta afinidad por el ácido fólico y el lometrexol pero muy poca por el MTX. El mecanismo de acción de estos receptores es el de una endocitosis mediada por receptor clásica. La expresión del RF $\alpha$  se limita a la superficie de determinadas células epiteliales; el RF $\beta$  tiene un patrón de expresión restringido (placenta, timo, bazo y células de la línea mielomonocítica). En las células en las que existe un bajo nivel de expresión del RFC, los niveles de RF son críticos para la captación intracelular de folatos.

Con respecto a la salida de folatos y antifolatos al exterior de la célula, éste depende en su totalidad de los transportadores *ABC* (*ATP-binding cassette*). Estos constituyen la familia más grande de proteínas transportadoras de membrana. Su función es la de translocar al exterior celular fármacos citotóxicos y/o substratos

endógenos mediante el uso de la energía obtenida a partir de la hidrólisis del ATP.<sup>173-174</sup> Algunos miembros de esta familia, como las proteínas de resistencia a drogas (*MRPs*, *multidrug resistance proteins*), son las encargadas de la salida al exterior de ácido fólico, THF y antifolatos hidrofílicos, con gasto de ATP.<sup>175</sup>

### 1.2.3 Mecanismos de resistencia a antifolatos

A pesar del desarrollo de antifolatos de nueva generación (MTX, pemetrexed, raltitrexed) continúan observándose resistencias innatas y adquiridas en las células tumorales. Con respecto a los antifolatos, se conocen múltiples mecanismos de resistencia, tanto *in vivo* como *in vitro*.

**Pérdida de función del RFC** – debido a una disminución en la expresión del gen del RFC y a una disregulación de la proteína transportadora. Tras haber sido observado *in vitro*, se realizaron estudios que comprobaron esta disminución en la expresión en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, osteosarcoma, cáncer colorrectal y linfoma primario del sistema nervioso central.<sup>176-178</sup> La alteración en el transporte de antifolatos ha sido asociada con alteraciones cuantitativas y cualitativas en la expresión del RFC y/o en su actividad transportadora.

**Sobreexpresión de MRPs** – *MRP1-5* tienen la capacidad de transportar folatos y antifolatos (MTX, raltitrexed y pemetrexed) fuera de la célula. *MRP5* puede además transportar folatos y antifolatos conjugados con glutamato (formas activas de los folatos/antifolatos a nivel intracelular). La sobreexpresión de estos transportadores daría lugar a resistencia frente a antifolatos.

**Sobreexpresión de DHFR** – un mecanismo frecuente de resistencia al MTX es la amplificación génica de la DHFR y la consecuente sobreexpresión del enzima.<sup>179</sup> El amplicón [segmento de ADN compuesto por múltiples copias de un gen] de la DHFR puede existir como una región cromosómica expandida y estable, o como una forma inestable que engloba pequeños fragmentos de cromatina nucleosomal (denominado *double minute*).

**Sobreexpresión de la TS** – la sobreexpresión de esta enzima, así como las mutaciones que disminuyen su afinidad por los antifolatos, son mecanismos de resistencia similares a los que se producen en relación con la DHFR. Los niveles de TS están estrechamente controlados por un mecanismo de *feed-back* negativo en el que la propia enzima interactúa con su ARNm controlando la transcripción. Esto permite una

rápida modulación de los niveles de TS requeridos para sintetizar dTTP, cruciales para la síntesis del ADN.<sup>180</sup> Mutaciones que afecten a la estructura de la TS también constituyen un mecanismo de resistencia a antifolatos.

**Alteraciones en la poliglutaminación** – para el correcto funcionamiento de los folatos y antifolatos en la célula, éstos han de ser poliglutaminados, es decir, se deben añadir residuos de glutamato a su molécula. Esta acción es realizada por la enzima folilpoli- $\gamma$ -glutamato sintetasa (FPGS) (Figura 5). Se puede producir una resistencia a los antifolatos por una disminución en la actividad de la FPGS debido a mutaciones, o por disminución de los niveles de FPGS sin alteración en los niveles de ARNm (lo que supondría que existen alteraciones post-transcripcionales).<sup>181</sup>

**Aumento de expresión de la  $\gamma$ -glutamil hidrolasa** – La  $\gamma$ -glutamil hidrolasa (GGH) es una glicoproteína lisosomal que hidroliza las cadenas de  $\gamma$ -poliglutamato unidas al THF y los antifolatos. La sobreexpresión de GGH resultaría en una disminución de la actividad de los antifolatos por la disminución de poliglutamatos, fundamentales para su correcto funcionamiento y evitar su salida al exterior celular mediado por las *MRPs*. No obstante esta hipótesis teórica aún no ha sido probada experimentalmente.

**Aumento de la THF intracelular** – la cantidad de enzima THF intracelular puede alterar el efecto citotóxico de los antifolatos. El mecanismo por el que un aumento en la concentración de THF da lugar a la resistencia a los antifolatos no está claro. La inhibición de la DHFR por los antifolatos como el MTX hace que el THF sea oxidado a DHF, aumentando la concentración de éste. Al tratarse DHF el sustrato con mayor afinidad por la DHFR, su mayor concentración intracelular competirá más eficientemente por la enzima que el antifolato, dando lugar a una menor inhibición de la enzima y como consecuencia, resistencia al antifolato. El aumento de la concentración intracelular de THF y DHF genera una competición por la FPGS lo que disminuye la poliglutaminación de los antifolatos, disminuyendo su acción y aumentando el eflujo de los mismos.<sup>182-183</sup>

#### **1.2.4 Eficacia terapéutica en el CPNM**

El uso de pemetrexed está aprobado para pacientes con CPNM con histología no escamosa, o predominantemente no escamosa.<sup>184</sup> No obstante, los ensayos clínicos

realizados han incluido pacientes con CPNM con histología escamosa y no escamosa, diferenciando los resultados según la histología.

En primera línea de tratamiento del CPNM avanzado, pemetrexed asociado a cisplatino no mostró inferioridad frente a la combinación gemcitabina/cisplatino en términos de supervivencia. La mediana de SG fue de 10,3 meses (HR 0,94; 95%IC 0,84-1,05) en ambos grupos de tratamiento. Las tasas de supervivencia a los 12 y 24 meses fueron de 43,5% y 18,9% en los pacientes tratados con pemetrexed/cisplatino y de 41,9% y 14,0% en aquellos que recibieron gemcitabina/cisplatino. En términos de SLP, la combinación pemetrexed/cisplatino tampoco fue inferior (4,8 vs 5,1 meses; HR 1,04; 95%IC 0,94-1,15). Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a respuestas objetivas (30,6 vs 28,2%) y duración de la respuesta (4,5 vs 5,1 meses). Todos los pacientes incluidos en este estudio presentaban un *PS* de 0 o 1. Cuando se evaluó la SG en relación con el subtipo histológico, la mediana fue significativamente ( $p < 0,03$ ) mayor con pemetrexed/cisplatino en los pacientes con adenocarcinoma (12,6 vs 10,9 meses;  $n=846$ ), carcinoma de células grandes (10,4 vs 6,7 meses;  $n=153$ ) y CPNM no escamoso (11,8 vs 9,4 meses;  $n=1000$ ). Por otra parte, la SG en los pacientes con carcinoma escamoso fue mayor en el grupo tratado con gemcitabina/cisplatino (10,8 vs 9,4 meses;  $n=473$ ). En cuanto a la SLP, los pacientes con histología no escamosa presentaron una mediana de 5,3 meses con pemetrexed/cisplatino frente a 4,7 meses con gemcitabina/cisplatino; mientras que aquellos con histología escamosa las medianas de SLP fueron de 4,4 vs 5,5 respectivamente. Otros factores con impacto pronóstico en la supervivencia ( $p < 0,05$ ) fueron el estadio, el *PS*, la raza y el sexo.<sup>124</sup>

En los estudios realizados para conocer el beneficio de pemetrexed en monoterapia en segunda línea de tratamiento, no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la mediana de SG entre pemetrexed (500 mg/m<sup>2</sup>) y docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>): 8,3 vs 7,9 meses.<sup>151</sup> Así como tampoco se observó entre administrar una dosis de pemetrexed estándar (500 mg/m<sup>2</sup>) o altas dosis (900 mg/m<sup>2</sup>): 6,7 vs 6,9 meses respectivamente.<sup>185</sup> La dosis se administraba el día 1 de un ciclo de 21 días. Tanto los pacientes que recibían pemetrexed como docetaxel, presentaban una mediana de supervivencia a los 12 meses del 29,7%. La SLP y la tasa de respuestas globales no mostraron diferencias significativas entre ambos tratamientos, ni entre las diferentes dosis de pemetrexed administradas (tasas de estabilización de la enfermedad del 45,8% para pemetrexed vs 46,4% para docetaxel; y del 50,6% para dosis estándar vs 53,1%



para dosis altas). Tampoco se observaron diferencias significativas entre el pemetrexed y el docetaxel en cuanto a la mediana de tiempo de respuesta (1,7 vs 2,9 meses), duración de la respuesta (4,6 vs 5,3) o duración del beneficio clínico (definido como el intervalo entre la aleatorización y progresión de la enfermedad o muerte; 5,4 vs 5,2 meses); no obstante, sí se observó que el tiempo al fallo del tratamiento (intervalo entre la aleatorización y progresión de la enfermedad, fin del tratamiento o muerte por otra causa) fue significativamente mayor en los pacientes que recibieron pemetrexed (2,3 vs 2,1 meses;  $p=0,046$ ; HR 0,84; 95% IC 0,71-0,997). Las tasas de mejoría de los síntomas (anorexia, astenia, tos, disnea, hemoptisis y dolor) no obtuvieron diferencias significativas entre los que recibieron pemetrexed y docetaxel.<sup>151</sup>

En cuanto a la terapia de mantenimiento, la mediana de SLP y la SG fueron significativamente ( $p<0,0001$  y  $p=0,012$ ) más altas en aquellos pacientes que recibieron pemetrexed y los mejores cuidados de soporte (*best supportive care, BSC*) que aquellos que recibieron placebo y *BSC* en CPNM avanzado. Los pacientes tratados con pemetrexed tenían mejores tasas de respuesta globales y de control de la enfermedad (respuestas completas y estabilizaciones: 49,1 vs 28,9%;  $p<0,0001$ ). En pacientes con histología no escamosa también se observó una mayor eficacia del pemetrexed en términos de SLP (4,4 vs 1,8 meses; HR 0,47; 95% IC 0,37-0,6;  $p<0,0001$ ) y SG (15,5 vs 10 meses; HR 0,70; 95% IC 0,77-1,50;  $p=0,002$ ).<sup>145</sup>

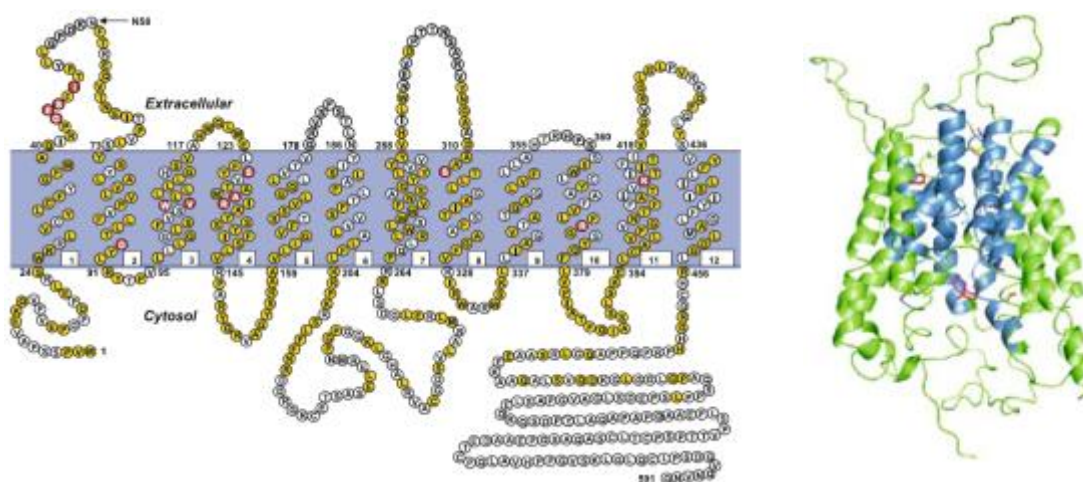
### **1.2.5 Efectos adversos**

Pemetrexed es un fármaco bien tolerado. Su perfil de toxicidad ha mejorado desde la administración rutinaria de suplementos de ácido fólico y cianocobalamina (vitamina B12), aunque la mielosupresión continúa siendo la toxicidad limitante de dosis más frecuente. Asimismo, el aporte de corticoides disminuye la incidencia y la gravedad de las reacciones cutáneas. Los efectos adversos (EA) más comunes en el tratamiento con pemetrexed en monoterapia (con una incidencia  $>20\%$  en los ensayos clínicos) son anorexia, astenia y náuseas. Cuando se administra combinado con cisplatino, a estos EA se incluyen anemia, estreñimiento, leucopenia, neutropenia, estomatitis, faringitis, trombopenia y vómitos; efectos éstos, más comúnmente producidos por los platinos.

### 1.3 Transportador de folatos reducidos (RFC)

El RFC es el transportador de folatos mejor caracterizado. Su expresión ubicua en los tejidos hace que sea considerado el sistema transporte de folatos y antifolatos más importante en las células y tejidos de los mamíferos. Asimismo es de gran relevancia en el transporte de los quimioterápicos antifolato: MTX, pemetrexed y raltitrexed, estando la efectividad de estos fármacos estrechamente ligada a la actividad del transportador.<sup>186-187</sup>

El RFC fue caracterizado a nivel molecular en 1960 por Goldman. Se trata de una proteína de aproximadamente 85 KDa, cuyo gen se encuentra codificado en el brazo largo del cromosoma 21 (21q22.3; SLCA19A1: *solute carrier family 19, member 1*). La proteína posee 12 dominios transmembrana (DTM), con los extremos amino- (N) y carboxi-terminal (C) orientados internamente y un loop que conecta los DTM 1-6 con los DTM 7-12. Se ha descrito una homología de en torno al 64-66% entre las secuencias génicas primarias de los humanos y los roedores, siendo completamente diferente en los extremos N- y C-terminal (figura 7).



**Figura 7.** Estructura esquemática del RFC humano (izquierda) y modelo 3D en visión lateral (derecha). En el esquema, los aminoácidos en amarillo se encuentran conservados en las especies estudiadas, los aminoácidos en rojo son aquellos de los que se conocen mutaciones importantes.<sup>188</sup>

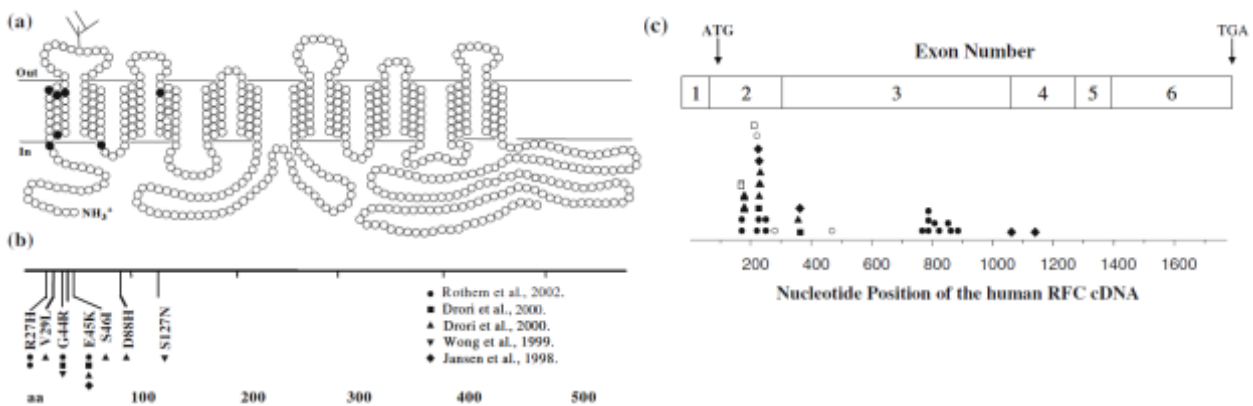
El funcionamiento del transportador es saturable a bajas concentraciones micromolares del sustrato. El transporte es dependiente de la temperatura del medio, independiente del sodio y es muy sensible a la competencia con otras moléculas. El pH óptimo de funcionamiento es el neutro, al menos en células de leucemia, en el epitelio

intestinal y en carcinoma de próstata. En diversos estudios se asoció un pH ácido con una mejor función de transporte. El transporte de folatos y antifolatos por medio del RFC sucede bidireccionalmente, no obstante, la salida a través del RFC es mínima, ya que el eflujo lo llevan a cabo las MRPs.<sup>188</sup>

Estudios de expresión del gen humano RFC realizados con *arrays* de ARNm, mostraron que los mayores niveles de transcripción del gen se hallan en la placenta, el hígado, leucocitos, riñón, pulmón, médula ósea, intestino y SNC (de mayor a menor nivel de ARNm).<sup>189</sup> Estudios en tejidos de ratón con técnicas de inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal frente al extremo C-terminal, mostraron la localización del RFC en la membrana basolateral del epitelio de los túbulos de corteza y médula renales, en la membrana de los hepatocitos, en la pulpa roja del bazo y en la zona apical de las vellosidades intestinales.<sup>190</sup> Estos resultados indican que el RFC se encuentra en múltiples tejidos, sobre todo en aquellos que participan de la absorción de los folatos de la sangre, en el tracto intestinal, el transporte transplacentario y en los túbulos renales. Debido a este papel fisiológico que juega, bajos niveles de RFC empeoran los efectos de la deficiencia de folatos que sucede en muchas enfermedades (cardiovasculares, defectos del tubo neural, neurológicas y cáncer). El RFC es fundamental en el desarrollo embrionario, ya que la ausencia de ambos alelos del gen RFC es letal en ratones durante el período embrionario.<sup>191</sup>

La disminución en el funcionamiento del RFC está relacionada con alteraciones cuantitativas y/o cualitativas en la expresión y/o la actividad transportadora de la proteína. Se han descrito diversas mutaciones que alteran el transporte modulando la afinidad por los folatos y antifolatos (aumentando la  $K_m$ ) o que dificultan la translocación del sustrato al interior celular (disminuyendo la  $V_{max}$ ). La mayoría de las mutaciones en el RFC humano se presentan agregadas en el primer segmento transmembrana, lo que sugiere un papel importante en el reconocimiento de la unión al sustrato y/o en la translocación al interior celular.<sup>192</sup> Un mecanismo de baja expresión del RFC es el silencio transcripcional del gen debido a una pérdida de función de los factores de transcripción que regulan su expresión en condiciones fisiológicas. Entre estos factores de transcripción alterados se encuentran: la familia Sp1, USF-1, AP-2, Ikaros, GATA y p53.<sup>193</sup> Otro mecanismo de silenciación génica que también ocurre en relación con el gen del RFC es la metilación de las zonas CpG (*CpG island*) en el promotor del gen. Esta metilación del promotor del *RFC* se observó por primera vez en

células de cáncer de mama que presentaban una resistencia inherente al MTX.<sup>194</sup> La inestabilidad genómica que caracteriza a diversos cánceres da lugar a un número de aberraciones cromosómicas. El locus del gen del RFC se encuentra en la región telomérica del cromosoma 21 (21q22.2-q22.3) lo que origina alteraciones en el número de copias del gen y/o en el estado de expresión. Se ha observado que la pérdida de alelos del *RFC* es un mecanismo de resistencia al tratamiento con antifolatos. Asimismo, translocaciones como la fusión de los cromosomas 21 y 22 pueden alterar la expresión del gen.<sup>195</sup>



**Figura 7.** Mutaciones en el RFC que implican un influjo alterado de folatos/antifolatos. Se representan a nivel de proteína (a, b) y a nivel génico (c).<sup>165</sup>

Recientemente se han descrito diversos polimorfismos del gen del RFC que predicen diferencias en la SG de los pacientes con CPNM tratados con pemetrexed. Los polimorfismos (o *SNPs*, *single nucleotide polymorphisms*) son diferencias en un nucleótido de un gen entre los individuos de una especie. Estas alteraciones genómicas dan lugar a variaciones en la normalidad. En el caso del gen *RFC*, se han descrito tres variantes [IVS4(2117)C>T, IVS5C>A, and exon6(2522)C>T] que confieren una mayor SG ( $p=0,03$ ).<sup>196</sup>

## 2 Objetivos

Además de los factores clásicos utilizados desde hace años en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de pulmón, es necesaria la búsqueda de nuevos elementos basados en los conocimientos moleculares, que ayuden a estratificar a los pacientes a recibir o no una quimioterapia que de por sí es tóxica y conlleva riesgos sobreañadidos a la propia enfermedad, o bien que ayuden a estrechar el seguimiento en aquellos que puedan tener un peor pronóstico.

En estudios previos se ha observado que los diferentes polimorfismos del gen codificante del *reduced folate carrier* están relacionados con la respuesta al tratamiento con pemetrexed en cáncer de pulmón no microcítico.

Hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio que valide la implicación pronóstica del nivel de expresión del *reduced folate carrier* en dichos tumores.

El objetivo fundamental de este trabajo es:

- Estudiar el valor predictivo de respuesta al tratamiento con pemetrexed en función de la expresión tumoral del *reduced folate carrier*.
- Valorar la relación de la expresión tumoral del *reduced folate carrier* con distintas variables clínico-patológicas conocidas (sexo, estado general, hábito tabáquico e histología).

### **3 Material y métodos**

### **3.1 Pacientes y características de las muestras**

Para este estudio se utilizó una muestra retrospectiva de pacientes que iniciaron tratamiento con pemetrexed en el Hospital Universitario Central de Asturias, entre julio de 2005 y julio de 2010. De los 290 pacientes registrados, se desecharon aquellos cuyo diagnóstico no fuera el de cáncer de pulmón y todos aquellos de los que no se dispusiera biopsia en el banco de tumores del Hospital Universitario Central de Asturias. El total de casos analizados en el estudio fue de 48.

Se utilizaron las muestras tumorales conservadas en bloques de parafina en el Servicio de Anatomía Patológica y el Banco de Tumores del Hospital Universitario Central de Asturias. Se analizaron 3 tipos de muestras: las obtenidas de la cirugía del tumor primario (25), las obtenidas de biopsia diagnóstica del tumor primario (1) y las obtenidas de biopsia diagnóstica de metástasis (7 de adenopatías, 5 óseas, 4 de sistema nervioso central, 2 de piel, 2 digestivas, 1 de pericardio y 1 de glándula suprarrenal resecada).

### **3.2 Estudio inmunohistoquímico**

El anticuerpo utilizado para la IHQ con RFC fue el RFC-1 (C-17) de Santa Cruz Biotechnology Inc. El RFC-1 (C17) es un inmunoglobulina G producida por inmunización animal (cabra) frente a un fragmento peptídico cercano al extremo C-terminal del RFC de origen humano.

Se elaboraron tissue microarrays (TMA: matrices de tejido) con las muestras obtenidas de los 48 casos. Para los TMA se tomaron tres muestras por caso y se elaboraron dos TMA, con una media de 30 muestras por bloque.

Para construir el TMA, se perforaron los bloques originales en las regiones tumorales seleccionadas previamente por el patólogo, utilizando agujas de 1 mm y un Tissue Microarrayer de la casa Beecher Instruments®. Estas se insertaron en un bloque nodriza que se homogenizó con todas las muestras en estufa de 37°C una noche, y se practicaron 30 cortes por bloque para estudios. Se realizó una sección adicional para control de calidad, comprobando que todos los tumores muestreados eran representados en el TMA.

Se colocaron secciones parafinadas de tres micras en cristales tratados Dako REAL Capillary Gap Microscope Slides®, que se mantuvieron en estufa a 56°C toda una noche. Posteriormente se procedió al desparafinado, rehidratación y recuperación



antigénica con el sistema PT-Link® (Dako) que permite realizar los 3 pasos en 1. La recuperación se realizó a una temperatura de 95°C durante 20 minutos a pH 9. La inmunotinción se realizó en Autostainer (Labvision Corporation). Las muestras se mantuvieron 5 minutos en un medio bloqueante de la actividad peroxidasa endógena y posteriormente se añadió el anticuerpo primario RFC-1, con una dilución de 1/200 en diluyente para anticuerpo de Dako, durante 30 minutos. Tras lavado con buffer se añadió el anticuerpo secundario, estreptavidina anti-goat, durante 30 minutos.

Posteriormente se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos y se reveló con el cromógeno Diamobenzidina (Dako DAB+) durante 10 minutos.

Finalmente se realizó contra-tinción con hematoxilina Dako durante 10 minutos, y posteriormente lavado en agua 10 minutos y deshidratación en alcoholes progresivos y xilol. El montaje se realizó con la resina sintética Entellan® (Merck).

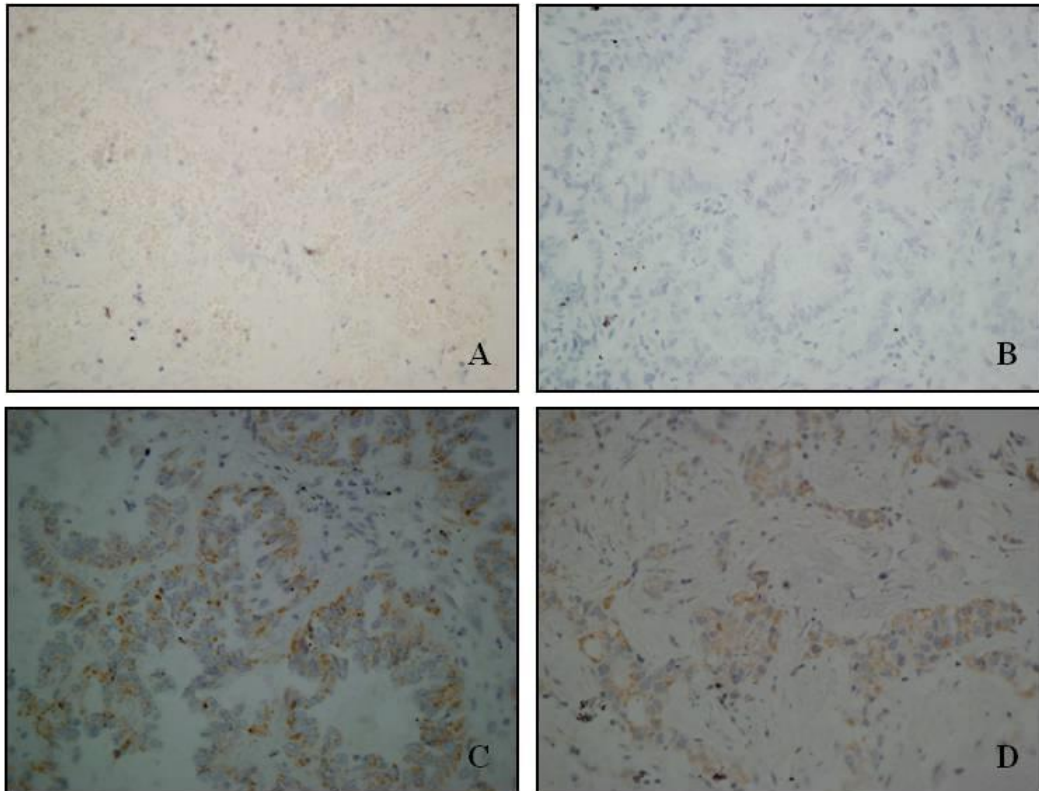
Todas las muestras fueron revisadas por el mismo patólogo e investigador principal, con un microscopio de doble observador Leica. Las imágenes fotográficas reproducidas en este trabajo se tomaron con la cámara Axiocam (Zeiss) a través del microscopio Jenamed 2 (Zeiss).

Se analizó la positividad de RFC en las muestras tumorales, en la membrana citoplasmática de las células tumorales. Siguiendo estudios previos de inmunohistoquímica, se analizó la positividad o negatividad de las muestras, con independencia de la intensidad de tinción (figura 8).<sup>189-190, 197-198</sup>

### **3.3 Evaluación y análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizaron los datos de 48 pacientes. Se dividió la muestra en dos cohortes según presentarán expresión del RFC o no. En ambos grupos se analizó la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) en relación con la expresión del RFC y las distintas variables clínico-patológicas. Todos los pacientes evaluados presentaban un estadio avanzado de la enfermedad (IV de la AJCC).

La SLP se midió desde el inicio del tratamiento con pemetrexed hasta el día de confirmación de progresión de la enfermedad. Todos los pacientes de la muestra habían progresado al tratamiento con pemetrexed.



**Figura 8.** Imágenes de IHQ (40x). **A-** control positivo, coriocarcinoma. **B-** adenocarcinoma sin expresión del *RFC*. **C y D-** adenocarcinoma con expresión del *RFC* (2 muestras distintas).

La SG se calculó desde el inicio del tratamiento con pemetrexed hasta el día de la muerte del paciente. En el caso de que el evento no hubiera tenido lugar, el dato fue censurado en la última consulta a la que acudió el paciente.

El resultado de la SLP fue la mediana de la supervivencia libre de progresión de cada paciente. La SG se calculó por medio del método de Kaplan-Meier y la significación por el método del log-Rank.<sup>199</sup> El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 17.0.

Las principales variables clínico-patológicas analizadas en este estudio fueron sexo, estado general, hábito tabáquico e histología del tumor. En todos los casos evaluados la administración de pemetrexed se realizó en segunda o tercera línea de tratamiento para carcinoma no microcítico de pulmón. Como variables de supervivencia se utilizaron la SLP y la SG. Para el análisis de la asociación de la expresión del RFC con las distintas variables clínico-patológicas adicionales se utilizó el estadístico Chi-cuadrado.

## 4 Resultados

#### 4.1 Características clínico-patológicas de los pacientes

Las características clínico-patológicas de los 48 pacientes evaluados se muestran en la tabla 1.

Todos los pacientes de la muestra recibieron tratamiento con pemetrexed. Tres pacientes lo recibieron en primera línea asociado a vinorelbina (dentro de ensayo clínico). 26 pacientes lo recibieron en 2ª y 14 en 3ª línea, todos ellos en monoterapia. 5 pacientes lo recibieron como monoterapia en 4ª y sucesivas líneas de tratamiento quimioterápico.

Las muestras analizadas se obtuvieron de la cirugía del tumor primario (25), de biopsia diagnóstica del tumor primario (1) y de biopsia diagnóstica de metástasis (7 de adenopatías, 5 óseas, 4 de sistema nervioso central, 2 de piel, 2 digestivas, 1 de pericardio y 1 de glándula suprarrenal reseca).

**Tabla 1.** Características clínico-patológicas de los 48 pacientes.

Edad (mediana, en años)	N	%
56 (42-75)		
<b>Sexo</b>		
Varón	33	68.75
Mujer	15	31.25
<b>Tabaquismo</b>		
Sí	23	47.92
No	10	20.83
Exfumador	15	31.25
<b>Estado general (ECOG)</b>		
0-1	37	77.08
≥ 2	11	22.92
<b>Histología</b>		
Adenocarcinoma	39	81.25
Epidermoide	8	16.67
Mixto	1	2.08
<b>Expresión RFC</b>		
Sí	16	33.33
No	32	66.67

Se encontró expresión del RFC en 16 (33,33%) muestras tumorales. De ellas, 14 eran adenocarcinomas, 1 epidermoide y 1 tumor de histología mixta. Entre las 32 muestras que fueron negativas para el RFC, 25 eran adenocarcinomas y 7 eran epidermoides. La distribución de las características de los pacientes según la expresión o no del RFC en las muestras analizadas, se puede ver en la tabla 2.

**Tabla 2.** Características clínico-patológicas según la expresión del *RFC*.

	<i>RFC</i> positivo	<i>RFC</i> negativo
<b>Edad</b> (mediana, en años)	55 (42-72)	59 (42-75)
<b>Sexo</b>		
Varón	10 (30.30%)	23 (69.70%)
Mujer	6 (40%)	9 (60%)
<b>Tabaquismo</b>		
Sí	4 (17.39%)	19 (82.61%)
No	3 (30%)	7 (70%)
Exfumador	9 (60%)	6 (40%)
<b>Estado general (<i>ECOG</i>)</b>		
0-1	14 (37.84%)	23 (62.16%)
≥ 2	2 (18.18%)	9 (81.82%)
<b>Histología</b>		
Adenocarcinoma	14 (35.90%)	25 (64.10%)
Epidermoide	1 (12.50%)	7 (87.50%)
Mixto	1	0

La indicación del tratamiento quimioterápico fue según criterio del oncólogo responsable. Todos los pacientes recibieron tratamiento con un doblete basado en platino en primera línea (cisplatino-gemcitabina, cisplatino-docetaxel, carboplatino-paclitaxel o carboplatino-gemcitabina), con excepción de los 3 pacientes mencionados que recibieron la combinación pemetrexed-vinorelbina. En sucesivas líneas de tratamiento, los pacientes pudieron recibir carboplatino, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, topotecan, irinotecan, inhibidores tirosin-kinasa (gefitinib, erlotinib), bevacizumab y crizotinib (dentro de ensayo clínico). En cualquier momento de la evolución pudieron recibir radioterapia de carácter paliativa, tanto a nivel del primario como a nivel de las metástasis. Las respectivas líneas de tratamiento quimioterápico recibidas se muestran en la tabla 3.

En el momento del análisis, todos los pacientes habían progresado al tratamiento con pemetrexed. Tan sólo 3 pacientes permanecían vivos, por lo que fueron censurados en el momento del análisis. La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 99 días (95%IC 1-197), mientras que la mediana de supervivencia global fue de 195 días (95%IC 63-307).

**Tabla 3.** Tratamientos administrados a la muestra estudiada. Entre paréntesis se expresa el porcentaje de pacientes que recibieron el tratamiento de los que recibieron esa línea. No aplicable a 4ª, 5ª y 6ª líneas administradas.

<b>Primera línea</b>		<b>N (%)</b>
	Cisplatino - docetaxel	14 (29.17)
	Cisplatino - gemcitabina	14 (29.17)
	Carboplatino - gemcitabina	5 (10.42)
	Carboplatino - paclitaxel	4 (8.32)
	Pemetrexed - vinorelbina	3 (6.26)
	Carboplatino - docetaxel	3 (6.26)
	Gemcitabina - vinorelbina	2 (4.16)
	Cisplatino	1 (2.08)
	Carboplatino - etopósido	1 (2.08)
	Cisplatino - etopósido	1 (2.08)
<b>Segunda línea</b>		
	Pemetrexed	26 (56.52)
	Gemcitabina - vinorelbina	5 (10.87)
	Paclitaxel	3 (6.52)
	Erlotinib	3 (6.52)
	Carboplatino - docetaxel	2 (4.35)
	Cisplatino - docetaxel	2 (4.35)
	Gemcitabina - paclitaxel	1 (2.17)
	Gemcitabina	1 (2.17)
	Docetaxel	1 (2.17)
	Carboplatino - paclitaxel	1 (2.17)
<b>Tercera línea</b>		
	Pemetrexed	14 (48.28)
	Paclitaxel	4 (13.78)
	Vinorelbina	3 (10.34)
	Gemcitabina - vinorelbina	2 (6.90)
	Erlotinib	2 (6.90)
	Docetaxel	1 (3.45)
	Etoposido	1 (3.45)
	Irinotecan	1 (3.45)
	Crizotinib	1 (3.45)
<b>Posteriores líneas de tratamiento</b>		
	Topotecan	6
	Erlotinib	5
	Pemetrexed	5
	Paclitaxel - bevacizumab	2
	Paclitaxel	4
	Carboplatino	3

## **4.2 Análisis de la supervivencia libre de progresión**

En cuanto a la supervivencia libre de progresión (SLP) de los 48 pacientes que recibieron tratamiento con pemetrexed, la mediana fue de 99 días, con un intervalo de confianza del 95% entre 1 y 197 días.

### **4.2.1 Sexo, estadio clínico, tabaquismo e histología:**

La SLP al tratamiento con pemetrexed en la muestra estudiada no demostró diferencias estadísticamente significativas en relación al sexo, al tabaquismo ni a la histología.

La mediana de SLP por sexos fue de 126 días para las mujeres y 93 días para los hombres ( $\chi^2 = 0,055$ ). En cuanto al tabaquismo, la mediana de SLP fue de 126 días para los no fumadores al diagnóstico y de 86 días para los fumadores activos al diagnósticos (Log-Rank = 0,105). Por histología: los adenocarcinomas alcanzaron una mediana de SLP de 109 días y los epidermoides (se agruparon epidermoides y mixtos) de 71 días (Log-Rank = 0,620).

En cuanto a la SLP según el estado general, los pacientes con un mejor estado general (*PS*) alcanzaban una mayor SLP estadísticamente significativa. Para un ECOG entre 0 y 1 la mediana de SLP fue de 122 días, mientras que para un ECOG mayor o igual a 2 fue de 43 días ( $p < 0,001$ ).

### **4.2.2 Expresión del *reduced folate carrier*:**

La expresión del *RFC* no mostró relación significativa con la SLP al tratamiento con pemetrexed. Se observó que en los pacientes que presentaban expresividad del *RFC*, la mediana de SLP alcanzaba los 135 días, mientras que en aquellos pacientes que no lo expresaban era de 84 días ( $\chi^2 = 0,926$ ).

### 4.3 Análisis de la supervivencia global

En cuanto a la supervivencia global (SG) de la muestra en estudio, la mediana fue de 195 días, con un intervalo de confianza del 95% entre 63 días y 307 días.

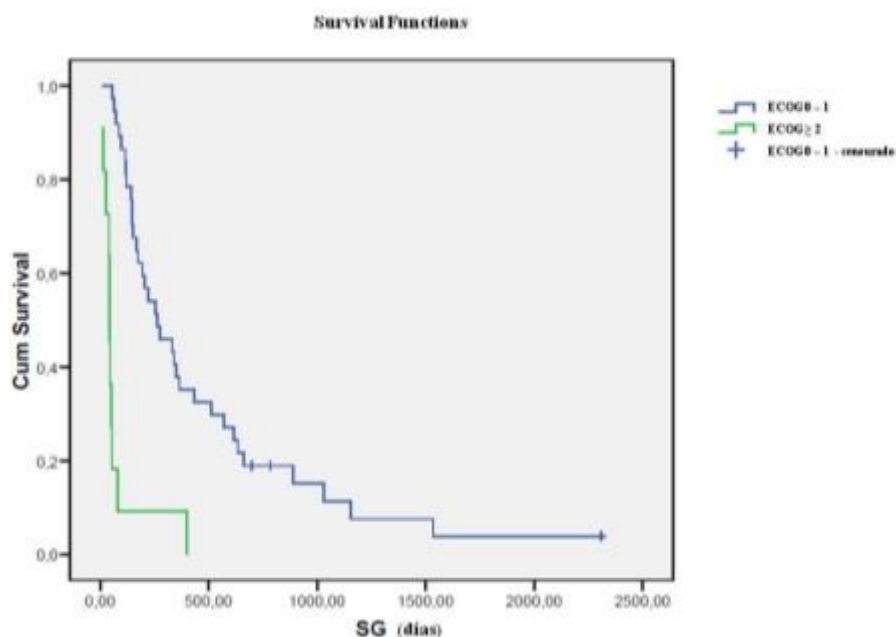
#### 4.3.1 Sexo, estadio clínico, tabaquismo e histología:

La SG en relación con el sexo y la histología no mostró ninguna relación estadísticamente significativa en la muestra estudiada.

La mediana de SG en hombres fue de 195 días y en mujeres de 166 días (Log-Rank = 0,273). En relación con la histología, los adenocarcinomas alcanzaron una mediana de 222 días frente a 87 días los epidermoides (Log-Rank = 0,762).

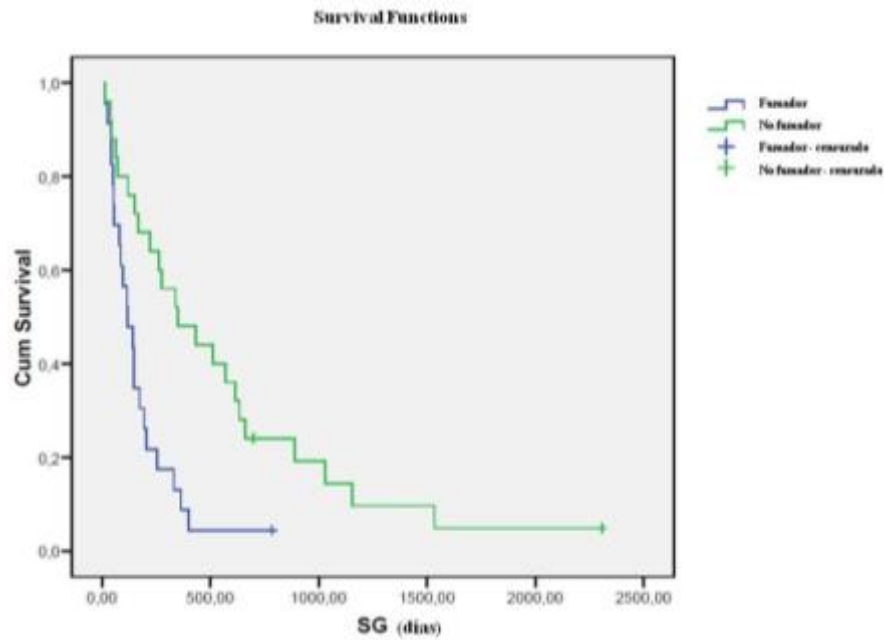
Los pacientes que presentaban un buen estado general (ECOG 0-1) tuvieron una SG estadísticamente significativa mayor que los que presentaban un mal estado general (ECOG  $\geq 2$ ). La mediana para los pacientes con buen estado general fue de 262 días versus 43 días para los que presentaban mal estado general (Log-Rank < 0,001). En la figura 9 se muestran las curvas de SG en relación con el estado general.

En relación al hábito tabáquico, también fue significativamente mayor la SG de los pacientes no fumadores al diagnóstico, en relación con los fumadores (351 días versus 118 días; Log-Rank = 0,001). En la figura 10 se muestran las curvas de SG en relación con el hábito tabáquico.



**Figura 9.** SG en relación con estado general (ECOG). Las cruces indican censuras. Cada caída a un nivel inferior significa un evento (en este caso fallecimiento).

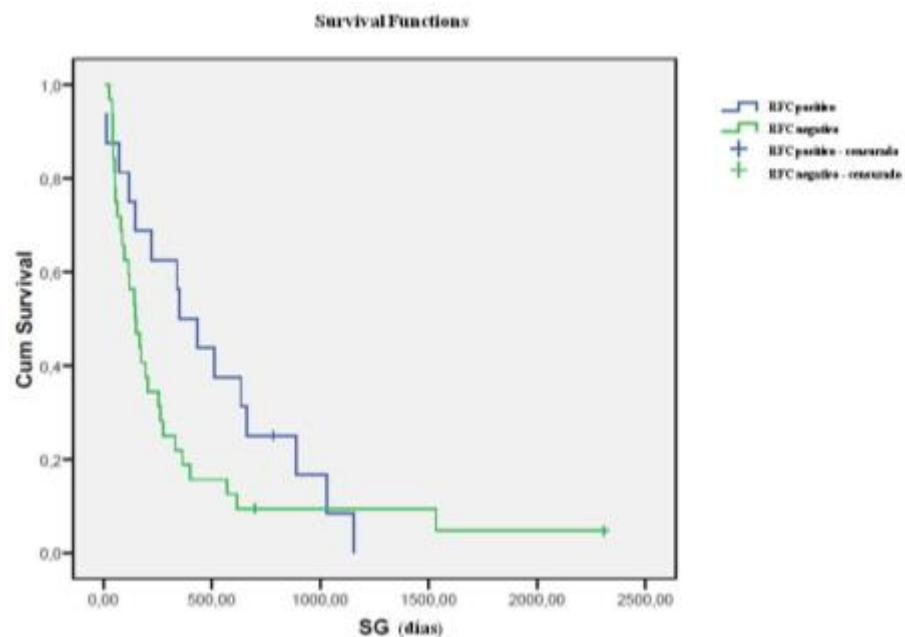




**Figura 10.** SG en relación con el hábito tabáquico. Las cruces indican censuras. Cada caída a un nivel inferior significa un evento (en este caso fallecimiento).

### 4.3.2 Expresión del *reduced folate carrier*:

La expresión del *RFC* no muestra una relación estadísticamente significativa con la SG. La mediana de SG de los pacientes con expresión fue de 351 días frente a los 146 días de los pacientes sin expresión del *RFC* (Log-Rank = 0,150). En la figura 11 se muestran las curvas de SG en relación con la expresión del *RFC*.



**Figura 11.** SG en relación con la expresión del *RFC*. Las cruces indican censuras. Cada caída a un nivel inferior significa un evento (en este caso fallecimiento).

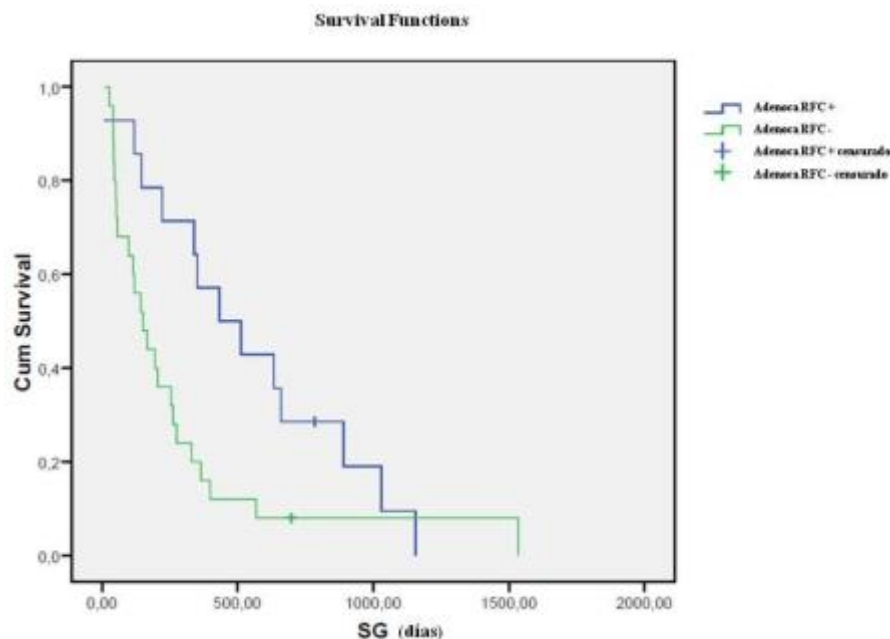
#### 4.4 Análisis multivariante

En el estudio estadístico multivariante no se encontró ninguna asociación entre las variables clínico-patológicas y la expresión del *RFC* en cuanto a SLP.

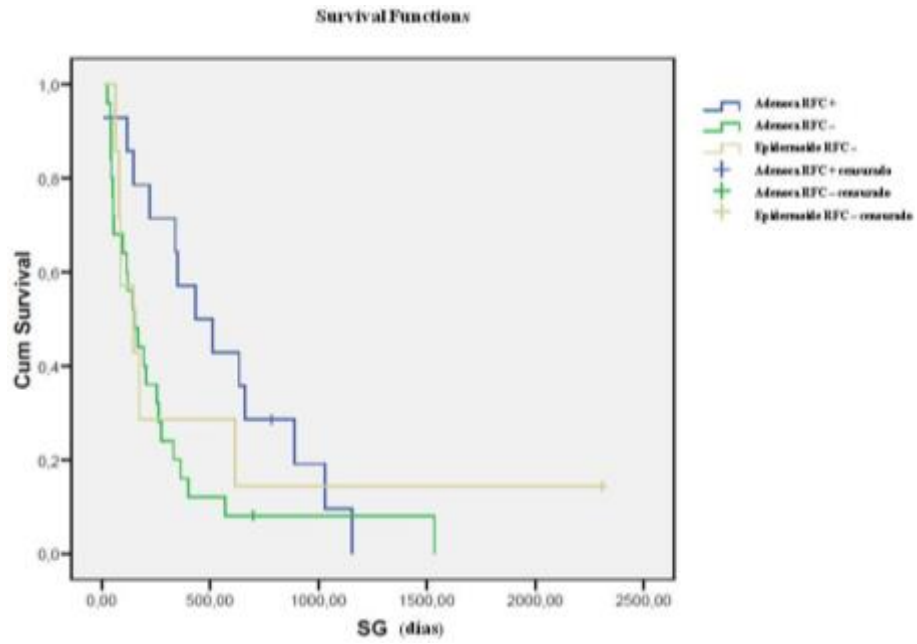
En cuanto a SG, se observó una relación estadísticamente significativa en los pacientes que presentaban histología de adenocarcinoma y expresión del *RFC* con respecto a todos los demás (Tabla 4).

Entre los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma, aquellos que presentaban expresión del *RFC* mostraban una mediana de SG de 433 días versus 151 días de los que no tenían expresión (Log-Rank = 0,039). En la figura 12 se muestran las curvas de SG en adenocarcinomas en relación con la expresión del *RFC*.

En la población estudiada, los pacientes sin expresión del *RFC* mostraban una evolución similar con independencia de la histología: adenocarcinomas con expresión del *RFC* alcanzaban una mediana de SG de 433 días, mientras que los adenocarcinomas y los tumores epidermoides que no tenían expresión del *RFC* alcanzaban una mediana de SG de 151 y 146 días respectivamente. No obstante, esta diferencia no era estadísticamente significativa (Log-Rank = 0,108; figura 13).



**Figura 12.** SG de los pacientes con adenocarcinoma en relación con la expresión del *RFC*. Las cruces indican censuras. Cada caída a un nivel inferior significa un evento (en este caso fallecimiento).



**Figura 13.** SG los pacientes en relación con la histología y la expresión del RFC. No se muestran los epidermoides con expresión del RFC (n = 2). Las cruces indican censuras. Cada caída a un nivel inferior significa un evento (en este caso fallecimiento).

**Tabla 4.** Resultados estadísticos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global en relación con las características clínico-patológicas y la expresión del *RFC* en la muestra estudiada.

	Mediana (días)	<i>P</i>
<b>Supervivencia libre de progresión</b>		
<b>Sexo</b>		0.055 <sup>a</sup>
Varón	93	
Mujer	126	
<b>Estado general (ECOG)</b>		< 0.001
0-1	122	
≥ 2	43	
<b>Tabaquismo</b>		0.105 <sup>b</sup>
Sí	86	
No	126	
<b>Histología</b>		0.620 <sup>b</sup>
Adenocarcinoma	109	
Epidermoide	71	
<b>Expresión del <i>RFC</i></b>		0.926 <sup>a</sup>
Sí	135	
No	84	
<b>Supervivencia global</b>		
<b>Sexo</b>		0.273 <sup>b</sup>
Varón	195	
Mujer	166	
<b>Estado general (ECOG)</b>		< 0.001 <sup>b</sup>
0-1	262	
≥ 2	43	
<b>Tabaquismo</b>		0.001 <sup>b</sup>
Sí	351	
No	118	
<b>Histología</b>		0.762 <sup>b</sup>
Adenocarcinoma	222	
Epidermoide	87	
<b>Expresión del <i>RFC</i></b>		0.150 <sup>b</sup>
Sí	351	
No	146	
<b>Análisis multivariante</b>		
<b>Histología y expresión del <i>RFC</i></b>		0.004 <sup>b</sup>
Adenocarcinomas con expresión del <i>RFC</i>	433	
Adenocarcinomas sin expresión del <i>RFC</i>	151	
Epidermoides con expresión del <i>RFC</i>	13	
Epidermoides sin expresión del <i>RFC</i>	146	
		0.039 <sup>b</sup>
Adenocarcinomas con expresión del <i>RFC</i>	433	
Adenocarcinomas sin expresión del <i>RFC</i>	151	

a.  $\chi^2$  b. Log-Rank

## 5 Discusión

Los datos obtenidos a partir de la población estudiada muestran que el diagnóstico de CPNM avanzado se produce en la edad media de la vida (entre la 5ª y la 6ª década), con un predominio en varones y hasta en un 70% de los casos en individuos fumadores (activos o exfumadores).

El estado general de la población estudiada era bueno en su mayoría (ECOG 0-1), algo necesario para tolerar la quimioterapia indicada en este tipo de patología con pocos efectos adversos.

La histología predominante fue el adenocarcinoma, lo cual parece lógico ya que el pemetrexed está indicado en esta categoría tumoral, si bien durante los inicios de su aplicación en clínica, también se administró a pacientes con histología de carcinoma epidermoide o mixto como uso compasivo; por ello se ha podido estudiar la relación que existe entre la expresión del *RFC* y la respuesta al pemetrexed, con independencia de la histología tumoral.

A pesar de que el *RFC* es un transportador de folatos muy ubicuo en el organismo, se ha detectado su expresión en un tercio de la población estudiada. Esta pobre expresión puede reforzar la hipótesis inicial de su relación con el beneficio terapéutico del uso del pemetrexed en aquellos tumores donde esté aumentada. En cuanto a la relación de su expresión con las características de la población, parece evidente que se encuentra disminuida en fumadores. Asimismo la expresión del *RFC* parece limitarse a adenocarcinomas, aunque la muestra no presenta un elevado número de tumores epidermoides. No hay diferencias relevantes en su expresión en relación con el sexo o el estado general.

En cuanto a los tratamientos recibidos por los pacientes estudiados, la variabilidad es amplia. Esto es debido a que el tratamiento de dichos pacientes correspondió a varios oncólogos. No obstante, se puede observar que la mayoría de los individuos recibieron en primera línea un doblete basado en platino y posteriormente, según el estado general y las toxicidades acumuladas por los tratamientos previos, pasaban a recibir una mono-quimioterapia o tratamientos dirigidos con ITKs o incluso crizotinib frente al reordenamiento del ALK (un individuo) dentro de ensayo clínico.

El análisis estadístico de los datos recogidos permite confirmar lo que ya ha sido publicado previamente: un buen estado general previo a la quimioterapia, el sexo

femenino, no haber fumado y una histología de adenocarcinoma se relacionan con unos mejores resultados terapéuticos.

En cuanto a la SLP, se confirma que tener un buen estado general (ECOG 0-1) previo al inicio de la quimioterapia da lugar a una mayor SLP ( $p < 0,001$ ). Respecto al sexo femenino, la ausencia del hábito tabáquico y la histología se observa una tendencia favorable pero sin llegar a la significación estadística en este trabajo.

La expresión del *RFC* muestra una tendencia en la población estudiada a alargar el tiempo hasta la progresión al tratamiento con pemetrexed ( $p = 0,926$ ).

Cuando se estudia la SG de la población analizada, los resultados demuestran que aquellos individuos con un mejor estado general (ECOG 0-1) viven más que los que presentan un mal estado general ( $p < 0,001$ ). Esto concuerda con lo publicado hasta la fecha y parece estar en relación con que a mejor estado general, más capacidad para tolerar los efectos adversos de los tratamientos quimioterápicos y mejor capacidad para intentar más líneas de quimioterapia que prolonguen la supervivencia.

Se confirma que no haber fumado es un factor favorable para alcanzar una mayor supervivencia ( $p = 0,001$ ).

El sexo y la histología tumoral no presentan resultados significativos en la población estudiada. Se observa una tendencia favorable hacia los adenocarcinomas, y de manera llamativa, hacia el sexo masculino. Sería necesario ampliar la muestra para confirmar si estos datos son extrapolables o son consecuencia del azar debido al limitado número de individuos analizados.

La expresión del *RFC* se relaciona con una mayor SG, aunque de manera no significativa. Posiblemente un mayor tamaño muestral permitiría confirmar esta tendencia que parece intuirse.

En el análisis multivariante se confirma la ausencia de relación de la expresión del *RFC* con el resto de variables en cuanto a la supervivencia libre de progresión.

Se podría afirmar que la expresión del *RFC* en los tumores de histología adenocarcinoma de la muestra se asocia con una mayor SG ( $p = 0,039$ ) en el análisis llevado a cabo en el estudio. Estos resultados parecen indicar que una mejor selección de la población podría obtener mejores respuestas al tratamiento con pemetrexed. En el

caso de los epidermoides no podemos inferir ni siquiera una tendencia ya que la escasez de los datos (apenas 2 muestras de tumores epidermoides con expresión del *RFC*) no permite sacar conclusiones ni tendencias.

Los resultados comentados anteriormente hacen vislumbrar la posibilidad de establecer la determinación de la expresión del *RFC* como criterio para indicar el tratamiento con un antifolato, como es el pemetrexed, en pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de pulmón, con ventajas significativas en supervivencia.

Asimismo podemos confirmar que los criterios de sexo femenino, buen estado general, no fumador e histología adenocarcinoma, están relacionados con un beneficio terapéutico al tratamiento con pemetrexed.

Para finalizar, este trabajo pone de manifiesto las dificultades que supone realizar un estudio retrospectivo y la necesidad de realizar estudios prospectivos para obtener resultados acordes a las preguntas planteadas, ya que son las preguntas las que se han de adaptar a los datos de que se dispone, con la consiguiente disminución de calidad en el resultado. También destaca las dificultades que entraña realizar un estudio con interés traslacional en un ámbito hospitalario común, con gran heterogeneidad en los profesionales implicados en el manejo de los pacientes y en su seguimiento posterior, con las numerosas pérdidas en cuanto al mismo que conlleva el hecho de no formar parte de un protocolo preestablecido.

Asimismo, sería interesante poder llevar el estudio a una serie más amplia de pacientes y de modo prospectivo, para poder analizar con mejor potencia estadística las diferencias observadas a lo largo del trabajo.



## **6 Conclusiones**

- Los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado y buen estado general (ECOG 0-1) presentan una mayor supervivencia libre de progresión al tratamiento con pemetrexed.
- Los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado, buen estado general (ECOG 0-1) y no fumadores presentan una mayor supervivencia global tras el tratamiento con pemetrexed.
- La expresión del *reduced folate carrier* está aumentada en adenocarcinomas de pulmón, siendo rara su expresión en tumores epidermoides.
- La asociación de adenocarcinoma de pulmón y expresión del *reduced folate carrier* en pacientes con cáncer de pulmón parece tener valor predictivo para alcanzar una mayor supervivencia.
- Por lo anteriormente expuesto, la expresión del *reduced folate carrier* guarda una potencial aplicabilidad clínica, fundamentalmente pronóstica, en el tratamiento con pemetrexed del carcinoma de pulmón no microcítico avanzado de histología adenocarcinoma, siendo necesario confirmar su utilidad en un estudio prospectivo con un mayor número de pacientes.
- El escaso número de pacientes con histología epidermoide no permite establecer una relación entre la expresión del *reduced folate carrier* y la efectividad del tratamiento con pemetrexed en esta población de cáncer de pulmón no microcítico.

## **7 Anexo**

## **Escala de evaluación del estado general**

- *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG, Zubrod)*<sup>200</sup>

**0** El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.

**1** El paciente presenta síntomas que no le impiden realizar su trabajo, ni las actividades de la vida diaria. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.

**2** El paciente no es capaz de desempeñar su trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades pero precisa de ayuda para alguna actividad que antes realizaba como por ejemplo la limpieza de la casa.

**3** El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria.

**4** Encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades básicas.

**5** El paciente está moribundo o morirá en horas.

## 8 Bibliografía

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, DM. P. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2010; Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 03/05/2012.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
3. Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol*. 2009 Nov;10(11):1033-4.
4. Doll R, Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *Br Med J*. 1976 Dec 25;2(6051):1525-36.
5. Taylor R, Najafi F, Dobson A. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int J Epidemiol*. 2007 Oct;36(5):1048-59.
6. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997 Oct 18;315(7114):980-8.
7. Wald NJ, Nanchahal K, Thompson SG, Cuckle HS. Does breathing other people's tobacco smoke cause lung cancer? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Nov 8;293(6556):1217-22.
8. United States. Public Health Service. Office of the Surgeon General. Children and secondhand smoke exposure excerpts from The health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke : a report of the Surgeon General. Rockville, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General; 2007.
9. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol*. 2009 Aug;10(8):751-2.
10. Darby S, Hill D, Deo H, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, et al. Residential radon and lung cancer--detailed results of a collaborative analysis of individual data on 7148 persons with lung cancer and 14,208 persons without lung cancer from 13 epidemiologic studies in Europe. *Scand J Work Environ Health*. 2006;32 Suppl 1:1-83.
11. Krewski D, Lubin JH, Zielinski JM, Alavanja M, Catalan VS, Field RW, et al. A combined analysis of North American case-control studies of residential radon and lung cancer. *J Toxicol Environ Health A*. 2006 Apr;69(7):533-97.
12. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer : principles and practice of oncology : principles & practice of oncology*. 9th ed ed. Philadelphia [etc.]: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
13. Omenn GS, Merchant J, Boatman E, Dement JM, Kuschner M, Nicholson W, et al. Contribution of environmental fibers to respiratory cancer. *Environ Health Perspect*. 1986 Dec;70:51-6.

14. Fraumeni JF, Jr. Respiratory carcinogenesis: an epidemiologic appraisal. *J Natl Cancer Inst.* 1975 Nov;55(5):1039-46.
15. Janerich DT, Thompson WD, Varela LR, Greenwald P, Chorost S, Tucci C, et al. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *N Engl J Med.* 1990 Sep 6;323(10):632-6.
16. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol.* 2009 May;10(5):453-4.
17. Driscoll T, Nelson DI, Steenland K, Leigh J, Concha-Barrientos M, Fingerhut M, et al. The global burden of disease due to occupational carcinogens. *Am J Ind Med.* 2005 Dec;48(6):419-31.
18. Chlebowski RT, Schwartz AG, Wakelee H, Anderson GL, Stefanick ML, Manson JE, et al. Oestrogen plus progestin and lung cancer in postmenopausal women (Women's Health Initiative trial): a post-hoc analysis of a randomised controlled trial. *Lancet.* 2009 Oct 10;374(9697):1243-51.
19. Aubin HJ, Bobak A, Britton JR, Oncken C, Billing CB, Jr., Gong J, et al. Varenicline versus transdermal nicotine patch for smoking cessation: results from a randomised open-label trial. *Thorax.* 2008 Aug;63(8):717-24.
20. Jorenby DE, Hays JT, Rigotti NA, Azoulay S, Watsky EJ, Williams KE, et al. Efficacy of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006 Jul 5;296(1):56-63.
21. Gonzales D, Rennard SI, Nides M, Oncken C, Azoulay S, Billing CB, et al. Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006 Jul 5;296(1):47-55.
22. Carney DN. Lung cancer--time to move on from chemotherapy. *N Engl J Med.* 2002 Jan 10;346(2):126-8.
23. Chute JP, Chen T, Feigal E, Simon R, Johnson BE. Twenty years of phase III trials for patients with extensive-stage small-cell lung cancer: perceptible progress. *J Clin Oncol.* 1999 Jun;17(6):1794-801.
24. Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, et al. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet.* 1999 Jul 10;354(9173):99-105.

25. Henschke CI, Naidich DP, Yankelevitz DF, McGuinness G, McCauley DI, Smith JP, et al. Early lung cancer action project: initial findings on repeat screenings. *Cancer*. 2001 Jul 1;92(1):153-9.
26. Kaneko M, Kusumoto M, Kobayashi T, Moriyama N, Naruke T, Ohmatsu H, et al. Computed tomography screening for lung carcinoma in Japan. *Cancer*. 2000 Dec 1;89(11 Suppl):2485-8.
27. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011 Aug 4;365(5):395-409.
28. Aberle DR, Berg CD, Black WC, Church TR, Fagerstrom RM, Galen B, et al. The National Lung Screening Trial: overview and study design. *Radiology*. 2011 Jan;258(1):243-53.
29. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Clapp JD, Clingan KL, Gareen IF, et al. Baseline characteristics of participants in the randomized national lung screening trial. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Dec 1;102(23):1771-9.
30. Travis WD, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer., International Association for the Study of Lung Cancer., International Academy of Pathology. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus, and heart. Lyon: IARC Press; 2004.
31. Cooper WA, O'Toole S, Boyer M, Horvath L, Mahar A. What's new in non-small cell lung cancer for pathologists: the importance of accurate subtyping, EGFR mutations and ALK rearrangements. *Pathology*. 2011 Feb;43(2):103-15.
32. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):5900-9.
33. Cappuzzo F, Ligorio C, Toschi L, Rossi E, Trisolini R, Paioli D, et al. EGFR and HER2 gene copy number and response to first-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Oncol*. 2007 May;2(5):423-9.
34. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010 Oct 28;363(18):1693-703.
35. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011 Feb;6(2):244-85.



36. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol*. 2011 Oct;24(10):1348-59.
37. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol*. 2011 Jan;35(1):15-25.
38. Terry J, Leung S, Laskin J, Leslie KO, Gown AM, Ionescu DN. Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples. *Am J Surg Pathol*. 2010 Dec;34(12):1805-11.
39. King JE, Thatcher N, Pickering CA, Hasleton PS. Sensitivity and specificity of immunohistochemical markers used in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a detailed systematic analysis using published data. *Histopathology*. 2006 Feb;48(3):223-32.
40. Ordonez NG. Thyroid transcription factor-1 is a marker of lung and thyroid carcinomas. *Adv Anat Pathol*. 2000 Mar;7(2):123-7.
41. Rivera MP, Mehta AC. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007 Sep;132(3 Suppl):131S-48S.
42. Tan D, Zander DS. Immunohistochemistry for assessment of pulmonary and pleural neoplasms: a review and update. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008;1(1):19-31.
43. Zhang H, Liu J, Cagle PT, Allen TC, Laga AC, Zander DS. Distinction of pulmonary small cell carcinoma from poorly differentiated squamous cell carcinoma: an immunohistochemical approach. *Mod Pathol*. 2005 Jan;18(1):111-8.
44. Guinee DG, Jr., Fishback NF, Koss MN, Abbondanzo SL, Travis WD. The spectrum of immunohistochemical staining of small-cell lung carcinoma in specimens from transbronchial and open-lung biopsies. *Am J Clin Pathol*. 1994 Oct;102(4):406-14.
45. Du L, Schageman JJ, Irnov, Girard L, Hammond SM, Minna JD, et al. MicroRNA expression distinguishes SCLC from NSCLC lung tumor cells and suggests a possible pathological relationship between SCLCs and NSCLCs. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:75.
46. Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. *Chest*. 1986 Apr;89(4 Suppl):225S-33S.
47. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*. 1997 Jun;111(6):1710-7.
48. Mountain CF. Staging classification of lung cancer. A critical evaluation. *Clin Chest Med*. 2002 Mar;23(1):103-21.
49. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in

the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol.* 2007 Aug;2(8):706-14.

50. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest.* 2009 Jul;136(1):260-71.

51. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual.* 7th ed. New York: Springer; 2010.

52. Finkelstein DM, Ettinger DS, Ruckdeschel JC. Long-term survivors in metastatic non-small-cell lung cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 1986 May;4(5):702-9.

53. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med.* 2005 Jul 14;353(2):133-44.

54. Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, Li AR, Patel JD, Heelan RT, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol.* 2008 Mar 20;26(9):1472-8.

55. Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Janne PA, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 2008 May 20;26(15):2442-9.

56. Hirsch FR, Bunn PA, Jr. EGFR testing in lung cancer is ready for prime time. *Lancet Oncol.* 2009 May;10(5):432-3.

57. Riely GJ, Politi KA, Miller VA, Pao W. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec 15;12(24):7232-41.

58. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005 Mar;2(3):e73.

59. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 1;12(19):5764-9.

60. Onitsuka T, Uramoto H, Nose N, Takenoyama M, Hanagiri T, Sugio K, et al. Acquired resistance to gefitinib: the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status. *Lung Cancer.* 2010 May;68(2):198-203.

61. Han SW, Kim TY, Jeon YK, Hwang PG, Im SA, Lee KH, et al. Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 15;12(8):2538-44.

62. Dacic S. EGFR assays in lung cancer. *Adv Anat Pathol.* 2008 Jul;15(4):241-7.

63. Sholl LM, Xiao Y, Joshi V, Yeap BY, Cioffredi LA, Jackman DM, et al. EGFR mutation is a better predictor of response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung carcinoma than FISH, CISH, and immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*. 2010 Jun;133(6):922-34.
64. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol*. 2008 Feb 20;26(6):983-94.
65. Pao W, Ladanyi M. Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: searching for the ideal method. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 1;13(17):4954-5.
66. Shepherd FA, Tsao MS. Epidermal growth factor receptor biomarkers in non-small-cell lung cancer: a riddle, wrapped in a mystery, inside an enigma. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 20;28(6):903-5.
67. Dias-Santagata D, Akhavanfard S, David SS, Vernovsky K, Kuhlmann G, Boisvert SL, et al. Rapid targeted mutational analysis of human tumours: a clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol Med*. 2010 May;2(5):146-58.
68. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010 Feb;11(2):121-8.
69. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010 Jun 24;362(25):2380-8.
70. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011 Aug;12(8):735-42.
71. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012 Mar;13(3):239-46.
72. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10;27(26):4247-53.
73. Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, Yoshizawa A, Menju T, Nakayama E, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol*. 2010 Mar;17(3):889-97.

74. Yang J, Zhang X, Su J, et al. Concomitant EGFR mutation and EML4-ALK gene fusion in non-small cell lung cancer. in ASCO. Chicago. 2011.
75. Shaw AT, Forcione DG, Digumarthy SR, Iafrate AJ. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 21-2011. A 31-year-old man with ALK-positive adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 2011 Jul 14;365(2):158-67.
76. Kim H, Yoo SB, Choe JY, Paik JH, Xu X, Nitta H, et al. Detection of ALK gene rearrangement in non-small cell lung cancer: a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization with correlation of ALK protein expression. *J Thorac Oncol*. 2011 Aug;6(8):1359-66.
77. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res*. 2009 Aug 15;15(16):5216-23.
78. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 1;16(5):1561-71.
79. Crinò L, Kim D, Riely GJ, Janne PA, Blackhall FH, Camidge DR, et al. Initial phase II results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005. *J Clin Oncol*. 2011;29(15 Suppl Meeting Abstracts):7514.
80. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med*. 2010 Oct 28;363(18):1734-9.
81. Simon GR, Sharma S, Cantor A, Smith P, Bepler G. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Chest*. 2005 Mar;127(3):978-83.
82. Olausson KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006 Sep 7;355(10):983-91.
83. Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ, Li X, Zheng Z, Boulware D, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5808-15.
84. Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K, Lau D, Liu N, Sakurada A, et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5240-7.
85. Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, Mooi WJ, Offerhaus GJ, Rodenhuis S. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst*. 1991 Jul 17;83(14):1024-7.

86. Mitsudomi T, Steinberg SM, Oie HK, Mulshine JL, Phelps R, Viallet J, et al. ras gene mutations in non-small cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer Res.* 1991 Sep 15;51(18):4999-5002.
87. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 1990 Aug 30;323(9):561-5.
88. Brissenden JE, Caras I, Thelander L, Francke U. The structural gene for the M1 subunit of ribonucleotide reductase maps to chromosome 11, band p15, in human and to chromosome 7 in mouse. *Exp Cell Res.* 1988 Jan;174(1):302-8.
89. Pitterle DM, Kim YC, Jolicoeur EM, Cao Y, O'Briant KC, Bepler G. Lung cancer and the human gene for ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1). *Mamm Genome.* 1999 Sep;10(9):916-22.
90. Bepler G, Sharma S, Cantor A, Gautam A, Haura E, Simon G, et al. RRM1 and PTEN as prognostic parameters for overall and disease-free survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2004 May 15;22(10):1878-85.
91. Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med.* 2007 Feb 22;356(8):800-8.
92. Boffa DJ, Allen MS, Grab JD, Gaissert HA, Harpole DH, Wright CD. Data from The Society of Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery database: the surgical management of primary lung tumors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Feb;135(2):247-54.
93. Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007 Sep;132(3 Suppl):234S-42S.
94. Siene W, Dango S, Kirschbaum A, Cucuruz B, Horth W, Stremmel C, et al. Sublobar resections in stage IA non-small cell lung cancer: segmentectomies result in significantly better cancer-related survival than wedge resections. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008 Apr;33(4):728-34.
95. Siene W, Stremmel C, Kirschbaum A, Hinterberger L, Stoelben E, Hasse J, et al. Frequency of local recurrence following segmentectomy of stage IA non-small cell lung cancer is influenced by segment localisation and width of resection margins--implications for patient selection for segmentectomy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007 Mar;31(3):522-7; discussion 7-8.
96. Darling GE, Allen MS, Decker PA, Ballman K, Malthaner RA, Inculet RI, et al. Number of lymph nodes harvested from a mediastinal lymphadenectomy: results of the randomized, prospective American College of Surgeons Oncology Group Z0030 trial. *Chest.* 2011 May;139(5):1124-9.
97. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the

forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009 May;4(5):568-77.

98. Gewanter RM, Rosenzweig KE, Chang JY, Decker R, Dubey S, Kong FM, et al. ACR Appropriateness Criteria: nonsurgical treatment for non-small-cell lung cancer: good performance status/definitive intent. *Curr Probl Cancer*. 2010 May-Jun;34(3):228-49.

99. Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi AT, 3rd, Shepherd FA, Smith C, et al. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2009 Aug 1;374(9687):379-86.

100. Albain KS, Rusch VW, Crowley JJ, Rice TW, Turrisi AT, 3rd, Weick JK, et al. Concurrent cisplatin/etoposide plus chest radiotherapy followed by surgery for stages IIIA (N2) and IIIB non-small-cell lung cancer: mature results of Southwest Oncology Group phase II study 8805. *J Clin Oncol*. 1995 Aug;13(8):1880-92.

101. Dahele M, Senan S. The role of stereotactic ablative radiotherapy for early-stage and oligometastatic non-small cell lung cancer: evidence for changing paradigms. *Cancer Res Treat*. 2011 Jun;43(2):75-82.

102. Heinzerling JH, Kavanagh B, Timmerman RD. Stereotactic ablative radiation therapy for primary lung tumors. *Cancer J*. 2011 Jan-Feb;17(1):28-32.

103. Potters L, Kavanagh B, Galvin JM, Hevezi JM, Janjan NA, Larson DA, et al. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) and American College of Radiology (ACR) practice guideline for the performance of stereotactic body radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Feb 1;76(2):326-32.

104. Fakiris AJ, McGarry RC, Yiannoutsos CT, Papiez L, Williams M, Henderson MA, et al. Stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small-cell lung carcinoma: four-year results of a prospective phase II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Nov 1;75(3):677-82.

105. Timmerman R, Paulus R, Galvin J, Michalski J, Straube W, Bradley J, et al. Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer. *JAMA*. 2010 Mar 17;303(11):1070-6.

106. Decker RH, Tanoue LT, Colasanto JM, Detterbeck FC, Wilson LD. Evaluation and definitive management of medically inoperable early stage non-small-cell lung cancer. Part 2: newer treatment modalities. *Oncology (Williston Park)*. 2006 Jul;20(8):899-905; discussion -8, 13.

107. Lencioni R, Crocetti L, Cioni R, Suh R, Glenn D, Regge D, et al. Response to radiofrequency ablation of pulmonary tumours: a prospective, intention-to-treat, multicentre clinical trial (the RAPTURE study). *Lancet Oncol*. 2008 Jul;9(7):621-8.

108. Simon CJ, Dupuy DE, DiPetrillo TA, Safran HP, Grieco CA, Ng T, et al. Pulmonary radiofrequency ablation: long-term safety and efficacy in 153 patients. *Radiology*. 2007 Apr;243(1):268-75.
109. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jan 22;350(4):351-60.
110. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005 Jun 23;352(25):2589-97.
111. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzales-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2006 Sep;7(9):719-27.
112. Curran WJ, Jr., Paulus R, Langer CJ, Komaki R, Lee JS, Hauser S, et al. Sequential vs. concurrent chemoradiation for stage III non-small cell lung cancer: randomized phase III trial RTOG 9410. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Oct 5;103(19):1452-60.
113. Auperin A, Le Pechoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 May 1;28(13):2181-90.
114. Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M, Nishikawa H, Takada Y, Kudoh S, et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2692-9.
115. Azzoli CG, Temin S, Aliff T, Baker S, Jr., Brahmer J, Johnson DH, et al. 2011 Focused Update of 2009 American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Oct 1;29(28):3825-31.
116. Azzoli CG, Baker S, Jr., Temin S, Pao W, Aliff T, Brahmer J, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6251-66.
117. Souquet PJ, Chauvin F, Boissel JP, Cellerino R, Cormier Y, Ganz PA, et al. Polychemotherapy in advanced non small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lancet*. 1993 Jul 3;342(8862):19-21.
118. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ*. 1995 Oct 7;311(7010):899-909.

119. Magilligan DJ, Jr., Duvernoy C, Malik G, Lewis JW, Jr., Knighton R, Ausman JI. Surgical approach to lung cancer with solitary cerebral metastasis: twenty-five years' experience. *Ann Thorac Surg.* 1986 Oct;42(4):360-4.
120. Ohe Y, Ohashi Y, Kubota K, Tamura T, Nakagawa K, Negoro S, et al. Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan. *Ann Oncol.* 2007 Feb;18(2):317-23.
121. Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, Pluzanska A, Gorbounova V, Kaukel E, et al. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. *J Clin Oncol.* 2003 Aug 15;21(16):3016-24.
122. Smit EF, van Meerbeeck JP, Lianes P, Debruyne C, Legrand C, Schramel F, et al. Three-arm randomized study of two cisplatin-based regimens and paclitaxel plus gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group--EORTC 08975. *J Clin Oncol.* 2003 Nov 1;21(21):3909-17.
123. Zatloukal P, Petruzelka L, Zemanova M, Havel L, Janku F, Judas L, et al. Concurrent versus sequential chemoradiotherapy with cisplatin and vinorelbine in locally advanced non-small cell lung cancer: a randomized study. *Lung Cancer.* 2004 Oct;46(1):87-98.
124. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 20;26(21):3543-51.
125. Kelly K, Crowley J, Bunn PA, Jr., Presant CA, Grevstad PK, Moinpour CM, et al. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non--small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol.* 2001 Jul 1;19(13):3210-8.
126. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2002 Jan 10;346(2):92-8.
127. Chow E, Harris K, Fan G, Tsao M, Sze WM. Palliative radiotherapy trials for bone metastases: a systematic review. *J Clin Oncol.* 2007 Apr 10;25(11):1423-36.
128. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2011 Mar 20;29(9):1125-32.



129. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian NS, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer*. 2004 Jun 15;100(12):2613-21.
130. Scagliotti G, Brodowicz T, Shepherd FA, Zielinski C, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Treatment-by-histology interaction analyses in three phase III trials show superiority of pemetrexed in nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011 Jan;6(1):64-70.
131. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006 Dec 14;355(24):2542-50.
132. Sandler A, Yi J, Dahlberg S, Kolb MM, Wang L, Hambleton J, et al. Treatment outcomes by tumor histology in Eastern Cooperative Group Study E4599 of bevacizumab with paclitaxel/carboplatin for advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010 Sep;5(9):1416-23.
133. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, et al. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAil. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1227-34.
134. Danson S, Middleton MR, O'Byrne KJ, Clemons M, Ranson M, Hassan J, et al. Phase III trial of gemcitabine and carboplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin or mitomycin, vinblastine, and cisplatin in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2003 Aug 1;98(3):542-53.
135. Booton R, Lorigan P, Anderson H, Baka S, Ashcroft L, Nicolson M, et al. A phase III trial of docetaxel/carboplatin versus mitomycin C/ifosfamide/cisplatin (MIC) or mitomycin C/vinblastine/cisplatin (MVP) in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial of the British Thoracic Oncology Group (BTOG1). *Ann Oncol*. 2006 Jul;17(7):1111-9.
136. Greco FA, Spigel DR, Kuzur ME, Shipley D, Gray JR, Thompson DS, et al. Paclitaxel/Carboplatin/gemcitabine versus gemcitabine/vinorelbine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II/III study of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *Clin Lung Cancer*. 2007 Sep;8(8):483-7.
137. Herbst RS, Khuri FR, Lu C, Liu DD, Fossella FV, Glisson BS, et al. The novel and effective nonplatinum, nontaxane combination of gemcitabine and vinorelbine in advanced nonsmall cell lung carcinoma: potential for decreased toxicity and combination with biological therapy. *Cancer*. 2002 Jul 15;95(2):340-53.

138. Pujol JL, Breton JL, Gervais R, Rebattu P, Depierre A, Morere JF, et al. Gemcitabine-docetaxel versus cisplatin-vinorelbine in advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: a phase III study addressing the case for cisplatin. *Ann Oncol.* 2005 Apr;16(4):602-10.
139. Socinski MA, Schell MJ, Peterman A, Bakri K, Yates S, Gitten R, et al. Phase III trial comparing a defined duration of therapy versus continuous therapy followed by second-line therapy in advanced-stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2002 Mar 1;20(5):1335-43.
140. Soon YY, Stockler MR, Askie LM, Boyer MJ. Duration of chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 10;27(20):3277-83.
141. Fidias P, Novello S. Strategies for prolonged therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Dec 1;28(34):5116-23.
142. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet.* 2009 May 2;373(9674):1525-31.
143. Paz-Ares L, de Marinis F, Dediu M, Thomas M, Pujol JL, Bidoli P, et al. Maintenance therapy with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (PARAMOUNT): a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2012 Mar;13(3):247-55.
144. Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicens S, Szczesna A, Juhasz E, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2010 Jun;11(6):521-9.
145. Ciuleanu T, Brodowicz T, Zielinski C, Kim JH, Krzakowski M, Laack E, et al. Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet.* 2009 Oct 24;374(9699):1432-40.
146. Riely GJ, Kris MG, Zhao B, Akhurst T, Milton DT, Moore E, et al. Prospective assessment of discontinuation and reinitiation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of everolimus. *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 1;13(17):5150-5.
147. Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer.* 2009 Jul;10(4):281-9.

148. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009 Aug;28 Suppl 1:S24-31.
149. Fossella FV, DeVore R, Kerr RN, Crawford J, Natale RR, Dunphy F, et al. Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2000 Jun;18(12):2354-62.
150. Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, Mattson K, Gralla R, O'Rourke M, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000 May;18(10):2095-103.
151. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, Pereira JR, De Marinis F, von Pawel J, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1589-97.
152. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):123-32.
153. Sandler AB, Johnson DH, Herbst RS. Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 15;10(12 Pt 2):4258s-62s.
154. Giaccone G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005 May 10;23(14):3235-42.
155. Sequist LV, Joshi VA, Janne PA, Muzikansky A, Fidias P, Meyerson M, et al. Response to treatment and survival of patients with non-small cell lung cancer undergoing somatic EGFR mutation testing. *Oncologist*. 2007 Jan;12(1):90-8.
156. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):947-57.
157. Inoue A, Kobayashi K, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 20;27(9):1394-400.
158. Patel JD, Hensing TA, Rademaker A, Hart EM, Blum MG, Milton DT, et al. Phase II study of pemetrexed and carboplatin plus bevacizumab with maintenance pemetrexed and bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 10;27(20):3284-9.

159. Nadler E, Yu E, Ravelo A, Sing A, Forsyth M, Gruschkus S. Bevacizumab treatment to progression after chemotherapy: outcomes from a U.S. community practice network. *Oncologist*. 2011;16(4):486-96.
160. Brodowicz T, Krzakowski M, Zwitter M, Tzekova V, Ramlau R, Ghilezan N, et al. Cisplatin and gemcitabine first-line chemotherapy followed by maintenance gemcitabine or best supportive care in advanced non-small cell lung cancer: a phase III trial. *Lung Cancer*. 2006 May;52(2):155-63.
161. Taylor EC, Harrington PJ, Fletcher SR, Beardsley GP, Moran RG. Synthesis of the antileukemic agents 5,10-dideazaaminopterin and 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydroaminopterin. *J Med Chem*. 1985 Jul;28(7):914-21.
162. Beardsley GP, Moroson BA, Taylor EC, Moran RG. A new folate antimetabolite, 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolate is a potent inhibitor of de novo purine synthesis. *J Biol Chem*. 1989 Jan 5;264(1):328-33.
163. Taylor EC, Kuhnt D, Shih C, Rinzel SM, Grindey GB, Barredo J, et al. A dideazatetrahydrofolate analogue lacking a chiral center at C-6, N-[4-[2-(2-amino-3,4-dihydro-4-oxo-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoyl]-L-glutamic acid, is an inhibitor of thymidylate synthase. *J Med Chem*. 1992 Nov 13;35(23):4450-4.
164. Shih C, Chen VJ, Gossett LS, Gates SB, MacKellar WC, Habeck LL, et al. LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes. *Cancer Res*. 1997 Mar 15;57(6):1116-23.
165. Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Mar;26(1):153-81.
166. Appling DR. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB J*. 1991 Sep;5(12):2645-51.
167. Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med*. 1948 Jun 3;238(23):787-93.
168. Chattopadhyay S, Moran RG, Goldman ID. Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications. *Mol Cancer Ther*. 2007 Feb;6(2):404-17.
169. Racanelli AC, Rothbart SB, Heyer CL, Moran RG. Therapeutics by cytotoxic metabolite accumulation: pemetrexed causes ZMP accumulation, AMPK activation, and mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res*. 2009 Jul 1;69(13):5467-74.
170. Sierra EE, Brigle KE, Spinella MJ, Goldman ID. pH dependence of methotrexate transport by the reduced folate carrier and the folate receptor in L1210 leukemia cells. Further evidence for a third route mediated at low pH. *Biochem Pharmacol*. 1997 Jan 24;53(2):223-31.

171. Sierra EE, Goldman ID. Characterization of folate transport mediated by a low pH route in mouse L1210 leukemia cells with defective reduced folate carrier function. *Biochem Pharmacol.* 1998 May 1;55(9):1505-12.
172. Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004 Apr 29;56(8):1067-84.
173. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:537-92.
174. Deeley RG, Westlake C, Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev.* 2006 Jul;86(3):849-99.
175. Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat.* 2006 Aug-Oct;9(4-5):227-46.
176. Wettergren Y, Odin E, Nilsson S, Willen R, Carlsson G, Gustavsson B. Low expression of reduced folate carrier-1 and folylpolyglutamate synthase correlates with lack of a deleted in colorectal carcinoma mRNA splice variant in normal-appearing mucosa of colorectal carcinoma patients. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(4):348-55.
177. Ferreri AJ, Dell'Oro S, Capello D, Ponzoni M, Iuzzolino P, Rossi D, et al. Aberrant methylation in the promoter region of the reduced folate carrier gene is a potential mechanism of resistance to methotrexate in primary central nervous system lymphomas. *Br J Haematol.* 2004 Sep;126(5):657-64.
178. Levy AS, Sather HN, Steinherz PG, Sowers R, La M, Moscow JA, et al. Reduced folate carrier and dihydrofolate reductase expression in acute lymphocytic leukemia may predict outcome: a Children's Cancer Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003 Sep;25(9):688-95.
179. Alt FW, Kellems RE, Bertino JR, Schimke RT. Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J Biol Chem.* 1978 Mar 10;253(5):1357-70.
180. Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, et al. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 15;88(20):8977-81.
181. Roy K, Egan MG, Sirlin S, Sirotnak FM. Posttranscriptionally mediated decreases in folylpolyglutamate synthetase gene expression in some folate analogue-resistant variants of the L1210 cell. Evidence for an altered cognate mRNA in the variants affecting the rate of de novo synthesis of the enzyme. *J Biol Chem.* 1997 Mar 14;272(11):6903-8.
182. van der Wilt CL, Backus HH, Smid K, Comijn L, Veerman G, Wouters D, et al. Modulation of both endogenous folates and thymidine enhance the therapeutic efficacy of thymidylate synthase inhibitors. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3675-81.

183. Zhao R, Gao F, Goldman ID. Marked suppression of the activity of some, but not all, antifolate compounds by augmentation of folate cofactor pools within tumor cells. *Biochem Pharmacol.* 2001 Apr 1;61(7):857-65.
184. European Medicines Agency. ALIMTA 100mg powder for concentrate for solution for infusion: summary of product characteristics [online]. Available from URL: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDRs/EPAR/alimta/H-564-Pl-enpdf> [Acceso 19 mayo 2012].
185. Cullen MH, Zatloukal P, Sorenson S, Novello S, Fischer JR, Joy AA, et al. A randomized phase III trial comparing standard and high-dose pemetrexed as second-line treatment in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2008 May;19(5):939-45.
186. Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. *Vitam Horm.* 2003;66:403-56.
187. Goldman ID, Zhao R. Molecular, biochemical, and cellular pharmacology of pemetrexed. *Semin Oncol.* 2002 Dec;29(6 Suppl 18):3-17.
188. Matherly LH, Hou Z, Deng Y. Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Mar;26(1):111-28.
189. Whetstone JR, Flatley RM, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem J.* 2002 Nov 1;367(Pt 3):629-40.
190. Wang Y, Zhao R, Russell RG, Goldman ID. Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Jul 2;1513(1):49-54.
191. Zhao R, Russell RG, Wang Y, Liu L, Gao F, Kneitz B, et al. Rescue of embryonic lethality in reduced folate carrier-deficient mice by maternal folic acid supplementation reveals early neonatal failure of hematopoietic organs. *J Biol Chem.* 2001 Mar 30;276(13):10224-8.
192. Rothem L, Ifergan I, Kaufman Y, Priest DG, Jansen G, Assaraf YG. Resistance to multiple novel antifolates is mediated via defective drug transport resulting from clustered mutations in the reduced folate carrier gene in human leukaemia cell lines. *Biochem J.* 2002 Nov 1;367(Pt 3):741-50.
193. Payton SG, Liu M, Ge Y, Matherly LH. Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier A1/A2 promoter: Identification of critical roles for the USF and GATA families of transcription factors. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Nov 10;1731(2):115-24.

194. Worm J, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Guldberg P. Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2001 Oct 26;276(43):39990-40000.
195. Ding BC, Witt TL, Hukku B, Heng H, Zhang L, Matherly LH. Association of deletions and translocation of the reduced folate carrier gene with profound loss of gene expression in methotrexate-resistant K562 human erythroleukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 2001 Mar 15;61(6):665-75.
196. Adjei AA, Salavaggione OE, Mandrekar SJ, Dy GK, Ziegler KL, Endo C, et al. Correlation between polymorphisms of the reduced folate carrier gene (SLC19A1) and survival after pemetrexed-based therapy in non-small cell lung cancer: a North Central Cancer Treatment Group-based exploratory study. *J Thorac Oncol*. 2010 Sep;5(9):1346-53.
197. Maddox DM, Manlapat A, Roon P, Prasad P, Ganapathy V, Smith SB. Reduced-folate carrier (RFC) is expressed in placenta and yolk sac, as well as in cells of the developing forebrain, hindbrain, neural tube, craniofacial region, eye, limb buds and heart. *BMC Dev Biol*. 2003 Jul 29;3:6.
198. Hinken M, Halwachs S, Kneuer C, Honscha W. Subcellular localization and distribution of the reduced folate carrier in normal rat tissues. *Eur J Histochem*. 2011;55(1):e3.
199. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-81.
200. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982 Dec;5(6):649-55.