

ROLUL CHIMIOTERAPIEI DE INDUCȚIE ÎN TRATAMENTUL CANCERELOR SFEREI ORL AVANSATE LOCO-REGIONAL, INOPERABILE – O CONTROVERSĂ PERMANENTĂ.

THE ROLE OF INDUCTION CHEMOTHERAPY IN THE TREATMENT OF ENT CANCERS LOCALLY ADVANCED, INOPERABLE - AN ONGOING CONTROVERSY

Asist. univ. drd. **Daniel Ciurescu**
Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania Brașov

Autor corespondent: Daniel Ciurescu; ciurescu@yahoo.com

Abstract:

Induction chemotherapy in Head and Neck cancer is controversial even since its very beginning. It is believed nowadays that additionally to standard PF schema (paclitaxel with 5-FU) there is need for taxes in order to achieve a better therapy response on tumour control.

In this study we tried to summarize advantages and defects of such induction chemotherapy related in oncological researches since middle 80s till current time reflecting treatment of Head and Neck cancer

Key-words: induction chemotherapy, head and neck cancer, controversial, tumour control

Tratamentul cancerelor din sfera ORL a implicat mult timp radioterapia și intervenția chirurgicală. Termenul de chimioterapie de inducție în tratamentul cancerelor sferei ORL a debut în anii 80 când s-a emis ipoteza că o chimioterapie administrată înainte de secvența de radioterapie ar crește rata controlului local și prin aceasta scăderea ratei de recidive locale, precum și creșterea supraviețuirii. În anul 1997 au fost publicate rezultatele administrării pro-tocolului PF (cisplatin și 5-FU), 3 cicluri ca și chimioterapie de inducție pentru tumorile sferei ORL urmat de radioterapie, și comunitatea medicală a acceptat acest nou protocol, în ciuda faptului că acest studiu nu a demonstrat avantaje în ceea ce privește rata controlului local sau a supraviețuirii globale. Totuși acest protocol devine un standard de tratament pentru următorii ani – tratament de inducție protocol PF, 3 cicluri urmat de radioterapie, pentru tumorile sferei ORL inoperabile, avansate loco-regional.

Raționamentul pentru chimioterapia de inducție

Din punct de vedere teoretic ar exista câteva avantaje în utilizarea unui tratament sistemic înainte de efectuarea tratamentului local. Aceste avantaje ar consta în suprimarea dezvoltării metastazelor prin administrarea unui tratament sistemic și ipoteza unui tratament

local care este mai eficient pe un volum tumoral redus. Împreună, aceste beneficii scad riscul de recurență locală și la distanță. Desigur, aceste avantaje teoretice ar trebui să corepundă și unui substrat științific dovedit.

Chimioterapia de inducție bazată pe săruri de platină duce la o rată de răspuns la nivelul tumorii primare și a ganglionilor de 30-50%

Rata de răspuns la chimioterapia de inducție și mărimea tumorii primare se corelează cu răspunsul la radioterapia ulterioară [2].

Un studiu [8] care a evaluat radioterapia pentru tumorile supraglotice a demonstrat că la tumorile mai mici 6 cm³ după chimioterapie, există un control local mai bun comparativ cu cele peste 6 cm³ – 83% vs 46% (p=0.038).

O analiză retrospectivă [14] a aceluiași grup de studiu, a analizat cancerile de laringe categoria T3, și din nou a existat o corelație între controlul local și volumul tumoral. Acest studiu a fost apoi extins la pacienții cu tumori de orofaringe, și deși stadiu T este cel mai bun predictiv al controlului local, volumul tumoral are un «efect predictiv», adică, o scădere a tumorii primare se corelează cu o evoluție locală favorabilă.

Hipoxia afectează negativ eficiența chimioterapiei și radioterapiei, fiind asociată cu un prognostic nefavorabil. În primul rând radioterapia are nevoie de oxigen pentru generarea radicalilor liber de oxigen necesari

pentru distrucția ADN celular. În al doilea rând există citostatice dependente de oxigen respectiv ciclofosfamidă și carboplatinul. În al treilea rând hipoxia joacă un rol crucial în carcinogeneza prin modularea inducerii factorului 1-alfa. Aceasta proteină este un regulator central al proceselor considerate critice în supraviețuirea celulară, incluzând apoptoza, angiogeneza și controlul ciclului celular.

Studiile [6,19] au arătat că în cazul carcinoamelor epidermoide ale sferei ORL volumul tumoral hipoxic și volumul tumoral total sunt factori de prognostic independent pentru supraviețuire. Deși volumul hipoxic este mai important dintre cele două, tumorile de dimensiuni mari au un rezultat negativ în obținerea controlului local prin corelare strânsă între volumul tumoral local și volumul hipoxic. Șansa statistică de dezvoltare a clonelor radiorezistente depinde de numărul de celule expuse la hipoxie care de fapt este corelat cu volumul și oxigenarea. Asocierile sunt complexe, dar sugerează că, chimioterapia de inducție asociată cu radiosensibilizatori și sensibilizatori de celule hipoxice, poate fi o nouă direcție de cercetare ulterioară.

Chimioterapia de inducție în practică

Studiile de chimioterapie de inducție asociate ulterior cu chirurgie sau radioterapie cu intenție curativă datează de peste 2 decade. Două trialuri importante demonstrează lipsa de beneficiu în supraviețuirea globală prin compararea chimioterapiei de inducție asociată

tratamentului local versus tratamentul local exclusiv (intervenție chirurgicală, radioterapie sau radiochimioterapie) deși s-a redus incidența metastazelor la distanță în grupurile ce au asociat chimioterapia înainte de tratamentul local. În opoziție, adăugarea la tratamentul standard a chimioterapiei de inducție este relativ recentă, iar datele sunt relativ limitate de imposibilitatea de a compara date din trialuri cu design-uri diferite (trial de chimioradioterapie vs radioterapie cu un trial în care chimioterapia de inducție se asociază ulterior cu posibilitatea unei intervenții chirurgicale) [5, 17, 20].

Există câteva posibile motive pentru care doar 2 studii randomizate au rezultate pozitive. În primul rând selecția pacienților variază – în ceea ce privește stadializarea și localizarea primară, probabil mai important fiind definirea operabilității și inoperabilității. În al doilea rând, criteriul în determinarea tratamentului definitiv local: chirurgie sau radioterapie precum și a timing-ului când aceasta se realizează (înainte de intrarea în studiu sau după chimioterapia de inducție), este diferit. Un alt motiv îl constituie faptul că puține trialuri clinice sunt concepute statistic astfel încât să demonstreze beneficiu minim în supraviețuire, sau nu reușesc să atingă recrutarea necesară. În al patrulea rând studiile folosesc numeroase combinații de citostatice și număr de cicluri diferite precum. De exemplu majoritatea studiilor conțin combinații de cisplatin cu 5 fluorouracil, în timp de schemele actuale încorporează taxani.

	Stadiu	Rezecabilitate	Tratament local	Chimioterapie
Orofaringe	T2-T4 N0-2b	Vindecabil prin RT sau chirurgie	Chirurgie sau RTE	Cisplatin 100 mg/mp z1, z22, z43 Fluorouracil 1000 mg, perfuzie continua z1-z5, z22-z26, z43-z47
Orofaringe, cavitate bucală, hipofaringe, sinusuri paranazale	III / IV	Operabil / inoperabil	Chirurgie sau radioterapie	Cisplatin 75 mg/mp z1, z 22,z 43, z65 Fluorouracil 1000 mg/ mp/ zi, perfuzie continua z1-5, 22-26, 43-47, 65-69
Cavitate bucală, orofaringe	T2-T4 N0-N3	Operabil	Chirurgie sau radioterapie	Carboplatin 400 mg/mp/z1, \22, 43 Fluorouracil 1000 mg/mp/zi perfuzie continua z1-5, 22-26, 43,47
Varia	III / IV	Operabil	Chirurgie sau radioterapie	Cisplatin, metotrexat, bleomicina, vincristin
Cavitate bucală, orofaringe, laringe, sinusuri para-nazale, rino-faringe, hipofaringe	III / IV	Operabil	Chimioradioterapie (în brațul de control) și chimioterapie de inducție + RTE	Cisplatin 100 mg/mp z1, 22, 43 Fluorouracil 1000 mg/mp/ zi z1-5, 22-26, 43-47
Cavitate bucală, orofaringe		Operabil	Chirurgie cu sau fără radioterapie	Cisplatin 100 mg/mp. z1, 22, 43 Fluorouracil 1000 mg/mp/ zi z1-5, 22-26, 43-47

Tabel 1. Studii de chimioterapie de inducție și tratament local

Chiar cu aceste diferențe, faptul că atâtea trialuri clinice (peste 30) nu au demonstrat un avantaj în ceea ce privește supraviețuirea globală prin adăugarea chimioterapiei de inducție, sugerează că ipoteza controlului local și ulterior a supraviețuirii este eronată. Să nu uităm din trialurile de concomitență afirmația conform căreia prin creșterea controlului local crește supraviețuirea globală dar nu realizează creșterea controlului la distanță (a metastazelor). Bazându-se pe datele updatate de la aceste trialuri Pignon și colaboratorii raportează în cadrul unei metaanalize un hazard ratio de 0,95 (95%, CI 0,88-1.01, cu un $p=0.10$) pentru contribuția chimioterapiei de inducție în supraviețuire. Mai mult aceste date sunt folosite pentru a demonstra superioritatea regimului de Cisplatin și 5-fluorouracil (HR 0,88; 95%, CI 0.79-0.97, $p=0,05$) în chimioterapia de inducție. Totuși Pignon recomandă prudență la aceste interpretări considerând necesar validarea acestor rezultate.

În ciuda acestor afirmații, aceste date istorice asociate cu modificările recente în epidemiologia și tratamentul cancerelor sferei ORL reprezintă o oportunitate pentru reșezarea rolului chimioterapiei de inducție în scopul controlului local și al ameliorării supraviețuirii. Cu un control locoregional aproape maximal prin chimioradioterapie, este necesară determinarea capacității de control al bolii sistemice prin asocierea chimioterapiei de inducție.

Studiile care au demonstrat avantaj în supraviețuire

Există 2 trialuri pozitive, care au testat cisplatinul și fluorouracilul în tratament de inducție și care sunt utilizate pentru a relua studiul chimioterapiei de inducție.

- 1) **GETTEC**, grupul francez, a înrolat 318 pacienți cu cancer orofaringiene, curabile (prin chirurgie sau radioterapie) în 2 brațe. Primului grup i se administrat protocolul de chimioterapie PF (cisplatin 100 mg/ mp, z1 și 5-FU 1000 mg/mp z1-z5, perfuzie continuă), 3 cicluri, urmată ulterior de tratament local. La al doilea grup randomizat s-a efectuat tratament local ca prim gest terapeutic. În acesta, numărul de pacienți care a efectuat intervenție chirurgicală sau radioterapie

au fost echilibrate. Media de urmărire pentru acest studiu a fost de 5 ani. Supraviețuirea mediană a fost de 5.1 ani în grupul cu chimioterapie și 3.3 ani în celălalt grup. În ciuda diferențelor mari în ceea ce privește supraviețuirea, este curios că între cele 2 grupuri nu diferă nici controlul locoregional și nici controlul la distanță.

- 2) **GSSTC**, grupul italian, a înrolat 237 de pacienți cu stadiu III și IV (carcinoame epidermoide de cavitate bucală, orofaringe, hipofaringe și sinusuri paranasale. S-au administrat 4 cicluri de chimioterapie de inducție protocol PF. Ulterior s-a împărțit în 3 grupuri: cei cu boală inoperabilă (tumori cu invazie osoasă, ganglioni locoregionali fixați de alte structuri sau prea invaziv pentru a realiza disecția) au beneficiat de *radioterapie locoregională*, al doilea grup cu boală inoperabilă dar cu răspuns complet la nivelul tumorii primare, evidențiată prin biopsie – au beneficiat de limfadenectomie cervicală (*neck dissection*) și *intervenție chirurgicală* la pacienții operabili după chimioterapie. Urmărirea pacienților la 10 ani, nu a demonstrat o creștere a supraviețuirii, atât la pacienții cu limfadenectomie cervicală cât și la cei cu boală operabilă. Mai mult, supraviețuirea pacienților cu chimioterapie de inducție și radioterapie locoregională a fost mai mare (16% vs 6%).

Intensificarea dozei și noile medicamente

Cel mai recent pas în dezvoltarea studiilor care testează chimioterapia de inducție este reprezentat de introducerea taxanilor. Există 2 studii mari care testează în tratament neoadjuvant combinația de cisplatin și 5-fluorouracil cu combinația de 3 medicamente dintre care unul este taxan, urmată de tratament locoregional. Randomizarea s-a efectuat la începutul tratamentului de inducție, cu schema de inducție și nu cu tratament local efectuat.

Vermorken și colaboratorii [23] au inclus în studiul lor doar pacienții cu boală inoperabilă. Toți au primit radioterapie după 3 cicluri de inducție cu cisplatin și 5-fluorouracil sau cisplatin-5 fluorouracil-docetaxel.

Rezultatele studiilor au fost o rată de răspuns superioară și o supraviețuire globală mai mare.

Hitt și colaboratorii [12] au inclus în studiul lor pacienții cu boală inoperabilă și operabilă și au substituit docetaxelul cu paclitaxel iar tratamentul ulterior a fost radiochimioterapie. Conservarea organului și rata de răspuns complet au fost mai mari în grupul care a primit combinația de 3 medicamente dar supraviețuirea generală nu a fost semnificativ mai mare între cele 2 grupuri.

Pornind de la premiza că realizarea controlului bolii la distanță se realizează mai bine la pacienții cu chimioradioterapie, Vokes și colaboratorii au condus 2 studii [11, 24] în care au inclus pacienți stadiu III-IV, cu cancer în sfera ORL avansate locoregional, care au primit chimioterapie de inducție cu paclitaxel și carboplatin în doze diferite urmat de radiochimioterapie cu paclitaxel, 5-FU și hidroxiuree, 4 sau 5 săptămâni cu hiperfractionarea radioterapiei și doze diferite în funcție de clasificarea risc înalt, intermediar sau scăzut.

Chimioterapie de inducție	Radiochimioterapie concomitentă
Cohorta A și B* Paclitaxel 135mg/mp Carboplatin AUC 2	Paclitaxel 100 mg/mp, ziua 1 HU 500 mg la 12 ore 5 zile
Cohorta C* Paclitaxel 100 mg/mp [^] Carboplatin AUC 6*	5 FU 600 mg/mp z1-z5 RTE – 2 fracționari /zi 1.5 Gy/fr la interval de 6 ore SCHEMA = TFHX
* săptămânal, 6 cicluri	1 ciclu de tratament are 14 zile cu 5 zile tratament pauza 9 zile
® repetat la 4 săptămâni [^] ziua 1,8, 15 [*] ziua 1	Cohorta A: 45, 60 si 75 Gy Cohorta B: 39, 54 si 75 Gy Cohorta C: 36, 51 si 72 Gy

Tabel 2. Trialul Vokes et al, radiochimioterapie de inducție urmată de tratament local

Primul studiu [24], studiu de faza II, a constat în 6 săptămâni de inducție cu paclitaxel și carboplatin conform schemei urmată de TFHX, a inclus 69 de pacienți majoritatea în stadiu IV. Chirurgia de citoreducție a precedat tratamentul la 16 pacienți și chirurgia de salvare s-a efectuat la 21. Doar 2 pacienți au evoluat sub chimioterapia de inducție, 50 au avut răspuns complet după TFHX, cu o supraviețuire la 3 ani de 80%, iar 5 pacienți au avut recurență la distanță.

Al doilea studiu [11] a utilizat o doză scăzută de radioterapie în arii cu risc crescut de existență a bolii microscopice pentru a reduce efectele toxice. În acest studiu de 64 de pacienți eficacitatea nu a fost redusă în schimb toxicitatea indusă de radioterapie, respectiv radiodermita grad III și IV au fost reduse.

Alte studii recente de faza II includ docetaxel, paclitaxelul și carboplatinul [9, 11, 13, 15, 18].

O analiză retrospectivă care a inclus 5 trialuri consecutive care încercat să determine factorii de recidivă și cei prognostici, a arătat o reducere a evoluției locale de la 22% la 13% consecutiv asocierii chimioterapiei de inducție la chimioteradioterapie, sugerând o reducere absolută a bolii metastatice și nu doar de întârziere în apariția metastazelor. **Bookmark not defined.**

Alți investigatori de asemenea au raportat frecvențe scăzute de metastaze la distanță la 2 ani comparativ cu trialuri consacrate dar beneficiul propriu-zis este relativ neclar datorită urmării reduse.

Teoretic, prin îmbunătățirea controlului local al bolii prin protocoalele de chimioradioterapie, pacienții vor supraviețui mai mult și vor avea un risc mai mare de evoluție la distanță a bolii. Aceasta idee este sugerată și de studiile care au raportat rate echivalente de recurență locală sau la distanță. (tabel 3) [10, 16, 22].

	STADIU	Rezecabilitate	Chimioterapie de inducție	Tratament local
Orofaringe	T3-4/N0-3/Mo T2/N2-3/M0	Rezecabil	Paclitaxel 200 mg/mp Carboplatin AUC 6 în Z1, Z22 (la cei non-responsivi la chirurgie)	RTE 70 Gy (FC) Paclitaxel 30 mg/zi
Carcinom epidermoid sau limfoepiteliom	III / IV	Posibilitate scăzută de rezecție	Cisplatin 20 mg/mp/ zi 5-FU 800 mg/mp/ zi Leucovorin 500 mg/mp/zi, z1-z4	RT 70 Gy, (FC) Cisplatin 100 mg/zi, z1,z22, z43

			-ciclu la 28 zile	
Rinofaringe, cavitare bucală, orofaringe, hipofaringe, laringe, sinusuri para-nazale	T3-4/ N1-3	Nedefinit	Paclitaxel 200 mg/mp Carboplatin AUC 6 z1,z22 5-fluorouracil 225 mg/mp/zi z1-z42	RT 70 Gy (fc) Paclitaxel 50 mg/mp/săptămână Carboplatin AUC2 /săptămână
Baza de limbă, hipofaringe	III IV (fără T4)	Rezecabil	Cisplatin 100 mg/mp/zi, z1, z22 5-Fluorouracil 1000 mg/mp/zi Z1-Z5, Z22-26	Rt 70 Gy (fc) Cisplatin 100 mg/mp, z1, z22, z43

Tabel 3. Trialuri de inducție ce demonstrează rate echivalente de evoluție locală sau la distanță

Direcții viitoare:

După aproape 30 de ani de cercetare a chimioterapiei de inducție, acesta rămâne în continuare o controversă. Interesul în prezent este de cel de a asocia tripla terapie cu taxani, cisplatin și fluorouracil la tratamentul care ameliorează controlul local respectiv chimioradioterapia. Înainte ca acest tratament să devină parte a tratamentului, este necesară demonstrarea beneficiului în supraviețuire. Informațiile ultimelor studii și a celor în curs de maturare, oferă informații cu privire la definirea cu mai mare exactitatea a caracteristicilor pacienților, la care beneficiul este maximal.

Analiza multivariată [3, 21] a arătat că pacienții cu tumora primară mare (T4) și boală avansată (N2-N3) au cel mai mare risc de recurență loco-regională, respectiv pentru dezvoltarea metastazelor la distanță. Altele [1,7] au demonstrat o corelație între diferențierea tumorală și localizarea tumorii primare. Din cele 2 studii randomizate de inducție înainte de chirurgie sau radioterapie, trialul lui Paccagnella și colaboratorii, oferă cele mai multe informații referitoare la selecția pacienților. Aceste date au demonstrat beneficiul doar la pacienții cu boală inoperabilă, respectiv grupul de pacienți cu boală primară avansată și ganglioni locali masiv invadați și care sunt considerați cu prognostic rezervat în studii precedente .

Odată cu intrare în terapie a tratamentelor biologice sau tratamente moleculare țintite (erlotinib, gefitinib și cetuximab), caracterele moleculare ale tumorilor pot fi predictive pentru răspunsul la această terapie. Cel mai comun marker sau țintă terapeutică o constituie EGFR (epidermal growth factor receptor), proteina transmembranară supraexprimată în 80% din cazurile de carcinom epidermoid al sferei ORL, supraexpresia acesteia corelându-se cu prognostic rezervat [3, 21]. Într-un studiu clinic

controlat, randomizat [1], există un beneficiu semnificativ în supraviețuire, atunci când se asociază cetuximab cu radioterapie versus exclusiv radioterapie. Un alt marker important este reprezentat de mutația la nivel tumoral a proteinei p53. Printr-o analiză multivariată, două studii [4,7] au arătat o scădere a răspunsului la chimioterapie de inducție cu cisplatin și 5-FU, la pacienții cu mutație a proteinei p53.

Designul studiilor următoare vor fi concepute luând în considerare toate aceste informații colectate în ultimii ani. Chimioterapia de inducție asociată chimioradioterapiei pare să fie o strategie rezonabilă pentru reducerea recurenței la distanță ca și mecanism al îmbunătățirii supraviețuirii globale. Necesitatea studiilor de faza III este necesară, pornind și de la premiza că beneficiul poate depăși riscurile. Criteriile de eligibilitate ar include inoperabilitatea, boala ganglionară avansată, (cele cu risc crescut de recurență) și supraexpresie EGFR, cu stratificare ulterioară pe baza markerilor moleculari.

Concluzii.

Chiar dacă înțelegerea apariției rezistenței la 5-FU este redusă de multe necunoscute, principiul de bază relevat de ultimele studii asupra timidilat sintetaze propune o abordare rațională a tratamentului cancerelor din sfera O.R.L. Atât inhibiția insuficientă a timidilat sintetazei cât și nivelul crescut intrinsec sunt implicate în rezistența cu 5-FU. Nivelul crescut de expresie enzimatică poate fi codificată într-un prognostic nefavorabil la chimioterapie. Aceste informații sunt utile în implementarea unei chimioterapii mai efective precum chimioterapie bazat pe inhibiția timidilat sintetazei sau scoaterea 5-FU din schemele de tratament și introducerea unor

agenți terapeutici cu o eficiență comparabilă 5-FU-lui sau fără reacții adverse incriminate acestuia din urmă. Din moment ce 5-FU și-a demonstrat limitele în cancerul epitelial bronhopulmoare unde nu este utilizat în schemele terapeutice, considerăm oportună reducerea utilizării 5-FU și în cancerul O.R.L. pe același principiu al similarității de epitelii și răspunsului redus prin creșterea expresiei de TS, lucru evidențiat de studii în alte tipuri de cancer.

Bibliografie

- [1] Bhushan S., McLeod H., and Walko CM., Role of Pharmacogenetics as Predictive Biomarkers in CRC Treatment: 5-Fluorouracil, School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill
- [2] Burri RJ., Lee NY. Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy for Head and Neck Cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(3):293-302., 03/23/2009
- [3] Chu E., Koeller DM., Johnston PG., Zinn S., Allegra CJ. Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma. *Mol Pharmacol* 1993;43:527-33.
- [4] Chu E., Zinn S., Boarman D., Allegra CJ. The interaction of γ interferon and 5-fluorouracil in the H630 human colon carcinoma cell line. *Cancer Res* 1990; 50:5834-40
- [5] Clark JL., Berger SL., Mittelman A., Berger FG. Thymidylate synthase gene amplification in a colon tumor resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. *Cancer Treat Rep* 1987;71:261-5
- [6] Curtin NJ., Harris AL., Aherne GW. Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Cancer Res* 1991, 51:2346-2352
- [7] Diasio RB., Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin. Pharmacokinet.* 16, 215–237 (1989).
- [8] Fukui Y., Oka T., Nagayama S., Danenberg PV., Danenberg KD., Fukushima M.: Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, orotate phosphoribosyltransferase mRNA and protein expression levels in solid tumors in large scale population analysis. *Int. J. Mol. Med.* 22.,709-716 (2008).
- [9] 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; 47: 2203–6.
- [10] Horie N., Aiba H., Oguro K., Hojo H., Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct. Funct.* 1995; 20: 191–7.
- [11] Iwahashi S., Shimada M., Utsunomiya T., Morine Y., Imura S., Ikemoto T., Mori H., Hanaoka J. Role of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expressions in gallbladder carcinoma. *Surg Today.* 2012 Jan 24
- [12] Jack West H., What Molecular Markers to Order in Non-Small Cell Lung Cancer? It's A Murky Mess!
- [13] Johnston PG., Behan KA. and Allegra CJ. Thymidylate Synthase Expression and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Advanced Head and Neck Cancer *JNCI J Natl Cancer Inst* (1997) 89 (4): 308-313. doi: 10.1093/jnci/89.4.308
- [14] Johnston PG., Drake JC., Trepel J., Allegra CJ Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 1992;52:4306-12.
- [15] Johnston PG., Lenz HJ., Leichman CG., Danenberg KD., Allegra CJ., Danenberg PV., Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and

- gastric tumors. *Cancer Res.* 1995 Apr 1;55(7):1407-12.
- [16] Kawakami K., Salonga D., Park JM. et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 4096–101
- [17] Kohno N. The role of taxanes for head and neck cancer, *Gan To Kagaku Ryoho.* 2005 Dec;32 (13):2035-9.
- [18] Lee A., Ezzeldin H., Fourie J., et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: impact of pharmacogenetics on 5-fluorouracil therapy. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2004;2:527-532
- [19] Longley DB., Harkin DP., Johnston PG (May 2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies". *Nat. Rev. Cancer* 3 (5): 330–8. doi:10.1038/nrc1074. PMID 12724731
- [20] Luo HR., Lü XM., Yao YG., et al. Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese populations and evolution of the novel alleles. *Biochem. Genet.* 2002; 40: 41–51.
- [21] Peters GJ., Backus HH., Freemantle S., van Triest B., Codacci-Pisanelli G., van der Wilt CL., Smid K., Lunec J., Calvert AH., Marsh S., McLeod HL., Bloemena E., Meijer S., Jansen G., van Groeningen CJ., Pinedo HM. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jul 18;1587(2-3):194-205.
- [22] Peters GJ., van Triest B., Backus HH., Kuiper CM., van der Wilt CL., Pinedo HM: Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Eur J Cancer* 2000, 36:916-924
- [23] Popat S., Matakidou A., Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2004;22:529-536
- [24] Posner MR. Role of Induction Chemotherapy in the Treatment of Head and Neck Cancer -- An Ongoing Debate: An Expert Interview With Dr. Marshall R. Posner
- [25] Pullarkat ST., Stoehlmacher J., Ghaderi V., et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2001; 1: 65–70.
- [26] Shah MA., Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2001, 7:2168-2181.
- [27] Shouji S., Pharmacogenetics of Fluoropyrimidine and Cisplatin, Gastrointestinal Unit, Settlement Clinic, Towa, Adachi-ku, Tokyo, Japan
- [28] Swain SM., Lippman ME., Egan EF., Drake JC., Steinberg SM., Allegra CJ. Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:890-9.
- [29] Villafranca E., Okruzhnov Y., Dominguez MA., et al. 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; 19: 1779–86.
- [30] Washtien WL. Increased levels of thymidylate synthetase in cells exposed to 5-fluorouracil. *Mol Pharmacol* 1984; 25:171-7
- [31] Zhou BB., Bartek J.: Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 2004, 4:216-225.
- [32] Zhou JY., Shi R., Yu HL., Zeng Y., Zheng WL., Ma WL. The association between two polymorphisms in the TS gene and risk of cancer: A systematic review and pooled analysis. *Int J Cancer.* 2012 Feb 5. doi: 10.1002/ijc.27465.