

Factores moleculares predictivos de respuesta y toxicidad para seleccionar el tratamiento adyuvante

E. Bandrés, J. García-Foncillas

La medicina personalizada pretende generar una unión consistente entre el perfil molecular del individuo y el perfil clínico de la enfermedad, ayudando a los profesionales de la medicina a tomar decisiones más acertadas en el tratamiento individual de cada paciente. El análisis molecular de determinadas enfermedades con fenotipos clínicos homogéneos, puede ayudarnos a distinguir distintas entidades moleculares que requieran diferentes estrategias terapéuticas, con el fin de obtener mayores éxitos en la terapia. De esta forma la clasificación de enfermedades de acuerdo a la subclínica puede ser reemplazada por una clasificación molecular. Las terapias dirigidas contra la diana responsable de determinadas patologías pueden reemplazar a las terapias clásicas, que en la mayoría de las ocasiones se limitan a tratar los síntomas de la enfermedad. De esta manera se espera que en un futuro muy próximo se desarrollen test farmacogenómicos que predigan la respuesta a la terapia según el perfil genómico de cada paciente. La medicina personalizada puede generar cambios radicales en la industria farmacéutica y en la práctica médica, aportando enormes beneficios para la salud del individuo^{1,2}.

El patrón de expresión génica en un determinado tejido, puede revelar mecanismos de acción de determinadas drogas en el contexto genético y puede servir para aclarar diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos³. Puede resultar especialmente importante realizar estudios del perfil de transcripción en tumores, ya que los patrones de expresión génica alterados pueden servir como guía para seleccionar una terapia efectiva o evitar exposiciones innecesarias a determinadas drogas tóxicas, porque son inefectivas. El proyecto genoma humano (HGP) y las avanzadas tecnologías automatizadas, como la tecnología *microarray*, van a tener un impacto profundo en el descubrimiento de nuevas drogas, su desarrollo y su aplicación terapéutica. La aplicación de esta técnica en *screening* y toxicología de fármacos permite analizar de una forma rápida los cambios de expresi-

sión génica que se dan durante la administración de un fármaco, así como la localización de posibles dianas terapéuticas nuevas y los efectos toxicológicos asociados.

La tecnología *microarray* permite estudiar simultáneamente la expresión de miles de genes en un experimento único. Se puede estudiar la función de los genes al facilitar la identificación de qué genes están activados de forma diferencial cuando se comparan tejido sano y enfermo, células en distintas etapas de desarrollo, en distintas condiciones metabólicas o ambientales. Este enfoque posibilita el desarrollo de la "genómica funcional". La tecnología *microarray* se basa en la tecnología Southern, que viene desarrollándose en ciencia desde los años 70. Las innovaciones tecnológicas como la miniaturización y la detección con fluorescencia, aportan notables ventajas con respecto a las técnicas tradicionales⁴. Un *microarray* está formado por cientos o miles de puntos, cada uno de los cuales representa la secuencia de un determinado gen. Estos puntos pueden ser productos de PCR de cDNA u oligonucleótidos, que son inmovilizados en una superficie sólida, habitualmente cristal. La muestra problema a analizar, RNA total o RNAm, es transformada en DNA complementario incorporando nucleótidos marcados fluorescentemente, normalmente Cy3 o Cy5. Los cDNA provenientes de dos muestras diferentes (tejido tumoral versus tejido normal), marcados con distintos fluorocromos, son hibridados con un mismo *microarray* y la fluorescencia en cada punto se determina mediante la utilización de un láser confocal. Tras la excitación y emisión de fluorescencia, se obtiene una señal cuantificable que se convierte en una matriz de puntos verdes, rojos o amarillos según la expresión relativa para cada gen en cada una de las muestras. La cantidad de RNA utilizado, la eficacia del marcaje del cDNA y la eficiencia en la hibridación, puede variar significativamente entre los distintos experimentos y resulta imprescindible "normalizar" los datos obtenidos. En estos experimentos se obtiene una gran información, con numerosos datos que deben ser procesados. Es en este punto donde la bioinformática adquiere su protagonismo aportando numerosas herramientas que permiten analizar toda la información obtenida^{5,6}.

Otro elemento clave en la búsqueda de genes relevantes para explicar una determinada enfermedad y/o terapia, es obtener un mapa comprensible de los polimorfismos distribuidos por todo el genoma. El término polimorfismo se define como las variaciones que existen en el DNA genómico y que ocurren en al menos el 1% de la población. La gran ma-

yoría de estos polimorfismos son cambios de un solo nucleótido o SNP (*single nucleotide polymorphisms*). Puesto que el genoma humano está formado por 3 billones de nucleótidos y existe una variación cada 300 pares de bases, las diferencias que podrían esperarse existen entre dos genomas, sería de 10 millones de SNP. Hasta ahora se conoce sólo una pequeña porción de estos SNP y una minoría de ellos se ha asociado con la respuesta a drogas, de manera que la tarea pendiente en este campo es enorme.

Las principales empresas farmacéuticas han respondido con grandes inversiones económicas al énfasis creciente en el desarrollo de una terapia individualizada para conseguir una mayor eficacia y seguridad de sus fármacos. Consideran esenciales el desarrollo de nuevos test genéticos, capaces de discernir en qué pacientes una determinada droga va a ser más efectiva y segura. El desarrollo de estas nuevas tecnologías es imprescindible en el avance de la farmacogenómica y no sólo permite identificar qué genes están afectando a la eficacia de una determinada droga sino que también está permitiendo identificar genes implicados directamente en la patogenia de una enfermedad determinada, descubriendo nuevas dianas potenciales para el desarrollo de fármacos novedosos⁷. Todo esto nos conduce a aproximaciones en el desarrollo de drogas nuevas, a la aplicación de una terapia individualizada y al desarrollo de una medicina más preventiva.

Aplicación de la farmacogenómica y de la farmacogenética en el cáncer de colon

En el campo de la oncología es particularmente evidente la necesidad de nuevos diagnósticos y nuevas estrategias terapéuticas. La clasificación de los tumores en subtipos patogénicos con diferentes cursos clínicos, puede ayudar a los médicos a desarrollar terapias más específicas. En el caso del cáncer colorrectal, la clasificación de Dukes y el estadiaje con el sistema TNM clasifica el tumor de acuerdo a su apariencia histológica. Sin embargo, la práctica clínica demuestra que aquellos tumores con características histopatológicas similares, presentan distintas respuestas a la terapia y por lo tanto muy diferentes pronósticos.

El fundamento del tratamiento actual para el cáncer de colon consiste en la resección del tumor mediante cirugía. Esta terapia, si bien resulta curativa en los estadios del tumor precoces, no resulta eficaz en aquellos pacientes con micro-metástasis o metástasis a distancia. Aunque se ha demostrado que el cáncer de colon representa una patogenia muy heterogénea desde el punto de vista clínico y patológico, el tratamiento quimioterápico aplicado, por el momento, es estándar⁸. Las drogas citotóxicas utilizadas son efectivas sólo en algunos pacientes, mientras que en otros, además de no ser eficaces, resultan altamente tóxicas. Por lo tanto es necesario localizar marcadores de pronóstico que puedan facilitar la identificación de aquellos pacientes que van a beneficiarse en mayor medida del tratamiento citostático. Habitualmente, todos los pacientes con cáncer de colon en estadio III son tratados con quimioterapia adyuvante. Sin embargo, un estudio realizado por Moertel et al.⁹ indica que tras la cirugía, la supervivencia a 5 años era tan sólo del 45%, mientras que en

aquellos pacientes que habían recibido quimioterapia adyuvante el porcentaje de supervivencia era del 65%. Lo que indican estos datos es que cerca de la mitad de los pacientes que han recibido quimioterapia se hubieran curado sin ella y que el 35% de los pacientes fallecen a pesar de haber recibido el tratamiento. Las diferencias genéticas individuales pueden ayudar a determinar el potencial metastásico de cada tumor y determinar distintos protocolos de tratamientos adyuvantes. Los cambios genéticos observados habitualmente en el cáncer de colon están siendo estudiados como posibles marcadores que puedan proveer pistas a los clínicos con el fin de realizar una intervención terapéutica más racional¹⁰. Además de la efectividad de la droga es importante poder predecir la toxicidad de los distintos tratamientos. Las células tumorales poseen un genoma que difiere sólo sutilmente de las células normales de las cuales derivan, por lo que muchas dianas, frente a las que van dirigidas las drogas anti-tumorales, afectan del mismo modo a las células normales. De esta manera muchas de las drogas que son capaces de matar células tumorales, son poco específicas y provocan daños colaterales muy importantes en las células normales. Se considera que estas drogas presentan un estrecho rango terapéutico en cuanto a que la relación existente entre la dosis que se asocia con la eficacia anti-tumoral y la toxicidad que presenta es demasiado pequeña.

Los compuestos formados por las tiopurinas son las drogas utilizadas más ampliamente, como terapia anti-tumoral. Estas prodrogas son convertidas por enzimas en nucleótidos de tio-guanina, los cuales son incorporados en el DNA provocando la muerte celular. Uno de estos fármacos, el agente 5-fluoruracilo (5-FU) es prescrito comúnmente para el tratamiento de tumores sólidos y es el principal agente quimioterápico utilizado en el tratamiento del cáncer colorrectal. Resulta raro comprobar que a pesar de ser el tercer agente anti-tumoral más prescrito, sólo el 20-30% de los pacientes con cáncer colorrectal responden al tratamiento. El 5-FU es una molécula en la que se sustituye en el carbono 5 del anillo de pirimidina del uracilo el hidrógeno por flúor. La enzima timidina fosforilasa (TP) cataliza la conversión de 5-fluoruracilo a FdR y posteriormente sufre una fosforilación por la timidina quinasa (TK) a 5-fluoro-2'-deoxiuridin-5'-monofosfato (FdUMP). Este metabolito es el que inhibe directamente a la enzima timidilato sintasa (TS). Esta enzima es necesaria para la síntesis de piridinas de novo y su inhibición impide la replicación del DNA y por tanto el crecimiento tumoral^{11,12}.

Diferentes niveles de la enzima timidilato sintasa (TS) afecta directamente la efectividad de dicho agente y se ha comprobado en diferentes estudios una relación inversa entre los niveles de RNAm^{13,14} o de enzima¹⁵ y la respuesta obtenida al tratamiento. Recientemente además se ha demostrado que la presencia de esta enzima es diferente en distintos puntos de metástasis. Gorlick et al.¹⁶ han demostrado que los niveles de RNAm de TS es mayor en las metástasis pulmonares que en las metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorrectal. Este dato coincide con los publicados por Cascinu et al.¹⁷, según los cuales los niveles de TS también son mayores en las metástasis abdominales que en las hepáticas. Estas variaciones intra-pacientes en los niveles de TS entre los tumores primarios y entre los distintos puntos de metástasis, puede indicarnos la necesidad de cuantificar la expresión de esta enzima con el fin de obtener un mejor indicador de la falta de respuesta a 5-FU. Se ha descrito tam-

bién un polimorfismo genético en el gen para la enzima TS que actúa como regulador de la expresión de dicha enzima. Este polimorfismo está caracterizado por un número de repeticiones en *tandem* (dos o tres repeticiones), en la región promotora del gen de la TS de una secuencia de 28 pares de bases. Un número mayor de repeticiones implica una expresión mayor de la enzima y por tanto, aquellos pacientes homocigotos con tres repeticiones en *tandem* tienen una mayor actividad de la TS y por tanto una menor probabilidad de responder al tratamiento con 5-FU que aquellos pacientes homocigotos con dos repeticiones^{18, 19}. En uno de estos estudios los investigadores evalúan 50 pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado que han sido tratados con 5-FU. Los resultados obtenidos demostraron que el 50% de los pacientes tienen una copia del promotor con una doble repetición y otra con triple repetición; el 29% de los pacientes presentan los dos genes con triple repetición y el 21% tienen los dos genes con una doble repetición. Se demuestra que aquellos pacientes en los que en la región promotora de ambos genes existe una doble repetición, son los que responden mejor al tratamiento con 5-FU y los tumores disminuyen o desaparecen completamente durante al menos 6 semanas²⁰. La supervivencia en estos pacientes es aproximadamente de 8 meses más que en los pacientes con otros tipos de variaciones. Estos datos sugieren que este simple test genético puede ayudar a determinar qué pacientes con cáncer colorrectal serían los más beneficiados por el tratamiento con esta droga. Sin embargo, en este estudio además se comprueba que aquellos pacientes con la variante genética más beneficiosa en cuanto a la respuesta, son además aquellos más sensibles a los efectos adversos provocados por la droga y por tanto este test también identifica aquellos pacientes que requieren un mayor seguimiento cuando son tratados.

Es importante señalar que aunque una alta expresión de la TS es indicativa de quimiorresistencia a 5-FU, una baja expresión no identifica necesariamente individuos que van a responder. Otros marcadores, tales como aquellas enzimas implicadas en el metabolismo del 5-FU, podrían ayudar a explicar la falta de respuesta a 5-FU. La enzima timidin-fosforilasa (TP) es una enzima que cataliza la fosforilación reversible de timina y deoxiuridina a sus bases y deoxirribosas fosfato. Se ha demostrado que esta enzima induce angiogénesis y crecimiento tumoral²¹ y además permite la activación de ciertas prodrogas como por ejemplo la conversión de FUDR a 5-FU. Un estudio realizado por Metzger et al demuestra que la expresión de TP es un factor predictivo independiente en pacientes con cáncer colorrectal tratados con 5FU más leucovorin. Niveles bajos de expresión de TP en el tumor se observan en aquellos pacientes que responden al tratamiento, mientras que ninguno de los pacientes con una expresión alta de TP o TS respondieron al tratamiento^{22, 23}. Estos datos contrastan claramente con la evidencia teórica de que aquellas células con una mayor expresión de TP, deberían ser más sensibles al 5FU. Esta discrepancia puede sugerir que la asociación inversa entre los niveles de expresión de TP y la respuesta a 5FU es una consecuencia del papel angiogénico de la enzima TP.

Otra enzima importante involucrada en la función del 5-FU es la dihidropirimidina dehidrogenasa (DPD). Más del 80% del 5-FU es inactivado en el hígado por esta enzima y la actividad de la DPD varía entre individuos entre 5-21 veces^{24, 25}. Un estudio publicado demuestra que en los tumores

de pacientes con cáncer colorrectal con expresión baja de esta enzima presentan mejores respuestas. Por otro lado, los pacientes con una baja actividad de la DPD no consiguen inactivar adecuadamente el 5-FU y se forman cantidades excesivas de metabolitos activos provocando grandes toxicidades que pueden llegar a ser mortales²⁶. Se ha descrito un amplio número de polimorfismos en esta enzima que podrían afectar a su actividad. Se ha comprobado que los individuos que padecen toxicidad severa frente al 5-FU presentan una actividad reducida de la enzima DPD (por debajo de 100pmol/min/mg de proteína en células de sangre periférica)²⁷. Aproximadamente el 3% de la población es portadora de mutaciones heterocigotas que inactivan la DPD y el 0.1% son homocigotos para estas mutaciones. La deficiencia completa de esta enzima provoca un metabolismo deficiente de las pirimidinas, que se asocia con desórdenes neurológicos. Se han documentado al menos 350 casos de asociación entre deficiencia en la enzima DPD y toxicidad severa a 5-FU y en siete de ellos los pacientes han fallecido²⁸. Una transición de G a A en la región 5' de la secuencia consenso de *splicing* del exón 14 ocurre en el 50% de los individuos que presentan un alelo no funcional de la proteína DPD, provocando una delección del exón 14 y por tanto la generación de una proteína truncada que es degradada por el proteosoma. Un estudio realizado en 25 pacientes con toxicidad en grado III-IV demostró que el 24% de los pacientes eran portadores de esta mutación, aportando pruebas sobre la necesidad de realizar dicho genotipaje antes del tratamiento quimioterápico con 5-FU²⁹. Si bien esta mutación parece ser la más frecuente, hasta ahora se han descrito un total de 20 mutaciones que se asocian con una actividad reducida de la enzima DPD y por tanto quizás en un futuro sea necesario realizar un *screening* completo de todo el gen. Por otro lado, otros trabajos demuestran que aproximadamente entre un 33-66% de pacientes con toxicidad severa tras el tratamiento con el 5-FU presentan un fenotipo normal en la enzima DPD, lo que sugiere que además de esta enzima existen otros factores que determinan la toxicidad a esta droga.

El análisis de expresión de mRNA de las enzimas DPD y TP en combinación con el análisis de expresión de la enzima TS, sugieren que estas tres enzimas podrían actuar como factores predictivos independientes de resistencia a 5-FU en cáncer colo-rectal metastásico³⁰.

Aunque estas enzimas, TS, DPD y TP son las que por el momento han aportado resultados más favorables como marcadores de resistencia, otros muchos genes están siendo investigados. El gen p53 y su proteína están involucrados directamente en el control del ciclo celular y el mecanismo de apoptosis. En un 50-60% de tumores de colon se observan mutaciones en dicho gen que provoca una sobreexpresión del mismo³¹. La sobreexpresión de esta proteína se ha asociado con un peor pronóstico, aunque los resultados existentes en la literatura a nivel clínico son conflictivos en este sentido³². Sólo existe un trabajo en el que se demuestra que la sobreexpresión de este gen se correlaciona con una peor respuesta en pacientes de cáncer colorrectal tratados con bolus de 5-FU más leucovorin³³. En líneas celulares de cáncer de colon se ha comprobado que la disrupción de la vía de p53 puede provocar resistencia a 5-FU.

Otro gen que ha sido investigado en cáncer colorrectal es el gen k-ras. Su influencia en la respuesta obtenida en el tratamiento quimioterápico con 5-FU se ha analizado en dos

estudios y en ninguno de los dos trabajos se ha demostrado asociación entre las mutaciones en este gen y la quimiosensibilidad^{34, 35}.

El 5-fluorouracilo interacciona con algunos otros fármacos antineoplásicos, confiriendo una acción sinérgica lo cual ha facilitado la puesta en marcha de regímenes de poliquimioterapia cuyo objetivo se cifra en aumentar la tasa de respuesta y, por extensión, la supervivencia global de estos pacientes. Algunos de estos citostáticos que pueden utilizarse como adyuvantes son:

- El ácido folínico o leucovorin se une a un punto distinto de la TS que el FdUMP, estableciéndose un complejo ternario entre los tres elementos que aumenta la inhibición de la TS.
- El tomudex (Raltitrexed), es otro inhibidor competitivo de la timidilato sintetasa, favoreciendo de esta manera la actividad del 5-fluorouracilo.

Los niveles de expresión de la enzima Timidilato Sintetasa, al igual que ocurre con el 5-FU, condiciona la respuesta obtenida a la poliquimioterapia con estos fármacos.

- Los derivados de platino como el cisplatino, carboplatino u oxaliplatino aumentan el contenido intracelular de folatos reducidos, aumentan el daño producido sobre el DNA e interfieren en la reparación del DNA. De todos ellos, el más utilizado en terapia de cáncer de colon es el oxaliplatino. Como agente único con este compuesto se obtienen respuestas modestas, pero es muy activo en combinación con 5-FU. Como tratamiento de primera línea, la combinación de ambos compuestos muestra ratios de respuestas de un 50-53%. Oxaliplatino actúa principalmente formando aductos en el DNA y los genes implicados en el sistema de reparación del DNA deben estar implicados en la respuesta obtenida. De todos los posibles genes implicados en el sistema de reparación, existen por el momento algunas evidencias de que una alta expresión del gen ERCC1 es un factor predictivo de la pobre respuesta obtenida en pacientes tratados con 5-FU más oxaliplatino³⁶.

La capecitabina es otra fluorpirimidina que ha demostrado ratios de respuesta similares al 5-Fu en enfermedad metastásica con una toxicidad aceptable y la ventaja de ser administrada por vía oral. La enzima TP cataliza el paso final de activación de este fármaco y se ha demostrado que la expresión de esta enzima es mayor en tumores que en tejidos normales, lo cual sugiere que este fármaco presenta una mayor especificidad tumoral. El mecanismo de acción es similar al 5-FU y al igual que ocurre con este agente, el nivel de expresión de la enzima TS se ha asociado con la respuesta obtenida a la capecitabina. Un pequeño estudio realizado en el promotor de la TS también ha demostrado que aquellos pacientes con el genotipo 2R/2R en esta región, muestran las tasas de respuestas más altas (80%)³⁷. Concentraciones bajas de DPD podrían asociarse también con la respuesta a capecitabina. Sin embargo, en contraste a lo que ocurre con el 5-FU, los tumores con niveles altos de TP responden mejor al tratamiento, lo cual indica un nuevo mecanismo de acción diferente al 5-FU.

El Irinotecan o CPT-11 es otro producto que está siendo utilizado como tratamiento quimioterápico frente el cáncer de colon, como agente único o en combinación con 5-FU.

Los resultados obtenidos en primera línea de tratamiento, demuestran que la incorporación del irinotecan al tratamiento con 5-FU incrementa la ratio de respuesta de un 22% a un 35% y la supervivencia en tres meses. Este producto se administra como una prodroga que requiere ser transformada por la carboxilesterasa, la cual activa el fármaco a SN-38 que bloquea la topoisomerasa I y por tanto inhibe el crecimiento celular³⁸. La enzima hepática UDP-glucuroniltransferasa 1A1 inactiva el producto activo del fármaco, SN-38, mediante glucuronidación, siendo el producto originado eliminado por la bilis y la orina. La toxicidad dosis-limitante del irinotecan consiste, entre otros efectos, en diarrea y leucopenia y estos efectos tóxicos están asociados con una excesiva formación de SN-38³⁹. Estudios *in vitro* han demostrado que la variación interindividual en la capacidad de introducir un grupo glucurónico al compuesto SN-38 varía entre 17-52 veces, de manera que la variabilidad en cuanto a la respuesta al irinotecan puede estar relacionada con la tasa de glucuronidación^{40, 41}. En la región promotora de este gen también se ha descrito un polimorfismo que afecta a la expresión de la enzima⁴². Este polimorfismo consiste en variaciones en un determinado número de repeticiones TA (zona de unión del factor de transcripción IID). La presencia de siete repeticiones TA, (TA)₇, TAA, UGT1, A1*28, en comparación con la forma agreste de seis repeticiones, en la región promotora de UGT1, reduce la expresión de la enzima y por tanto reduce también los niveles de SN-38-glucuronizado⁴³. Esto provoca una mayor acumulación de SN-38, provocando efectos adversos importantes durante la terapia con irinotecan. En cuanto a la eficacia de este fármaco, otro gen que ha sido implicado como marcador predictivo es el gen k-ras. Se ha sugerido que productos mutantes de este gen pueden alterar la expresión de c-fos, alterando la sensibilidad de células tumorales a las camptotecinas. El producto del oncogen fos regula la síntesis de DNA y los mecanismos de reparación del DNA aumentando en parte la expresión de la enzima Topoisomerasa I. Esta enzima es la principal diana del CPT-11 y por tanto un aumento en su expresión podría provocar resistencia al tratamiento⁴⁴. Estudios *in vitro* han demostrado que aquellas líneas celulares con alta expresión de c-fos muestran una mayor resistencia a camptotecinas. En un trabajo *in vivo* se ha comprobado que pacientes con mutaciones en k-ras, tienen un menor tiempo de supervivencia tras el tratamiento con CPT-11 que aquellos pacientes con el gen k-ras normal.

Bibliografía

1. Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000 Mar; 24(3):236-44.
2. Evans DAP. Genetic factors in drug therapy. In: *Clinical and Molecular Pharmacogenetics*. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.
3. Kleyen PW, Vesell ES. Genetic variation as a guide to drug development. *Science*. 1998; 281:1820-1.
4. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999; 286:487-91.

5. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Dec 8; 95(25):14863-8.
6. Hollon T. Comparing microarray data: What technology is needed? *J Natl Cancer Inst* 2001 Aug 1; 93(15):1126-7.
7. Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res* 2001 Apr 1; 61(7):3124-30.
8. Seymour MT. Colorectal cancer: treatment of advanced disease. *Cancer Treat Rev* 1998 Apr; 24(2):119-31.
9. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995 Dec; 13(12):2936-43.
10. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Hamilton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001 Apr 19; 344(16):1196-206.
11. 5-Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988 Oct; 6(10):1653-64.
12. Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 1987 Apr 15; 47(8):2203-6.
13. Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, Boswell W, Metzger R, Tan M, Danenberg PV. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 1997 Oct; 15(10):3223-9.
14. Kornmann M, Link KH, Lenz HJ, Pillasch J, Metzger R, Butzer U, Leder GH, Weindel M, Safi F, Danenberg KD, Beger HG, Danenberg PV. Thymidylate synthase is a predictor for response and resistance in hepatic artery infusion chemotherapy. *Cancer Lett* 1997 Sep 16; 118(1):29-35.
15. Aschele C, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C, Lionetto R, Maley F, Sobrero A. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999 Jun; 17(6):1760-70.
16. Gorlick R, Metzger R, Danenberg KD, Salonga D, Miles JS, Longo GS, Fu J, Banerjee D, Klimstra D, Jhanwar S, Danenberg PV, Kemeny N, Bertino JR. Higher levels of thymidylate synthase gene expression are observed in pulmonary as compared with hepatic metastases of colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1998 Apr; 16(4):1465-9.
17. Cascinu S, Aschele C, Barni S, Debernardis D, Baldo C, Tunesi G, Catalano V, Staccioli MP, Brenna A, Muretto P, Catalano G. Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999 Aug; 5(8):1996-9.
18. Villafranca E, Okruzhnov Y, Domínguez MA, García-Foncillas J, Azinovic I, Martínez E, Illarramendi JJ, Arias F, Martínez R, Salgado E, Angeletti S, Brugarolas A. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001 Mar 15; 19(6):1779-86.
19. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 1999 Jul-Aug; 19(4B):3249-52.
20. Marsh S, McKay JA, Cassidy J, McLeod HL. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2001 Aug; 19(2):383-6.
21. Moghaddam A, Zhang HT, Fan TP, Hu DE, Lees VC, Turley H, Fox SB, Gatter KC, Harris AL, Bicknell R. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Feb 14; 92(4):998-1002.
22. Griffiths L, Stratford IJ. Platelet-derived endothelial cell growth factor thymidine phosphorylase in tumour growth and response to therapy. *Br J Cancer* 1997; 76(6):689-93.
23. Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, Lenz HJ, Groshen S, Leichman L, Danenberg PV. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1998 Oct; 4(10):2371-6.
24. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N, Schneider M, Demard F, Milano G. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994 Nov; 12(11):2248-53.
25. Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res* 1993 Nov 15; 53(22):5433-8.
26. González FJ, Fernández-Salguero P. Diagnostic analysis, clinical importance and molecular basis of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Trends Pharmacol Sci* 1995 Oct; 16(10):325-7.
27. Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest* 1988 Jan; 81(1):47-51.
28. Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, High L, Smith JB, Diasio RB. Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999 Aug; 5(8):2006-11.
29. van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J, Meisma R, Zoetekouw L, Waterham HR, Baas F, Richel DJ, van Gennip AH. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 2001 May; 7(5):1149-53.
30. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000 Apr; 6(4):1322-7.
31. Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R, Banerjee D, Bertino JR, Groshen S, Leichman LP, Leichman CG. p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. *Clin Cancer Res* 1998 May; 4(5):1243-50.
32. Tórtola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, Sancho FJ, Peinado MA, Capella G. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of

- routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999 May; 17(5):1375-81.
33. Brett MC, Pickard M, Green B, Howel-Evans A, Smith D, Kinse-lla A, Poston G. p53 protein overexpression and response to biomodulated 5-fluorouracil chemotherapy in patients with ad-vanced colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 1996 Apr; 22(2):182-5.
34. Wadler S, Bajaj R, Neuberg D, Agarwal V, Haynes H, Benson AB 3rd. Prognostic implications of c-Ki-ras2 mutations in pa-tients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluoroura-cil and interferon: a study of the eastern cooperative oncology group (EST 2292) *Cancer J Sci Am* 1997 Sep-Oct; 3(5):284-8.
35. Markowitz S, Hines JD, Lutterbaugh J, Myeroff L, Mackay W, Gordon N, Rustum Y, Luna E, Kleinerman J. Mutant K-ras onco-genes in colon cancers Do not predict Patient's chemotherapy response or survival. *Clin Cancer Res* 1995 Apr; 1(4):441-5.
36. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, Groshen S, Tsao-Wei DD, Danenberg PV, Lenz HJ. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survi-val for colorectal cancer patients receiving combination oxali-platin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001 Dec 1; 19(23):4298-304.
37. Park DJ, Stoelmacher J, Zhang W et al. Human thymidylate synthase gene polymorphism determines response to capecita-bine chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; abst 514.
38. Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 1991 Aug 15; 51(16):4187-91.
39. Gupta E, Lestingi TM, Mick R, Ramirez J, Vokes EE, Ratain MJ. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuroni-dation with diarrhea. *Cancer Res* 1994 Jul 15; 54(14):3723-5.
40. Iyer L, King CD, Whittington PF, Green MD, Roy SK, Tephly TR, Coffman BL, Ratain MJ. Genetic predisposition to the metabo-lism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucu-ronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its ac-tive metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest* 1998 Feb 15; 101(4):847-54.
41. Fisher MB, Vandenbranden M, Findlay K, Burchell B, Thummel KE, Hall SD, Wrighton SA. Tissue distribution and interindividu-al variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variabi-lity in a liver bank. *Pharmacogenetics* 2000 Nov; 10(8):727-39.
42. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Be-langer A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. The UDP gly-cosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 1997 Aug; 7(4):255-69.
43. Wasserman E, Myara A, Lokiec F, Goldwasser F, Trivin F, Mahjoubi M, Misset JL, Cvitkovic E. Severe CPT-11 toxicity in patients with Gilbert's syndrome: two case reports. *Ann Oncol* 1997 Oct; 8(10):1049-51.
44. Paradiso AV, Maiello EM, Ranieri G et al. Topoisomerase-I (TO-POI) and thymidylates synthase (TS) primary tumor expression are predictive of response to CPT-11 in advanced colorectal cancer (CRC) patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; abst 599.