

TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Farmacia

**“ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS
IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y
EL RIESGO Y LA SUPERVIVENCIA DE CÁNCER DE
PULMÓN NO MICROCÍTICO”**

LAURA ELENA PINEDA LANCHEROS

Granada, febrero 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Laura Elena Pineda Lancheros
ISBN: 978-84-1117-861-7
URI: <https://hdl.handle.net/10481/82094>

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE ATENCIÓN FARMACÉUTICA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIDAD DE FARMACOGENÉTICA
SERVICIO DE FARMACIA
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

TESIS DOCTORAL

**“ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS
IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y EL
RIESGO Y LA SUPERVIVENCIA DE CÁNCER DE PULMÓN NO
MICROCÍTICO”**

Tesis presentada por **Laura Elena Pineda Lancheros** para optar al grado de Doctora.

Directoras:

Dra. Cristina Pérez Ramírez

Dra. Almudena Sánchez Martín

Granada, febrero 2023



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

La doctoranda **Laura Elena Pineda Lancheros** y las directoras de la tesis **Dra. Cristina Pérez Ramírez** y **Dra. Almudena Sánchez Martín**.

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, febrero 2023.

Directores de la Tesis:

Doctoranda:

Firma

Firma

Firma

A la memoria de mis padres,

A mis hermanas,

A mis sobrinos.

*Fuego purga nuestra tierra y destinos
Arrasa vorazmente con los vírgenes campos
Fénix majestuoso es nuestra immaculada voluntad
Entre cenizas, a nuestros sueños brinda fertilidad*

*Sutíl susurro de la guardiana alada
En el radiante día o la noche estrellada
Surca los cielos cargando mis anhelos,
Ahora un gran cóndor, antes un pequeño reyezuelo.*

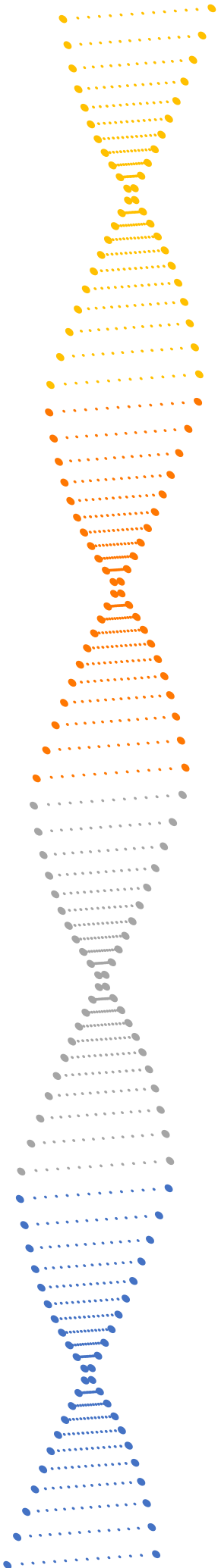
*Marejada invencible ha viajado el atlántico,
Nacida de riachuelos nutridos del pacífico
Flexible, poderosa y pura nave es mi sangre
Contracorriente he surcado los mares, dejando mi raigambre.*

*Piezas aromáticas bañadas de café, notas florales son Orquídeas,
Se visten de laurel, acompañando el oro en estas líneas
La semilla que en esta tierra fértil cultive,
Recompensa al trabajo fuerte, el logro que hoy coseche.*

Con cariño,

Miguel Arturo Silva Mejía

María Camila Parada Lancheros



AGRADECIMIENTOS

Tras este largo camino, por fin ha llegado el tan anhelado momento donde culmino esta etapa tan importante de mi vida. Ha sido un recorrido lleno de muchas experiencias, mucho aprendizaje, muchas historias que contar. Pero, sobre todo, agradezco mucho la oportunidad de conocer personas extraordinarias de las cuales he podido enriquecerme en lo personal y profesionalmente. Así como, valorar un poco más a todas aquellas personas que me han apoyado siempre, incluso ahora desde la distancia.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, mis mentoras, Cristina y Almudena. Gracias Cristina, por confiar desde el primer momento en mí, por motivarme cada día y no dejarme sola en los momentos de dificultad. Gracias por tu paciencia a la hora de enseñarnos lo que sabes, que no ha sido poco y por tu disposición a apoyarme no solo en lo académico sino en lo personal. Gracias a Almudena, que con tu entusiasmo y amor por la farmacogenética me animaste a iniciar y culminar este proyecto. Tu enfoque clínico me ha ayudado a tener una perspectiva más global, no solo centrada en la investigación, sino también en la aplicación clínica. Sin su guía este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias a mi tutor de Tesis, Fernando Martínez, por su respaldo en todo momento, por siempre estar dispuesto a asesorarme en las decisiones importantes. Gracias por su confianza, por apoyar mis nuevas ideas. Sin duda es un placer poder trabajar a tu lado.

Agradecimiento especial a Alberto Jiménez, jefe del Servicio de Farmacia, por su gran soporte al desarrollo de la investigación en farmacogenética, sin duda su confianza es pilar fundamental para poder realizar todos los proyectos que tenemos en la unidad. Adicionalmente, su colaboración me ha permitido poder complementar mi formación con cursos, diplomados y congresos.

Y como no agradecerle a Ana Moreno, quien siempre me ha recibido con los brazos abiertos, irradiando alegría en todo momento. Tu cercanía y amabilidad me han hecho sentir como en casa. Gracias por tu disposición para ayudarme en todos los trámites y papeleos desde mi inicio en la universidad con el máster, hasta finalizar la tesis.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de Laboratorio, durante estos años nos hemos convertido en un equipo, siempre dispuestos a darnos una mano. Gracias a Susana, quien se ha convertido en una gran amiga, trabajar con ella hace que todo sea más llevadero, siempre poniendo buena cara a todas las situaciones. Es una mujer integral, inteligente y de buen corazón. Sin duda una gran suerte de conocerla. Noelia,

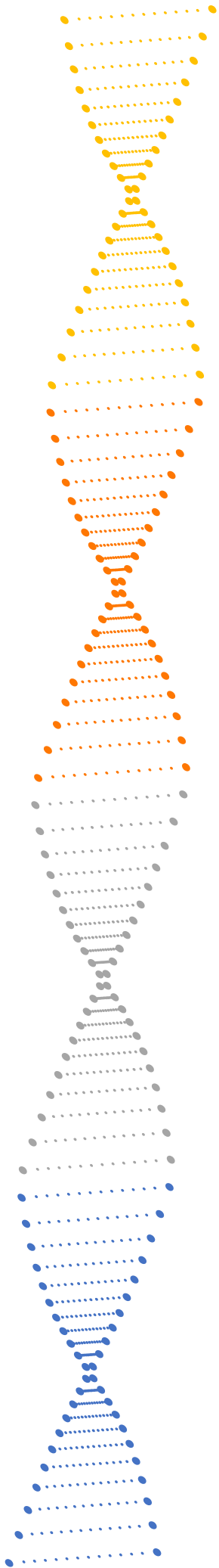
estos días me he preguntado, que sería del grupo sin ella. Siempre dispuesta a transmitir su conocimiento y experiencia. Me ha guiado desde que aprendí las técnicas de laboratorio hasta la finalización de la tesis. Gracias, por tanto. Chema, has llegado en mi último año de tesis, pero me has aportado muchísimo, no solo en lo académico, sino en lo personal. Tus dichos y forma de ser hacen que cada reto que nos ponemos sea más fácil de afrontar. Cristina, siempre tan positiva, viendo el lado amable de la vida. Aprender de ella da gusto. Tiene el don de la enseñanza. Luciana, trabajar con ella ha sido una gran experiencia, es una mujer muy sabia, que me ha aportado buenos consejos. Yasmin, gracias por tu disposición en el laboratorio y estar dispuesta a todo. Gracias a ti me fue posible realizar la revisión sistemática. Lograste simplificar lo que parecía tan complejo. Gracias Andrea, por tu disposición a colaborar en nuevos proyectos, será un placer seguir trabajando juntas hasta finalizarlos. Gracias a todos los que han pasado por el grupo y a los que inician ahora su camino, a los administrativos de la farmacia y demás profesionales adjuntos y residentes. De cada uno me llevo un aprendizaje.

Sin duda alguna esta historia no sería realidad sin el apoyo de Carlos Lema. Desde que nos conocimos en el 2017, él ha depositado su confianza en mí incondicionalmente. Me ha acompañado desde entonces, con su sabiduría y especial forma de ser. Creo firmemente que el mundo sería mejor si existieran más personas como tú. No tengo palabras para expresar y agradecer el cómo tu apoyo ha cambiado mi vida y me ha impulsado a llegar donde estoy. ¡De corazón mil y mil gracias!

Gracias infinitas a mis queridos profes Martha Nelly Cascavita e Ivar Muñoz. Gracias por estar siempre conmigo, por darme soporte y cariño, por cuidarme como a una hija. Siempre han velado para que yo esté bien y cumpla todas mis metas. Han sembrado en mí el deseo de progresar, de salir adelante y aquí estoy culminando este logro tan importante. Se que podemos contar con nuestro apoyo mutuo y eso no tiene precio. Agradezco mucho a la vida por haberlos puesto en mi camino, los quiero mucho.

Gracias a mis amigos, Camila, Laura, Santiago, Javier, Mafe, Daniel, José, Deisy, Alex, Erika, Ruth, Diana, Adriana, Fabi, Paola, Karen, Katy, porque siempre han estado ahí a pesar de la distancia, para apoyarme en todo momento y por supuesto para celebrar mis logros. Gracias a Manuel, quien ha sido mi soporte lejos de mi tierra, por compartir conmigo tu familia para que no esté sola. Gracias por acompañarme en este largo camino y animarme a continuar cuando fue necesario.

Gracias a mi familia. A mis tías Yolanda y Alcira, a todos mis primos Alexandra, Diego, Juan Pablo, Angela, Nathalia, Felipe, Jeisson, Nicolas, por siempre apoyarme y recibirme con los abiertos. Gracias a mi cuñado Beto, quien me apoyo y me animo desde mis inicios en la carrera y a mi cuñado Miguel, quien con sus detalles culinarios hacen que mi estancia cuando voy a verlos sea especial. A mis adorados sobrinos, María Paula, Jacobo y Cristian, son un motor para continuar y ser mejor cada día, para así poder brindarles el mejor ejemplo. Gracias a mis hermanas, Viviana, Camila y Alejandra, por ser mi pilar, porque a pesar de la distancia y las dificultades de la vida hemos permanecido unidas. Ustedes son mi hogar, mi lugar seguro cuando acudir en cada paso que doy. Este logro no es solo mío, es para ustedes. Porque siempre han estado orgullosas de mí, porque juntas formamos el mejor equipo. Y no puedo terminar sin agradecerle a mis padres, Mayerly y Pedro, que a pesar de que su camino fue muy corto, me sembraron los valores que han forjado la mujer que soy hoy. Este y todos mis logros serán para ustedes. Su recuerdo siempre me dará el valor y la fuerza para continuar, para ser cada día una mejor persona.



RESUMEN

TÍTULO

ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y EL RIESGO Y LA SUPERVIVENCIA DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es una de las neoplasias más severas y con mayor mortalidad a nivel mundial (18%). Comparando ambos sexos, es el segundo con mayor incidencia tras el cáncer de mama (11.4%). Se estima que para el año 2040, la incidencia del cáncer de pulmón aumente un 22.4% en Europa, mientras que el aumento de la mortalidad será de un 25.5%. Según las últimas estadísticas de cáncer, se espera que ocurran más de 236,740 nuevos casos y 139,603 muertes en los Estados Unidos en 2022.

Los tipos más importantes de cáncer de pulmón son el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, del inglés Small Cell Lung Cancer) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, del inglés Non-Small Cell Lung Cancer). El NSCLC representa aproximadamente el 80-85% de todos los casos de cáncer de pulmón. El NSCLC se divide en diferentes subtipos: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes.

La patogenia del NSCLC es compleja, ya que se han identificado numerosos factores de riesgo, como son el tabaco, exposición al radón, contaminación del aire, el historial de enfermedades pulmonares previas, mutaciones somáticas y bajos niveles séricos de la vitamina D. Por otro lado, la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón a los 5 años después del diagnóstico es del 10% al 20% en la mayoría de los países, incluso después de la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia.

La vitamina D se caracteriza por tener múltiples funciones biológicas, su influencia en el cáncer se debe al inhibir la progresión tumoral suprimiendo la metástasis, la proliferación celular y la angiogénesis, o al promover la apoptosis en las células cancerosas. Investigaciones recientes apuntan a la relación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs, del inglés Single nucleotide polymorphism) en los principales genes implicados en la ruta metabólica de la vitamina D tanto en la supervivencia de la enfermedad como en su patogenia. Por lo que se destaca la importancia de profundizar el impacto de estas asociaciones en diferentes poblaciones.

HIPÓTESIS

“La prevalencia de polimorfismos en los genes *CYP27B1*, *CYP24A1*, *CYP2R1*, *GC* y *VDR* implicados en la ruta metabólica de la vitamina D, influyen en el riesgo y la supervivencia de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón no microcítico”.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Evaluar la influencia de la prevalencia de SNPs en los genes *CYP27B1*, *CYP2R1*, *GC*, *CYP24A1* y *VDR* implicados en la ruta metabólica de la vitamina D, como predictores de riesgo y supervivencia de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón no microcítico.

Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de los polimorfismos **rs10877012** (*CYP27B1*), **rs4646536** (*CYP27B1*), **rs703842** (*CYP27B1*), **rs3782130** (*CYP27B1*), **rs6068816** (*CYP24A1*), **rs4809957** (*CYP24A1*), **rs10741657** (*CYP2R1*), **rs7041** (*GC*) y *VDR Bmsl* (rs1544410), *VDR TaqI* (rs731236), *VDR Apal* (rs7975232), *VDR FokI* (rs2228570) y *VDR Cdx2* (rs11568820) implicados en la ruta metabólica de la vitamina D en casos y controles.
- Evaluar la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión en pacientes diagnosticados con NSCLC.
- Evaluar la influencia de variables clínicas y genéticas en la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión en pacientes con NSCLC.
- Evaluar la influencia de variables clínicas y genéticas en la susceptibilidad de desarrollar NSCLC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis de supervivencia se realizó un estudio de cohortes retrospectivo, que incluyó 194 pacientes diagnosticados de NSCLC y para el análisis de riesgo se llevó a cabo un estudio observacional de casos y controles, incluyendo 204 pacientes con NSCLC y 408 controles. La investigación se llevó a cabo en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (HUVN).

Las variables clínicas, sociodemográficas e histopatológicas se obtuvieron a partir de la revisión de las historias clínicas de los pacientes. Las muestras de ADN de sangre o saliva se obtuvieron del Biobanco público de Andalucía. Los polimorfismos que se analizaron fueron los siguientes: rs10877012 (*CYP27B1*), rs4646536 (*CYP27B1*), rs703842 (*CYP27B1*), rs3782130 (*CYP27B1*), rs6068816 (*CYP24A1*), rs4809957 (*CYP24A1*), rs10741657 (*CYP2R1*), rs7041 (*GC*) y *VDR Bmsl* (rs1544410), *VDR TaqI* (rs731236), *VDR Apal* (rs7975232), *VDR FokI* (rs2228570) y *VDR Cdx2* (rs11568820). La técnica utilizada para la determinación de los genotipos fue PCR a tiempo real

utilizando sondas TaqMan™. El 10% de los resultados se confirmó mediante secuenciación Sanger.

Se evaluó la asociación de los polimorfismos con el riesgo y la supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en NSCLC a través de los softwares R 3.5. y PLINK, aplicando los métodos estadísticos correspondientes para cada tipo de estudio.

RESULTADOS

Se emplearon los modelos genotípico, aditivo, alélico, dominante y recesivo para realizar el análisis bivariado entre los polimorfismos genéticos y el riesgo a padecer NSCLC. Se observó una asociación estadísticamente significativa en los siguientes polimorfismos: *VDR Bmsl* rs1544410, en los modelos genotípico ($p=0.0020$), aditivo ($p=0.0122$), alélico ($p=0.0121$) y recesivo ($p=0.0006$); *VDR TaqI* rs731236 en los modelos genotípico ($p=0.0299$) y recesivo ($p=0.0124$) y *CYP24A1* rs6068816 en los modelos genotípico ($p=0.0292$), aditivo ($p=0.0316$), alélico ($p=0.0353$) y recesivo ($p=0.0194$). Sin embargo, tras realizar la corrección por el método de Bonferroni, el único polimorfismo que mantuvo la asociación estadísticamente significativa con respecto al riesgo a desarrollar NSCLC fue *VDR Bmsl* rs1544410 en el modelo genotípico y recesivo. En el modelo genotípico, los pacientes portadores del genotipo *VDR Bmsl* rs1544410-AG presentaron mayor riesgo de NSCLC respecto a los portadores del genotipo GG ($p_{(\text{bonferroni-corregido})}=0.0361$; OR=1.058; CI_{95%}= 0.72-1.54; AG vs GG), mientras que los portadores del genotipo *VDR Bmsl* rs1544410-AA presentaron menor riesgo de NSCLC respecto al genotipo GG ($p_{(\text{bonferroni-corregido})}=0.0361$; OR=0.457; CI_{95%}= 0.26-0.76; AA vs GG). Asimismo, en el modelo recesivo, se observó que los pacientes portadores del genotipo *VDR Bmsl* rs1544410-AA mostraron un menor riesgo a padecer NSCLC respecto a los portadores del alelo G ($p_{(\text{bonferroni-corregido})}=0.0082$; OR=0.442; CI_{95%}= 0.26-0.70; AA vs G). El modelo de regresión logística ajustado por el tabaquismo y antecedentes familiares de cáncer reveló que, en el modelo genotípico, los portadores del genotipo *VDR Bmsl* rs1544410-AA se asociaron con un menor riesgo de desarrollar NSCLC con respecto al genotipo GG ($p=0.0377$; OR=0.51; CI_{95%}= 0.27- 0.95; AA vs GG). En el modelo recesivo, se mantuvo esta asociación, donde los pacientes portadores del genotipo AA presentaron menor riesgo a padecer NSCLC con respecto a los portadores del alelo G ($p=0.0140$; OR=0.49; CI_{95%}= 0.27-0.85; AA vs G). El resto de los polimorfismos analizados no mostraron asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de NSCLC en ninguno de los modelos estudiados.

En cuanto al análisis de supervivencia, se evaluó la SG y la SLP para la población general y posteriormente en subgrupos teniendo en cuenta aquellos pacientes que habían recibido cirugía o no como primera línea de tratamiento.

Población general: el modelo de regresión de Cox ajustado por género, estadio tumoral y primera línea de tratamiento mostró que el polimorfismo *CYP27B1* rs4646536 presentó una tendencia a la asociación con la SG ($p=0.0569$; HR=2.01; CI_{95%}=0.98-4.14) ($p_{\text{likelihood ratio test}} < 2 \cdot 10^{-16}$) (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia global de 194 pacientes con NSCLC.

| | Supervivencia global | |
|---|----------------------|---------|
| | HR (CI95%) | p-valor |
| Genero (Masculino) | 1.63 (1.11-2.38) | 0.0119 |
| Estadio tumoral (IIIB-IV) | 2.25 (1.25-4.07) | 0.0070 |
| Primera línea de tratamiento (No cirugía) | 2.65 (1.31-5.35) | 0.0064 |
| <i>CYP27B1</i> rs4646536-A | 2.01 (0.98-4.14) | 0.0569 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de confianza.

Así mismo, la regresión de Cox ajustada por la primera línea de tratamiento mostró que el polimorfismo genético *CYP27B1* rs4646536 estaba asociado con la SLP ($p=0.0233$; HR=2.11; CI_{95%}=1.11-4.04) ($p_{\text{likelihood ratio test}} = 1 \cdot 10^{-12}$) (Tabla 2).

Tabla 2. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia libre de progresión de 194 pacientes con NSCLC.

| | Supervivencia libre de progresión | |
|---|-----------------------------------|---------|
| | HR (CI95%) | p-valor |
| Primera línea de tratamiento (no cirugía) | 3.89 (2.54-5.96) | <0.001 |
| <i>CYP27B1</i> rs4646536_A | 2.11 (1.11-4.04) | 0.0233 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de confianza.

Análisis de subgrupos

Supervivencia global: La regresión de Cox multivariante, ajustada por antecedentes familiares de cáncer, mostró que el polimorfismo genético *VDR* (Cdx-2; rs11568820) era el único factor independiente asociado a la SG en pacientes con NSCLC reseado ($p=0.0129$; HR=7.43; CI_{95%}=1.53-36.15) ($p_{\text{likelihood ratio test}} = 0.04$) (tabla 3).

Tabla 3. Influencia de las características clínicas y los polimorfismos genéticos en la supervivencia global de los pacientes con NSCLC reseado.

| | Supervivencia global | |
|--------------------------|----------------------|---------|
| | HR (CI95%) | p-valor |
| <i>VDR</i> rs11568820_AA | 7.43 (1.53-36.15) | 0.0129 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de confianza.

La regresión de Cox ajustada por género, estatus alcohólico y estadio mostró que los polimorfismos genéticos *CYP24A1* rs6068816 ($p=0.0089$; HR=3.47; CI_{95%}=1.37-8.79) y *VDR* (Taql; rs731236) ($p=0.0005$; HR=2.71; CI_{95%}=1.55-4.75) eran los únicos factores independientes asociados con la SG en pacientes con NSCLC no resecado ($p_{\text{likelihood ratio test}}=0.000002$) (tabla 4).

Tabla 4. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia global de pacientes con NSCLC no resecado.

| | Supervivencia global | |
|-----------------------------|-------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-valor |
| Genero (Masculino) | 1.67 (1.11-2.52) | 0.0142 |
| Estadio tumoral (IIIB – IV) | 2.42 (1.29-4.51) | 0.0055 |
| <i>CYP24A1</i> rs6068816_TT | 3.47 (1.37-8.79) | 0.0089 |
| <i>VDR</i> rs731236_CC | 2.71 (1.55-4.75) | 0.0005 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de confianza.

Supervivencia libre de progresión: La regresión de Cox ajustada por el estadio reveló que el polimorfismo *GC* rs7041 estaba significativamente asociado con la SLP en pacientes con NSCLC resecado ($p=0.0447$; HR=2.26; CI_{95%}=1.02-5.02; Tabla 5) ($p_{\text{likelihood ratio test}}=0.05$).

Tabla 5. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC resecado.

| | Supervivencia libre de progresión | |
|---------------------|-----------------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-valor |
| Estadio (IIIB-IV) | 11.8 (1.34-104.1) | 0.0262 |
| <i>GC</i> rs7041_GG | 2.26 (1.02-5.02) | 0.0447 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de confianza.

La regresión de Cox ajustada por el IMC mostró que los polimorfismos *CYP27B1* rs4646536 ($p=0.0411$; HR=2.52; CI_{95%}=1.04-6.12), *CYP24A1* rs6068816 ($p=0.0048$; HR=8.77; CI_{95%}=1.94-39.7) y *VDR* (ApaI; rs7975232) ($p=0.0002$; HR=3.08; CI_{95%}=1.71-5.54) se asociaron significativamente con la SLP en pacientes con NSCLC no resecado ($p_{\text{likelihood ratio test}}=0.00006$) (Tabla 6).

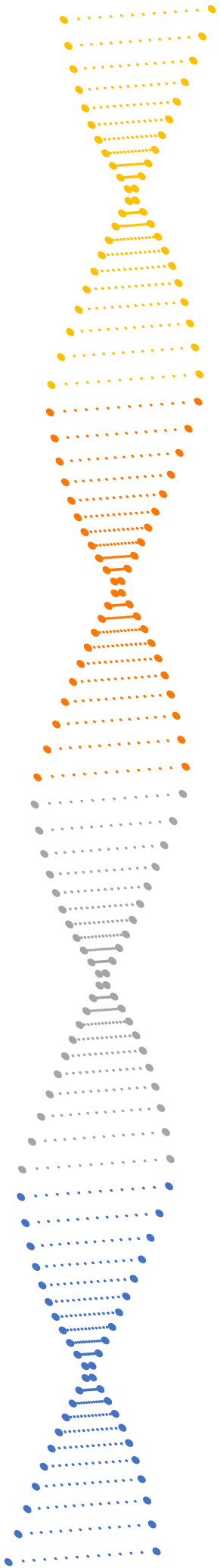
Tabla 6. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia libre de progresión de pacientes con NSCLC no resecado.

| | Supervivencia libre de progresión | |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-valor |
| IMC (>24) | 2.23 (1.27-3.89) | 0.0051 |
| <i>CYP27B1</i> rs4646536_A | 2.52 (1.04-6.12) | 0.0411 |
| <i>CYP24A1</i> rs6068816_TT | 8.77 (1.94-39.7) | 0.0048 |
| <i>VDR</i> rs7975232_AA | 3.08 (1.71-5.54) | 0.0002 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de Confianza.

CONCLUSIONES

- I. El genotipo AA en el gen *VDR BmsI* rs1544410 se asoció significativamente con un menor riesgo de NSCLC, tanto en el modelo genotípico como en el recesivo.
- II. Los polimorfismos *CYP24A1* rs6068816 y *VDR TaqI* rs731236 se asociaron con el riesgo a de NSCLC en el modelo bivariante.
- III. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos rs10877012 (*CYP27B1*), rs4646536 (*CYP27B1*), rs703842 (*CYP27B1*), rs3782130 (*CYP27B1*), rs4809957 (*CYP24A1*), rs10741657 (*CYP2R1*), rs7041 (*GC*) y *VDR ApaI* (rs7975232), *VDR FokI* (rs2228570) y *VDR Cdx2* (rs11568820) con la susceptibilidad a NSCLC.
- IV. Los pacientes portadores del alelo A para el polimorfismo rs4646536 *CYP27B1* presentaron una fuerte tendencia a un mayor riesgo de muerte y un mayor riesgo de progresión en 194 pacientes con NSCLC. Adicionalmente, los portadores del genotipo rs4646536-AA mostraron una mayor progresión en subgrupo de 146 pacientes con NSCLC no resecado.
- V. El genotipo AA para *VDR Cdx2* (rs11568820) se asoció con un mayor riesgo de muerte y mostraron una tendencia hacia una mayor progresión en el subgrupo de 48 pacientes con NSCLC resecado.
- VI. Se encontró un mayor riesgo de muerte y progresión en los pacientes con NSCLC no resecado, portadores del genotipo TT para el polimorfismo rs6068816 *CYP24A1*.
- VII. Los portadores del genotipo GG para el polimorfismo *VDR TaqI* rs731236 se asociaron con un mayor riesgo de muerte y progresión en los pacientes con NSCLC no resecado.
- VIII. Pacientes con NSCLC resecado portadores del genotipo GG para rs7041 (*GC*) presentaron un mayor riesgo de muerte (Modelo de Cox univariante) y un mayor riesgo de progresión (Modelo de Cox multivariante).
- IX. El genotipo AA para *VDR ApaI* (rs7975232) mostró un mayor riesgo de muerte (Modelo de Cox univariante) y un mayor riesgo de progresión (Modelo de Cox multivariante) en pacientes con NSCLC no resecado.
- X. No se encontró una relación entre los polimorfismos rs3782130 (*CYP27B1*), rs10877012 (*CYP27B1*), rs4809957 (*CYP24A1*), rs10741657 (*CYP2R1*), *VDR BmsI* (rs1544410) y *VDR FokI* (rs2228570) y la supervivencia en nuestra población de estudio.



ÍNDICE

ÍNDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 39 |
| 1.1 | Epidemiología del cáncer de pulmón | 39 |
| 1.1.1 | Prevalencia, incidencia y mortalidad del Cáncer de pulmón | 39 |
| 1.2 | Factores de riesgo | 40 |
| 1.3 | Signos y síntomas | 41 |
| 1.4 | Diagnóstico | 42 |
| 1.5 | Clasificación del cáncer de pulmón | 44 |
| 1.6 | Mutaciones oncogénicas en NSCLC | 45 |
| 1.7 | Estadificación del cáncer de pulmón de células no pequeñas | 46 |
| 1.8 | Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas | 50 |
| 1.8.1 | 1.7.1 Tumores resecables | 50 |
| 1.8.2 | 1.7.2. Tumores irresecables | 50 |
| 1.9 | Pronóstico del NSCLC | 52 |
| 1.10 | Funciones biológicas de la vitamina D | 52 |
| 1.11 | Ruta metabólica de la vitamina D | 53 |
| 1.12 | Implicaciones genéticas | 54 |
| 1.13 | Genes involucrados en la ruta metabólica de la vitamina D | 56 |
| 1.13.1 | VDR: Receptor de vitamina D (Vitamin D receptor) | 56 |
| 1.13.2 | CYP27B1: Citocromo P450 Familia 27 Subfamilia B Miembro 1 | 57 |
| 1.13.3 | CYP24A1: Citocromo P450 Familia 24 Subfamilia A Miembro 1 | 58 |
| 1.13.4 | GC: Componente específico del grupo (Proteína de unión a la vitamina D) | 58 |
| 1.13.5 | CYP2R1: Citocromo P450 Familia 2 Subfamilia R Miembro 1 | 59 |
| 2 | HIPÓTESIS | 63 |
| 3 | OBJETIVOS | 63 |
| 3.1 | Objetivo principal | 63 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 63 |
| 4 | MATERIAL Y MÉTODOS | 67 |
| 4.1 | Diseño del estudio | 67 |
| 4.2 | Declaración ética | 67 |
| 4.3 | Población y ámbito de estudio | 67 |
| 4.4 | Alcance geográfico y temporal | 67 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.5 | Criterios de inclusión | 67 |
| 4.6 | Criterios de exclusión | 68 |
| 4.7 | Variables | 68 |
| 4.7.1 | Variables dependientes o de respuesta | 68 |
| 4.7.2 | Variables independientes..... | 68 |
| 4.8 | Análisis estadístico | 73 |
| 4.8.1 | Análisis descriptivo:..... | 73 |
| 4.8.2 | Análisis de Riesgo | 74 |
| 4.8.3 | Análisis de Supervivencia | 74 |
| 4.8.4 | Equilibrio de Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamento y frecuencias de haplotipos..... | 75 |
| 5 | Resultados | 79 |
| 5.1 | Estudio de Riesgo | 79 |
| 5.1.1 | Características de los pacientes | 79 |
| 5.1.2 | Distribución del genotipo | 80 |
| 5.1.3 | Influencia de los polimorfismos genéticos en el riesgo de NSCLC | 84 |
| 5.3 | Estudio de Supervivencia | 90 |
| 5.3.1 | Características de los pacientes | 90 |
| 5.3.2 | Influencia de las características clínico-patológicas en la supervivencia | 90 |
| 5.3.3 | Distribución de genotipos | 103 |
| 5.3.4 | Influencia de los polimorfismos genéricos en la supervivencia | 107 |
| 6 | DISCUSIÓN | 132 |
| 7 | CONCLUSIONES | 145 |
| 8 | REFERENCIAS | 150 |
| 9 | ANEXOS | 163 |
| 9.1 | ANEXO 1 | 163 |
| 9.2 | ANEXO 2 | 164 |
| 10 | PUBLICACIONES | 173 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Clasificación TNM para el cáncer de pulmón..... | 49 |
| Tabla 2. Características de los genes y SNPs implicados en la ruta metabólica de la vitamina D..... | 57 |
| Tabla 3. Polimorfismos genéticos y TaqMan® ID..... | 71 |
| Tabla 4. Características de cada SNP y la metodología usada para la secuenciación sanger..... | 73 |
| Tabla 5. Características clínico-patológicas de los casos y controles de NSCLC..... | 80 |
| Tabla 6. Equilibrio de Hardy-Weinberg (Riesgo)..... | 81 |
| Tabla 7. Desequilibrio de ligamento (Riesgo)..... | 82 |
| Tabla 8. Frecuencias del alelo menor para los SNPs (Riesgo)..... | 82 |
| Tabla 9. Estimaciones de frecuencia de haplotipos..... | 83 |
| Tabla 10. Polimorfismos genéticos y asociación con el riesgo de NSCLC..... | 86 |
| Tabla 11. Influencia del polimorfismo del gen VDR BmsI (rs1544410) en el riesgo de NSCLC..... | 88 |
| Tabla 12. Asociación del haplotipo con el riesgo de NSCLC..... | 88 |
| Tabla 13. Influencia de las características clínicas y del polimorfismo del gen VDR BmsI (rs1544410) en el riesgo de NSCLC..... | 89 |
| Tabla 14. Clasificación de los 194 pacientes con NSCLC según las características clínico-patológicas..... | 91 |
| Tabla 15. Características clínicas y asociación con la supervivencia global de los 194 pacientes con NSCLC..... | 92 |
| Tabla 16. Características clínicas y asociación con la supervivencia libre de progresión de los 194 pacientes con NSCLC..... | 95 |
| Tabla 17. Características clínicas y asociación con la supervivencia global de los pacientes con NSCLC resecado..... | 98 |
| Tabla 18. Características clínicas y asociación con la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC resecado..... | 99 |
| Tabla 19. Características clínicas y asociación con la supervivencia global de los pacientes con NSCLC no resecado..... | 100 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 20. Características clínicas y asociación con la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC no resecado..... | 102 |
| Tabla 21. Frecuencias de los alelos menores de los SNP..... | 104 |
| Tabla 22. Equilibrio de Hardy-Weinberg (SG)..... | 105 |
| Tabla 23. Equilibrio de Hardy-Weinberg (SLP)..... | 106 |
| Tabla 24. Desequilibrio de ligamiento..... | 107 |
| Tabla 25. Polimorfismos y asociación con la supervivencia global de los 194 pacientes con NSCLC..... | 108 |
| Tabla 26. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia global de 194 pacientes con NSCLC..... | 109 |
| Tabla 27. Polimorfismos y asociación con la supervivencia libre de progresión de los 194 pacientes con NSCLC..... | 110 |
| Tabla 28. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia libre de progresión de 194 pacientes con NSCLC..... | 111 |
| Tabla 29. Polimorfismos y asociación con la supervivencia global de los pacientes con NSCLC resecado..... | 113 |
| Tabla 30. Influencia de las características clínicas y los polimorfismos genéticos en la supervivencia global de los pacientes con NSCLC resecado..... | 114 |
| Tabla 31. Polimorfismos y asociación con la supervivencia global de los pacientes con NSCLC no resecado..... | 116 |
| Tabla 32. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia global de pacientes con NSCLC no resecado..... | 119 |
| Tabla 33. Polimorfismos y asociación con la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC resecado..... | 120 |
| Tabla 34. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC resecado..... | 122 |
| Tabla 35. Polimorfismos y asociación con la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC no resecado..... | 124 |
| Tabla 36. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia libre de progresión de pacientes con NSCLC no resecado..... | 128 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribución de casos y muertes por los 10 cánceres más comunes en 2020 para ambos sexos. Tomado de GLOBOCAN 2020 (1)..... | 39 |
| Figura 2. Histología del cáncer de pulmón Los cánceres de pulmón se clasifican en SCLC o NSCLC (A), que se subdividen en histología escamosa y no escamosa (B). NSCLC = cáncer de pulmón no microcítico. SCLC =cáncer de pulmón microcítico (23)..... | 45 |
| Figura 3. (C) Las frecuencias de mutaciones oncogénicas comunes en NSCLC. Basado en una cohorte de 4.064 pacientes con NSCLC metastásico de Singal y colaboradores. NSCLC = cáncer de pulmón no microcítico (23)..... | 46 |
| Figura 4. Ruta metabólica de la vitamina D..... | 55 |
| Figura 5. Desequilibrio de ligamento..... | 84 |
| Figura 6. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el género en 194 pacientes con NSCLC..... | 93 |
| Figura 7. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según hábito enólico en 194 pacientes con NSCLC..... | 93 |
| Figura 8. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el estadio tumoral en 194 pacientes con NSCLC..... | 94 |
| Figura 9. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según la primera línea de tratamiento (dividido por cirugía) en 194 pacientes con NSCLC..... | 94 |
| Figura 10. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión según la enfermedad pulmonar anterior en 194 pacientes con NSCLC..... | 96 |
| Figura 11. Curva Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según el hábito enólico en 194 pacientes con NSCLC | 96 |
| Figura 12. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión según el estadio tumoral en 194 pacientes con NSCLC..... | 97 |
| Figura 13. Curva Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según la primera línea de tratamiento (dividido por cirugía) en 194 pacientes con NSCLC..... | 97 |
| Figura 14. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según los antecedentes familiares de cáncer en el subgrupo NSCLC resecado..... | 99 |

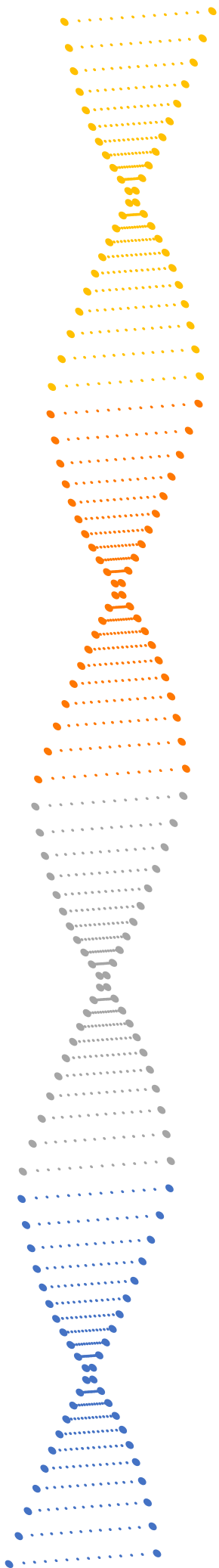
| | |
|--|-----|
| Figura 15. Curva Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según el estadio tumoral en el subgrupo NSCLC resecado..... | 100 |
| Figura 16. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el género en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 101 |
| Figura 17. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el hábito enólico en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 101 |
| Figura 18. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el estadio tumoral en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 102 |
| Figura 19. Curva Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según el índice de masa corporal en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 103 |
| Figura 20. Desequilibrio de ligamento..... | 107 |
| Figura 21. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo A del polimorfismo genético <i>CYP27B1</i> rs4646536 en 194 pacientes con NSCLC..... | 109 |
| Figura 22. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión según el alelo A del polimorfismo genético <i>CYP27B1</i> rs4646536 en 194 pacientes con NSCLC..... | 111 |
| Figura 23. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo T del polimorfismo genético <i>GC</i> rs7041 en el subgrupo NSCLC resecado..... | 112 |
| Figura 24. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo G del polimorfismo genético <i>VDR</i> (Cdx-2; rs11568820) en el subgrupo NSCLC resecado..... | 114 |
| Figura 25. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo C del polimorfismo genético <i>CYP24A1</i> rs6068816 en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 117 |
| Figura 26. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo G del polimorfismo genético <i>VDR</i> (Bsml; rs1544410) en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 117 |
| Figura 27. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo C del polimorfismo genético <i>VDR</i> (Apal; rs7975232) en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 118 |
| Figura 28. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo T del polimorfismo genético <i>VDR</i> (TaqI; rs731236) en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 118 |
| Figura 29. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo G del polimorfismo genético <i>VDR</i> (Cdx-2; rs11568820) en el subgrupo NSCLC resecado..... | 121 |
| Figura 30. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo T del polimorfismo genético <i>GC</i> rs7041 en el subgrupo NSCLC resecado..... | 121 |

| | |
|---|-----|
| Figura 31. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo A del polimorfismo genético <i>CYP27B1</i> rs4646536 en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 125 |
| Figura 32. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo G del polimorfismo genético <i>CYP27B1</i> rs3782130 en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 125 |
| Figura 33. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo G del polimorfismo genético <i>CYP27B1</i> rs10877012 en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 126 |
| Figura 34. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo C del polimorfismo genético <i>CYP24A1</i> rs6068816 en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 126 |
| Figura 35. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo C del polimorfismo genético <i>VDR</i> (ApaI; rs7975232) en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 127 |
| Figura 36. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo T del polimorfismo genético <i>VDR</i> (TaqI; rs731236) en el subgrupo NSCLC no resecado..... | 127 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| ALFA | Allele Frequency Aggregator |
| ALK | Quinasa del linfoma anaplásico |
| BRAF | B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase |
| Chr | Cromosoma |
| CPCP | Cáncer de pulmón de células pequeñas |
| CYP24A1 | Citocromo P450 Familia 24 Subfamilia A Miembro 1 |
| CYP27B1 | Citocromo P450 Familia 27 Subfamilia B Miembro 1 |
| CYP2R1 | Citocromo P450 Familia 2 Subfamilia R Miembro 1 |
| D' | Lewontin's D prime |
| EBUS-FNA | Aspiración endoscópica con aguja fina guiada por ultrasonido |
| EBUS-TBNA | Aspiración endobronquial con aguja transbronquial guiada por ultrasonido |
| EGFR | Receptor del factor de crecimiento epidérmico |
| EML4 | Echinoderm microtubule associated protein-like 4 |
| EPOC | Enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| FEV1 | Volumen Espiratorio Forzado en un Segundo |
| GC | Group-Specific Component (Vitamin D Binding Protein); Componente específico del grupo (proteína de unión a la vitamina D) |
| HER2 | Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico |
| HR | Hazard ratio |
| HWE | Equilibrio de Hardy-Weinberg |
| IASLC | Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón |
| IC | Intervalo de confianza |
| IMC | Índice de masa corporal |
| KRAS | Kirsten rat sarcoma virus |
| LD | Desequilibrio de ligamiento |
| MAF | Frecuencias de alelo menor |

| | |
|----------------------|---|
| MST | Media de tiempo de supervivencia |
| NA | Not available (No disponible) |
| NCCN | National Comprehensive Cancer Network |
| NR | Not reached (No alcanzado) |
| NR | Receptores nucleares |
| NSCLC | Non-Small Cell Lung Cancer; Cáncer de pulmón de células no pequeñas |
| OR | Odds ratio |
| OS | Overall survival |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PFS | Progression-free survival |
| p25 | Percentil 25 |
| p50 | Percentil 50 |
| p75 | Percentil 75 |
| R² | Coefficiente de desequilibrio de ligamiento |
| RET | Ret Proto-Oncogene |
| ROS1 | Proto-oncogene tyrosine-protein kinase |
| RXR | Receptor retinoide X |
| SCLC | Small Cell Lung Cancer; cáncer de pulmón de células pequeñas |
| sd | Desviación estándar |
| SDU | Unidades de bebida estándar |
| SG | Supervivencia global |
| SLP | Supervivencia libre de progresión |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |
| TKI | Inhibidores de la tirosina cinasa |
| TNM | Clasificación TNM (Tumores-ganglios y Metástasis) |
| VDBP | Vitamin D Binding Protein (Proteína de unión a la vitamina D) |
| VDR | Vitamin D Receptor (gene) |
| VDR | Vitamin D Receptor (proteína) |
| VDRE | Elementos de respuesta VDR |
| UVB | Radiación ultravioleta B |



INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer de pulmón

1.1.1 Prevalencia, incidencia y mortalidad del Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una de las neoplasias más severas y con mayor mortalidad a nivel mundial (18%) (Figura 1) (1). Además, se caracteriza por presentar una mayor incidencia en hombres (14.3%), y ser el tercero en el caso de las mujeres (8.4%), tras el cáncer de mama y el colorrectal. Comparando ambos sexos, es el segundo con mayor incidencia tras el cáncer de mama (11.4%) (1). Se estima que para el año 2040, la incidencia del cáncer de pulmón aumente un 22.4% en Europa, mientras que el aumento de la mortalidad será de un 25.5% (2). Según las últimas estadísticas de cáncer, se espera que ocurran más de 236,740 nuevos casos y 139,603 muertes en los Estados Unidos en 2022 (3).

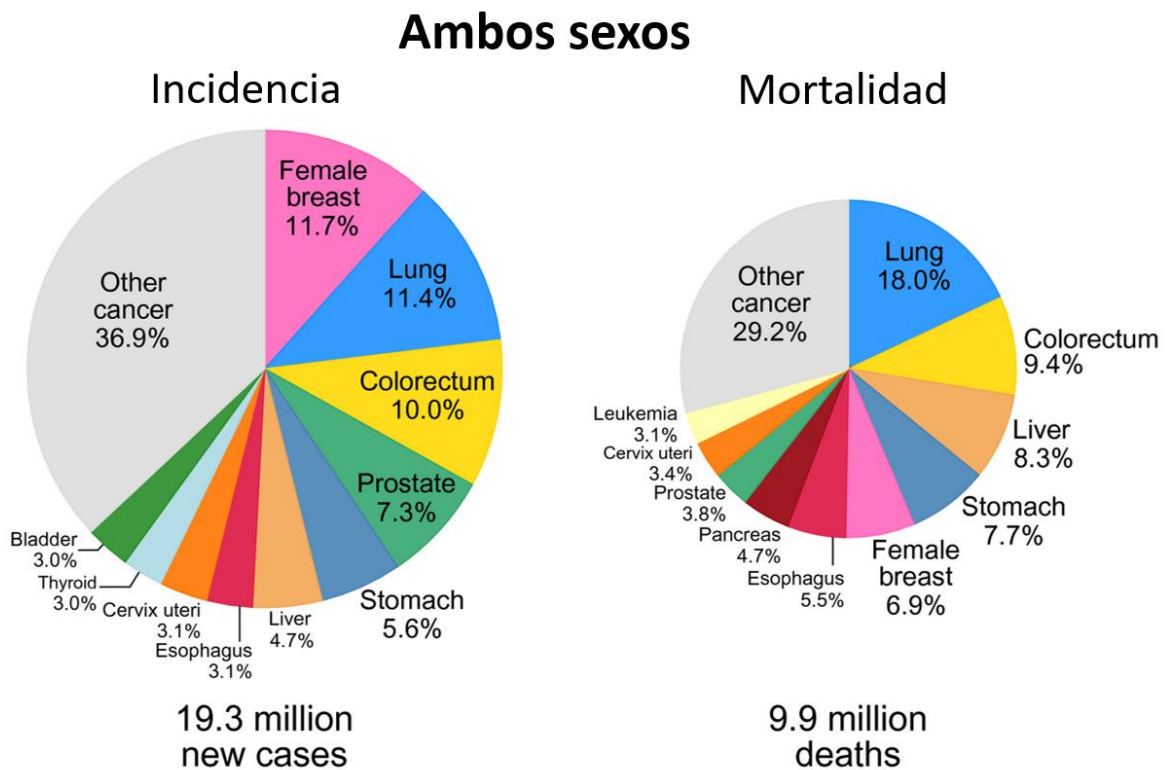


Figura 1. Distribución de casos y muertes por los 10 cánceres más comunes en 2020 para ambos sexos. Tomado de GLOBOCAN 2020 (1).

1.2 Factores de riesgo

La edad avanzada es el principal factor de riesgo para la mayoría de los cánceres.

Otros factores de riesgo para el cáncer de pulmón incluyen:

- Fumar: los fumadores tienen 10 veces más riesgo de desarrollar cáncer de pulmón que los no fumadores, y esta probabilidad aumenta con la cantidad de cigarrillos, la duración del tabaquismo y la edad de inicio (4). Aunque se deje de fumar, los exfumadores continúan teniendo un riesgo elevado de cáncer de pulmón durante años (4). Una causa de cáncer de pulmón en los no fumadores es el tabaquismo pasivo. Varios estudios han reportado un riesgo significativamente mayor entre las personas expuestas al humo pasivo (5).
- Exposición ocupacional al asbesto, arsénico, cromo, berilio, níquel (6).
- Vivir en un área con contaminación del aire (7-9).
- Exposición al gas radón: el radón es un gas radiactivo producido por la descomposición natural del uranio en el suelo, las rocas y el agua. Este gas se encuentra en el aire atmosférico a baja concentración y puede acumularse en cualquier edificio, incluidos los hogares (10). Sin embargo, la exposición al radón doméstico depende de cómo se construyen y ventilan las casas. Además, como factor de riesgo laboral, es especialmente importante para los mineros porque suelen estar expuestos a altas concentraciones de este gas.
- Alcohol: el consumo de alcohol de al menos 30 g/día aumenta el riesgo de cáncer de pulmón (11).
- Dieta: las frutas y verduras aportan una gran cantidad de vitaminas y otros micronutrientes como los carotenoides. Varios estudios han reportado el beneficio de estas sustancias porque disminuyen el riesgo de cáncer, pero el consumo excesivo puede ser dañino (12, 13).

- Antecedentes familiares de cáncer: las personas con un padre, hermano o hijo con cáncer de pulmón tienen un mayor riesgo de la enfermedad (14).
- Otras enfermedades: los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática tienen un riesgo de cáncer de pulmón 14 veces mayor. Del mismo modo, en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el riesgo de cáncer de pulmón aumenta 4 veces (15, 16).
- Mutaciones somáticas y bajos niveles séricos de la vitamina D (17, 18).

1.3 Signos y síntomas

El cáncer de pulmón puede presentarse con síntomas o encontrarse incidentalmente en las imágenes de tórax. Los síntomas y signos pueden resultar de la ubicación de la invasión local primaria o compresión de estructuras torácicas adyacentes, metástasis a distancia o fenómenos paraneoplásicos (19). Los síntomas no específicos pueden incluir pérdida de apetito, pérdida de peso y fatiga, mientras que los síntomas específicos son los siguientes:

- Síntomas respiratorios: tos, tos con sangre, sibilancias o dificultad para respirar.
- Síntomas sistémicos: pérdida de peso, debilidad, fiebre o decoloración de las uñas.
- Síntomas debidos a la presión de la masa cancerosa sobre las estructuras adyacentes: dolor torácico, dolor óseo, obstrucción de la vena cava superior o dificultad para tragar.

En el momento del diagnóstico, la mayoría de los pacientes tienen enfermedad metastásica y los síntomas incluyen defectos neurológicos o cambios de personalidad por metástasis cerebrales o dolor por metástasis óseas (19). Los sitios más comunes de metástasis para el cáncer de pulmón son el otro pulmón, las

glándulas suprarrenales, los huesos, el cerebro, el hígado, el pericardio y los riñones (19).

1.4 Diagnóstico

Los procedimientos que se usan para determinar la presencia de cáncer son los siguientes (19):

- **Examen clínico:** aunque el diagnóstico de cáncer de pulmón puede no basarse en los hallazgos del examen clínico respiratorio, este examen siempre debe formar parte de los estudios diagnósticos de un paciente si se informan síntomas respiratorios o se detectan hallazgos anormales en las pruebas radiológicas. El examen clínico respiratorio incluye inspección, palpación, percusión y auscultación torácica. La auscultación pulmonar debe interpretarse cuidadosamente, ponerse en contexto con el historial clínico y otros hallazgos clínicos del paciente. El examen clínico debe incluir la palpación física de los grupos de ganglios linfáticos superficiales del cuello, así como los ubicados por encima de la clavícula (supraclavicular).
- **Prueba de imagen:** las pruebas radiológicas son cruciales para confirmar un diagnóstico de cáncer de pulmón y definir su extensión. Incluyen:
 - Radiografía de tórax: generalmente se toma como primera prueba para estudios diagnósticos de un paciente.
 - Tomografía computarizada (TC) de tórax y abdomen superior: prueba radiológica necesaria para la correcta estadificación del NSCLC. Esta técnica permite una evaluación precisa de la extensión del tumor.
 - Tomografía computarizada cerebral: es necesario excluir la presencia de metástasis en el cerebro.
 - Tomografía por emisión de positrones (PET): prueba de imagen de medicina nuclear que permite examinar la morfología y la actividad metabólica del tumor.

- Gammagrafía ósea: es una prueba de imagen de medicina nuclear que se realiza para verificar si el cáncer de pulmón ha hecho metástasis a los huesos.
- **Examen histopatológico:** consiste en el análisis de laboratorio de las células obtenidas de una muestra de tejido tumoral (biopsia). Las técnicas más comunes utilizadas para obtener biopsias tumorales son las siguientes:
 - Broncoscopia: técnica utilizada para visualizar el interior de las vías respiratorias con un instrumento insertado a través de la boca o la nariz. Permite examinar las vías respiratorias del paciente para detectar anomalías.
 - Biopsia pulmonar con aguja guiada por tomografía computarizada: esta técnica se utiliza cuando se considera que la broncoscopia no es útil para obtener una biopsia. Se inserta una aguja en el tórax utilizando la guía de tomografía computarizada.
 - Aspiración endobronquial con aguja transbronquial guiada por ultrasonido (EBUS-TBNA): es una técnica que permite confirmar la invasión de los ganglios linfáticos regionales. Se utiliza un tubo de ultrasonido para identificar cualquier ganglio sospechoso que pueda estar cerca de las vías respiratorias. El tubo también contiene una aguja muy fina. Esta aguja se utiliza para tomar muestras de tejido corporal empujando a través del bronquio hasta el tejido del otro lado.
 - Aspiración endoscópica con aguja fina guiada por ultrasonido (EBUS-FNA): es similar a la EBUS; Esta técnica es útil para conocer la invasión de los ganglios linfáticos regionales. A diferencia de EBUS, el instrumento es insertado por el esófago.
 - Mediastinoscopia: es un procedimiento invasivo que permite visualizar el mediastino con un laparoscopio insertado a través de una incisión de aproximadamente 1 cm por encima de la unión del esternón a la clavícula.

- Biopsia de lesiones metastásicas: si la enfermedad se ha diseminado a otras partes del cuerpo, se puede obtener una biopsia de la lesión metastásica.
- **Examen citológico:** a diferencia del examen histopatológico, que se realiza en una muestra de tejido tumoral, el examen citológico es el examen de laboratorio de las células cancerosas separadas espontáneamente del tumor. Los principales métodos para la exploración citológica son los siguientes:
 - Broncoscopia: durante la broncoscopia se suelen realizar lavados bronquiales y recogida de secreciones para comprobar la presencia de células cancerosas.
 - Toracocentesis/drenaje pleural: estas técnicas permiten la aspiración de líquidos de la cavidad pleural en caso de derrame pleural.
 - Pericardiocentesis/drenaje pericárdico: estas técnicas permiten aspirar líquido de la cavidad pericárdica en caso de derrame pericárdico.

1.5 Clasificación del cáncer de pulmón

Los tipos más importantes de cáncer de pulmón son el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, del inglés Small Cell Lung Cancer) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, del inglés Non-Small Cell Lung Cancer). El NSCLC representa aproximadamente el 80-85% de todos los casos de cáncer de pulmón. El NSCLC se divide en diferentes subtipos: carcinoma de células escamosas, carcinoma de células no escamosas (adenocarcinoma) y otros (carcinoma de células grandes) (Figura 2). De acuerdo con el American Joint Committee on Cancer [AJCC], la mayoría de los pacientes se catalogan como estadio avanzado (IIIB-IV) en el momento del diagnóstico (20-22).

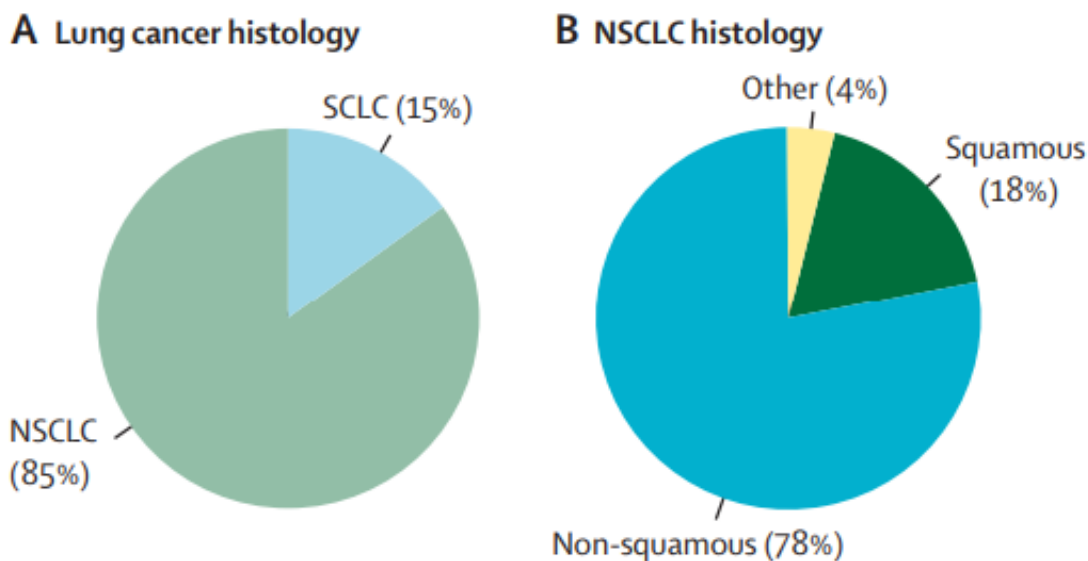


Figura 2. Histología del cáncer de pulmón Los cánceres de pulmón se clasifican en SCLC o NSCLC (A), que se subdividen en histología escamosa y no escamosa (B). NSCLC = cáncer de pulmón no microcítico. SCLC =cáncer de pulmón microcítico. Tomado de Lung Cancer, 2019 (23).

1.6 Mutaciones oncogénicas en NSCLC

El manejo del cáncer de pulmón avanzado se anclaba en la quimioterapia y se basaba en la histología. Sin embargo, durante la última década, el descubrimiento de biomarcadores predictivos ha creado nuevas oportunidades terapéuticas con terapia dirigida e inmunoterapia (Figura 3) (23).

Las alteraciones genéticas más comunes en el adenocarcinoma de pulmón son las mutaciones activadoras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y KRAS (24). Las inserciones y deleciones de EGFR se encuentran en aproximadamente el 15 % de los adenocarcinomas de pulmón en los EE.UU., con mayor frecuencia en no fumadores (43 % frente al 11 % en fumadores) (25) y asiáticos (hasta el 60 % en mujeres asiáticas) (26). En estadios avanzados de la enfermedad, esta mutación predice un pronóstico y una sensibilidad más favorables a los inhibidores de la tirosina cinasa (TKI) del EGFR, como erlotinib, gefitinib y afatinib (27). Por el contrario, las mutaciones de KRAS ocurren con mayor frecuencia en fumadores y parecen conferir un peor pronóstico (25). Si bien actualmente no hay terapias dirigidas disponibles para esta mutación, se

están realizando ensayos clínicos para probar medicamentos que se dirijan a los efectores aguas abajo de KRAS activado (27). Las mutaciones impulsoras adicionales en el adenocarcinoma de pulmón ocurren con una frecuencia de <1 a 4%, incluidos los reordenamientos del gen ALK, las translocaciones de ROS1, las mutaciones de HER2, las mutaciones de BRAF y las translocaciones de RET. Sin embargo, el reordenamiento de ALK es clínicamente importante, ya que esta mutación crea un producto de fusión, más frecuentemente con EML4, que predice la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa de ALK, como crizotinib y ceritinib (27). Además, los tumores positivos para ALK se han asociado con patrones histológicos acinares o sólidos con características de anillo de sello (28, 29).

C Oncogenic mutations in NSCLC

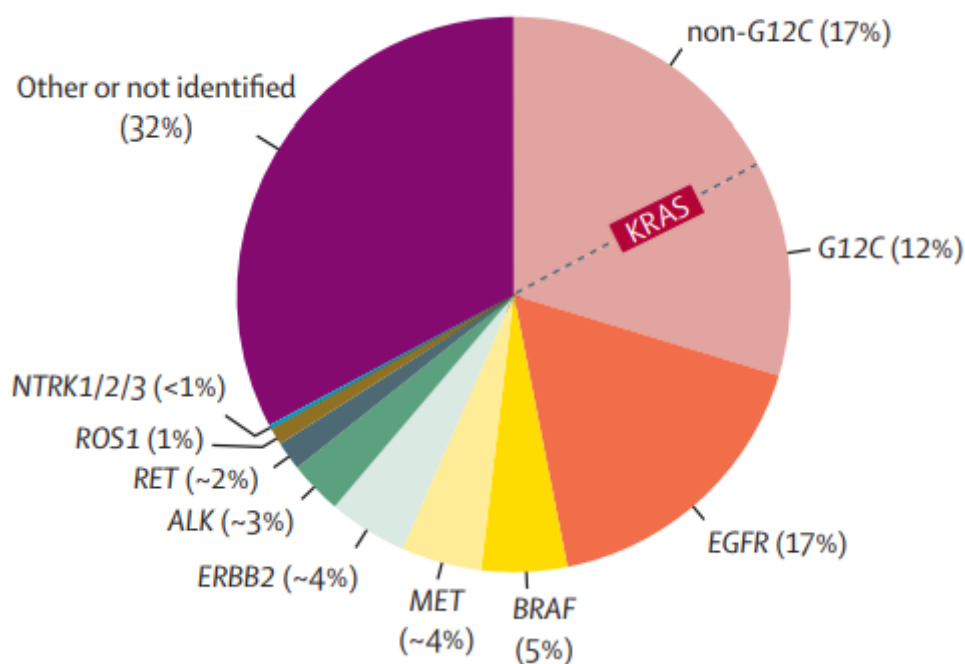


Figura 3. (C) Las frecuencias de mutaciones oncogénicas comunes en NSCLC. Basado en una cohorte de 4.064 pacientes con NSCLC metastásico de Singal y colaboradores. NSCLC = cáncer de pulmón no microcítico. Tomado de Lung Cancer, 2019 (23).

1.7 Estadificación del cáncer de pulmón de células no pequeñas

La clasificación internacional o sistema de estadificación internacional utilizado en NSCLC es desarrollado y mantenido por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC, por sus siglas en inglés), siendo la última versión la 8ª

edición que se publicó en 2016. Los descriptores de la clasificación TNM (Tumores-ganglios y Metástasis) utilizada internacionalmente, incluyen el tamaño y el grado de invasión regional por el tumor primario (T), la extensión de la afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis intratorácicas o a distancia (M) (30). El objetivo de dicho sistema de clasificación es ayudar a los médicos a planificar el tratamiento, determinar el pronóstico, evaluar los resultados del tratamiento y facilitar el intercambio de información entre múltiples centros. El esquema general para la clasificación TNM está a continuación y la Tabla 1 muestra los grupos de estadificación TNM (30).

T: tumor primario

Tx: El tumor primario no se puede evaluar o probar el tumor por la presencia de células malignas en el esputo o lavados bronquiales, pero no se visualiza mediante imágenes o broncoscopia.

T0: Sin evidencia de tumor primario

Tis: Carcinoma in situ

T1: Tumor ≤ 3 cm en su mayor dimensión rodeado por pulmón o pleura visceral sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar (es decir, no en el bronquio principal)

T1a: Adenocarcinoma mínimamente invasivo

T1a: Tumor ≤ 1 cm en su mayor dimensión

T1b: Tumor > 1 cm, pero ≤ 2 cm en su mayor dimensión

T1c: Tumor > 2 cm, pero ≤ 3 cm en su mayor dimensión

T2: Tumor > 3 cm, pero ≤ 5 cm o tumor con cualquiera de las siguientes características:

- Afecta al bronquio principal independientemente de la distancia a la Carina, pero sin afectación de la Carina
- Invade la pleura visceral

- Asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar, involucrando parte o todo el pulmón

T2a: Tumor >3 cm, pero ≤4 cm en su mayor dimensión

T2b: Tumor >4 cm, pero ≤5 cm en su mayor dimensión

T3: Tumor >5 cm, pero ≤7 cm en su mayor dimensión o asociado con nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en el mismo lóbulo que el tumor primario o invade directamente cualquiera de las siguientes estructuras: pared torácica (incluidos los tumores de la pleura parietal y del surco superior), nervio frénico, pericardio parietal

T4: Tumor >7 cm en su mayor dimensión o asociado con nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en un lóbulo ipsilateral diferente al del tumor primario o que invade cualquiera de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral y Carina.

N: compromiso de los ganglios linfáticos regionales

Nx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales

N0: Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales

N1: Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales peribronquiales y/o hiliares ipsilaterales y ganglios intrapulmonares, incluida la afectación por extensión directa

N2: Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mediastínico(s) ipsilateral(es) y/o subcarinal(es)

N3: Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mediastínico(s) contralateral(es), hiliar(es) contralateral(es), escaleno(s) ipsilateral o contralateral o supraclavicular(es)

M: metástasis a distancia

M0: Sin metástasis a distancia

M1: Metástasis a distancia presente

M1a: Nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en un lóbulo contralateral; tumor con nódulo(s) pleural o pericárdico o derrame pleural o pericárdico maligno

M1b: Metástasis extratorácica única

M1c: Múltiples metástasis extratorácicas en uno o más órganos

Tabla 1. Agrupaciones de estadios propuestas para la octava edición de la clasificación TNM para el cáncer de pulmón (30).

| Estadio anatómico | | | |
|--------------------------|-------------|-------------|-----|
| Carcinoma oculto | TX | N0 | M0 |
| <i>Estadio 0</i> | Tis | N0 | M0 |
| <i>Estadio IA1</i> | T1a | N0 | M0 |
| | T1a | N0 | M0 |
| <i>Estadio IA2</i> | T1b | N0 | M0 |
| <i>Estadio IA3</i> | T1c | N0 | M0 |
| <i>Estadio IB</i> | T2a | N0 | M0 |
| <i>Estadio IIA</i> | T2b | N0 | M0 |
| <i>Estadio IIB</i> | T1a–c | N1 | M0 |
| | T2a | N1 | M0 |
| | T2b | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| <i>Estadio IIIA</i> | T1a–c | N2 | M0 |
| | T2a–b | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T4 | N0 | M0 |
| | T4 | N1 | M0 |
| <i>Estadio IIIB</i> | T1a–c | N3 | M0 |
| | T2a–b | N3 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| | T4 | N2 | M0 |
| <i>Estadio IIIC</i> | T3 | N3 | M0 |
| | T4 | N3 | M0 |
| <i>Estadio IVA</i> | Cualquier T | Cualquier N | M1a |
| | Cualquier T | Cualquier N | M1b |
| <i>Estadio IVB</i> | Cualquier T | Cualquier N | M1c |

TNM, tumor, ganglio, metástasis; Tis, carcinoma in situ; T1a(mi) adenocarcinoma mínimamente invasivo.

1.8 Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas

En general, el tratamiento del NSCLC incluye varias opciones: cirugía, quimioterapia, radioterapia y terapia dirigida. La selección de la terapia dependerá de la etapa de la enfermedad y ciertas características de los pacientes, como la edad o el estado general. El tratamiento no solo se centra en el tumor primario de pulmón; También se dirige a las metástasis que pueden aparecer en otra parte del cuerpo.

1.8.1 Tumores resecables

Según la guía National Comprehensive Cancer Network (NCCN) versión 4.2016, el tratamiento estándar para el NSCLC resecable en etapa temprana (I-III A) es la cirugía. En este punto, es fundamental determinar qué método de resección se recomienda en cada caso, determinando los riesgos individuales de cada paciente. Si el volumen espiratorio en un segundo (FEV1, Volumen Espiratorio Forzado en un Segundo) es superior al 80% y no hay evidencia de disnea, el paciente es candidato a resección incluyendo neumonectomía. Antes de usar la intervención de tratamiento radical, los pacientes con enfermedad localmente avanzada generalmente se tratan con quimioterapia basada en platino para reducir el tamaño o la extensión del cáncer, lo que facilita el procedimiento y el éxito de la cirugía (quimioterapia neoadyuvante). Después de la cirugía, los pacientes con alto riesgo de recurrencia se tratan con quimioterapia basada en platino para maximizar la efectividad de la cirugía (quimioterapia adyuvante). Los pacientes con NSCLC en etapa temprana irresecable son candidatos para quimioterapia y/o radioterapia basadas en platino (31).

1.8.2 Tumores irresecables

La quimioterapia basada en platino sigue siendo el tratamiento de elección para el NSCLC en estadio avanzado (IIIB-IV) (31). En esta etapa el tratamiento es paliativo, no curativo; Se utiliza para aliviar los síntomas, mejorando la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes. El cisplatino y el carboplatino son los principales fármacos de platino utilizados en el NSCLC. Estos compuestos interfieren con el ADN, generando aductos que inducen a las células a morir de forma programada.

Por lo general, se administran en combinación con medicamentos de tercera generación, que son los siguientes (31):

- Taxanos (paclitaxel/docetaxel) y alcaloides de la vinca (vinorelbina): el principal mecanismo de acción de estos fármacos es la alteración de la función de los microtúbulos (32). Los microtúbulos son esenciales para la división celular, por lo que la inhibición de estas estructuras resulta en la muerte celular (32).
- Pemetrexed: este medicamento es químicamente similar al ácido fólico y pertenece a la clase de medicamentos de quimioterapia llamados agentes antifolato. Este compuesto actúa inhibiendo la formación de nucleótidos precursores de purina y pirimidina (33). Por lo tanto, pemetrexed previene la formación de ADN y ARN, que son necesarios para el crecimiento y la supervivencia tanto de las células normales como de las células cancerosas (33).
- Gemcitabina: es una pirimidina análoga cuyo mecanismo fundamental de acción es la inhibición de la síntesis de ADN (34).

No se han encontrado diferencias significativas en ninguna de las combinaciones (35, 36). En la práctica clínica, el carboplatino es una alternativa al cisplatino cuando existe una contraindicación.

Los pacientes selectivos con NSCLC avanzado pueden beneficiarse de la terapia dirigida (31). Los pacientes con mutaciones en EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) son tratados con un inhibidor de la tirosina cinasa EGFR, como gefitinib, erlotinib o afatinib. Del mismo modo, los pacientes que albergan translocaciones en *ALK* (quinasa de linfoma anaplásico) son tratados con crizotinib, un inhibidor de *ALK*. En segunda línea, estos pacientes son tratados con quimioterapia basada en platino.

1.9 Pronóstico del NSCLC

La supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón a los 5 años después del diagnóstico es del 10% al 20% en la mayoría de los países (1), incluso después de la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia (37). Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores pronósticos que mejoren la supervivencia en este tipo de pacientes (38). El principal factor que influye en el pronóstico de la enfermedad es el estadio tumoral inicial (30, 39, 40). Sin embargo, estudios en pacientes diagnosticados con el mismo estadio han mostrado una variabilidad en la supervivencia, lo que sugiere que otros factores pueden influir en el pronóstico del NSCLC (41-44). Es de destacar, que alteraciones genéticas como son los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) pueden ser la causa de esta variabilidad interindividual en la supervivencia de pacientes con NSCLC (38, 45-47).

1.10 Funciones biológicas de la vitamina D

La vitamina D (prohormona seco-esteroide) destaca por sus diversas funciones biológicas que implican, entre otras, la supresión de la metástasis al inhibir la progresión tumoral, la proliferación celular y la angiogénesis, o al promover la apoptosis en las células cancerosas (38, 48-51). Específicamente en el cáncer de pulmón, se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo*, donde, se ha descrito que la 1,25-D₃ inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer de pulmón y afecta la regulación del ciclo celular en modelos de carcinoma de células escamosas (52-54). En modelos de ratón, la 1,25-D₃ demostró que inhibe el crecimiento de tumores pulmonares y las metástasis (55, 56). Además, estudios observacionales han encontrado que la mortalidad por cáncer de pulmón es más baja durante los meses de otoño y verano, épocas del año que se asocian con los niveles más altos de vitamina D (57, 58). Los niveles bajos de vitamina D se han asociado con el riesgo, el desarrollo y el crecimiento de cáncer sólido y no sólido (51).

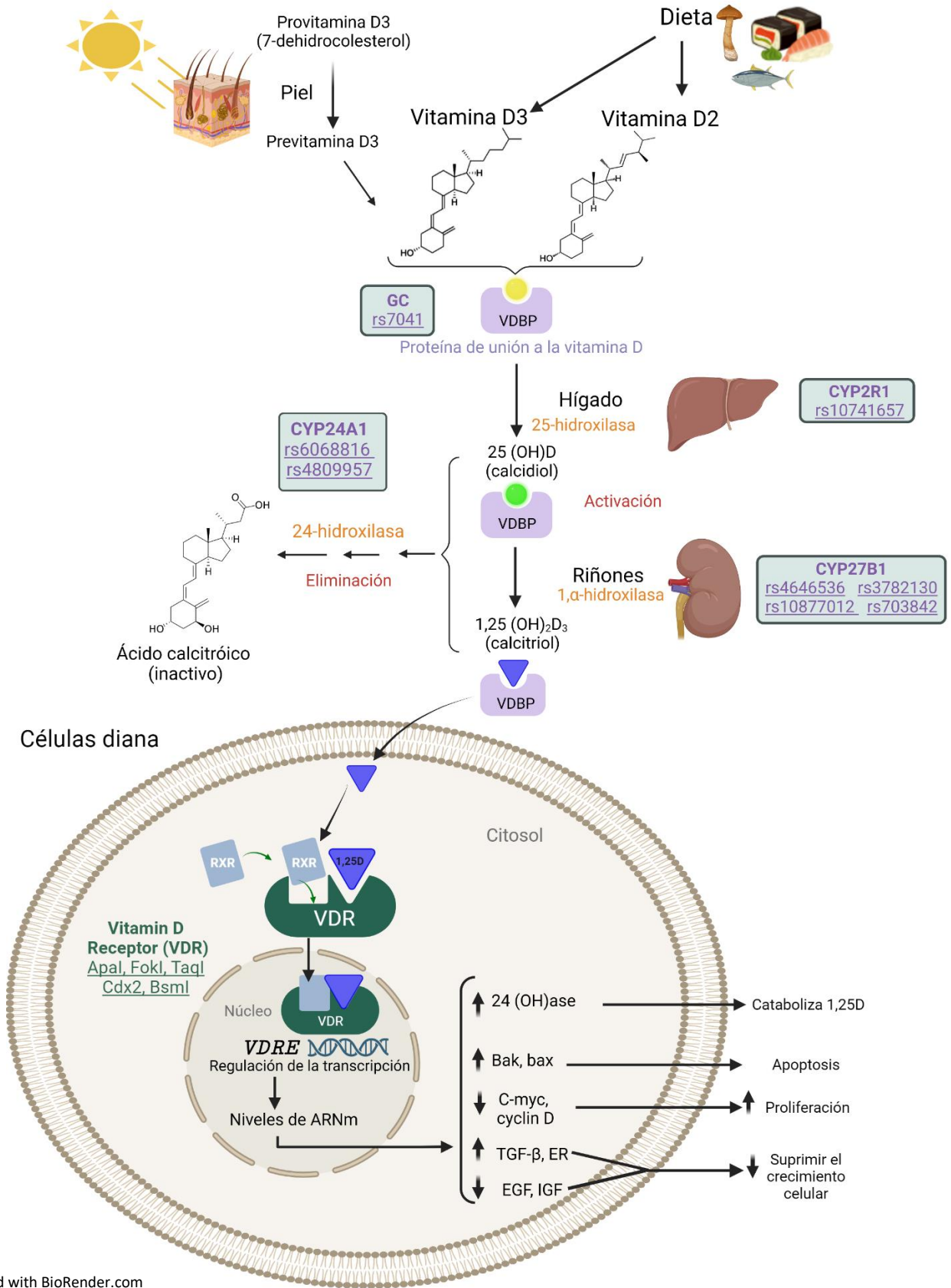
1.11 Ruta metabólica de la vitamina D

La vitamina D posee dos isoformas fundamentales: La vitamina D₂ (ergocalciferol) y vitamina D₃ (colecalfiferol), ambas moléculas son liposolubles e inactivas. Se generan de forma endógena después de la exposición solar y por ingesta directa a través de la dieta o suplementos (58-60). Las dos isoformas de la vitamina D (D₂ y D₃) se unen a la proteína de unión a la vitamina D (*VDBP*), también conocida como componente específico de grupo (GC), codificada por un gen del mismo nombre (*GC*), lo cual facilita su transporte (60-62). Posteriormente, ambas formas se metabolizan en el hígado a 25-hidroxitamina D (63) por medio de 25-hidroxilazas o *CYP2R1* (codificada por el gen *CYP2R1*), siendo ésta su principal forma circulante en suero, de manera que los niveles séricos de vitamina D consisten en la determinación de calcidiol (60, 61, 64); a continuación, 1 α -hidroxilasa o *CYP27B1* (codificada por el gen *CYP27B1*) la convierte en 1,25-dihidroxitamina D (calcitriol) ya sea en el riñón (donde se libera en la circulación) o en órganos diana específicos, convirtiéndola en su forma biológicamente activa (48, 58-61). En los tejidos diana, calcitriol interactúa con el receptor de vitamina D (*VDR*) y se une al receptor retinoide X (*RXR*), formando un complejo heterodímero (*VDR-RXR*) que es translocado al núcleo uniéndose a los elementos de respuesta *VDR* (*VDRE*) en múltiples loci genómicos, algunos de los cuales poseen propiedades anticancerígenas (48, 61, 65). Se considera que las células con una alta expresión de *VDR* son sensibles a la actividad antiproliferativa de 1,25D₃ (66)). Finalmente, el calcitriol y calcidiol circulante son degradados a nivel mitocondrial por 24-hidroxilasa (*CYP24A1*) a ácido calcitroico y otros productos hidrosolubles que son inactivos y se excretan en la bilis u orina, evitando así su acumulación (58, 60, 61, 65) (Figura 5).

Los *VDRE* permiten la expresión de multitud de genes, los cuales se relacionan con procesos clave en el inicio y desarrollo del cáncer. Por lo que cabría pensar que bajos niveles séricos de calcidiol o la disfuncionalidad de la vitamina pueden favorecer la carcinogénesis, debido a la presencia de polimorfismos de nucleótido único o SNPs en aquellos genes que participan en el metabolismo de la vitamina D (*GC* o *VDBP*, *VDR*, *CYP2R1*, *CYP27B1* y *CYP24A1*) (67-69).

1.12 Implicaciones genéticas

Los genes que codifican para las enzimas que participan en el metabolismo de la vitamina D (*GC* o *VDBP*, *CYP2R1*, *CYP27B1*, *CYP24A1* y *VDR*) se caracterizan por ser altamente polimórficos (63, 70)). Polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en estos genes, pueden alterar tanto la funcionalidad de las enzimas sintetizadas, así como la expresión de cada gen, y por tanto desempeñar un papel fundamental en el inicio, progresión y pronóstico del NSCLC (47, 59, 65, 71-73). La influencia de polimorfismos en estos genes sobre el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón ha sido previamente evaluada, principalmente en población asiática (58, 61, 74-85)). Sin embargo, los estudios son escasos, por lo que se resalta la necesidad de realizar más investigación para evaluar la influencia de estos polimorfismos en el riesgo a padecer NSCLC en diferentes poblaciones. Asimismo, hasta la fecha ningún estudio ha evaluado el efecto conjunto de los SNPs en *VDR*, *GC*, *CYP2R1*, *CYP27B1* y *CYP24A1* y el riesgo y la supervivencia de NSCLC.



Created with BioRender.com

Figura 4. Ruta metabólica de la vitamina D.

1.13 Genes involucrados en la ruta metabólica de la vitamina D

Los principales genes implicados en la ruta metabólica de la vitamina D son *VDR*, *CYP27B1*, *CYP24A1*, *GC* y *CYP2R1*. Se destacan las características de cada gen y sus principales polimorfismos de nucleótido único en la tabla 2.

1.13.1 VDR: Receptor de vitamina D (Vitamin D receptor)

El gen VDR (también denominado NR111) está ubicado en el cromosoma 12 en la región 12q13.11. Es un factor de transcripción dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (NR) (86-89). Los polimorfismos de nucleótido único en este gen han sido ampliamente estudiados. Siendo BmsI (rs1544410), TaqI (rs731236), Apal (rs7975232), FokI (2228570) y Cdx-2 (11568820) aquellos que han demostrado más relevancia.

Su principal influencia se debe, por un lado, a que las enzimas activadoras de la vitamina D y el VDR están presentes en muchos tejidos, incluyendo el del pulmón (71, 87, 90, 91). A su vez, se estima que VDR y su ligando regulan el 1-3% de toda la expresión génica (92, 93). Incluyendo los genes que están involucrados en el metabolismo del calcio, el crecimiento celular, la antiproliferación, la diferenciación, la apoptosis y las respuestas inmunitarias adaptativas/innatas (86-88, 94). Por otro lado, se ha reportado que el aumento de la expresión de VDR en cáncer de pulmón se asocia con una mejor supervivencia (73, 95). Esto puede relacionarse con un estado proliferativo más bajo y la detención en fase G1 de células tumorales que expresan alto VDR (73, 95).

Tabla 2. Características de los genes y SNPs implicados en la ruta metabólica de la vitamina D

| Gen | dbSNP ID | Posición | Alelos | Frecuencia (ALFA) |
|----------------------|--------------------|-------------|--------|------------------------------|
| VDR (12q13.11) | rs1544410 (BsmI) | Intron 8 | C > T | T=0.388066 (85636/220674) |
| | rs11568820 (Cdx-2) | Intron 1 | G > A | A=0.28140 (14569/51774) |
| | rs2228570 (FokI) | Exon 2 | C > T | T=0.388743 (91849/236272) |
| | rs7975232 (ApaI) | Intron 8 | C > A | C=0.44552 (17435/39134) |
| | rs731236 (TaqI) | Exon 9 | A > G | G=0.387180 (74890/193424) |
| CYP27B1 (12q14.1) | rs4646536 | Intron 6 | A > G | G=0.32704 (27483/84036) |
| | rs3782130 | Promotor 5' | G > C | C=0.18262 (2560/14018) |
| | rs10877012 | 5'UTR | G > T | T=0.292364 (46918/160478) |
| | rs703842 | 3'UTR | T > C | C=0.326395 (80258/245892) |
| CYP24A1 (20q13.2) | rs6068816 | Exon 6 | C > T | T=0.108153 (33297/307870) |
| | rs4809957 | 3'UTR | A > G | G=0.232972 (62226/267096) |
| GC (4q13.3) | rs7041 | Exon 11 | T > G | T = 0.457674 (154076/336650) |
| CYP2R1 (11p15.2) | rs10741657 | 5'UTR | A > G | A=0.379194 (73776/194560) |

SNP: Single Nucleotide polymorphisms (Polimorfismo de nucleótido único); ALFA: Allele Frequency Aggregator (Agregador de frecuencias alélicas) (97).

1.13.2 CYP27B1: Citocromo P450 Familia 27 Subfamilia B Miembro 1

El gen *CYP27B1* codifica la 1-alfa-hidroxilasa, única enzima capaz de convertir la vitamina D en su forma activa (48, 98). El gen está ubicado en 12q14.1 en el brazo largo del cromosoma 12 (48, 98). Los principales SNPs asociados en los estudios previos en cáncer de pulmón son rs10877012, rs4646536, rs3782130 y rs703842.

Hasta la fecha, la información reportada en la literatura científica es escasa con respecto a la asociación de estos SNPs y la supervivencia en cáncer. La investigación se ha enfocado en determinar la influencia de los polimorfismos en la expresión genética. Por otro lado, se ha evidenciado que la expresión genética de *CYP24A1*, *CYP27B1* y *VDR*, en

el cáncer de pulmón se ve afectada por la diferenciación y caracterización tumoral. Cuando el tumor está pobremente diferenciado, hay mayor expresión de *CYP24A1* y disminución de la expresión de *CYP27B1* (65, 71).

1.13.3 *CYP24A1*: Citocromo P450 Familia 24 Subfamilia A Miembro 1

El metabolismo de la vitamina D esta catalizado por la enzima 24-hidroxilasa, quien se encarga de realizar una serie de hidroxilaciones para convertir el calcitriol en ácido calcitroico, una molécula con mayor polaridad para favorecer su eliminación por vía renal (37, 65, 99, 100). La 24-hidroxilasa viene codificada por el gen *CYP24A1*, ubicado en el cromosoma 20, específicamente en la región 20q13.2 (65, 71).

Recientemente se ha estudiado el efecto de los polimorfismos rs6068816 y rs4809957 en el gen *CYP24A1* y el riesgo de NSCLC (58, 61, 83-85). Adicionalmente, existen estudios que relacionan un aumento en la expresión del *CYP24A1* con un peor pronóstico, ya que se ha observado que cuando el tumor está pobremente diferenciado, hay mayor expresión del gen (65, 71). A pesar de que no es clara la información acerca de la influencia de SNPs en la expresión tumoral, se sabe que polimorfismos sinónimos como el rs6068816, el cual no altera la secuencia de aminoácidos de *CYP24A1*, puede influir en el empalme de intrones. Lo que conlleva a una afectación de los patrones o la eficiencia del empalme del ARNm, lo que a su vez tiene un impacto en las actividades biológicas (61, 101). Esta actividad puede relacionarse con la anulación de los efectos antiproliferativos del calcitriol con el aumento de la expresión de *CYP24A1* en el tejido tumoral pulmonar (100).

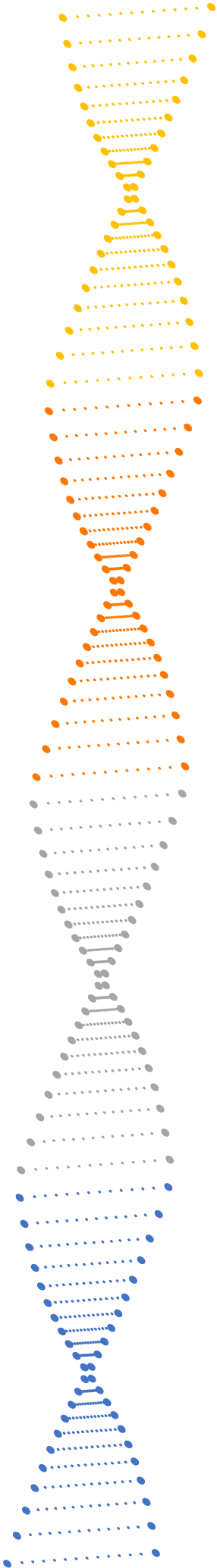
1.13.4 *GC*: Componente específico del grupo (Proteína de unión a la vitamina D)

El gen *GC*, localizado en la región 4q13.3 del cromosoma 4. Pertenece a la superfamilia de albúmina de proteínas de unión (albúmina, alfa-fetoproteína, alfa-albúmina/afamina) (62, 102, 103). Este gen se caracteriza por sintetizar la proteína de

unión a la vitamina D (VDBP), encargada del transporte en sangre de los metabolitos de la vitamina D hasta las dianas de acción (62, 102, 103). Concretamente en el pulmón tiene funciones inmunomoduladoras, relacionadas con la activación de macrófagos y la quimiotaxis de neutrófilos (102)). El polimorfismo rs7041 se encuentra en el exón 11 del dominio III del gen *GC*. Existe una evidencia limitada acerca de la influencia del polimorfismo *GC* rs7041 en la supervivencia en cáncer. Los estudios disponibles se han enfocado en la expresión genética y los niveles circulantes de la VDBP. Un estudio previo reveló que los niveles bajos de VDBP en suero predijeron la muerte específica por cáncer de pulmón, ya que la VDBP se expresó pobremente en las células del tejido tumoral (104). Por otro lado, en otro estudio encontraron que, en pacientes con patologías crónicas, el genotipo *GC* rs7041-TT se asociaba con niveles más altos de 25(OH)D (105).

1.13.5 *CYP2R1*: Citocromo P450 Familia 2 Subfamilia R Miembro 1

La 25-hidroxilasa o *CYP2R1* es codificada por el gen con el mismo nombre (*CYP2R1*), localizado en el cromosoma 11, en la región 11p15.2 (64, 96, 106). Esta enzima se encarga de sintetizar el calcidiol 25(OH)D, a partir de sus precursores ergocalciferol (vitamina D₂) y el colecalciferol (vitamina D₃) (64, 96, 106). Estudios previos han reportado que los bajos niveles séricos de vitamina D aumentaban la mortalidad por cáncer y la mortalidad por todas las causas (90). A su vez, determinaron que los bajos niveles de vitamina D podrían deberse a polimorfismos en *CYP2R1* y *DHCR7*. En particular, los portadores del genotipo GG- rs10741657 se asociaron a niveles más bajos de 25-hidroxivitamina D (90). Otros autores han informado que la mutación de transición en el exón 2 del gen *CYP2R1*, conlleva a la sustitución de prolina leucina en el aminoácido 99 en la proteína *CYP2R1* y suprime la actividad enzimática de la vitamina D 25-hidroxilasa, lo que indica que la variación genética en este gen puede afectar la síntesis de 25(OH)D (96, 107-109).



HIPÓTESIS y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS

La prevalencia de polimorfismos en los genes *CYP27B1*, *CYP24A1*, *CYP2R1*, *GC* y *VDR* implicados en la ruta metabólica de la vitamina D, influyen en el riesgo y la supervivencia de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón no microcítico.

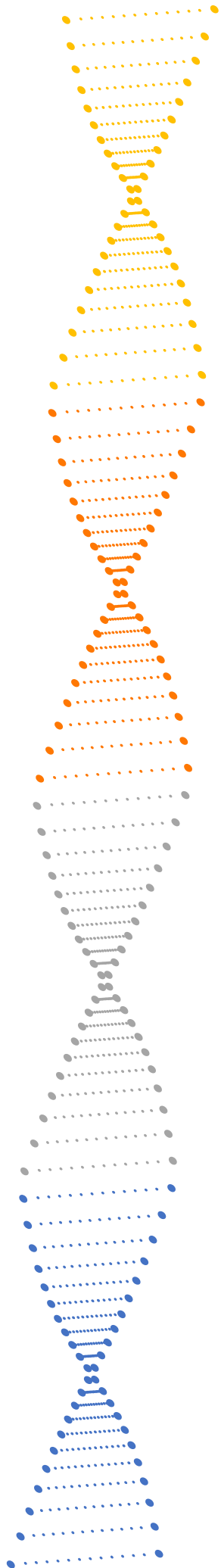
3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Evaluar la influencia de la prevalencia de SNPs en los genes *CYP27B1*, *CYP2R1*, *GC*, *CYP24A1* y *VDR* implicados en la ruta metabólica de la vitamina D y variables clínicas, como predictores de riesgo y supervivencia de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón no microcítico.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de los polimorfismos **rs10877012** (*CYP27B1*), **rs4646536** (*CYP27B1*), **rs703842** (*CYP27B1*), **rs3782130** (*CYP27B1*), **rs6068816** (*CYP24A1*), **rs4809957** (*CYP24A1*), **rs10741657** (*CYP2R1*), **rs7041** (*GC*) y *VDR BmsI* (*rs1544410*), *VDR TaqI* (*rs731236*), *VDR ApaI* (*rs7975232*), *VDR FokI* (*rs2228570*) y *VDR Cdx2* (*rs11568820*) implicados en la ruta metabólica de la vitamina D en casos y controles.
- Evaluar la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión en pacientes diagnosticados con NSCLC.
- Evaluar la influencia de variables clínicas y genéticas en la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión en pacientes con NSCLC.
- Evaluar la influencia de variables clínicas y genéticas en la susceptibilidad de desarrollar NSCLC.



MATERIAL Y MÉTODOS

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

Para el análisis de supervivencia se realizó un estudio observacional de cohortes retrospectivo y para el análisis de riesgo se llevó a cabo un estudio de casos y controles.

4.2 Declaración ética

Esta investigación se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki, bajo la aprobación del Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), código de aprobación 1322-N-20. (*Anexo 1*). Los sujetos participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado para la recogida y análisis genético de las muestras de saliva, y su donación al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, el cual ha avalado la investigación (*Anexo 2*).

4.3 Población y ámbito de estudio

Pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico.

4.4 Alcance geográfico y temporal

El estudio incluyó 204 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico y 408 controles, reclutados en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves entre 2003 y 2019.

4.5 Criterios de inclusión

- Pacientes caucásicos.
- Pacientes mayores de 18 años (casos) o mayores de 60 años (controles)
- Pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer de pulmón no microcítico, según los criterios de clasificación de la AJCC.
- Pacientes que contaban con muestra de sangre o saliva en el Biobanco público de Andalucía.

- Pacientes cuyo seguimiento clínico se haya realizado en el hospital universitario virgen de las nieves (HUVN).

4.6 Criterios de exclusión

- Neoplasia previa
- Historia clínica no disponible para realizar el seguimiento

4.7 Variables

4.7.1 Variables dependientes o de respuesta

- Desarrollo de NSCLC: variable cualitativa nominal (Sí/No).
- Supervivencia: Supervivencia global y supervivencia libre de progresión, con seguimiento hasta el fin del estudio.

a) Supervivencia global (SG). La supervivencia global se evaluó como el tiempo desde el diagnóstico del cáncer hasta el seguimiento final o la muerte.

b) Supervivencia libre de progresión (SLP). Se calculó como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la recaída, la muerte o el último seguimiento conocido.

Los datos relacionados con la mortalidad se obtuvieron de las historias clínicas y del Registro de Cáncer de base poblacional de Granada.

4.7.2 Variables independientes

4.7.2.1 Variables sociodemográficas

- Edad (a la fecha de diagnóstico): variable cuantitativa continua.
- Sexo: variable cualitativa nominal (femenino/masculino).
- Índice de masa corporal: variable cuantitativa continua.
- Antecedentes familiares de cáncer: variable cualitativa nominal (Si/No).
- Enfermedad pulmonar previa: Variable cualitativa nominal (Si/No).
- Hábito tabáquico: Variable cualitativa nominal (Fumador/Exfumador/No fumador).

Se considerarán no fumadores si han fumado menos de 10 cigarrillos en su vida. Los pacientes exfumadores también se considerarán fumadores si hace menos de 5 años que han dejado de fumar y fumaban más de 10 paquetes/año.

- Hábito enólico: Variable cualitativa nominal (Bebedor/Ex bebedor/No bebedor)

Los individuos fueron clasificados de acuerdo con las unidades de bebida estándar (SDU) como no bebedores si eran abstencionistas o no consumían alcohol regularmente, como bebedores activos si su consumo de alcohol > 4 SDU/día en hombres y > 2.5 SDU/día en mujeres, y como ex bebedores si su consumo de alcohol era > 4 unidades SDU/día en hombres y > 2.5 SDU/día en mujeres, pero no estaban bebiendo actualmente.

Estas variables se recogieron a partir de las historias clínicas de los pacientes, procedentes de los datos recogidos por el oncólogo.

4.7.2.2 Variables Histopatológicas

- Clasificación histológica: Variable cualitativa nominal (Adenocarcinoma/Carcinoma de células escamosas/Desconocido).
- Estadio del cáncer: Variable cualitativa nominal (Oculto/0/IA/IB/IIA/IIB/IIIA/IIIB/IV).
- Tratamiento de primera línea: Variable cualitativa nominal (Cirugía/ Quimio radioterapia/ Terapia dirigida).

Estos parámetros fueron recogidos a partir de las historias clínicas de los pacientes, procedentes de los datos recogidos por el oncólogo.

4.7.2.3 Variables genéticas

- **Estatus de los marcadores genéticos.** Variable cualitativa ordinal que toma los valores Homocigoto AA/Homocigoto aa/Heterocigoto Aa para cada polimorfismo genético.

Las variables genéticas fueron obtenidas a partir de los análisis de detección de SNPs realizados en la unidad de farmacogenética del servicio de farmacia del HUVN.

4.7.2.3.1 Extracción y purificación de ADN

Las muestras de saliva se recogieron en hisopos bucales (Kit OCR-100). La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de extracción *QIAamp DNA Mini (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania)*, siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante para la purificación de ADN a partir de saliva y se almacenó a -40°C . La concentración y la pureza del ADN se midieron con el espectrofotómetro de UV *NanoDrop 2000* mediante la relación de absorbancia a 260/280 y 260/230.

4.7.2.3.2 Análisis de polimorfismos genéticos mediante *Real Time PCR*

Se determinaron los polimorfismos génicos mediante ensayo de discriminación alélica por PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan® (ABI Applied Biosystems, QuantStudio 3 Real-Time PCR System, 96 pocillos), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 3). La PCR en tiempo real y se realizó en la Unidad de Farmacogenética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Los criterios para el control de calidad de los SNPs fueron: (1) tasa de genotipos faltantes por SNP $< 0,05$; (2) frecuencia de alelos menores $> 0,01$; (3) valor $p > 0,05$ en el test de equilibrio Hardy-Weinberg; (4) tasa de genotipos faltantes entre casos y control $< 0,05$.

Tabla 3. Polimorfismos genéticos y TaqMan® ID

| Gen | dbSNP ID | Assay ID |
|----------------------|--------------------|----------------|
| VDR (12q13.11) | rs1544410 (BsmI) | AN324M4 * |
| | rs11568820 (Cdx-2) | C__2880808_10 |
| | rs2228570 (FokI) | C__12060045_20 |
| | rs7975232 (ApaI) | C__28977635_10 |
| | rs731236 (TaqI) | C__2404008_10 |
| CYP27B1 (12q14.1) | rs4646536 | C__25623453_10 |
| | rs3782130 | ANGZRHH * |
| | rs10877012 | C__26237740_10 |
| CYP24A1 (20q13.2) | rs703842 | ANH6J3F * |
| | rs6068816 | C__25620091_20 |
| GC (4q13.3) | rs4809957 | C__3120981_20 |
| | rs7041 | C__3133594_30 |
| CYP2R1 (11p15.2) | rs10741657 | C__2958430_10 |

* Los polimorfismos se analizaron mediante ensayos personalizados de ThermoFisher Scientific.

La técnica y el análisis se llevaron a cabo en el Applied Biosystem StepOne Real Time PCR System (ABI Applied Biosystems, 7300 Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA). Las sondas TaqMan™ son reactivos fluorogénicos que utilizan la actividad 5' nucleasa de la *Taq* polimerasa del ADN, de tal forma, que son capaces de detectar un producto específico a medida que se acumula durante los distintos ciclos de la PCR. Los reactivos TaqMan™ contienen sondas con diferentes fluorocromos notificadores específicos para cada alelo en el extremo 5', y quencher no fluorescentes en el extremo 3'. El fluorocromo VIC se encuentra unido en el extremo 5' de la sonda del alelo 1, mientras que el fluorocromo FAM está unido al extremo 5' de la sonda del alelo 2. El quencher hace que se reduzca la fluorescencia que emite el fluorocromo, mientras que la sonda se encuentra intacta, mediante FRET (*Transferencia de energía de resonancia de Förster*). En el caso de que la sonda encuentre su diana de actuación, hibrida de manera

específica con su secuencia complementaria situada entre el cebador directo y el reverso, y se rompe debido a la actividad 5' nucleasa de la enzima *AmpliTaq Gold DNA polimerasa*, durante el proceso de extensión del ADN. Esto hace que se separe el fluorocromo notificador del quencher, aumentando la señal de fluorescencia del fluorocromo correspondiente. Asimismo, se produce la separación de la sonda de la cadena diana, permitiendo la extensión del cebador hasta el final de la cadena molde. En cada ciclo se separan más moléculas de fluorocromo notificador de sus respectivas sondas, por lo que se va produciendo un aumento progresivo de la intensidad de fluorescencia, proporcional a la cantidad de amplicón producido. En función del genotipo que tengamos en el ADN, emitirá fluorescencia el fluorocromo VIC (alelo 1), el fluorocromo FAM (alelo 2), o ambos (heterocigosidad).

Las condiciones utilizadas para llevar a cabo la reacción de PCR fueron las siguientes: se inició el proceso con la desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, a continuación, se aplicaron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y anillado/extensión a 60°C durante 60 segundos.

4.7.2.3.3 Análisis de polimorfismos genéticos mediante Secuenciación

El 10% de los polimorfismos genéticos se determinaron mediante PCR y secuenciación directa, en la unidad de Farmacogenética y el laboratorio de análisis clínico del HUVN. Los productos de PCR se purificaron utilizando el ilustra Exostar Kit para PCR enzimática y Limpieza de secuenciación (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, EE.UU.).

La reacción de secuenciación se realizó utilizando 1 µl de reactivo de secuenciación cíclica Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), 2 µl del producto de PCR purificado y 119 nM del cebador de PCR inversa. A continuación, los productos de secuenciación se purificaron mediante precipitación con etanol y se analizaron en un analizador genético ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Las características de los ensayos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características de cada SNP y la metodología usada para la secuenciación.

| | dbSNP ID | Primers | |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| | | Forward | Reverse |
| VDR (12q13.11) | rs1544410 (BsmI) | CGGGGAGTATGAAGGACAAA | CTCTGCTCTTGCGTGAAGCTG |
| | rs11568820 (Cdx-2) | AAAGGAAGGAAGGCAGGAAG | AAGACCCCTTGTTTTGCTTT |
| | rs2228570 (FokI) | AGGGCGAATCATGTATGAGG | TGACCCTGGAGACTTTGACC |
| | rs7975232 (ApaI) | TCGGCTAGCTTCTGGATCAT | CTATGACTGCTGACCGGTGA |
| | rs731236 (TaqI) | CTGCCGTTGAGTGTCTGTGT | ATGATCCAGAAGCTAGCCGA |
| CYP27B1 (12q14.1) | rs4646536 | CTAAGGTGAGGGGGAAGGAG | GGAAATTCTCGTGTCCCAGA |
| | rs3782130 | CCAACACTTTGGGAGGCTAA | CAACAGAGAGAGGGCCTGTC |
| | rs10877012 | CTTGAGAGGCTGAGGTGGAT | TCATTCCCCACTGCAACTCT |
| | rs703842 | ATTTCCCAGCCATCTTCCGA | TAAAGAAGGTGGGGAGCTGC |
| CYP24A1 (20q13.2) | rs6068816 | GTTCTGGCTGGTTGTGAAGG | ACATTCTAAACCGCAGCACC |
| | rs4809957 | GGCCTGAAACGGTTTGTAAC | TAGAATGCCTTGATCCCAG |
| GC (4q13.3) | rs7041 | TCAGACTGGCAGAGCGACTA | GTAACCCTCCACTTAACATGGC |
| CYP2R1 (11p15.2) | rs10741657 | GGGAAGAGCAATGACATGGA | TTACCACCAATCTGATGGCTT |

4.8 Análisis estadístico

4.8.1 Análisis descriptivo:

Los datos cuantitativos se expresaron como media \pm desviación estándar (sd) para las variables con distribución normal y medianas o percentiles (25 y 75) para las variables con distribución no normal. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks para verificar la normalidad. Las variables cualitativas se expresaron como número de observaciones y el porcentaje de observaciones en cada categoría.

4.8.2 Análisis de Riesgo

Los casos y los controles se emparejaron por edad y sexo con el método de emparejamiento por puntuación de propensión 1:2 (110).

La asociación bivariante entre el riesgo de NSCLC y los polimorfismos se evaluó para múltiples modelos (genotípico, aditivo, alélico, dominante y recesivo), utilizando el chi-cuadrado de Pearson y la prueba exacta de Fisher, y se evaluó mediante odds ratio y sus correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95%. Los modelos se definieron de la siguiente manera: genotípico (DD vs Dd vs dd), alélico (D vs d), dominante ((DD, Dd) vs dd), recesivo (DD vs (Dd, dd)) y aditivo (dd=0, Dd=1, DD=2), siendo D el alelo menor y d el alelo mayor. La corrección de Bonferroni se utilizó para comparaciones múltiples. Se consideraron modelos de regresión logística múltiple incondicional (genotípica, dominante y recesiva) para determinar la influencia de posibles variables de confusión sobre el riesgo a padecer cáncer de pulmón.

Todas las pruebas fueron bilaterales con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y se estimaron utilizando los softwares PLINK y R 4.0.2 (111, 112)).

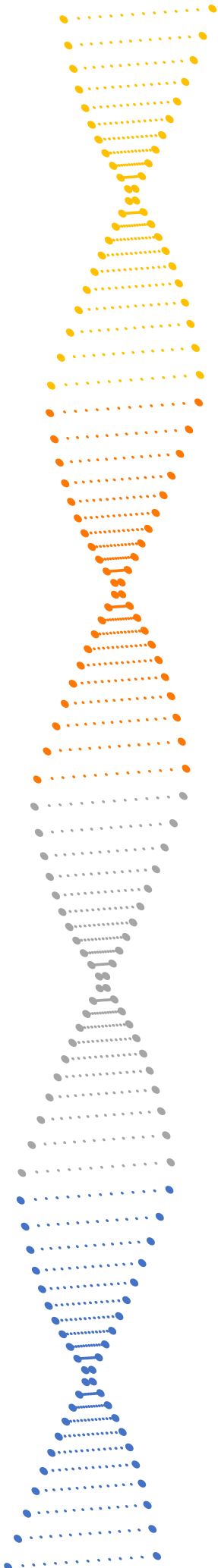
4.8.3 Análisis de Supervivencia

Se utilizó el método de Kaplan-Meier y la prueba de log-rank para analizar las asociaciones entre la supervivencia con las variables demográficas, clínicas y genéticas. Para el análisis multivariante se utilizó el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox (método por pasos hacia atrás) para obtener la razón de riesgos ajustada (HR) y el intervalo de confianza del 95% (IC95%) para los posibles factores pronósticos de supervivencia.

Todas las pruebas fueron bilaterales con un nivel de significancia de $p < 0.05$. El análisis de datos se realizó utilizando el software R 4.0.2 (111).

4.8.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamento y frecuencias de haplotipos

Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), las frecuencias de haplotipos y el desequilibrio de ligamiento a través de los coeficientes Lewontin's D prime (D') y r^2 . El desequilibrio de ligamiento (LD) para cada polimorfismo se calculó a través del programa de análisis de asociación del genoma *PLINK*. El análisis de las frecuencias de haplotipos y su asociación con las respuestas analizadas en el estudio se desarrolló con los programas *HaploView* y *SNPstats*, aplicaciones web para el análisis de estudios de asociación (112-114).



RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Estudio de Riesgo

5.1.1 Características de los pacientes

Se incluyeron en el estudio un total de 204 casos de NSCLC y 408 controles, cuyas características clínico-patológicas se describen en la Tabla 5. El grupo de casos estuvo conformado por el 73.5% de hombres (150/204) y 25.6% de mujeres (54/204); La edad media al diagnóstico fue de 61.1 ± 10.72 años; el 47.9% eran fumadores (96/204); el 76.2% se catalogaron como no bebedores; el 50.5% no tuvieron antecedentes familiares de cáncer (103/204); el 65.7% no registró enfermedades pulmonares previas (103/204); en cuanto a las características propias de la enfermedad, el 63.1% de los casos tuvo adenocarcinoma y el 36.9% carcinoma de células escamosas (73/198); el 68.3% se catalogó en estadio IIIB-IV (138/202) y el 31.7% en estadios I, II o IIIA (64/202). El grupo control se conformó por el 68.4% de hombres (279/408) y 31.6% de mujeres; la mediana de edad fue de 64 [52,75] años; el 44.9% se catalogaron como no fumadores (178/396); el 60.0% se consideraron como no bebedores (251/396); el 93.6% no presentaron antecedentes familiares de cáncer (382/408) y el 65.2% no poseían enfermedades pulmonares previas (266/408).

Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles en cuanto al hábito tabáquico ($p < 0.001$; OR=8.88; CI_{95%}=5.42-14.9; Fumadores actuales vs No fumadores y $p < 0.001$; OR=3.43; CI_{95%}= 2.14-5.63; Exfumadores vs No fumadores) y antecedentes familiares de cáncer ($p < 0.001$; OR=15.2; CI_{95%}=9.55-25.2; Si vs No). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el género ($p = 0.1898$), la edad ($p = 0.1030$), estatus alcohólico ($p = 0.1392$) y enfermedad pulmonar previa ($p = 0.9044$) entre los dos grupos.

Tabla 5. Características clínico-patológicas de los casos y controles de NSCLC.

| | Casos | | Controles | | χ^2 | p-Valor | Ref. | OR | CI95% |
|--------------------------------|-------|-------------|-----------|------------|----------|----------|------------|------|-----------|
| | N | n (%) | N | n (%) | | | | | |
| Genero | 204 | | 408 | | | | | | |
| Femenino | | 54 (26.5) | | 129 (31.6) | 1.7189 | 0.1898 | | | |
| Masculino | | 150 (73.5) | | 279 (68.4) | | | | | |
| Edad | 204 | 61.1 ± 10.7 | 408 | 64 (52,75) | | 0.1030 * | | | |
| Hábito tabáquico | 204 | | 396 | | | | | | |
| Fumador | | 96 (47.96) | | 68 (17.2) | 81.179 | <0.001 | No fumador | 8.88 | 5.42–14.9 |
| Exfumador | | 81 (39.71) | | 150 (37.9) | | | | 3.43 | 2.14–5.63 |
| No fumador | | 27 (13.24) | | 178 (44.9) | | | | 1 | |
| Hábito enólico | 168 | | 369 | | | | | | |
| Bebedor | | 34 (20.24) | | 104 (28.2) | 3.9433 | 0.1392 | | | |
| Ex bebedor | | 6 (3.57) | | 14 (3.8) | | | | | |
| No bebedor | | 128 (76.2) | | 251 (60.0) | | | | | |
| Historia familiar de cáncer | 204 | | 408 | | | | | | |
| Si | | 101 (49.5) | | 26 (6.37) | 160.35 | <0.001 | No | 15.2 | 9.55–25.2 |
| No | | 103 (50.5) | | 382 (93.6) | | | | | |
| Enfermedad pulmonar previa | 204 | | 408 | | | | | | |
| Si | | 70 (34.3) | | 142 (34.8) | 0.0144 | 0.9044 | | | |
| No | | 134 (65.7) | | 266 (65.2) | | | | | |
| Histología | 198 | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | | 125 (63.1) | | | | | | | |
| Carcinoma de células escamosas | | 73 (36.87) | | | | | | | |
| Estadio tumoral | 202 | | | | | | | | |
| I, II o IIIA | | 64 (31.7) | | | | | | | |
| IIIB o IV | | 138 (68.3) | | | | | | | |

* Valor p para la prueba t; el sombreado significa que el valor es significativo. N significa el número total de pacientes considerados; n significa el número de pacientes en subgrupos.

5.1.2 Distribución del genotipo

Todas las frecuencias genotípicas observadas estaban de acuerdo con las esperadas según el modelo de equilibrio Hardy-Weinberg, con la única excepción de *VDR Bmsl* rs1544410 en el grupo control ($p=0.0459$) (Tabla 6). No se encontraron diferencias estadísticas con las descritas en población ibérica para esta variante (*VDR Bmsl* rs1544410 alelo A: 0.4383 vs. 0.4393; $p = 0.9989$) (115). Los valores de desequilibrio de ligamento LD' y r^2 se muestran en la Tabla 7. En particular, los pares *VDR* rs731236/rs7975232 ($r^2=0.545082$; $D'=0.959$), *VDR* rs731236/rs1544410 ($r^2=0.615164$; $D'=0.907$), *CYP27B1* rs4646536/rs3782130 ($r^2=0.850829$; $D'=0.933$), *CYP27B1* rs4646536/rs10877012 ($r^2=0.815743$; $D'=0.925$), *CYP27B1* rs3782130/rs10877012 ($r^2=0.783361$; $D'=0.901$), estaban en fuerte desequilibrio de ligamiento (Figura 5). Todos los polimorfismos mostraron frecuencias de alelo menor (MAF) superiores al 1% y

ninguno de ellos fue excluido del análisis (Tabla 8). La estimación de las frecuencias de haplotipos se presenta en la Tabla 9.

Tabla 6. Equilibrio de Hardy-Weinberg (Riesgo).

| Cromosoma | SNP | Muestra | Alelo Menor | Alelo Mayor | Genotipos contados | Heterocigosidad observados | Heterocigosidad esperados | p-valor |
|-----------|------------|---------|-------------|-------------|--------------------|----------------------------|---------------------------|---------|
| 4 | rs7041 | Todos | T | G | 120/304/183 | 0.5008 | 0.4946 | 0.8056 |
| 4 | rs7041 | Caso | T | G | 43/92/68 | 0.4532 | 0.4924 | 0.2565 |
| 4 | rs7041 | Control | T | G | 77/212/115 | 0.5248 | 0.4956 | 0.2697 |
| 11 | rs10741657 | Todos | A | G | 96/269/234 | 0.4491 | 0.4735 | 0.2267 |
| 11 | rs10741657 | Todos | A | G | 26/97/78 | 0.4826 | 0.4665 | 0.7621 |
| 11 | rs10741657 | Control | A | G | 70/172/156 | 0.4322 | 0.4767 | 0.07342 |
| 12 | rs731236 | Todos | C | T | 94/298/212 | 0.4934 | 0.4809 | 0.5543 |
| 12 | rs731236 | Caso | C | T | 21/110/72 | 0.5419 | 0.4684 | 0.03542 |
| 12 | rs731236 | Control | C | T | 73/188/140 | 0.4688 | 0.486 | 0.4734 |
| 12 | rs7975232 | Todos | C | A | 133/301/173 | 0.4959 | 0.4978 | 0.9351 |
| 12 | rs7975232 | Caso | C | A | 54/98/52 | 0.4804 | 0.5 | 0.5772 |
| 12 | rs7975232 | Control | C | A | 79/203/121 | 0.5037 | 0.4946 | 0.7628 |
| 12 | rs1544410 | Todos | A | G | 122/289/197 | 0.4753 | 0.4924 | 0.4102 |
| 12 | rs1544410 | Caso | A | G | 25/108/71 | 0.5294 | 0.4746 | 0.1393 |
| 12 | rs1544410 | Control | A | G | 97/181/126 | 0.448 | 0.4974 | 0.04586 |
| 12 | rs2228570 | Todos | T | C | 79/275/254 | 0.4523 | 0.4586 | 0.7242 |
| 12 | rs2228570 | Caso | T | C | 24/90/89 | 0.4433 | 0.4487 | 0.8761 |
| 12 | rs2228570 | Control | T | C | 55/185/165 | 0.4568 | 0.4631 | 0.83 |
| 12 | rs11568820 | Todos | A | G | 34/231/335 | 0.385 | 0.3742 | 0.5143 |
| 12 | rs11568820 | Caso | A | G | 11/73/120 | 0.3578 | 0.3573 | 1 |
| 12 | rs11568820 | Control | A | G | 23/158/215 | 0.399 | 0.3825 | 0.4326 |
| 12 | rs4646536 | Todos | G | A | 47/219/343 | 0.3596 | 0.3819 | 0.1671 |
| 12 | rs4646536 | Caso | G | A | 15/70/118 | 0.3448 | 0.3713 | 0.3434 |
| 12 | rs4646536 | Control | G | A | 32/149/225 | 0.367 | 0.387 | 0.3052 |
| 12 | rs3782130 | Todos | C | G | 43/218/341 | 0.3621 | 0.3775 | 0.3311 |
| 12 | rs3782130 | Caso | C | G | 13/69/120 | 0.3416 | 0.3597 | 0.4399 |
| 12 | rs3782130 | Control | C | G | 30/149/221 | 0.3725 | 0.386 | 0.5168 |
| 12 | rs10877012 | Todos | T | G | 45/221/338 | 0.3659 | 0.3823 | 0.2881 |
| 12 | rs10877012 | Caso | T | G | 13/70/120 | 0.3448 | 0.3611 | 0.5592 |
| 12 | rs10877012 | Control | T | G | 32/151/218 | 0.3766 | 0.3924 | 0.4448 |
| 12 | rs703842 | Todos | C | T | 42/215/344 | 0.3577 | 0.3737 | 0.3254 |
| 12 | rs703842 | Caso | C | T | 16/71/116 | 0.3498 | 0.3787 | 0.2694 |
| 12 | rs703842 | Control | C | T | 26/144/228 | 0.3618 | 0.3712 | 0.591 |
| 20 | rs4809957 | Todos | G | A | 26/213/359 | 0.3562 | 0.345 | 0.4779 |
| 20 | rs4809957 | Caso | G | A | 9/68/126 | 0.335 | 0.3339 | 1 |
| 20 | rs4809957 | Control | G | A | 17/145/233 | 0.3671 | 0.3505 | 0.3915 |
| 20 | rs6068816 | Todos | T | C | 10/119/477 | 0.1964 | 0.2031 | 0.4214 |
| 20 | rs6068816 | Caso | T | C | 7/44/152 | 0.2167 | 0.2449 | 0.1433 |
| 20 | rs6068816 | Control | T | C | 3/75/325 | 0.1861 | 0.1808 | 0.7832 |

Tabla 7. Desequilibrio de ligamento (Riesgo)

| Chr | BP | SNP | Chr | BP | SNP | R2 | D' |
|-----|----------|------------|-----|----------|------------|----------|-------|
| 12 | 47844974 | rs731236 | 12 | 47845054 | rs7975232 | 0.545082 | 0.959 |
| 12 | 47844974 | rs731236 | 12 | 47846052 | rs1544410 | 0.615164 | 0.907 |
| 12 | 47845054 | rs7975232 | 12 | 47846052 | rs1544410 | 0.445594 | 0.828 |
| 12 | 57764205 | rs4646536 | 12 | 57768115 | rs3782130 | 0.850829 | 0.933 |
| 12 | 57764205 | rs4646536 | 12 | 57768302 | rs10877012 | 0.815743 | 0.925 |
| 12 | 57764205 | rs4646536 | 12 | 57768956 | rs703842 | 0.729635 | 0.883 |
| 12 | 57768115 | rs3782130 | 12 | 57768302 | rs10877012 | 0.783361 | 0.901 |
| 12 | 57768115 | rs3782130 | 12 | 57768956 | rs703842 | 0.68475 | 0.844 |
| 12 | 57768302 | rs10877012 | 12 | 57768956 | rs703842 | 0.621515 | 0.827 |

Chr: Cromosoma; BP: Posición física (Pares de base)

Tabla 8. Frecuencias del alelo menor para los SNPs (Riesgo).

| Cromosoma | SNP | Alelo Menor | Alelo Mayor | MAF |
|-----------|------------|-------------|-------------|--------|
| 4 | rs7041 | T | G | 0.4481 |
| 11 | rs10741657 | A | G | 0.3848 |
| 12 | rs731236 | C | T | 0.4023 |
| 12 | rs7975232 | C | A | 0.4671 |
| 12 | rs1544410 | A | G | 0.4383 |
| 12 | rs2228570 | T | C | 0.3561 |
| 12 | rs11568820 | A | G | 0.2492 |
| 12 | rs4646536 | G | A | 0.257 |
| 12 | rs3782130 | C | G | 0.2525 |
| 12 | rs10877012 | T | G | 0.2575 |
| 12 | rs703842 | C | T | 0.2488 |
| 20 | rs4809957 | G | A | 0.2216 |
| 20 | rs6068816 | T | C | 0.1147 |

MAF: Minor allele frequency (Frecuencia del alelo menor)

Tabla 9. Estimaciones de frecuencia de haplotipos.

| | rs1544410 | rs7975232 | rs731236 | rs4646536 | rs703842 | rs3782130 | rs10877012 | Total | Grupo Casos | Grupo Control | Frecuencia acumulada |
|----|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|------------|--------|-------------|---------------|----------------------|
| 1 | G | C | T | A | T | G | G | 0.3294 | 0.4048 | 0.2895 | 0.3294 |
| 2 | A | A | C | A | T | G | G | 0.2379 | 0.2167 | 0.2455 | 0.5672 |
| 3 | A | A | C | G | C | C | T | 0.103 | 0.1386 | 0.0889 | 0.6702 |
| 4 | G | A | T | A | T | G | G | 0.0799 | 0.1006 | 0.0724 | 0.7501 |
| 5 | G | C | T | G | C | C | T | 0.0667 | 0.0757 | 0.0606 | 0.8168 |
| 6 | A | C | T | A | T | G | G | 0.0231 | NA | 0.0356 | 0.8399 |
| 7 | G | A | T | G | C | C | T | 0.0208 | 0.013 | 0.0217 | 0.8607 |
| 8 | A | A | T | A | T | G | G | 0.0145 | 0.0124 | 0.0155 | 0.8752 |
| 9 | G | A | C | A | T | G | G | 0.013 | 0.0025 | 0.0188 | 0.8883 |
| 10 | G | C | T | G | T | C | T | 0.0106 | NA | 0.0168 | 0.8989 |
| 11 | A | A | C | G | T | C | T | 0.0083 | 0.0025 | 0.0116 | 0.9072 |
| 12 | A | A | T | G | C | C | T | 0.0079 | NA | 0.0125 | 0.915 |
| 13 | G | C | T | A | C | G | G | 0.0075 | 0.0093 | 0.0072 | 0.9225 |
| 14 | A | A | C | A | C | G | G | 0.0071 | 0.0029 | 0.009 | 0.9297 |
| 15 | G | C | T | A | T | C | G | 0.0051 | NA | 0.0081 | 0.9348 |
| 16 | A | C | T | G | C | C | T | 0.0047 | NA | 0.007 | 0.9395 |
| 17 | A | A | C | G | C | C | G | 0.0042 | NA | 0.0058 | 0.9437 |
| 18 | A | A | C | G | T | G | T | 0.0038 | NA | 0.0057 | 0.9475 |
| 19 | G | C | T | G | C | G | G | 0.0037 | 0.0041 | 0.0037 | 0.9511 |
| 20 | G | C | T | A | T | G | T | 0.0034 | NA | 0.0052 | 0.9546 |
| 21 | A | A | C | A | T | G | T | 0.0033 | NA | 0.0051 | 0.9579 |
| 22 | A | A | C | A | C | C | T | 0.0033 | NA | 0.005 | 0.9612 |
| 23 | G | A | T | G | T | C | T | 0.0031 | 0.0025 | 0.0033 | 0.9644 |
| 24 | A | C | C | A | T | G | G | 0.0029 | 0.0036 | 0.0026 | 0.9672 |
| 25 | G | C | T | G | C | G | T | 0.0028 | NA | 0.0049 | 0.97 |
| 26 | A | A | C | A | T | C | G | 0.0026 | NA | 0.0037 | 0.9726 |
| 27 | G | A | C | G | C | C | T | 0.0024 | NA | 0.0041 | 0.975 |
| 28 | G | A | C | G | T | C | T | 0.0022 | NA | 0.0029 | 0.9772 |
| 29 | A | C | C | G | C | C | T | 0.0021 | 0.0048 | 4e-04 | 0.9793 |
| 30 | G | A | T | A | T | G | T | 0.0019 | NA | 0.0029 | 0.9811 |
| 31 | G | C | T | G | C | C | G | 0.0018 | NA | 0.0032 | 0.983 |
| 32 | G | A | T | A | C | G | G | 0.0017 | 2e-04 | 0.0023 | 0.9847 |
| 33 | A | A | C | G | T | C | G | 0.0017 | NA | 0.0025 | 0.9863 |
| 34 | A | A | T | A | T | G | T | 0.0016 | NA | 0.0025 | 0.9879 |
| 35 | G | A | T | G | C | C | G | 0.0015 | NA | 0.0022 | 0.9894 |
| 36 | A | A | C | G | C | G | G | 0.0012 | 0.0032 | NA | 0.9906 |
| 37 | G | C | C | A | T | G | G | 0.0011 | NA | 0.0016 | 0.9917 |
| 38 | G | A | C | G | C | G | T | 9e-04 | NA | 0.0014 | 0.9926 |
| 39 | A | C | C | G | C | G | G | 9e-04 | 0.0025 | NA | 0.9934 |
| 40 | A | A | C | G | T | G | G | 9e-04 | NA | 0.0013 | 0.9943 |
| 41 | A | A | T | A | T | C | G | 8e-04 | NA | 0.0012 | 0.9951 |
| 42 | A | A | T | G | C | G | G | 8e-04 | NA | 0.0012 | 0.9959 |

Tabla 9. Continuación.

| | rs1544410 | rs7975232 | rs731236 | rs4646536 | rs703842 | rs3782130 | rs10877012 | Total | Grupo Casos | Grupo Control | Frecuencia acumulada |
|----|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|------------|-------|-------------|---------------|----------------------|
| 43 | G | A | T | A | C | G | T | 8e-04 | NA | 0.0011 | 0.9967 |
| 44 | G | C | C | G | C | C | T | 7e-04 | NA | 0.0011 | 0.9975 |
| 45 | G | A | C | A | T | C | G | 7e-04 | NA | 8e-04 | 0.9981 |
| 46 | A | C | T | A | C | G | G | 7e-04 | NA | 9e-04 | 0.9988 |
| 47 | A | A | C | G | C | G | T | 5e-04 | NA | NA | 0.9993 |
| 48 | A | A | T | G | T | C | T | 4e-04 | NA | 0 | 0.9996 |
| 49 | A | A | T | A | C | G | G | 3e-04 | NA | 4e-04 | 0.9999 |
| 50 | A | C | T | G | T | C | T | 1e-04 | NA | NA | 1 |
| 51 | G | C | T | G | T | C | G | 0 | NA | 0 | 1 |
| 52 | G | C | T | A | C | C | T | 0 | NA | 0 | 1 |

* Haplotipos raros; NA: no disponible.

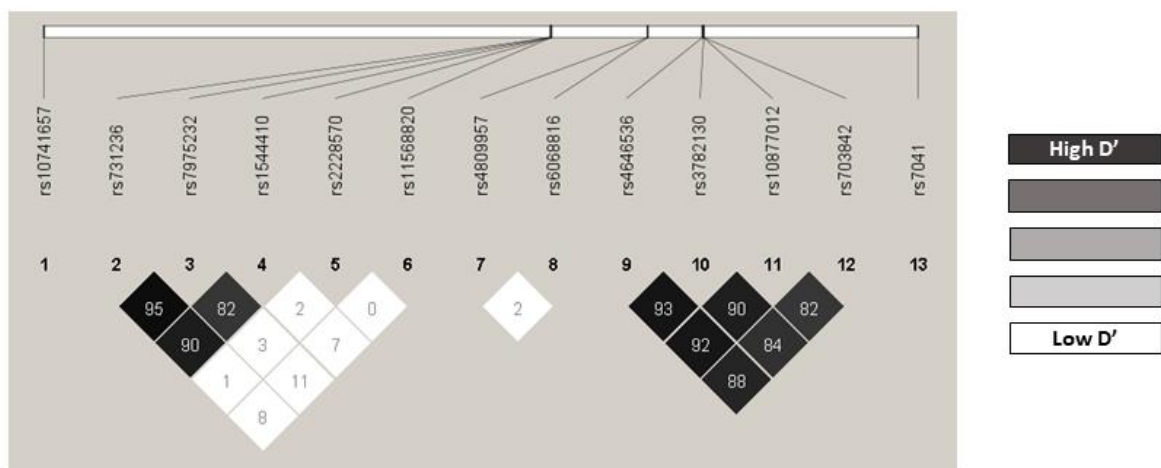


Figura 5. Desequilibrio de ligamento.

5.1.3 Influencia de los polimorfismos genéticos en el riesgo de NSCLC

Se emplearon los modelos genotípico, aditivo, alélico, dominante y recesivo para realizar el análisis bivariado entre los polimorfismos genéticos y el riesgo a padecer NSCLC (Tabla 10). Se observó una asociación estadísticamente significativa en los siguientes polimorfismos: *VDR BmsI* rs1544410, en los modelos genotípico ($p=0.0020$), aditivo ($p=0.0122$), alélico ($p=0.0121$) y recesivo ($p=0.0006$); *VDR TaqI* rs731236 en los modelos genotípico ($p=0.0299$) y recesivo ($p=0.0124$) y *CYP24A1* rs6068816 en los modelos genotípico ($p=0.0292$), aditivo ($p=0.0316$), alélico ($p=0.0353$) y recesivo ($p=0.0194$) (Tabla 10). Sin embargo, tras realizar la corrección por el método de

Bonferroni, el único polimorfismo que mantuvo la asociación estadísticamente significativa con respecto al riesgo a desarrollar NSCLC fue *VDR Bmsl* rs1544410 en el modelo genotípico y recesivo (Tabla 10). En el modelo genotípico, los pacientes portadores del genotipo *VDR Bmsl* rs1544410-AG presentaron mayor riesgo de NSCLC respecto a los portadores del genotipo GG ($p_{(\text{bonferroni-correctado})} = 0.0361$; OR=1.058; CI_{95%}= 0.72-1.54; AG vs GG), mientras que los portadores del genotipo *VDR Bmsl* rs1544410-AA presentaron menor riesgo de NSCLC respecto al genotipo GG ($p_{(\text{bonferroni-correctado})} = 0.0361$; OR=0.457; CI_{95%}= 0.26-0.76; AA vs GG). Asimismo, en el modelo recesivo, se observó que los pacientes portadores del genotipo *VDR Bmsl* rs1544410-AA mostraron un menor riesgo a padecer NSCLC respecto a los portadores del alelo G ($p_{(\text{bonferroni-correctado})} = 0.0082$; OR=0.442; CI_{95%}= 0.26-0.70; AA vs G) (Tabla 11). El modelo de regresión logística ajustado por el tabaquismo y antecedentes familiares de cáncer reveló que, en el modelo genotípico, los portadores del genotipo *VDR Bmsl* rs1544410-AA se asociaron con un menor riesgo de desarrollar NSCLC con respecto al genotipo GG ($p = 0.0377$; OR=0.51; CI_{95%}= 0.27- 0.95; AA vs GG). En el modelo recesivo, se mantuvo esta asociación, donde los pacientes portadores del genotipo AA presentaron menor riesgo a padecer NSCLC con respecto a los portadores del alelo G ($p = 0.0140$; OR=0.49; CI_{95%}= 0.27-0.85; AA vs G) (Tabla 13). El resto de los polimorfismos analizados no mostraron asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de NSCLC en ninguno de los modelos estudiados (Tabla 10). Se realizó el análisis de haplotipos teniendo en cuenta los polimorfismos que se encontraban en fuerte desequilibrio de ligamento (tabla 7). Se encontró que los haplotipos AACATGG y GACATGG, para los SNPs rs1544410, rs7975232, rs731236, rs4646536, rs703842, rs3782130, rs10877012, se asociaron con un menor riesgo de NSCLC ($p = 0.015$; OR=0.63; CI_{95%}=0.44-0.91) y ($p = 0.044$; OR=0.11; CI_{95%}=0.01-0.94), respectivamente (Tabla 12).

Tabla 10. Polimorfismos genéticos y asociación con el riesgo de NSCLC.

| SNP | Alelo Menor | Alelo Mayor | Modelo | Casos | Controles | χ^2 | p-valor χ^2 | p-valor Fisher | p-valor *Ajustado |
|------------|-------------|-------------|------------|-----------|------------|----------|------------------|----------------|-------------------|
| rs1544410 | A | G | Genotípico | 25/108/71 | 97/181/126 | 11.77 | 0.00278 | 0.002042 | 0.0361 |
| | | | Aditivo | 158/250 | 375/433 | 6.286 | 0.01217 | 0.01217 | 0.1582 |
| | | | Alélico | 158/250 | 375/433 | 6.504 | 0.01076 | 0.01206 | 0.1399 |
| | | | Dominante | 133/71 | 278/126 | 0.8091 | 0.3684 | 0.4089 | 1 |
| | | | Recesivo | 25/179 | 97/307 | 11.68 | 0.000632 | 0.0005676 | 0.0082 |
| rs11568820 | A | G | Genotípico | 11/73/120 | 23/158/215 | 1.128 | 0.5689 | 0.563 | 1 |
| | | | Aditivo | 95/313 | 204/588 | 0.9067 | 0.341 | 0.341 | 1 |
| | | | Alélico | 95/313 | 204/588 | 0.8805 | 0.3481 | 0.3605 | 1 |
| | | | Dominante | 84/120 | 181/215 | 1.121 | 0.2898 | 0.299 | 1 |
| | | | Recesivo | 11/193 | 23/373 | 0.04357 | 0.8347 | 1 | 1 |
| rs2228570 | T | C | Genotípico | 24/90/89 | 55/185/165 | 0.6869 | 0.7093 | 0.7302 | 1 |
| | | | Aditivo | 138/268 | 295/515 | 0.6869 | 0.4072 | 0.4072 | 1 |
| | | | Alélico | 138/268 | 295/515 | 0.6963 | 0.404 | 0.41 | 1 |
| | | | Dominante | 114/89 | 240/165 | 0.5348 | 0.4646 | 0.4861 | 1 |
| | | | Recesivo | 24/179 | 55/350 | 0.3695 | 0.5433 | 0.6097 | 1 |
| rs7975232 | C | A | Genotípico | 54/98/52 | 79/203/121 | 4.041 | 0.1326 | 0.1389 | 1 |
| | | | Aditivo | 206/202 | 361/445 | 3.523 | 0.06051 | 0.06051 | 0.7866 |
| | | | Alélico | 206/202 | 361/445 | 3.537 | 0.06001 | 0.06768 | 0.7801 |
| | | | Dominante | 152/52 | 282/121 | 1.367 | 0.2424 | 0.2547 | 1 |
| | | | Recesivo | 54/150 | 79/324 | 3.733 | 0.05333 | 0.06145 | 0.6933 |
| rs731236 | C | T | Genotípico | 21/110/72 | 73/188/140 | 6.819 | 0.03306 | 0.02979 | 0.4297 |
| | | | Aditivo | 152/254 | 334/468 | 2.037 | 0.1535 | 0.1535 | 1 |
| | | | Alélico | 152/254 | 334/468 | 1.984 | 0.1589 | 0.1719 | 1 |
| | | | Dominante | 131/72 | 261/140 | 0.01824 | 0.8926 | 0.9282 | 1 |
| | | | Recesivo | 21/182 | 73/328 | 6.336 | 0.01183 | 0.01242 | 0.1537 |
| rs7041 | T | G | Genotípico | 43/92/68 | 77/212/115 | 2.824 | 0.2437 | 0.2445 | 1 |
| | | | Aditivo | 178/228 | 366/442 | 0.2342 | 0.6285 | 0.6285 | 1 |
| | | | Alélico | 178/228 | 366/442 | 0.2312 | 0.6306 | 0.6686 | 1 |
| | | | Dominante | 135/68 | 289/115 | 1.625 | 0.2024 | 0.2231 | 1 |
| | | | Recesivo | 43/92/68 | 77/212/115 | 2.824 | 0.2437 | 0.2445 | 1 |
| rs10741657 | A | G | Genotípico | 43/160 | 77/327 | 0.3839 | 0.5355 | 0.5893 | 1 |
| | | | Aditivo | 26/97/78 | 70/172/156 | 2.565 | 0.2773 | 0.281 | 1 |
| | | | Alélico | 149/253 | 312/484 | 0.4874 | 0.4851 | 0.4851 | 1 |
| | | | Dominante | 149/253 | 312/484 | 0.5125 | 0.474 | 0.4896 | 1 |
| | | | Recesivo | 123/78 | 242/156 | 0.008534 | 0.9264 | 1 | 1 |

Tabla 10. Continuación.

| SNP | Alelo Menor | Alelo Mayor | Modelo | Casos | Controles | χ^2 | p-valor χ^2 | p-valor Fisher | p-valor *Ajustado |
|------------|-------------|-------------|------------|-----------|------------|----------|------------------|----------------|-------------------|
| rs4646536 | G | A | Genotípico | 15/70/118 | 32/149/225 | 0.4039 | 0.8171 | 0.8216 | 1 |
| | | | Aditivo | 100/306 | 213/599 | 0.3433 | 0.5579 | 0.5579 | 1 |
| | | | Alélico | 100/306 | 213/599 | 0.3633 | 0.5467 | 0.5782 | 1 |
| | | | Dominante | 85/118 | 181/225 | 0.4038 | 0.5251 | 0.5449 | 1 |
| | | | Recesivo | 15/188 | 32/374 | 0.04611 | 0.83 | 0.8736 | 1 |
| rs3782130 | C | G | Genotípico | 13/69/120 | 30/149/221 | 0.9764 | 0.6137 | 0.6267 | 1 |
| | | | Aditivo | 95/309 | 209/591 | 0.9311 | 0.3346 | 0.3346 | 1 |
| | | | Alélico | 95/309 | 209/591 | 0.969 | 0.3249 | 0.3611 | 1 |
| | | | Dominante | 82/120 | 179/221 | 0.944 | 0.3313 | 0.3395 | 1 |
| | | | Recesivo | 13/189 | 30/370 | 0.2292 | 0.6321 | 0.7383 | 1 |
| rs10877012 | T | G | Genotípico | 13/70/120 | 32/151/218 | 1.363 | 0.5057 | 0.5184 | 1 |
| | | | Aditivo | 96/310 | 215/587 | 1.352 | 0.2449 | 0.2449 | 1 |
| | | | Alélico | 96/310 | 215/587 | 1.41 | 0.235 | 0.265 | 1 |
| | | | Dominante | 83/120 | 183/218 | 1.233 | 0.2667 | 0.2979 | 1 |
| | | | Recesivo | 13/190 | 32/369 | 0.4855 | 0.4859 | 0.5174 | 1 |
| rs703842 | C | T | Genotípico | 16/71/116 | 26/144/228 | 0.4052 | 0.8166 | 0.8139 | 1 |
| | | | Aditivo | 103/303 | 196/600 | 0.07685 | 0.7816 | 0.7816 | 1 |
| | | | Alélico | 103/303 | 196/600 | 0.08014 | 0.7771 | 0.7782 | 1 |
| | | | Dominante | 87/116 | 170/228 | 0.001132 | 0.9732 | 1 | 1 |
| | | | Recesivo | 16/187 | 26/372 | 0.3764 | 0.5395 | 0.6121 | 1 |
| rs4809957 | G | A | Genotípico | 9/68/126 | 17/145/233 | 0.6055 | 0.7388 | 0.7373 | 1 |
| | | | Aditivo | 86/320 | 179/611 | 0.3501 | 0.554 | 0.554 | 1 |
| | | | Alélico | 86/320 | 179/611 | 0.3387 | 0.5606 | 0.6069 | 1 |
| | | | Dominante | 77/126 | 162/233 | 0.5307 | 0.4663 | 0.4818 | 1 |
| | | | Recesivo | 9/194 | 17/378 | 0.005424 | 0.9413 | 1 | 1 |
| rs6068816 | T | C | Genotípico | 7/44/152 | 3/75/325 | NA | NA | 0.02918 | NA |
| | | | Aditivo | 58/348 | 81/725 | 4.619 | 0.03161 | 0.03161 | 0.4109 |
| | | | Alélico | 58/348 | 81/725 | 4.772 | 0.02893 | 0.03532 | 0.3761 |
| | | | Dominante | 51/152 | 78/325 | NA | NA | 0.1148 | NA |
| | | | Recesivo | 7/196 | 3/400 | NA | NA | 0.01937 | NA |

NA: no alcanzado; * p-valor para corrección de Bonferroni

Tabla 11. Influencia del polimorfismo del gen VDR Bmsl (rs1544410) en el riesgo de NSCLC.

| Modelos | Genotipo | Casos [n (%)] | Controles [n (%)] | p-Valor ^a | p-Valor Ajustada ^b | OR ^c | CI95% |
|------------|----------|---------------|-------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------|-----------|
| Genotípico | GG | 71 (34.8) | 126 (31.2) | 0.00278 | 0.0361 | 1 | |
| | AG | 108 (52.9) | 181 (44.8) | | | 1.058 | 0.72–1.54 |
| | AA | 25 (12.3) | 97 (24.0) | | | 0.457 | 0.26–0.76 |
| Dominante | A | 133 (65.2) | 278 (68.8) | 0.3684 | 1 | | |
| | GG | 71 (34.8) | 126 (31.2) | | | | |
| Recesivo | AA | 25 (12.3) | 97 (24.0) | 0.00063 | 0.0082 | 0.442 | 0.26–0.70 |
| | G | 179 (87.7) | 307 (76.0) | | | | |
| Alélico | A | 158 (38.7) | 375 (46.4) | 0.01076 | 0.1399 | | |
| | G | 250 (61.3) | 433 (53.6) | | | | |
| Aditivo | - | - | - | 0.01217 | 0.1582 | | |

IC: intervalo de confianza; OR: odds ratio. a Valor p para la prueba χ^2 . b Valor p para la corrección de Bonferroni. c OR no ajustadas o brutas.

Tabla 12. Asociación del haplotipo con el riesgo de NSCLC.

| | rs1544410 | rs7975232 | rs731236 | rs4646536 | rs703842 | rs3782130 | rs10877012 | Freq | OR (CI95%) | p-Valor |
|----|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|------------|--------|-------------------------|---------|
| 1 | G | C | T | A | T | G | G | 0.3283 | 1.00 | --- |
| 2 | A | A | C | A | T | G | G | 0.2364 | 0.63 (0.44–0.91) | 0.015 |
| 3 | A | A | C | G | C | C | T | 0.1053 | 1.00 (0.65–1.53) | 0.99 |
| 4 | G | A | T | A | T | G | G | 0.082 | 0.95 (0.58–1.53) | 0.82 |
| 5 | G | C | T | G | C | C | T | 0.0661 | 0.90 (0.48–1.65) | 0.72 |
| 6 | A | C | T | A | T | G | G | 0.0241 | 0.00 (-Inf–Inf) | 1 |
| 7 | G | A | T | G | C | C | T | 0.019 | 0.40 (0.09–1.84) | 0.24 |
| 8 | A | A | T | A | T | G | G | 0.0136 | 1.26 (0.27–5.88) | 0.77 |
| 9 | G | A | C | A | T | G | G | 0.0133 | 0.11 (0.01–0.94) | 0.044 |
| 10 | G | C | T | G | T | C | T | 0.011 | 0.00 (-Inf–Inf) | 1 |

Valor p de asociación global de haplotipos: <0.0001. Inf: infinito; Freq: frecuencia de haplotipos.

Tabla 13. Influencia de las características clínicas y del polimorfismo del gen VDR BmsI (rs1544410) en el riesgo de NSCLC.

| | Genotípico | | | | | | Dominante | | | Recesivo | | | Aditivo | | |
|-----------------------------|------------|------|-------------------|-----------|------|-------------------|-----------|------|-------------------|----------|------|-------------------|---------|------|-------------------|
| | AA vs. GG | | | AG vs. GG | | | A vs. GG | | | AA vs. G | | | A vs. G | | |
| | p-Valor | OR | CI _{95%} | p-Valor | OR | CI _{95%} | p-Valor | OR | CI _{95%} | p-Valor | OR | CI _{95%} | p-Valor | OR | CI _{95%} |
| Hábito tabáquico | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fumadores | <0.001 | 6.11 | 3.51–10.8 | <0.001 | 6.11 | 3.51–10.8 | <0.001 | 5.91 | 3.40–10.4 | <0.001 | 6.10 | 3.50–10.8 | <0.001 | 5.96 | 3.43–10.5 |
| Exfumadores | 0.0003 | 2.64 | 1.57–4.55 | 0.0003 | 2.64 | 1.57–4.55 | 0.0004 | 2.58 | 1.53–4.43 | 0.0003 | 2.64 | 1.56–4.54 | 0.0003 | 2.59 | 1.54–4.46 |
| Historia familiar de cáncer | | | | | | | | | | | | | | | |
| Si | <0.001 | 10.9 | 6.67–18.4 | <0.001 | 10.9 | 6.67–18.4 | <0.001 | 11.3 | 6.90–18.9 | <0.001 | 10.9 | 6.68–18.4 | <0.001 | 11.1 | 6.81–18.8 |
| rs1544410 | 0.0377 | 0.51 | 0.27–0.95 | 0.7786 | 1.06 | 0.67–1.70 | 0.5478 | 0.87 | 0.56–1.36 | 0.0140 | 0.49 | 0.27–0.85 | 0.0752 | 0.76 | 0.57–1.02 |

5.3 Estudio de Supervivencia

5.3.1 Características de los pacientes

Un total de 194 pacientes caucásicos del sur de España con NSCLC fueron incluidos en el estudio. Las características sociodemográficas, clínicas y patológicas se resumen en la tabla 14. La edad media de los pacientes fue de 60.86 ± 10.51 años, 141 eran hombres (141/194; 72.68%) y 130 fueron fase IIIB-IV (130/194; 67.36%). La cirugía fue el primer curso de tratamiento para 48 pacientes (48/194; 24.74%) de los cuales el 97.91% (47/48) tuvieron estadio I-III A. Durante el seguimiento, se registraron 154 eventos mortales. Para todos los pacientes, la mediana de SG y SLP fue de 26.8 [15.5-64.2] y 13.7 [6.46-29.9] meses, respectivamente.

5.3.2 Influencia de las características clínico-patológicas en la supervivencia

5.3.2.1 Población general

La mediana de la SG fue mayor en mujeres ($p_{\log\text{-rank}}=0.030$; 38.9 vs. 26.1 meses; Tabla 15; Figura 6), no bebedor ($p_{\log\text{-rank}}=0.0005$; 36.53 meses vs. 21.43 para bebedores y 8.85 para ex bebedores; Tabla 15; Figura 7), I, II y III A ($p_{\log\text{-rank}} < 0.001$; 107.6 vs. 21.1 meses; Tabla 6; Figura 8) y cirugía como primer curso de tratamiento ($p_{\log\text{-rank}} < 0.001$; 130.0 vs. 23.2 meses; Tabla 15; Figura 9).

Tabla 14. Clasificación de los 194 pacientes con NSCLC según las características clínico-patológicas.

| | n | % |
|--------------------------------|-------------------|-------|
| Genero | | |
| Femenino | 53 | 27.32 |
| Masculino | 141 | 72.68 |
| Historia Familiar de Cáncer | | |
| Si | 102 | 53.4 |
| No | 89 | 46.6 |
| Enfermedad Pulmonar Previa | | |
| Si | 55 | 28.35 |
| No | 139 | 71.65 |
| Hábito Tabáquico | | |
| Fumador | 92 | 47.42 |
| Exfumador | 75 | 38.66 |
| No fumador | 27 | 13.92 |
| Hábito Enólico | | |
| Bebedor | 33 | 20.50 |
| Ex bebedor | 4 | 2.48 |
| No bebedor | 124 | 77.02 |
| IMC | 27.09±5,12 | |
| <24 | 31 | 27.19 |
| >24 | 83 | 72.81 |
| Edad al diagnóstico de NSCLC | 60.86±10.51 | |
| ≤60 | 85 | 43.81 |
| >60 | 109 | 56.19 |
| Histología | | |
| Adenocarcinoma | 119 | 61.34 |
| Carcinoma de células escamosas | 72 | 37.11 |
| Desconocido | 3 | 1.55 |
| Estadio tumoral | | |
| I, II o IIIA | 63 | 32.64 |
| IIIB o IV | 130 | 67.36 |
| Primera línea de tratamiento | | |
| Cirugía | 48 | 24.74 |
| Quimio radioterapia | 121 | 62.37 |
| Terapia dirigida | 25 | 12.89 |
| Supervivencia | | |
| SLP | 13.7 [6.46-29.96] | |
| SG | 26.8 [15.5-64.2] | |

Variables cualitativas: número (porcentaje); Variables cuantitativas: Distribución normal: media ± desviación estándar; Distribución no normal: P50 [P25, P75].

Tabla 15. Características clínicas y asociación con la supervivencia global de los 194 pacientes con NSCLC.

| Características | SG | | | | | | | | |
|---|-----|---------|----------|------------|------------------|--------------------------------|---------------------------|------------|---------|
| | N | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-valor | Categoría de Referencia | Modelo de Cox Univariante | | |
| | | | | | | | HR | IC95% | p-valor |
| Genero | | | | | | | | | |
| Femenino | 53 | 36 | 38.9 | 25.6-124.5 | 0.030 | Femenino | 1.505 | 1.04-2.19 | 0.0324 |
| Masculino | 141 | 118 | 26.1 | 22.1-32.2 | | | | | |
| Historial familiar de Cáncer | | | | | | | | | |
| Si | 102 | 88 | 30.4 | 25.4-38.9 | 0.500 | | | | |
| No | 89 | 65 | 24.9 | 20.1-41.8 | | | | | |
| Enfermedad pulmonar previa | | | | | | | | | |
| Si | 55 | 39 | 32.2 | 23.4-75.0 | 0.100 | | | | |
| No | 139 | 115 | 26.9 | 23.8-36.5 | | | | | |
| Hábito tabáquico | | | | | | | | | |
| Fumador | 92 | 76 | 27.9 | 23.7-45.9 | 1.000 | | | | |
| Exfumador | 75 | 58 | 26.4 | 20.1-42.5 | | | | | |
| No fumador | 27 | 20 | 26.9 | 24.5-48.4 | | | | | |
| Hábito enólico | | | | | | | | | |
| Bebedor | 33 | 29 | 21.43 | 13.03-32.0 | 0.0005 | No bebedor | 1.772 | 1.16-2.70 | 0.0079 |
| Ex bebedor | 4 | 4 | 8.95 | 5.87-NR | | | 4.487 | 1.62-12.43 | 0.0039 |
| No bebedor | 124 | 91 | 36.53 | 27.03-48.4 | | | 1 | | |
| Edad al diagnóstico de NSCLC | | | | | | | | | |
| ≤60 | 85 | 65 | 27.7 | 22.7-42.5 | 0.300 | | | | |
| >60 | 109 | 89 | 30.1 | 24.5-41.7 | | | | | |
| IMC | | | | | | | | | |
| <24 | 31 | 20 | 53.8 | 32.0-NR | 0.080 | <24 | 1.563 | 0.94-2.59 | 0.0843 |
| >24 | 83 | 63 | 35.2 | 24.5-55 | | | | | |
| Histología | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 119 | 98 | 26.1 | 23.7-32.2 | 0.070 | Carcinoma de células escamosas | 1.363 | 0.98- 1.91 | 0.0694 |
| Carcinoma de células escamosas | 72 | 54 | 37.7 | 22.1-64.7 | | | | | |
| Estadio del tumor | | | | | | | | | |
| I, II y IIIA | 63 | 33 | 107.6 | 72.0-NR | <0.001 | I, II y IIIA | 4.414 | 2.95-6.59 | <0.001 |
| IIIB y IV | 130 | 120 | 21.1 | 17.8-24.9 | | | | | |
| Primer curso del tratamiento | | | | | | | | | |
| Cirugía | 48 | 22 | 130.0 | 102.5-NR | <0.001 | Cirugía | 1 | | |
| Quimio radioterapia | 121 | 110 | 22.7 | 18.4-27.0 | | | 5.027 | 3.12-8.10 | <0.001 |
| Terapia dirigida | 25 | 22 | 20.1 | 20.1-41.8 | | | 5.709 | 3.07-10.62 | <0.001 |
| Primer curso del tratamiento (dividido por cirugía) | | | | | | | | | |
| Cirugía | 48 | 22 | 130.0 | 102.5-NR | <0.001 | Cirugía | 5.108 | 3.18- 8.19 | <0.001 |
| No cirugía | 146 | 132 | 23.2 | 19.5-26.4 | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal

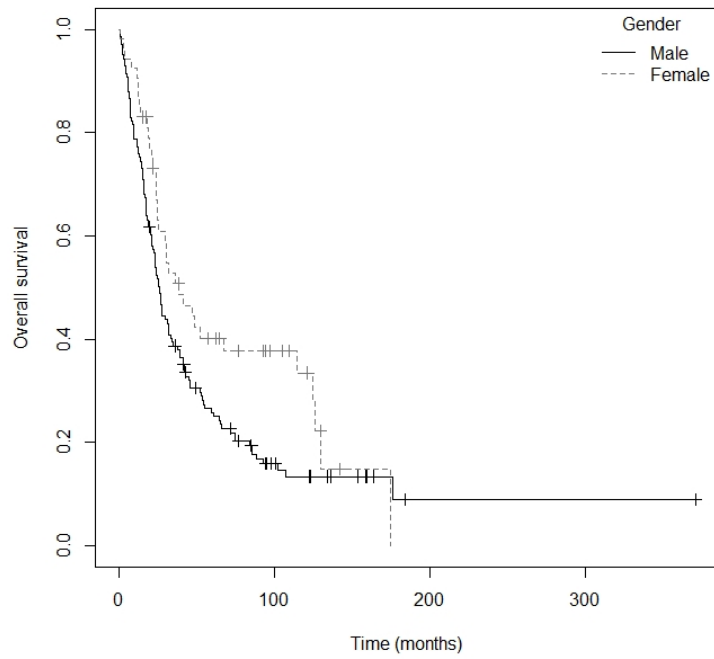


Figura 6. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el género en 194 pacientes con NSCLC

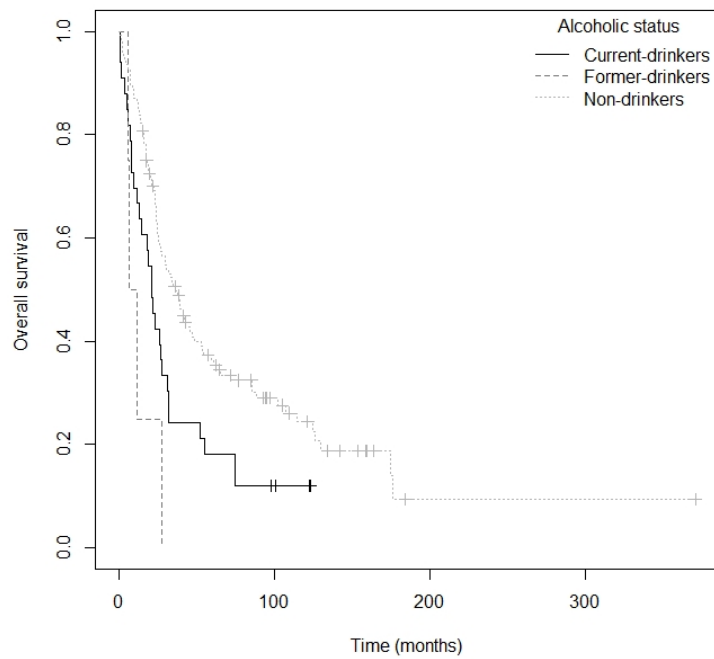


Figura 7. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según hábito enólico en 194 pacientes con NSCLC

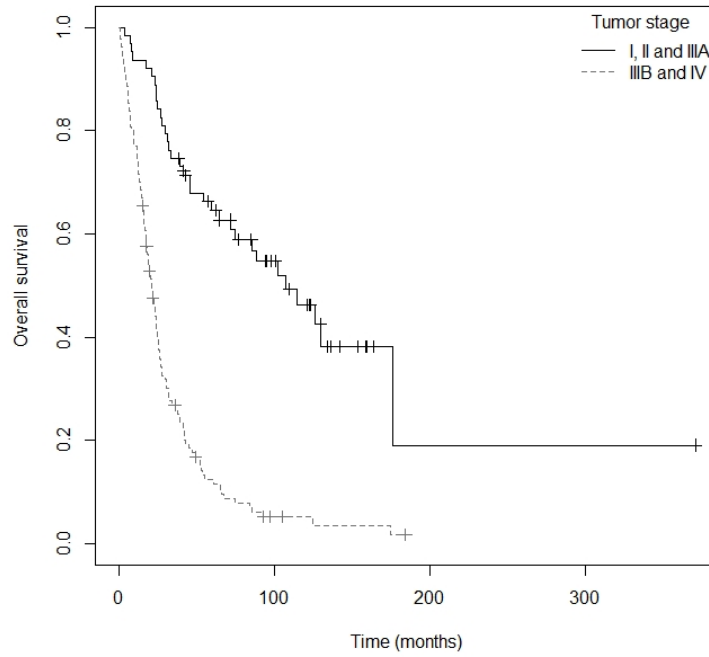


Figura 8. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el estadio tumoral en 194 pacientes con NSCLC

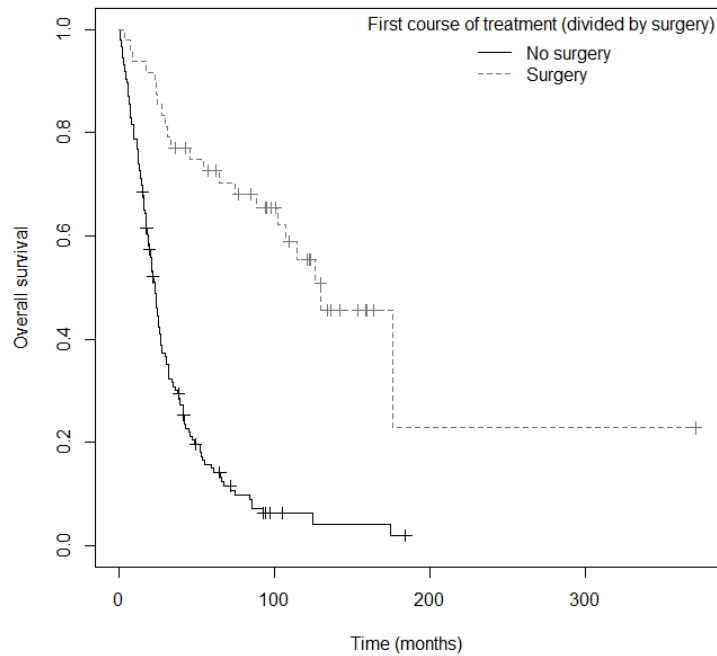


Figura 9. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según la primera línea de tratamiento (dividido por cirugía) en 194 pacientes con NSCLC

La mediana de SLP se asoció con enfermedades pulmonares anteriores ($p_{\log\text{-rank}}=0.040$; 17.6 vs. 12.3 meses; Tabla 16; Figura 10), no bebedor ($p_{\log\text{-rank}}=0.020$; 17.07 meses vs. 9.17 para bebedores y 7.82 para ex bebedores; Tabla 7; Figura 11), I, II y IIIA ($p_{\log\text{-rank}} < 0.001$; 29.4 vs. 10.6 meses; Tabla 16; Figura 12) y cirugía como primer curso de tratamiento ($p_{\log\text{-rank}} < 0.001$; 59.0 vs. 10.9 meses; Tabla 16; Figura 13).

Tabla 16. Características clínicas y asociación con la supervivencia libre de progresión de los 194 pacientes con NSCLC.

| Características | SLP | | | | | | | | | |
|---|-----|---------|----------|------------|------------------|-------------------------|---------------------------|-----------|-----------|--------|
| | N | Eventos | MST (mo) | IC95% | p-valor Log-Rank | Categoría de referencia | Modelo de Cox Univariante | | | |
| | | | | | | | HR | IC95% | p-valor | |
| Genero | | | | | | | | | | |
| Femenino | 53 | 43 | 17.6 | 12.9-30.0 | 0.050 | Femenino | 1.403 | 0.99-1.99 | 0.0558 | |
| Masculino | 141 | 127 | 11.9 | 9.87-16.1 | | | | | | |
| Historial familiar de Cáncer | | | | | 0.200 | | | | | |
| Si | 102 | 93 | 15.6 | 11.4-19.4 | | | | | | |
| No | 89 | 75 | 12.1 | 10.2-16.8 | | | | | | |
| Enfermedad pulmonar previa | | | | | 0.040 | Si | 1.422 | 1.01-2.01 | 0.0452 | |
| Si | 55 | 45 | 17.6 | 12.7-24.7 | | | | | | |
| No | 139 | 125 | 12.3 | 10.5-16.7 | | | | | | |
| Hábito tabáquico | | | | | 0.900 | | | | | |
| Fumador | 92 | 81 | 13.4 | 10.30-19.2 | | | | | | |
| Exfumador | 75 | 64 | 13.2 | 9.07-18.7 | | | | | | |
| No fumador | 27 | 25 | 15.6 | 12.03-20.0 | | | | | | |
| Hábito enólico | | | | | 0.020 | No bebedor | 1.508 | 1.00-2.27 | 0.0485 | |
| Bebedor | 33 | 30 | 9.17 | 6.7-20.9 | | | | | | |
| Ex bebedor | 4 | 4 | 7.82 | 5.1-NR | | | | | | |
| No bebedor | 124 | 105 | 17.07 | 12.9-20.2 | | | 2.886 | 1.05-7.95 | 0.0403 | |
| Edad al diagnóstico de NSCLC | | | | | 1.000 | | | | | |
| ≤60 | 85 | 74 | 11.9 | 10.2-17.1 | | | | | | |
| >60 | 109 | 96 | 15.8 | 12.8-19.2 | | | | | | |
| IMC | | | | | 0.200 | | | | | |
| <24 | 31 | 26 | 24.5 | 17.6-51.9 | | | | | | |
| >24 | 83 | 70 | 12.9 | 10.3-18.7 | | | | | | |
| Histología | | | | | 0.200 | | | | | |
| Adenocarcinoma | 119 | 107 | 14.2 | 11.4-17.1 | | | | | | |
| Carcinoma de células escamosas | 72 | 61 | 12.9 | 10.0-24.7 | | | | | | |
| Estadio del tumor | | | | | <0.001 | I, II Y IIIA | 3.026 | 2.11-4.34 | <0.001 | |
| I, II y IIIA | 63 | 44 | 29.4 | 24.47-86.1 | | | | | | |
| IIIB y IV | 130 | 125 | 10.6 | 9.07-12.8 | | | | | | |
| Primer curso del tratamiento | | | | | <0.001 | Cirugía | 1 | 3.964 | 2.58-6.08 | <0.001 |
| Cirugía | 48 | 29 | 59.0 | 25.6-NR | | | | | | |
| Quimio radioterapia | 121 | 118 | 10.2 | 7.7-12.9 | | | | | | |
| Terapia dirigida | 25 | 23 | 15.8 | 12.0-21.8 | | | 3.233 | 1.82-5.73 | <0.001 | |
| Primer curso del tratamiento (dividido por cirugía) | | | | | <0.001 | Cirugía | 3.838 | 2.51-5.87 | <0.001 | |
| Cirugía | 48 | 29 | 59.0 | 25.6-NR | | | | | | |
| No cirugía | 146 | 141 | 10.9 | 10.0-13.2 | | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal

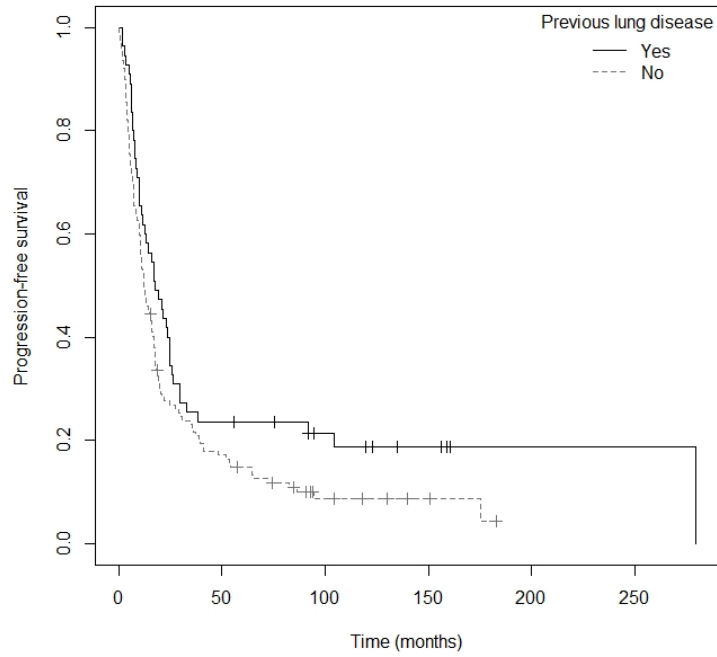


Figura 10. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión según la enfermedad pulmonar anterior en 194 pacientes con NSCLC

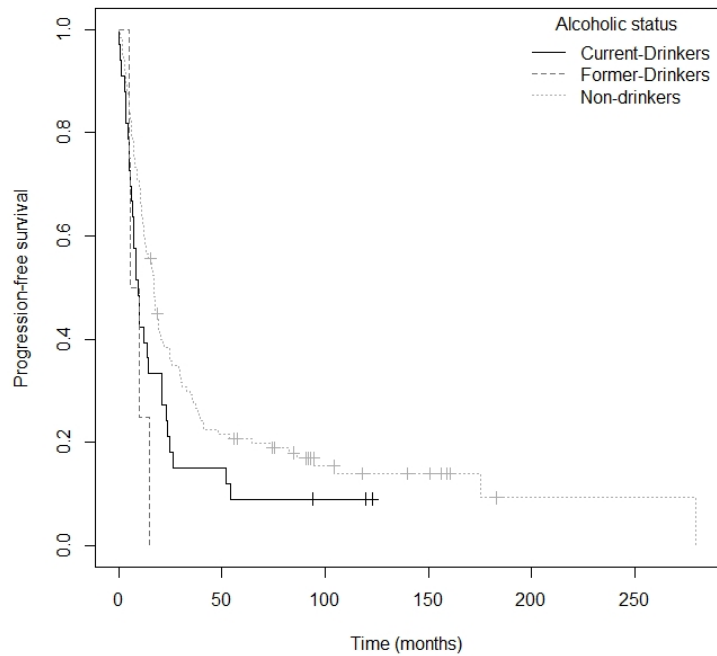


Figura 11. Curva Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según el hábito enólico en 194 pacientes con NSCLC

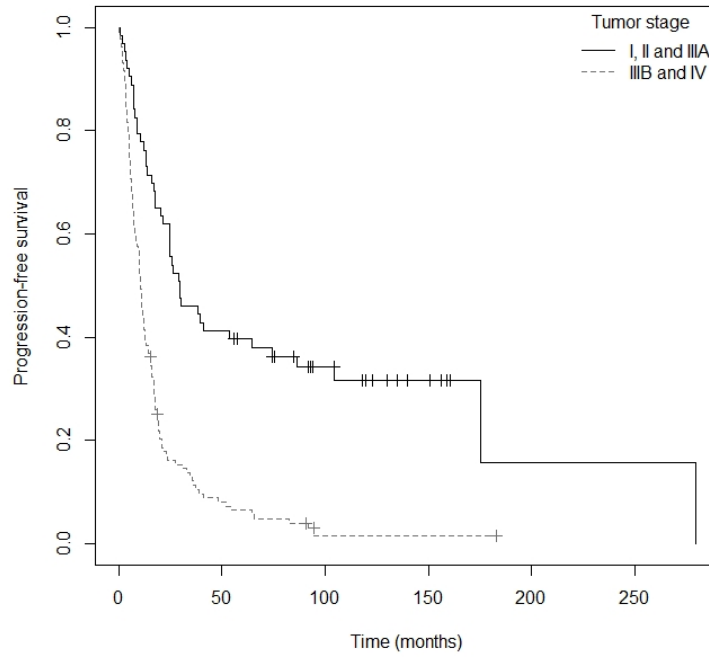


Figura 12. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión según el estadio tumoral en 194 pacientes con NSCLC

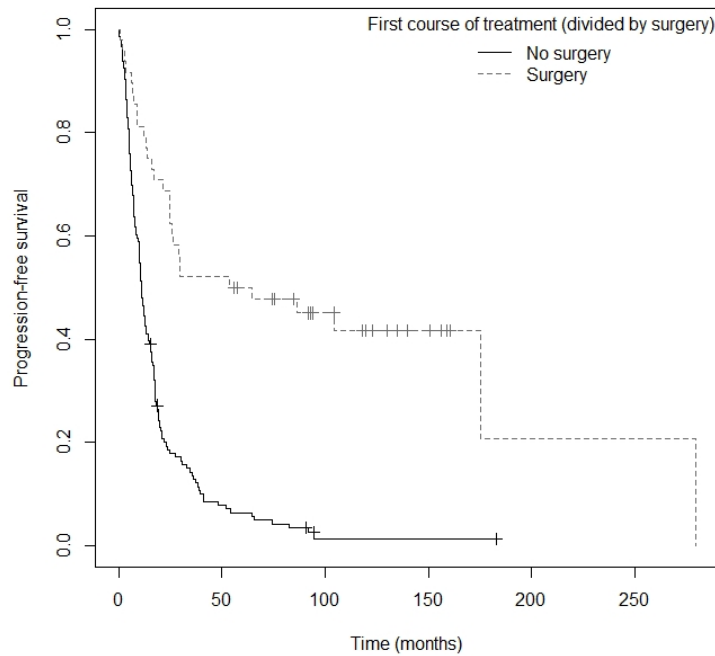


Figura 13. Curva Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según la primera línea de tratamiento (dividido por cirugía) en 194 pacientes con NSCLC

5.3.2.2 Análisis de subgrupos

En el subgrupo de pacientes con NSCLC resecaados, la SG se asoció con los antecedentes familiares de cáncer ($p_{\text{log-rank}}=0.030$; 103 vs. 176 meses; Tabla 17; Figura 14) y la SLP fue mayor en los estadios I, II y IIIA ($p_{\text{log-rank}}=0.020$; 64.5 vs. 6.9 meses; Tabla 18; Figura 15). En cuanto a los pacientes con NSCLC no resecaados, la mediana de la SG fue mayor en mujeres ($p_{\text{log-rank}}=0.007$; 30,4 vs. 20,1 meses; Tabla 19; Figura 16), en no bebedor ($p_{\text{log-rank}}=0.002$; 25.4 meses vs. 18.4 para bebedores y 8.95 para ex bebedores; Tabla 19; Figura 17) y en los estadios I, II y IIIA ($p_{\text{log-rank}}=0.004$; 45.9 vs. 21.1 meses; Tabla 19; Figura 18). Por otro lado, la mediana de SLP se asoció con el IMC <24 ($p_{\text{log-rank}}=0,020$; 18,8 vs. 10.2 meses; Tabla 20; Figura 19) en pacientes con NSCLC no resecaados.

Tabla 17. Características clínicas y asociación con la supervivencia global de los pacientes con NSCLC resecaado.

| Características | SG | | | | | | | | |
|--------------------------------|----|---------|----------|----------|------------------|-------------------------|---------------------------|-----------|---------|
| | N | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-valor | Categoría de Referencia | Modelo de Cox Univariante | | |
| | | | | | | | HR | IC95% | p-valor |
| Genero | | | | | | | | | |
| Femenino | 13 | 5 | 130 | 114-NR | 0.500 | | | | |
| Masculino | 35 | 17 | 108 | 75-NR | | | | | |
| Historia familiar de Cáncer | | | | | | | | | |
| Si | 22 | 14 | 103 | 45.9-NR | 0.030 | No | 2.756 | 1.06-7.20 | 0.0384 |
| No | 23 | 7 | 176 | 107.6-NR | | | | | |
| Enfermedad pulmonar previa | | | | | | | | | |
| Si | 22 | 9 | NR | 75.0-NR | 0.500 | | | | |
| No | 23 | 13 | 126 | 88.6-NR | | | | | |
| Hábito tabáquico | | | | | | | | | |
| Fumadores | 28 | 16 | 114 | 75-NR | 0.300 | | | | |
| Exfumadores | 17 | 5 | NR | NR-NR | | | | | |
| No fumadores | 3 | 1 | 108 | NR-NR | | | | | |
| Habito enólico | | | | | | | | | |
| Bebedores | 8 | 4 | 75 | 31.1-NR | 0.500 | | | | |
| No bebedores | 38 | 18 | 126 | 102.5-NR | | | | | |
| Edad al diagnóstico de NSCLC | | | | | | | | | |
| ≤60 | 22 | 9 | 130 | 114-NR | 0.500 | | | | |
| >60 | 26 | 13 | 108 | 75-NR | | | | | |
| IMC | | | | | | | | | |
| <24 | 11 | 3 | NR | 130.0-NR | 0.100 | | | | |
| >24 | 29 | 15 | 114 | 88.6-NR | | | | | |
| Histología | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 23 | 9 | 126 | 88.6-NR | 0.500 | | | | |
| Carcinoma de células escamosas | 24 | 13 | 108 | 64.7-NR | | | | | |
| Estadio tumoral | | | | | | | | | |
| I, II y IIIA | 47 | 22 | 130 | 103-NR | 0.600 | | | | |
| IIIB y IV | 1 | 0 | NR | NR | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal

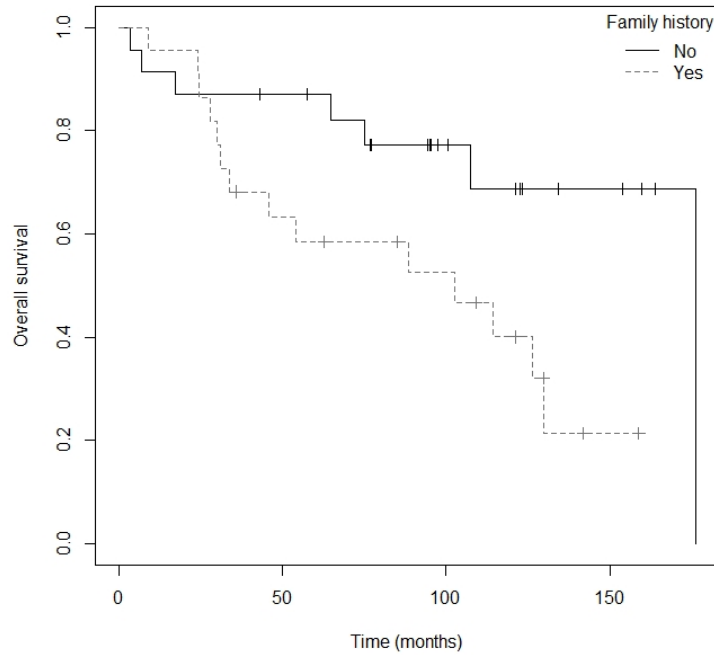


Figura 14. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según los antecedentes familiares de cáncer en el subgrupo NSCLC resecado

Tabla 18. Características clínicas y asociación con la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC resecado.

| Características | SLP | | | | | | Modelo de Cox Univariante | | |
|-------------------------------------|-----|---------|----------|---------|------------------|-------------------------|---------------------------|------------|---------|
| | N | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-valor | Categoría de referencia | HR | IC95% | p-valor |
| | | | | | | | | | |
| Genero | | | | | | | | | |
| Femenino | 13 | 6 | 86.1 | 53.6-NR | 0.300 | | | | |
| Masculino | 35 | 23 | 28.9 | 21.6-NR | | | | | |
| Historia familiar de Cáncer | | | | | | | | | |
| Si | 22 | 15 | 25.3 | 13.9-NR | 0.100 | | | | |
| No | 23 | 12 | 104.3 | 28.9-NR | | | | | |
| Enfermedad pulmonar previa | | | | | | | | | |
| Si | 22 | 13 | 67.1 | 25.6-NR | 0.500 | | | | |
| No | 26 | 16 | 59.0 | 13.9-NR | | | | | |
| Hábito tabáquico | | | | | | | | | |
| Fumadores | 28 | 19 | 27.7 | 16.8-NR | 0.300 | | | | |
| Exfumadores | 17 | 8 | 279.2 | 25.6-NR | | | | | |
| No fumadores | 3 | 2 | 104.3 | 29.4-NR | | | | | |
| Habito enólico | | | | | | | | | |
| Bebedores | 8 | 5 | 20.2 | 12.3-NR | 0.600 | | | | |
| No bebedores | 38 | 24 | 59.0 | 24.9-NR | | | | | |
| Edad al diagnóstico de NSCLC | | | | | | | | | |
| ≤60 | 22 | 13 | 69.9 | 16.8-NR | 0.800 | | | | |
| >60 | 26 | 16 | 47.1 | 24.7-NR | | | | | |
| IMC | | | | | | | | | |
| <24 | 11 | 8 | 28.9 | 25.6-NR | 0.900 | | | | |
| >24 | 29 | 17 | 86.1 | 24.7-NR | | | | | |
| Histología | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 23 | 13 | 86.1 | 16.8-NR | 0.400 | | | | |
| Carcinoma de células escamosas | 24 | 16 | 29.4 | 24.7-NR | | | | | |
| Estadio tumoral | | | | | | | | | |
| I, II y IIIA | 47 | 28 | 64.5 | 25.6-NR | 0.020 | I, II y IIIA | 8.889 | 1.038-76.1 | 0.0461 |
| IIIB y IV | 1 | 1 | 6.9 | NR-NR | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal

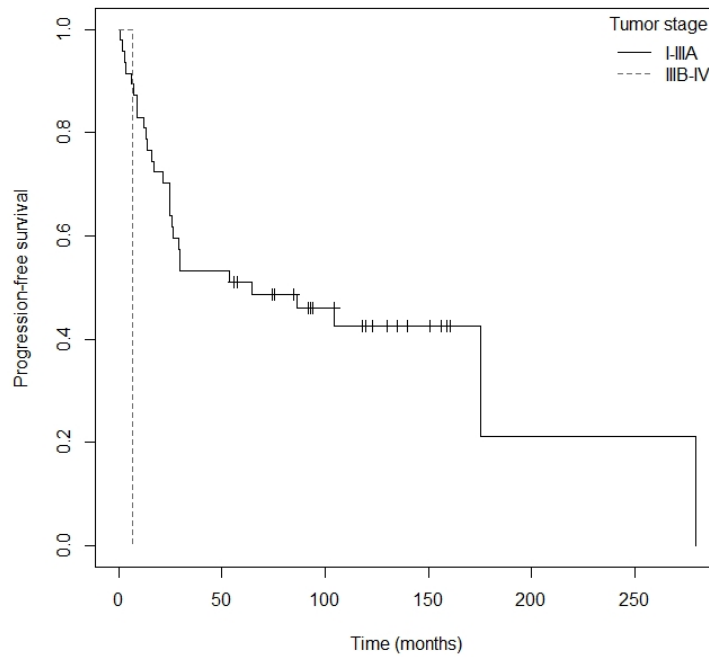


Figura 15. Curva Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según el estadio tumoral en el subgrupo NSCLC resecado

Tabla 19. Características clínicas y asociación con la supervivencia global de los pacientes con NSCLC no resecado.

| Características | SG | | | | | | | | |
|--------------------------------|-----|---------|----------|------------|------------------|-------------------------|---------------------------|-----------|---------|
| | N | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-valor | Categoría de Referencia | Modelo de Cox Univariante | | |
| | | | | | | | HR | IC95% | p-valor |
| Genero | | | | | | | | | |
| Femenino | 40 | 31 | 30.4 | 23.8-47.4 | 0.007 | Femenino | 1.732 | 1.15-2.60 | 0.0082 |
| Masculino | 106 | 101 | 20.1 | 17.1-25.4 | | | | | |
| Historia familiar de Cáncer | | | | | | | | | |
| Si | 80 | 74 | 25.5 | 16-24.9 | 0.200 | | | | |
| No | 66 | 58 | 20.1 | 21-32.2 | | | | | |
| Enfermedad pulmonar previa | | | | | | | | | |
| Si | 33 | 30 | 21.1 | 16.0-32.0 | 0.400 | | | | |
| No | 113 | 102 | 23.9 | 19.5-27.9 | | | | | |
| Hábito tabáquico | | | | | | | | | |
| Fumadores | 64 | 60 | 22.1 | 16.1-27.7 | 0.600 | | | | |
| Exfumadores | 58 | 53 | 21.2 | 17.8-36.5 | | | | | |
| No fumadores | 24 | 19 | 25.6 | 23.7-39.6 | | | | | |
| Habito enólico | | | | | | | | | |
| Bebedor | 25 | 25 | 18.43 | 9.77-26.4 | 0.002 | No bebedor | 1.95 | 1.23-3.01 | 0.0046 |
| Ex bebedor | 4 | 4 | 8.95 | 5.87-NR | | | 3.28 | 1.12-9.13 | 0.0229 |
| No bebedor | 86 | 73 | 25.40 | 22.70-35.2 | | | 1 | | |
| Edad al diagnóstico de NSCLC | | | | | | | | | |
| ≤60 | 63 | 56 | 22.1 | 17.1-30.0 | 0.400 | | | | |
| >60 | 83 | 76 | 23.9 | 20.1-30.8 | | | | | |
| IMC | | | | | | | | | |
| <24 | 20 | 17 | 29.9 | 22.1-85.5 | 0.100 | | | | |
| >24 | 54 | 48 | 23.1 | 18.3-35.2 | | | | | |
| Histología | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 96 | 89 | 23.4 | 20.1-26.7 | 0.100 | | | | |
| Carcinoma de células escamosas | 48 | 41 | 20.6 | 17.8-41.8 | | | | | |
| Estadio tumoral | | | | | | | | | |
| I, II y IIIA | 16 | 11 | 45.9 | 32.0-NR | 0.004 | I, II y IIIA | 2.424 | 1.30-4.51 | 0.00517 |
| IIIB y IV | 129 | 120 | 21.1 | 17.8-24.5 | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal

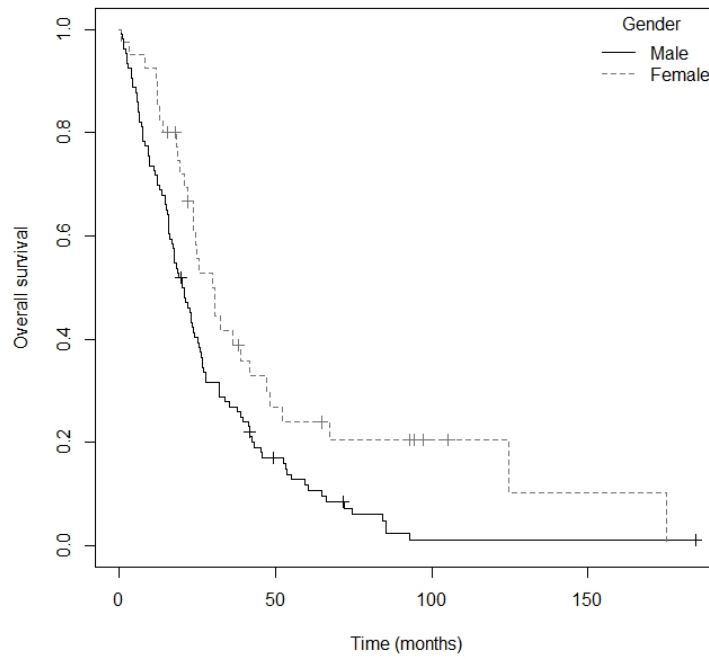


Figura 16. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el género en el subgrupo NSCLC no resecado

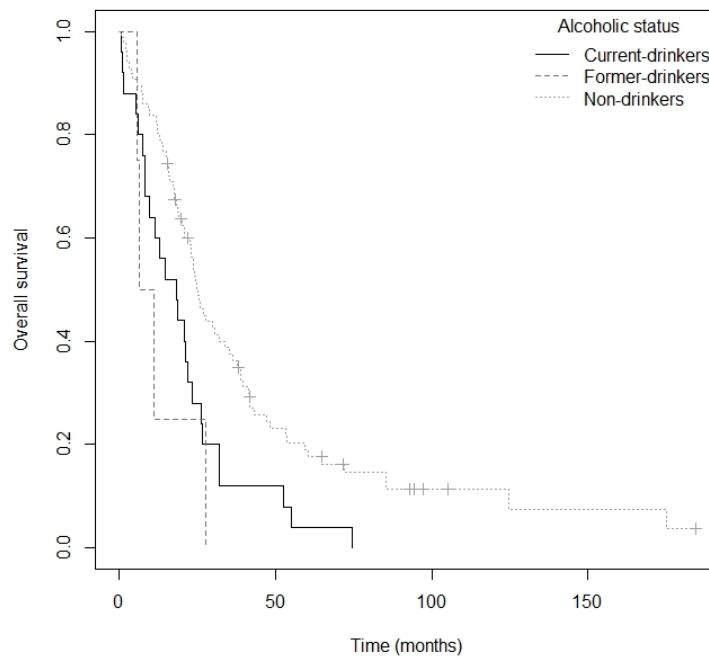


Figura 17. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el hábito enólico en el subgrupo NSCLC no resecado

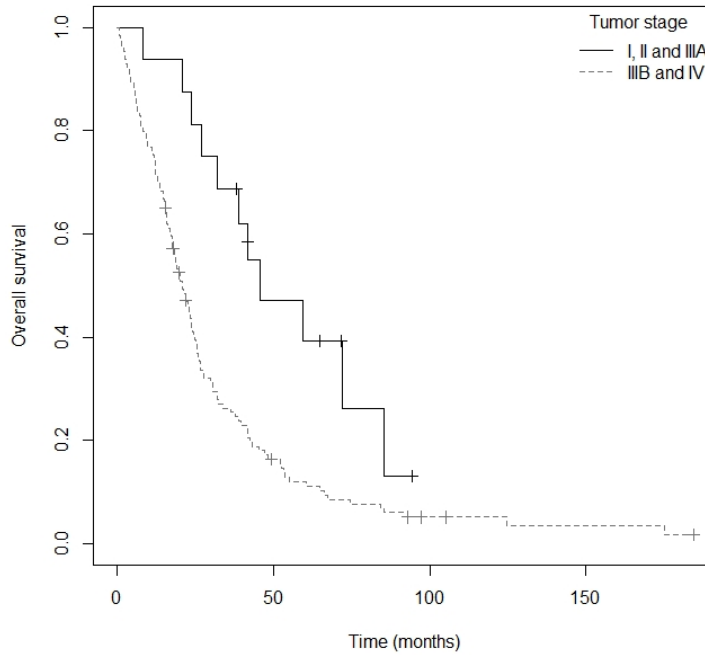


Figura 18. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el estadio tumoral en el subgrupo NSCLC no reseado

Tabla 20. Características clínicas y asociación con la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC no reseado.

| Características | SLP | | | | | | | | |
|--------------------------------|-----|---------|----------|------------|------------------|-------------------------|---------------------------|-----------|---------|
| | N | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-valor | Categoría de Referencia | Modelo de Cox Univariante | | |
| | | | | | | | HR | IC95% | p-valor |
| Genero | | | | | | | | | |
| Femenino | 40 | 37 | 14.2 | 10.97-19.2 | 0.050 | Femenino | 1.453 | 0.99-2.12 | 0.0527 |
| Masculino | 106 | 104 | 10.0 | 7.13-13.0 | | | | | |
| Historia familiar de Cáncer | | | | | | | | | |
| Si | 80 | 78 | 10.8 | 10.0-15.5 | 1.000 | | | | |
| No | 66 | 63 | 11.1 | 7.70-15.8 | | | | | |
| Enfermedad pulmonar previa | | | | | | | | | |
| Si | 33 | 32 | 10.2 | 8.0-17.6 | 0.900 | | | | |
| No | 113 | 109 | 11.2 | 10.0-14.6 | | | | | |
| Hábito tabáquico | | | | | | | | | |
| Fumadores | 64 | 62 | 10.6 | 7.33-14.6 | 0.900 | | | | |
| Exfumadores | 58 | 56 | 10.0 | 7.13-17.1 | | | | | |
| No fumadores | 24 | 23 | 14.1 | 11.20-19.2 | | | | | |
| Habito enólico | | | | | | | | | |
| Bebedor | 25 | 25 | 8.37 | 5.83-20.7 | 0.090 | | | | |
| Ex bebedor | 4 | 4 | 7.82 | 5.10-NR | | | | | |
| No bebedor | 86 | 81 | 12.48 | 10.73-17.1 | | | | | |
| Edad al diagnóstico de NSCLC | | | | | | | | | |
| ≤60 | 63 | 61 | 10.4 | 7.57-12.3 | 0.900 | | | | |
| >60 | 83 | 80 | 12.8 | 9.87-16.8 | | | | | |
| IMC | | | | | | | | | |
| <24 | 20 | 18 | 18.8 | 16.1-39.1 | 0.020 | <24 | 1.888 | 1.09-3.25 | 0.0218 |
| >24 | 54 | 53 | 10.2 | 8.0-15.6 | | | | | |
| Histología | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 96 | 94 | 12.0 | 10.30-16.1 | 0.500 | | | | |
| Carcinoma de células escamosas | 48 | 45 | 10.1 | 7.57-13.0 | | | | | |
| Estadio tumoral | | | | | | | | | |
| I, II y IIIA | 16 | 16 | 17.6 | 7.70-39.2 | 0.300 | | | | |
| IIIB y IV | 129 | 124 | 10.7 | 9.17-12.8 | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza

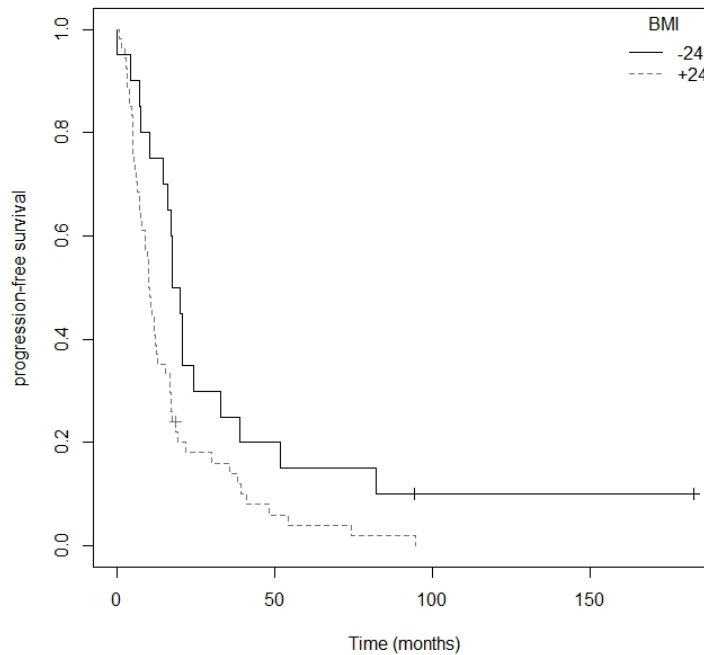


Figura 19. Curva Kaplan-Meier para supervivencia libre de progresión según el índice de masa corporal en el subgrupo NSCLC no reseado

5.3.3 Distribución de genotipos

Todos los polimorfismos mostraron frecuencias de alelos menores (MAF) superiores al 1% y ninguno de ellos fue excluido del análisis (Tabla 21). Todas las distribuciones de polimorfismos genéticos estaban de acuerdo con las esperadas según el modelo de equilibrio Hardy-Weinberg tanto para la SG (Tabla 22) y SLP (Tabla 23), con la única excepción en SG para *VDR TaqI* rs731236 ($p=0.0231$). No se encontraron diferencias estadísticas con las descritas para la población ibérica para esta variante (alelo *VDR TaqI* rs731236 G: 0,374 vs. 0,423; $p = 0.1777$) (115). Los valores de desequilibrio de ligamento LD' y r^2 se muestran en la Tabla 24. En particular, los pares *VDR* rs731236/rs1544410 y *CYP27B1* rs4646536/rs3782130; rs4646536/rs10877012; rs3782130/rs10877012 estaban en fuerte desequilibrio de ligamento (Figura 20).

Tabla 21. Frecuencias de los alelos menores de los SNP.

| Cromosoma | SNP | Alelo Menor | Alelo Mayor | MAF |
|--|------------|--------------------|--------------------|------------|
| 4 | rs7041 | T | G | 0.4407 |
| 11 | rs10741657 | A | G | 0.3672 |
| 12 | rs731236 | C | T | 0.3737 |
| 12 | rs7975232 | A | C | 0.4871 |
| 12 | rs1544410 | A | G | 0.3866 |
| 12 | rs2228570 | T | C | 0.3402 |
| 12 | rs11568820 | A | G | 0.2345 |
| 12 | rs4646536 | G | A | 0.2448 |
| 12 | rs3782130 | C | G | 0.2332 |
| 12 | rs10877012 | T | G | 0.2345 |
| 20 | rs4809957 | G | A | 0.2088 |
| 20 | rs6068816 | T | C | 0.1392 |
| MAF: Minor allele frequency (Frecuencia del alelo menor) | | | | |

Tabla 22. Equilibrio de Hardy-Weinberg (SG).

| Chr | SNP | Muestra | Alelo Menor | Alelo Mayor | Genotipos contados | Heterocigosidad Observada | Heterocigosidad Esperada | p-valor |
|-----|------------|-----------|-------------|-------------|--------------------|---------------------------|--------------------------|---------|
| 4 | rs7041 | Todos | T | G | 41/89/64 | 0.4588 | 0.493 | 0.3817 |
| 4 | rs7041 | Casos | T | G | 29/71/54 | 0.461 | 0.4868 | 0.5107 |
| 4 | rs7041 | Controles | T | G | 12/18/10 | 0.45 | 0.4987 | 0.5371 |
| 11 | rs10741657 | Todos | A | G | 24/93/75 | 0.4844 | 0.4647 | 0.642 |
| 11 | rs10741657 | Casos | A | G | 21/73/58 | 0.4803 | 0.4704 | 0.8642 |
| 11 | rs10741657 | Controles | A | G | 3/20/17 | 0.5 | 0.4388 | 0.4894 |
| 12 | rs731236 | Todos | C | T | 21/103/70 | 0.5309 | 0.4681 | 0.09064 |
| 12 | rs731236 | Casos | C | T | 17/75/62 | 0.487 | 0.4573 | 0.4837 |
| 12 | rs731236 | Controles | C | T | 4/28/8 | 0.7 | 0.495 | 0.02309 |
| 12 | rs7975232 | Todos | A | C | 48/93/53 | 0.4794 | 0.4997 | 0.5677 |
| 12 | rs7975232 | Casos | A | C | 39/74/41 | 0.4805 | 0.4999 | 0.6309 |
| 12 | rs7975232 | Controles | A | C | 9/19/12 | 0.475 | 0.4972 | 0.7582 |
| 12 | rs1544410 | Todos | A | G | 24/102/68 | 0.5258 | 0.4743 | 0.1725 |
| 12 | rs1544410 | Casos | A | G | 18/76/60 | 0.4935 | 0.4628 | 0.4875 |
| 12 | rs1544410 | Controles | A | G | 6/26/8 | 0.65 | 0.4987 | 0.1103 |
| 12 | rs2228570 | Todos | T | C | 23/86/85 | 0.4433 | 0.4489 | 0.8733 |
| 12 | rs2228570 | Casos | T | C | 18/64/72 | 0.4156 | 0.4385 | 0.5809 |
| 12 | rs2228570 | Controles | T | C | 5/22/13 | 0.55 | 0.48 | 0.513 |
| 12 | rs11568820 | Todos | A | G | 11/69/114 | 0.3557 | 0.3591 | 0.8435 |
| 12 | rs11568820 | Casos | A | G | 10/53/91 | 0.3442 | 0.3617 | 0.5103 |
| 12 | rs11568820 | Controles | A | G | 1/16/23 | 0.4 | 0.3488 | 0.6521 |
| 12 | rs4646536 | Todos | G | A | 15/65/114 | 0.3351 | 0.3698 | 0.1794 |
| 12 | rs4646536 | Casos | G | A | 8/51/95 | 0.3312 | 0.3404 | 0.8122 |
| 12 | rs4646536 | Controles | G | A | 7/14/19 | 0.35 | 0.455 | 0.1666 |
| 12 | rs3782130 | Todos | C | G | 13/64/116 | 0.3316 | 0.3576 | 0.3156 |
| 12 | rs3782130 | Casos | C | G | 8/49/96 | 0.3203 | 0.3346 | 0.6283 |
| 12 | rs3782130 | Controles | C | G | 5/15/20 | 0.375 | 0.4297 | 0.4647 |
| 12 | rs10877012 | Todos | T | G | 13/65/116 | 0.3351 | 0.3591 | 0.3243 |
| 12 | rs10877012 | Casos | T | G | 8/50/96 | 0.3247 | 0.3367 | 0.6349 |
| 12 | rs10877012 | Controles | T | G | 5/15/20 | 0.375 | 0.4297 | 0.4647 |
| 20 | rs4809957 | Todos | G | A | 9/63/122 | 0.3247 | 0.3304 | 0.828 |
| 20 | rs4809957 | Casos | G | A | 5/53/96 | 0.3442 | 0.3254 | 0.6225 |
| 20 | rs4809957 | Controles | G | A | 04/10/2026 | 0.25 | 0.3488 | 0.07909 |
| 20 | rs6068816 | Todos | T | C | 7/40/147 | 0.2062 | 0.2396 | 0.06588 |
| 20 | rs6068816 | Casos | T | C | 5/30/119 | 0.1948 | 0.226 | 0.1397 |
| 20 | rs6068816 | Controles | T | C | 02/10/2028 | 0.25 | 0.2888 | 0.323 |

Chr: Cromosoma

Tabla 23. Equilibrio de Hardy-Weinberg (SLP).

| Chr | SNP | Muestra | Alelo Menor | Alelo Mayor | Genotipos contados | Heterocigosidad Observada | Heterocigosidad Esperada | p-valor |
|----------------|------------|-----------|----------------|----------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|---------|
| 4 | rs7041 | Todos | T | G | 41/89/64 | 0.4588 | 0.493 | 0.3817 |
| 4 | rs7041 | Casos | T | G | 32/80/58 | 0.4706 | 0.4883 | 0.6393 |
| 4 | rs7041 | Controles | T | G | 09/09/2006 | 0.375 | 0.4922 | 0.2415 |
| 11 | rs10741657 | Todos | A | G | 24/93/75 | 0.4844 | 0.4647 | 0.642 |
| 11 | rs10741657 | Casos | A | G | 23/81/64 | 0.4821 | 0.4702 | 0.8697 |
| 11 | rs10741657 | Controles | A | G | 01/12/2011 | 0.5 | 0.4132 | 0.6211 |
| 12 | rs731236 | Todos | C | T | 21/103/70 | 0.5309 | 0.4681 | 0.09064 |
| 12 | rs731236 | Casos | C | T | 17/88/65 | 0.5176 | 0.4601 | 0.1336 |
| 12 | rs731236 | Controles | C | T | 4/15/5 | 0.625 | 0.4991 | 0.4115 |
| 12 | rs7975232 | Todos | A | C | 48/93/53 | 0.4794 | 0.4997 | 0.5677 |
| 12 | rs7975232 | Casos | A | C | 42/80/48 | 0.4706 | 0.4994 | 0.4459 |
| 12 | rs7975232 | Controles | A | C | 6/13/5 | 0.5417 | 0.4991 | 1 |
| 12 | rs1544410 | Todos | A | G | 24/102/68 | 0.5258 | 0.4743 | 0.1725 |
| 12 | rs1544410 | Casos | A | G | 19/88/63 | 0.5176 | 0.4665 | 0.1893 |
| 12 | rs1544410 | Controles | A | G | 5/14/5 | 0.5833 | 0.5 | 0.6826 |
| 12 | rs2228570 | Todos | T | C | 23/86/85 | 0.4433 | 0.4489 | 0.8733 |
| 12 | rs2228570 | Casos | T | C | 22/72/76 | 0.4235 | 0.4496 | 0.4947 |
| 12 | rs2228570 | Controles | T | C | 1/14/9 | 0.5833 | 0.4444 | 0.1996 |
| 12 | rs11568820 | Todos | A | G | 11/69/114 | 0.3557 | 0.3591 | 0.8435 |
| 12 | rs11568820 | Casos | A | G | 11/59/100 | 0.3471 | 0.363 | 0.5316 |
| 12 | rs11568820 | Controles | A | G | 0/10/14 | 0.4167 | 0.3299 | 0.5394 |
| 12 | rs4646536 | Todos | G | A | 15/65/114 | 0.3351 | 0.3698 | 0.1794 |
| 12 | rs4646536 | Casos | G | A | 11/56/103 | 0.3294 | 0.3536 | 0.386 |
| 12 | rs4646536 | Controles | G | A | 04/09/2011 | 0.375 | 0.4575 | 0.3906 |
| 12 | rs3782130 | Todos | C | G | 13/64/116 | 0.3316 | 0.3576 | 0.3156 |
| 12 | rs3782130 | Casos | C | G | 11/53/105 | 0.3136 | 0.3453 | 0.2632 |
| 12 | rs3782130 | Controles | C | G | 02/11/2011 | 0.4583 | 0.4297 | 1 |
| 12 | rs10877012 | Todos | T | G | 13/65/116 | 0.3351 | 0.3591 | 0.3243 |
| 12 | rs10877012 | Casos | T | G | 11/54/105 | 0.3176 | 0.3471 | 0.2708 |
| 12 | rs10877012 | Controles | T | G | 02/11/2011 | 0.4583 | 0.4297 | 1 |
| 20 | rs4809957 | Todos | G | A | 9/63/122 | 0.3247 | 0.3304 | 0.828 |
| 20 | rs4809957 | Casos | G | A | 6/56/108 | 0.3294 | 0.32 | 0.8142 |
| 20 | rs4809957 | Controles | G | A | 03/07/2014 | 0.2917 | 0.395 | 0.2912 |
| 20 | rs6068816 | Todos | T | C | 7/40/147 | 0.2062 | 0.2396 | 0.06588 |
| 20 | rs6068816 | Casos | T | C | 5/34/131 | 0.2 | 0.2253 | 0.1635 |
| 20 | rs6068816 | Controles | T | C | 02/06/2016 | 0.25 | 0.3299 | 0.2324 |
| Chr: Cromosoma | | | | | | | | |

Tabla 24. Desequilibrio de ligamiento.

| Chr | BP | SNP | Chr | BP | SNP | R2 | D' |
|-----|----------|-----------|-----|----------|------------|----------|-------|
| 12 | 47844974 | rs731236 | 12 | 47845054 | rs7975232 | 0.512229 | 0.938 |
| 12 | 47844974 | rs731236 | 12 | 47846052 | rs1544410 | 0.940695 | 1.000 |
| 12 | 47845054 | rs7975232 | 12 | 47846052 | rs1544410 | 0.540406 | 0.941 |
| 12 | 57764205 | rs4646536 | 12 | 57768115 | rs3782130 | 0.949924 | 1.000 |
| 12 | 57764205 | rs4646536 | 12 | 57768302 | rs10877012 | 0.950085 | 1.000 |
| 12 | 57768115 | rs3782130 | 12 | 57768302 | rs10877012 | 1 | 1.000 |

Chr: Cromosoma; BP: Posición física (Pares de base)

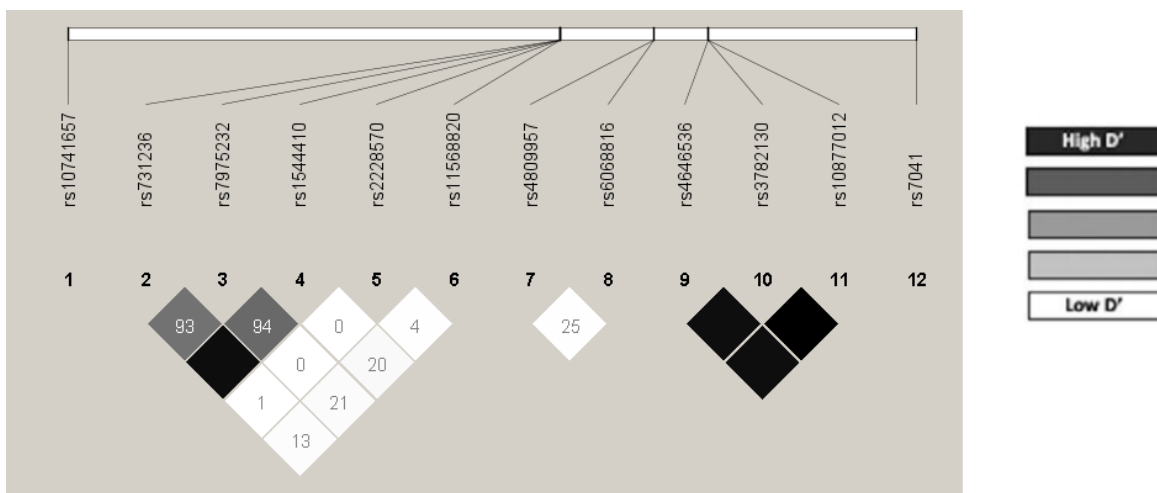


Figura 20. Desequilibrio de ligamento

5.3.4 Influencia de los polimorfismos genéricos en la supervivencia

5.3.4.1 Población general

5.3.4.1.1 Supervivencia global

El análisis bivalente mostró que la SG se asociaba al polimorfismo genético *CYP27B1* rs4646536 (Tabla 25). En particular, los pacientes portadores del alelo A tenían un mayor riesgo de muerte en comparación con aquellos portadores del genotipo GG ($p=0.0021$; HR=2.32; CI_{95%}=1.13-4.73; Tabla 25). La curva Kaplan-Meier para la SG según el alelo A del polimorfismo genético *CYP27B1* rs4646536 se muestra en la Figura 21 ($p_{\log\text{-rank}}=0.020$). La mediana la SG fue de 92.9 (CI_{95%}=34.1-NR) meses para el genotipo GG. Para los genotipos AG y GG, la mediana de SG fue de 24.9 (CI_{95%}=22.7-38.0) y 27.0 (IC_{95%}=23.2-41.8) meses, respectivamente. La regresión de Cox ajustada por género, estadio tumoral y primera línea de tratamiento mostró que el polimorfismo *CYP27B1*

rs4646536 presentó una tendencia a la asociación con la SG (p=0.0569; HR=2.01; CI_{95%}=0.98-4.14) (p_{likelihood ratio test}=<2·10⁻¹⁶) (Tabla 26).

Tabla 25. Polimorfismos y asociación con la supervivencia global de los 194 pacientes con NSCLC.

| Gen | SNPs | Genotipo | N | SG | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------|------|------------|--------------|------------|------------------|-----------|---------------------------|-----------|---------|--------------|
| | | | | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-valor | Cat Ref | Modelo de Cox Univariante | | | |
| | | | | | | | | | HR | IC95% | p-valor | |
| CPY27B1 | rs4646536 | AA | 114 | 95 | 27.0 | 23.2-41.8 | 0.060 | G | 2.318 | 1.13-4.73 | 0.0211 | |
| | | AG | 65 | 51 | 24.9 | 22.7-38.0 | | | | | | |
| | | GG | 15 | 8 | 92.9 | 34.1-NR | | | | | | |
| | | G | 80 | 59 | 28.1 | 23.8-41.6 | | | | | | |
| | rs3782130 | CC | 13 | 8 | 41.8 | 32.0-NR | 0.200 | | | | | |
| | | GC | 64 | 49 | 26.4 | 23.4-39.1 | | | | | | |
| | | GG | 116 | 96 | 27.0 | 23.2-41.8 | | | | | | |
| | | C | 77 | 57 | 28.1 | 24.3-41.6 | | | | | | |
| | rs10877012 | G | 180 | 145 | 26.7 | 23.9-33.8 | 0.100 | | | | | |
| | | TT | 13 | 8 | 41.8 | 32.0-NR | | | | | | |
| | | GT | 65 | 50 | 26.1 | 23.4- 39.1 | | | | | | |
| | | GG | 116 | 96 | 27.0 | 23.2- 41.8 | | | | | | |
| | | T | 78 | 58 | 28.1 | 23.8- 41.6 | | | | | | |
| G | 181 | 146 | 26.7 | 23.8- 33.8 | 0.090 | T | 1.826 | 0.89-3.73 | 0.0988 | | | |
| CYP24A1 | rs6068816 | CC | 147 | 119 | 30.0 | 24.50-39.6 | 0.900 | | | | | |
| | | CT | 40 | 30 | 27.7 | 22.70-52.2 | | | | | | |
| | | TT | 7 | 5 | 17.6 | 6.47-NR | | | | | | |
| | | C | 187 | 149 | 28.1 | 24.50-38 | | | | | | |
| | rs4809957 | T | 47 | 35 | 26.9 | 19.0-43.1 | 1.000 | | | | | |
| | | GG | 9 | 5 | 60.7 | 26.9-NR | | | | | | |
| | | GA | 63 | 53 | 25.4 | 20.9-41.7 | 0.300 | | | | | |
| | | AA | 122 | 96 | 30.0 | 23.4-38.0 | | | | | | |
| | | G | 72 | 58 | 26.7 | 23.8-41.8 | 0.900 | | | | | |
| | | A | 185 | 149 | 27.0 | 23.9-35.2 | 0.200 | | | | | |
| GC | rs7041 | TT | 41 | 29 | 39.6 | 22.1-114.4 | 0.300 | | | | | |
| | | TG | 89 | 71 | 25.4 | 23.2- 42.5 | | | | | | |
| | | GG | 64 | 54 | 26.7 | 21.1-36.5 | | | | | | |
| | | T | 130 | 100 | 30.0 | 23.9-42.5 | | | | | | 0.300 |
| | | G | 153 | 125 | 26.1 | 23.7-33.8 | | | | | | 0.100 |
| CYP2R1 | rs10741657 | GG | 75 | 58 | 27.9 | 21.0-45.9 | 0.100 | G | 1.585 | 0.99-2.52 | 0.0525 | |
| | | GA | 93 | 73 | 35.2 | 24.9-45.9 | | | | | | |
| | | AA | 24 | 21 | 23.4 | 19.5-38.0 | | | | | | |
| | | G | 168 | 131 | 30.8 | 24.9-41.7 | | | | | | 0.050 |
| | | A | 117 | 94 | 30.8 | 24.3-41.6 | | | | | | 0.400 |
| | | G | 170 | 136 | 28.1 | 24.5-38.9 | | | | | | 0.600 |
| VDR | rs1544410 (BsmI) | AA | 24 | 18 | 22.1 | 17.5-54.3 | 0.500 | | | | | |
| | | AG | 102 | 76 | 30.7 | 24.2-45.9 | | | | | | |
| | | GG | 68 | 60 | 26.1 | 23.8-42.5 | | | | | | |
| | | A | 126 | 94 | 30.1 | 23.1-41.6 | | | | | | 0.400 |
| | | G | 170 | 136 | 28.1 | 24.5-38.9 | | | | | | 0.600 |
| | rs11568820 (Cdx-2) | AA | 11 | 10 | 24.3 | 22.1-NR | 0.400 | | | | | |
| | | AG | 69 | 53 | 26.1 | 21.0-45.3 | | | | | | |
| | | GG | 114 | 91 | 30.0 | 24.5-43.1 | | | | | | |
| | | A | 80 | 63 | 25.4 | 22.7-38.0 | | | | | | 0.500 |
| | | G | 183 | 144 | 27.9 | 24.5-39.1 | | | | | | 0.200 |
| | rs2228570 (FokI) | CC | 85 | 72 | 26.7 | 23.4-41.6 | 0.600 | | | | | |
| | | CT | 86 | 64 | 30.7 | 23.8-45.9 | | | | | | |
| | | TT | 23 | 18 | 24.9 | 22.1-47.4 | | | | | | |
| | | C | 171 | 136 | 27.9 | 24.3-38.0 | | | | | | 0.600 |
| | | T | 109 | 82 | 30.1 | 23.8-41.8 | | | | | | 0.500 |
| | rs7975232 (ApaI) | AA | 48 | 39 | 22.7 | 17.5-39.6 | 0.400 | | | | | |
| | | AC | 93 | 74 | 26.9 | 23.7-38.9 | | | | | | |
| | | CC | 53 | 41 | 39.1 | 24.5-64.7 | | | | | | |
| | | A | 141 | 113 | 26.7 | 22.7-32.2 | | | | | | 0.400 |
| | | C | 146 | 115 | 30.0 | 24.9-42.5 | | | | | | 0.200 |
| rs731236 (TaqI) | CC | 21 | 17 | 19.0 | 11.6-54.3 | 0.200 | | | | | | |
| | CT | 103 | 75 | 32.2 | 26.4-52.6 | | | | | | | |
| | TT | 70 | 62 | 25.8 | 23.8-39.1 | | | | | | | |
| | C | 124 | 92 | 30.7 | 23.1-41.7 | | | | | | 0.300 | |
| | T | 173 | 137 | 30.0 | 24.9-39.1 | | | | | | 0.300 | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; Ref: Referencia

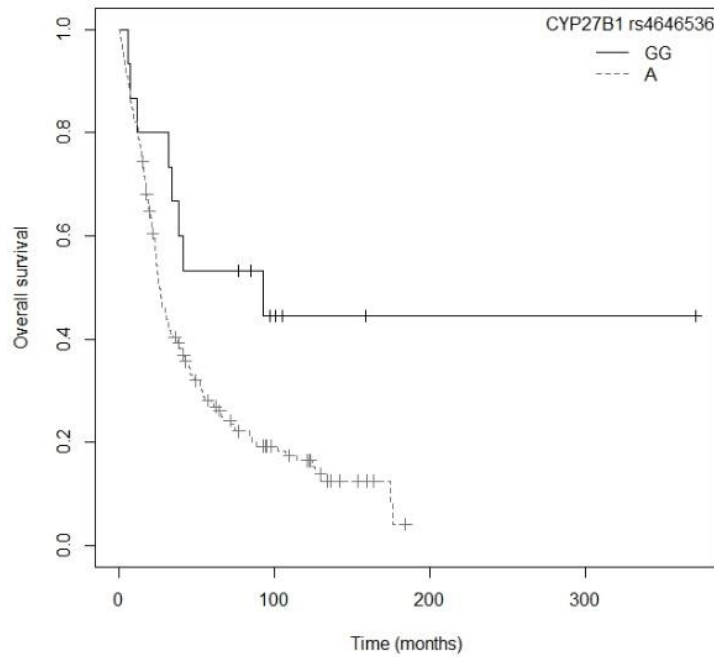


Figura 21. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo A del polimorfismo genético *CYP27B1* rs4646536 en 194 pacientes con NSCLC.

Tabla 26. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia global de 194 pacientes con NSCLC.

| | Supervivencia global | |
|---|-------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-valor |
| Genero (Masculino) | 1.63 (1.11-2.38) | 0.0119 |
| Estadio tumoral (IIIB-IV) | 2.25 (1.25-4.07) | 0.0070 |
| Primera línea de tratamiento (No cirugía) | 2.65 (1.31-5.35) | 0.0064 |
| <i>CYP27B1</i> rs4646536-A | 2.01 (0.98-4.14) | 0.0569 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de confianza.

5.3.4.1.2 Supervivencia libre de progresión

Los pacientes portadores del alelo A para el polimorfismo genético *CYP27B1* rs4646536 presentaron un mayor riesgo de progresión en comparación con aquellos portadores del genotipo GG ($p=0.0266$; HR=2.07; CI_{95%}=1.08-3.93; Tabla 27). La curva Kaplan-Meier para la SLP según el alelo A del polimorfismo *CYP27B1* rs4646536 se muestra en la Figura 22 ($p_{\log\text{-rank}}=0.020$). La mediana la SLP fue de 30.0 (IC_{95%}=12.3-NR) meses para el genotipo GG. Para los portadores AG y GG, la mediana de SLP fue de 12.3 (CI_{95%}=9.17-17.6) y 13.3 (CI_{95%}=10.9-17.6) meses, respectivamente. La regresión de Cox ajustada por la primera línea de tratamiento mostró que el polimorfismo genético *CYP27B1* rs4646536 estaba

asociado con la SLP ($p=0.0233$; $HR=2.11$; $CI_{95\%}=1.11-4.04$) ($p_{\text{likelihood ratio test}}=1 \cdot 10^{-12}$) (Tabla 28).

Tabla 27. Polimorfismos y asociación con la supervivencia libre de progresión de los 194 pacientes con NSCLC.

| Gen | SNPs | Genotipo | N | SLP | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------|-----|---------|-----------|------------|------------------|---------|---------|-----------|---------|-------|----|-------|-----------|--------|
| | | | | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-value | Cat Ref | Eventos | | | | | | | |
| | | | | | | | | | HR | IC95% | p-valor | | | | | |
| CPY27B1 | rs4646536 | AA | 114 | 103 | 13.3 | 10.93-17.6 | 0.070 | | | | | | | | | |
| | | AG | 65 | 56 | 12.3 | 9.17-17.6 | | | | | | | | | | |
| | | GG | 15 | 11 | 30.0 | 12.30-NR | | | | | | | | | | |
| | | A | 179 | 159 | 13.0 | 10.9-16.8 | | | | | | 0.020 | GG | 2.069 | 1.08-3.93 | 0.0266 |
| | | G | 80 | 67 | 14.2 | 10.3-17.9 | | | | | | 0.600 | | | | |
| | rs3782130 | CC | 13 | 11 | 24.5 | 10.7-NR | 0.400 | | | | | | | | | |
| | | GC | 64 | 53 | 14.2 | 10.2-17.9 | | | | | | | | | | |
| | | GG | 116 | 105 | 13.1 | 10.9-17.6 | | | | | | | | | | |
| | | C | 77 | 64 | 14.6 | 10.7-18.7 | | | | | | 0.400 | | | | |
| | rs10877012 | G | 180 | 158 | 13.3 | 11.0-17.1 | 0.200 | | | | | | | | | |
| | | TT | 13 | 11 | 24.5 | 10.7-NR | | | | | | | | | | |
| | | GT | 65 | 54 | 14.2 | 10.1-17.9 | 0.400 | | | | | | | | | |
| GG | | 116 | 105 | 13.1 | 10.9-17.6 | 0.400 | | | | | | | | | | |
| T | | 78 | 65 | 14.4 | 10.7-18.7 | 0.400 | | | | | | | | | | |
| CYP24A1 | rs6068816 | G | 181 | 159 | 13.2 | 11.0-17.1 | 0.200 | | | | | | | | | |
| | | CC | 147 | 131 | 14.2 | 11.93-17.6 | 1.000 | | | | | | | | | |
| | | CT | 40 | 34 | 11.9 | 9.07-21.6 | | | | | | | | | | |
| | | TT | 7 | 5 | 8.5 | 4.27-NR | | | | | | | | | | |
| | rs4809957 | C | 187 | 165 | 14.2 | 11.87-17.1 | 0.900 | | | | | | | | | |
| | | T | 47 | 39 | 11.2 | 8.5-19.6 | 0.800 | | | | | | | | | |
| | | GG | 9 | 6 | 36.1 | 13.5-NR | 0.200 | | | | | | | | | |
| | | GA | 63 | 56 | 15.9 | 10.2-19.6 | | | | | | | | | | |
| | | AA | 122 | 108 | 13.0 | 10.9-16.7 | 0.400 | | | | | | | | | |
| | | G | 72 | 62 | 17.0 | 10.7-20.2 | | | | | | | | | | |
| GC | rs7041 | A | 185 | 164 | 13.0 | 11.0-16.8 | 0.080 | G | 2.03 | 0.89-4.59 | 0.0891 | | | | | |
| | | TT | 41 | 32 | 15.6 | 10.2-37.1 | 0.300 | | | | | | | | | |
| | | TG | 89 | 80 | 13.2 | 10.5-17.6 | | | | | | | | | | |
| | | GG | 64 | 58 | 14.4 | 10.7-18.7 | 0.500 | | | | | | | | | |
| | | G | 153 | 138 | 13.5 | 11.0-17.1 | 0.100 | | | | | | | | | |
| CYP2R1 | rs10741657 | GG | 75 | 64 | 14.2 | 10.07-19.2 | 0.300 | | | | | | | | | |
| | | GA | 93 | 81 | 13.9 | 10.93-18.7 | | | | | | | | | | |
| | | AA | 24 | 23 | 12.7 | 9.07-21.8 | 0.100 | | | | | | | | | |
| | | G | 168 | 145 | 14.1 | 11.87-17.5 | | | | | | | | | | |
| | | A | 117 | 104 | 13.9 | 11.0-17.6 | | 0.500 | | | | | | | | |
| VDR | rs154410 (BsmI) | AA | 24 | 19 | 15.0 | 9.07-30.0 | 0.900 | | | | | | | | | |
| | | AG | 102 | 88 | 12.5 | 10.50-17.5 | | | | | | | | | | |
| | | GG | 68 | 63 | 15.6 | 11.17-20.0 | 0.700 | | | | | | | | | |
| | | A | 126 | 107 | 13.1 | 10.2-17.1 | | | | | | | | | | |
| | | G | 170 | 151 | 13.3 | 11.20-17.1 | | | | | | | | | | |
| | rs11568820 (Cdx-2) | AA | 11 | 11 | 16.1 | 13.2-NR | 0.600 | | | | | | | | | |
| | | AG | 69 | 59 | 10.7 | 7.7-17.6 | | | | | | | | | | |
| | | GG | 114 | 100 | 15.6 | 12.0-19.2 | 0.400 | | | | | | | | | |
| | | A | 80 | 70 | 11.9 | 10.0-17.1 | | | | | | | | | | |
| | | G | 183 | 159 | 13.0 | 11.0-17.1 | | | | | | | | | | |
| | rs2228570 (FokI) | CC | 85 | 76 | 14.6 | 11.2-17.7 | 0.600 | | | | | | | | | |
| | | CT | 86 | 72 | 12.9 | 10.3-18.7 | | | | | | | | | | |
| | | TT | 23 | 22 | 12.7 | 10.9-24.9 | 0.400 | | | | | | | | | |
| | | C | 171 | 148 | 14.2 | 10.9-17.5 | | | | | | | | | | |
| | | T | 109 | 94 | 12.7 | 10.7-17.9 | | 0.900 | | | | | | | | |
| | rs7975232 (ApaI) | AA | 48 | 42 | 11.8 | 9.07-17.7 | 0.600 | | | | | | | | | |
| | | AC | 93 | 80 | 13.5 | 10.50-18.4 | | | | | | | | | | |
| | | CC | 53 | 48 | 15.6 | 10.97-21.8 | 0.800 | | | | | | | | | |
| | | A | 141 | 122 | 12.8 | 10.5-17.5 | | | | | | | | | | |
| | | C | 146 | 128 | 14.2 | 11.87-17.6 | | 0.300 | | | | | | | | |
| rs731236 (TaqI) | CC | 21 | 17 | 10.0 | 6.7-30.0 | 0.900 | | | | | | | | | | |
| | CT | 103 | 88 | 13.5 | 10.7-17.7 | | | | | | | | | | | |
| | TT | 70 | 65 | 15.6 | 11.2-19.4 | 0.600 | | | | | | | | | | |
| | C | 124 | 105 | 13.1 | 10.2-17.1 | | | | | | | | | | | |
| | T | 173 | 153 | 14.2 | 11.4-17.6 | | 1.000 | | | | | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; Cat Ref: Referencia

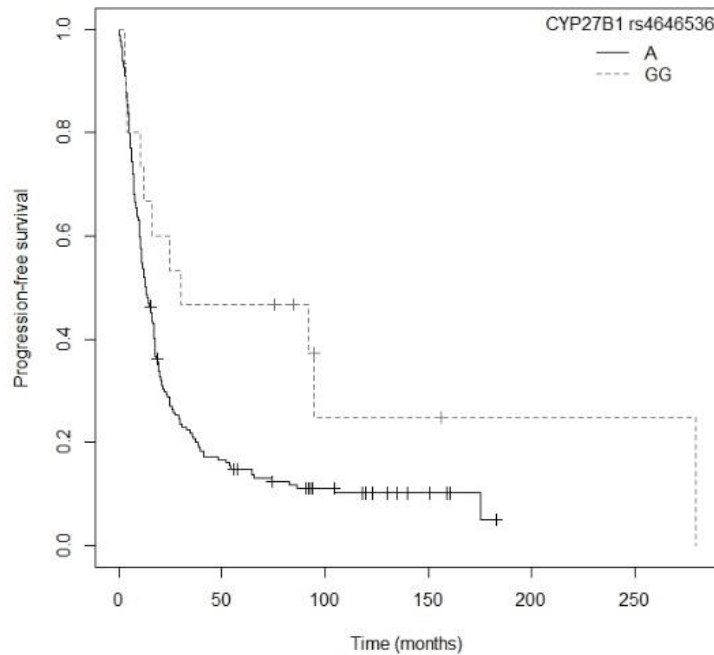


Figura 22. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión según el alelo A del polimorfismo genético *CYP27B1* rs4646536 en 194 pacientes con NSCLC.

Tabla 28. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia libre de progresión de 194 pacientes con NSCLC.

| | Supervivencia libre de progresión | |
|---|-----------------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-valor |
| Primera línea de tratamiento (no cirugía) | 3.89 (2.54-5.96) | <0.001 |
| <i>CYP27B1</i> rs4646536_A | 2.11 (1.11-4.04) | 0.0233 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de confianza.

5.3.4.2 Análisis de subgrupos

5.3.4.2.1 Supervivencia global

En el subgrupo de pacientes NSCLC resecao, los portadores del genotipo GG para el polimorfismo *GC* rs7041 tenían un mayor riesgo de muerte en comparación con aquellos con alelo T ($p=0.0242$; $HR=2.72$; $CI_{95\%}=1.14-6.47$; Tabla 29). La mediana de la SG para los genotipos GG fue de 61.2 ($CI_{95\%}=24.3-NR$) meses, mientras que para los genotipos GT y TT fue de 107.6 ($CI_{95\%}=75.0-NR$) y 176.1 ($CI_{95\%}=126.4-NR$), meses, respectivamente. Las curvas Kaplan-Meier para SG según el alelo T para el polimorfismo *GC* rs7041 se muestran en la Figura 23 ($p_{\log-rank}=0.020$). Del mismo modo, los pacientes portadores del genotipo AA para el polimorfismo genético *VDR* (*Cdx-2*; rs11568820) se asociaron con

mayor riesgo de muerte respecto a los que tenían el genotipo GG ($p=0.0129$; $HR=7.43$; $CI_{95\%}=1.53-36.15$; Tabla 29). Las curvas Kaplan-Meier para SG según el alelo G para el polimorfismo *VDR* (*Cdx-2*; rs11568820) se muestran en la Figura 24 ($p_{\log-rank}=0.003$). La mediana de la SG para el genotipo GG fue de 130.0 ($CI_{95\%}=107.6-NR$) meses y para el genotipo AA fue de 27.2 ($CI_{95\%}=24.3-NR$) meses, mientras que para el genotipo AG no se alcanzó. La regresión de Cox multivariante, ajustada por antecedentes familiares de cáncer, mostró que el polimorfismo genético *VDR* (*Cdx-2*; rs11568820) era el único factor independiente asociado a la SG en pacientes con NSCLC reseado ($p=0.0129$; $HR=7.43$; $CI_{95\%}=1.53-36.15$) ($p_{\text{likelihood ratio test}}=0.04$) (tabla 30).

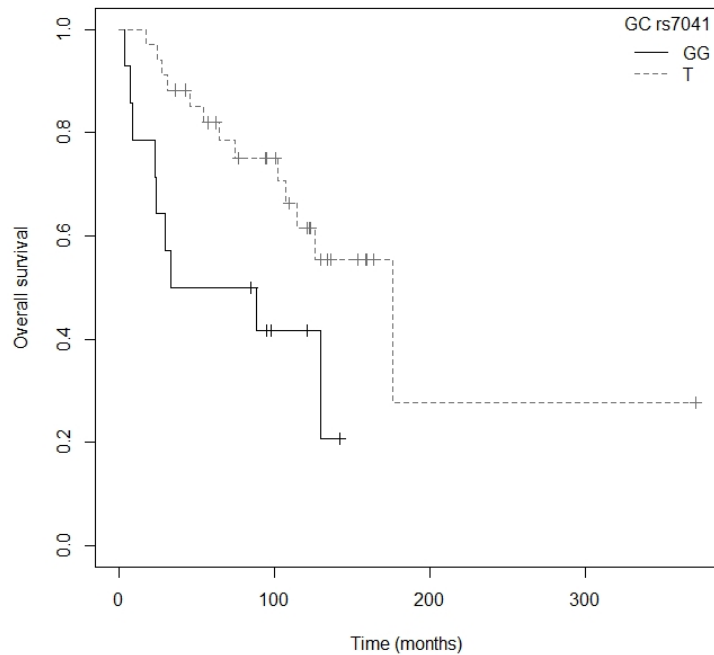


Figura 23. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo T del polimorfismo genético GC rs7041 en el subgrupo NSCLC reseado

Tabla 29. Polimorfismos y asociación con la supervivencia global de los pacientes con NSCLC resecaado.

| Gen | SNPs | Genotipo | N | SG | | | | | | | | | | | |
|---------|--------------------|------------|-------|----------|--------------|--------------|------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|--------------|-------|------------|--------|
| | | | | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-value | Ref Cat | Eventos | | | | | | |
| | | | | | | | | | HR | IC95% | p-value | | | | |
| CPY27B1 | rs4646536 | AA | 29 | 17 | 108 | 64.7-NR | 0.080 | | | | | | | | |
| | | AG | 14 | 5 | NR | 102.5-NR | | | | | | | | | |
| | | GG | 5 | 0 | NR | NR-NR | | | | | | | | | |
| | | A | 43 | 22 | 126 | 88.6-NR | | | | | | 0.050 | | | |
| | | rs3782130 | G | 19 | 5 | NR | 114.4-NR | 0.060 | G | 2.54 | 0.93-6.89 | 0.0676 | | | |
| | | | CC | 3 | 0 | NR | NR-NR | 0.100 | | | | | | | |
| | | | GC | 15 | 5 | NR | 102.5-NR | | | | | | | | |
| | | | GG | 30 | 17 | 126 | 64.7-NR | | | | | | | | |
| | C | 18 | 5 | NR | 114.4-NR | 0.070 | C | | | | | | 2.42 | 0.89-6.59 | 0.0827 |
| | | rs10877012 | G | 45 | 22 | 126 | 103-NR | 0.100 | | | | | | | |
| | | | TT | 3 | 0 | NR | NR-NR | 0.100 | | | | | | | |
| | | | GT | 15 | 5 | NR | 102.5-NR | | | | | | | | |
| GG | | | 30 | 17 | 126 | 64.7-NR | | | | | | | | | |
| | | T | 18 | 5 | NR | 114.4-NR | 0.070 | | T | 2.42 | 0.89-6.58 | 0.0827 | | | |
| | | G | 45 | 22 | 126 | 103-NR | 0.100 | | | | | | | | |
| | | CC | 39 | 21 | 114 | 75-NR | 0.200 | | | | | | | | |
| | | CT | 7 | 1 | NR | NR-NR | | | | | | | | | |
| TT | 2 | 0 | NR | NR-NR | | | | | | | | | | | |
| C | 46 | 22 | 126 | 103-NR | 0.300 | | | | | | | | | | |
| | rs6068816 | T | 9 | 1 | NR | NR-NR | 0.080 | T | 4.99 | 0.67-37.2 | 0.117 | | | | |
| | | GG | 5 | 1 | NR | NR-NR | 0.700 | | | | | | | | |
| | | GA | 15 | 8 | 114 | 75.0-NR | | | | | | | | | |
| | | AA | 28 | 13 | 176 | 88.6-NR | | | | | | | | | |
| G | 20 | 9 | 130 | 107.6-NR | 0.800 | | | | | | | | | | |
| | | A | 43 | 21 | 126 | 103-NR | 0.500 | | | | | | | | |
| | | TT | 12 | 3 | 176.1 | 126.4-NR | 0.030 | | | | | | | | |
| | | TG | 22 | 10 | 107.6 | 75.0-NR | | | | | | | | | |
| | | GG | 14 | 9 | 61.2 | 24.3-NR | | | | | | | | | |
| T | 34 | 13 | 176.1 | 114.4-NR | 0.020 | T | | 2.72 | 1.14-6.47 | 0.0242 | | | | | |
| | rs7041 | G | 36 | 19 | 108 | 54.3-NR | 0.050 | | | | | | | | |
| | | GG | 23 | 12 | 126.4 | 64.7-NR | 0.800 | | | | | | | | |
| | | GA | 23 | 9 | 130.0 | 107.6-NR | | | | | | | | | |
| | | AA | 2 | 1 | 24.3 | 24.3-NR | | | | | | | | | |
| | rs10741657 | G | 46 | 21 | 130.0 | 102.5-NR | | 0.900 | | | | | | | |
| | | A | 25 | 10 | 130 | 107.6-NR | 0.600 | | | | | | | | |
| | | AA | 7 | 2 | NR | 54.3-NR | 0.600 | | | | | | | | |
| | | AG | 27 | 11 | 130 | 102.5-NR | | | | | | | | | |
| GG | 14 | 9 | 108 | 64.7-NR | | | | | | | | | | | |
| A | 34 | 13 | 130 | 102.5-NR | 0.400 | | | | | | | | | | |
| | rs1544410 (BsmI) | G | 41 | 20 | 126 | 102.5-NR | 0.600 | | | | | | | | |
| | | AA | 2 | 2 | 27.2 | 24.3-NR | 0.010 | | | | | | | | |
| | | AG | 16 | 5 | NR | 102.5-NR | | | | | | | | | |
| | | GG | 30 | 15 | 126.4 | 107.6-NR | | | | | | | | | |
| | rs11568820 (Cdx-2) | A | 18 | 7 | NR | 88.6-NR | | 0.900 | | | | | | | |
| | | G | 46 | 20 | 130.0 | 107.6-NR | 0.003 | G | | | | | 7.434 | 1.53-36.15 | 0.0129 |
| | | CC | 21 | 10 | 126 | 75.0-NR | 1.000 | | | | | | | | |
| | | CT | 22 | 10 | 114 | 88.6-NR | | | | | | | | | |
| TT | 5 | 2 | 130 | 130.0-NR | | | | | | | | | | | |
| C | 43 | 20 | 126 | 103-NR | 0.900 | | | | | | | | | | |
| | rs2228570 (FokI) | T | 27 | 12 | 130 | 88.6-NR | 0.900 | | | | | | | | |
| | | AA | 12 | 5 | 103 | 75.0-NR | 1.000 | | | | | | | | |
| | | AC | 22 | 10 | 130 | 45.0-NR | | | | | | | | | |
| | | CC | 14 | 7 | 126 | 88.6-NR | | | | | | | | | |
| | rs7975232 (ApaI) | A | 34 | 15 | 130 | 102.5-NR | | 0.900 | | | | | | | |
| | | C | 36 | 17 | 130 | 108-NR | 1.000 | | | | | | | | |
| | | CC | 6 | 2 | NR | 54.3-NR | 0.700 | | | | | | | | |
| | | CT | 28 | 11 | 130 | 102.5-NR | | | | | | | | | |
| TT | 14 | 9 | 108 | 64.7-NR | | | | | | | | | | | |
| C | 34 | 13 | 130 | 102.5-NR | 0.400 | | | | | | | | | | |
| | rs731236 (TaqI) | T | 42 | 20 | 126 | 102.5-NR | 0.800 | | | | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; Ref: Referencia

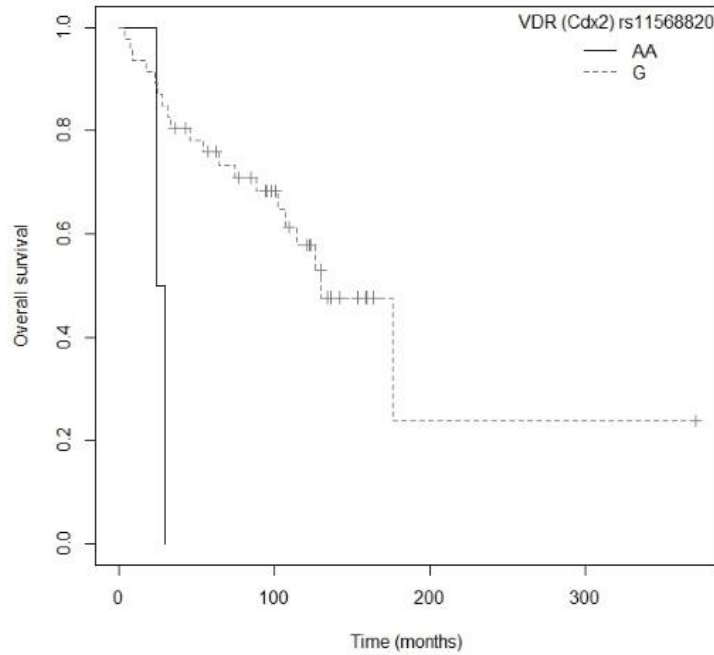


Figura 24. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo G del polimorfismo genético VDR (Cdx-2; rs11568820) en el subgrupo NSCLC resecao.

Tabla 30. Influencia de las características clínicas y los polimorfismos genéticos en la supervivencia global de los pacientes con NSCLC resecao.

| | Supervivencia global | |
|-------------------|----------------------|---------|
| | HR (CI95%) | p-valor |
| VDR rs11568820_AA | 7.43 (1.53-36.15) | 0.0129 |

HR=hazard ratio. CI95%: 95% Intervalo de confianza.

En el subgrupo de pacientes con NSCLC no resecaos, el genotipo TT para el polimorfismo CYP24A1 rs6068816 se asoció con un mayor riesgo de muerte respecto a los portadores del alelo C ($p=0.0048$; HR=3.75; CI_{95%}=1.49-9.41; Tabla 31). La Figura 25 muestra las curvas Kaplan-Meier para la SG según el alelo C para el polimorfismo CYP24A1 rs6068816 ($p_{\log\text{-rank}}=0.009$). La mediana de SG para pacientes portadores de genotipo TT fue de 12.4 (CI_{95%}=6.47-NR) meses, mientras que para los genotipos CC y CT fue de 23.4 (CI_{95%}=20.1-27.0) y 24.5 (CI_{95%}=16.0-38.9) meses, respectivamente. Por otro lado, tres de los cinco polimorfismos genéticos del gen VDR mostraron asociación con la SG. En primer lugar, los pacientes portadores del genotipo AA para el polimorfismo VDR (BsmI; rs1544410) revelaron mayor riesgo de muerte en comparación con los

portadores del alelo G ($p=0.0073$; $HR=2.08$; $CI_{95\%}=1.22-3.56$; Tabla 31). La mediana de SG para el genotipo AA fue de 17.5 ($CI_{95\%}=9.77-34.1$) meses, mientras que para los genotipos AG y GG fue de 23.7 ($CI_{95\%}=16.1-32.0$) y 24.5 ($CI_{95\%}=21.1-32.2$) meses, respectivamente. La Figura 26 muestra las curvas Kaplan-Meier para la SG según el alelo G para VDR (BsmI; rs1544410) ($p_{\log\text{-rank}}=0.020$). En segundo lugar, los portadores del genotipo AA para VDR (ApaI; rs7975232) mostraron mayor riesgo de muerte respecto a los portadores del alelo C ($p=0.0068$; $HR=1.733$; $CI_{95\%}=1.16-2.58$; Tabla 31). La mediana de SG para el genotipo AA fue de 16.1 ($CI_{95\%}=12.3-27.7$) meses, mientras que para los genotipos AC y CC fue de 24.2 ($CI_{95\%}=20.1-30.0$) y 24.9 ($CI_{95\%}=22.1-43.1$) meses, respectivamente. La Figura 27 muestra las curvas Kaplan-Meier para la SG según el alelo C para VDR (ApaI; rs7975232) ($p_{\log\text{-rank}}=0.020$). Finalmente, los portadores del genotipo CC para VDR (TaqI; rs731236) presentaron mayor riesgo de muerte en relación con los pacientes portadores del alelo T ($p=0.0014$; $HR=2.47$; $CI_{95\%}=1.42-4.28$; Tabla 31). La mediana de SG para el genotipo CC fue de 11.9 ($CI_{95\%}=8.30-22.7$) meses, mientras que para los genotipos CT y TT fue de 25.4 ($CI_{95\%}=18.3-36.5$) y 24.2 ($CI_{95\%}=21.1-32.2$) meses, respectivamente. La Figura 28 muestra las curvas Kaplan-Meier para la SG según el alelo T para VDR (TaqI; rs731236) ($p_{\log\text{-rank}}=0.004$). La regresión de Cox ajustada por género, estatus alcohólico y estadio mostró que los polimorfismos genéticos *CYP24A1* rs6068816 ($p=0.0089$; $HR=3.47$; $CI_{95\%}=1.37-8.79$) y VDR (TaqI; rs731236) ($p=0.0005$; $HR=2.71$; $CI_{95\%}=1.55-4.75$) eran los únicos factores independientes asociados con la SG en pacientes con NSCLC no resecaado ($p_{\text{likelihood ratio test}}=0.000002$) (tabla 32).

Tabla 31. Polimorfismos y asociación con la supervivencia global de los pacientes con NSCLC no reseado.

| Gen | SNPs | Genotipo | N | SG | | | | | | | | |
|---|--------------------|-----------|------|-----------|-----------|-----------|------------------|---------|---------|-------|---------|--|
| | | | | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-value | Ref Cat | Eventos | | | |
| | | | | | | | | | HR | IC95% | p-value | |
| CPY27B1 | rs4646536 | AA | 85 | 78 | 22.1 | 18.8-27.9 | 0.200 | | | | | |
| | | AG | 51 | 46 | 22.7 | 17.1-26.9 | | | | | | |
| | | GG | 10 | 8 | 36.5 | 11.9-NR | | | | | | |
| | | rs3782130 | A | 136 | 124 | 22.7 | 19.0-25.8 | 0.100 | | | | |
| | G | | 61 | 54 | 23.7 | 18.3-32.0 | 0.900 | | | | | |
| | CC | | 10 | 8 | 36.5 | 11.9-NR | 0.200 | | | | | |
| | GC | | 49 | 44 | 23.4 | 17.1-27.7 | | | | | | |
| | GG | | 86 | 79 | 22.4 | 18.8-27.0 | | | | | | |
| | rs10877012 | | C | 59 | 52 | 23.8 | 18.3-32.2 | 1.000 | | | | |
| | | | G | 135 | 123 | 22.7 | 19.0-25.8 | 0.100 | | | | |
| | | TT | 10 | 8 | 36.5 | 11.9-NR | 0.200 | | | | | |
| | | GT | 50 | 45 | 23.4 | 16.1-27.7 | | | | | | |
| | | GG | 86 | 79 | 22.4 | 18.8-27.0 | | | | | | |
| CYP24A1 | rs6068816 | T | 60 | 53 | 23.8 | 18.3-32.0 | 1.000 | | | | | |
| | | G | 136 | 124 | 22.7 | 19.0-25.8 | 0.100 | | | | | |
| | | CC | 108 | 98 | 23.4 | 20.1-27.0 | 0.009 | | | | | |
| | | CT | 33 | 29 | 24.5 | 16.0-38.9 | | | | | | |
| | rs4809957 | TT | 5 | 5 | 12.4 | 6.47-NR | 0.700 | | | | | |
| | | C | 141 | 127 | 23.7 | 20.9-27.0 | | | | | | |
| | | T | 38 | 34 | 21.1 | 15.5-30.7 | | | | | | |
| | | rs7041 | GG | 4 | 4 | 28.8 | 15.2-NR | 0.500 | | | | |
| | | | GA | 48 | 45 | 20.9 | 17.5-26.7 | | | | | |
| | | | AA | 94 | 83 | 23.1 | 18.8-32.0 | 0.900 | | | | |
| G | 52 | | 49 | 23.7 | 17.5-26.9 | | | | | | | |
| GC | rs7041 | A | 142 | 128 | 23.1 | 19.0-26.1 | 0.900 | | | | | |
| | | TT | 29 | 26 | 22.1 | 17.1-39.6 | 0.700 | | | | | |
| | | TG | 67 | 61 | 22.7 | 16.2-25.4 | | | | | | |
| | | GG | 50 | 45 | 25.8 | 18.8-35.2 | 0.400 | | | | | |
| | | T | 96 | 87 | 22.1 | 17.8-25.4 | | | | | | |
| G | 117 | 106 | 23.4 | 19.0-26.4 | | | | | | | | |
| CYP2R1 | rs10741657 | GG | 52 | 46 | 20.5 | 17.8-27.9 | 0.700 | | | | | |
| | | GA | 70 | 64 | 24.9 | 20.1-39.1 | | | | | | |
| | | AA | 22 | 20 | 23.2 | 19.5-38.0 | 0.400 | | | | | |
| | | G | 122 | 110 | 23.7 | 19.0-27.9 | | | | | | |
| | | A | 92 | 84 | 24.2 | 21.4-34.1 | | | | | | |
| VDR | rs1544410 (BsmI) | AA | 17 | 16 | 17.5 | 9.77-34.1 | 0.020 | | | | | |
| | | AG | 75 | 65 | 23.7 | 16.1-32.0 | | | | | | |
| | | GG | 54 | 51 | 24.5 | 21.1-32.2 | 0.700 | | | | | |
| | | A | 92 | 81 | 21.0 | 16.1-26.9 | | | | | | |
| | | G | 129 | 116 | 24.2 | 21.0-27.7 | | | | | | |
| | rs11568820 (Cdx-2) | AA | 9 | 8 | 24.2 | 16.0-NR | 0.700 | | | | | |
| | | AG | 53 | 48 | 21.0 | 13.0-27.0 | | | | | | |
| | | GG | 84 | 76 | 23.7 | 20.1-30.8 | 0.400 | | | | | |
| | | A | 62 | 56 | 22.1 | 16.0-27.0 | | | | | | |
| | | G | 137 | 124 | 23.1 | 19.0-26.4 | | | | | | |
| | rs2228570 (FokI) | CC | 64 | 62 | 23.1 | 18.4-26.9 | 0.700 | | | | | |
| | | CT | 64 | 54 | 23.2 | 16.2-38.0 | | | | | | |
| | | TT | 18 | 16 | 23.1 | 20.1-42.5 | 0.500 | | | | | |
| | | C | 128 | 116 | 23.2 | 18.7-26.9 | | | | | | |
| | | T | 82 | 70 | 23.2 | 19.0-30.8 | | | | | | |
| | rs7975232 (ApaI) | AA | 36 | 34 | 16.1 | 12.3-27.7 | 0.020 | | | | | |
| | | AC | 71 | 64 | 24.2 | 20.1-30.0 | | | | | | |
| | | CC | 39 | 34 | 24.9 | 22.1-43.1 | 0.400 | | | | | |
| | | A | 107 | 98 | 21.1 | 17.5-26.4 | | | | | | |
| | | C | 110 | 98 | 24.5 | 21.4-30.0 | | | | | | |
| rs731236 (TaqI) | CC | 15 | 15 | 11.9 | 8.30-22.7 | 0.004 | | | | | | |
| | CT | 75 | 64 | 25.4 | 18.3-36.5 | | | | | | | |
| | TT | 56 | 53 | 24.2 | 21.1-32.2 | 0.900 | | | | | | |
| | C | 90 | 79 | 21.0 | 16.1-27.0 | | | | | | | |
| | T | 131 | 117 | 24.2 | 21.0-27.9 | | | | | | | |
| MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; Ref: Referencia | | | | | | | | | | | | |

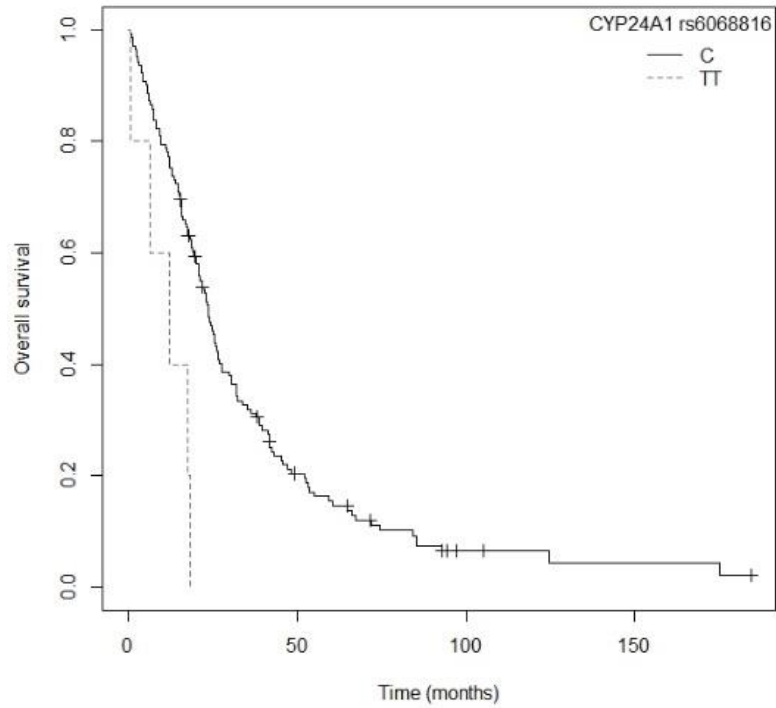


Figura 25. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo C del polimorfismo genético *CYP24A1* rs6068816 en el subgrupo NSCLC no reseado.

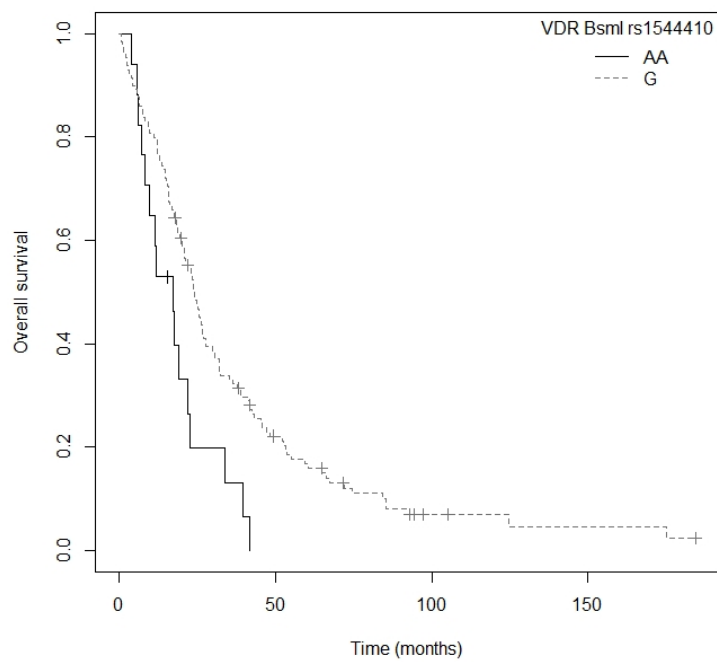


Figura 26. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo G del polimorfismo genético *VDR* (BsmI; rs1544410) en el subgrupo NSCLC no reseado.

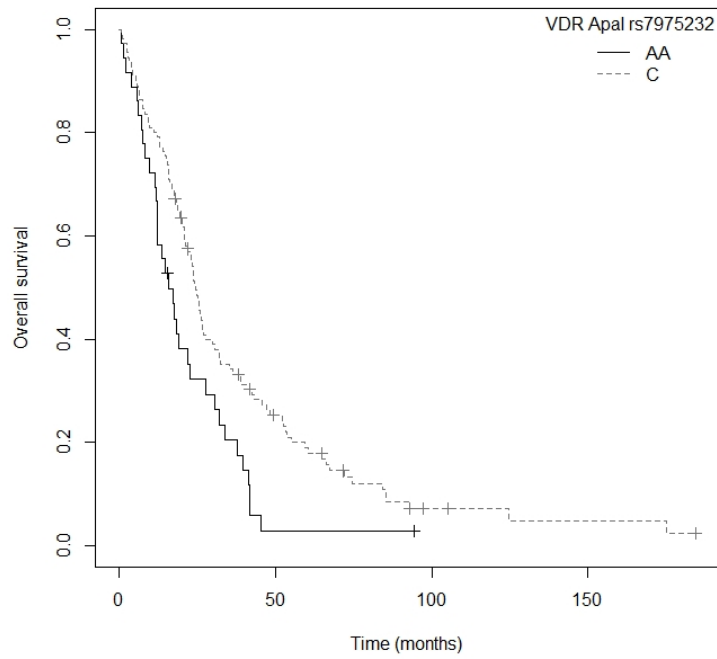


Figura 27. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo C del polimorfismo genético VDR (Apal; rs7975232) en el subgrupo NSCLC no resecado

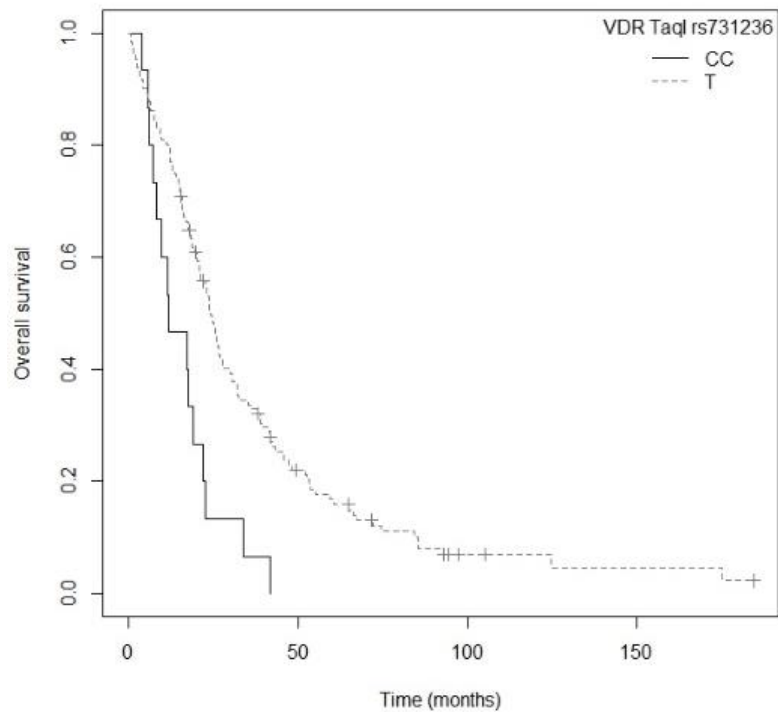


Figura 28. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia global según el alelo T del polimorfismo genético VDR (TaqI; rs731236) en el subgrupo NSCLC no resecado.

Tabla 32. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia global de pacientes con NSCLC no reseado.

| | Supervivencia global | |
|-----------------------------|-------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-valor |
| Genero (Masculino) | 1.67 (1.11-2.52) | 0.0142 |
| Estadio tumoral (IIIB – IV) | 2.42 (1.29-4.51) | 0.0055 |
| <i>CYP24A1</i> rs6068816_TT | 3.47 (1.37-8.79) | 0.0089 |
| <i>VDR</i> rs731236_CC | 2.71 (1.55-4.75) | 0.0005 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de confianza.

5.3.4.2.2 Supervivencia libre de progresión

En el subgrupo NSCLC reseado, los pacientes portadores del genotipo AA para el polimorfismo *VDR* (Cdx-2; rs11568820) mostraron una tendencia hacia una mayor progresión, en comparación con aquellos pacientes portadores del alelo G ($p=0.055$; HR=4,35; CI_{95%}=0.97-19.53; Tabla 33). Las curvas Kaplan-Meier para PFS según el alelo G para el polimorfismo *VDR* (Cdx-2; rs11568820) se muestran en la Figura 29 ($p_{\log\text{-rank}}=0.040$). Los pacientes portadores del genotipo GG mostraron una mediana de SLP de 59.0 (CI_{95%}= 24.73-NR) meses, mientras que para el genotipo AA fue de 12.8 (CI_{95%}=8.67-NR) meses, y para AG no se alcanzó. En el caso del polimorfismo genético *GC* rs7041, los pacientes portadores del genotipo GG presentaron una tendencia a mayor riesgo de progresión en comparación con aquellos portadores del genotipo TT ($p=0.061$; HR=2.122; CI_{95%}=0.97-4.66; Tabla 33). Las curvas Kaplan-Meier para SLP según el alelo T para el polimorfismo *GC* rs7041 se muestran en la Figura 30 ($p_{\log\text{-rank}}=0.060$). Los pacientes portadores del genotipo TT mostraron una mediana de SLP de 175.2 (CI_{95%}=86.10-NR) meses, mientras que para los genotipos GT y GG, la mediana de SLP fue de 29.6 (CI_{95%}=24.73-NR) y 23.3 (CI_{95%}=8.67-NR) meses, respectivamente. Por último, se encontró que el alelo C del polimorfismo *CYP24A1* rs6068816 estaba asociado a un mayor riesgo de progresión respecto al alelo T ($p=0.0359$; HR=8.49; CI_{95%}=1.15-62.7; Tabla 33). Sin embargo, no se presentaron eventos para los portadores del genotipo TT y para el genotipo CT se presentó un único evento, por lo que no se alcanzó la mediana de seguimiento. Por lo tanto, este polimorfismo se excluyó del análisis multivariante. La regresión de Cox ajustada por el estadio reveló que el polimorfismo *GC* rs7041 estaba significativamente asociado con la SLP en pacientes con NSCLC reseado ($p=0.0447$; HR=2.26; CI_{95%}=1.02-5.02; Tabla 34) ($p_{\text{likelihood ratio test}}= 0.05$).

Tabla 33. Polimorfismos y asociación con la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC resecao.

| Gen | SNPs | Genotipo | N | SLP | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|----------|----|---------|----------|----------|------------------|---------|---------|------------|---------|-------|---|-------|------------|--------|
| | | | | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-value | Ref Cat | Eventos | | | | | | | |
| | | | | | | | | | HR | IC95% | p-value | | | | | |
| CYP27B1 | rs4646536 | AA | 29 | 19 | 29.8 | 24.9-NR | 0.300 | | | | | | | | | |
| | | AG | 14 | 8 | 57.8 | 16.8-NR | | | | | | | | | | |
| | | GG | 5 | 2 | 279.2 | NR-NR | | | | | | | | | | |
| | | G | 19 | 10 | 86.1 | 24.5-NR | | | | | | 0.400 | | | | |
| | rs3782130 | CC | 3 | 2 | 279.2 | 12.3-NR | 0.400 | | | | | | | | | |
| | | GC | 15 | 7 | 86.1 | 24.5-NR | | | | | | | | | | |
| | | GG | 30 | 20 | 29.4 | 24.7-NR | | | | | | | | | | |
| | | C | 18 | 9 | 279.2 | 24.5-NR | | | | | | 0.200 | | | | |
| | rs10877012 | TT | 3 | 2 | 279.2 | 12.3-NR | 0.400 | | | | | | | | | |
| | | GT | 15 | 7 | 86.1 | 24.5-NR | | | | | | | | | | |
| | | GG | 30 | 20 | 29.4 | 24.7-NR | | | | | | | | | | |
| | | T | 18 | 9 | 279.2 | 24.5-NR | | | | | | 0.200 | | | | |
| CYP24A1 | rs6068816 | CC | 39 | 28 | 28.9 | 24.5-NR | 0.040 | | | | | | | | | |
| | | CT | 7 | 1 | NR | NR-NR | | | | | | | | | | |
| | | TT | 2 | 0 | NR | NR-NR | | | | | | | | | | |
| | | C | 46 | 29 | 41.7 | 24.9-NR | | | | | | 0.200 | | | | |
| | rs4809957 | T | 9 | 1 | NR | NR-NR | 0.010 | T | 8.492 | 1.15-62.67 | 0.0359 | | | | | |
| | | GG | 5 | 2 | NR | 29.4-NR | 0.700 | | | | | | | | | |
| | | GA | 15 | 10 | 53.6 | 26.4-NR | | | | | | | | | | |
| | | AA | 28 | 17 | 45.0 | 16.8-NR | | | | | | | | | | |
| | | G | 20 | 12 | 69.9 | 28.9-NR | | | | | | 0.900 | | | | |
| | | A | 43 | 27 | 53.6 | 24.7-NR | | | | | | 0.400 | | | | |
| GC | rs7041 | TT | 12 | 5 | 175.2 | 86.10-NR | | | | | | 0.100 | | | | |
| | | TG | 22 | 14 | 29.6 | 24.73-NR | | | | | | | | | | |
| | | GG | 14 | 10 | 23.3 | 8.67-NR | | | | | | | | | | |
| | | T | 34 | 19 | 104.3 | 29.43-NR | 0.060 | T | 2.122 | 0.97-4.66 | 0.061 | | | | | |
| | | G | 36 | 24 | 27.7 | 16.8-NR | 0.100 | | | | | | | | | |
| CYP2R1 | rs10741657 | GG | 23 | 15 | 53.6 | 24.7-NR | 0.300 | | | | | | | | | |
| | | GA | 23 | 12 | 104.3 | 24.9-NR | | | | | | | | | | |
| | | AA | 2 | 2 | 20.6 | 16.8-NR | | | | | | | | | | |
| | | G | 46 | 27 | 64.5 | 26.4-NR | | | | | | 0.100 | | | | |
| | | A | 25 | 14 | 86.1 | 24.5-NR | | | | | | 1.000 | | | | |
| VDR | rs1544410 (BsmI) | AA | 7 | 3 | NR | 28.9-NR | 0.700 | | | | | | | | | |
| | | AG | 27 | 16 | 29.4 | 24.5-NR | | | | | | | | | | |
| | | GG | 14 | 10 | 64.5 | 21.6-NR | | | | | | | | | | |
| | | A | 34 | 19 | 41.7 | 25.6-NR | | | | | | 0.900 | | | | |
| | | G | 41 | 26 | 53.6 | 24.7-NR | | | | | | 0.400 | | | | |
| | rs11568820 (Cdx-2) | AA | 2 | 2 | 12.8 | 8.67-NR | 0.080 | | | | | | | | | |
| | | AG | 16 | 7 | NR | 25.60-NR | | | | | | | | | | |
| | | GG | 30 | 20 | 59.0 | 24.73-NR | | | | | | | | | | |
| | | A | 18 | 9 | 29.4 | 16.8-NR | | | | | | 0.700 | | | | |
| | | G | 46 | 27 | 64.5 | 26.43-NR | | | | | | 0.040 | G | 4.345 | 0.97-19.53 | 0.0555 |
| | rs2228570 (FokI) | CC | 21 | 12 | 175.2 | 26.4-NR | 0.400 | | | | | | | | | |
| | | CT | 22 | 13 | 57.5 | 13.9-NR | | | | | | | | | | |
| | | TT | 5 | 4 | 24.9 | 21.6-NR | | | | | | | | | | |
| | | C | 43 | 25 | 86.1 | 25.6-NR | | | | | | 0.300 | | | | |
| | | T | 27 | 17 | 28.9 | 15.9-NR | | | | | | 0.300 | | | | |
| | rs7975232 (ApaI) | AA | 12 | 7 | 29.4 | 21.6-NR | 1.000 | | | | | | | | | |
| | | AC | 22 | 12 | 69.9 | 24.5-NR | | | | | | | | | | |
| | | CC | 14 | 10 | 64.5 | 24.7-NR | | | | | | | | | | |
| | | A | 34 | 19 | 41.7 | 24.9-NR | | | | | | 1.000 | | | | |
| | | C | 36 | 22 | 64.5 | 24.7-NR | | | | | | 0.900 | | | | |
| rs731236 (TaqI) | CC | 6 | 2 | NR | 29.8-NR | 0.500 | | | | | | | | | | |
| | CT | 28 | 17 | 29.2 | 24.5-NR | | | | | | | | | | | |
| | TT | 14 | 10 | 64.5 | 21.6-NR | | | | | | | | | | | |
| | C | 34 | 19 | 41.7 | 25.6-NR | | | | | | 0.900 | | | | | |
| | T | 42 | 27 | 41.5 | 24.7-NR | | | | | | 0.300 | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; Ref: Referencia

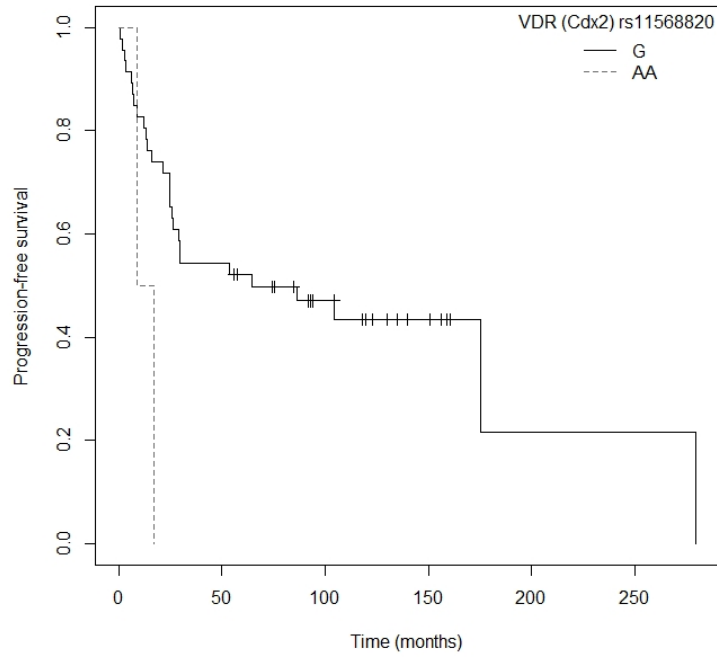


Figura 29. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo G del polimorfismo genético VDR (Cdx2; rs11568820) en el subgrupo NSCLC reseado

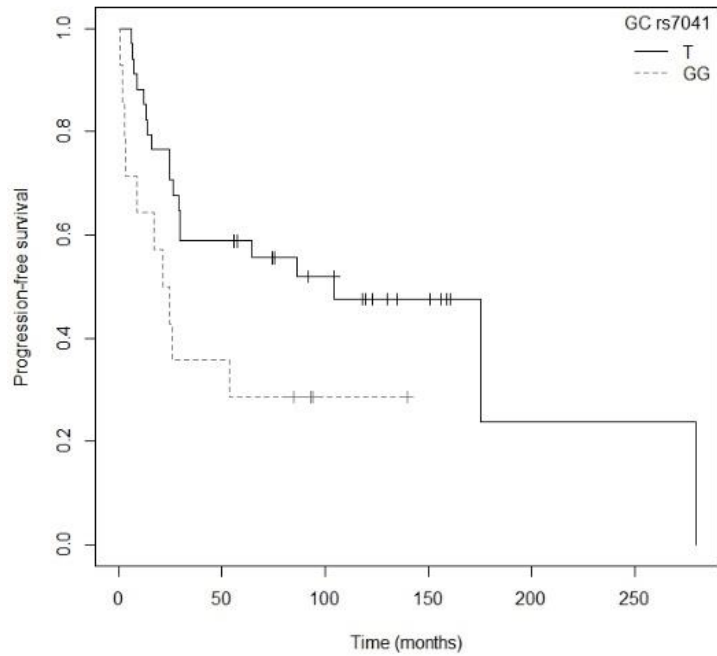


Figura 30. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo T del polimorfismo genético GC rs7041 en el subgrupo NSCLC reseado.

Tabla 34. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC resecaado.

| | Supervivencia libre de progresión | |
|-------------------|-----------------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-valor |
| Estadio (IIIB-IV) | 11.8 (1.34-104.1) | 0.0262 |
| GC rs7041_GG | 2.26 (1.02-5.02) | 0.0447 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de confianza.

Los pacientes con NSCLC no resecaados portadores del alelo A para el polimorfismo genético *CYP27B1* rs4646536 mostraron mayor riesgo de progresión en comparación con aquellos con el genotipo GG ($p=0.0443$; HR=2.05; CI_{95%}=1.02-4.14; Tabla 35). Las curvas Kaplan-Meier para PFS según el alelo A para el polimorfismo *CYP27B1* rs4646536 se muestran en la Figura 31 ($p_{\log\text{-rank}}=0.040$). La mediana de SLP para los portadores del genotipo GG fue de 20.3 (CI_{95%}=3.77-NR) meses, mientras que para los genotipos AG y AA fue de 10.3 (CI_{95%}=8.5-15.6) y 10.9 (CI_{95%}=8.37-15.5) meses, respectivamente. Del mismo modo, el alelo G del polimorfismo *CYP27B1* rs3782130, presentó un mayor riesgo de progresión respecto al genotipo CC ($p=0.0452$; HR=2.05; CI_{95%}=1.01-4.13; Tabla 35). Las curvas Kaplan-Meier para SLP según el alelo G para el polimorfismo *CYP27B1* rs3782130 se muestran en la Figura 32 ($p_{\log\text{-rank}}=0.040$). Los pacientes portadores del genotipo CC mostraron una mediana de SLP de 20.3 (CI_{95%}=3.77-NR) meses, mientras que para los genotipos GC y GG la mediana de SLP fue de 11.2 (CI_{95%}=8.0-17.1) y 10.9 (CI_{95%}=8.37-15.5) meses, respectivamente. Asimismo, los portadores del alelo G del polimorfismo *CYP27B1* rs10877012 mostraron mayor riesgo de progresión vs. el genotipo TT ($p=0.0443$; HR=2.05; CI_{95%}=1.02-4.14; Tabla 35). Los pacientes con genotipo TT mostraron una mediana de SLP de 20.3 (CI_{95%}=3.77-NR) meses, mientras que para los genotipos GT y GG la mediana de SLP fue de 10.8 (CI_{95%}=8.0-15.6) y 10.9 (CI_{95%}=8.37-15.5) meses, respectivamente. Las curvas Kaplan-Meier para SLP según el alelo G para el polimorfismo *CYP27B1* rs10877012 se muestran en la Figura 33 ($p_{\log\text{-rank}}=0.040$). Igualmente, los pacientes portadores del genotipo TT para el polimorfismo *CYP27B1* rs6068816 mostraron una mayor progresión, en comparación con aquellos portadores del alelo C ($p=0.0179$; HR=2.99; CI_{95%}=1.21-7.45; Tabla 35). Las curvas Kaplan-Meier para SLP según el alelo C para *CYP27B1* rs6068816 se muestran en la Figura 34 ($p_{\log\text{-rank}}=0.010$). Los pacientes con genotipo TT mostraron una mediana de SLP de 5.43 (CI_{95%}=

4.27-NR) meses, mientras que para el genotipo CC y CT fue de 11.9 (CI_{95%}=10.1-16.1) y 10.4 (CI_{95%}=6.20-18.7) meses, respectivamente. Además, los pacientes portadores del genotipo AA para el polimorfismo *VDR* (*Apal*; rs7975232) mostraron una tendencia hacia una mayor progresión, en comparación con aquellos portadores del alelo C ($p=0.0643$; HR=1.44; CI_{95%}=0.98-2.13; Tabla 35). La curva Kaplan-Meier para SLP según el alelo C para el polimorfismo *VDR* (*Apal*; rs7975232) se muestra en la Figura 35 ($p_{\log\text{-rank}}=0.060$). Los pacientes portadores del genotipo AA mostraron una mediana de SLP de 9.47 (IC_{95%}=6.70-16.1) meses, mientras que para el genotipo AC y CC fue de 11.20 (CI_{95%}=8.37-16.8) y 12.9 (CI_{95%}=10.4-17.6) meses, respectivamente. Finalmente, se encontró que el genotipo CC para el polimorfismo *VDR* (*TaqI* rs731236) estaba asociado a un mayor riesgo de progresión en comparación con el alelo T ($p=0.0463$; HR=1.74; CI_{95%}=1.01-2.99; Tabla 35). Los pacientes portadores del genotipo de CC mostraron una mediana de SLP de 7.1 meses (IC_{95%}=6.20-17.1), mientras que para el genotipo CT y TT fue de 10.7 (CI_{95%}=8.0-16.1) y 12.8 (CI_{95%}=10.5-17.6) meses, respectivamente. La curva Kaplan-Meier para SLP según el alelo T para *VDR* (*TaqI* rs731236) se muestra en la Figura 36 ($p_{\log\text{-rank}}=0.040$). La regresión de Cox ajustada por el IMC mostró que los polimorfismos *CYP27B1* rs4646536 ($p=0.0411$; HR=2.52; CI_{95%}=1.04-6.12), *CYP24A1* rs6068816 ($p=0.0048$; HR=8.77; CI_{95%}=1.94-39.7) y *VDR* (*Apal*; rs7975232) ($p=0.0002$; HR=3.08; CI_{95%}=1.71-5.54) se asociaron significativamente con la SLP en pacientes con NSCLC no resecaado ($p_{\text{likelihood ratio test}}=0.00006$) (Tabla 36).

Tabla 35. Polimorfismos y asociación con la supervivencia libre de progresión de los pacientes con NSCLC no resecao.

| Gen | SNPs | Genotipo | N | SLP | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--------------------|----------|-----|---------|-----------|-----------|------------------|---------|---------|-----------|---------|--|-------|------|-----------|-----------|--------|--|
| | | | | Eventos | MST (mo) | IC95% | Log-Rank p-value | Ref Cat | Eventos | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | HR | IC95% | p-value | | | | | | | |
| CPY27B1 | rs4646536 | AA | 85 | 84 | 10.9 | 8.37-15.5 | 0.100 | | | | | | | | | | | |
| | | AG | 51 | 48 | 10.3 | 8.50-15.6 | | | | | | | | | | | | |
| | | GG | 10 | 9 | 20.3 | 3.77-NR | | | | | | | | | | | | |
| | | A | 136 | 132 | 10.9 | 9.87-13.0 | | | | | | | 0.040 | G | 2.05 | 1.02-4.14 | 0.0443 | |
| | rs3782130 | G | 61 | 57 | 11.2 | 9.07-17.1 | 0.600 | | | | | | | | | | | |
| | | CC | 10 | 9 | 20.3 | 3.77-NR | 0.100 | | | | | | | | | | | |
| | | GC | 49 | 46 | 11.2 | 8.00-17.1 | | | | | | | | | | | | |
| | | GG | 86 | 85 | 10.9 | 8.37-15.5 | | | | | | | | | | | | |
| | | C | 59 | 55 | 12.0 | 8.50-17.5 | | | | | | | 0.500 | | | | | |
| | G | 135 | 131 | 10.9 | 10.0-13.0 | 0.040 | | | | | | | C | 2.05 | 1.01-4.13 | 0.0452 | | |
| | rs10877012 | TT | 10 | 9 | 20.3 | 3.77-NR | 0.100 | | | | | | | | | | | |
| | | GT | 50 | 47 | 10.8 | 8.00-15.6 | | | | | | | | | | | | |
| | | GG | 86 | 85 | 10.9 | 8.37-15.5 | | | | | | | | | | | | |
| T | | 60 | 56 | 11.6 | 9.17-17.1 | 0.500 | | | | | | | | | | | | |
| CYP24A1 | rs6068816 | G | 136 | 132 | 10.9 | 9.87-13.0 | 0.040 | T | 2.05 | 1.02-4.14 | 0.0443 | | | | | | | |
| | | CC | 108 | 103 | 11.98 | 10.1-16.1 | 0.040 | | | | | | | | | | | |
| | | CT | 33 | 33 | 10.37 | 6.20-18.7 | | | | | | | | | | | | |
| | | TT | 5 | 5 | 5.43 | 4.27-NR | | | | | | | | | | | | |
| | C | 141 | 136 | 11.17 | 10.1-14.6 | 0.010 | | | | | | | C | 2.99 | 1.21-7.45 | 0.0179 | | |
| | rs4809957 | T | 38 | 38 | 9.68 | 6.0-14.6 | 0.400 | | | | | | | | | | | |
| | | GG | 4 | 4 | 21.5 | 4.23-NR | 0.900 | | | | | | | | | | | |
| | | GA | 48 | 46 | 10.5 | 8.00-17.1 | | | | | | | | | | | | |
| | | AA | 94 | 91 | 11.1 | 9.17-14.6 | | | | | | | | | | | | |
| | | G | 52 | 50 | 10.5 | 7.47-17.6 | | | | | | | 0.700 | | | | | |
| A | | 142 | 137 | 10.9 | 10.0-13.2 | 0.700 | | | | | | | | | | | | |
| GC | rs7041 | TT | 29 | 27 | 10.2 | 7.57-17.6 | | | | | | | 0.400 | | | | | |
| | | TG | 67 | 66 | 10.5 | 8.00-15.5 | | | | | | | | | | | | |
| | | GG | 50 | 48 | 12.4 | 9.87-17.6 | | | | | | | | | | | | |
| | | T | 96 | 93 | 10.4 | 8.37-13.0 | 0.200 | | | | | | | | | | | |
| | | G | 117 | 114 | 11.2 | 10.0-15.5 | 0.700 | | | | | | | | | | | |
| CYP2R1 | rs10741657 | GG | 52 | 49 | 10.3 | 7.33-16.8 | 1.000 | | | | | | | | | | | |
| | | GA | 70 | 69 | 11.6 | 10.0-16.1 | | | | | | | | | | | | |
| | | AA | 22 | 21 | 11.1 | 7.10-21.8 | | | | | | | | | | | | |
| | | G | 122 | 118 | 11.1 | 10.0-14.2 | | | | | | | 0.900 | | | | | |
| | | A | 92 | 90 | 11.2 | 10.2-16.1 | | | | | | | 1.000 | | | | | |
| VDR | rs1544410 (BsmI) | AA | 17 | 16 | 9.07 | 6.53-20.7 | 0.500 | | | | | | | | | | | |
| | | AG | 75 | 72 | 10.70 | 8.00-14.6 | | | | | | | | | | | | |
| | | GG | 54 | 53 | 12.83 | 10.4-17.6 | | | | | | | | | | | | |
| | | A | 92 | 88 | 10.2 | 8.0-14.2 | | | | | | | 0.800 | | | | | |
| | | G | 129 | 125 | 11.20 | 10.2-14.2 | | | | | | | 0.200 | | | | | |
| | rs11568820 (Cdx-2) | AA | 9 | 9 | 16.13 | 13.2-NR | 0.400 | | | | | | | | | | | |
| | | AG | 53 | 52 | 9.17 | 7.1-11.9 | | | | | | | | | | | | |
| | | GG | 84 | 80 | 11.70 | 10.0-16.1 | | | | | | | | | | | | |
| | | A | 62 | 61 | 10.2 | 7.47-13.2 | | | | | | | 0.300 | | | | | |
| | rs2228570 (FokI) | G | 137 | 132 | 10.7 | 9.07-12.8 | 0.700 | | | | | | | | | | | |
| | | CC | 64 | 64 | 11.3 | 7.33-15.5 | 0.400 | | | | | | | | | | | |
| | | CT | 64 | 59 | 10.6 | 10.0-17.6 | | | | | | | | | | | | |
| | | TT | 18 | 18 | 12.1 | 10.1-20.7 | | | | | | | | | | | | |
| | C | 128 | 123 | 10.7 | 8.50-14.6 | 0.600 | | | | | | | | | | | | |
| | rs7975232 (ApaI) | T | 82 | 77 | 10.9 | 10.2-17.1 | 0.300 | | | | | | | | | | | |
| | | AA | 36 | 35 | 9.47 | 6.70-16.1 | 0.200 | | | | | | | | | | | |
| | | AC | 71 | 68 | 11.20 | 8.37-16.8 | | | | | | | | | | | | |
| | | CC | 39 | 38 | 12.90 | 10.4-17.6 | | | | | | | | | | | | |
| | | A | 107 | 103 | 10.5 | 8.37-14.2 | | | | | | | 0.900 | | | | | |
| | C | 110 | 106 | 11.90 | 10.3-15.6 | 0.060 | | | | | | | C | 1.44 | 0.98-2.13 | 0.0643 | | |
| | rs731236 (TaqI) | CC | 15 | 15 | 7.1 | 6.20-17.1 | 0.100 | | | | | | | | | | | |
| CT | | 75 | 71 | 10.7 | 8.00-16.1 | | | | | | | | | | | | | |
| TT | | 56 | 55 | 12.8 | 10.5-17.6 | | | | | | | | | | | | | |
| C | | 90 | 86 | 10.1 | 7.70-14.2 | 0.800 | | | | | | | | | | | | |
| | | T | 131 | 126 | 11.4 | 10.3-14.6 | 0.040 | T | 1.74 | 1.01-2.99 | 0.0463 | | | | | | | |

MST: Media de tiempo de supervivencia (meses); NR: no alcanzado; HR: hazard ratio; IC95%: 95% intervalo de confianza; Ref: Referencia

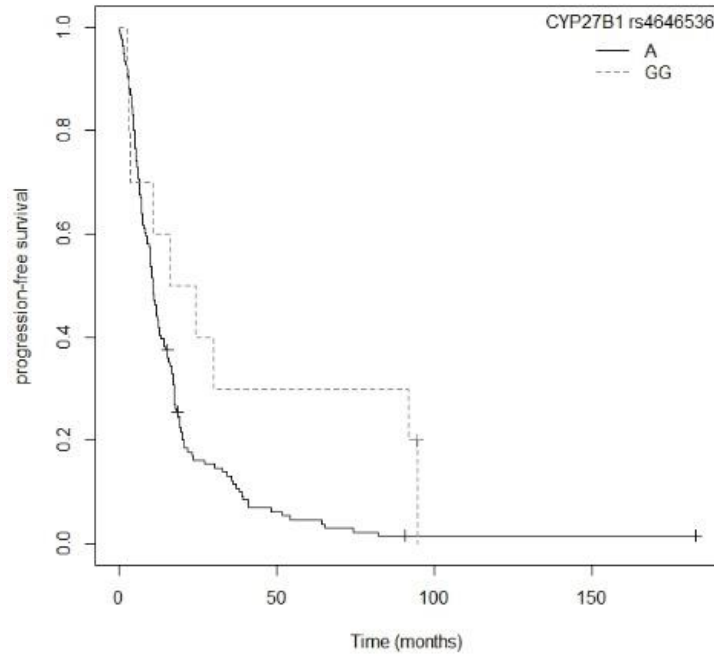


Figura 31. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo A del polimorfismo genético *CYP27B1* rs4646536 en el subgrupo NSCLC no reseado.

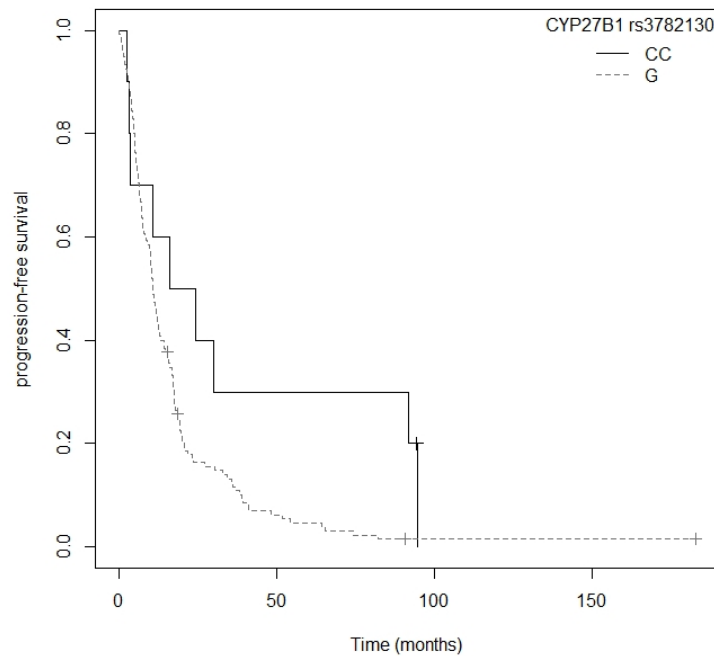


Figura 32. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo G del polimorfismo genético *CYP27B1* rs3782130 en el subgrupo NSCLC no reseado.

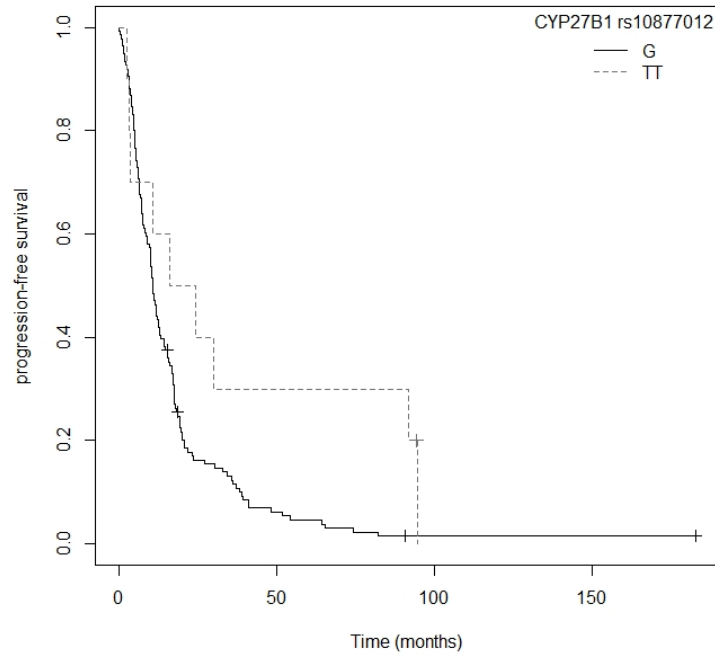


Figura 33. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo G del polimorfismo genético *CYP27B1* rs10877012 en el subgrupo NSCLC no reseado

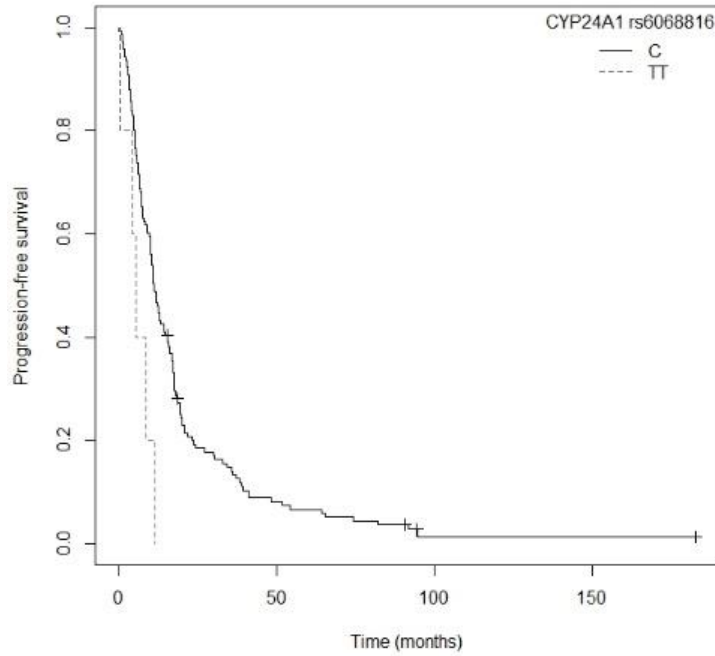


Figura 34. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo C del polimorfismo genético *CYP24A1* rs6068816 en el subgrupo NSCLC no reseado.

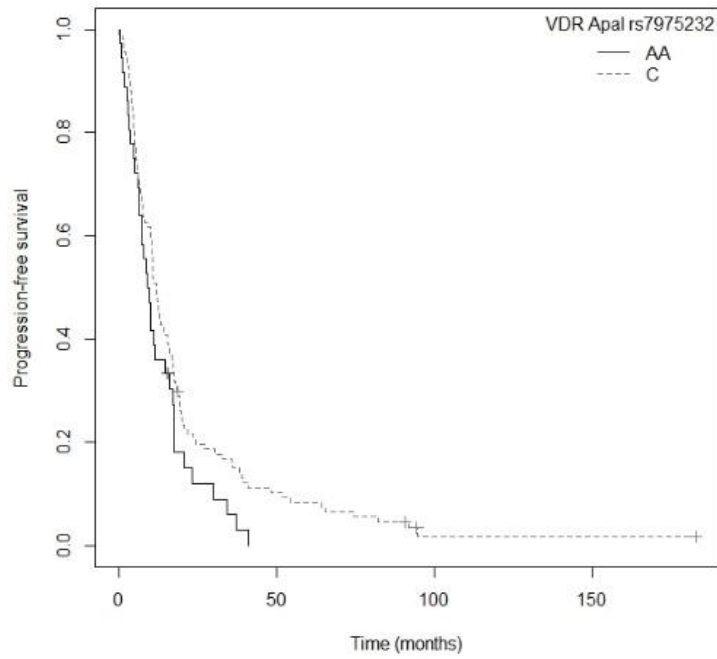


Figura 35. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo C del polimorfismo genético VDR (Apal; rs7975232) en el subgrupo NSCLC no reseado.

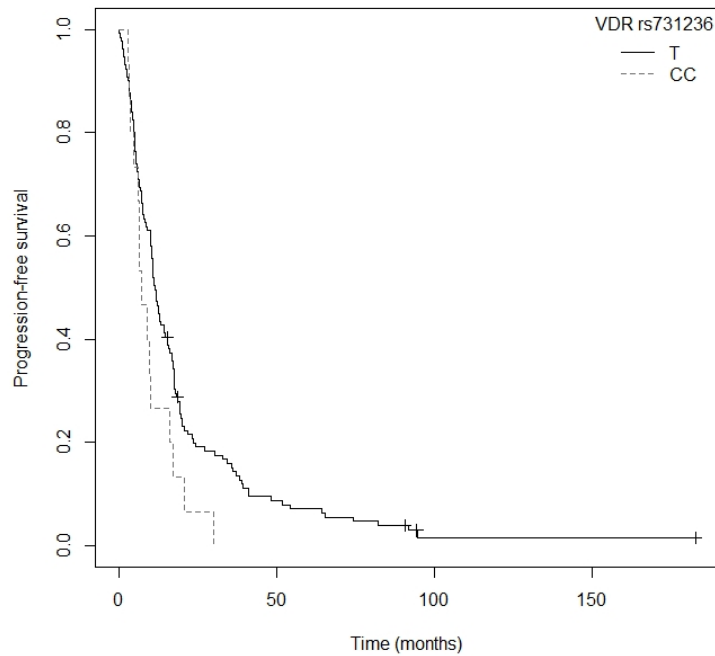
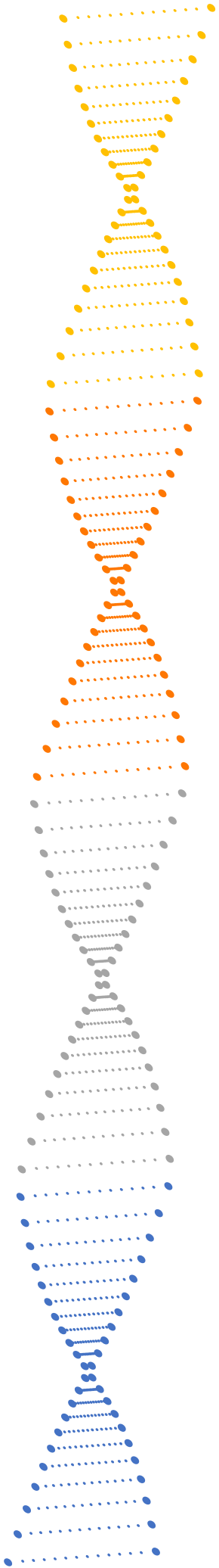


Figura 36. Curva Kaplan-Meier para la supervivencia libre progresión según el alelo T del polimorfismo genético VDR (TaqI; rs731236) en el subgrupo NSCLC no reseado.

Tabla 36. Influencia de los polimorfismos genéticos y las características clínicas en la supervivencia libre de progresión de pacientes con NSCLC no reseado.

| | Supervivencia libre de progresión | |
|----------------------|-----------------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-valor |
| IMC (>24) | 2.23 (1.27-3.89) | 0.0051 |
| CYP27B1 rs4646536_A | 2.52 (1.04-6.12) | 0.0411 |
| CYP24A1 rs6068816_TT | 8.77 (1.94-39.7) | 0.0048 |
| VDR rs7975232_AA | 3.08 (1.71-5.54) | 0.0002 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% Intervalo de Confianza.



DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

La vitamina D puede influir en la susceptibilidad y la supervivencia del cáncer al inhibir la progresión tumoral suprimiendo la metástasis, la proliferación celular y la angiogénesis, o al promover la apoptosis en las células cancerosas (38, 48). La patogenia del NSCLC es compleja, ya que se han identificado numerosos factores de riesgo, como son el tabaco, exposición al radón, contaminación del aire, el historial de enfermedades pulmonares previas, mutaciones somáticas y bajos niveles séricos de la vitamina D (17, 18). Por otro lado, las tasas de supervivencia en pacientes diagnosticados NSCLC son bajas, incluso entre pacientes diagnosticados con el mismo estadio (41-44). Los factores genéticos pueden explicar estas diferencias interindividuales en la progresión de los pacientes. Investigaciones recientes apuntan a la relación de polimorfismos en los principales genes implicados en la ruta metabólica de la vitamina D tanto en la supervivencia de la enfermedad (38, 46, 47, 61, 70, 116, 117) como en su patogenia (58, 61, 74-85). Por lo que se destaca la importancia de profundizar el impacto de estas asociaciones en diferentes poblaciones. En el presente estudio investigamos la influencia de 13 polimorfismos genéticos en 5 genes implicados en la ruta metabólica de la vitamina D sobre la susceptibilidad y la supervivencia en NSCLC en una población caucásica (España).

En cuanto al análisis de la influencia de polimorfismos genéticos implicados en la ruta metabólica de la vitamina D sobre el riesgo de NSCLC, se encontró que la mayoría de los efectos de la vitamina D están mediados por su unión al receptor VDR (también denominado NR111), un factor de transcripción dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (NR) (86-88). VDR y su ligando regulan los genes que están involucrados en el metabolismo del calcio, el crecimiento celular, la antiproliferación, la diferenciación, la apoptosis y las respuestas inmunitarias adaptativas/innatas (86-88). Los polimorfismos genéticos en este gen han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, aquellos que han demostrado más relevancia han sido *BmsI* (rs1544410), *TaqI* (rs731236), *Apal* (rs7975232), *FokI* (2228570) y *Cdx-2* (11568820). Uno de los polimorfismos más estudiados respecto al riesgo de NSCLC es el *BmsI* (rs1544410), que está localizado la región 3'UTR, en el intrón 8 del gen *VDR* y

conduce a un cambio de una guanina por una adenina (58, 74-81). Los polimorfismos funcionales ubicados en esta región pueden afectar la función de *VDR* al regular la estabilidad del ARNm y la eficiencia de traducción de la proteína, influyendo en el efecto de la vitamina D en la inhibición tumoral (118). Nuestros resultados reflejan que, tanto en el modelo genotípico como recesivo, los pacientes portadores del genotipo *VDR BmsI* rs1544410-AA poseían menor riesgo de desarrollar NSCLC, datos corregidos teniendo en cuenta el hábito tabáquico y los antecedentes familiares de cáncer (Tabla 4). Estos resultados están en consonancia con los descritos en estudios previos. En concreto, un reciente metaanálisis multiétnico (China, Turquía, Polonia y Túnez), compuesto por 10 artículos (3046 casos/2716 controles), mostró que el genotipo *VDR BmsI* rs1544410-AA reducía el riesgo de padecer cáncer de pulmón ($p=0.05$; OR=0.63; CI_{95%}=0.40-0.99; $I^2=50%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.05$; AA vs GG y $p=0.02$; OR=0.78; CI_{95%}=0.63-0.97; $I^2=42%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.11$; AA vs G) (82). Asimismo, en el análisis por subtipos de cáncer, el genotipo *VDR BmsI* rs1544410-AA disminuía significativamente el riesgo a desarrollar NSCLC ($p<0.00001$; OR=0.41; CI_{95%}=0.29-0.58; $I^2=56%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.06$; A vs G y $p=0.0004$; OR=0.22; CI_{95%}=0.10-0.51; $I^2=0%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.76$; AA vs G) (82).

Por otro lado, en nuestro estudio encontramos inicialmente que el alelo T para el polimorfismo *TaqI* (rs731236) en el gen *VDR* mostró un mayor riesgo de NSCLC respecto al genotipo CC ($p=0.0129$). Sin embargo, esta asociación no se mantuvo tras realizar la corrección por bonferroni. A pesar de esto, estos resultados están en línea con lo reportado en la literatura. Un reciente metaanálisis multiétnico (China, Turquía, Túnez, Polonia) que evaluó 6 artículos (2204 casos/2369 controles), mostró que el alelo T se asoció con un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón respecto al genotipo CC tanto en el modelo alélico como en el modelo recesivo ($p=0.02$; OR=1.14, CI_{95%}=1.02-1.27; $I^2=42%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.12$; T vs C y $p=0.02$; OR=1.18; CI_{95%}=1.02-1.37; $I^2=46%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.10$; T vs CC, respectivamente) (82). Adicionalmente, el análisis de subgrupos por origen étnico indicó que aquellos individuos asiáticos portadores del alelo T o el genotipo TT presentaban mayor riesgo desarrollar cáncer de pulmón ($p=0.008$; OR=1.56; CI_{95%}=1.12-2.17; $I^2=0%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.99$; T vs C y $p=0.009$; OR=1.60; CI_{95%}=1.12-2.28; $I^2=0%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.98$; TT vs C). Sin embargo, dicha asociación no se encontró en caucásicos ($p=0.20$; OR=1.14; CI_{95%}=0.93-1.40; $I^2=57%$;

$p_{\text{heterogeneidad}}=0.10$; T vs C y $p=0.22$; OR=1.22; CI_{95%}=0.88-1.69; $I^2=66\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.05$; TT vs C). (82).

En relación con los polimorfismos *Apal* (rs7975232) y *FokI* (2228570), en nuestro estudio no encontramos ninguna asociación entre estos polimorfismos y la susceptibilidad a padecer NSCLC. Estos resultados están en concordancia con los resultados publicados previamente. Para el polimorfismo *Apal*, un metaanálisis (China, Turquía, Túnez, Polonia) publicado recientemente, compuesto por 10 artículos (3609 casos/3099 controles) no encontró ninguna asociación estadísticamente significativa en ninguno de los modelos analizados [($p=0.09$; OR=0.83; CI_{95%}=0.66-1.03; $I^2=88\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}<0.00001$; A vs C); ($p=0.11$; OR=0.74; CI_{95%}=0.51-1.07; $I^2=82\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}<0.00001$; AA vs C); ($p=0.95$; OR=1.01; CI_{95%}=0.76-1.34; $I^2=80\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}<0.00001$; AC vs CC); ($p=0.34$; OR=0.88; CI_{95%}=0.68-1.14; $I^2=78\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}<0.00001$; A vs CC) y ($p=0.08$; OR=0.71; IC_{95%}=0.48-1.04; $I^2=88\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}<0.00001$; AA vs C)] (82). En cuanto al polimorfismo *FokI*, un metaanálisis multiétnico (China, Turquía, Túnez, Polonia) compuesto por 5 artículos (1362 casos/1474 controles) tampoco encontró una asociación significativa respecto al riesgo de padecer cáncer de pulmón en ninguno de los modelos analizados [($p=0.30$; OR=1.14; CI_{95%}=0.89-1.47; $I^2=70\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.009$; C vs.T); ($p=0.45$; OR=1.21; CI_{95%}=0.74-1.98; $I^2=62\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.03$; CC vs. CT); ($p=0.63$; OR=0.88; CI_{95%}=0.53-1.47; $I^2=70\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.01$; CT vs TT); ($p=0.96$; OR=1.01; CI_{95%}=0.62-1.66; $I^2=71\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.008$; C vs TT) y ($p=0.07$; OR=1.33; CI_{95%}=0.98-1.80; $I^2=55\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.06$; CC vs T)] (82). Asimismo, nosotros no encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la susceptibilidad a desarrollar NSCLC y el polimorfismo *Cdx-2* (11568820). Sin embargo, un metaanálisis (Polonia, China) compuesto por 2 artículos (1266 casos/ 1365 controles) mostró que el alelo T se asociaba con menor riesgo de padecer cáncer de pulmón tanto en el modelo heterocigoto como en el dominante ($p=0.05$; OR=0.81; CI_{95%}=0.66-1.00; $I^2=0\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.77$; TC vs CC y $p=0.03$; OR=0.80; CI_{95%}=0.65-0.98; $I^2=0\%$; $p_{\text{heterogeneidad}}=0.99$; T vs CC, respectivamente) (82).

Recientemente se ha estudiado el efecto de los polimorfismos rs6068816 y rs4809957 en el gen *CYP24A1* y el riesgo de NSCLC (58, 61, 83-85). Este gen es el responsable de

sintetizar la enzima implicada en la degradación de la vitamina D y así evitar su acumulación. Los resultados obtenidos en nuestro estudio relacionan el alelo rs6068816-C con menor riesgo de desarrollar NSCLC en el análisis bivariante. Sin embargo, esta significación no se mantuvo tras realizar la corrección por Bonferroni. No obstante, nuestros resultados están en línea con los expuestos en la literatura. Un metaanálisis compuesto por 2 estudios realizados en población asiática (China) (1056 casos/1302 controles) mostró que el polimorfismo rs6068816 se asociaba significativamente con el riesgo a padecer cáncer de pulmón. En particular el alelo rs6068816-C presento un efecto protector frente al desarrollo de NSCLC ($p=0.031$; $OR=0.88$; $CI_{95\%}=0.78-0.99$; $I^2=0\%$; $p_{heterogeneidad}=0.667$; C vs T y $p=0.049$; $OR=0.85$; $CI_{95\%}=0.72-1.00$; $I^2=0\%$; $p_{heterogeneidad}=0.955$; CC vs T). Sin embargo, la significancia no se mantuvo después de la corrección de Bonferroni (83). Con relación al polimorfismo rs4809957, en nuestro estudio no se encontró asociación significativa en ninguno de los modelos analizados. Sin embargo, un estudio previo compuesto por 603 casos y 661 controles de ascendencia asiática (China), encontró que el polimorfismo rs4809957 se asociaba con el riesgo de NSCLC (61, 83). En particular aquellos individuos portadores del genotipo rs4809957-AA presentaban mayor riesgo a padecer NSCLC ($p<0.001$; $OR=2.71$; $CI_{95\%}=1.66-4.41$; AA vs G) (61, 83).

Los polimorfismos rs4646536, rs3782130, rs10877012 y rs703842 en el gen *CYP27B1*, único capaz de sintetizar la enzima 1alfa-hidroxilaza que es responsable de la segunda hidroxilación en el proceso de activación de la vitamina D, no mostraron asociaciones estadísticamente significativas con el riesgo de NSCLC en nuestro estudio. Hasta la fecha, no se ha evaluado el efecto de los polimorfismos rs4646536 y rs703842 sobre la susceptibilidad a desarrollar cáncer de pulmón. Sin embargo, se ha evaluado su efecto en otras patologías oncológicas (cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, entre otros) sin encontrar una asociación estadísticamente significativa (48). Por otro lado, se han realizado dos estudios que evalúan el efecto de los polimorfismos rs10877012 y rs3782130 sobre el riesgo a padecer NSCLC. Un estudio realizado con 426 casos/445 controles en población asiática (China), no encontró asociación estadísticamente significativa en ninguno de los modelos analizados, para los polimorfismos rs10877012 [($p=0.37$; $OR=1.10$; $CI_{95\%}=0.88-1.35$; GG vs GT); ($p=0.37$;

OR=0.95; CI_{95%}=0.76-1.21; GG vs TT); (p=0.37; OR=1.01; CI_{95%}=0.75–1.32; GG vs T) y rs3782130 [(p=0.15; OR=0.82; CI_{95%}=0.76-1.45; CC vs CG); (p=0.15; OR=1.03; CI_{95%}=0.89-1.34; CC vs GG); (p=0.15; OR=0.94; CI_{95%}=0.78-1.38; CC vs G) (58). Asimismo, otro estudio con 603 casos/661 controles de ascendencia asiática (China), no encontró asociaciones estadísticamente significativas respecto al riesgo de padecer NSCLC en ninguno de los modelos genéticos analizados para el polimorfismo rs10877012 [(p=0.331; OR=0.87; CI_{95%}=0.67-1.13; TT vs GT); (p=0.331; OR=1.10; CI_{95%}=0.76-1.58; TT vs GG); (p=0.331; OR=0.92; CI_{95%}=0.72-1.17; TT vs G); (p=0.331; OR=1.19; CI_{95%}=0.85-1.66; GG vs T)] (61). Por el contrario, para el polimorfismo rs3782130 se encontró asociación estadísticamente significativa en el modelo genotípico (p=0.022; OR=0.82; CI_{95%}=0.63-1.06; CC vs CG), (p=0.022; OR=1.42; CI_{95%}=0.94-2.14; CC vs GG) y en el modelo dominante (p=0.022; OR=1.60; CI_{95%}=1.09-2.34; GG vs C) (61).

Con respecto al polimorfismo rs10741657 del gen *CYP2R1*, ubicado en el locus p15.2 del cromosoma 11. Este gen se encarga de codificar la principal hidroxilasa que convierte la vitamina D en el hígado en el intermedio 25(OH)D (primera hidroxilación) (119). Nuestro estudio no encontró una asociación estadísticamente significativa con el riesgo a padecer NSCLC. Resultados que están acorde con un estudio previo en población asiática (China), donde evaluaron 603 casos/661 controles sin encontrar asociación estadísticamente significativa en ninguno de los modelos genéticos analizados [(p=0.216; OR=0.82; CI_{95%}=0.64–1.06; GG vs AG); (p=0.216; OR=0.86; CI_{95%}=0.59–1.25; GG vs AA); (p=0.216; OR=0.83; CI_{95%}=0.65–1.06; GG vs A); (p=0.216; OR=0.96; CI_{95%}=0.68–1.36; AA vs G) (61).

El polimorfismo rs7041 se encuentra en el exón 11 del dominio III del gen *GC*. El gen *GC* sintetiza la proteína de unión a la vitamina D (VDBP) o GC y concretamente en el pulmón tiene funciones inmunomoduladoras, relacionadas con la activación de macrófagos y la quimiotaxis de neutrófilos (102). En consecuencia, polimorfismos en el gen *GC* pueden alterar la función de la proteína y aumentar el riesgo de enfermedades (120). Nuestros resultados no mostraron una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo rs7041 y la susceptibilidad a NSCLC en ninguno de los modelos genéticos analizados. Resultados que se encuentran en consonancia con un metaanálisis

compuesto por 3 estudios realizados en población asiática (China) (1142 casos/1219 controles). Este estudio mostró que el polimorfismo rs7041 no estaba asociado con el riesgo a padecer cáncer de pulmón en ninguno de los modelos analizados [(p=0.52; OR=0.90; CI_{95%}=0.65–1.25; I²=83%; p_{heterogeneidad}=0.003; G vs T); (p=0.17; OR=0.65; CI_{95%}=0.36–1.19; I²=63%; p_{heterogeneidad}=0.07; GG vs TT); (p=0.93; OR=0.97; CI_{95%}=0.56–1.70; I²=89%; p_{heterogeneidad}=0.0001; GT vs TT); (p=0.80; OR=0.93; CI_{95%}=0.55–1.59; I²=88%; p_{heterogeneidad}=0.0002; G vs TT) y (p=0.12; OR=0.67; CI_{95%}=0.40–1.11; I²=52%; p_{heterogeneidad}=0.12; GG vs T)] (82). Sin embargo, al realizar el análisis de subgrupos por subtipos de cáncer mostró que el alelo G y el genotipo GG podrían ser factores protectores para el desarrollo de NSCLC en población asiática (China) [(p=0.004; OR=0.76; CI_{95%}=0.62–0.92; I²=53%; p_{heterogeneidad}=0.14; G vs. T) y (p=0.03; OR=0.58; CI_{95%}=0.35–0.95; I²=51%; p_{heterogeneidad}=0.15; GG vs. T), respectivamente] (82).

La principal limitación de este estudio es el tamaño limitado de la muestra en comparación con otros estudios, particularmente en lo que respecta a los casos. Esto puede haber llevado a impedir la detección de las asociaciones de algunos polimorfismos. Sin embargo, a pesar de esta muestra limitada, y después de aplicar la corrección de Bonferroni para evitar asociaciones de falsos positivos, el efecto de *VDR BmsI* rs1544410 sobre la susceptibilidad al NSCLC se mantuvo. Los puntos fuertes de nuestro estudio incluyen una cohorte de casos muy homogénea, compuesta únicamente por pacientes con NSCLC diagnosticados por el mismo equipo de patólogos, reclutados de en la misma zona geográfica, lo que aumenta su uniformidad.

En cuanto al análisis del potencial de los polimorfismos genéticos implicados en la ruta metabólica de la vitamina D en 194 pacientes caucásicos (España) con NSCLC, se encontró que, para la población general, los pacientes portadores del alelo A para el polimorfismo *CYP27B1* rs4545636 poseían mayor riesgo de progresión (p=0.0233; HR=2.11; CI_{95%}=1.11–4.04) y tendencia a mayor riesgo de muerte (p=0.0569; HR=2.01; CI_{95%}=0.98–4.14) que los portadores del genotipo GG. Adicionalmente, el polimorfismo *CYP27B1* rs4646536 mantuvo su asociación con la SLP en el subgrupo de pacientes no resecaos (p=0.0233; HR=2.11; CI_{95%}=1.11–4.04). Hasta la fecha solo existe otro estudio, realizado en población asiática (China) con 542 pacientes con NSCLC que evaluó la

influencia de los polimorfismos en *CYP27B1* rs4646536 y la supervivencia. Sin embargo, no encontraron una asociación estadísticamente significativa ($p=0.625$) (38). Por otro lado, en otro estudio realizado en población asiática (China) con 153 muestras tumorales (NSCLC), encontraron que la alta expresión de *CYP27B1* se asociaba con una mayor supervivencia global ($p=0.018$). A su vez hallaron que la alteración en la expresión genética puede deberse a SNPs. Específicamente encontraron que las diferencias en la expresión fueron estadísticamente significativas en el polimorfismo *CYP27B1* rs3782130 ($p=0.028$) (61). La importancia en la expresión del gen *CYP27B1* radica en que es el único capaz de convertir la vitamina D en su forma activa (calcitriol) y este producto es el que desencadenará todas las funciones biológicas de la vitamina D, tras la unión a *VDR* (48). En nuestro estudio, el polimorfismo *CYP27B1* rs3782130 se asoció con la SLP en el subgrupo de pacientes no resecaados en el modelo de regresión de Cox univariante ($p=0.0452$; HR=2.05; CI_{95%}=1.01-4.13; GG/CG vs. CC).

En el subgrupo de pacientes resecaados, el análisis multivariante reveló que los pacientes portadores del genotipo AA para *VDR* (Cdx2; rs11568820) presentaron mayor riesgo de muerte respecto al genotipo GG ($p=0.0129$; HR=7.43; CI_{95%}=1.53-36.15). Estudios previos muestran resultados contradictorios, ya que Akiba *et al.* 155 pacientes asiáticos (Japón) con NSCLC, encontraron que el alelo A para el polimorfismo *VDR* (Cdx2; rs11568820) estaba asociado con mayor supervivencia global ($p=0.04$; HR=0.39; CI_{95%}=0.16-0.97 para GA/AA vs. GG) (117). Asimismo, otro estudio en 376 pacientes de origen caucásico (Estados Unidos) con NSCLC en estadio temprano mostró que los genotipos AA/AG para *VDR* (Cdx2; rs11568820) tuvieron mejor supervivencia global respecto al genotipo GG ($p=0.04$; HR=0.56; CI_{95%}=0.33-0.95 para GA/AA vs. GG) (47). Sin embargo, otro estudio realizado en 294 pacientes caucásicos (Estados Unidos) con NSCLC avanzado, no encontraron asociación entre los polimorfismos en *VDR* (Cdx2; rs11568820) y la supervivencia global ($p=0.82$) (46). Además, en nuestro estudio los pacientes portadores del alelo G para el polimorfismo *GC* rs7041 presentaron un mayor riesgo de progresión en comparación con aquellos portadores del genotipo TT ($p=0.0447$; HR=2.26; CI_{95%}=1.02-5.02). Nuestros hallazgos concuerdan con un estudio anterior en 155 pacientes asiáticos (Japón) con NSCLC, donde el genotipo TT para el polimorfismo *GC* rs7041 se asoció con un menor riesgo de SLP ($p=0.045$; HR=0.51;

CI_{95%}=0.26-0.99; TT vs. TG/GG) y menor SG (p=0.003; HR=0.21; CI_{95%}=0.07-0.59; TT vs. TG/GG) (117). Posteriormente, se realizó otro estudio en 542 pacientes asiáticos (China) que evaluaron la relación entre GC rs7041 y la supervivencia en NSCLC. Sin embargo, no encontraron resultados estadísticamente significativos (p=0.693) (38).

En cuanto al subgrupo de pacientes no resecaados, nuestro estudio reveló que el genotipo TT para el polimorfismo *CYP24A1* rs6068816 se asociaba con un mayor riesgo de muerte (p=0.0089; HR=3.47; CI_{95%}=1.37-8.79) y mayor riesgo de progresión (p=0.0048; HR=8.77; CI_{95%}=1.94-39.7) en comparación con aquellos portadores del alelo C. Hasta la fecha se ha realizado un único estudio que evaluó la asociación entre *CYP24A1* rs6068816 y la supervivencia en 542 pacientes asiáticos (China) con NSCLC. Sin embargo, no encontraron una asociación estadísticamente significativa (p=0.072) (38). Por otro lado, en nuestro estudio encontramos que en el subgrupo de pacientes no resecaados los polimorfismos TaqI (rs731236) y ApaI (rs7975232) en el gen *VDR* estuvieron asociados con la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión, respectivamente. En primer lugar, en nuestro estudio los pacientes portadores del genotipo CC para *VDR* (TaqI; rs731236) presentaron mayor riesgo de muerte en relación con aquellos portadores del alelo T (p=0.0005; HR=2.71; CI_{95%}=1.55-4.75). Resultados contradictorios han sido descritos en estudios previos. Un estudio en 62 pacientes de origen asiático (Turquía) con NSCLC, mostró que los genotipos combinados TT-CC/TT-TC para *TaqI* y *FokI* respectivamente, se asociaron con una peor supervivencia global (HR=1.81; CI_{95%}=1.23-3.48; P=0.04) (121). Sin embargo, otro estudio posterior en 155 pacientes asiáticos (Japón) con NSCLC no encontró una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo *VDR* (TaqI; rs731236) y la supervivencia global (p=0.26) (117). El polimorfismo *VDR* (ApaI; rs7975232) en nuestro estudio se asoció con un mayor riesgo de muerte y progresión. En particular, los pacientes portadores del genotipo AA mostraron menor SG (p=0.0068; HR=1.733; CI_{95%}=1.16-2.58) y mayor progresión (p=0.0002; HR=3.08; CI_{95%}=1.71-5.54) en comparación con aquellos pacientes portadores del alelo C. Nuestros resultados están en consonancia con un estudio previo en 321 pacientes asiáticos (China) con NSCLC avanzado (122). Este estudio encontró una asociación entre el genotipo AA para el polimorfismo *VDR* (ApaI; rs7975232) y menor SG (p<0.001; HR=2.84; CI_{95%}=2.63-3.94) así como una fuerte

tendencia a mayor riesgo de progresión ($p=0.053$; $HR=1.43$; $CI_{95\%}=0.99-2.78$) respecto al genotipo CC (122). Asimismo, esta asociación ha sido confirmada en un metaanálisis multiétnico realizado con 3.199 casos/5 estudios de distintos tipos de cánceres (próstata, riñón, colorrectal, pulmón, cabeza y cuello) reveló que el genotipo AA para el polimorfismo *VDR* (Apal; rs7975232) estaba asociado con mayor SLP ($HR=1.29$; $CI_{95\%}=1.02-1.56$) (123).

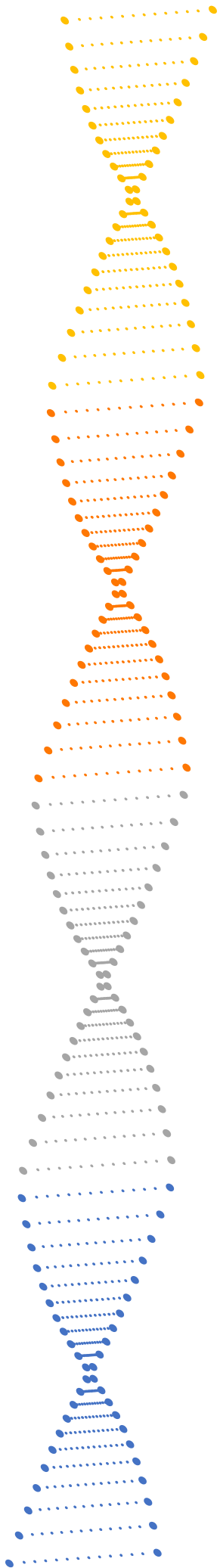
El polimorfismo *CYP2R1* rs10741657 ha sido recientemente estudiado. Un estudio en población asiática (China) con 542 casos de NSCLC, encontró que aquellos pacientes portadores de los genotipos GG y AG presentaban mejor SG respecto a aquellos portadores del genotipo AA ($p=0.033$; $HR=0.69$; $CI_{95\%}=0.46-0.97$). En particular, en pacientes de edad avanzada y que no estaban siendo tratados con quimioterapia (38). Este efecto no fue confirmado en nuestros pacientes. Sin embargo, se observó una fuerte tendencia en el modelo de regresión de Cox univariante para la SG en la población general ($p=0.0525$; $HR=1.59$; $CI_{95\%}=0.99-2.52$).

Por otro último, un metaanálisis multiétnico en distintos tipos de cánceres realizado con 9.926 casos/10 estudios (próstata, pulmón, colorrectal, piel, glioma, cabeza y cuello) para el polimorfismo *VDR* (Bsml; rs1544410) y 11.334 casos / 12 estudios (mama, próstata, pulmón, colorrectal, piel, glioma, ovario, cabeza y cuello) para el polimorfismo *VDR* (FokI; rs2228570), evaluó la asociación de ambos polimorfismos con la SG. En particular, los genotipos AA/AG del polimorfismo *VDR* (Bsml; rs1544410) se asociaron con peor SG ($HR=1.40$; $CI_{95\%}=1.05-1.75$; AA/AG vs. GG) (123). En nuestro estudio, el modelo de regresión de Cox univariante mostró que el genotipo AA para el polimorfismo *VDR* (Bsml; rs1544410) se asociaba con peor SG en pacientes no resecaados en comparación con los portadores del alelo G ($p=0.0073$; $HR=2.08$; $CI_{95\%}=1.22-3.56$). Sin embargo, tras la regresión de Cox multivariante no se mantuvo dicha asociación. El polimorfismo *VDR* (FokI; rs2228570) no se asoció con la SG en el metaanálisis descrito ($HR=1.26$; $CI_{95\%}=0.96-1.56$) (123). Nuestro estudio está en consonancia con dichos resultados, ya que no obtuvimos asociaciones estadísticamente significativas para el polimorfismo *VDR* (FokI; rs2228570) en ninguno de los subgrupos analizados.

Existe una fuerte relación entre la vitamina D y el riesgo y supervivencia del NSCLC. Por lo tanto, se presume que las alteraciones en los genes que están implicados en la ruta metabólica de la vitamina D pueden afectar su expresión y funcionalidad (47, 59, 65, 71-73). Cada uno de los genes cumple una función única y característica dentro del proceso metabólico de la vitamina D. Por tanto, podemos especular que las variaciones en uno o más genes pueden conllevar a un peor pronóstico. Hasta la fecha se sabe que la expresión genética de *CYP24A1*, *CYP27B1* y *VDR*, en el cáncer de pulmón se ve afectada por la diferenciación y caracterización tumoral. Cuando el tumor está pobremente diferenciado, hay mayor expresión de *CYP24A1* y disminución de la expresión de *CYP27B1* (65, 71). El aumento de la expresión de *VDR* en cáncer de pulmón se asocia con una mejor supervivencia (73, 95). Esto puede relacionarse con un estado proliferativo más bajo y la detención en fase G1 de células tumorales que expresan alto *VDR* (73, 95). Es necesario seguir investigando el mecanismo por el cual los SNPs asociados a la ruta metabólica de la vitamina D afectan la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión en pacientes con NSCLC.

Este estudio presenta una cohorte de pacientes diagnosticados con NSCLC procedentes de la misma institución y tratados bajo el mismo protocolo terapéutico, lo que asegura la homogeneidad de la muestra en la medida de las variables de supervivencia analizadas. A pesar de que el tamaño muestral en nuestro estudio es limitado y algunas asociaciones no se han podido detectar, el efecto de los polimorfismos en los genes *CYP27B1*, *CYP24A1*, *GC* y *VDR* ha sido evidente.

En resumen, nuestros resultados sugirieron que el polimorfismo del gen *VDR BmsI* rs1544410 puede actuar sustancialmente como factor protector para el desarrollo de NSCLC. Más estudios en diferentes poblaciones también podrían contribuir a encontrar asociaciones adicionales entre otros genes y polimorfismos en la ruta metabólica de la vitamina D y el riesgo de NSCLC. Así mismo, este estudio encontró que los polimorfismos *CYP27B1* rs4646535, *CYP24A1* rs6068816, *GC* rs7041, *VDR* (Cdx-2; rs11568820), *VDR* (TaqI; rs731236) y *VDR* (ApaI; rs7975232) están asociados a la supervivencia en NSCLC y pueden actuar sustancialmente como marcadores pronósticos de la enfermedad.

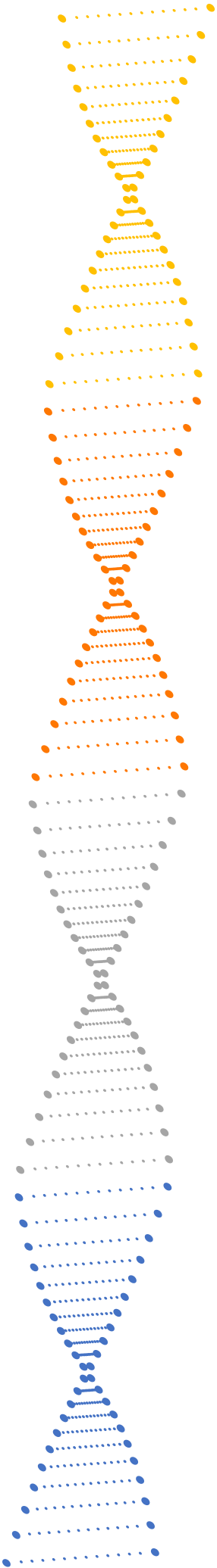


CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

- I. El genotipo AA en el gen *VDR BmsI* rs1544410 se asoció significativamente con un menor riesgo de NSCLC, tanto en el modelo genotípico como en el recesivo.
- II. Los polimorfismos *CYP24A1* rs6068816 y *VDR TaqI* rs731236 se asociaron con el riesgo a de NSCLC en el modelo bivariante.
- III. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos rs10877012 (*CYP27B1*), rs4646536 (*CYP27B1*), rs703842 (*CYP27B1*), rs3782130 (*CYP27B1*), rs4809957 (*CYP24A1*), rs10741657 (*CYP2R1*), rs7041 (*GC*) y *VDR ApaI* (rs7975232), *VDR FokI* (rs2228570) y *VDR Cdx2* (rs11568820) con la susceptibilidad a NSCLC.
- IV. Los pacientes portadores del alelo A para el polimorfismo rs4646536 *CYP27B1* presentaron una fuerte tendencia a un mayor riesgo de muerte y un mayor riesgo de progresión en 194 pacientes con NSCLC. Adicionalmente, los portadores del genotipo rs4646536-AA mostraron una mayor progresión en subgrupo de 146 pacientes con NSCLC no resecado.
- V. El genotipo AA para *VDR Cdx2* (rs11568820) se asoció con un mayor riesgo de muerte y mostraron una tendencia hacia una mayor progresión en el subgrupo de 48 pacientes con NSCLC resecado.
- VI. Se encontró un mayor riesgo de muerte y progresión en los pacientes con NSCLC no resecado, portadores del genotipo TT para el polimorfismo rs6068816 *CYP24A1*.
- VII. Los portadores del genotipo GG para el polimorfismo *VDR TaqI* rs731236 se asociaron con un mayor riesgo de muerte y progresión en los pacientes con NSCLC no resecado.
- VIII. Pacientes con NSCLC resecado portadores del genotipo GG para rs7041 (*GC*) presentaron un mayor riesgo de muerte (Modelo de Cox univariante) y un mayor riesgo de progresión (Modelo de Cox multivariante).
- IX. El genotipo AA para *VDR ApaI* (rs7975232) mostró un mayor riesgo de muerte (Modelo de Cox univariante) y un mayor riesgo de progresión (Modelo de Cox multivariante) en pacientes con NSCLC no resecado.

- X. No se encontró una relación entre los polimorfismos rs3782130 (*CYP27B1*), rs10877012 (*CYP27B1*), rs4809957 (*CYP24A1*), rs10741657 (*CYP2R1*), *VDR* Bmsl (rs1544410) y *VDR* FokI (rs2228570) y la supervivencia en nuestra población de estudio.



REFERENCIAS

8 REFERENCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144(8):1941-53.
3. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7-33.
4. Wahidi MM, Govert JA, Goudar RK, Gould MK, McCrory DC, Physicians ACoC. Evidence for the treatment of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer?: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007;132(3 Suppl):94S-107S.
5. Taylor R, Najafi F, Dobson A. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int J Epidemiol.* 2007;36(5):1048-59.
6. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):453-4.
7. Cao J, Yang C, Li J, Chen R, Chen B, Gu D, et al. Association between long-term exposure to outdoor air pollution and mortality in China: a cohort study. *J Hazard Mater.* 2011;186(2-3):1594-600.
8. Hales S, Blakely T, Woodward A. Air pollution and mortality in New Zealand: cohort study. *J Epidemiol Community Health.* 2012;66(5):468-73.
9. Katanoda K, Sobue T, Satoh H, Tajima K, Suzuki T, Nakatsuka H, et al. An association between long-term exposure to ambient air pollution and mortality from lung cancer and respiratory diseases in Japan. *J Epidemiol.* 2011;21(2):132-43.
10. Lantz PM, Mendez D, Philbert MA. Radon, smoking, and lung cancer: the need to refocus radon control policy. *Am J Public Health.* 2013;103(3):443-7.
11. Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA, Albanes D, Bandera EV, van den Brandt PA, et al. Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(3):657-67.

12. The alpha-tocopherol, beta-carotene lung cancer prevention study: design, methods, participant characteristics, and compliance. The ATBC Cancer Prevention Study Group. *Ann Epidemiol.* 1994;4(1):1-10.
13. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1996;334(18):1150-5.
14. Yang IA, Holloway JW, Fong KM. Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *J Thorac Dis.* 2013;5 Suppl 5(Suppl 5):S454-62.
15. Li J, Yang M, Li P, Su Z, Gao P, Zhang J. Idiopathic pulmonary fibrosis will increase the risk of lung cancer. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(17):3142-9.
16. Powell HA, Iyen-Omofoman B, Baldwin DR, Hubbard RB, Tata LJ. Chronic obstructive pulmonary disease and risk of lung cancer: the importance of smoking and timing of diagnosis. *J Thorac Oncol.* 2013;8(4):e34-5.
17. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(10):1563-79.
18. Wei H, Jing H, Wei Q, Wei G, Heng Z. Associations of the risk of lung cancer with serum 25-hydroxyvitamin D level and dietary vitamin D intake: A dose-response PRISMA meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(37):e12282.
19. AS. F. Harrison. *Manual de Medicina* 2010.
20. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(13):1367-80.
21. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(5):584-94.
22. Edge SB BR CC, Fritz AG, Green FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual.* Springer-Verlag, editor. New York 2010.
23. Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, Gainor JF, Heist RS. Lung cancer. *Lancet.* 2021;398(10299):535-54.
24. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health.* 2019;85(1).
25. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher

susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6169-77.

26. Shi Y, Au JS, Thongprasert S, Srinivasan S, Tsai CM, Khoa MT, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol.* 2014;9(2):154-62.

27. Ou SH. Lung cancer in never-smokers. Does smoking history matter in the era of molecular diagnostics and targeted therapy? *J Clin Pathol.* 2013;66(10):839-46.

28. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4275-83.

29. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4247-53.

30. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):39-51.

31. Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, Bazhenova LA, Borghaei H, Camidge DR, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 4.2016. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016;14(3):255-64.

32. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(4):253-65.

33. Adjei AA. Pharmacology and mechanism of action of pemetrexed. *Clin Lung Cancer.* 2004;5 Suppl 2:S51-5.

34. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* 1991;51(22):6110-7.

35. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(21):3543-51.

36. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002;346(2):92-8.
37. Ge N, Chu XM, Xuan YP, Ren DQ, Wang Y, Ma K, et al. Associations between abnormal vitamin D metabolism pathway function and non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(6):7538-44.
38. Kong J, Chen X, Wang J, Li J, Xu F, Gao S, et al. Genetic Polymorphisms in the Vitamin D Pathway and Non-small Cell Lung Cancer Survival. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(3):1709-15.
39. Asselain B, Barrière JR, Clarot C, Vabre JP, Gentil Le Pecq B, Duval Y, et al. Metastatic NSCLC: Clinical, molecular, and therapeutic factors associated with long-term survival. *Respir Med Res*. 2019;76:38-44.
40. Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol*. 2017;7(9).
41. Davis JS, Prophet E, Peng HL, Lee HY, Tidwell RSS, Lee JJ, et al. Potential Influence on Clinical Trials of Long-Term Survivors of Stage IV Non-small cell Lung Cancer. *JNCI Cancer Spectr*. 2019;3(2):pkz010.
42. Wang T, Nelson RA, Bogardus A, Grannis FW, Jr. Five-year lung cancer survival: which advanced stage nonsmall cell lung cancer patients attain long-term survival? *Cancer*. 2010;116(6):1518-25.
43. Simeone JC, Nordstrom BL, Patel K, Klein AB. Treatment patterns and overall survival in metastatic non-small-cell lung cancer in a real-world, US setting. *Future Oncol*. 2019;15(30):3491-502.
44. Cornwell LD, Echeverria AE, Samuelian J, Mayor J, Casal RF, Bakaeen FG, et al. Video-assisted thoracoscopic lobectomy is associated with greater recurrence-free survival than stereotactic body radiotherapy for clinical stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2018;155(1):395-402.
45. Pérez-Ramírez C, Cañadas-Garre M, Alnatsha A, Molina M, Robles AI, Villar E, et al. Interleukins as new prognostic genetic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Surg Oncol*. 2017;26(3):278-85.

46. Heist RS, Zhou W, Wang Z, Liu G, Neuberg D, Su L, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D, VDR polymorphisms, and survival in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(34):5596-602.
47. Zhou W, Heist RS, Liu G, Neuberg DS, Asomaning K, Su L, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor and survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(11):2239-45.
48. Latacz M, Snarska J, Kostyra E, Fiedorowicz E, Savelkoul HF, Grzybowski R, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in 25-Hydroxyvitamin D3 1-Alpha-Hydroxylase (CYP27B1) Gene: The Risk of Malignant Tumors and Other Chronic Diseases. *Nutrients*. 2020;12(3).
49. Yu WD, Ma Y, Flynn G, Muindi JR, Kong RX, Trump DL, et al. Calcitriol enhances gemcitabine anti-tumor activity in vitro and in vivo by promoting apoptosis in a human pancreatic carcinoma model system. *Cell Cycle*. 2010;9(15):3022-9.
50. El-Sharkawy A, Malki A. Vitamin D Signaling in Inflammation and Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Molecules*. 2020;25(14).
51. Negri M, Gentile A, de Angelis C, Montò T, Patalano R, Colao A, et al. Vitamin D-Induced Molecular Mechanisms to Potentiate Cancer Therapy and to Reverse Drug-Resistance in Cancer Cells. *Nutrients*. 2020;12(6).
52. Higashimoto Y, Ohata M, Nishio K, Iwamoto Y, Fujimoto H, Uetani K, et al. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid inhibit the growth of a lung cancer cell line. *Anticancer Res*. 1996;16(5a):2653-9.
53. Light BW, Yu WD, McElwain MC, Russell DM, Trump DL, Johnson CS. Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. *Cancer Res*. 1997;57(17):3759-64.
54. Hershberger PA, McGuire TF, Yu WD, Zuhowski EG, Schellens JH, Egorin MJ, et al. Cisplatin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis in association with increased mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKK-1) expression. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(10):821-9.
55. Young MR, Ihm J, Lozano Y, Wright MA, Prechel MM. Treating tumor-bearing mice with vitamin D3 diminishes tumor-induced myelopoiesis and associated immunosuppression, and reduces tumor metastasis and recurrence. *Cancer Immunol Immunother*. 1995;41(1):37-45.

56. Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, Takeda E, Okano T. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):429-40.
57. Anic GM, Weinstein SJ, Mondul AM, Männistö S, Albanes D. Serum vitamin D, vitamin D binding protein, and lung cancer survival. *Lung Cancer*. 2014;86(3):297-303.
58. Wu X, Cheng J, Yang K. Vitamin D-Related Gene Polymorphisms, Plasma 25-Hydroxy-Vitamin D, Cigarette Smoke and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Risk. *Int J Mol Sci*. 2016;17(10).
59. Haznadar M, Krausz KW, Margono E, Diehl CM, Bowman ED, Manna SK, et al. Inverse association of vitamin D(3) levels with lung cancer mediated by genetic variation. *Cancer Med*. 2018;7(6):2764-75.
60. Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med*. 2018;50(4):1-14.
61. Kong J, Xu F, Qu J, Wang Y, Gao M, Yu H, et al. Genetic polymorphisms in the vitamin D pathway in relation to lung cancer risk and survival. *Oncotarget*. 2015;6(4):2573-82.
62. Rozmus D, Ciesielska A, Płomiński J, Grzybowski R, Fiedorowicz E, Kordulewska N, et al. Vitamin D Binding Protein (VDBP) and Its Gene Polymorphisms-The Risk of Malignant Tumors and Other Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
63. Ruiz-Ballesteros AI, Meza-Meza MR, Vizmanos-Lamotte B, Parra-Rojas I, de la Cruz-Mosso U. Association of Vitamin D Metabolism Gene Polymorphisms with Autoimmunity: Evidence in Population Genetic Studies. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24).
64. Duan L, Xue Z, Ji H, Zhang D, Wang Y. Effects of CYP2R1 gene variants on vitamin D levels and status: A systematic review and meta-analysis. *Gene*. 2018;678:361-9.
65. Parise RA, Egorin MJ, Kanterewicz B, Taimi M, Petkovich M, Lew AM, et al. CYP24, the enzyme that catabolizes the antiproliferative agent vitamin D, is increased in lung cancer. *Int J Cancer*. 2006;119(8):1819-28.
66. Maj E, Trynda J, Maj B, Gębura K, Bogunia-Kubik K, Chodyński M, et al. Differential response of lung cancer cell lines to vitamin D derivatives depending on EGFR, KRAS, p53 mutation status and VDR polymorphism. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019;193:105431.

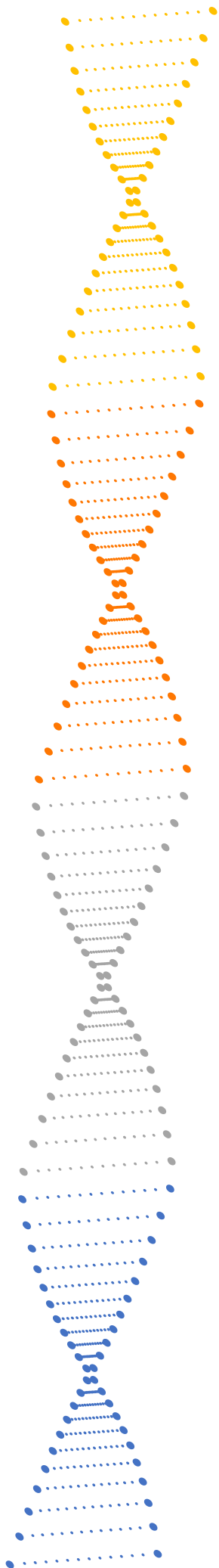
67. Guan H, Liu C, Chen Z, Wang L, Li C, Zhao J, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates expression of hsa-let-7a-2 through the interaction of VDR/VDRE in human lung cancer A549 cells. *Gene*. 2013;522(2):142-6.
68. Linowiecka K, Wolnicka-Glubisz A, Brozyna AA. Vitamin D endocrine system in breast cancer. *Acta Biochim Pol*. 2021;68(4):489-97.
69. Miki H, Okito A, Akiyama M, Ono T, Tachikawa N, Nakahama KI. Genetic and epigenetic regulation of osteopontin by cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate in osteoblasts. *Gene*. 2020;763:145059.
70. Pineda Lancheros LE, Pérez Ramírez C, Sánchez Martín A, Gálvez Navas JM, Martínez Martínez F, Ramírez Tortosa MdC, et al. Impact of Genetic Polymorphisms on the Metabolic Pathway of Vitamin D and Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. *Nutrients*2021. p. 3783.
71. Yokomura K, Suda T, Sasaki S, Inui N, Chida K, Nakamura H. Increased expression of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase gene in alveolar macrophages of patients with lung cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(12):5704-9.
72. Wang W, Hu W, Xue S, Chen Q, Jiang Y, Zhang H, et al. Vitamin D and Lung Cancer; Association, Prevention, and Treatment. *Nutr Cancer*. 2020:1-13.
73. Srinivasan M, Parwani AV, Hershberger PA, Lenzner DE, Weissfeld JL. Nuclear vitamin D receptor expression is associated with improved survival in non-small cell lung cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;123(1-2):30-6.
74. Dogan I, Onen HI, Yurdakul AS, Konac E, Ozturk C, Varol A, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of lung cancer. *Med Sci Monit*. 2009;15(8):BR232-42.
75. Yan Y. Association of vitamin D receptor gene Apa1 and Taq1 polymorphisms with susceptibility to lung squamous cell carcinoma. *Journal of Hebei Medical University*. 2017;37(1):20.
76. Kaabachi W, Kaabachi S, Rafrafi A, Amor AB, Tizaoui K, Haj Sassi F, et al. Association of vitamin D receptor FokI and ApaI polymorphisms with lung cancer risk in Tunisian population. *Mol Biol Rep*. 2014;41(10):6545-53.
77. Zang XBaYJaWLaLLaA. Vitamin D receptor gene polymorphism and genetic susceptibility of nonsmall cell lung cancer. *J Trop Med*. 2016;16:905-8.

78. Hülya Çiçek and Nesli Güleken and Serdar Öztuzcu and Alper S. Vitamin D receptor polymorphisms and related biochemical parameters in various cancer species. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2017;42(2):161-8.
79. Gromowski T, Gapska P, Scott RJ, Kąklewski K, Marciniak W, Durda K, et al. Serum 25(OH)D concentration, common variants of the VDR gene and lung cancer occurrence. *Int J Cancer*. 2017;141(2):336-41.
80. Wensheng YEaGCaDPaYCaZYUaJMaXC. Clinical value of vitamin D receptor gene polymorphism in lung cancer screening. *Chinese Journal of Primary Medicine and Pharmacy*. 2018:2320-3.
81. Guangxi MWaGSaZLaSWaL. Clinical study effecton of vitamin D receptor gene polymorphism on the susceptibility of lung squamous cell carcinoma, and chemotherapy curative. *Chronic Pathematol J*. 2014;15:349-51.
82. Duan G-Q, Zheng X, Li W-K, Zhang W, Li Z, Tan W. The Association Between VDR and GC Polymorphisms and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2020;24(5):285-95.
83. Xiong Q, Jiao Y, Yang P, Liao Y, Gu X, Hu F, et al. The association study between CYP24A1 gene polymorphisms and risk of liver, lung and gastric cancer in a Chinese population. *Pathol Res Pract*. 2020;216(12):153237.
84. Li M, Li A, He R, Dang W, Liu X, Yang T, et al. Gene polymorphism of cytochrome P450 significantly affects lung cancer susceptibility. *Cancer Med*. 2019;8(10):4892-905.
85. Qu R, Li X, Quan X, Xia L, Fang X, Li H, et al. Polymorphism in CYP24A1 Is Associated with Lung Cancer Risk: A Case-Control Study in Chinese Female Nonsmokers. *DNA Cell Biol*. 2019;38(3):243-9.
86. Carlberg C. Vitamin D in the Context of Evolution. *Nutrients*. 2022;14(15).
87. Rochel N. Vitamin D and Its Receptor from a Structural Perspective. *Nutrients*. 2022;14(14).
88. Carlberg C. Vitamin D and Its Target Genes. *Nutrients*. 2022;14(7).
89. Makishima M. [Update on recent progress in vitamin D research. Vitamin D receptor and the nuclear receptor superfamily.]. *Clin Calcium*. 2017;27(11):1533-41.
90. Afzal S, Brøndum-Jacobsen P, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Genetically low vitamin D concentrations and increased mortality: Mendelian randomisation analysis in three large cohorts. *BMJ*. 2014;349:g6330.

91. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol.* 2010;28(12):1248-50.
92. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A, et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res.* 2010;20(10):1352-60.
93. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-81.
94. Afzal M, Kazmi I, Al-Abbasi FA, Alshehri S, Ghoneim MM, Imam SS, et al. Current Overview on Therapeutic Potential of Vitamin D in Inflammatory Lung Diseases. *Biomedicines.* 2021;9(12).
95. Kim SH, Chen G, King AN, Jeon CK, Christensen PJ, Zhao L, et al. Characterization of vitamin D receptor (VDR) in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2012;77(2):265-71.
96. Dong AN, Tan BH, Pan Y, Ong CE. The CYP2R1 Enzyme: Structure, Function, Enzymatic Properties and Genetic Polymorphism. *J Pharm Pharm Sci.* 2021;24:94-112.
97. L. Phan, Y. Jin, H. Zhang, W. Qiang, E. Shekhtman, D. Shao, D. Revoe, R. Villamarin, E. Ivanchenko, M. Kimura, Z. Y. Wang, L. Hao, N. Sharopova, M. Bihan, A. Sturcke, M. Lee, N. Popova, W. Wu, C. Bastiani, M. Ward, J. B. Holmes, V. Lyoshin, K. Kaur, E. Moyer, M. Feolo, and B. L. Kattman. "ALFA: Allele Frequency Aggregator." National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 10 Mar. 2020, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/.
98. Jones G. 100 YEARS OF VITAMIN D: Historical aspects of vitamin D. *Endocr Connect.* 2022;11(4).
99. Ramnath N, Nadal E, Jeon CK, Sandoval J, Colacino J, Rozek LS, et al. Epigenetic regulation of vitamin D metabolism in human lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2014;9(4):473-82.
100. Chen G, Kim SH, King AN, Zhao L, Simpson RU, Christensen PJ, et al. CYP24A1 is an independent prognostic marker of survival in patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(4):817-26.
101. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.* 1999;22(3):231-8.

102. Chun RF. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochem Funct.* 2012;30(6):445-56.
103. Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YE. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta.* 2006;372(1-2):33-42.
104. Turner AM, McGowan L, Millen A, Rajesh P, Webster C, Langman G, et al. Circulating DBP level and prognosis in operated lung cancer: an exploration of pathophysiology. *Eur Respir J.* 2013;41(2):410-6.
105. Lafi ZM, Irshaid YM, El-Khateeb M, Ajlouni KM, Hyassat D. Association of rs7041 and rs4588 Polymorphisms of the Vitamin D Binding Protein and the rs10741657 Polymorphism of CYP2R1 with Vitamin D Status Among Jordanian Patients. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015;19(11):629-36.
106. Scazzone C, Agnello L, Ragonese P, Lo Sasso B, Bellia C, Bivona G, et al. Association of CYP2R1 rs10766197 with MS risk and disease progression. *J Neurosci Res.* 2018;96(2):297-304.
107. Nissen J, Rasmussen LB, Ravn-Haren G, Andersen EW, Hansen B, Andersen R, et al. Common variants in CYP2R1 and GC genes predict vitamin D concentrations in healthy Danish children and adults. *PLoS One.* 2014;9(2):e89907.
108. Slater NA, Rager ML, Havrda DE, Harralson AF. Genetic Variation in CYP2R1 and GC Genes Associated With Vitamin D Deficiency Status. *J Pharm Pract.* 2017;30(1):31-6.
109. Ramos-Lopez E, Brück P, Jansen T, Herwig J, Badenhoop K. CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007;23(8):631-6.
110. Randolph JaFKaMAKaBJL. A step-by-step guide to propensity score matching in R. *Pract Assess Res Eval.* 2014;19:1-6.
111. RC. T. R: A language and environment for statistical computing. 4.0.2 ed.
112. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):559-75.
113. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21(2):263-5.

114. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-9.
115. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
116. Liu Y, Chen W, Hu ZB, Xu L, Shu YQ, Pan SY, et al. Plasma Vitamin D Levels And Vitamin D Receptor Polymorphisms Are Associated with Survival of Non-small Cell Lung Cancer. *Chin J Cancer Res*. 2011;23(1):33-7.
117. Akiba T, Morikawa T, Odaka M, Nakada T, Kamiya N, Yamashita M, et al. Vitamin D Supplementation and Survival of Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Cancer Res*. 2018;24(17):4089-97.
118. Li M, Liu X, Liu N, Yang T, Shi P, He R, et al. Association between Polymorphisms of Vitamin D Receptor and Lung Cancer Susceptibility: Evidence from an Updated Meta-analysis. *J Cancer*. 2019;10(16):3639-49.
119. Fronczek M, Strzelczyk JK, Biernacki K, Salatino S, Osadnik T, Ostrowska Z. New Variants of the Cytochrome P450 2R1 (*Biomolecules*. 2021;11(12).
120. Rozmus D, Płomiński J, Augustyn K, Cieślińska A. rs7041 and rs4588 Polymorphisms in Vitamin D Binding Protein Gene (VDBP) and the Risk of Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022;23(2).
121. Turna A, Pekçolaklar A, Metin M, Yaylim I, Gurses A. The effect of season of operation on the survival of patients with resected non-small cell lung cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012;14(2):151-5.
122. Xiong L, Cheng J, Gao J, Wang J, Liu X, Wang L. Vitamin D receptor genetic variants are associated with chemotherapy response and prognosis in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2013;14(4):433-9.
123. Vaughan-Shaw PG, O'Sullivan F, Farrington SM, Theodoratou E, Campbell H, Dunlop MG, et al. The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2017;116(8):1092-110.



ANEXOS

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1.

Comité ético del Proyecto “Asociación entre los polimorfismos genéticos implicados en el metabolismo de la vitamina D y el riesgo y la supervivencia de patologías oncológicas”



DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D. ANTONIO SALMERÓN GARCÍA, EN CALIDAD DE SECRETARIO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LA PROVINCIA DE GRANADA (CEIM/CEI GRANADA)

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador: _____, para realizar el estudio titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: RIESGO PATOLOGÍAS ONCOLÓGICAS Y VITAMINA D.- ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LA VITAMINA D Y EL RIESGO Y LA SUPERVIVENCIA DE PATOLOGÍAS ONCOLÓGICAS

Código protocolo: FG-VDR-ONCO-2021

Código Portal de Ética: 1322-N-20

Investigador Principal: CRISTINA PEREZ RAMIREZ

Versión de los documentos:

| | | |
|-----------|--------------|---------------------|
| Protocolo | Versión 0.0 | de fecha 15/04/2021 |
| HIP | Versión ---- | de fecha |
| CI | Versión ---- | de fecha |

Y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el proyecto.
- El protocolo del estudio contempla de forma adecuada toda la legislación aplicable
- Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Por lo que este Comité ha acordado emitir **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización del dicho estudio, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro/os correspondiente/s determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevarlo a cabo.

Lo que firmo en Granada

| | | | |
|--------------------------------|---|--------|------------|
| Código Seguro De Verificación: | 703805a6d510e18812b105d1ea7c61b053ae2cf3 | Fecha | 29/04/2021 |
| Normativa | Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica. | | |
| Firmado Por | Antonio Salmeron Garcia | | |
| Url De Verificación | https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/703805a6d510e18812b105d1ea7c61b053ae2cf3 | Página | 1/4 |



9.2 ANEXO 2.

| | |
|--|--------------------------|
| SOLICITUD DE PETICIÓN DE BIORRECURSOS Servicio de provisión de muestras y datos asociados | Código solicitud: |
|--|--------------------------|


Datos de contacto del Investigador Principal (Solicitante)

| | |
|---|---|
| Nombre y apellidos | Cristina Pérez Ramírez |
| NIF | 75134079W |
| Servicio/Departamento | Servicio de Farmacia |
| Institución | Hospital Universitario Virgen de las Nieves |
| Dirección postal | Avenida Fuerzas Armadas, 2, 18014 |
| Teléfono | 607966508 |
| Dirección electrónica | cperezramirez87@gmail.com |
| Otras personas de contacto autorizadas (nombre, teléfono, mail) | |

Datos fiscales / Datos factura electrónica

| | |
|--------------------|--|
| Empresa | Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental (FIBAO) |
| CIF | G-18374199 |
| Dirección fiscal | Av las Fuerzas Armadas, Nº 2 18014, Granada, Granada |
| Órgano Gestor | (Código/descripción) |
| Oficina Contable | (Código/descripción) |
| Unidad Tramitadora | (Código/descripción) |
| Órgano Proponente | (Código/descripción) |

SECCIÓN A: NATURALEZA, CANTIDAD Y FORMATO DE LAS MUESTRAS QUE SE SOLICITAN. DATOS CLÍNICOS O BIOLÓGICOS SOLICITADOS

| | |
|--|--------------------|
| Firma del solicitante  | Recepción Biobanco |
| Fecha: 24 de noviembre del 2020 | Fecha: |

Indique las muestras biológicas que requiere para su proyecto de investigación. Puede describirlas mediante criterios clínicos y diagnósticos (ver información adicional de esta sección).

Las muestras se distribuyen en el formato que el investigador requiera, gracias a su procesamiento previo en el Biobanco (ver información adicional de esta sección).

Si precisa soporte para la selección de sus muestras, solicite nuestros **SERVICIOS A MEDIDA**.

| | |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Diagnóstico y naturaleza | Series poblacionales de ADN genómico |
| Formato | ADN extraído |
| Número de muestras | 1485 |
| Cantidad de muestra | 50 ul |
| Datos clínicos requeridos | No procede |

INFORMACIÓN ADICIONAL:

NATURALEZA:

Enfermedades raras, enfermedades genéticas

Enfermedades neurodegenerativas

Enfermedades oncológicas

Enfermedades infecciosas

Series poblacionales de ADN genómico

Tejido o fracciones celulares sanas (cordón umbilical, grasa, médula ósea, elementos celulares de sangre periférica movilizada o no, fibroblastos, queratinocitos,...)

FORMATOS DISPONIBLES:

Provisión de muestras:

Muestras en fresco:

sangre y órganos

tejidos en fresco

Sección en portaobjetos fijada

Sección en tubo fijada (sección de 10 micras)

Sección en tubo congelada (sección de 20 micras)

Sección en portaobjetos congelada

Sección de matriz de muestras (TMA) de 50 muestras

DNA

c-DNA

RNA

Fluido corporal preservado

Suero

Plasma

Extendido celular concentrado

Extendido celular directo

Provisión de líneas celulares:

- Línea establecida de células madre embrionarias (HESC)
- Línea establecida de células madre mesenquimales (MSC) humanas de cordón umbilical
- Línea establecida de células madre mesenquimales (MSC) humanas de grasa
- Línea establecida de células madre pluripotentes inducidas
- Línea establecida modificada genéticamente
- Línea mínimamente pasada normal humana de fibroblastos adultos
- Línea mínimamente pasada normal humana de queratinocitos
- Línea mínimamente pasada tumoral
- Líneas inmortalizadas PBMC

Provisión de datos clínicos:

Datos clínicos y diagnósticos disponibles: Datos clínicos y diagnósticos a recoger mediante encuesta

SECCIÓN B: Datos del proyecto.

Título:

**ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO
DE LA VITAMINA D Y EL RIESGO Y LA SUPERVIVENCIA DE PATOLOGÍAS ONCOLÓGICAS**

SECCIÓN C: Informe favorable de un Comité de Ética de la Investigación.

El informe del comité ético deberá pertenecer a la red de comités de ética del SSPA. Se indicará el comité, la referencia del proyecto, y la fecha de inicio y de finalización. Si no se dispone de dicha evaluación, el Biobanco dispone de un Comité de Ética de la Investigación que pueden evaluar el proyecto.

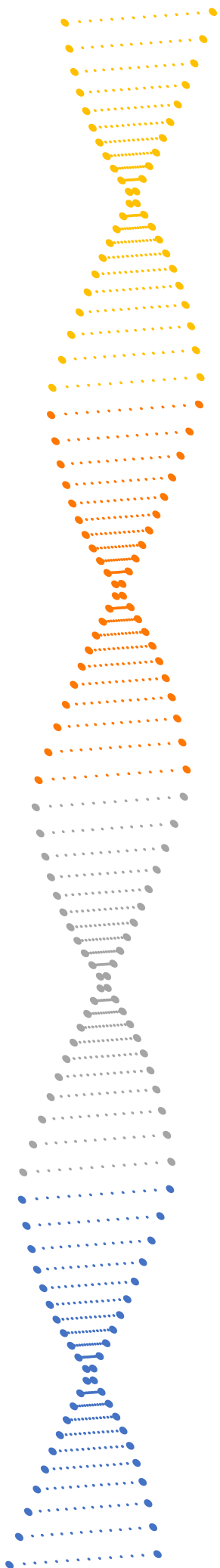


SECCIÓN D: Informe favorable de un Comité Científico.

El informe del comité científico deberá ser de agencias externas, preferiblemente agencias de evaluación de convocatorias de financiación competitivas. Se indicará la agencia, la referencia del proyecto en la convocatoria de evaluación, y la fecha de inicio y de finalización. Si no se dispone de dicha evaluación externa, el Biobanco dispone de un Comité Científico externos que pueden evaluar el proyecto.

Este formulario puede enviarse por correo ordinario o por correo electrónico a cualquiera de las siguientes direcciones:

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía
Parque Tecnológico Ciencias de la Salud
Centro de Investigación Biomédica
Avda. del Conocimiento s/n
18016 Granada • Spain
Teléfono: 0034 958 894 672
Dirección electrónica: biobanco.sspa@juntadeandalucia.es



PUBLICACIONES

10 PUBLICACIONES

Los resultados de esta Tesis han sido publicados como dos artículos originales. Ambos se han publicado en la revista *Nutrients* (JCR, Factor de impacto 2022: 6.706; Categoría: “Nutrition & Dietetics” 15/90, Quartil 1 (Q1)).

Pineda Lancheros LE, Pérez Ramírez C, Sánchez Martín A, Gálvez Navas JM, Martínez Martínez F, Ramírez Tortosa MDC, Jiménez Morales A. Impact of Genetic Polymorphisms on the Metabolic Pathway of Vitamin D and Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. *Nutrients*. 2021 Oct 25;13(11):3783. doi: 10.3390/nu13113783. Received: 23 September 2021/ Revised: 15 October 2021 / Accepted: 21 October 2021 / Published: 25 October 2021.

Pineda Lancheros LE, Rojo Tolosa S, Gálvez Navas JM, Martínez Martínez F, Sánchez Martín A, Jiménez Morales A, Pérez Ramírez C. Effect of Single Nucleotide Polymorphisms in the Vitamin D Metabolic Pathway on Susceptibility to Non-Small-Cell Lung Cancer. *Nutrients*. 2022 Nov 4;14(21):4668. doi: 10.3390/nu14214668. Received: October 2022 / Revised: 14 October 2022 / Accepted: 02 November 2022 / Published: 04 November 2022.

Nutrients. 2021 Oct 25;13(11):3783. doi: 10.3390/nu13113783.

Impact of genetic polymorphisms on the metabolic pathway of vitamin D and survival in non-small cell lung cancer

Laura Elena Pineda Lancheros ¹, Cristina Pérez Ramírez ^{1,2,*}, Almudena Sánchez Martín ¹, José María Gálvez Navas ^{1,2}, Fernando Martínez Martínez ³, María del Carmen Ramírez Tortosa ² and Alberto Jiménez Morales ¹

¹ Pharmacy Service, Pharmacogenetics Unit, University Hospital Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain; lepinedal@unal.edu.co (L.E.P.L.); almuweb06@gmail.com (A.S.M.); alberto.jimenez.morales.sspa@juntadeandalucia.es (A.J.M.)

² Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Center of Biomedical Research, University of Granada, Avda. del Conocimiento s/n., 18016, Armilla, Granada, Spain; cperezramirez87@ugr.es (C.P.R.); jmgalna7@gmail.com (J.M.G.N.); mramirez@ugr.es (M.d.C.R.T)

³ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Social and Legal Assistance Pharmacy Section, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain; femartin@ugr.es

* Correspondence: cperezramirez87@ugr.es

Abstract: Vitamin D has been associated with risk, development, and progression of cancer. However, the genes involved in its metabolism are highly polymorphic, compromising its activity. The aim of this study is to evaluate the association between the gene polymorphisms involved in the metabolic pathway of vitamin D and survival in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). The study was designed as an observational cohort which included 194 Caucasians patients from southern Spain with NSCLC. Real-time polymerase chain reaction was used to analyze the following polymorphisms: CYP27B1 rs4646536, rs3782130, and rs10877012; CYP24A1 rs6068816 and rs4809957; GC rs7041; CYP2R1 rs10741657; VDR rs1544410 (BsmI), rs11568820 (Cdx-2), rs2228570 (FokI), rs7975232 (ApaI), and rs731236 (TaqI). Progression-free survival (PFS) and overall survival were assessed. Cox regression showed that rs4646536 was associated with PFS in the general population ($P=0.0233$) and in the non-resected NSCLC subgroup ($P=0.0233$). In the resected NSCLC subgroup, rs11568820 was associated with OS ($P=0.0129$) and rs7041 with PFS ($P=0.0447$). In the non-resected NSCLC subgroup, rs6068816 was associated with PFS ($P=0.0048$) and OS ($P=0.0089$) and rs731236 and rs7975232 were associated with OS ($P=0.0005$) and PFS ($P=0.0002$) respectively. The other polymorphisms showed no effect on the results. The rs4646536, rs6068816, rs7041, rs11568820, rs731236, and rs7975232 polymorphisms are associated with survival in NSCLC and may have a substantial role as prognostic markers of the disease.

Keywords: Vitamin D metabolism; survival; non-small cell lung cancer; single nucleotide polymorphisms; CYP27B1; CYP24A1; CYP2R1; GC; VDR.

1. Introduction

The second most commonly diagnosed type of tumor is lung cancer, after breast cancer, with a global incidence of around 11.4 [1]. It represents the leading cause of cancer death worldwide (18.0%) [1]. According to the latest cancer statistics, it is estimated that there will be more than 235,760 new cases and 131,880 deaths in the United States in 2021 [2].

Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents around 80%–85% of all lung cancers [3]. Survival of lung cancer patients 5 years after diagnosis is between 10% and 20% in most countries, even after surgery, chemotherapy, and radiotherapy [4]. There is therefore a need to look for new

prognostic biomarkers that will improve survival in these patients [5]. The main factor influencing disease prognosis is the initial tumor stage [6-8]. However, studies in patients diagnosed with the same stage have shown variability in survival, which suggests that other factors may influence the prognosis of NSCLC [9-12]. It should be emphasized that genetic alterations such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) may be the cause of this interindividual variability in survival of patients with NSCLC [5,13-15].

Vitamin D is notable for its wide-ranging biological functions, which involve, among other things, suppressing metastasis by inhibiting tumor progression, angiogenesis, and cell proliferation, or by apoptosis promotion in cancer cells [5,16-20]. In lung cancer, specifically, in vivo and in vitro studies have been carried out, showing that 1,25-dihydroxycholecalciferol inhibits growth of lung cancerous cell lines and affects cell cycle regulation in squamous cell carcinoma models [21-23]. In mouse models, calcitriol proved to inhibit growth of lung tumors and metastases [24,25]. Furthermore, observational studies have found that lung cancer mortality is lower during the autumn and summer months, the times of year associated with the highest vitamin D levels [26,27]. Risk, development, and growth of solid and non-solid tumors have been associated with vitamin D low levels [19].

Vitamin D has two basic isoforms: vitamin D₂ (ergocalciferol) and vitamin D₃ (cholecalciferol). Both are produced endogenously following sun exposure and by direct consumption through diet or supplements [27-30]. The two isoforms of vitamin D (D₂ and D₃) bind to the vitamin D binding protein (VDBP), encoded by the group-specific component (vitamin D binding protein) gene (GC), facilitating their transport [29,31-33]. Both forms are subsequently metabolized in the liver to 25-hydroxycholecalciferol, by 25-hydroxylases (encoded by CYP2R1 and CYP27A1), this being its main circulating form [29,31,34,35]; 1 α -hydroxylase (encoded by CYP27B1) converts it to 1,25-dihydroxycholecalciferol, either in the kidney (where it is released into circulation) or in specific target organs, converting it to its biologically active form [16,27-29,31]. In the target tissues, 1,25-dihydroxycholecalciferol binds to the vitamin D receptor (VDR) and interacts with the retinoid X receptor (RXR), forming a heterodimer complex (VDR-RXR), which is translocated to the nucleus, binding to the VDR response elements in numerous genomic loci, some of which have anti-cancer properties [16,31,36,37]. Finally, circulating 1,25-dihydroxycholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol are degraded by 24-hydroxylase (encoded by CYP24A1) to calcitric acid and other hydrosoluble products which are inactive and are excreted in bile or urine [27,29,31,36].

The genes that encode the enzymes involved in the vitamin D pathway are highly polymorphic [27]. These genetic alterations may influence the expression of those genes in lung tumor tissue, modifying the activity of vitamin D [15,28,36,38-41]. Therefore, they may play a vital part in the development, progression, and prognosis of NSCLC [5]. In this context, polymorphisms in the genes that mediate the metabolic pathway of vitamin D (CYP27B1, CYP24A1, CYP2R1, GC and VDR) may have a crucial role in the survival of patients with NSCLC [5,14,15,31,42,43].

On the basis of the foregoing, this study was designed to evaluate the association of SNP-type polymorphisms in the genes implicated in the vitamin D metabolic pathway with progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in Caucasian patients (from Spain) with NSCLC.

2. Material and Methods

2.1. Study Design

A prospective observational cohort study was carried out.

2.2. Ethics statement

This study was conducted with the approval of the Ethics and Research Committee of the Sistema Andaluz de Salud (Andalusian Health Service) (SAS) and in accordance with the Declaration of Helsinki (code: 1322-N-20). A written informed consent form was signed by the patients for collection of saliva or blood samples and its further donation to the biobank. The confidentiality of the samples treated was ensured through their codification.

2.3. Study population

The study included 194 patients of Caucasian origin from southern Spain with NSCLC, recruited in the Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain, diagnosed between 2003 and 2019 and followed up until December 2020. The inclusion criteria for the patient group were age 18 years or over, confirmed histologic or cytologic diagnosis of NSCLC (stages I-IV), adequate organ function, measurable disease on computed tomography, with no previous treatment and available clinical data. The patients were treated in accordance with the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines [44].

2.4. Sociodemographic and clinical variables

From the clinical records we collected sociodemographic information, including family history of cancer, gender, smoking status, previous lung disease, drinking status, body mass index (BMI), and age at diagnosis. Individuals were classified as active smokers if they had smoked 100 or more cigarettes in their lives and currently smoked, as ex-smokers if they had smoked 100 or more cigarettes in their lives but did not currently smoke, and as non-smokers if they had never smoked or had smoked fewer than 100 cigarettes in their lives. Individuals were classified by standard drink units (SDUs) as non-drinkers if they were teetotalers or did not consume alcohol regularly, as active drinkers if their alcohol consumption was greater than 4 SDUs per day in men and greater than 2.5 SDUs per day in women, and as ex-drinkers if their alcohol consumption was greater than 4 SDUs per day in men and greater than 2.5 SDUs per day in women, but they did not currently drink [45]. Histopathologic data (tumor histology and stage) and first-line treatment were also collected. The guidelines of the AJCC staging system criteria were followed in the tumor classification [46].

2.5. Genetic variables

2.5.1. DNA isolation

The DNA samples, isolated from saliva or blood, were obtained from the Biobank of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves, which is part of the SAS Biobank. BD Falcon™ 50 mL conical tubes were used in saliva samples collection (BD, Plymouth, United Kingdom). BD Vacutainer® tubes with anticoagulant were (3 mL of EDTA K3) were used in blood samples collection. QIAamp DNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) were used in the DNA extraction performance, following the specifications provided by the manufacturer for purification of DNA from saliva or blood, and stored at -40°C. The concentration and purity of the DNA were assessed using a NanoDrop 2000™ UV spectrophotometer with 280/260 and 280/230 absorbance ratios.

2.5.2. Detection of gene polymorphisms

We determined the gene polymorphisms by real-time PCR allelic discrimination assay using TaqMan® probes (ABI Applied Biosystems, QuantStudio 3 Real-Time PCR System), following the manufacturer's instructions.

Table 1. Gene polymorphisms and TaqMan® ID.

| Gene | dbSNP ID | Assay ID |
|---------|--------------------|----------------|
| VDR | rs1544410 (BsmI) | AN324M4* |
| | rs11568820 (Cdx-2) | C__2880808_10 |
| | rs2228570 (FokI) | C__12060045_20 |
| | rs7975232 (ApaI) | C__28977635_10 |
| | rs731236 (TaqI) | C__2404008_10 |
| CYP27B1 | rs4646536 | C__25623453_10 |
| | rs3782130 | ANGZRHH* |
| | rs10877012 | C__26237740_10 |
| CYP24A1 | rs6068816 | C__25620091_20 |
| | rs4809957 | C__3120981_20 |
| GC | rs7041 | C__3133594_30 |
| CYP2R1 | rs10741657 | C__2958430_10 |

*The polymorphisms were analyzed using custom assays by ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

2.6. Survival variables

PFS and OS were used in survival measurement.

Survival was measured by PFS and OS. We evaluated OS as the time from cancer diagnosis to death or final follow-up and calculated PFS as the time from start of treatment to last known follow-up, death, or relapse. The mortality data were obtained from the clinical histories and the Granada population-based cancer registry.

2.7. Statistical analysis

The quantitative data were expressed as the mean (plus/minus standard deviation) for variables with normal distribution or medians and percentiles (25 and 75) for variables with non-normal distribution. Normality was assessed with the usage of Shapiro-Wilks test.

We used the Kaplan-Meier method and log-rank test to analyze the associations between survival and the demographic, genetic, and clinical variables. The Cox proportional hazards regression model was used for the multivariate analysis (stepwise backward selection method) to obtain the adjusted hazard ratio (HR) and the 95% confidence interval (95% CI) for the possible survival prognostic factors.

All the tests were bilateral with a significance level of $P < 0.05$. R 4.0.2 software was used to perform the data analysis [47].

The linkage disequilibrium, Hardy-Weinberg equilibrium, and haplotype frequency were determined through the D' and r^2 coefficients and were estimated using the PLINK and Haploview 4.2 programs [48,49].

3. Results

3.1. Patient characteristics

A total of 194 Caucasian patients from southern Spain with NSCLC were included in the study. Their sociodemographic, clinical, and pathologic characteristics are summarized in Table 2. The mean age of the patients was 60.86 ± 10.51 years, 141 were men (141/194; 72.68%), and 130 were stage IIIB-IV (130/194; 67.36%). Surgery was the first course of treatment for 48 patients (48/194; 24.74%), of whom 97.91% (47/48) had stage I-IIIa. During follow-up, 154 fatal events were

recorded. For all patients, the median OS and PFS were 26.8 [15.5-64.2] and 13.7 [6.46-29.9] months respectively.

Table 2. Classification of the 194 NSCLC patients according to the clinico-pathologic characteristics.

| | n | % |
|---------------------------|-------------------|-------|
| Gender | | |
| Female | 53 | 27.32 |
| Male | 141 | 72.68 |
| Family history of cancer | | |
| Yes | 102 | 53.4 |
| No | 89 | 46.6 |
| Previous lung disease | | |
| Yes | 55 | 28.35 |
| No | 139 | 71.65 |
| Smoking status | | |
| Current smokers | 92 | 47.42 |
| Former smokers | 75 | 38.66 |
| Non smokers | 27 | 13.92 |
| Alcoholic status | | |
| Current drinkers | 33 | 20.50 |
| Former drinkers | 4 | 2.48 |
| Non-drinkers | 124 | 77.02 |
| BMI | 27.09±5.12 | |
| <24 | 31 | 27.19 |
| >24 | 83 | 72.81 |
| Age at NSCLC diagnosis | 60.86±10.51 | |
| ≤60 | 85 | 43.81 |
| >60 | 109 | 56.19 |
| Histology | | |
| Adenocarcinoma | 119 | 61.34 |
| Squamous cell carcinoma | 72 | 37.11 |
| Unknown | 3 | 1.55 |
| Tumor stage | | |
| I, II or IIIA | 63 | 32.64 |
| IIIB or IV | 130 | 67.36 |
| First course of treatment | | |
| Surgery | 48 | 24.74 |
| Chemoradiotherapy | 121 | 62.37 |
| Targeted therapy | 25 | 12.89 |
| Survival | | |
| PFS | 13.7 [6.46-29.96] | |
| OS | 26.8 [15.5-64.2] | |

Qualitative variables: number (percentage); Quantitative variables: Normal distribution: mean ± standard deviation; Non-normal distribution: P50 [P25, P75].

3.2. Influence of clinical-pathologic characteristics on survival

3.2.1. Overall population

Median OS was greater in women ($P_{\log\text{-rank}}=0.030$; 38.9 vs 26.1 months; Table S1; Figure S1), non-drinkers ($P_{\log\text{-rank}}=0.0005$; 36.53 months vs 21.43 for drinkers and 8.85 for ex-drinkers; Table S1; Figure S2), stages I, II, and IIIA ($P_{\log\text{-rank}}<0.001$; 107.6 versus 21.1 months; Table S1; Figure S3), and

with surgery as the first course of treatment ($P_{\log\text{-rank}} < 0.001$; 130.0 vs 23.2 months; Table S1; Figure S4).

Median PFS was associated with previous lung disease ($P_{\log\text{-rank}} = 0.040$; 17.6 vs 12.3 months; Table S2; Figure S5), non-drinkers ($P_{\log\text{-rank}} = 0.020$; 17.07 months vs 9.17 for drinkers and 7.82 for ex-drinkers; Table S2; Figure S6), stages I, II, and IIIA ($P_{\log\text{-rank}} < 0.001$; 29.4 vs 10.6 months; Table S2; Figure S7), and with surgery as the first course of treatment ($P_{\log\text{-rank}} < 0.001$; 59.0 vs 10.9 months; Table S2; Figure S8).

3.2.2. Subgroup analysis

In the subgroup of patients with resected NSCLC, OS was associated with family history of cancer ($P_{\log\text{-rank}} = 0.030$; 103 vs 176 months; Table S3; Figure S9) and PFS was greater in stages I, II, and IIIA ($P_{\log\text{-rank}} = 0.020$; 64.5 vs 6.9 months; Table S4; Figure S10). For patients with non-resected NSCLC, median OS was greater in women ($P_{\log\text{-rank}} = 0.007$; 30.4 vs 20.1 months; Table S5; Figure S11), non-drinkers ($P_{\log\text{-rank}} = 0.002$; 25.4 months vs 18.4 for drinkers and 8.95 for ex-drinkers; Table S5; Figure S12), and in stages I, II, and IIIA ($P_{\log\text{-rank}} = 0.004$; 45.9 vs 21.1 months; Table S5; Figure S13). On the other hand, median PFS was associated with BMI < 24 ($P_{\log\text{-rank}} = 0.020$; 18.8 vs 10.2 months; Table S6; Figure S14) in patients with non-resected NSCLC.

3.3. Genotype distribution

Minor allele frequencies (MAFs) greater than 1% were shown in all the polymorphisms and none of them was excluded from the analysis (Table S7). According to the Hardy-Weinberg equilibrium model, all the gene polymorphism distributions were in agreement with those expected, both for OS (Table S8) and for PFS (Table S9), with the sole exception of OS for *VDR* rs731236 ($P = 0.0231$). No statistical differences were found from the frequencies described for the Iberian population for this variant (*VDR* rs731236 G allele: 0.374 vs 0.423; $P = 0.1777$) (44). The LD' and r^2 linkage disequilibrium values are shown in Table S10. In particular, the *VDR* rs731236/rs1544410, *CYP27B1* rs4646536/rs3782130, *CYP27B1* rs4646536/rs10877012, and *CYP27B1* rs3782130/rs10877012 pairs were in strong linkage disequilibrium (Figure 1).

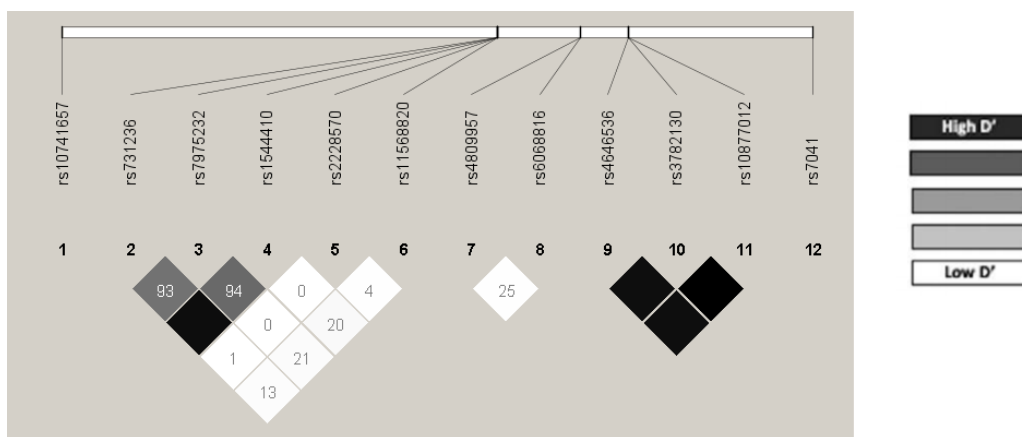


Figure 1. Linkage disequilibrium.

3.4. Influence of gene polymorphisms on survival

3.4.1. Overall population

3.4.1.1 Overall survival

The bivariate analysis showed that OS was associated with the *CYP27B1* rs4646536 gene polymorphism (Table S11). In particular, patients carrying the A allele had a higher risk of death compared to those with the GG genotype ($P = 0.0021$; HR = 2.32; $CI_{95\%} = 1.13-4.73$; Table S11). The Kaplan-Meier plot of OS curves with the A allele of *CYP27B1* rs4646536 is shown in Figure 2 ($P_{\log\text{-rank}} = 0.020$). Median OS was 92.9 ($CI_{95\%} = 34.1$ -not reached [NR]) months for the GG genotype. For the AG and GG genotypes, median OS was 24.9 ($CI_{95\%} = 22.7-38.0$) and 27.0 (95% $CI = 23.2-41.8$)

months respectively. Cox regression adjusted for gender, tumor stage, and first-line treatment showed that the *CYP27B1* rs4646536 polymorphism exhibited a tendency toward association with OS ($P=0.0569$; $HR=2.01$; $CI_{95\%}=0.98-4.14$) ($P_{\text{likelihood ratio test}} < 2 \cdot 10^{-16}$) (Table 3).

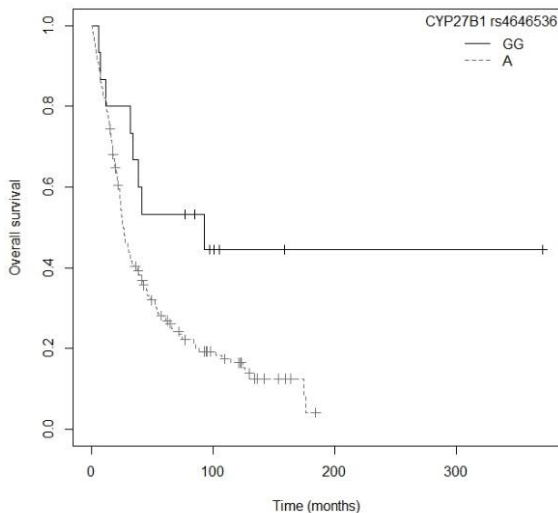


Figure 2. Kaplan-Meier plot of overall survival curves with the A allele of the *CYP27B1* rs4646536 gene polymorphism in 194 patients with NSCLC.

Table 3. Influence of gene polymorphisms and clinical characteristic on overall survival of 194 NSCLC patients.

| | Overall survival | |
|-----------------------------------|-------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-value |
| Gender (Male) | 1.63 (1.11-2.38) | 0.0119 |
| Tumor stage (IIIB-IV) | 2.25 (1.25-4.07) | 0.0070 |
| First-line treatment (No surgery) | 2.65 (1.31-5.35) | 0.0064 |
| <i>CYP27B1</i> rs4646536-A | 2.01 (0.98-4.14) | 0.0569 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% confidence interval.

3.4.1.2 Progression-free survival

Patients carrying the A allele for the *CYP27B1* rs4646536 gene polymorphism showed a higher risk of progression compared to those carrying the GG genotype ($P=0.0266$; $HR=2.07$; $CI_{95\%}=1.08-3.93$; Table S12). The Kaplan-Meier plot of PFS curves with the A allele of *CYP27B1* rs4646536 is shown in Figure 3 ($P_{\text{log-rank}}=0.020$). Median PFS was 30.0 ($CI_{95\%}=12.3\text{-NR}$) months for the GG genotype. For AG and GG carriers, median PFS was 12.3 ($CI_{95\%}=9.17\text{-}17.6$) and 13.3 ($CI_{95\%}=10.9\text{-}17.6$) months respectively. Cox regression adjusted for first-line treatment showed that the *CYP27B1* rs4646536 polymorphism was associated with PFS ($P=0.0233$; $HR=2.11$; $CI_{95\%}=1.11\text{-}4.04$) ($P_{\text{likelihood ratio test}}=1 \cdot 10^{-12}$) (Table 4).

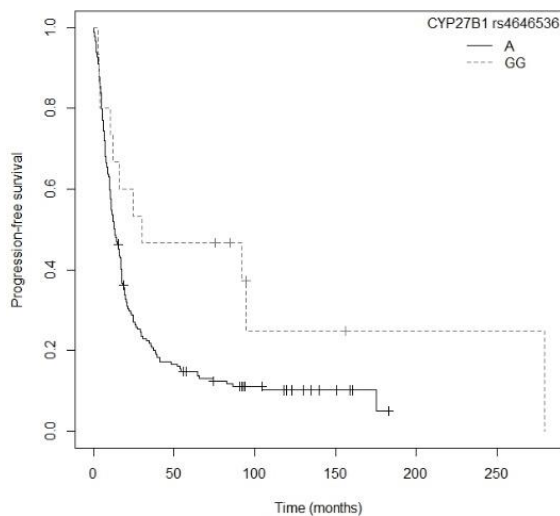


Figure 3. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with the A allele of the *CYP27B1* rs4646536 gene polymorphism in 194 patients with NSCLC.

Table 4. Influence of gene polymorphisms and clinical characteristics on progression-free survival of 194 NSCLC patients.

| | Progression-free survival | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-value |
| First-line treatment (no surgery) | 3.89 (2.54-5.96) | <0.001 |
| <i>CYP27B1</i> rs4646536_A | 2.11 (1.11-4.04) | 0.0233 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% confidence interval.

3.4.2. Subgroup analysis

3.4.2.1. Overall survival

In the subgroup of resected NSCLC patients, those carrying the GG genotype for the GC rs7041 polymorphism had a higher risk of death compared to those with the T allele ($P=0.0242$; HR=2.72; CI_{95%}=1.14-6.47; Table S13). Median OS for the GG genotype was 61.2 (CI_{95%}=24.3-NR) months, while for the GT and TT genotypes it was 107.6 (CI_{95%}=75.0-NR) and 176.1 (CI_{95%}=126.4-NR) months respectively. The Kaplan-Meier plot of OS curves with the T allele of GC rs7041 is shown in Figure S15 ($P_{\log\text{-rank}}=0.020$). Similarly, patients carrying the AA genotype for the *VDR* rs11568820 polymorphism were associated with a higher risk of death than those with the GG genotype ($P=0.0129$; HR=7.43; CI_{95%}=1.53-36.15; Table S13). The Kaplan-Meier curve for OS with the T allele of *VDR* Cdx-2 (rs11568820) is shown in Figure 4 ($P_{\log\text{-rank}}=0.003$). The median OS for the GG genotype was 130.0 (CI_{95%}=107.6-NR) months and for the AA genotype it was 27.2 (CI_{95%}=24.3-NR) months, while for the AG genotype it was not reached. Multivariate Cox regression, adjusted for family history of cancer, showed that the *VDR* rs11568820 polymorphism was the only independent factor associated with OS in patients with resected NSCLC ($P=0.0129$; HR=7.43; CI_{95%}=1.53-36.15) ($P_{\text{likelihood ratio test}}=0.04$) (Table 5).

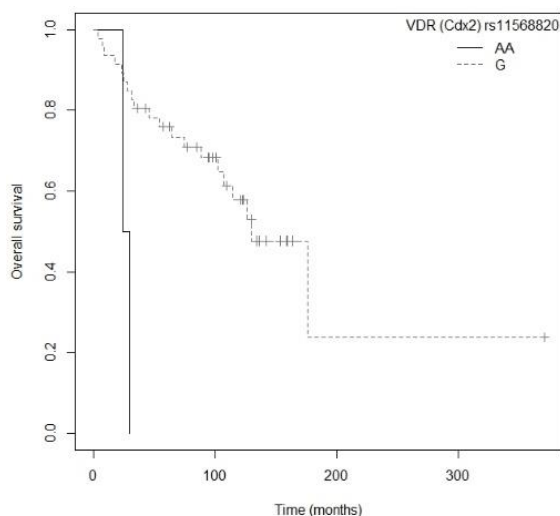


Figure 4. Kaplan-Meier plot of overall survival curves with the G allele of the *VDR* rs11568820 gene polymorphism in the resected NSCLC subgroup.

Table 5. Influence of clinical characteristic and gene polymorphisms on overall survival of resected NSCLC patients.

| | Overall survival | |
|--------------------------|-------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-value |
| <i>VDR</i> rs11568820_AA | 7.43 (1.53-36.15) | 0.0129 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% confidence interval.

In the subgroup of patients with non-resected NSCLC, the TT genotype of the *CYP24A1* rs6068816 polymorphism was associated with higher risk of death in comparison to carriers of the C allele ($P=0.0048$; HR=3.75; CI_{95%}=1.49-9.41; Table S14). Figure 5 shows the Kaplan-Meier plot of OS curves with the C allele for *CYP24A1* rs6068816 ($P_{\log\text{-rank}}=0.009$). Median OS for patients carrying the TT genotype was 12.4 (CI_{95%}=6.47-NR) months, while for the CC and CT genotypes it was 23.4 (CI_{95%}=20.1-27.0) and 24.5 (CI_{95%}=16.0-38.9) months respectively. On the other hand, 3 of the 5 polymorphisms of the *VDR* gene showed an association with OS. Firstly, patients carrying the AA genotype of *VDR* rs1544410 displayed a higher risk of death compared to carriers of the G allele ($P=0.0073$; HR=2.08; CI_{95%}=1.22-3.56; Table S14). Median OS for the AA genotype was 17.5 (CI_{95%}=9.77-34.1) months, while for the AG and GG genotypes it was 23.7 (CI_{95%}=16.1-32.0) and 24.5 (CI_{95%}=21.1-32.2) months respectively. Figure S16 shows the Kaplan-Meier plot of OS curves with the G allele of *VDR* rs1544410 ($P_{\log\text{-rank}}=0.020$). Secondly, carriers of the AA genotype of *VDR* rs7975232 showed a higher risk of death that those carrying the C allele ($P=0.0068$; HR=1.733; CI_{95%}=1.16-2.58; Table S14). Median OS for the AA genotype was 16.1 (CI_{95%}=12.3-27.7) months, while for the AC and CC genotypes it was 24.2 (CI_{95%}=20.1-30.0) and 24.9 (CI_{95%}=22.1-43.1) months respectively. Figure S17 shows the Kaplan-Meier plot of OS curves with the C allele of *VDR* rs7975232 ($P_{\log\text{-rank}}=0.020$). Finally, carriers of the CC genotype for *VDR* rs731236 displayed a higher risk of death compared to patients carrying the T allele ($P=0.0014$; HR=2.47; CI_{95%}=1.42-4.28; Table S14). Median OS for the CC genotype was 11.9 (CI_{95%}=8.30-22.7) months, while for the CT and TT genotypes it was 25.4 (CI_{95%}=18.3-36.5) and 24.2 (CI_{95%}=21.1-32.2) months respectively. Figure 6 shows the Kaplan-Meier plot of OS curves with the T allele for *VDR* rs731236 ($P_{\log\text{-rank}}=0.004$). Cox regression adjusted for gender, drinking status, and tumor stage showed that the *CYP24A1* rs6068816 ($P=0.0089$; HR=3.47; CI_{95%}=1.37-8.79) and *VDR* rs731236 ($P=0.0005$; HR=2.71; CI_{95%}=1.55-4.75) gene polymorphisms were the only independent factors associated with OS in patients with non-resected NSCLC ($P_{\text{likelihood ratio test}}=0.000002$) (Table 6).

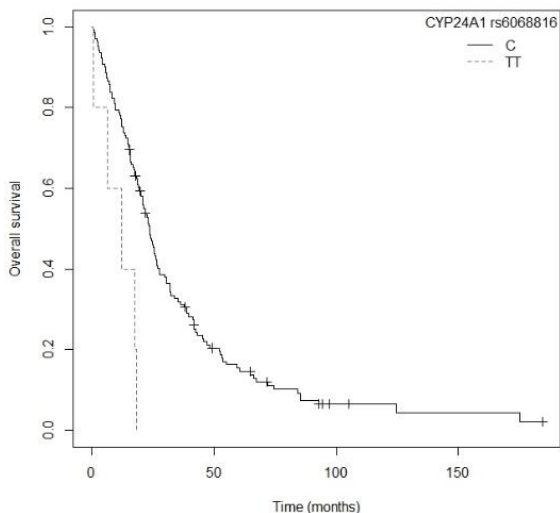


Figure 5. Kaplan-Meier plot of overall survival curves with the C allele of the *CYP24A1* rs6068816 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup.

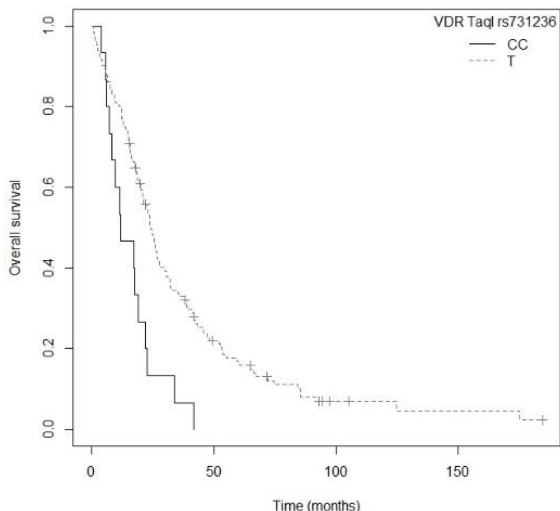


Figure 6. Kaplan-Meier plot of overall survival curves with the T allele of the *VDR* rs731236 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup.

Table 6. Influence of gene polymorphisms and clinical characteristic on overall survival of non-resected NSCLC patients.

| | Overall survival | |
|-----------------------------|-------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-value |
| Gender (Male) | 1.67 (1.11-2.52) | 0.0142 |
| Tumor stage (IIIB – IV) | 2.42 (1.29-4.51) | 0.0055 |
| <i>CYP24A1</i> rs6068816_TT | 3.47 (1.37-8.79) | 0.0089 |
| <i>VDR</i> rs731236_CC | 2.71 (1.55-4.75) | 0.0005 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% confidence interval.

3.4.2.2. Progression-free survival

Patients carrying the AA genotype for the *VDR* rs11568820 polymorphism showed a tendency toward greater progression compared to those with the G allele (P=0.055; HR=4,35; CI_{95%}=0.97-19.53; Table S15) in the resected NSCLC subgroup. The Kaplan-Meier plot of PFS curves with the G allele of *VDR* rs11568820 is shown in Figure S18 (P_{log-rank}=0.040). Patients carrying the GG

genotype had a median PFS of 59.0 (CI_{95%}=24.73-NR) months, while for the AA genotype it was 12.8 (CI_{95%}=8.67-NR) months and for AG it was not reached. In the case of GC rs7041, carriers of the GG genotype exhibited a tendency toward greater risk of progression than those with the TT genotype (P=0.061; HR=2.122; CI_{95%}=0.97-4.66; Table S15). The Kaplan-Meier plot of PFS curves with the T allele of GC rs7041 is shown in Figure 7 (P_{log-rank}=0.060). Patients who carried the TT genotype showed a median PFS of 175.2 (CI_{95%}=86.10-NR) months, while for the GT and GG genotypes median PFS was 29.6 (CI_{95%}=24.73-NR) and 23.3 (CI_{95%}=8.67-NR) months respectively. Finally, we found that the C allele of the *CYP24A1* rs6068816 polymorphism was associated with a higher risk of progression than the T allele (P=0.0359; HR=8.49; CI_{95%}=1.15-62.7; Table S15). However, there were no events for carriers of the TT genotype and for the CT genotype there was a single event, so median follow-up was not reached. This polymorphism was therefore excluded from the multivariate analysis. Cox regression adjusted for tumor stage revealed that the GC rs7041 polymorphism was significantly associated with PFS in patients with resected NSCLC (P=0.0447; HR=2.26; CI_{95%}=1.02-5.02; Table 7) (P_{likelihood ratio test}=0.05).

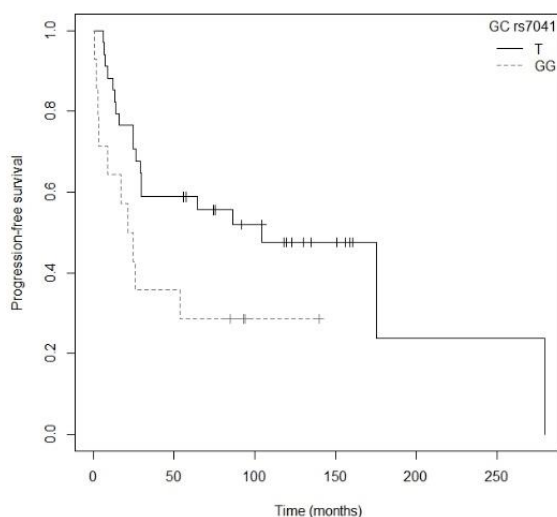


Figure 7. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with the T allele of the GC rs7041 gene polymorphism in the resected NSCLC subgroup.

Table 7. Influence of gene polymorphisms and clinical characteristic on progression-free survival of resected NSCLC patients.

| | Progression-free survival | |
|-------------------|---------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-value |
| Estadio (IIIB-IV) | 11.8 (1.34-104.1) | 0.0262 |
| GC rs7041_GG | 2.26 (1.02-5.02) | 0.0447 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% confidence interval.

A higher risk of progression was shown in non-resected NSCLC patients carrying the A allele for the *CYP27B1* rs4646536 gene polymorphism compared to those with the GG genotype (P=0.0443; HR=2.05; CI_{95%}=1.02-4.14; Table S16). The Kaplan-Meier plot of PFS curves with the A allele of *CYP27B1* rs4646536 is shown in Figure 8 (P_{log-rank}=0.040). Median PFS for carriers of the GG genotype was 20.3 (CI_{95%}=3.77-NR) months, while for the AG and AA genotypes it was 10.3 (CI_{95%}=8.5-15.6) and 10.9 (CI_{95%}=8.37-15.5) months respectively. Similarly, the G allele of the *CYP27B1* rs3782130 polymorphism displayed a higher risk of progression than the CC genotype (P=0.0452; HR=2.05; CI_{95%}=1.01-4.13; Table S16). The Kaplan-Meier plot of PFS curves with the G allele of *CYP27B1* rs3782130 is shown in Figure S19 (P_{log-rank}=0.040). Patients carrying the CC genotype had a median PFS of 20.3 (CI_{95%}=3.77-NR) months, while for the GC and GG genotypes

median PFS was 11.2 (CI_{95%}=8.0-17.1) and 10.9 (CI_{95%}=8.37-15.5) months respectively. Furthermore, carriers of the G allele of the *CYP27B1* rs10877012 polymorphism showed a higher risk of progression compared to the TT genotype ($P=0.0443$; HR=2.05; CI_{95%}=1.02-4.14; Table S16). Patients with the TT genotype had a median PFS of 20.3 (CI_{95%}=3.77-NR) months, while for the GT and GG genotypes median PFS was 10.8 (CI_{95%}=8.0-15.6) and 10.9 (CI_{95%}=8.37-15.5) months respectively. The Kaplan-Meier plot of PFS curves with the G allele for *CYP27B1* rs10877012 is shown in Figure S20 ($P_{\log\text{-rank}}=0.040$). Patients carrying the TT genotype of the *CYP27B1* rs6068816 polymorphism also showed greater progression than those carrying the C allele ($P=0.0179$; HR=2.99; CI_{95%}=1.21-7.45; Table S16). The Kaplan-Meier plot of PFS curves with the C allele for *CYP27B1* rs6068816 is shown in Figure 9 ($P_{\log\text{-rank}}=0.010$). Patients with the TT genotype had a median PFS of 5.43 (CI_{95%}=4.27-NR) months, while for the CC and CT genotypes it was 11.9 (CI_{95%}=10.1-16.1) and 10.4 (CI_{95%}=6.20-18.7) months respectively. Furthermore, patients with the AA genotype for the *VDR* rs7975232 polymorphism displayed a tendency toward greater progression compared to those carrying the C allele ($P=0.0643$; HR=1.44; CI_{95%}=0.98-2.13; Table S16). The Kaplan-Meier plot of PFS curves with the C allele of *VDR* rs7975232 is shown in Figure 10 ($P_{\log\text{-rank}}=0.060$). Patients carrying the AA genotype had a median PFS of 9.47 (CI_{95%}=6.70-16.1) months, whereas for the AC and CC genotypes it was 11.20 (CI_{95%}=8.37-16.8) and 12.9 (CI_{95%}=10.4-17.6) months respectively. Finally, we found that the CC genotype of the *VDR* rs731236 polymorphism was associated with a higher risk of progression compared to the T allele ($P=0.0463$; HR=1.74; CI_{95%}=1.01-2.99; Table S16). Patients carrying the CC genotype showed a median PFS of 7.1 months (CI_{95%}=6.20-17.1), while for the CT and TT genotypes it was 10.7 (CI_{95%}=8.0-16.1) and 12.8 (CI_{95%}=10.5-17.6) months respectively. The Kaplan-Meier plot of PFS curves with the T allele of *VDR* rs731236 is shown in Figure S21 ($P_{\log\text{-rank}}=0.040$). Cox regression adjusted for BMI showed that the *CYP27B1* rs4646536 ($P=0.0411$; HR=2.52; CI_{95%}=1.04-6.12), *CYP24A1* rs6068816 ($P=0.0048$; HR=8.77; CI_{95%}=1.94-39.7), and *VDR* rs7975232 ($P=0.0002$; HR=3.08; CI_{95%}=1.71-5.54) polymorphisms were significantly associated with PFS in patients with non-resected NSCLC ($P_{\text{likelihood ratio test}}=0.00006$) (Table 8).

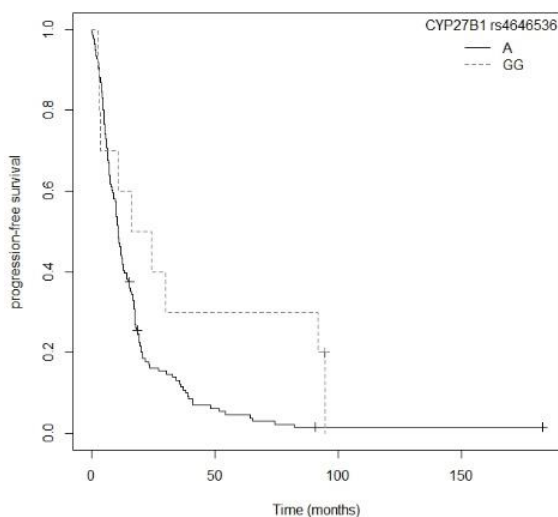


Figure 8. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with the A allele of the *CYP27B1* rs4646536 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup.

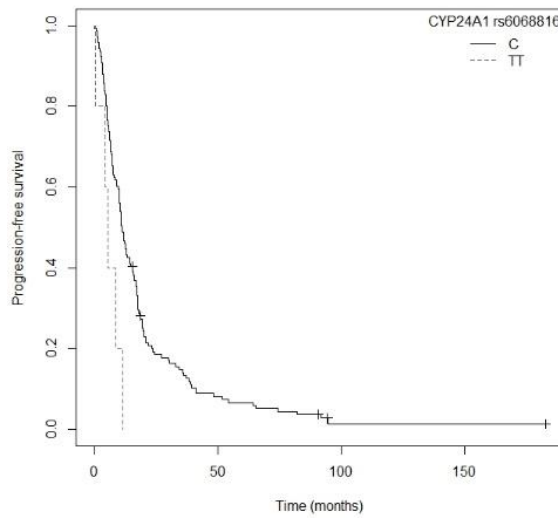


Figure 9. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with the C allele of the *CYP24A1* rs6068816 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup.

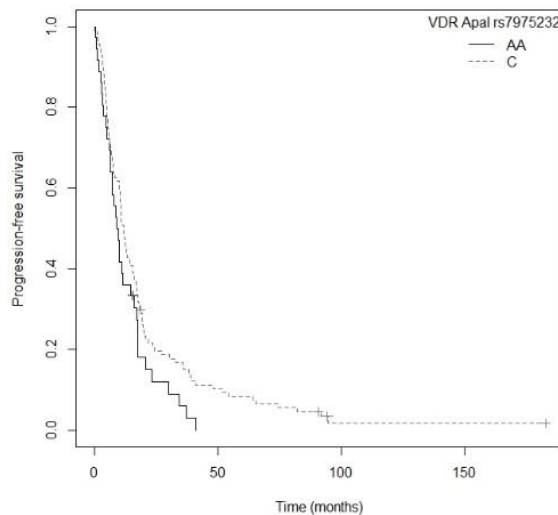


Figure 10. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with the C allele of the *VDR* rs7975232 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup.

Table 8. Influence of gene polymorphisms and clinical characteristic on progression-free survival of non-resected NSCLC patients.

| | Progression-free survival | |
|-----------------------------|---------------------------|---------|
| | HR (CI _{95%}) | p-value |
| BMI (>24) | 2.23 (1.27-3.89) | 0.0051 |
| <i>CYP27B1</i> rs4646536_A | 2.52 (1.04-6.12) | 0.0411 |
| <i>CYP24A1</i> rs6068816_TT | 8.77 (1.94-39.7) | 0.0048 |
| <i>VDR</i> rs7975232_AA | 3.08 (1.71-5.54) | 0.0002 |

HR=hazard ratio. CI_{95%}: 95% confidence interval.

4. Discussion

Cancer survival may be influenced by vitamin D through the suppression of cell proliferation, angiogenesis, cell proliferation, and metastasis which means the inhibition of tumor progression. Furthermore, the promotion of apoptosis in cancerous cells could be triggered by vitamin D [5,16]. Survival rates in patients diagnosed with NSCLC vary, even among patients diagnosed with the same stage [9-12]. Genetic factors may explain these interindividual differences. Several polymorphisms in various genes involved in the vitamin D metabolic pathway have been suggested as possible causes of this variability [5,14,15,31,42,43].

After investigating the potential of the gene polymorphisms involved in the vitamin D metabolic pathway in 194 Caucasian patients (from Spain) with NSCLC, we found that for the general population, patients carrying the A allele for the CYP27B1 rs4545636 polymorphism had a higher risk of progression and tended to have a higher risk of death than bearers of the GG genotype. Additionally, CYP27B1 rs4646536 maintained its association with PFS in the subgroup of non-resected patients. To date there is only one other study, conducted in an Asian population (from China) with 542 NSCLC patients, that has evaluated the influence of CYP27B1 rs4646536 on survival. However, no statistically significant association was found ($P=0.625$) [5]. On the other hand, another study carried out in an Asian population (from China), with 153 (NSCLC) tumor samples, where a better overall survival ($P=0.018$) was associated with a high CYP27B1 expression. It also found that alteration in gene expression may be due to SNPs, and specifically that the differences in expression were statistically significant in the CYP27B1 rs3782130 polymorphism ($P=0.028$) [31]. The importance of expression of CYP27B1 lies in the fact that it is the only gene capable of converting vitamin D to its active form (1,25-dihydroxycholecalciferol) and it is this product that triggers all the biological functions of vitamin D, after binding to VDR [16]. In our study, the CYP27B1 rs3782130 polymorphism was associated with PFS in the non-resected patient subgroup in the univariate Cox regression model.

In the resected patient subgroup, the multivariate analysis revealed that patients carrying the AA genotype for VDR rs11568820 had a higher risk of death than those with the GG genotype. Previous studies have shown contradictory results. Akiba et al., in a study with 155 Asian NSCLC patients (from Japan), found that the A allele of VDR rs11568820 was associated with better overall survival ($P=0.04$; HR=0.39; CI95%=0.16-0.97 for GA/AA vs GG) [43]. Similarly, another study with 376 patients of Caucasian origin (from the United States) with early-stage NSCLC showed that the AA/AG genotypes of VDR rs11568820 had better overall survival than the GG genotype ($P=0.04$; HR=0.56; CI95%=0.33-0.95 for GA/AA vs GG) [15]. However, a study involving 294 Caucasian patients (from the United States) with advanced NSCLC found no association between VDR rs11568820 polymorphisms and overall survival ($P=0.82$) [14]. Moreover, in our study patients bearing the G allele of the GC rs7041 polymorphism showed a higher risk of progression than those with the TT genotype. Our findings are in line with the above-mentioned study by Akiba et al., in which the TT genotype of GC rs7041 was associated with better PFS ($P=0.045$; HR=0.51; CI95%=0.26-0.99; TT vs TG/GG) and better OS ($P=0.003$; HR=0.21; CI95%=0.07-0.59; TT vs TG/GG) [43]. Subsequently, another study was carried out with 542 Asian patients (from China), evaluating the relationship between GC rs7041 and survival in NSCLC. However, the results were not statistically significant ($P=0.693$) [5].

With regard to the subgroup of non-resected patients, our study revealed that a higher risk of death and of progression was associated with the TT genotype for the CYP24A1 rs6068816 polymorphism in comparison to those carrying the C allele. Only one other study of the relationship between CYP24A1 rs6068816 and survival has been conducted to date, in 542 Asian patients (from China) with NSCLC. However, it did not find a statistically significant association ($P=0.072$) [5].

In our study, we also found that in the non-resected patient subgroup the rs7975232 and rs731236 polymorphisms of the VDR gene were associated with progression-free survival and overall survival respectively. Firstly, patients in our study carrying the CC genotype for VDR rs731236 had a higher risk of death than those bearing the T allele. Previous studies have reported contradictory results. A study involving 62 patients of Asian origin (from Turkey) with NSCLC showed that the combined TT-CC/TT-TC genotypes for rs731236 and rs2228570 respectively

were associated with worse overall survival (HR=1.81; CI95%=1.23-3.48; P=0.04) [51]. However, another later study with 155 Asian patients (from Japan) with NSCLC did not find a statistically significant association between VDR rs731236 and overall survival (P=0.26) [43]. The VDR rs7975232 polymorphism was associated in our study with a higher risk of death and progression. Specifically, patients carrying the AA genotype showed worse OS and greater progression than those with the C allele. Our results are in line with a previous study in 321 Asian patients (from China) with advanced NSCLC [52]. This found an association between the AA genotype of VDR rs7975232 and worse OS (P<0.001; HR=2.84; CI95%=2.63-3.94) as well as a strong tendency toward a higher risk of progression (P=0.053; HR=1.43; CI95%=0.99-2.78) than with the CC genotype [52]. Moreover, this association has been confirmed in a multiethnic meta-analysis with 3,199 cases in 5 studies of various types of cancer (prostate, renal, colorectal, lung, and head and neck), which revealed that the AA genotype of VDR rs7975232 was associated with worse PFS (HR=1.29; CI95%=1.02-1.56) [53].

The CYP2R1 rs10741657 polymorphism has been studied recently. A study in an Asian population (from China) with 542 cases of NSCLC found that patients with the GG and AG genotypes had better OS than those with the AA genotype (P=0.033; HR=0.69; CI95%=0.46-0.97), particularly elderly patients not receiving chemotherapy [5]. In our patients this effect could not be confirmed. However, we did observe a strong tendency in the univariate Cox regression model toward OS in the general population.

Finally, a multiethnic meta-analysis of various types of cancer with 9,926 cases in 10 studies (prostate, lung, colorectal, skin, glioma, and head and neck) for VDR rs1544410 and 11,334 cases in 12 studies (breast, prostate, lung, colorectal, skin, glioma, ovarian, and head and neck) for VDR rs2228570 evaluated the association of these two polymorphisms with OS. In particular, the AA/AG genotypes of VDR rs1544410 were associated with worse OS (HR=1.40; CI95%=1.05-1.75; AA/AG vs GG) [53]. In our study, the univariate Cox regression model showed that the AA genotype for the VDR rs1544410 polymorphism was associated with worse OS in non-resected patients compared to the G allele. However, after the multivariate Cox regression this association was not sustained. The VDR rs2228570 polymorphism was not associated with OS in the meta-analysis described above (HR=1.26; CI95%=0.96-1.56) [53]. Our study is in agreement with those results, since we did not obtain statistically significant associations for VDR rs2228570 in any of the subgroups analyzed.

Vitamin D is strongly related to survival and risk of NSCLC. There is therefore a presumption that alterations in the genes involved in the metabolic pathway of vitamin D may affect their expression and functionality [15,28,36-40]. Each of the genes fulfills a unique and characteristic function within the metabolic process of vitamin D. We can therefore surmise that variations in one or more genes may entail a worse prognosis. So far we know that the genetic expression of CYP24A1, CYP27B1, and VDR in lung cancer is affected by tumor differentiation and characterization. When the tumor is poorly differentiated, there is greater expression of CYP24A1 and reduced expression of CYP27B1 [36,38]. Increased expression of VDR in lung cancer is associated with better survival [40,54]. This may be related to a lower proliferative state and G1-phase arrest of high VDR-expressing tumor cells [40,54]. Continued research is needed on the mechanism by which the SNPs associated with the vitamin D metabolic pathway affect overall survival and progression-free survival in patients with NSCLC.

This study presents a cohort of patients diagnosed with NSCLC from the same institution and treated under the same therapeutic protocol, ensuring the uniformity of the sample in the measurement of the survival variables analyzed. Although the sample size in our study is limited and it was not possible to detect some associations, the effect of the polymorphisms in the CYP27B1, CYP24A1, GC y VDR genes was clear.

5. Conclusions

This study found that the CYP27B1 rs4646535, CYP24A1 rs6068816, GC rs7041, VDR rs11568820, VDR rs731236, and VDR rs7975232 polymorphisms are associated with survival in NSCLC and may have a substantial role as prognostic markers of the disease. We found no relationship

between the CYP27B1 rs3782130, CYP27B1 rs10877012, CYP24A1 rs4809957, CYP2R1 rs10741657, VDR rs1544410, and VDR rs2228570 polymorphisms and survival in our patients.

Supplementary Materials: Table S1: Clinical characteristics and association with overall survival of the 194 NSCLC patients. Table S2: Clinical characteristics and association with progression-free survival of the 194 NSCLC patients. Table S3: Clinical characteristics and association with overall survival of the resected NSCLC patients. Table S4: Clinical characteristics and association with progression-free survival of the resected NSCLC patients. Table S5: Clinical characteristics and association with overall survival of the non-resected NSCLC patients. Table S6: Clinical characteristics and association with progression-free survival of the non-resected NSCLC patients. Table S7: Minor allele frequencies of SNPs. Table S8: Hardy-Weinberg Equilibrium (OS). Table S9: Hardy-Weinberg Equilibrium (PFS). Table S10: Linkage disequilibrium. Table S11: Polymorphisms and association with overall survival of the 194 NSCLC patients. Table S12: Polymorphisms and association with progression-free survival of the 194 NSCLC patients. Table S13: Polymorphisms and association with overall survival of the resected NSCLC patients. Table S14: Polymorphisms and association with overall survival of the non-resected NSCLC patients. Table S15: Polymorphisms and association with progression-free survival of the resected NSCLC patients. Table S16: Polymorphisms and association with progression-free survival of the non-resected NSCLC patients. Figure S1. Kaplan-Meier plot of overall survival curves by gender in 194 patients with NSCLC. Figure S2. Kaplan-Meier plot of overall survival curves by drinking status in 194 patients with NSCLC. Figure S3. Kaplan-Meier plot of overall survival curves by tumor stage in 194 patients with NSCLC. Figure S4. Kaplan-Meier plot of overall survival curves by first-line treatment (divided by surgery) in 194 patients with NSCLC. Figure S5. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with previous lung disease in 194 patients with NSCLC. Figure S6. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves by drinking status in 194 patients with NSCLC. Figure S7. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves by tumor stage in 194 patients with NSCLC. Figure S8. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves by first-line treatment (divided by surgery) in 194 patients with NSCLC. Figure S9. Kaplan-Meier plot of overall survival curves with family history of cancer in the resected NSCLC subgroup. Figure S10. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves by tumor stage in the resected NSCLC subgroup. Figure S11. Kaplan-Meier plot of overall survival curves by gender in the non-resected NSCLC subgroup. Figure S12. Kaplan-Meier plot of overall survival curves by drinking status in the non-resected NSCLC subgroup. Figure S13. Kaplan-Meier plot of overall survival curves by tumor stage in the non-resected NSCLC subgroup. Figure S14. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves by body mass index in the non-resected NSCLC subgroup. Figure S15. Kaplan-Meier plot of overall survival curves with the T allele of the GC rs7041 gene polymorphism in the resected NSCLC subgroup. Figure S16. Kaplan-Meier plot of overall survival curves with the G allele of the VDR rs1544410 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup. Figure S17. Kaplan-Meier plot of overall survival curves with the C allele of the VDR rs7975232 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup. Figure S18. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with the G allele of the VDR rs11568820 gene polymorphism in the resected NSCLC subgroup. Figure S19. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with the G allele of the CYP27B1 rs3782130 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup. Figure S20. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with the G allele of the CYP27B1 rs10877012 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup. Figure S21. Kaplan-Meier plot of progression-free survival curves with the T allele of the VDR rs731236 gene polymorphism in the non-resected NSCLC subgroup.

Author Contributions: L.E.P.L. and C.P.R. conceived and designed the experiments; L.E.P.L. performed the experiments; L.E.P.L. and J.M.G.N. collected samples; L.E.P.L. and C.P.R. analyzed the data; F.M.M. and A.S.M. contributed materials and analysis tools; L.E.P.L. prepared the original draft; C.P.R., A.S.M., F.M.M. and M.d.C.R.T. reviewed and edited the draft; L.E.P.L., C.P.R. and A.S.M. reviewed the analysis and interpretation; A.J.M supervised funding acquisition. All the authors participated in critically reviewing the manuscript and improving its intellectual content. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding: The ERDF funds (EU) from the Instituto de Salud Carlos III (PT13/0010/0039) supported by cofounding grants the Virgen de las Nieves University Hospital Biobank.

Institutional Review Board Statement: The guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Research Committee of the Sistema Andaluz de Salud (code: 1322-N-20) were followed in the conductance of this study.

Informed Consent Statement: All subjects involved in the study signed the written informed consent form.

Acknowledgments: The results of this study are part of the doctoral thesis presented by Laura Elena Pineda Lancheros at the University of Granada.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no competing financial interest in relation to the work described in this article and that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Abbreviations: AJCC: American Joint Committee on Cancer; CI: confidence interval; *CYP24A1*: cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1; *CYP27B1*: cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1; *CYP2R1*: cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1; GC: GC Vitamin D Binding Protein (gene); HR: hazard ratio; BMI: body mass index; MAF: minor allele frequency; NA: not available; NR: not reached; NSCLC: non-small cell lung cancer; OS: overall survival; PCR: polymerase chain reaction; PFS: progression-free survival; SAS: Sistema Andaluz de Salud (Andalusian Health Service); SNP: single nucleotide polymorphism; VDBP: vitamin D binding protein; *VDR*: vitamin D receptor (gene); *VDR*: vitamin D receptor (protein); RXR: retinoid X receptor.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021, 71, 209-249, doi:10.3322/caac.21660.
2. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021, 71, 7-33, doi:10.3322/caac.21654.
3. Marshall, A.L.; Christiani, D.C. Genetic susceptibility to lung cancer--light at the end of the tunnel? *Carcinogenesis* 2013, 34, 487-502, doi:10.1093/carcin/bgt016.
4. Ge, N.; Chu, X.M.; Xuan, Y.P.; Ren, D.Q.; Wang, Y.; Ma, K.; Gao, H.J.; Jiao, W.J. Associations between abnormal vitamin D metabolism pathway function and non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2017, 14, 7538-7544, doi:10.3892/ol.2017.7162.
5. Kong, J.; Chen, X.; Wang, J.; Li, J.; Xu, F.; Gao, S.; Yu, H.; Qian, B. Genetic Polymorphisms in the Vitamin D Pathway and Non-small Cell Lung Cancer Survival. *Pathol Oncol Res* 2020, 26, 1709-1715, doi:10.1007/s12253-019-00702-4.
6. Asselain, B.; Barrière, J.R.; Clarot, C.; Vabre, J.P.; Gentil Le Pecq, B.; Duval, Y.; Thomas, P.; Herman, D.; Grivaux, M.; Debieuvre, D. Metastatic NSCLC: Clinical, molecular, and therapeutic factors associated with long-term survival. *Respir Med Res* 2019, 76, 38-44, doi:10.1016/j.resmer.2019.07.001.
7. Blandin Knight, S.; Crosbie, P.A.; Balata, H.; Chudziak, J.; Hussell, T.; Dive, C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol* 2017, 7, doi:10.1098/rsob.170070.
8. Goldstraw, P.; Chansky, K.; Crowley, J.; Rami-Porta, R.; Asamura, H.; Eberhardt, W.E.; Nicholson, A.G.; Groome, P.; Mitchell, A.; Bolejack, V. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016, 11, 39-51, doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009.
9. Davis, J.S.; Prophet, E.; Peng, H.L.; Lee, H.Y.; Tidwell, R.S.S.; Lee, J.J.; Thomas, A.; Szabo, E.; Chang, S. Potential Influence on Clinical Trials of Long-Term Survivors of Stage IV Non-small cell Lung Cancer. *JNCI Cancer Spectr* 2019, 3, pkz010, doi:10.1093/jncics/pkz010.
10. Wang, T.; Nelson, R.A.; Bogardus, A.; Grannis, F.W., Jr. Five-year lung cancer survival: which advanced stage nonsmall cell lung cancer patients attain long-term survival? *Cancer* 2010, 116, 1518-1525, doi:10.1002/cncr.24871.
11. Simeone, J.C.; Nordstrom, B.L.; Patel, K.; Klein, A.B. Treatment patterns and overall survival in metastatic non-small-cell lung cancer in a real-world, US setting. *Future Oncol* 2019, 15, 3491-3502, doi:10.2217/fon-2019-0348.
12. Cornwell, L.D.; Echeverria, A.E.; Samuelian, J.; Mayor, J.; Casal, R.F.; Bakaeen, F.G.; Omer, S.; Preventza, O.; Mai, W.; Chen, G.; et al. Video-assisted thoracoscopic lobectomy is associated with greater recurrence-free survival than stereotactic body radiotherapy for clinical stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2018, 155, 395-402, doi:10.1016/j.jtcvs.2017.07.065.
13. Pérez-Ramírez, C.; Cañadas-Garre, M.; Alnatsha, A.; Molina, M.; Robles, A.I.; Villar, E.; Delgado, J.R.; Faus-Dáder, M.J.; Calleja-Hernández, M. Interleukins as new prognostic genetic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Surg Oncol* 2017, 26, 278-285, doi:10.1016/j.suronc.2017.05.004.
14. Heist, R.S.; Zhou, W.; Wang, Z.; Liu, G.; Neuberg, D.; Su, L.; Asomaning, K.; Hollis, B.W.; Lynch, T.J.; Wain, J.C.; et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D, *VDR* polymorphisms, and survival in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26, 5596-5602, doi:10.1200/jco.2008.18.0406.
15. Zhou, W.; Heist, R.S.; Liu, G.; Neuberg, D.S.; Asomaning, K.; Su, L.; Wain, J.C.; Lynch, T.J.; Giovannucci, E.; Christiani, D.C. Polymorphisms of vitamin D receptor and survival in early-stage

- non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, 15, 2239-2245, doi:10.1158/1055-9965.epi-06-0023.
16. Latacz, M.; Snarska, J.; Kostyra, E.; Fiedorowicz, E.; Savelkoul, H.F.; Grzybowski, R.; Cieślińska, A. Single Nucleotide Polymorphisms in 25-Hydroxyvitamin D3 1-Alpha-Hydroxylase (CYP27B1) Gene: The Risk of Malignant Tumors and Other Chronic Diseases. *Nutrients* 2020, 12, doi:10.3390/nu12030801.
 17. Yu, W.D.; Ma, Y.; Flynn, G.; Muindi, J.R.; Kong, R.X.; Trump, D.L.; Johnson, C.S. Calcitriol enhances gemcitabine anti-tumor activity in vitro and in vivo by promoting apoptosis in a human pancreatic carcinoma model system. *Cell Cycle* 2010, 9, 3022-3029, doi:10.4161/cc.9.15.12381.
 18. El-Sharkawy, A.; Malki, A. Vitamin D Signaling in Inflammation and Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Molecules* 2020, 25, doi:10.3390/molecules25143219.
 19. Negri, M.; Gentile, A.; de Angelis, C.; Montò, T.; Patalano, R.; Colao, A.; Pivonello, R.; Pivonello, C. Vitamin D-Induced Molecular Mechanisms to Potentiate Cancer Therapy and to Reverse Drug-Resistance in Cancer Cells. *Nutrients* 2020, 12, doi:10.3390/nu12061798.
 20. Scazzone, C.; Agnello, L.; Lo Sasso, B.; Salemi, G.; Gambino, C.M.; Ragonese, P.; Candore, G.; Ciaccio, A.M.; Giglio, R.V.; Bivona, G.; et al. FOXP3 and GATA3 Polymorphisms, Vitamin D3 and Multiple Sclerosis. *Brain Sci* 2021, 11, doi:10.3390/brainsci11040415.
 21. Higashimoto, Y.; Ohata, M.; Nishio, K.; Iwamoto, Y.; Fujimoto, H.; Uetani, K.; Suruda, T.; Nakamura, Y.; Funasako, M.; Saijo, N. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid inhibit the growth of a lung cancer cell line. *Anticancer Res* 1996, 16, 2653-2659.
 22. Light, B.W.; Yu, W.D.; McElwain, M.C.; Russell, D.M.; Trump, D.L.; Johnson, C.S. Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. *Cancer Res* 1997, 57, 3759-3764.
 23. Hershberger, P.A.; McGuire, T.F.; Yu, W.D.; Zuhowski, E.G.; Schellens, J.H.; Egorin, M.J.; Trump, D.L.; Johnson, C.S. Cisplatin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis in association with increased mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEKK-1) expression. *Mol Cancer Ther* 2002, 1, 821-829.
 24. Young, M.R.; Ihm, J.; Lozano, Y.; Wright, M.A.; Prechel, M.M. Treating tumor-bearing mice with vitamin D3 diminishes tumor-induced myelopoiesis and associated immunosuppression, and reduces tumor metastasis and recurrence. *Cancer Immunol Immunother* 1995, 41, 37-45, doi:10.1007/bf01788958.
 25. Nakagawa, K.; Kawaura, A.; Kato, S.; Takeda, E.; Okano, T. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis* 2005, 26, 429-440, doi:10.1093/carcin/bgh332.
 26. Anic, G.M.; Weinstein, S.J.; Mondul, A.M.; Männistö, S.; Albanes, D. Serum vitamin D, vitamin D binding protein, and lung cancer survival. *Lung Cancer* 2014, 86, 297-303, doi:10.1016/j.lungcan.2014.10.008.
 27. Wu, X.; Cheng, J.; Yang, K. Vitamin D-Related Gene Polymorphisms, Plasma 25-Hydroxy-Vitamin D, Cigarette Smoke and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Risk. *Int J Mol Sci* 2016, 17, doi:10.3390/ijms17101597.
 28. Haznadar, M.; Krausz, K.W.; Margono, E.; Diehl, C.M.; Bowman, E.D.; Manna, S.K.; Robles, A.I.; Ryan, B.M.; Gonzalez, F.J.; Harris, C.C. Inverse association of vitamin D(3) levels with lung cancer mediated by genetic variation. *Cancer Med* 2018, 7, 2764-2775, doi:10.1002/cam4.1444.
 29. Jeon, S.M.; Shin, E.A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med* 2018, 50, 1-14, doi:10.1038/s12276-018-0038-9.
 30. Bivona, G.; Agnello, L.; Ciaccio, M. The immunological implication of the new vitamin D metabolism. *Cent Eur J Immunol* 2018, 43, 331-334, doi:10.5114/ceji.2018.80053.
 31. Kong, J.; Xu, F.; Qu, J.; Wang, Y.; Gao, M.; Yu, H.; Qian, B. Genetic polymorphisms in the vitamin D pathway in relation to lung cancer risk and survival. *Oncotarget* 2015, 6, 2573-2582, doi:10.18632/oncotarget.2951.
 32. Rozmus, D.; Ciesielska, A.; Płomiński, J.; Grzybowski, R.; Fiedorowicz, E.; Kordulewska, N.; Savelkoul, H.; Kostyra, E.; Cieślińska, A. Vitamin D Binding Protein (VDBP) and Its Gene Polymorphisms-The Risk of Malignant Tumors and Other Diseases. *Int J Mol Sci* 2020, 21, doi:10.3390/ijms21217822.
 33. Agnello, L.; Scazzone, C.; Lo Sasso, B.; Bellia, C.; Bivona, G.; Realmuto, S.; Brighina, F.; Schillaci, R.; Ragonese, P.; Salemi, G.; et al. VDBP, CYP27B1, and 25-Hydroxyvitamin D Gene Polymorphism Analyses in a Group of Sicilian Multiple Sclerosis Patients. *Biochem Genet* 2017, 55, 183-192, doi:10.1007/s10528-016-9783-4.
 34. Duan, L.; Xue, Z.; Ji, H.; Zhang, D.; Wang, Y. Effects of CYP2R1 gene variants on vitamin D levels and status: A systematic review and meta-analysis. *Gene* 2018, 678, 361-369, doi:10.1016/j.gene.2018.08.056.

35. Scazzone, C.; Agnello, L.; Ragonese, P.; Lo Sasso, B.; Bellia, C.; Bivona, G.; Schillaci, R.; Salemi, G.; Ciaccio, M. Association of CYP2R1 rs10766197 with MS risk and disease progression. *J Neurosci Res* 2018, 96, 297-304, doi:10.1002/jnr.24133.
36. Parise, R.A.; Egorin, M.J.; Kanterewicz, B.; Taimi, M.; Petkovich, M.; Lew, A.M.; Chuang, S.S.; Nichols, M.; El-Hefnawy, T.; Hershberger, P.A. CYP24, the enzyme that catabolizes the antiproliferative agent vitamin D, is increased in lung cancer. *Int J Cancer* 2006, 119, 1819-1828, doi:10.1002/ijc.22058.
37. Cancela Díez, B.; Pérez-Ramírez, C.; Maldonado-Montoro, M.D.M.; Carrasco-Campos, M.I.; Sánchez Martín, A.; Pineda Lancheros, L.E.; Martínez-Martínez, F.; Calleja-Hernández, M.; Ramírez-Tortosa, M.C.; Jiménez-Morales, A. Association between polymorphisms in the vitamin D receptor and susceptibility to multiple sclerosis. *Pharmacogenet Genomics* 2021, 31, 40-47, doi:10.1097/fpc.0000000000000420.
38. Yokomura, K.; Suda, T.; Sasaki, S.; Inui, N.; Chida, K.; Nakamura, H. Increased expression of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1 α -hydroxylase gene in alveolar macrophages of patients with lung cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88, 5704-5709, doi:10.1210/jc.2003-030537.
39. Wang, W.; Hu, W.; Xue, S.; Chen, Q.; Jiang, Y.; Zhang, H.; Zuo, W. Vitamin D and Lung Cancer; Association, Prevention, and Treatment. *Nutr Cancer* 2020, 1-13, doi:10.1080/01635581.2020.1844245.
40. Srinivasan, M.; Parwani, A.V.; Hershberger, P.A.; Lenzner, D.E.; Weissfeld, J.L. Nuclear vitamin D receptor expression is associated with improved survival in non-small cell lung cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011, 123, 30-36, doi:10.1016/j.jsbmb.2010.10.002.
41. Scazzone, C.; Agnello, L.; Sasso, B.L.; Ragonese, P.; Bivona, G.; Realmuto, S.; Iacolino, G.; Gambino, C.M.; Bellia, C.; Salemi, G.; et al. Klotho and vitamin D in multiple sclerosis: an Italian study. *Arch Med Sci* 2020, 16, 842-847, doi:10.5114/aoms.2019.86969.
42. Liu, Y.; Chen, W.; Hu, Z.B.; Xu, L.; Shu, Y.Q.; Pan, S.Y.; Dai, J.C.; Jin, G.F.; Ma, H.X.; Shen, H.B. Plasma Vitamin D Levels And Vitamin D Receptor Polymorphisms Are Associated with Survival of Non-small Cell Lung Cancer. *Chin J Cancer Res* 2011, 23, 33-37, doi:10.1007/s11670-011-0033-3.
43. Akiba, T.; Morikawa, T.; Odaka, M.; Nakada, T.; Kamiya, N.; Yamashita, M.; Yabe, M.; Inagaki, T.; Asano, H.; Mori, S.; et al. Vitamin D Supplementation and Survival of Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Cancer Res* 2018, 24, 4089-4097, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0483.
44. Ettinger, D.S.; Wood, D.E.; Aggarwal, C.; Aisner, D.L.; Akerley, W.; Bauman, J.R.; Bharat, A.; Bruno, D.S.; Chang, J.Y.; Chi-rieac, L.R.; et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 1.2020. *J Natl Compr Canc Netw* 2019, 17, 1464-1472, doi:10.6004/jnccn.2019.0059.
45. Ochoa Mangado, E.; Madoz-Gúrpide, A.; Vicente Muelas, N. Diagnóstico y tratamiento de la dependencia de alcohol. *Medicina y Seguridad del Trabajo* 2009, 55, 26-40.
46. Edge SB BR, C.C., Fritz AG, Green FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*; New York, 2010; Volume 7 ed.
47. RC., T. R: *A language and environment for statistical computing.*, 4.0.2
48. Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; de Bakker, P.I.; Daly, M.J.; et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007, 81, 559-575, doi:10.1086/519795.
49. Barrett, J.C.; Fry, B.; Maller, J.; Daly, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005, 21, 263-265, doi:10.1093/bioinformatics/bth457.
50. Auton, A.; Brooks, L.D.; Durbin, R.M.; Garrison, E.P.; Kang, H.M.; Korbel, J.O.; Marchini, J.L.; McCarthy, S.; McVean, G.A.; Abecasis, G.R. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015, 526, 68-74, doi:10.1038/nature15393.
51. Turna, A.; Pekçolaklar, A.; Metin, M.; Yaylim, I.; Gurses, A. The effect of season of operation on the survival of patients with resected non-small cell lung cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2012, 14, 151-155, doi:10.1093/icvts/ivr063.
52. Xiong, L.; Cheng, J.; Gao, J.; Wang, J.; Liu, X.; Wang, L. Vitamin D receptor genetic variants are associated with chemotherapy response and prognosis in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2013, 14, 433-439, doi:10.1016/j.clc.2013.01.004.
53. Vaughan-Shaw, P.G.; O'Sullivan, F.; Farrington, S.M.; Theodoratou, E.; Campbell, H.; Dunlop, M.G.; Zgaga, L. The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 2017, 116, 1092-1110, doi:10.1038/bjc.2017.44.
54. Kim, S.H.; Chen, G.; King, A.N.; Jeon, C.K.; Christensen, P.J.; Zhao, L.; Simpson, R.U.; Thomas, D.G.; Giordano, T.J.; Brenner, D.E.; et al. Characterization of vitamin D receptor (VDR) in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2012, 77, 265-271, doi:10.1016/j.lungcan.2012.04.010.

Nutrients. 2022 Nov 4;14(21):4668. doi: 10.3390/nu14214668.

Effect of Single Nucleotide Polymorphisms in the Vitamin D Metabolic Pathway on Susceptibility to Non-Small-Cell Lung Cancer

Laura Elena Pineda Lancheros ¹, Susana Rojo Tolosa ^{1,*}, José María Gálvez Navas ^{1,2,*}, Fernando Martínez Martínez ³, Almudena Sánchez Martín ¹, Alberto Jiménez Morales ^{1,†} and Cristina Pérez Ramírez ^{1,2,†}

¹ Pharmacogenetics Unit, Pharmacy Service, University Hospital Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain; lepinedal@unal.edu.co (L.E.P.L.); almuweb06@gmail.com (A.S.M.); alberto.jimenez.morales.sspa@juntadeandalucia.es (A.J.M.); cperezramirez87@ugr.es (C.P.R.)

² Biomedical Research Center, Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, University of Granada, Avda. del Conocimiento s/n., 18016 Granada, Spain

³ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Social and Legal Assistance Pharmacy Section, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain; femartin@ugr.es

* Correspondence: susanarojotolosa@gmail.com (S.R.T.); jmgalna7@gmail.com (J.M.G.N.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract

The pathogenesis of non-small-cell lung cancer (NSCLC) is complex, since many risk factors have been identified. Recent research indicates that polymorphisms in the metabolic pathway of vitamin D may be involved in both risk and survival of the disease. The objective of this study is to assess the effect of 13 genetic polymorphisms involved in the vitamin D metabolic pathway on the risk of suffering from NSCLC. We conducted an observational case-control study, which included 204 patients with NSCLC and 408 controls, of Caucasian origin, from southern Spain. The *CYP27B1* (rs4646536, rs3782130, rs703842, rs10877012), *CYP2R1* (rs10741657), *GC* (rs7041), *CYP24A1*, and *VDR* (BsmI, Cdx-2, FokI, ApaI, TaqI) gene polymorphisms were analyzed by real-time polymerase chain reaction. The logistic regression model, adjusted for smoking and family history of cancer, revealed that in the genotypic model, carriers of the *VDR* BsmI rs1544410-AA genotype were associated with a lower risk of developing NSCLC compared to the GG genotype ($p = 0.0377$; OR = 0.51; CI_{95%} = 0.27–0.95; AA vs. GG). This association was maintained in the recessive model ($p = 0.0140$). Haplotype analysis revealed that the AACATGG and GACATGG haplotypes for the rs1544410, rs7975232, rs731236, rs4646536, rs703842, rs3782130, and rs10877012 polymorphisms were associated with a lower risk of NSCLC ($p = 0.015$ and $p = 0.044$ respectively). The remaining polymorphisms showed no effect on susceptibility to NSCLC. The BsmI rs1544410 polymorphism was significantly associated with lower risk of NSCLC and could be of considerable value as a predictive biomarker of the disease.

Keywords: non-small-cell lung cancer; metabolic pathway of vitamin D; risk; biomarker; single-nucleotide polymorphisms; *CYP27B1*; *CYP2R1*; *GC*; *CYP24A1*; *VDR*.

1. Introduction

Lung cancer is one of the most serious malignancies, with the highest mortality (18% of cancer deaths worldwide) [1]. It also has a higher incidence in men (14.3%) and is the third most common cancer in women (8.4%), after breast and colorectal cancer. Taking both sexes together, it has the second highest incidence after breast cancer [1]. It is estimated that by 2040 the incidence of lung cancer will rise by 22.4% in Europe and that the increase in mortality will be 25.5% [2]. According to the latest cancer statistics, 236,740 new cases and 130,180 deaths are projected to occur in the United States in 2022 [3].

Lung cancer is a heterogeneous disease comprising various types. On this basis it can be classified primarily as small-cell lung cancer (SCLC, 13% of cases) and non-small-cell lung cancer (NSCLC, 83% of cases). The latter, in turn, can be divided into three subtypes: squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and large cell carcinoma [4–6]. Numerous risk factors for NSCLC have been discovered, including tobacco (which causes 80% of cases), exposure to radon, air pollution, previous history of lung disease, such as emphysema, bronchitis, asthma or chronic obstructive pulmonary disease (COPD), somatic mutations, and low serum levels of vitamin D [5,7].

Vitamin D (a secosteroid prohormone) has classically been considered to play a role in the regulation of calcium and phosphorus homeostasis, intervening in intestinal absorption, bone resorption, and reabsorption in the kidney [8]. Vitamin D has various functions in the body, in addition to those already mentioned, notably including its antiproliferative and proapoptotic ability, stimulating cell differentiation, acting as an antioxidant, and regulating the immune system, among other functions [8,9].

Several fat-soluble molecules are grouped together under the term vitamin D: vitamin D2 or ergocalciferol, vitamin D3 or cholecalciferol, and calcitriol or 1,25-dihydroxycalciferol (1,25(OH)₂D), distinguished by their functions [7,10]. The first two are the inactive isoforms of the vitamin, whereas 1,25(OH)₂D is its active form [11]. Cholecalciferol is obtained by the action of ultraviolet radiation (UVB 290–320 nm) on 7-dehydrocholesterol in the epidermis. Both cholecalciferol and ergocalciferol are ingested through the diet [8]. Both isoforms (vitamin D2 and D3) are transported in the bloodstream by being bound to VDBP (vitamin D binding protein), which carries the two precursors to the liver [12]. Here, the first hydroxylation takes place at position 25 through the action of the CYP2R1 or 25-hydroxylase enzyme. This reaction produces calcidiol or 25-hydroxyvitamin D. This metabolite remains in the blood for longer, so serum vitamin D levels are determined by calcidiol [8,11,12]. This is followed by a second hydroxylation of the molecule in the kidney, through the action of the CYP27B1 or α -1-hydroxylase enzyme, resulting in the active form of vitamin D: 1,25(OH)₂D [7,10]. This metabolite is capable of binding to the vitamin D receptor (VDR), which is translocated to the nucleus to bind to the retinoid X receptor (RXR) and act as a transcription factor. Cells with high expression of VDR are sensitive to the antiproliferative activity of 1,25D₃ [13]. Finally, vitamin D is degraded at mitochondrial level by the action of the CYP24A1 enzyme, preventing it from accumulating [11,12,14,15].

The genes that code for the enzymes involved in vitamin D metabolism (*GC*, *CYP2R1*, *CYP27B1*, *CYP24A1*, and *VDR*) are highly polymorphic [12,16]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes can alter both the functionality of the synthesized enzymes and the expression of each gene, and may therefore play an essential role in the onset, progression, and prognosis of NSCLC [12,17]. The influence of SNPs in these genes on the risk of developing lung cancer has been evaluated before, mainly in Asian populations [18–31]. However, there are few studies, and this highlights the need to carry out more research to assess the influence of these polymorphisms on the risk of suffering from NSCLC in various populations. Furthermore, no study has so far evaluated the combined effect of SNPs in *VDR*, *GC*, *CYP2R1*, *CYP27B1*, and *CYP24A1* on the risk of NSCLC. In addition, in a previous study we found a strong relationship between polymorphisms involved in the metabolic pathway of vitamin D and prognosis in patients with NSCLC [12], and we therefore believe that these SNPs may also be implicated in the pathogenesis of the disease.

In the light of the foregoing considerations, this case-control study was designed with the aim of assessing the effect of polymorphisms in genes involved in vitamin D metabolism on the risk of suffering from NSCLC in Caucasian patients, specifically in southern Spain.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

We conducted an observational case-control study.

2.1. Study Population

This study involved 204 cases of NSCLC and 408 controls of Caucasian origin from southern Spain. The inclusion criteria for the cases were age 18 years or over, confirmed histological or cytological diagnosis of NSCLC (stages I–IV), and available clinical data. The controls were individuals aged over 18 years with no personal history of malignancies who had lived in the same geographical area and were recruited from the same hospital.

This case-control study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics and Research Committee of the Andalusian Public Health Service's Biobank (Code: 1322-N-20). The subjects signed a written informed consent form for collection of blood or saliva samples and their donation to the Biobank. The samples were coded and treated confidentially.

2.2. Sociodemographic and Clinical Variables

The sociodemographic data include gender, age at diagnosis, smoking status, drinking status, family history of cancer, and previous lung disease. Individuals were classified as non-smokers if they had never smoked or had smoked fewer than 100 cigarettes in their lives, as ex-smokers if they had smoked 100 or more cigarettes in their lives but did not currently smoke, and as active smokers if they had smoked 100 or more cigarettes in their lives and currently smoke. Individuals were classified by standard drink units (SDUs) as non-drinkers if they were teetotalers or did not consume alcohol regularly, as active drinkers if their alcohol consumption was greater than 4 SDUs per day in men and greater than 2.5 SDUs per day in women, and as ex-drinkers if their alcohol consumption had been greater than 4 SDUs per day in men and greater than 2.5 SDUs per day in women but they did not currently drink [32]. Histopathologic data (tumor histology and stage) were also collected. The staging system used to classify the tumors was based on the guidelines of the American Joint Committee on Cancer [33].

2.3. Genetic Variables

2.3.1. DNA Isolation

Blood samples (3 mL) were collected in BD Vacutainer® K3E Plus blood collection tubes and saliva samples in BD Falcon™ 50 mL conical tubes (BD, Plymouth, UK). DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions for purification of DNA from blood or saliva, and stored at -40 °C. The concentration and purity of the DNA were measured using the NanoDrop 2000™ UV spectrophotometer with 280/260 and 280/230 absorbance ratios. The DNA samples, isolated from blood or saliva, were preserved in the Biobank of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves, part of the Andalusian Public Health Service's Biobank.

2.3.2. Detection of Gene Polymorphisms and Quality Control

We determined the gene polymorphisms by real-time PCR allelic discrimination assay using TaqMan® probes (ABI Applied Biosystems, QuantStudio 3 Real-Time PCR System, 96 wells), following the manufacturer's instructions (Table 1). Ten per cent of the results were confirmed by Sanger sequencing. Real-time PCR and Sanger sequencing were performed in the Pharmacogenetics Unit of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves. The criteria for SNPs quality control were: (1) missing genotype rate per SNP < 0.05; (2) minor allele frequency > 0.01; (3) *p* value > 0.05 in Hardy-Weinberg equilibrium test; (4) missing genotype rate between cases and control < 0.05.

Table 1. Gene polymorphisms and TaqMan® ID.

| Gene | Location, SNP | dbSNP ID | Assay ID |
|----------------------|----------------------|--------------------|----------------|
| VDR (12q13.11) | Exon 8, G > A | rs1544410 (BsmI) | AN324M4 * |
| | Exon 1, G > A | rs11568820 (Cdx-2) | C__2880808_10 |
| | Exon 2, C > T | rs2228570 (FokI) | C__12060045_20 |
| | Exon 8, C > A | rs7975232 (ApaI) | C__28977635_10 |
| | Exon 9, T > C | rs731236 (TaqI) | C__2404008_10 |
| CYP27B1 (12q14.1) | Intron 6, T > C | rs4646536 | C__25623453_10 |
| | Promoter 5', G>A/G>C | rs3782130 | ANGZRHH * |
| | 5' UTR, A > G | rs10877012 | C__26237740_10 |
| CYP24A1 (20q13.2) | 3' UTR, A > G | rs703842 | ANH6J3F * |
| | Exon 6, G > A | rs6068816 | C__25620091_20 |
| GC (4q13.3) | 3' UTR, G > C | rs4809957 | C__3120981_20 |
| | Exon 11, T > G | rs7041 | C__3133594_30 |
| CYP2R1 (11p15.2) | 5' UTR, A > G | rs10741657 | C__2958430_10 |

* The SNPs were analyzed using custom assays by ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

2.4. Statistical Analysis

We matched cases and controls by age and gender using the 1:2 propensity score matching method [34]. Quantitative data were expressed as the results (\pm standard deviation) for variables with normal distribution and medians or percentiles (25 and 75) for variables with non-normal distribution. We used the Shapiro–Wilks test to verify normality.

We determined the Hardy–Weinberg equilibrium and haplotype frequency through the D' and r^2 coefficients. The bivariate association between risk of NSCLC and polymorphisms was evaluated for multiple models (genotypic, additive, allelic, dominant and recessive), using the Pearson chi-square and Fisher exact tests, and assessed with the odds ratio and corresponding 95% confidence interval (CI). We defined the models as follows: genotypic (DD vs. Dd vs. dd), allelic (D vs. d), dominant ((DD, Dd) vs. dd), recessive (DD vs. (Dd, dd)), and additive (dd = 0, Dd = 1, DD = 2), where D is the minor allele and d the major allele. We used the Bonferroni adjustment for multiple comparisons. Unconditional multiple logistic regression models (genotypic, dominant, and recessive) were considered to determine the influence of possible confounding variables on the risk of suffering from lung cancer.

All the tests were bilateral, with a significance level of $p < 0.05$, and were estimated using PLINK and R 4.0.2 software [35,36]. We performed linkage disequilibrium with Haploview 4.2 and haplotype analysis with SNPStats [37,38].

3. Results

3.1. Patient Characteristics

The study included a total of 204 cases of NSCLC and 408 controls, whose clinicopathological characteristics are described in Table 2. The group of cases consisted of 73.5% men (150/204) and 26.5% women (54/204); the mean age at diagnosis was 61.1 ± 10.7 years; 47.9% were smokers (96/204); 76.2% were classified as non-drinkers (128/168); 50.5% had no family history of cancer (103/204); 65.7% had no previous lung diseases (134/204). As regards the features of the disease itself, 63.1% of the cases had adenocarcinoma (125/198) and 36.9% had squamous cell carcinoma (73/198); 68.3% were classified as stage IIIB–IV (138/202); and 31.7% as stage I, II or IIIA (64/202). The control group was made up of 68.4% men (279/408) and 31.6% women (129/408); the median age was 64 (52,75) years; 44.9% were classified as non-smokers (178/396); 60.0% were regarded as non-drinkers (251/369); 93.6% had no family history of cancer (382/408), and 65.2% had had no previous lung diseases (266/408).

Table 2. Clinico-pathologic characteristics of NSCLC cases and controls.

| | Cases | | Controls | | χ^2 | p-Value | Reference | OR | CI95% |
|--------------------------|-------|-------------|----------|------------|----------|----------|-------------|------|-----------|
| | N | n (%) | N | n (%) | | | | | |
| Gender | 204 | | 408 | | | | | | |
| Female | | 54 (26.5) | | 129 (31.6) | 1.7189 | 0.1898 | | | |
| Male | | 150 (73.5) | | 279 (68.4) | | | | | |
| Age | 204 | 61.1 ± 10.7 | 408 | 64 (52,75) | | 0.1030 * | | | |
| Tobacco consumption | 204 | | 396 | | | | | | |
| Current-smokers | | 96 (47.96) | | 68 (17.2) | 81.179 | <0.001 | Non-smokers | 8.88 | 5.42–14.9 |
| Former-smokers | | 81 (39.71) | | 150 (37.9) | | | | | |
| Non-smokers | | 27 (13.24) | | 178 (44.9) | | | | | |
| Alcohol consumption | 168 | | 369 | | | | | | |
| Current-drinkers | | 34 (20.24) | | 104 (28.2) | 3.9433 | 0.1392 | | | |
| Former-drinkers | | 6 (3.57) | | 14 (3.8) | | | | | |
| Non-drinkers | | 128 (76.2) | | 251 (60.0) | | | | | |
| Family history of cancer | 204 | | 408 | | | | | | |
| Yes | | 101 (49.5) | | 26 (6.37) | 160.35 | <0.001 | No | 15.2 | 9.55–25.2 |
| No | | 103 (50.5) | | 382 (93.6) | | | | | |
| Previous lung disease | 204 | | 408 | | | | | | |
| Yes | | 70 (34.3) | | 142 (34.8) | 0.0144 | 0.9044 | | | |
| No | | 134 (65.7) | | 266 (65.2) | | | | | |
| Histology | 198 | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | | 125 (63.1) | | | | | | | |
| Squamous cell carcinoma | | 73 (36.87) | | | | | | | |
| Tumor stage | 202 | | | | | | | | |
| I, II or IIIA | | 64 (31.7) | | | | | | | |
| IIIB or IV | | 138 (68.3) | | | | | | | |

* p-value for t test; Shade means the value is significant. N means the whole number of patients considered; n means the number of patients in subgroups.

There were statistically significant differences between the cases and the controls with respect to smoking status ($p < 0.001$; OR = 8.88; CI95% = 5.42–14.9; current smokers vs. non-smokers and $p < 0.001$; OR = 3.43; CI95% = 2.14–5.63; ex-smokers vs. non-smokers) and family history of cancer ($p < 0.001$; OR = 15.2; CI95% = 9.55–25.2; yes vs. no). No statistically significant differences were observed between the two groups in gender ($p = 0.1898$), age ($p = 0.1030$), drinking status ($p = 0.1392$), or previous lung disease ($p = 0.9044$).

3.2. Genotype Distribution

All the genotype frequencies observed agreed with those expected according to the Hardy–Weinberg equilibrium model, with the sole exception of VDR BsmI rs1544410 in the control group ($p = 0.0459$) (Table S1). We found no statistical differences from those described in the Iberian population for this variant (VDR BsmI rs1544410 A allele: 0.4383 vs. 0.4393; $p = 0.9989$) [39]. The linkage disequilibrium (LD') and r^2 values are shown in Table S2. In particular, the pairs VDR rs731236/rs7975232 ($r^2 = 0.545082$; $D' = 0.959$), VDR rs731236/rs1544410 ($r^2 = 0.615164$; $D' = 0.907$), CYP27B1 rs4646536/rs3782130 ($r^2 = 0.850829$; $D' = 0.933$), CYP27B1 rs4646536/rs10877012 ($r^2 = 0.815743$; $D' = 0.925$), and CYP27B1 rs3782130/rs10877012 ($r^2 = 0.783361$; $D' = 0.901$) were in strong linkage disequilibrium (Figure 1). All the polymorphisms show minor allele frequencies (MAFs) greater than 1% and none of them was excluded from the analysis (Table S3). The haplotype frequency estimates are presented in Table S4.

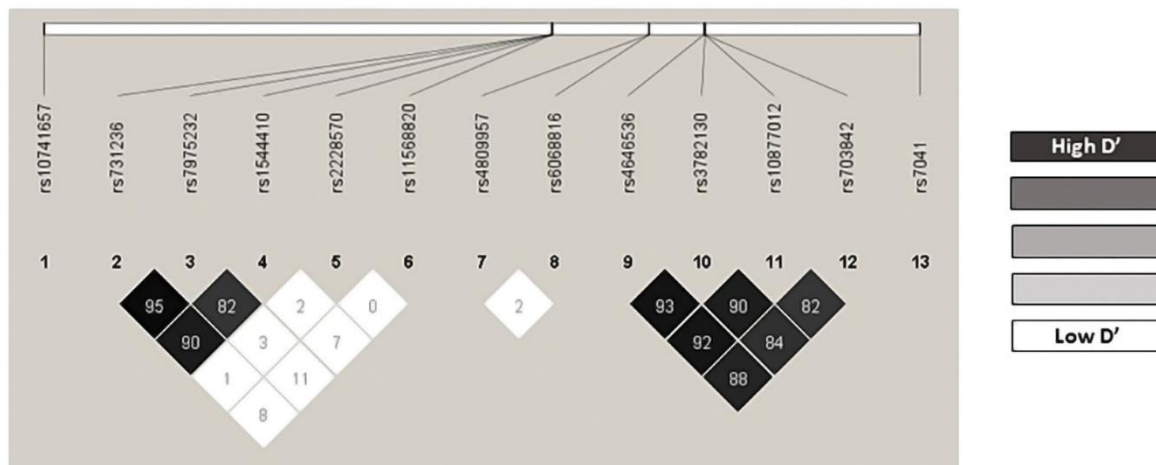


Figure 1. Linkage disequilibrium.

3.3. Influence of Genetic Polymorphisms on the Risk of NSCLC

We used the genotypic, additive, allelic, dominant, and recessive models to perform the bivariate analysis between the gene polymorphisms and the risk of suffering from NSCLC (Table S5). A statistically significant association was observed in the following SNPs: *VDR* BsmI rs1544410, in the genotypic ($p = 0.0020$), additive ($p = 0.0122$), allelic ($p = 0.0121$), and recessive ($p = 0.0006$) models, *VDR* TaqI rs731236 in the genotypic ($p = 0.0299$), and recessive ($p = 0.0124$) models, and *CYP24A1* rs6068816 in the genotypic ($p = 0.0292$), additive ($p = 0.0316$), allelic ($p = 0.0353$), and recessive ($p = 0.0194$) models (Table S5). However, after the adjustment by the Bonferroni method had been made, the only SNP that maintained a statistically significant association with the risk of developing NSCLC was *VDR* BsmI rs1544410 in the genotypic and recessive models (Table S5). In the genotypic model, patients carrying the *VDR* BsmI rs1544410-AA genotype had a lower risk of NSCLC relative to the GG genotype ($p_{\text{Bonferroni-adjusted}} = 0.0361$; OR = 0.457; CI95% = 0.26–0.76; AA vs. GG). Moreover, in the recessive model it was observed that patients carrying the *VDR* BsmI rs1544410-AA exhibited a lower risk of NSCLC than those carrying the G allele ($p_{\text{Bonferroni-adjusted}} = 0.0082$; OR = 0.442; CI95% = 0.26–0.70; AA vs. G) (Table 3). The logistic regression model adjusted for smoking and family history of cancer revealed that in the genotypic model carriers of the *VDR* BsmI rs1544410-AA genotype were associated with a lower risk of developing NSCLC compared to the GG genotype ($p = 0.0377$; OR = 0.51; CI95% = 0.27–0.95; AA vs. GG). This association was maintained in the recessive model, where patients carrying the AA genotype showed a lower risk of suffering from NSCLC than those carrying the G allele ($p = 0.0140$; OR = 0.49; CI95% = 0.27–0.85; AA vs. G) (Table 4). The other SNPs analyzed showed no statistically significant association with developing NSCLC in any of the models studied (Table S5). In performing the haplotype analysis, we took account of the polymorphisms that were in strong linkage disequilibrium (Table S2). We found that the AACATGG and GACATGG haplotypes, for the rs1544410, rs7975232, rs731236, rs4646536, rs703842, rs3782130, and rs10877012 SNPs, were associated with a lower risk of NSCLC ($p = 0.015$; OR = 0.63; CI95% = 0.44–0.91 and $p = 0.044$; OR = 0.11; CI95% = 0.01–0.94 respectively) (Table 5).

Table 3. Influence of VDR BmsI (rs1544410) gene polymorphism on risk of NSCLC.

| Models | Genotype | Cases [n (%)] | Controls [n (%)] | <i>p</i> -Value ^a | Adjusted <i>p</i> -Value ^b | OR ^c | CI95% |
|-----------|----------|---------------|------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-----------|
| Genotypic | GG | 71 (34.8) | 126 (31.2) | 0.00278 | 0.0361 | 1 | 0.72–1.54 |
| | AG | 108 (52.9) | 181 (44.8) | | | 1.058 | |
| | AA | 25 (12.3) | 97 (24.0) | | | 0.457 | |
| Dominant | A | 133 (65.2) | 278 (68.8) | 0.3684 | 1 | | |
| | GG | 71 (34.8) | 126 (31.2) | | | | |
| Recessive | AA | 25 (12.3) | 97 (24.0) | 0.00063 | 0.0082 | 0.442 | 0.26–0.70 |
| | G | 179 (87.7) | 307 (76.0) | | | | |
| | | | | | | | |
| Allelic | A | 158 (38.7) | 375 (46.4) | 0.01076 | 0.1399 | | |
| | G | 250 (61.3) | 433 (53.6) | | | | |
| Additive | - | - | - | 0.01217 | 0.1582 | | |

CI: confidence interval; OR: odds ratio. ^a*p*-value for χ^2 -test. ^b*p*-value for Bonferroni correction. ^c Unadjusted or crude ORs. Shade means the value is significant.

Table 4. Influence of clinical characteristic and VDR BmsI (rs1544410) gene polymorphism on risk of NSCLC.

| | Genotypic | | | Dominant | | | Recessive | | | Additive | | | | | |
|--------------------------|-----------------|------|-----------|-----------------|------|-----------|-----------------|------|-----------|-----------------|------|-----------|--------|------|-----------|
| | AA vs. GG | | AG vs. GG | A vs. GG | | | AA vs. G | | | A vs. G | | | | | |
| | <i>p</i> -Value | OR | CI95% | <i>p</i> -Value | OR | CI95% | <i>p</i> -Value | OR | CI95% | <i>p</i> -Value | OR | CI95% | | | |
| Tobacco consumption | | | | | | | | | | | | | | | |
| Current smokers | <0.001 | 6.11 | 3.51–10.8 | <0.001 | 6.11 | 3.51–10.8 | <0.001 | 5.91 | 3.40–10.4 | <0.001 | 6.10 | 3.50–10.8 | <0.001 | 5.96 | 3.43–10.5 |
| Former smokers | 0.0003 | 2.64 | 1.57–4.55 | 0.0003 | 2.64 | 1.57–4.55 | 0.0004 | 2.58 | 1.53–4.43 | 0.0003 | 2.64 | 1.56–4.54 | 0.0003 | 2.59 | 1.54–4.46 |
| Family history of cancer | | | | | | | | | | | | | | | |
| Yes | <0.001 | 10.9 | 6.67–18.4 | <0.001 | 10.9 | 6.67–18.4 | <0.001 | 11.3 | 6.90–18.9 | <0.001 | 10.9 | 6.68–18.4 | <0.001 | 11.1 | 6.81–18.8 |
| rs1544410 | 0.0377 | 0.51 | 0.27–0.95 | 0.7786 | 1.06 | 0.67–1.70 | 0.5478 | 0.87 | 0.56–1.36 | 0.0140 | 0.49 | 0.27–0.85 | 0.0752 | 0.76 | 0.57–1.02 |

Shade means the value is significant.

Table 5. Haplotype association with risk of NSCLC.

| | rs1544410 | rs7975232 | rs731236 | rs4646536 | rs703842 | rs3782130 | rs10877012 | Freq | OR (CI95%) | <i>p</i> -Value |
|----|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|------------|--------|-------------------------|-----------------|
| 1 | G | C | T | A | T | G | G | 0.3283 | 1.00 | --- |
| 2 | A | A | C | A | T | G | G | 0.2364 | 0.63 (0.44–0.91) | 0.015 |
| 3 | A | A | C | G | C | C | T | 0.1053 | 1.00 (0.65–1.53) | 0.99 |
| 4 | G | A | T | A | T | G | G | 0.082 | 0.95 (0.58–1.53) | 0.82 |
| 5 | G | C | T | G | C | C | T | 0.0661 | 0.90 (0.48–1.65) | 0.72 |
| 6 | A | C | T | A | T | G | G | 0.0241 | 0.00 (-Inf–Inf) | 1 |
| 7 | G | A | T | G | C | C | T | 0.019 | 0.40 (0.09–1.84) | 0.24 |
| 8 | A | A | T | A | T | G | G | 0.0136 | 1.26 (0.27–5.88) | 0.77 |
| 9 | G | A | C | A | T | G | G | 0.0133 | 0.11 (0.01–0.94) | 0.044 |
| 10 | G | C | T | G | T | C | T | 0.011 | 0.00 (-Inf–Inf) | 1 |

Global haplotype association *p*-value: <0.0001. Inf: infinite; Freq: haplotype frequency; Shade means the value is significant.

4. Discussion

The pathogenesis of NSCLC is complex, since numerous risk factors have been identified, such as smoking, exposure to radon, air pollution, history of previous lung disease, somatic mutations, and low serum levels of vitamin D [5,7]. Recent research indicates that polymorphisms involved in the metabolic pathway of vitamin D are related both to survival of the disease [12,17,40–43] and to its pathogenesis [18–31]. It is therefore important to explore the impact of these associations in different populations. In this case-control study we investigate the influence of 13 genetic polymorphisms in five genes involved in the metabolic pathway of vitamin D on susceptibility to NSCLC in a Caucasian population (Spain).

Most of the effects of vitamin D are mediated by its binding to VDR (also known as NR1H1), a ligand-dependent transcription factor belonging to the nuclear receptor (NR) superfamily [44–46]. The VDR receptor and its ligand regulate the genes involved in calcium metabolism, cell growth, antiproliferation, differentiation, apoptosis, and adaptive/innate immune responses [44–46]. The SNPs of the *VDR* gene have been extensively studied. However, those that have proved most significant are BsmI (rs1544410), TaqI (rs731236), ApaI (rs7975232), FokI (2228570), and Cdx-2 (11568820). One of the SNPs that has been studied most in relation to the risk of NSCLC is BsmI (rs1544410), which is located in the 3' UTR region, on intron 8 of the *VDR* gene, and gives rise to a change from adenine to guanine [18–26]. The functional polymorphisms located in this region may affect the function of VDR by regulating mRNA stability and protein translation efficiency, influencing the effect of vitamin D on tumor inhibition [47]. Our results show that in both the genotypic and the recessive models, patients carrying the *VDR* BsmI rs1544410-AA genotype had a lower risk of developing NSCLC; the data were adjusted to take account of smoking status and family history of cancer (Table 4). These results are in line with those described in previous studies. Specifically, a recent multiethnic meta-analysis (China, Turkey, Poland, and Tunisia) comprising ten articles (3046 cases/2716 controls) showed that the *VDR* BsmI rs1544410-AA genotype reduced the risk of lung cancer ($p = 0.05$; OR = 0.63; CI95% = 0.40–0.99; I² = 50%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.05$; AA vs. GG and $p = 0.02$; OR = 0.78; CI95% = 0.63–0.97; I² = 42%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.11$; AA vs. G) [28]. Similarly, in the analysis by cancer subtypes, the *VDR* BsmI rs1544410-AA genotype significantly reduced the risk of developing NSCLC ($p < 0.00001$; OR = 0.41; CI95% = 0.29–0.58; I² = 56%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.06$; A vs. G and $p = 0.0004$; OR = 0.22; CI95% = 0.10–0.51; I² = 0%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.76$; AA vs. G) [28].

Furthermore, we initially found in our study that the T allele for the TaqI (rs731236) SNP in the *VDR* gene showed a higher risk of NSCLC than the CC genotype ($p = 0.0129$). However, this association was not maintained after the Bonferroni adjustment. Nevertheless, these results are in line with what has been reported in the literature. A recent multiethnic meta-analysis (China, Turkey, Tunisia, Poland) based on 6 articles (2204 cases/2369 controls) showed that the T allele was associated with a higher risk of lung cancer compared to the CC genotype, both in the allelic model and in the recessive model ($p = 0.02$; OR = 1.14, CI95% = 1.02–1.27; I² = 42%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.12$; T vs. C and $p = 0.02$; OR = 1.18; CI95% = 1.02–1.37; I² = 46%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.10$; T vs. CC respectively) [28]. In addition, the analysis of subgroups by ethnic origin indicated that Asians carrying the T allele or the TT genotype showed a high risk of developing lung cancer ($p = 0.008$; OR = 1.56; CI95% = 1.12–2.17; I² = 0%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.99$; T vs. C and $p = 0.009$; OR = 1.60; CI95% = 1.12–2.28; I² = 0%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.98$; TT vs. C). However, this association was not found in Caucasians ($p = 0.20$; OR = 1.14; CI95% = 0.93–1.40; I² = 57%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.10$; T vs. C and $p = 0.22$; OR = 1.22; CI95% = 0.88–1.69; I² = 66%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.05$; TT vs. C) [28].

With regard to ApaI (rs7975232) and FokI (2228570), we found no association in our study between these SNPs and susceptibility to NSCLC. These results are in accordance with those published previously. For the ApaI SNP, a multiethnic meta-analysis (China, Turkey, Tunisia, Poland), published recently, consisting of 10 articles (3609 cases/3099 controls), found no statistically significant association in any of the models analyzed ($[p = 0.09$; OR = 0.83; CI95% = 0.66–1.03; I² = 88%; $p_{\text{heterogeneity}} < 0.00001$; A vs. C]; $[p = 0.11$; OR = 0.74; CI95% = 0.51–1.07; I² = 82%; $p_{\text{heterogeneity}} < 0.00001$; AA vs. C]; $[p = 0.95$; OR = 1.01; CI95% = 0.76–1.34; I² = 80%; $p_{\text{heterogeneity}} < 0.00001$; AC vs. CC]; $[p = 0.34$; OR = 0.88; CI95% = 0.68–1.14; I² = 78%; $p_{\text{heterogeneity}} < 0.00001$; A vs. CC] and $[p = 0.08$; OR = 0.71; CI95% = 0.48–1.04; I² = 88%; $p_{\text{heterogeneity}} < 0.00001$; AA vs. C]) [28]. As for the FokI SNP, a multiethnic meta-analysis (China, Turkey, Tunisia, Poland) based on 5 articles (1362 cases/1474 controls) also failed to find a significant association with the risk of lung cancer in any of the models analyzed ($[p = 0.30$; OR = 1.14; CI95% = 0.89–1.47; I² = 70%; $p_{\text{heterogeneity}} < 0.009$; C vs. T]; $[p = 0.45$; OR = 1.21; CI95% = 0.74–1.98; I² = 62%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.03$; CC vs. CT]; $[p = 0.63$; OR = 0.88; CI95% = 0.53–1.47; I² = 70%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.01$; CT vs. TT]; $[p = 0.96$; OR = 1.01; CI95% = 0.62–1.66; I² = 71%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.008$; C vs. TT] and $[p = 0.07$; OR = 1.33; CI95% = 0.98–1.80; I² = 55%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.06$; CC vs. T]) [28]. Similarly, we did not find a statistically significant association between susceptibility to NSCLC and the Cdx-2 (11568820) polymorphism. However, a meta-analysis (Poland, China) composed of 2 articles (1266 cases/1365 controls) showed that the

T allele was associated with lower risk of lung cancer in both the heterozygous and the dominant model ($p = 0.05$; OR = 0.81; CI95% = 0.66–1.00; I² = 0%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.77$; TC vs. CC and $p = 0.03$; OR = 0.80; CI95% = 0.65–0.98; I² = 0%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.99$; T vs. CC respectively) [28].

Recently, the effect of the rs6068816 and rs4809957 SNPs of the *CYP24A1* gene on the risk of NSCLC has been studied [24,27,29–31]. This gene is responsible for synthesizing the enzyme involved in degrading vitamin D and thereby preventing it from accumulating. The results obtained in our study relate the rs6068816-C allele to lower risk of developing NSCLC in the bivariate analysis. However, this significance was not maintained after the Bonferroni adjustment. Nevertheless, our results are in line with those presented in the literature. A meta-analysis consisting of two studies conducted in Asian populations (China) (1056 cases/1302 controls) showed that the rs6068816 SNP was significantly associated with the risk of suffering from lung cancer. In particular, the rs6068816-C allele showed a protective effect from the development of NSCLC ($p = 0.031$; OR = 0.88; CI95% = 0.78–0.99; I² = 0%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.667$; C vs. T and $p = 0.049$; OR = 0.85; CI95% = 0.72–1.00; I² = 0%; $p_{\text{heterogeneity}} = 0.955$; CC vs. T). However, the significance was not maintained after the Bonferroni adjustment [29]. As for the rs4809957 SNP, no significant association was found in our study in any of the models analyzed. However, a previous study comprising 603 cases and 661 controls of Asian descent (China) found that rs4809957 was associated with the risk of NSCLC [27]. In particular, subjects carrying the rs4809957-AA genotype had a higher risk of suffering from NSCLC ($p < 0.001$; OR = 2.71; CI95% = 1.66–4.41; AA vs. G) [27].

The rs4646536, rs3782130, rs10877012, and rs703842 SNPs in the *CYP27B1* gene, the only one capable of synthesizing the α -1-hydroxylase enzyme, which is responsible for the second hydroxylation in the vitamin D activation process, showed no statistically significant associations with the risk of NSCLC in our study. The effect of the rs4646536 and rs703842 SNPs on susceptibility to developing lung cancer has not so far been evaluated. However, their effect on other cancers (breast, colorectal, and prostate, among others) has been assessed, without any statistically significant association being found [48]. On the other hand, two studies evaluating the effect of the rs10877012 and rs3782130 SNPs on the risk of developing NSCLC have been conducted. A study with 426 cases/445 controls in an Asian population (China) found no statistically significant association for rs10877012 ($[p = 0.37$; OR = 1.10; CI95% = 0.88–1.35; GG vs. GT]; $[p = 0.37$; OR = 0.95; CI95% = 0.76–1.21; GG vs. TT]; $[p = 0.37$; OR = 1.01; CI95% = 0.75–1.32; GG vs. T]) or rs3782130 ($[p = 0.15$; OR = 0.82; CI95% = 0.76–1.45; CC vs. CG]; $[p = 0.15$; OR = 1.03; CI95% = 0.89–1.34; CC vs. GG]; $[p = 0.15$; OR = 0.94; CI95% = 0.78–1.38; CC vs. G]) in any of the models analyzed [24]. Similarly, another study with 603 cases/661 controls of Asian descent (China) found no statistically significant associations for the rs10877012 SNP with respect to the risk of NSCLC in any of the genetic models analyzed ($[p = 0.331$; OR = 0.87; CI95% = 0.67–1.13; TT vs. GT]; $[p = 0.331$; OR = 1.10; CI95% = 0.76–1.58; TT vs. GG]; $[p = 0.331$; OR = 0.92; CI95% = 0.72–1.17; TT vs. G]; $[p = 0.331$; OR = 1.19; CI95% = 0.85–1.66; GG vs. T]) [27]. By contrast, a statistically significant association was found for the rs3782130 SNP in the genotypic model ($p = 0.022$; OR = 0.82; CI95% = 0.63–1.06; CC vs. CG), ($p = 0.022$; OR = 1.42; CI95% = 0.94–2.14; CC vs. GG) and in the dominant model ($p = 0.022$; OR = 1.60; CI95% = 1.09–2.34; GG vs. C) [27].

With regard to the rs10741657 SNP of the *CYP2R1* gene, located at the p15.2 locus on chromosome 11, this gene is responsible for encoding the main hydroxylase that converts vitamin D in the liver into the intermediate metabolite 25(OH)D (first hydroxylation) [49]. Our study found no statistically significant association with risk of suffering from NSCLC. These results are in line with a previous study in an Asian population (China), in which 603 cases/661 controls were assessed without finding a statistically significant association in any of the genetic models analyzed ($[p = 0.216$; OR = 0.82; CI95% = 0.64–1.06; GG vs. AG]; $[p = 0.216$; OR = 0.86; CI95% = 0.59–1.25; GG vs. AA]; $[p = 0.216$; OR = 0.83; CI95% = 0.65–1.06; GG vs. A]; $[p = 0.216$; OR = 0.96; CI95% = 0.68–1.36; AA vs. G]) [27].

The rs7041 SNP is located in exon 11 in domain III of the *GC* gene. This gene synthesizes the vitamin D binding protein (VDBP), which has immunomodulatory functions, specifically in the lung, related to activation of macrophages and chemotaxis of neutrophils [50]. Consequently, SNPs in the *GC* gene may alter the function of the protein and increase the risk of disease [51].

Our results did not show a statistically significant association between the rs7041 SNP and susceptibility to NSCLC in any of the genetic models analyzed. These results are in line with a meta-analysis comprising 3 articles with Asian populations (China) (1142 cases/1219 controls), which showed that the rs7041 SNP was not associated with risk of lung cancer in any of the models analyzed ($[p = 0.52; OR = 0.90; CI95\% = 0.65-1.25; I2 = 83\%; p_{\text{heterogeneity}} = 0.003; G \text{ vs. } T]; [p = 0.17; OR = 0.65; CI95\% = 0.36-1.19; I2 = 63\%; p_{\text{heterogeneity}} = 0.07; GG \text{ vs. } TT]; [p = 0.93; OR = 0.97; CI95\% = 0.56-1.70; I2 = 89\%; p_{\text{heterogeneity}} = 0.0001; GT \text{ vs. } TT]; [p = 0.80; OR = 0.93; CI95\% = 0.55-1.59; I2 = 88\%; p_{\text{heterogeneity}} = 0.0002; G \text{ vs. } TT]; [p = 0.12; OR = 0.67; CI95\% = 0.40-1.11; I2 = 52\%; p_{\text{heterogeneity}} = 0.12; GG \text{ vs. } T]) [28]. However, when the subgroup analysis by cancer subtypes was performed, it showed that the G allele and the GG genotype might be protective factors against the development of NSCLC in an Asian population (China) ($p = 0.004; OR = 0.76; CI95\% = 0.62-0.92; I2 = 53\%; p_{\text{heterogeneity}} = 0.14; G \text{ vs. } T$ and $p = 0.03; OR = 0.58; CI95\% = 0.35-0.95; I2 = 51\%; p_{\text{heterogeneity}} = 0.15; GG \text{ vs. } T$ respectively) [28].$

The main limitation of this study is the limited size of the sample compared to other studies, particularly with regard to cases. This may have prevented detection of associations of some polymorphisms. However, despite this limited sample size, after the Bonferroni adjustment was applied to avoid false-positive associations, the effect of *VDR* BsmI rs1544410 on susceptibility to NSCLC remained. The strengths of our study include a very homogeneous cohort of cases, consisting solely of patients with NSCLC diagnosed by the same team of pathologists and recruited in the same geographical area, increasing their uniformity.

To summarize, our results suggested that the BsmI rs1544410 polymorphism in the *VDR* gene may act substantially as a protective factor against developing NSCLC. Further studies in different populations could help to find additional associations between other genes and polymorphisms in the vitamin D metabolic pathway and the risk of NSCLC.

5. Conclusions

The *VDR* BsmI rs1544410 gene polymorphism was significantly associated with a lower risk of NSCLC. No influence on the risk of developing NSCLC was found in our patients for the following gene polymorphisms: *VDR* Cdx2 rs11568820, *VDR* TaqI rs731236, *VDR* ApaI rs7975232, *VDR* FokI rs2228570, *CYP27B1* rs4646535, *CYP27B1* rs3782130, *CYP27B1* rs10877012, *CYP27B1* rs703842, *CYP24A1* rs6068816, *CYP24A1* rs4809957, *CYP2R1* rs10741657, and *GC* rs7041.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1. Table S1: Hardy–Weinberg equilibrium. Table S2: Linkage disequilibrium. Table S3: Minor allele frequencies of SNPs. Table S4: Haplotype frequency estimates. Table S5: Polymorphisms and association with risk of NSCLC.

Author Contributions: Conceptualization, L.E.P.L. and C.P.R.; methodology, L.E.P.L., J.M.G.N. and S.R.T.; software, L.E.P.L. and S.R.T.; validation, C.P.R., A.S.M. and F.M.M.; formal analysis, L.E.P.L. and A.S.M.; investigation, L.E.P.L., J.M.G.N. and S.R.T.; resources, A.J.M.; data curation, C.P.R.; writing—original draft preparation, L.E.P.L., J.M.G.N. and S.R.T.; writing—review and editing, C.P.R. and A.S.M.; visualization, C.P.R.; supervision, F.M.M.; project administration, A.J.M.; funding acquisition, A.J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Funding: ERDF funds (EU) from the Instituto de Salud Carlos III (PT13/0010/0039) supported by co-funding grants from the Biobank of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Research Committee of the Sistema Andaluz de Salud (code: 1322-N-20).

Informed Consent Statement: All subjects involved in the study signed the written informed consent form.

Acknowledgments: The results of this study are part of the doctoral thesis presented by Laura Elena Pineda Lancheros at the University of Granada.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

CI: confidence interval; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; *CYP24A1*: cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1; *CYP27B1*: cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1; *CYP2R1*: cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1; GC: GC Vitamin D Binding Protein (gene); MAF: minor allele frequency; NSCLC: non-small-cell lung cancer; OR: odds ratio; PCR: polymerase chain reaction; RXR: retinoid X receptor; SCLC: small-cell lung cancer; SDU: standard drink unit; SNP: single nucleotide polymorphism; UVB: ultraviolet B; VDBP: vitamin D binding protein; VDR: vitamin D receptor (gene); VDR: vitamin D receptor (protein).

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
2. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN: Cancer Tomorrow. Available online: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars?mode=population&bar_mode=stacked&cancers=15&populations=905_908_724&types=1 (accessed on 2 October 2022).
3. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>.
4. Pérez-Ramírez, C.; Cañadas-Garre, M.; Alnatsha, A.; Villar, E.; Delgado, J.R.; Calleja-Hernández, M.; Faus-Dáder, M.J. Impact of DNA repair, folate and glutathione gene polymorphisms on risk of non small cell lung cancer. *Pathol. Res. Pract.* **2018**, *214*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.11.015>.
5. Schabath, M.B.; Cote, M.L. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2019**, *28*, 1563–1579. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0221>.
6. Rodríguez-Canales, J.; Parra-Cuentas, E.; Wistuba, I.I. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat Res.* **2016**, *170*, 25–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_2.
7. Wei, H.; Jing, H.; Wei, Q.; Wei, G.; Heng, Z. Associations of the risk of lung cancer with serum 25-hydroxyvitamin D level and dietary vitamin D intake: A dose-response PRISMA meta-analysis. *Medicine* **2018**, *97*, e12282. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012282>.
8. Sirajudeen, S.; Shah, I.; Al Menhali, A. A Narrative Role of Vitamin D and Its Receptor: With Current Evidence on the Gastric Tissues. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3832. <https://doi.org/10.3390/ijms20153832>.
9. Bouillon, R.; Marcocci, C.; Carmeliet, G.; Bikle, D.; White, J.H.; Dawson-Hughes, B.; Lips, P.; Munns, C.F.; Lazaretti-Castro, M.; Giustina, A.; et al. Skeletal and Extraskeletal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocr. Rev.* **2019**, *40*, 1109–1151. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00126>.
10. Ali, N. Role of vitamin D in preventing of COVID-19 infection, progression and severity. *J. Infect. Public Health* **2020**, *13*, 1373–1380. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.021>.
11. Jeon, S.M.; Shin, E.A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 20. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0038-9>.
12. Pineda Lancheros, L.E.; Pérez Ramírez, C.; Sánchez Martín, A.; Gálvez Navas, J.M.; Martínez Martínez, F.; Ramírez Tortosa, M.D.C.; Jiménez Morales, A. Impact of Genetic Polymorphisms on the Metabolic Pathway of Vitamin D and Survival in Non-Small Cell Lung Cancer. *Nutrients* **2021**, *13*, 3783. <https://doi.org/10.3390/nu13113783>.
13. Maj, E.; Trynda, J.; Maj, B.; Gębura, K.; Bogunia-Kubik, K.; Chodyński, M.; Kutner, A.; Wietrzyk, J. Differential response of lung cancer cell lines to vitamin D derivatives depending on EGFR, KRAS, p53 mutation status and VDR polymorphism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *193*, 105431. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105431>.
14. Ge, N.; Chu, X.M.; Xuan, Y.P.; Ren, D.Q.; Wang, Y.; Ma, K.; Gao, H.J.; Jiao, W.J. Associations between abnormal vitamin D metabolism pathway function and non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 7538–7544. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7162>.
15. González Rojo, P.; Pérez Ramírez, C.; Gálvez Navas, J.M.; Pineda Lancheros, L.E.; Rojo Tolosa, S.; Ramírez Tortosa, M.D.C.; Jiménez Morales, A. Vitamin D-Related Single Nucleotide Polymorphisms as Risk Biomarker of Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8686. <https://doi.org/10.3390/ijms23158686>.
16. Ruiz-Ballesteros, A.I.; Meza-Meza, M.R.; Vizmanos-Lamotte, B.; Parra-Rojas, I.; de la Cruz-Mosso, U. Association of Vitamin D Metabolism Gene Polymorphisms with Autoimmunity: Evidence in Population Genetic Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9626. <https://doi.org/10.3390/ijms21249626>.

17. Kong, J.; Chen, X.; Wang, J.; Li, J.; Xu, F.; Gao, S.; Yu, H.; Qian, B. Genetic Polymorphisms in the Vitamin D Pathway and Non-small Cell Lung Cancer Survival. *Pathol. Oncol. Res.* **2020**, *26*, 1709–1715. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00702-4>.
18. Dogan, I.; Onen, H.I.; Yurdakul, A.S.; Konac, E.; Ozturk, C.; Varol, A.; Ekmekci, A. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of lung cancer. *Med. Sci. Monit.* **2009**, *15*, BR232–BR242.
19. Yan, Y. Association of vitamin D receptor gene Apa1 and Taq1 polymorphisms with susceptibility to lung squamous cell carcinoma. *J. Hebei Med. Univ.* **2017**, *37*, 20.
20. Kaabachi, W.; Kaabachi, S.; Rafrafi, A.; Amor, A.B.; Tizaoui, K.; Haj Sassi, F.; Hamzaoui, K. Association of vitamin D receptor FokI and Apal polymorphisms with lung cancer risk in Tunisian population. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, *41*, 6545–6553. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3538-2>.
21. Bi, X.; Jia, Y.; Liu, W.; Liu, L.; Zang, A. Vitamin D receptor gene polymorphism and genetic susceptibility of nonsmall cell lung cancer. *J. Trop. Med.* **2016**, *16*, 905–908.
22. Çiçek, H.; Güleken, N.; Öztuzcu, S.; Sevinç, A. Vitamin D receptor polymorphisms and related biochemical parameters in various cancer species. *Turk. J. Biochem.* **2017**, *42*, 161–168.
23. Gromowski, T.; Gapska, P.; Scott, R.J.; Kąklewski, K.; Marciniak, W.; Durda, K.; Lener, M.; Górski, B.; Cybulski, C.; Sukiennicki, G.; et al. Serum 25(OH)D concentration, common variants of the VDR gene and lung cancer occurrence. *Int. J. Cancer* **2017**, *141*, 336–341. <https://doi.org/10.1002/ijc.30740>.
24. Wu, X.; Cheng, J.; Yang, K. Vitamin D-Related Gene Polymorphisms, Plasma 25-Hydroxy-Vitamin D, Cigarette Smoke and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Risk. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1597. <https://doi.org/10.3390/ijms17101597>.
25. Ye, W.; Chen, G.; Pan, D.; Chen, Y.; Yu, Z.; Meng, J.; Chen, X. Clinical value of vitamin D receptor gene polymorphism in lung cancer screening. *Chin. J. Prim. Med. Pharm.* **2018**, *21*(10), 2320–2323.
26. Wei, M.; Su, G.; Ling, Z.; Wei, S.; Guangxi, L. Clinical study effecton of vitamin D receptor gene polymorphism on the susceptibility of lung squamous cell carcinoma, and chemotherapy curative. *Chronic Pathematol. J.* **2014**, *15*, 349–351.
27. Kong, J.; Xu, F.; Qu, J.; Wang, Y.; Gao, M.; Yu, H.; Qian, B. Genetic polymorphisms in the vitamin D pathway in relation to lung cancer risk and survival. *Oncotarget* **2015**, *6*, 2573–2582. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2951>.
28. Duan, G.-Q.; Zheng, X.; Li, W.-K.; Zhang, W.; Li, Z.; Tan, W. The Association Between VDR and GC Polymorphisms and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Genet. Test. Mol. Biomark.* **2020**, *24*, 285–295. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2019.0187>.
29. Xiong, Q.; Jiao, Y.; Yang, P.; Liao, Y.; Gu, X.; Hu, F.; Chen, B. The association study between CYP24A1 gene polymorphisms and risk of liver, lung and gastric cancer in a Chinese population. *Pathol. Res. Pract.* **2020**, *216*, 153237. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153237>.
30. Li, M.; Li, A.; He, R.; Dang, W.; Liu, X.; Yang, T.; Shi, P.; Bu, X.; Gao, D.; Zhang, N.; et al. Gene polymorphism of cytochrome P450 significantly affects lung cancer susceptibility. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 4892–4905. <https://doi.org/10.1002/cam4.2367>.
31. Qu, R.; Li, X.; Quan, X.; Xia, L.; Fang, X.; Li, H.; Zhou, B. Polymorphism in CYP24A1 Is Associated with Lung Cancer Risk: A Case-Control Study in Chinese Female Nonsmokers. *DNA Cell Biol.* **2019**, *38*, 243–249. <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4510>.
32. Ochoa Mangado, E.; Madoz-Gúrpide, A.; Vicente Muelas, N. Diagnóstico y tratamiento de la dependencia de alcohol. *Med. Y Segur. Del Trab.* **2009**, *55*, 26–40.
33. Amin, M.B.; Edge, S.B.; Greene, F.L.; Byrd, D.R.; Brookland, R.K.; Washington, M.K.; Gershenwald, J.E.; Compton, C.C.; Hess, K.R.; Sullivan, D.C.; et al. (Eds.) *AJCC Cancer Staging Manual*; Springer, New York, NY, USA, 2010; Volume 7.
34. Randolph, J.J.; Falbe, K. A step-by-step guide to propensity score matching in R. *Pract. Assess Res. Eval.* **2014**, *19*, 1–6.
35. Team, R.C. R: *A Language and Environment for Statistical Computing 4.0.2*; R Core Team: Vienna, Austria, 2020.
36. Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; de Bakker, P.I.; Daly, M.J.; et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *81*, 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>.
37. Barrett, J.C.; Fry, B.; Maller, J.; Daly, M.J. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 263–265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>.
38. Solé, X.; Guinó, E.; Valls, J.; Iniesta, R.; Moreno, V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>.
39. Auton, A.; Brooks, L.D.; Durbin, R.M.; Garrison, E.P.; Kang, H.M.; Korbel, J.O.; Marchini, J.L.; McCarthy, S.; McVean, G.A.; Abecasis, G.R. A global reference for human genetic variation. *Nature* **2015**, *526*, 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>.

40. Heist, R.S.; Zhou, W.; Wang, Z.; Liu, G.; Neuberg, D.; Su, L.; Asomaning, K.; Hollis, B.W.; Lynch, T.J.; Wain, J.C.; et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D, VDR polymorphisms, and survival in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 5596–5602. <https://doi.org/10.1200/jco.2008.18.0406>.
41. Zhou, W.; Heist, R.S.; Liu, G.; Neuberg, D.S.; Asomaning, K.; Su, L.; Wain, J.C.; Lynch, T.J.; Giovannucci, E.; Christiani, D.C. Polymorphisms of vitamin D receptor and survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2006**, *15*, 2239–2245. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-06-0023>.
42. Liu, Y.; Chen, W.; Hu, Z.B.; Xu, L.; Shu, Y.Q.; Pan, S.Y.; Dai, J.C.; Jin, G.F.; Ma, H.X.; Shen, H.B. Plasma Vitamin D Levels And Vitamin D Receptor Polymorphisms Are Associated with Survival of Non-small Cell Lung Cancer. *Chin. J. Cancer Res.* **2011**, *23*, 33–37. <https://doi.org/10.1007/s11670-011-0033-3>.
43. Akiba, T.; Morikawa, T.; Odaka, M.; Nakada, T.; Kamiya, N.; Yamashita, M.; Yabe, M.; Inagaki, T.; Asano, H.; Mori, S.; et al. Vitamin D Supplementation and Survival of Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 4089–4097. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0483>.
44. Carlberg, C. Vitamin D in the Context of Evolution. *Nutrients* **2022**, *14*, 3018. <https://doi.org/10.3390/nu14153018>.
45. Rochel, N. Vitamin D and Its Receptor from a Structural Perspective. *Nutrients* **2022**, *14*, 2847. <https://doi.org/10.3390/nu14142847>.
46. Carlberg, C. Vitamin D and Its Target Genes. *Nutrients* **2022**, *14*, 1354. <https://doi.org/10.3390/nu14071354>.
47. Li, M.; Liu, X.; Liu, N.; Yang, T.; Shi, P.; He, R.; Chen, M. Association between Polymorphisms of Vitamin D Receptor and Lung Cancer Susceptibility: Evidence from an Updated Meta-analysis. *J. Cancer* **2019**, *10*, 3639–3649. <https://doi.org/10.7150/jca.33431>.
48. Latacz, M.; Snarska, J.; Kostyra, E.; Fiedorowicz, E.; Savelkoul, H.F.; Grzybowski, R.; Cieślińska, A. Single Nucleotide Polymorphisms in 25-Hydroxyvitamin D3 1-Alpha-Hydroxylase (CYP27B1) Gene: The Risk of Malignant Tumors and Other Chronic Diseases. *Nutrients* **2020**, *12*, 801. <https://doi.org/10.3390/nu12030801>.
49. Fronczek, M.; Strzelczyk, J.K.; Biernacki, K.; Salatino, S.; Osadnik, T.; Ostrowska, Z. New Variants of the Cytochrome P450 2R1 (CYP2R1) Gene in Individuals with Severe Vitamin D-Activating Enzyme 25(OH)D Deficiency. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1867. <https://doi.org/10.3390/biom11121867>.
50. Chun, R.F. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochem. Funct.* **2012**, *30*, 445–456. <https://doi.org/10.1002/cbf.2835>.
51. Rozmus, D.; Płomiński, J.; Augustyn, K.; Cieślińska, A. rs7041 and rs4588 Polymorphisms in Vitamin D Binding Protein Gene (VDBP) and the Risk of Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 933. <https://doi.org/10.3390/ijms23020933>.