

Cadernos de Anatomia Patológica

Pathology Notebooks

Lina Carvalho¹
António Silva²
Cláudia Andrade²
Cláudia Barroso²
Cláudia Farinha²
José Carlos Fernandes²
Raquel Landeiro²

Os genes ERCC1 e RRM1 no carcinoma broncopulmonar

ERCC1 and RRM1 genes in lung cancer

Recebido para publicação/received for publication: 09.02.05

Aceite para publicação/accepted for publication: 09.02.26

Resumo

No cancro do pulmão, ainda não se obteve sobrevivência expressiva dos doentes que se apresentam em estádios não cirúrgicos. Os doentes com carcinoma de não pequenas células são tratados com platina e outros fármacos, para os quais se podem caracterizar actualmente marcadores preditivos de resposta terapêutica.

Procedeu-se a uma revisão da literatura, tendo como alvo o papel dos genes *ERCC1* e *RRM1* na resposta à quimioterapia baseada na platina e na gemcitabina. Actualmente, a expressão destes genes é encarada como preditiva de resposta à quimioterapia em doentes com adenocarcinomas e carcinomas epidermóides, orientando a terapêutica personalizada.

Dados publicados demonstram a utilidade da quimioterapia individualizada, de acordo com os níveis individuais de *ERCC1*. Estes também são influenciados por variabilidade genética. Assim, a presença de certos polimorfismos, como são os códiões 118 C/T e

Abstract

In lung cancer, expressive survival has not yet been achieved in non surgical stages. Non-small cell lung cancer (NSCLC) patients are treated with platinum and other drugs. To choose these agents we can actually define predictive biomarkers to preview therapeutic response.

A literature revision was done in order to define the role of *ERCC1* e *RRM1* genes in the response to chemotherapy based in platinum and gemcitabine respectively. The expression of these genes is faced as a predictive marker to the chemotherapy response in patients with adenocarcinomas and squamous cell carcinomas, providing a personalized therapy.

Published data supports this behaviour and is useful to individualize therapy accordingly to individual levels of *ERCC1* which are modified by genetic mutations. Polymorphisms in codons 118 C/T and C8092A, seem to influence the carcinogenesis, cytostatic resistance, survival and even the prognosis.

¹ Professora de Anatomia Patológica

² Disciplina de Oncologia

Anatomia Patológica/Oncologia
Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

C8092A, parecem estar relacionados com a carcinogénese, resistência aos citostáticos, tempo de sobrevivência e até com o prognóstico.

Estudos clínicos e laboratoriais demonstraram também que a elevada expressão do gene *RRM1* no NSCLC tem impacto no fenótipo do tumor e na resposta variável à quimioterapia. Doentes submetidos a ressecção cirúrgica, cujos tumores apresentavam expressão aumentada do gene *RRM1*, têm maior sobrevivência do que os doentes com baixa expressão. No entanto, os doentes com NSCLC avançado sujeitos a quimioterapia com gemcitabina e cisplatina apresentam um pior prognóstico se o tumor apresentar expressão aumentada do gene *RRM1*.

Rev Port Pneumol 2009; XV (4): 683-696

Palavras-chave: Carcinoma do pulmão de células não pequenas, *RRM1*, *ERCC1*.

Clinical and laboratorial trials showed that high expression of *RRM1* gene in NSCLC has impact in the tumoral phenotype. Patients having done surgical resection and presenting high expression of *RRM1* have better survival than those with lower expression. However, patients with advanced NSCLC and treated with chemotherapy with gemcitabine and cisplatin appear to have a poor outcome if the tumor express elevated levels of *RRM1* gene.

Rev Port Pneumol 2009; XV (4): 683-696

Key-words: Non-small cell lung cancer, *RRM1*, *ERCC1*.

Introdução

O carcinoma do pulmão continua hoje em dia a ser o mais frequente, sendo responsável por aproximadamente um milhão de mortes/ano a nível mundial¹. Ainda se agrupa o cancro do pulmão em dois grupos: o carcinoma do pulmão de pequenas células (SCLC), quimiossensível e com taxas de resposta na ordem dos 80% à quimioterapia com cisplatina e etoposido; e o carcinoma de células não pequenas (NSCLC), moderadamente quimiossensível, dependendo do estágio TMN, e com taxas de resposta para tumores inoperáveis que variam de 30 a 60% para esquemas que combinam platina com gemcitabina, vinorelbina, ou taxanos. Neste grupo estão os tipos histológicos mais frequentes, o adenocarcinoma e o carcino-

ma epidermóide^{2,3}. O NSCLC é responsável por aproximadamente 80% de todos os casos de cancro do pulmão. Aproximadamente 70% dos doentes apresenta um estágio avançado da doença e a sobrevivência para os detectados em estádios mais tardios permanece bastante pobre⁴. Apesar de a terapêutica cirúrgica ser a melhor opção nos estádios mais precoces para estes doentes, metade poderá eventualmente sofrer recidiva local ou à distância. Estudos clínicos desenvolvidos recentemente e focados na quimioterapia adjuvante para NSCLC, baseada em regimes que têm por principal agente os derivados da platina demonstraram que estes aumentam de facto a sobrevivência^{5,6,7}; contudo, a proporção de doentes que beneficiam da quimioterapia adjuvante perma-

nece ainda baixa. Em casos avançados, tratamento duplo baseado em platina tem sido o inicial protocolado⁸, apesar de a sobrevivência média de 10-12 meses ser obviamente ainda insatisfatória^{9,10}. É portanto lógico pensar que novas abordagens para selecção dos melhores candidatos à quimioterapia e para identificar os regimes terapêuticos mais adequados são necessárias. A perspectiva da utilização de biomarcadores, com o fim de atingir este objectivo, tem-se mostrado aliciante, sendo já considerável a investigação actualmente orientada neste sentido⁴. Contudo, estudos clínicos retrospectivos já realizados mostraram que apenas alguns destes biomarcadores são clinicamente interessantes no que toca ao carcinoma do pulmão. Actualmente, os mais referidos como candidatos a marcadores são o *excision-repair cross-complementation group 1* (ERCC1), implicado como veremos adiante na reparação do ADN; a subunidade do *ribonucleotide reductase M1* (RRM1), implicada no metabolismo dos nucleótidos para a síntese de ADN; e o p53, implicado no processo apoptótico¹¹.

Tentaremos avaliar o impacto do nível expresso de ERCC1 e RRM1 pelas células neoplásicas na sobrevivência dos doentes com cancro do pulmão; e comparar a sobrevida pós-quimioterapia e os níveis de ERCC1 e polimorfismos de RRM1 expressos, de modo a que num futuro próximo seja possível otimizar e personalizar o tratamento destes doentes.

ERCC1

O ERCC1 é a principal enzima da cascata NER: *nucleotide excision repair*, mecanismo responsável pela reparação do ADN¹². Esta

enzima (de 33 kDa) é codificada pelo gene ERCC1, de 15 kb, localizado no cromossoma 19q. Este gene foi altamente preservado durante a evolução e é expresso em todos os tecidos em níveis relativamente elevados. Apesar de todas as suas funções não serem ainda conhecidas, é um facto comprovado que ele é essencial à vida¹³. A importância da enzima por ele codificada prende-se portanto com o seu papel no NER^{14,15}. De facto, estando a informação genética “armazenada” na estrutura química do ADN, manter a sua integridade estrutural é crucial e indispensável à vida. Subsequentemente, complicados sistemas de reparação do ADN evoluíram neste sentido, entre os quais se destaca o NER¹⁶. Na última década, todos os factores-chave do NER foram identificados e o conhecimento sobre este mecanismo foi largamente ampliado. Existem dois tipos distintos de reacções NER: um com funções de reparação de danos e lesões, abrangendo todo o genoma, o *global genome NER* (GG-NER); outro responsável pela reparação de lesões bloqueadoras da transcrição presentes em sequências de ADN transcritas, o *transcription-coupled NER* (TC-NER). A reacção TC-NER é iniciada pelo XPC, um sensor de danos no ADN e recrutador da maquinaria de reparação, que inicia todo o processo de reparação ao formarem complexo com o hHR23B. Uma vez que o segmento do dano no ADN, e consequentemente a ser excisado, seja identificado, o complexo geral de transcrição TFIIH, composto pelas helicases XPB e XPD, promove a separação das duas fitas de ADN no local da lesão. No GG-NER, o complexo TFIIH consegue iniciar a reacção sem a ajuda do complexo XPC-hHR23B. O XPA é então recrutado identificando a lesão no ADN na forma de

conformação aberta. A proteína de replicação A estabiliza o ADN nessa conformação e posiciona a endonuclease XPG (ERCC5), que procede à excisão na terminação 3' do segmento de ADN. Por fim, o ERCC1 liga-se ao XPF para formar uma endonuclease responsável pela excisão na terminação 5' da lesão¹⁷. O oligonucleótido contendo a lesão (tipicamente constituído por 24-32 nucleótidos) é então removido. Factores de replicação são activados, sendo o processo de reparação concluído¹⁸.

O NER contraria assim os efeitos deletérios de múltiplos insultos que causam dano ao ADN, entre os quais estão os causados por químicos, por radiações (nomeadamente as ondas UV da luz solar) e por várias toxinas ambientais¹⁹. Perante tal facto, pode colocar-se a possibilidade de os mecanismos de reparação do ADN, como o NER, poderem desempenhar um papel fundamental na carcinogénese. Simultaneamente, são instrumentos úteis na definição do prognóstico e resposta ao tratamento, uma vez que um aumento da sua capacidade de reparação do ADN leva provavelmente a um aumento da resistência a certos tipos de quimiofármacos¹⁸.

Estudos recentes clarificaram o papel do NER na história natural e na resposta ao tratamento em doentes com NSCLC. O estado funcional do NER é avaliado em espécimes clínicos através da medição do ERCC1. De facto, quer o ERCC1 mRNA, quer a proteína ERCC1 podem ser quantificados. O primeiro por técnicas de *reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) e a segunda através de técnicas de imunistoquímica^{20,21}. Os níveis de ERCC1 em amostras do tumor são assim presumíveis representantes de todo o NER¹⁸.

Entretanto, há ainda a ter em consideração o facto de a expressão do gene ERCC1 e, consequentemente, os níveis da enzima correspondente, serem influenciados por alterações genéticas, nomeadamente pela presença de determinados polimorfismos (*single nucleotide polymorphisms* – SNP). De facto, a perda de heterozigotismo nos genes do NER foi já observada em carcinomas do pulmão²², e a expressão de níveis reduzidos de mRNA dos genes NER foi observado nos linfócitos do sangue periférico (PBL) de doentes com carcinoma do pulmão²³. Alguns dos SNP actualmente mais abordados numa perspectiva de investigação da sua influência na expressão do ERCC1, e consequente possível relação com a carcinogénese e resistência a fármacos citostáticos, são o códon 118 C/T, o C8092A²⁴⁻²⁸ e o C15310G²⁹. O polimorfismo códon 118 C/T está associado a diminuições nos níveis de ERCC1 mRNA e, consequentemente, à proteína correspondente³⁰; já o polimorfismo C8092A, localizado na região 3'-untranslated do gene, poderá afectar a estabilidade do ERCC1 mRNA²⁷.

RRM1

O gene RRM1 (*ribonucleotide reductase M1 polypeptide*) está localizado no segmento 11p15.5 do cromossoma 11, região com importância na supressão tumoral. Codifica a subunidade grande (M1) da ribonucleótido-reductase, enzima heterodimérica, essencial para a produção de ADN, antes da sua síntese, na fase S, da divisão celular³¹. A ribonucleótido-reductase é constituída por duas subunidades não idênticas, R1 e R2, sendo a única enzima conhecida que converte ribonucleótidos em desoxirribonu-

cleótidos, sendo uma etapa fundamental na polimerização e na reparação de ADN³².

Tem como função ligar ATP e nucleótidos, apresenta actividade de oxiredutase na ligação às proteínas e actividade de ribonucleótido-difosfato-redutase.

Alterações na região onde se encontra este gene estão associadas a síndrome de Beckwith-Wiedemann, tumor de Wilms, rabdomiossarcoma e carcinomas da suprarrenal, do pulmão, do ovário e da mama^{31,33}.

A actividade reguladora da subunidade ribonucleótido-redutase está envolvida na carcinogénese, na progressão tumoral e na resposta ao tratamento das células no cancro do pulmão de não pequenas células.

LOH11A é uma região do cromossoma 11p15.5, onde 75% dos carcinomas do pulmão de não pequenas células mostram perda de heterozigotia (LOH). Estudos clínicos e culturas de células sugerem que a LOH11A contém um gene supressor tumoral.

Em células geneticamente modificadas para cancro do pulmão, um aumento na expressão da proteína RRM1 aumenta a expressão da fosfatase e da tensina homóloga – PTEN (inibidor da proliferação celular), diminui a fosforilação da adesão cinase focal, inibe a migração, a invasão celular e a formação de metástases^{3,34,35}.

Altos níveis de expressão do gene RRM1 estão associados a uma longa sobrevida em doentes submetidos a ressecção cirúrgica completa do carcinoma do pulmão de não pequenas células em estádios iniciais; baixos níveis de expressão do gene estão associados a sobrevivência baixa destes doentes^{34,36}.

A gemcitabina (2' 2-difluorodeoxycytidine [dFdC]) é uma pirimidina análoga à desoxicitidina, penetra nas células pelo mecanismo de transporte facilitado de nucleotídeos,

sendo fosforilada sucessivamente nas formas de monofosfato, difosfato e trifosfato^{37,38}. O difosfato de dFdC é um inibidor da enzima ribonucleótido-redutase e o trifosfato de dFdC compete com o trifosfato de desoxicitidina na incorporação ao ADN, ao mesmo tempo que inibe a fosforilação da desoxicitidina, produzindo a interrupção do processo de polimerização do ADN.

O desenvolvimento da resistência à gemcitabina é um grande problema no tratamento das neoplasias e essa resistência pode ser inerente ou adquirida.

Em múltiplos estudos *in vitro*, o principal mecanismo de resistência à gemcitabina é um decréscimo da actividade da dCK (deoxicitidina cinase). No entanto, a resistência a este fármaco pode incluir outros mecanismos, como o aumento da actividade da desoxicitidina desaminase e da ribonucleótido-redutase, a diminuição da acumulação de trifosfatos e a alteração da ADN-polimerase³⁹.

Como a gemcitabina é um dos principais agentes de quimioterapia para o cancro do pulmão de não pequenas células, e sendo o gene RRM1 um determinante celular da eficácia dos análogos nucleotídeos da gemcitabina, a expressão aumentada do RRM1 aumenta a resistência do tumor à quimioterapia, enquanto o inverso confere sensibilidade¹⁰.

A determinação dos níveis de expressão de RRM1 foi tecnicamente difícil; no entanto, com o desenvolvimento de uma técnica de imunoistoquímica e a integração de um sistema totalmente automatizado e quantitativo, a análise de expressão génica do RRM1 está agora mais objectiva, fiável e reprodutível³⁴.

A expressão do gene RRM1 é influenciada por alterações genéticas, designadamente

polimorfismos. O conhecimento destes pode ter um papel importante na escolha do tratamento mais adaptado a cada doente¹⁰. Altos níveis de expressão de RRM1 são determinantes nos níveis de sobrevivência no cancro do pulmão de não pequenas células, porque estão associados a uma fraca resposta à quimioterapia com gemcitabina³⁴.

Discussão

Actualmente, o tratamento-padrão em doentes com NSCLC metastático e incurável, é um regime quimioterapêutico assente na combinação de dois fármacos e já protocolado. Os principais agentes utilizados no NSCLC são a cisplatina ou carboplatina, o docetaxel ou paclitaxel, gemcitabina, e a vinorelbina¹⁸. Há uma década, foi realizada a nível mundial uma meta-análise⁴⁰ que demonstrou de facto que a quimioterapia baseada em cisplatina melhorava a sobrevivência no carcinoma avançado do pulmão. Desde então, vários ensaios clínicos sobre esquemas de quimioterapia adjuvante baseados em platina foram realizados, e resultados recentes demonstraram que este tipo de quimioterapia aumenta a sobrevida em cerca de 4-15% entre os doentes com NSCLC submetidos a cirurgia de ressecção^{5,6,7,41,42,43}. De entre estes destaca-se o IALT – *Internacional Adjuvant Lung Cancer Trial*, que incluiu mais de 1800 doentes com NSCLC e que demonstrou uma diminuição de 14% na taxa de mortalidade e um benefício absoluto de 4,1% na sobrevivência em 5 anos nos doentes tratados com quimioterapia adjuvante baseada em cisplatina⁴². É óbvio que a quimioterapia adjuvante não tem efeito em muitos doentes, que, contudo, sofrem com os efeitos adversos re-

lacionados com o tratamento, sem qualquer benefício terapêutico¹¹. Os compostos de platina, e especialmente a cisplatina e a carboplatina, são complexos de metal pesado que formam *adducts* e *covalent cross-links* entre as fitas duplas de ADN, bloqueando desta forma a sua replicação e transcrição. São exactamente estes segmentos de ADN reparados pelo NER descrito, e cujo funcionamento depende por sua vez da expressão do gene ERCC1¹⁸. A resposta (ou a sua ausência) ao tratamento com quimioterapia baseada em cisplatina pode assim estar relacionado com o nível de expressão tumoral do ERCC1 (níveis obviamente influenciados então pela presença de polimorfismos)¹¹. Uma abordagem personalizada da selecção do tratamento quimioterapêutico é necessária no NSCLC, uma vez que actualmente o benefício é mínimo e apenas há incrementos modestos nas taxas de respostas e na sobrevivência. Foi colocada a hipótese de que os doentes com tumores NSCLC ressecados em estádios iniciais, com elevada expressão de ERCC1, não só teriam uma baixa incidência de recidivas como também iriam beneficiar menos de quimioterapia adjuvante baseada em cisplatina, uma vez que o ERCC1 iria conferir resistência à platina. O contrário também seria verdade para doentes com baixo ERCC1 intratumoral, *i.e.*, estarão mais predispostos a recorrências mas beneficiarão de quimioterapia adjuvante com cisplatina, ocorrendo menor catabolismo do fármaco¹⁸. O estudo IALT, através de uma análise imunoistoquímica, determinou a expressão da proteína do ERCC1 em tumores em estádios cirúrgicos de doentes com NSCLC^{21,44}. O IALT é um ensaio de fase III que analisou tumores ressecados de doentes com NSCLC do estágio I ao III e

incluiu-os em dois grupos: o de observação e o da quimioterapia (4 ciclos de quimioterapia baseada em cisplatina)⁴⁵. Dos 1897 doentes envolvidos no IALT, 761 tinham tumores possíveis para análise do ERCC1. A expressão imunoistoquímica do ERCC1 de amostras tumorais foi classificada alta ou baixa, usando um valor mediano de ERCC1 como valor de *cut-off*. A análise comparativa do grupo que recebeu quimioterapia do que não recebeu permitiu um estudo estatisticamente poderoso sobre o impacto do ERCC1^{20,34}. Assim sendo, uma expressão positiva de ERCC1 estava correlacionada com um melhor prognóstico no grupo de observação. Havia uma interacção estatística significativa ($P < 0,01$) entre expressão de ERCC1 e o impacto da quimioterapia na sobrevivência. A correlação entre ERCC1, sobrevida, e a interacção biológica com a quimioterapia, dá uma explicação para o facto de o ERCC1 não demonstrar um valor prognóstico para o grupo da quimioterapia. Efectivamente, quando os doentes são tratados com cisplatina, uma correlação inversa é observada, significando que o benefício da quimioterapia adjuvante é maior quando o ERCC1 é baixo¹¹.

Quantificando os níveis de ERCC1, pode ser representativo da capacidade da reparação do ADN intrínseco danificado das células e pode servir como um biomarcador da extensão de ADN lesado acumulado intratumoral¹⁸. Simon *et al.*²⁰ publicou um estudo em que avaliou tumores ressecados de 51 doentes com NSCLC (sem quimioterapia) e quantificou o ERCC1 (método Taqman) para correlacionar a sobrevivência com a expressão do ERCC1. Concluiu que doentes com elevada expressão de ERCC1 (>50) têm uma melhor sobrevida quando compa-

rados com doentes com baixa expressão (<50). No mesmo estudo foi também concluído que a expressão do ERCC1 no tumor ressecado não tem correlação com o pulmão adjacente, o que sugere que a capacidade do NER é uma propriedade intrínseca do tumor e é necessário medir o ERCC1 intratumoral¹⁸.

Outros dos aspectos a considerar é se o ERCC1 pode ser um factor preditivo da resposta à quimioterapia em doentes com NSCLC em estádios avançados. Lord *et al.*⁴⁶ correlacionou as respostas à quimioterapia (com gemcitabina e cisplatina) e a sobrevivência com o nível de ERCC1, encontrado em 56 doentes com NSCLC em estádios avançados (estádio IIIb ou IV). Concluiu que o ERCC1 era detectável em todos os tumores e que não havia variabilidade na expressão genética de acordo com o género, *performance status*, perda de peso ou estágio tumoral diferente. A taxa global de resposta foi de 44,7%. A sobrevida média global era significativamente maior nos que tinham baixa expressão de ERCC1 comparada com os doentes com elevada expressão de ERCC1.

Ensaio de terapias individualizadas nestes doentes através da análise molecular têm vindo a ser feitos. Simon *et al.*⁴⁷, num ensaio clínico prospectivo de fase II, testou a eficácia e a possibilidade dessa terapia individualizada. A hipótese proposta era a de que a selecção de uma quimioterapia dupla baseada na expressão de ERCC1 e RRM1 seria possível e benéfica para todos os doentes com NSCLC em estádios avançados. O estudo foi feito através da determinação da expressão do ERCC1 e RRM1 por RT-PCR em biópsias tumorais. Só 53 doentes com expressão génica disponível foram eleitos

para tratamento. A quimioterapia dupla consistia em carboplatina e gemcitabina, docetaxel ou vinorelbina, e era seleccionada consoante a expressão génica. Valores predefinidos de ERCC1 e RRM1 eram usados para decidir o fármaco a utilizar, se a gemcitabina se a carboplatina. Se RRM1 fosse igual ou inferior a 16,5, decidia-se pela gemcitabina. Se ERCC1 fosse igual ou inferior a 8,7, optava-se pela carboplatina. Estes valores são baseados em estudos publicados anteriormente^{20,36,48}. Esta estratégia resultou em quatro esquemas de quimioterapia diferentes com quatro expressões diferentes de genes. Em seguida, foi avaliada a resposta ao tratamento, à sobrevida global e ao tempo de sobrevida livre de doença. O resultado foi uma taxa de resposta de 42%. A sobrevida global não diferiu entre as diferentes quimioterapias e não houve diferenças estatisticamente significativas entre elas, o que sugeriu que a quimioterapia personalizada não alterava a sobrevida. No entanto, comparando um estudo de fase II, Chiappori *et al.*⁴⁹, onde foram usados os mesmos critérios de selecção de doentes e a quimioterapia tradicional (ou seja, carboplatina + gemcitabina), foi apenas atingida uma taxa de resposta de 24% (*versus* a 42% anterior), significando que o uso de quimioterapia não seleccionada aparenta ser inferior em relação aos resultados obtidos com a quimioterapia personalizada. Os mesmos resultados foram encontrados para a sobrevivência, na comparação entre os dois estudos. Isto implica que a decisão terapêutica baseada no ERCC1 e RRM1 em doentes com NSCLC avançado é possível e pode melhorar taxas de resposta e sobrevivência¹⁸. Estudos semelhantes, Rosell *et al.*⁵⁰, recentemente publicados, comparando o uso de quimioterapia

baseada em cisplatina com a expressão quantitativa de mRNA ERCC1 (ensaio randomizado fase III), concluíram que a taxa de resposta era maior no grupo tratado com quimioterapia otimizada e que a taxa expressa de mRNA ERCC1 em tecido tumoral é possível na clínica para prever respostas à cisplatina. Por outro lado, neste estudo não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na sobrevivência global¹¹. Outro estudo retrospectivo muito importante realizado recentemente, Ceppi *et al.*⁵¹, efectuou biópsias em 70 doentes com NSCLC avançado e estudou dois grupos de doentes, uns tratados com cisplatina/gemcitabina e outros apenas com gemcitabina¹¹. Igualmente a sobrevida média em doentes com baixo ERCC1 e após quimioterapia com cisplatina/gemcitabina foi maior, assim como os doentes com RRM1 baixo. Então, o ERCC1 e RRM1 têm impacto na sobrevida nos doentes com NSCLC tratados com cisplatina/gemcitabina¹⁸.

Nos doentes submetidos a ressecção cirúrgica, altos níveis de expressão do gene RRM1 estão associados a um aumento da sobrevivência. Num estudo efectuado por Bepler *et al.*³⁵ foi analisada a frequência de 2 SNPs (RR37 e RR524) em diferentes populações (americanos caucasianos, afro-americanos, hispânicos, asiáticos), tendo como objectivo analisar a associação destes polimorfismos com a expressão do promotor do gene RRM1 e investigar o seu impacto no prognóstico dos doentes com NSCLC.

Para a tipagem dos alelos dos dois SNP, aplicou-se a PCR seguido de RFLP– *restriction enzyme digestion*. Nas populações em estudo, a combinação mais frequente encontrada foi a associação entre os alelos RR37CC

e RR524TT. A segunda mais frequente foi entre os alelos RR37AC e RR524CT.

A análise do alelótipo do promotor do RRM1 foi efectuada em 286 doentes com NSCLC e com dados clínicos acessíveis. Analisou-se a evolução dos doentes em função do alelótipo do promotor RRM1, com base na hipótese de que uma elevada expressão de RRM1 em tumores estaria associada a um melhor prognóstico³⁵.

Para esta análise foram criados três grupos de doentes: um com alelótipo RR37CC-RR524TT (N=112), outro com alelótipo RR37AC-RR524CT (N=93) e outro englobando os restantes alelótipos. Como previsto, os doentes com alelótipo RR37CC-RR524TT tiveram uma sobrevivência maior do que os doentes com alelótipo RR37AC-RR524CT³⁵.

Num trabalho efectuada por Woo SK *et al.*⁵² foram investigados polimorfismos de RRM1 em 62 linhas celulares cancerígenas e realizado um estudo de associação destes polimorfismos com a sensibilidade à gemcitabina. A frequência dos polimorfismos foi de 79 % para RRM1 2464G>A, 59,7 % para RRM1 2455A>G e de 45,2 % para RRM1 1082C>A. O polimorfismo RRM1 2464G >A encontrou-se em todas as linhas celulares dos carcinomas pulmonares. A sensibilidade de cada linha celular à gemcitabina foi classificada de acordo com os valores de log IC50. Cada célula foi classificada como resistente (n=20), ou sensível (n=42) com base nos valores de log Cmax (concentrações máximas) de todas as linhas celulares.

Quando a associação dos polimorfismos com os valores de log IC50 foi efectuada, apenas o polimorfismo RRM1 2464G>A apresentou maior sensibilidade à gemcitabina.

Foi também estudado a relação entre haplótipos de RRM1 e a sensibilidade à gemcita-

bina. Foram criados oito haplótipos a partir de três polimorfismos de RRM1 (2464G>A, 2455A>G, 1082C>A). Os haplótipos mais comuns foram: AGA (40,4%), CAA (21%), CGA (16,1%).

Os haplótipos demonstraram alguma sensibilidade quando comparados com o *wild-type* (CAG), excepto os que se apresentavam numa linha celular (CGG, AAG, AGG, AAA). Haplótipos do polimorfismo 2464G>A (AGA, CAA, CGA) apresentavam maior sensibilidade à gemcitabina.

Relativamente aos polimorfismos do ERCC1, vários estudos também já foram realizados, na tentativa de saber qual o impacto deles na sobrevida dos doentes com NSCLC. Um estudo realizado em 2000 concluiu que existem polimorfismos específicos do ERCC1 que podem aumentar o risco de cancro²³. Dos SNP falados, incluindo o códon 118 C/T, o C8092A⁵³ e o C15310G²⁹ do ERCC1, sabe-se que o polimorfismo C8092A pode ser um factor preditivo importante na sobrevida global em doentes com NSCLC avançado e tratados com quimioterapia baseada em cisplatina. Já o polimorfismo C15310G não foi descrito como estando associado a qualquer doença²⁹.

Isla *et al.*⁵⁴ estudou um SNP (*single-nucleotide polymorphism*) do ERCC1 nos linfócitos do sangue periférico em doentes com NSCLC avançado e tratados com quimioterapia baseada em cisplatina. Os autores concluíram que os doentes com o polimorfismo 118C tinham uma melhor sobrevida. Por outro lado, outro estudo refere não haver associação estatisticamente significativa entre esse polimorfismo e a sobrevida global⁵³.

Zhou *et al.*⁵³ demonstraram que um aumento do número de variantes alélicas no

ERCC1 está associado a uma diminuição da sobrevida global nesses doentes e que o número desses alelos pode ser preditivo da sobrevida global.

Após a análise de diversos resultados obtidos nos estudos observados, conclui-se que o NER tem um papel fulcral na carcinogénese, no prognóstico e na resposta ao tratamento em doentes com NSCLC.

Em doentes com NSCLC em estádios iniciais, observamos que níveis reduzidos de ERCC1 intratumoral traduziam níveis de sobrevida inferiores, bem como uma maior susceptibilidade para recidivas; no entanto, estes doentes apresentavam também uma maior sensibilidade ao tratamento com platina, sendo portanto de grande interesse a identificação dos grupos que poderiam beneficiar de quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante, com base na expressão do ERCC1.

Pelo contrário, doentes com níveis elevados de ERCC1 apresentam um melhor prognóstico e uma menor probabilidade de recidiva, apesar de não apresentarem qualquer tipo de benefício com o uso de quimioterapia. No entanto, fica ainda por investigar até que ponto doentes com elevados níveis de ERCC1 beneficiariam ou não de quimioterapia dupla não baseada em derivados da platina. Assim, em futuros estudos, a quimioterapia individualizada tendo por base os níveis de ERCC1 deverá ser um método a considerar¹⁸.

Em estádios mais avançados, os níveis de ERCC1 são preditivos da sensibilidade à terapêutica, permitindo-nos uma escolha, baseada no perfil molecular individual de cada doente. Apenas um estudo prospectivo de fase II⁵⁰ demonstrou uma elevação na resposta terapêutica, mas não na sobrevida global de doentes tratados com cisplatina. Os

restantes estudos, quer o prospectivo fase II⁴⁷, quer o outro estudo retrospectivo⁵¹, sugeriram que a quimioterapia baseada nos níveis individuais de ERCC1 aumenta as respostas à quimioterapia e a sobrevivência. No entanto, apesar de promissor, este é um tipo de estudo ainda difícil, uma vez que a quantificação de ERCC1 ou de RRM1 requer, para além de biópsias do tumor, microdissecção a *laser* e subsequentes métodos de análise de expressão do gene, como imunistoquímica²¹, expressão de mRNA⁵¹ e AQUA (*quantitative in situ protein analyses*)⁵⁵.

O ERCC1 pode ser visto como um potencial marcador, preditivo da resistência aos compostos de platina, como a cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina. No entanto, nenhum estudo obteve provas sólidas que pudessem considerar o ERCC1 um marcador de resistência a todos os tipos de quimioterapia. Além disso, o ERCC1 não é, necessariamente, o único marcador que pode prever a quimiossensibilidade aos derivados da platina⁵⁶.

Antes de podermos avaliar o potencial global do ERCC1 como um marcador preditivo de quimiossensibilidade, há que repensar certos pormenores técnicos, como são: o facto de o diagnóstico ser feito tendo por base um pequeno fragmento do tumor, que pode até nem representar o tumor na sua globalidade, devido à heterogeneidade do marcador, bem como a biópsia poder ser realizada, quer no tumor primário, quer numa metástase. Uma vez que ainda não está determinada a expressão do ERCC1 no tumor primário e nas metástases, esta sequência poderá ser considerada uma limitação. Uma outra limitação passa pelo facto de ser difícil, em estudo de IHC (uma técnica praticável em qualquer laboratório), criar

um valor óptimo de *cut-off* para ERCC1, uma vez que o olho humano tem uma visão ao microscópio demasiado subjectiva. Outras dificuldades passam pelas diferenças genéticas existentes na população, bem como as interacções com carcinogénicos, como é o caso do fumo do tabaco¹¹.

Conclusões

Um biomarcador como o ERCC1 deverá ser validado e confirmado em estudos independentes, sendo de futuro necessários estudos prospectivos mais alargados, que deverão ser discutidos com uma equipa multidisciplinar, envolvendo não apenas patologistas, mas também bioestatistas. Do que podemos ter a certeza, com os dados publicados até então, é da utilidade da quimioterapia individualizada, de acordo com os níveis individuais de ERCC1¹¹.

Os níveis de ERCC1 são também influenciados pelas alterações genéticas; assim, a presença de certos polimorfismos, como são o códon 118 C/T e o C8092A, parecem apresentar relações, quer a nível da carcinogénese, da resistência aos citostáticos, da sobrevida e mesmo a nível do prognóstico.

Todos os dados apresentados nesta revisão são apenas referentes a tumores de não pequenas células (NSCLC), uma vez que não se encontram publicados estudos feitos em tumores de pequenas células, o que traduz uma lacuna na área da investigação do tratamento de carcinoma do pulmão, já que a terapêutica advogada para este tipo de tumor é na maioria das vezes quimioterapia e radioterapia.

Estudos clínicos e laboratoriais demonstraram que a elevada expressão do gene RRM1

no NSCLC tem impacto no fenótipo do tumor. Doentes submetidos a ressecção cirúrgica, cujos tumores apresentavam expressão aumentada do gene RRM1, têm maior sobrevida do que os doentes com baixa expressão. No entanto, os doentes com NSCLC avançado sujeitos a quimioterapia com gemcitabina e cisplatina apresentam um pior prognóstico se o tumor apresentar expressão aumentada do gene RRM1³⁵.

Os polimorfismos podem estar associados à eficiência de certos tratamentos quimioterapêuticos, aos seus efeitos tóxicos e podem ser usados como marcadores de prognóstico. Estudos efectuados demonstraram que o polimorfismo RRM1 2464G>A está associado a uma aumento de sensibilidade ao tratamento com gemcitabina; no entanto, são necessários mais estudos funcionais e clínicos para que a expressão deste polimorfismo seja considerada um indicador de prognóstico⁵².

Em relação aos doentes submetidos a ressecção cirúrgica curativa do NSCLC, foi concluído que os SNP do promotor RRM1 têm impacto na sua actividade e têm valor prognóstico. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para uma melhor elucidação sobre os factores controladores da expressão do RRM1³⁵.

É cada vez mais provável que doentes com ERCC1 positivo, apesar do seu prognóstico melhor, poderão num futuro ser tratados com agentes não derivados da platina, assim como os doentes ERCC1 negativos, com um prognóstico inicial mais desfavorável do que os anteriores, irão ser considerados possíveis candidatos a quimioterapia com derivados da platina¹¹.

O ERCC1 poderá ser considerado, de acordo com os mecanismos de reparação de ADN,

uma faca de dois gumes⁵⁷, ou *the two faces of janus*⁵⁸. Uma menor capacidade de reparação do ADN (como ocorre em tumores com baixos níveis de ERCC1) conduz a uma maior instabilidade genómica nas células cancerígenas e, conseqüentemente, conduz a uma mais rápida aquisição de características malignas, tal como a metastização. No entanto, por outro lado, também é preditiva de uma resposta mais favorável à terapêutica, sugerindo que o ERCC1 possa ter uma função alternativa nas células cancerígenas.

Bibliografia

1. Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site. II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2002; 2:37.
2. Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:379-392.
3. Gautam A, Li ZR, Bepler G., RRM1-induced metastasis suppression through PTEN-regulated pathways. *Oncogene* 2003; 22:2135-2142.
4. Takenaka T, Yoshino I, Kouso H, Ohba T, Yohena T, Osoegawa A, Shoji F, Maehara Y. Combined evaluation of Rad51 and ERCC1 expressions for sensitivity to platinum agents in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2007; 121:895-900.
5. Douillard JY, Rossel R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzales-Larriba JL, Grodzki T, Pereira JR, Le Groumellec A, Lorusso V, Clary C, Torres AJ, *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;9:719-727.
6. Winton T, Linvingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, Cormier Y, Goss G, Incullet R, Vallieres E, Fry W, Bethune D, *et al.*, For the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group and National Cancer Institute of the United States Intergroup JBR. 10 trial investigators. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 352:2589-2597.
7. Strauss GM, Herndon J, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, Watson DM, Sugarbaker DJ, Schilsky RL, Green MR. Randomized clinical trial of adjuvant chemotherapy with paclitaxel and carboplatin following resection in stage IB non-small-cell lung cancer: report of Cancer and Leukemia Group B protocol 9633. *J Clin Oncol* 2004;22 (Suppl 14):A7019-A7019.
8. Pujol JL, Barlesi F, Daures JP. Should chemotherapy combinations for advanced non-small-cell lung cancer be platinum-based? A meta-analysis of phase III randomized trials. *Lung Cancer* 2006;3:335-345.
9. Smit EF, van Meerbeek JB, Lianes P, Debruyne C, Legrand C, Schramel F, Smit H, Gaafar R, Biesma B, Manegold C, Neymark N, Giaccone G. 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; 21:3909-3917.
10. Hespagnol VP. Polimorfismos e metilação de genes na selecção da terapêutica do cancro do pulmão. *Revista GECP* 2006;1-2:17-21.
11. Olaussen K., Mountzios G., Soria J. ERCC1 as a risk stratifier in platinum-based chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13: 287-289.
12. De Laat WL, Appeldoorn E, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity. *J Biol Chem* 1998;273:7835-7842.
13. Nunez F, Chipchase MD, Clarke AR, Melton DW. Nucleotide excision repair gene (ERCC1) deficiency causes G(2) arrest in hepatocytes and a reduction in liver binucleation: the role of p. 53 and p. 21. *FASEB J* 2000; 14:1073-1082.
14. Evans E, Moggs JG, Hwang JR, *et al.* Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* 1997; 16: 6559-6573.
15. Mu D, Hsu DS, Sancar A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 1996; 271:8285-8294.
16. Hoeijmakers, JH. Nucleotide excision repair. I. From E.coli to yeast. *Trends Genet* 1993a; 9(5):173-177.
17. Houstmuller, AB, Rademarkers S, Nigg AL, Hoogstraten D, Hoeijmakers JH & Vermeulen W. Action of

- DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* 1999; 284(5416):958-961.
18. Simon G, Ismail-Khan R, Bepler G. Nuclear excision repair-based personalized therapy for non-small cell lung cancer: From hypothesis to reality. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39:1318-1328.
 19. Hoelmakers, JH. Nucleotide excision repair. II. From yeast to mammals. *Trends Genet* 1993b; 9(6):211-217.
 20. Simon GR, Sharma S, Cantor A, Smith P, Bepler G. ERCC1 expression as a predictor of survival in resected patients with non-small-cell lung cancer. *Chest* 2005; 127(3):978-983.
 21. 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; 355(10):983-991.
 22. Takebayashi Y, Nakayama K, Kansaki A, *et al.* Loss of heterozygosity of nucleotide excision repair factors in sporadic ovarian, colon and lung carcinomas: implication for their roles of carcinogenesis in human solid tumors. *Cancer Lett* 2001; 174:115-125.
 23. Cheng L, Spitz MR, Hong WK, *et al.* Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 2000; 21:1527-1530.
 24. Park DJ, Stoehelmacher J, Zhang W, *et al.* ERCC1 polymorphism is associated with differential ERCC1 gene expression. *Proc Am Assoc Cancer* 2002; 1591.
 25. Yu JJ, Lee KB, Mu C, *et al.* Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol* 2000; 16:555-560.
 26. Park DJ, Zhang W, Stoehlmacher J, *et al.* ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003; 1:162-166.
 27. Chen P, Wiencke J, Aldape K, *et al.* Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000; 9:843-847.
 28. Sturgis EM, Dahlstrom KR, Spitz MR, Wei Q. DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128: 1084-1088.
 29. Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stangeland L, Phillips D, Canzian F, Haugen A. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27(3): 560-567.
 30. Yu JJ, Mu C, Lee KB, *et al.* A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cells lines and tumor tissues. *Mutat Res* 1997; 382:13-20.
 31. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=6240
 32. Davidson JD, Ma L, Flagella M, Geeganage S, Gelbert LM, Slapak CA. An increase in the expression of ribonucleotide reductase large subunit 1 is associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Research* 2004; 64:3761-3766.
 33. Kaye SB. Gemcitabine: Current status of phase I and II trials. *J Clin Oncol* 1994;12:1527-1531.
 34. 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; 356:800-808.
 35. Bepler G, Zheng Z, Gautam A, Sharma S, Cantor A, Sharma A, Cress WD, Kim YCK, Rosell R, McBride C, Robinson L, Sommerers E, Haura E. Ribonucleotide reductase M1 gene promoter activity polymorphisms, population frequencies and clinical relevance. *Lung Cancer* 2005; 47:183-192.
 36. Bepler G, Sharma S, Cantor A, *et al.* RRM1 and PTEN as prognostic parameters for overall and disease-free survival patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1878-1885.
 37. Fukunaga AK, Marsh S, Murry DJ, *et al.* Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway. *Pharmacogenomics J* 2004; 4:307-314.
 38. Plunkett W, Huang P, Xu YZ, *et al.* Gemcitabine: Metabolism, mechanisms of action, and self potentiation. *Semin Oncol* 1995;22(suppl 11):3-10.
 39. Bergman AM, Eijk PP, van Haperen VWTR, Smid K, Veerman G, Hubeek I, van den Ijssel P, Ylstra B, Peters GJ. In vivo induction of resistance to gemcitabine results in increased expression of ribonucleotide reductase subunit M1 as the major determinant. *Cancer Res* 2005; 65:(20).
 40. Nonsmall Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in nonsmall cell lung cancer: a meta-

- analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials. *BMJ* 1995; 311:899-909.
41. Scagliotti GV, Fossati R, Torri V, *et al.* Randomized study of adjuvant chemotherapy for completely resected stage I,II or IIIA nonsmall-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1453-1461.
42. The International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected nonsmall-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004;350:351-360.
43. Le Chevalier T, Arriagada R, Pignon JP, Scagliotti GV. Should adjuvant chemotherapy become standart treatment in all patients with resected nonsmall-cell lung cancer? *Lancet Oncol* 2005; 6:182-184.
44. 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 Eng J Med* 2004; 350(4):351-360.
45. Le Chevalier T. Results of the randomized adjuvant lung cancer trials (IALT): Cisplatin-based chemotherapy (CT) *vs.* noCT in 1867 patients with resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc ASCO* 2003; 21.
46. Lord RV, Branbender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, *et al.* Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res* 2002; 8(7):2286-2291.
47. Simon GR, Sharma A, Li X, Hazelton T, Walsh F, Williams C, *et al.* Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-smal cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25 (in press).
48. Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, Gautam A, Cantor A, Sharma A, *et al.* RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(29):4731-4737.
49. Chiappori A, Simon G, Rocha Lima C, Williams C, Haura E, Vaughn J, *et al.* Phase II study of sequential gemcitabine (G) and carboplatin (C) followed by docetaxel (D) as first-line chemotherapy for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005; 41(2):S225.
50. Rosell R, Gandara D, Cobo M, *et al.* Customizing cisplatin based chemotherapy on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III randomized trial in non-small cell lung cancer. The 31st Congress of the European Society of Medical Oncology, 30 September – 3 October 2006; Istanbul, Turkey. *Ann Oncol* 2006; 17 (suppl 9): abstract LBA 1.
51. Ceppi P, Vollante M, Novello S, *et al.* ERCC 1 and RRM1 gene expressions but EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol* 2006; 17:1818-1825.
52. Kwon WS, Rha SY, Choi YH, Lee JO, Park KH, Jung JJ, Kim TS, Jeung H-C, Chung HC. Ribonucleotide reductase M1 (RRM1) 2464G>A polymorphism shows an association with gemcitabine chemosensitivity in cancer cell lines. *Pharmacogenetics and Genomics* 2006; 16(6):429-438.
53. Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G, *et al.* Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4939-4943.
54. Isla D, Sarries C, Rosell R, *et al.* Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel – cisplatin – treated advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004; 15:1194-1203.
55. McCabe A, Dolled-Filhart M, Camp RL, Rimm DL. Automated quantitative analysis (AQUA) of in situ protein expression, antibody concentration, and prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(24):1808-1815.
56. Reed E. ERCC1 measurements in clinical oncology. *N Engl J Med* 2006; 355:1054-1055.
57. Wei Q, Frazier ML, Levin B. DNA repair: a double-edged sword. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:440-441.
58. Gazdar AF. DNA repair and survival in lung cancer – the two faces of Janus. *N Engl J Med* 2007; 356:771-773.