

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Influencia de variantes genéticas de Timidilato sintasa y timidina fosforilasa en la eficacia de la quimioterapia basada en 5-FU en pacientes con cáncer colorrectal etapa IV***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

***Eduardo Roberto Lamoza Galleguillos***

Director de Tesis: Dr Luis Quiñones  
Co-Director de Tesis: Leslie Cerpa

Santiago-CHILE

Octubre 2022

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**Eduardo Roberto Lamoza Galleguillos**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Dr Luis Quiñones S**

---

**Co-director de Tesis:**

**Leslie Cerpa C**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Lorena Garcia**

---

**Dra Maritza Garrido**

---

**Dr. Ulises Urzua**

---

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo el apoyo que me han dado, tanto desde que decidí tomar esta carrera hasta este día, gracias a ellos, su paciencia, tiempo y esfuerzo pude cumplir mi sueño de ayudar a las personas usando todos los conocimientos que adquirí y seguiré adquiriendo a lo largo de los años, esto solo es el comienzo de una larga travesía para hacer al mundo mejor.

A mi novia Andrea, la razón de mi vida y la mujer que me ha apoyado desde el comienzo de esta aventura. Jamás creí que encontraría a una persona que me amara y me diera este amor que es simplemente de cuento de hadas, gracias a ti a al bebe que pronto viene en camino tengo las ganas de seguir adelante en esta vida.

A mis, hermanos, “Los cabros”, Felipe (alias Matatán), Pato, Nicolas (Alias Pikachu), Seba (están en orden alfabético así que no se peleen si leen esto), han sido lo mejor que me ha pasado en mi vida escolar y universitaria, los momentos y risas que hemos tenido, como también los momentos tristes en los cuales nos apoyábamos jamás serán olvidados, su amistad y cariño son un tesoro invaluable.

A mis amigos de la media, los cuales a pesar de todos los dramas han estado unidos y mantienen una férrea amistad, Agüero (Alias Awero), Benja (Alias REDACTED), Héctor, Seba (alias Ollín), el otro Seba (alias Fama), Felipe (Alias Pipa), Flores (alias Flowers), Nico y Shapato. Todos ustedes se han mantenido desde la media juntos y a pesar de los problemas siempre tienen tiempo para juntarse y conversar de la vida, manteniendo el grupo junto y eso me inspira a ser una persona que no abandona a los que quiere, ustedes son increíbles.

A mis amigos de la universidad, ya que en todo es largo trayecto me han ayudado ante las dificultades, juntos hemos pasado por todo tipo de problemas y hemos logrado salir adelante y ayudarnos entre nosotros, Aramburo, Salvador, Paz, Pamela, gracias por ser los pilares fundamentales en mi desarrollo tanto académico como personal, ayudándome a ser una mejor persona.

A todos los miembros de mi laboratorio, por ser una constante fuente de conocimientos, correcciones, enseñanzas y risas. De todos aprendí algo y siempre estaré agradecido. Principalmente estoy muy agradecido de Alejandra y Susan, por tener el tiempo y la paciencia de enseñarme estadística e histología, mundos desconocidos para mí.

A mi co-directora de tesis Leslie, que gracias a ella aprendí casi todo lo que tenía que aprender para hacer esta tesis, tanto de forma, conocimientos, interpretar resultados y discutir dichos resultados, gracias a ti y a tu casi infinita paciencia pudieron hacer esto posible. Espero de verdad que la hayas pasado tan bien como yo, sobre todo por los chistes internos.

Finalmente, al profesor Luis, porque gracias a su apoyo, enseñanza, paciencia, dedicación y confianza que tuvo en mí. Espero que esto sea el comienzo de muchos más proyectos y nuevas investigaciones con el fin de ayudar a la humanidad a prosperar.

Sin ustedes, mi vida jamás hubiera sido la misma.

Índice General	
Índice General	4
Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	7
Abreviaturas	8
Resumen	9
Abstract	10
1. Introducción	11
1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal	11
1.2 Diagnóstico e histología del cáncer colorrectal (CCR)	16
1.3 Tratamiento del cáncer colorrectal (CCR)	17
1.4 Farmacocinética del 5-fluorouracilo	19
1.5 Farmacogenética de timidilato sintasa y timidina fosforilasa	22
1.5.1 Variante rs11479 del gen <i>TYMP</i>	22
1.5.2 Variante rs12280056 del gen <i>TYMS</i>	23
2. Hipotesis	24
3. Objetivos	25
3.1 Objetivo General	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. Materiales y Métodos	25
4.1 Selección de individuos y muestras de estudios	25
4.1.1 Tipo de estudio	25
4.1.2 Cálculo del tamaño muestral	26
4.1.3 Criterios de Selección de sujetos en estudio	26
4.1.4 Consideraciones éticas	27
4.2 Etapas experimentales y metodología	28
4.2.1 Extracción de ADN desde muestras de tumor fijadas en formalina y parafina.	28
4.2.2 Extracción de ADN a partir de <i>Buffy coat</i> .	28
4.2.3 Cuantificación y controles de calidad del ADN	29
4.2.4 Análisis de variabilidad genética en ADN genómico o tumoral	29
4.2.5 Análisis de variantes genéticas en población general	30
4.2.6 Recolección de datos clínicos	30
4.2.7 Análisis estadísticos	30
5. Resultados	31
5.1 Caracterización clínica de los pacientes	31
5.2 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante de <i>TYMP</i> y <i>TYMS</i> en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.	34
5.3 Análisis del equilibrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (HWE) en las variantes genéticas en población general.	35
5.4 Análisis estadístico univariado asociado entre variantes genéticas y no genéticas con la sobrevida de pacientes con mCCR	36
5.4.1 Variables no genéticas.	36
5.4.2 Variantes genéticas	39
5.5 Análisis multivariado de variantes genéticas y no genéticas en un modelo de regresión de Cox multivariado	42
5.6 Recálculo del tamaño muestral:	43
6. Discusión	44
	4

6.1 Asociación univariada de variantes genéticas y no genéticas en la sobrevida	44
6.1.1 Sexo	44
6.1.2 Edad de diagnóstico	45
6.1.3 TNM	46
6.1.4 Histología	49
6.1.5 Grado de diferenciación	50
6.1.6 Localización tumoral	51
6.1.7 Equilibrio de Hardy-Weinberg	52
6.1.8 Asociaciones entre los rs11479 y rs12280056 en la OS de pacientes CCR metastásico (mCCR).	53
6.2 Asociaciones multivariadas de las variantes genéticas y no genéticas	55
6.3 Limitaciones y proyecciones	56
7. Conclusiones	57
8. Referencias	58

**Anexos:**

ANEXO I: Dispensa al consentimiento informado	70
ANEXO II: Estandarización de extracción de ADN desde muestras en formalina	71
ANEXO III: Ficha de reclutamiento población general	72
ANEXO IV: RT-PCR rs11479	73
ANEXO V: Ficha de reclutamiento de los pacientes mCCR	76
ANEXO VI: Análisis estadístico no significativos	78
ANEXO VII: Tabla de especificación “Otras metástasis”	83
ANEXO VIII: Análisis de Cox univariada, variables no significativas	84

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Gráfico del número de defunciones en Chile a través de los años por diferentes patologías.	13
<b>Figura 2:</b> Gráfico del número de defunciones en el mundo a través de los años por diferentes patologías.	13
<b>Figura 3:</b> Gráfico dual de incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en Chile.	14
<b>Figura 4:</b> Gráfico dual de incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en mujeres en Chile.	14
<b>Figura 5:</b> Gráfico dual de incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en hombres en Chile.	15
<b>Figura 6:</b> Tipos de tumores primarios según su ubicación en el colon.	17
<b>Figura 7:</b> Fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer colorrectal.	18
<b>Figura 8:</b> Farmacocinética de una de las principales vías metabólicas de 5-FU.	20
<b>Figura 9:</b> Farmacodinamia de 5-FU.	21
<b>Figura 10:</b> Flujograma de diseño de estudio.	26
<b>Figura 11:</b> Curva <i>Kaplan-Meier</i> según la edad de pacientes con mCCR.	37
<b>Figura 12:</b> Curva <i>Kaplan-Meier</i> según la presencia de histología túbulo papilar de pacientes con mCCR.	37
<b>Figura 13:</b> Curvas <i>Kaplan-Meier</i> para metástasis hepática en pacientes con mCCR.	38
<b>Figura 14:</b> Curva <i>Kaplan-Meier</i> para la presencia de otras metástasis en pacientes con mCCR.	39
<b>Figura 15:</b> Curvas <i>Kaplan-Meier</i> asociadas a los genotipos del rs11479 del gen <i>TYMP</i> modelo dominante en pacientes con mCCR.	40
<b>Figura 16:</b> Curvas <i>Kaplan-Meier</i> asociadas a los genotipos de la variante 3'UTR del gen <i>TYMS</i> (rs12280056) en pacientes con mCCR.	41

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Descripción sondas <i>TaqMan</i> ® utilizadas.	29
<b>Tabla 2.</b> Características generales de los pacientes mCCRdel estudio.	32
<b>Tabla 3.</b> Características generales de las muestras de tumor primario obtenidas de pacientes mCCR.	33
<b>Tabla 4.</b> Frecuencias genotípicas de los rs11479 y rs12280056 en población general (PG) y pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCCR).	34
<b>Tabla 5.</b> Frecuencias alélicas de diferentes poblaciones obtenidas de la base de datos pública <i>Ensembl</i> y sujetos de estudio (Población general (PG), pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCCR).	35
<b>Tabla 6.</b> Determinación del HWE en población general de los rs11479 y rs12280056.	36
<b>Tabla 7.</b> Análisis univariado por regresión de Cox de variables clínicas.	41
<b>Tabla 8.</b> Análisis univariado por regresión de Cox de variables Genéticas.	42
<b>Tabla 9.</b> Análisis de regresión de Cox multivariado para variables clínicas.	42
<b>Tabla 10.</b> Análisis de regresión de Cox multivariado para variantes genéticas y variables clínicas.	43

## Abreviaturas

**5-FU:** 5-Fluorouracilo  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**CAPEOx:** Esquema quimioterapéutico con capecitabina y oxaliplatino  
**CCR:** Cáncer colorrectal  
**CH<sub>2</sub>THF:** 5, 10 metilentetrahidrofolato  
**CIN:** Inestabilidad cromosómica  
**CNV:** Variación del número de copias  
**CRF:** “*Case report file*”  
**DFS:** Sobrevida libre de enfermedad (*Disease free survival*)  
**DHFU:** Dehidro-fluorouracilo  
**DPD:** Dehidropirimidina fosforilasa  
**dTMP:** Deoxi-timidina monofosfato  
**dTTP:** Deoxi-timidina trifosfato  
**dUMP:** Deoxi-uridina monofosfato  
**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epitelial  
**FdUMP:** Fluorodeoxi uridina monofosfato  
**FdUTP:** Fluorodeoxi uridina trifosfato  
**FOLFIRI:** Esquema quimioterapéutico con 5-FU/LV más Irinotecan  
**FOLFOX:** Esquema quimioterapéutico con 5-FU/LV más Oxaliplatino  
**FUTP:** Fluoro uridina trifosfato  
**HR:** *Hazzard ratio*  
**HWE:** Equilibrio de *Hardy-Weinberg*  
**INDEL:** Inserción-delección nucleosídica  
**LCC:** Cáncer colorrectal izquierdo  
**LOH:** Pérdida de heterocigosidad  
**LV:** Leucovorina  
**mCCR:** Cáncer colorrectal metastásico  
**MSI:** Inestabilidad de microsatélites  
**OS:** Tasa de sobrevida global (*Overall survival*)  
**RCC:** Cáncer colorrectal derecho  
**SLC22A7:** Transportador mediado por soluto (*Solute carrier family 22 member 7*)  
**SNP:** Polimorfismo de un único nucleótido  
**TYMP:** Timidina fosforilasa  
**TYMS:** Timidilato sintasa

## RESUMEN

El cáncer colorrectal es una neoplasia con alta incidencia y mortalidad en Chile y en el mundo. El principal tratamiento es la resección quirúrgica, seguido de radioterapia y/o terapia adyuvante. La terapia más común se basa en análogos del uracilo principalmente 5-fluorouracilo el cual se administra junto con leucovorina y además con otros fármacos anticancerígenos (esquemas FOLFOX, FOLFIRI y CapeOx). Dentro de las enzimas metabolizadoras de 5-FU podemos destacar a timidina fosforilasa (TYMP) y el blanco terapéutico timidilato sintasa (TYMS), cuyas variantes genéticas han sido asociadas con la eficacia y/o la toxicidad de 5-FU. Las asociaciones clínicas y farmacológicas de estas variantes son controversiales y por consiguiente el objetivo en este trabajo es estudiar, en pacientes con cáncer colorrectal etapa IV, la asociación entre la presencia de las variantes genéticas de TYMP y de TYMS, y la eficacia del tratamiento basado en 5-FU. Para esto, el presente trabajo de tesis planteó la siguiente hipótesis “Variantes genéticas presentes en TYMS y TYMP se asocian con una disminución en la tasa de sobrevida a 2 años en pacientes con cáncer colorrectal en etapa IV con tratamiento basado en 5-FU”, para ello se realizó un estudio retrospectivo en pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCCR) tratados con terapia basada en 5-FU (n=63). De forma adicional, se incluyó un grupo de población general (n=83) para identificar la frecuencia de las variantes genéticas en la población chilena. Ambos grupos fueron genotipificados mediante PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*® para las variantes genéticas rs11479 del gen *TYMP* y rs11280056 del gen *TYMS*, con el fin de determinar las frecuencias genotípicas en ambos grupos, el equilibrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) en población general y asociar variables clínicas y genéticas con la tasa de sobrevida de 2 años de los pacientes con mCCR, mediante análisis univariados y multivariados mediante un modelo de regresión de Cox. Los resultados mostraron que ninguna de las variantes en población general cumplía con el equilibrio de *Hardy-Weinberg*, por lo que puede que exista un fuerza evolutiva o sesgos de selección que estén alterando la frecuencia de los genotipos. Por otra parte, con respecto a las variantes genéticas, se asoció significativamente el genotipo 6bp-/6bp- del rs11280056 del gen *TYMS* con una disminución en la tasa de sobrevida (HR=2,07, *p-value*=0,058, IC95=0,97-4,42) mientras que no se encontró una asociación a ningún modelo de herencia del rs11479 del gen *TYMP*. Por el lado de variables clínicas se encontró una asociación significativa en la edad de diagnóstico menor a 50 años (HR=2,33, IC95=1–5,41), la presencia de histología túbulopapilar (HR=5,3, *p* = 0,0048, IC95=1,44–18,48) y la presencia de metástasis hepática (HR=4,21, *p-value*=0,021 IC95%=1,24-14,28). Con relación a los análisis multivariados se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la edad de diagnóstico del paciente y el rs11280056, siendo pacientes jóvenes con el genotipo 6bp-/6bp- aquellos con una menor sobrevida global. En conclusión, nuestros resultados, preliminares encontraron una asociación entre la edad de diagnóstico, el rs11280056, la metástasis hepática y la histología túbulopapilar con la sobrevida global a los 2 años en pacientes con mCCR, pero no encontraron asociación al rs11479 ni otras variables clínicas. Estos resultados pueden ser el punto de partida para la generación de un modelo de predicción de la eficacia del tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal metastásico con tratamiento basado en 5-FU en Chile.

**Palabras clave:** Cáncer colorrectal metastásico, 5-fluorouracilo, Timidilato sintasa, timidina sintasa, metástasis hepática, histología tubulopapilar, sobrevida.

## Abstract

Colorectal cancer is a type of cancer which has a high incidence and mortality in Chile and the world. The main treatment for colorectal cancer is surgical resection, followed or accompanied by radiotherapy and/or adjuvant therapy. Focusing on the last type of treatment, the most common therapy is based on uracil analogs, mainly 5-fluorouracil, which can be given in chemotherapy regimens with other anticancer agents (FOLFOX or FOLFIRI regimens). Among the metabolizing enzymes that are targeted by 5-FU are thymidine phosphorylase (TYMP) and thymidylate synthase (TYMS), whose genetic variants have been associated with the efficacy and/or toxicity of 5-FU. Evidence is controversial about the role of genetic variants in 5-FU efficacy and/or toxicity. Therefore, the aim this work was to elucidate whether these genetic variants affect the efficacy of 5-FU-based treatment in the Chilean population with mCCR. For this, this thesis proposed the following hypothesis "Genetic variants in TYMS and TYMP are associated with a decrease in the 2-year survival rate in patients with stage IV colorectal cancer treated with 5-FU". In order to that, a retrospective study was carried out in patients with metastatic colorectal cancer (mCCR) treated with adjuvant therapy containing 5-FU (n = 63) and also a general population group (n = 83), these groups were genotyped by real-time PCR using *TaqMan*® probes for the genetic variants rs11479 from TYMP gene and rs11280056 from TYMS gene, in order to determine the genotypic frequencies in both groups, the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the general population and to associate clinical and with the 2-year survival rate -OS- of patients with mCCR. Survival analyzes were performed on clinical variables associated with lower survival in patients with CCR obtained from medical records using univariate and multivariate analyzes were performed using a Cox regression model. Firstly, it was found that none of the variants in the general population complied with the Hardy-Weinberg equilibrium, meaning that an evolutionary force or selection bias are altering the frequency of the genotypes. About the genetic variants in our study, we found that 6bp-/6bp-genotype of the TYMS gene rs11280056 is associated with a worse OS (Hazard ratio (HR) = 2.07 p = 0.058 confidence interval of 95% (CI95) [0.97 - 4.42]), while no association was found with any inheritance model of the TYMP gene rs11479. Now in the clinic variables we found an association in the age of diagnosis, in which patients diagnosed at an age less than 50 years have worse OS than patients diagnosed at older ages (HR= 2,33 IC95 [1 – 5,41]). Among this variable, the presence of a tubulopapillary histology, and the presence of liver metastases were also associated with a worse prognosis (HR = 5,3 p = 0,0048, IC95 [1,44 – 18,48], HR = 4,21 p = 0,021 IC95% [1,24 - 14,28] respectively). Concerning about all these variables work together, a multivariate analysis was made, and it was found that the age of diagnosis and the 6bp-/6bp-genotype are significative variables associated with a worse global survival in patients with mCCR. In conclusion, this could be the start-point to generate a predictive model of efficacy in the treatment of 5-FU in patients with CCR in Chile.

Keywords: Metastatic colorectal cancer, 5-fluorouracil, Thymidylate synthase, thymidine synthase, liver metastases, tubulopapillary histology, survival.

## 1. Introducción:

### 1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal (CCR):

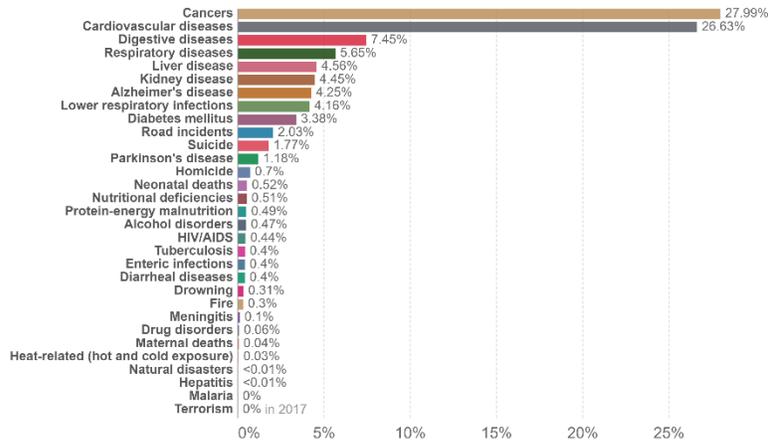
El cáncer es una agrupación de más de 100 patologías que se desarrollan en el tiempo e involucran la división celular descontrolada. Cada tipo de cáncer posee características únicas que lo diferencian de los demás, y debido a esto, los tratamientos van adaptándose y cambiando a través de los años para optimizar la eficacia de las terapias realizadas (NIH 2007). Esta resistencia que ha dado el cáncer a los tratamientos de hoy en día ha escalado al punto de que hoy es, junto con las enfermedades cardiovasculares, una de las mayores causas de muerte a nivel global y nacional (**Figuras 1, 2 y 3**) (Ritchie & Roser *et al*, 2018). Dentro de todas estas patologías el cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer lugar en el ranking de incidencia y segundo en mortalidad a escala global al compararse con los otros tipos de cáncer (Recio-Bolies *et al*, 2022).

En relación con la incidencia del CCR, la genética es un factor que puede alterarla, por ejemplo, la incidencia es levemente mayor en hombres que en mujeres (proporción 1,4:1) (**Figuras 4 y 5**). Se ha descrito que algunas enfermedades pueden aumentar la incidencia de CCR, tales como enfermedades inflamatorias del intestino (Enfermedad de Crohn, Colitis ulcerosa), poliposis adenomatosa familiar, síndrome de Lynch, entre otros (MINSAL, 2012; Recio-Boiles *et al*, 2022). De forma similar, se ha descrito que el ambiente también influye en la incidencia, ya que aumenta dependiendo del nivel de desarrollo socioeconómico en cada país, de tal forma que las tasas de incidencia más altas son en países como Australia/nueva Zelanda y de la unión europea, intermedias en países latinoamericanos y bajas en países de África (Exceptuando África del sur) y Asia (enfocándose en zonas centrales y del sur de Asia) (MINSAL, 2012). Uno de los factores que promueven la incidencia son la dieta y los hábitos en las comunidades de cada país, dentro de estos, el consumo de tabaco, alcohol y/o carnes rojas, el sobrepeso, obesidad y/o diabetes, también se han asociados a un mayor índice de riesgo en padecer CCR (Kuipers *et al*, 2015). Siendo Chile un país en vías de desarrollo, con una alta tasa de fumadores, un alto nivel de consumo de alcohol, con un tercio de su población adulta con obesidad y un 44,5% de sus niños con sobrepeso u obesidad (Colombo *et al*, 2019), es esperable que las tasas de incidencia aumenten a lo largo del tiempo, por lo que estudios

relacionados al CCR podrán aportar mejores formas de diagnóstico y tratamiento de esta patología.

Para hablar del CCR es necesario referirnos a ciertas terminologías como la tasa de supervivencia (OS-*Overall survival*-), la cual se define como el tiempo en el cual los pacientes siguen vivos después del diagnóstico y/o el tratamiento de una enfermedad, siendo este ejemplo el cáncer. Junto con esto la tasa de supervivencia libre de progresión (DFS-*Disease free survival*-) la cual se define como el tiempo en el cual el paciente no presenta signos o síntomas de la patología posterior del tratamiento. En el CCR la OS varía dependiendo del estadio o etapa en el cual es diagnosticada esta enfermedad. Para cada etapa existe una tasa de supervivencia relativa a 5 años (OS-5y-), siendo en pacientes con cáncer localizado no metastásico (Etapa I) de un 90%, en pacientes con CCR con infiltración a tejidos u órganos cercanos (Etapa II) y/o con infiltración en los nódulos linfáticos (Etapa III) el porcentaje es de un 71%. Finalmente, la presencia de un CCR metastásico (Etapa IV), presenta una diseminación a uno o más órganos lejanos, presenta una OS de un 14% (ACS 2020). En lo que respecta a Chile, el informe de 2021 del *Global Cancer Observatory* (GCO) mostró que el CCR se encuentra en segundo lugar en nivel de incidencia con 6.219 nuevos casos y el tercero en mortalidad con 3.179 defunciones. Este alto índice se puede deber a la naturaleza del CCR, ya que, en estadios tempranos, este no presenta síntomas distinguibles con otras enfermedades (sangrado rectal, dolor abdominal y anemia, por dar algunos ejemplos), y una vez expandido a otros órganos o tejidos (Etapa III y IV) puede empezar a generar síntomas característicos que impliquen su diagnóstico (Recio-Bolies *et al*, 2022).

Share of deaths by cause, Chile, 2019

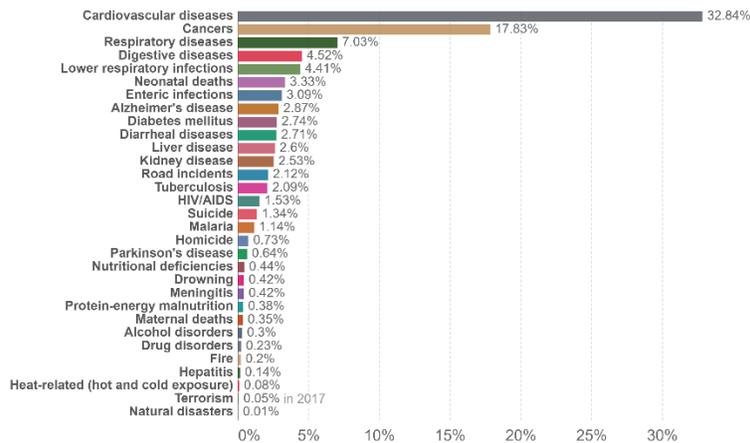


Source: IHME, Global Burden of Disease

OurWorldInData.org/causes-of-death - CC BY

**Figura 1:** Número de defunciones en Chile a través de los años por diferentes patologías. (Ritchie *et al*, 2018). En donde las defunciones por cáncer llegan a 31,638 en el año 2019 siendo un 27,99% del total en ese año.

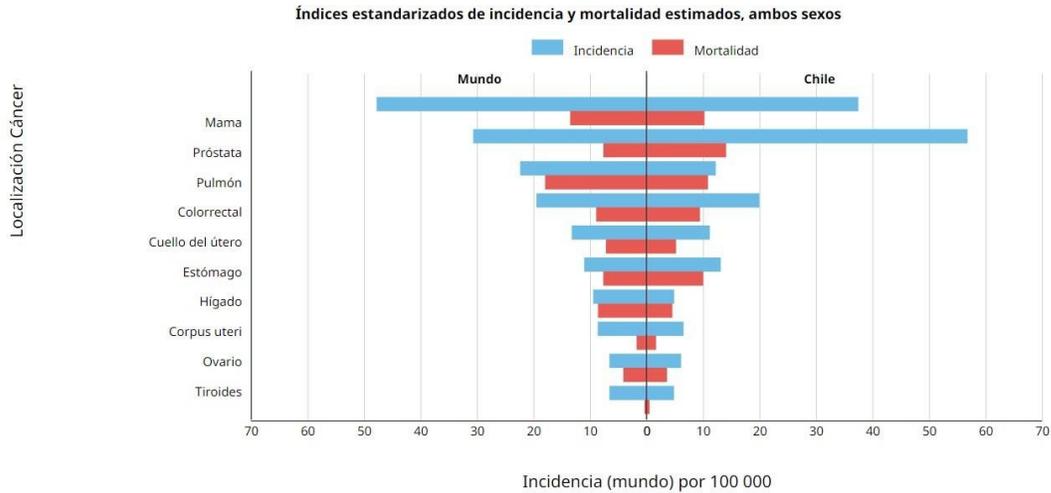
Share of deaths by cause, World, 2019



Source: IHME, Global Burden of Disease

OurWorldInData.org/causes-of-death - CC BY

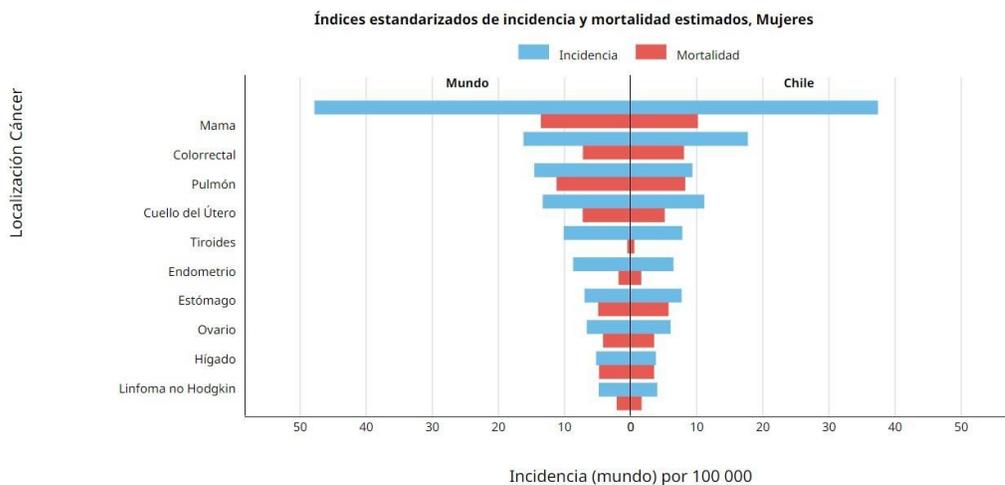
**Figura 2:** Número de defunciones en el mundo a través de los años por diferentes patologías. (Ritchie *et al*, 2018). En donde las defunciones por cáncer llegan a 18,56 millones en el año 2019 siendo un 32,84% del total en ese año.



Fuente: GLOBOCAN 2020  
 Modificado de: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)  
 © International Agency for Research on Cancer 2022

International Agency for Research on Cancer  
 World Health Organization

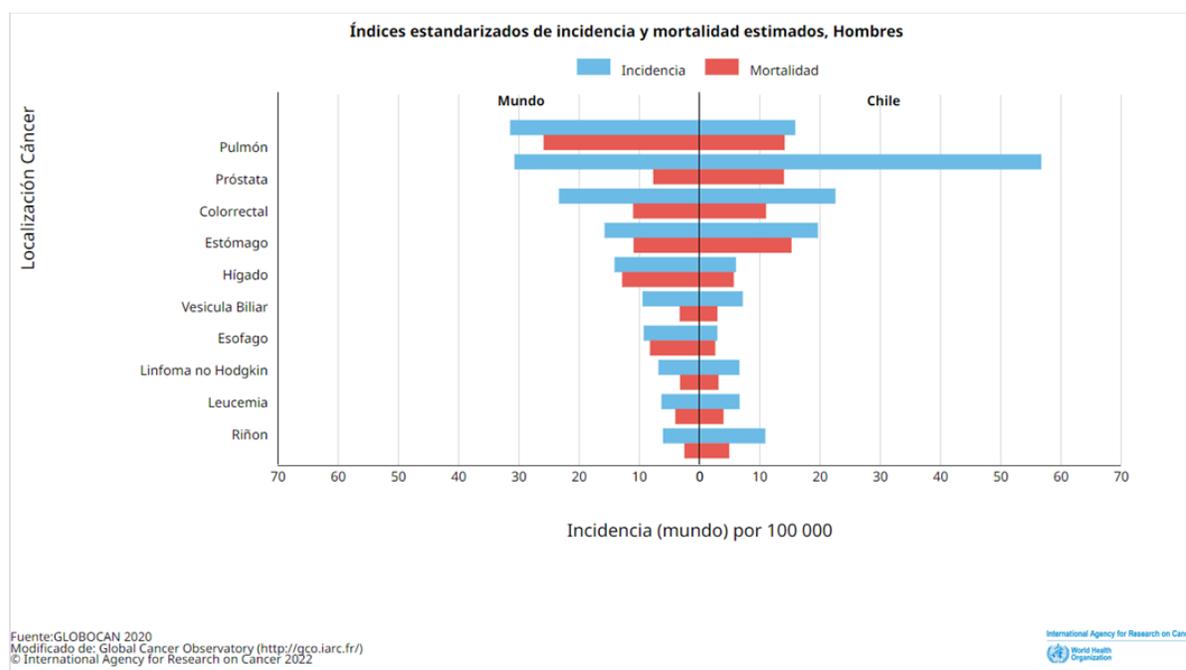
**Figura 3:** Incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en Chile (lado derecho) y el mundo (lado izquierdo) al año 2020. Barra roja corresponde a mortalidad y barra azul a incidencia, en la cual se observa que la incidencia de cáncer colorrectal en Chile y en el mundo es de aproximadamente 19,9 y 19,5 por cada 100,000 habitantes respectivamente y la mortalidad es de 9 por cada 100,000 habitantes en el mundo mientras que en Chile es de 9,4 por cada 100,000 habitantes. Imagen obtenida de *Global Cancer Observatory (GCO), Cancer Today, WHO*. Índices estandarizados de incidencia y mortalidad estimados, ambos sexos



Fuente: GLOBOCAN 2020  
 Modificado de: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)  
 © International Agency for Research on Cancer 2022

International Agency for Research on Cancer  
 World Health Organization

**Figura 4:** Incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en mujeres en Chile (lado derecho) y el mundo (lado izquierdo) al año 2020. Barra roja corresponde a mortalidad y barra azul a incidencia, en la cual se observa que la incidencia de cáncer colorrectal en Chile y en el mundo es de aproximadamente 17,7 y 16,2 por cada 100,000 habitantes respectivamente y la mortalidad es de 8,1 por cada 100,000 habitantes en el mundo mientras que en Chile es de 7,2 por cada 100,000 habitantes. Imagen obtenida de *Global Cancer Observatory (GCO), Cancer Today, WHO*.



**Figura 5:** Gráfico Dual de incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en hombres en Chile (lado derecho) y el mundo (lado izquierdo) al año 2020. Barra roja corresponde a mortalidad y barra azul a incidencia, en la cual se observa que la incidencia de cáncer colorrectal en Chile y en el mundo es de aproximadamente 22,6 y 23,4 por cada 100,000 habitantes respectivamente y la mortalidad es de 11 por cada 100,000 habitantes en ambos casos. Imagen obtenida de *Global Cancer Observatory (GCO), Cancer Today*

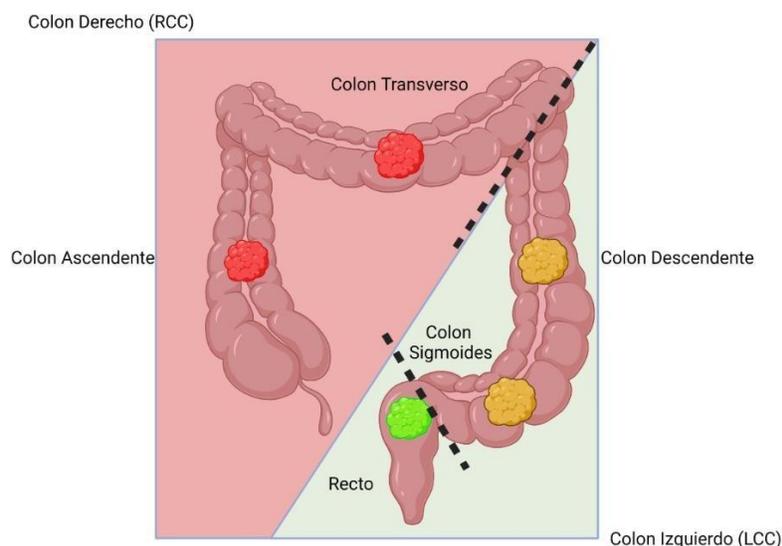
## 1.2 Diagnóstico e histología del cáncer colorrectal:

Para el diagnóstico del CCR el *gold standard* es la colonoscopia más biopsia derivada por signos o síntomas correspondientes a dicha patología, *screening* de rutina, o encontrado por accidente por una admisión al recinto hospitalario debido a dolor abdominal agudo. Los síntomas que son necesarios para realizar una colonoscopia son sangrado rectal, dolor abdominal y anemia, mientras que, ante la presencia de síntomas más severos como obstrucción intestinal, peritonitis y perforación son causal de una cirugía de emergencia (Recio-Boiles *et al*, 2022).

Ante la posibilidad de presentar un CCR el método de análisis estándar es la colonoscopia más biopsia en la zona de sospecha. Una vez obtenida la muestra de biopsia es analizada por un anatomopatólogo, y según la guía del Comité Conjunto Americano de Cáncer (*The American Joint Committee on Cancer* o AJCC) se determina la clasificación TNM del tumor primario o del foco metastásico, el tipo histológico y el grado de diferenciación. La clasificación TNM indica el tamaño del tumor (T), la cantidad de ganglios linfáticos con células cancerígenas infiltradas (N) y el tipo de metástasis a distancia (M) (Weiser *et al*, 2018).

Histológicamente, el 90% de los CCR pertenecen al grupo de los adenocarcinomas provenientes de células epiteliales de la mucosa del colon y dentro de estas existen subclasificaciones las cuales tienen diferentes características anatómicas y fisiopatológicas, como el adenocarcinoma mucinoso, en forma de anillo de sello, tubular mucinoso, entre otros. (Recio-Boiles *et al*, 2022, Hamilton *et al*, 2010). Para la caracterización de los adenocarcinomas se analiza el grado de diferenciación del tumor, analizando la forma y comparando cuan similar es con su tejido de origen, las células epiteliales. Se considera a un tumor bien diferenciado cuando el 95% del tejido presenta glándulas completamente diferenciadas, un tumor moderadamente diferenciado presenta un grado de diferenciación de entre un 50-95%, y un tumor pobremente diferenciado posee un grado de diferenciación menor al 50%; aparte de estas tres clasificaciones existen 2 más (moderada buena y pobre de alto grado), las cuales son significativos para el pronóstico del paciente. Se ha establecido que, a mayor diferenciación del tumor, mejor será el pronóstico (OS) de los pacientes con CCR (Recio-Boiles *et al*, 2022, Halvorsen-Seim *et al*, 1988).

Otro factor por considerar es la localización del tumor en el colon. Este se puede dividir en colon ascendente, transverso, sigmoide y recto, y, dependiendo de la zona y vascularización en la cual se encuentra el tumor, se pueden clasificar en 3 tipos de tumores primarios malignos: Tumor de colon derecho o RCC (ascendente y/o transverso), tumor de colon izquierdo o LCC (Descendente y/o sigmoide) y tumor de recto (**Figura 6**) (Ponz *et al*, 2001). Un meta-análisis ha relacionado que los tumores RCC poseen un peor pronóstico clínico con respecto a aquellos tumores LCC (Petrelli *et al*, 2017). Además, se ha observado que tumores LCC y metástasis tienen un mejor pronóstico que aquellos tumores RCC y metástasis (Brouwer *et al*, 2020).



**Figura 6:** Tipos de tumores primarios según su ubicación en el colon. Los tumores rojos corresponden al colon derecho (RCC), los amarillos al colon izquierdo (LCC) y el verde en el recto. Imagen creada utilizando el programa *BioRender.com*.

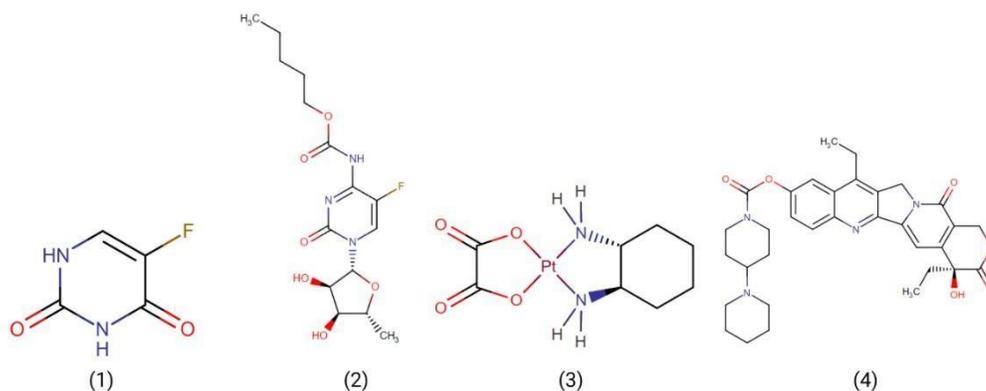
### 1.3 Tratamiento para el cáncer colorrectal:

La resección quirúrgica es el tratamiento más común frente a un CCR localizado no metastásico, este procedimiento quirúrgico, ya sea por colectomía laparoscópica manualmente asistida o laparotomía exploratoria, mejoran la OS-5y- en un 69% y la DFS en un 76% de los pacientes (incluyendo a todos los estadios de CCR). Ante estadios II de alto riesgo, III o IV, la cirugía por si sola aumenta la OS-5y- de los pacientes entre un 20-50%, por lo que se ha recomendado el uso de agentes citotóxicos previa y post cirugía, conocidos como terapias neoadyuvante y adyuvante, respectivamente. La función de dichas terapias es interrumpir la

replicación célula, impidiendo la proliferación de tejidos neoplásicos (Recio-Boiles *et al*, 2022).

La terapia más utilizada para el CCR se basa en la administración de 5-Fluorouracilo (5-FU) en conjunto con Leucovorina (LV o 5'-Formiltetrahidrofolato), ya que la tasa de respuesta sin LV es de un 10-15%, pero la administración conjunta de LV aumenta la tasa de respuesta a la quimioterapia en un 40-50% (Longley *et al*, 2003). LV es un compuesto no citotóxico, pero que cumple la función de aumentar los niveles intracelulares de tetrahidrofolato (CH<sub>2</sub>THF), sustrato necesario para la correcta actividad de 5-FU (Recio-Boiles *et al*, 2022, Longley *et al*, 2003).

Adicional a estos 2 fármacos, existen otros tratamientos que pueden complementarse con 5-FU/LV, como el oxaliplatino, cuya función es unirse a las hebras de ADN generando aductos en ellas, o el irinotecan, el cual actúa inhibiendo a la proteína topoisomerasa I. Estos fármacos son usados para mejorar la respuesta a la terapia con 5-FU/LV (Grothey *et al*, 2004, Fujita *et al*, 2015) (**Figura 7**). Esquemas quimioterapéuticos como FOLFOX (5-FU/LV + Oxaliplatino) o FOLFIRI (5-FU/LV + Irinotecan) han sido la primera y segunda línea de tratamientos contra el CCR, respectivamente (Recio-Boiles *et al*, 2022, MINSAL, 2012). Aparte de estos tratamientos existen terapias personalizadas con anticuerpos como Bevacizumab y Cetuximab, caracterizados por ser anticuerpos monoclonales contra el factor de crecimiento vascular A (VEGF-A) y el receptor de crecimiento epidermal (EGFR), respectivamente (Garriets *et al*, 2021, Chidharla *et al*, 2021). Una revisión realizada por Baraniskin *et al* en el año 2019 concluyó que un tratamiento con bevacizumab y monoterapia con 5-FU mejora la DFS y la OS-5y- en un 39% y un 15%, mientras que otra revisión por Fornasier en el año 2018, concluyó que pacientes con CCR metastásico y sin mutaciones en el gen del virus sarcoma de ratas (RAS) presentan una mejoría en su DFS y su OS-5y- en un 30% y un 18% respectivamente (Baraninskin *et al*, 2019, Fornasier *et al*, 2018).



**Figura 7:** Fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer colorrectal: (1) 5-fluorouracilo (2) Capecitabina (3) Oxaliplatino (4) Irinotecan (Wishart *et al*, 2018).

#### 1.4 Farmacocinética del 5-fluorouracilo:

El 5-FU es un fármaco análogo a las pirimidinas, el cual tiene como blanco terapéutico la enzima timidilato sintasa (TS) (Codificada por el gen *TYMS*), la cual está involucrada en la reposición de timidinas disponibles para la síntesis y reparación del ADN mediante la metilación de deoxiuridina monofosfato usando de sustrato 5,10-metilentetrahidrofolato (CH<sub>2</sub>THF) para la formación de deoxitimidina monofosfato (dTMP) (Thorn *et al*, 2010).

Este fármaco ingresa por usando el transportador SLC22A7 (*Solute carrier family 22 member 7*) y al entrar al citoplasma comienza a ser metabolizado por varias vías las cuales pueden llevar a la formación de metabolitos activos o inactivos los cuales serán eliminados. El principal mecanismo de acción de 5-FU se basa en la metabolización de este fármaco a fluorodeoxiurina monofosfato (FdUMP) el cual inhibe a TS formando un complejo ternario estable (**Figura 8**) (Thorn *et al*, 2010 *et al*, Longley 2003).

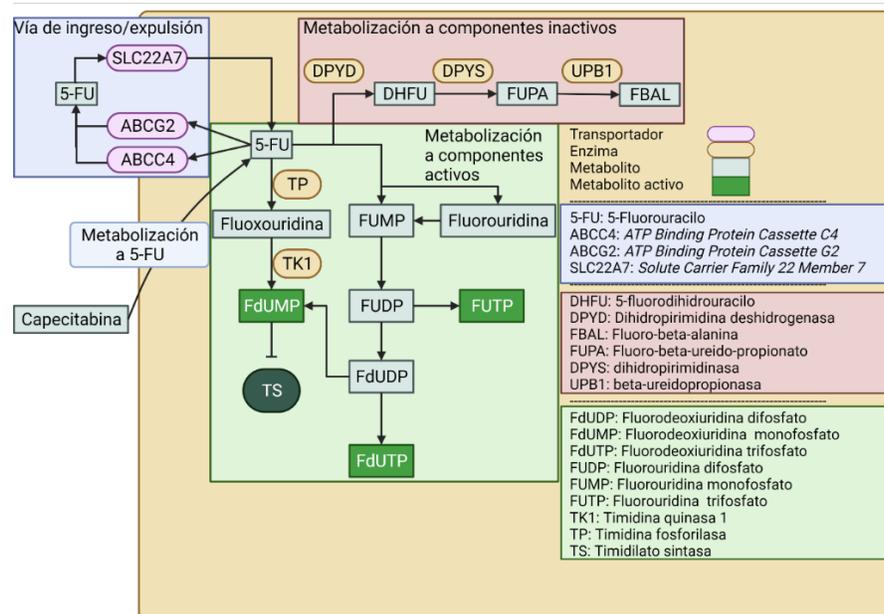
La metabolización de 5-FU a FdUMP puede ocurrir por la vía de timidina fosforilasa (TP) (Codificada por el gen *TYMP*) a fluorodeoxiuridina y por la acción de timidina quinasa 1 (TK1) a FdUMP. También puede ocurrir indirectamente vía fluorouridina monofosfato (FUMP) o fluorouridina (FUR) a fluorouridina difosfato (FUDP) y mediante una reducción ribonucleotídica a FdUDP y FdUMP. FUDP y FdUDP pueden ser transformadas a FUTP y FdUTP y ser incorporadas al RNA y DNA respectivamente y contribuir a la acción farmacodinámica de 5-FU (**Figura 9**) (Thorn *et al*, 2010, Longley *et al*, 2003).

El paso limitante para el catabolismo de 5-FU es la conversión de 5-FU a 5-fluorodihidrouracilo (DHFU) por la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD, codificada por el gen *DPYD*) a un metabolito inactivo. DHFU es metabolizado a fluoro-beta-ureido-propionato (FUPA) y posteriormente a fluoro-β-alanina (FBAL) por dihidropirimidinas (DPYS) y β-ureodopropionasa (UPB1) respectivamente (Thorn *et al*, 2010). Este proceso impide que un 80% del 5-FU administrado pueda cumplir su acción en el organismo (Zhang *et al*, 2008).

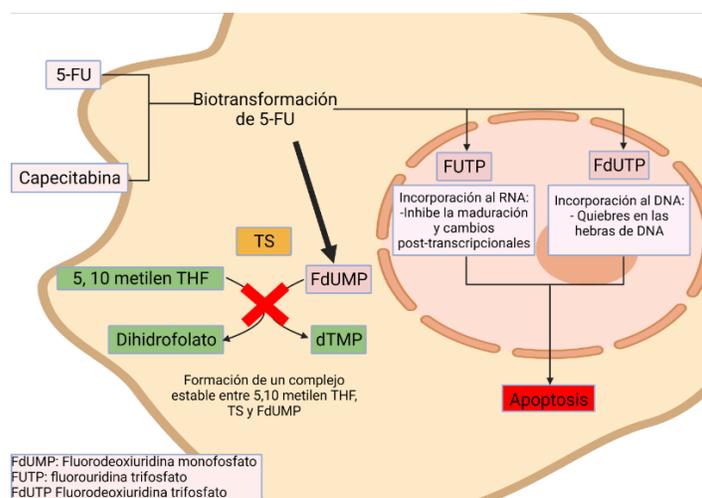
La principal ruta de acción de 5-FU por FdUMP es una secuencia de unión en serie, en donde el metabolito activo FdUMP se une al sitio activo antes que CH<sub>2</sub>THF. La reacción inicia con una adición nucleofílica del sitio activo cisteína 146 hacia el carbono 6 del anillo pirimidínico de FdUMP. De esta catálisis la posición de unión y orientación del substrato, si son correctamente adoptadas, permiten una eficiente unión al cofactor, permitiendo la formación del complejo ternario TS-FdUMP-CH<sub>2</sub>THF e inhibiendo la enzima (Zhang *et al*, 2008).

Al inhibirse la función de TS los niveles de dUMP aumentan y dTMP disminuyen, traduciendo en una disminución en los niveles de deoxitimidina trifosfato (dTTP) y un desbalance de nucleótidos, lo que perjudica procesos como la síntesis y reparación del ADN (Longley *et al*, 2003).

Ante lo descrito previamente, se puede inferir que existe una gran red enzimática para la metabolización de este 5-FU, y, por consiguiente, si existen variantes genéticas que alteren la expresión de dichas enzimas, lo mismo ocurrirá con la eficacia y/o la toxicidad en la célula o en el organismo. Con esto presente, se decidió realizar un análisis de las variantes genéticas de las enzimas TP y TS y determinar las variantes genéticas que estaban asociadas a la eficacia en el tratamiento ante CCR.



**Figura 8:** Farmacocinética las principales vías metabólicas de 5-FU a sus componentes activos. Fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), Fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) y Fluorouridina trifosfato (FUTP). A través del transportador SLC22A7 5-FU entra a la célula y al ingresar puede ser excretado por bombas ATP dependientes ABCG2 y/o ABCC4. Una vez ingresado 5-FU este puede ser metabolizado por las enzimas TP y TK1 hasta FdUMP para formar uno de sus metabolitos activos FdUMP. La otra ruta de síntesis es el paso de 5-FU a fluorouridina monofosfato, la cual, por varios procesos enzimáticos, lleva a la formación de FdUMP y sus otros metabolitos activos fluorouridina trifosfato (FUTP) y fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) Con respecto al fármaco capecitabina este puede atravesar la membrana celular sin la necesidad de un transportador, este luego es biotransformado a 5-FU para ser utilizado en las diferentes vías de metabolización. Imagen creada utilizando el programa *BioRender.com*.



**Figura 9:** Farmacodinamia de 5-FU. La biotrasformación de 5-FU resulta en la formación de 3 metabolitos activos, el principal de estos es FdUMP, el cual inhibe a TS formando un complejo ternario estable con 5,10-metilentetrahidrofolato (CH<sub>2</sub>THF), incapacitando a la célula de reciclar uracilos (deoxiuridinamonofosfato (dUMP)) a timidinas (deoxitimidinamonofosfato (dTMP)). Otros metabolitos activos de 5-FU son FUTP y FdUTP, los cuales inhiben la transcripción y la replicación del ADN respectivamente, gatillando la apoptosis celular. Imagen creada utilizando el programa *BioRender.com*.

## 1.5 Farmacogenética de timidilato sintasa y timidina fosforilasa

Una de las formas en las cuales la expresión de los genes puede ser alterada es mediante la presencia de mutaciones y polimorfismos en genes o zonas reguladoras de dichos genes. Un polimorfismo se define como aquella variante genética que se encuentra presente en más del 1% de la población y presenta por lo menos dos fenotipos diferentes. Entre los polimorfismos más comunes encontramos los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), deleciones e inserciones cortas (INDELs), variación del número de copias (CNVs), entre otros (Alzu'bi *et al*, 2019).

Un SNP se puede definir como la sustitución de un solo nucleótido, y representan el 90% de todos los polimorfismos humanos. Los SNPs pueden aparecer en cualquier región del genoma, incluyendo exones, intrones y zonas regulatorias de estos mismos, afectando o no la expresión y/o función de dicho gen. La presencia de un SNP también puede alterar genes que codifican proteínas involucradas en la farmacocinética o farmacodinamia de diferentes fármacos, lo cual podría determinar cuan eficiente será el tratamiento (Alzu'bi *et al*, 2019). En este sentido, hoy en día, aparece el término de medicina de precisión, basada en la farmacogenética, la cual ha permitido mejorar los tratamientos mediante estrategias personalizadas acorde a la información del paciente, dentro de lo cual se encuentra su perfil genético.

### 1.5.1 Variante rs11479 del gen *TYMP*

La variante rs11479, del gen *TYMP* que codifica a TP, corresponde a un SNP en la cual se reemplaza una base de citosina por una timidina en la posición 1412 en su región codificante, lo cual altera el codón y con ello la secuencia de la proteína a sintetizar, cambiando de un aminoácido de serina a una leucina en la posición 471 de la cadena aminoacídica (c.1412C>T, S471L) (Huang *et al*, 2014, Jennings *et al*, 2013, Wang *et al*, 2014, Meulendijks *et al*, 2017). Existen 4 estudios en los cuales tratan de asociar este SNP con alguna variable clínica o patológica en cánceres gastrointestinales tratados con 5-FU o capecitabina, dentro de los cuales, el estudio de Huang *et al* 2014, demostró que existe un aumento en la expresión de TP en el tejido canceroso junto con la presencia de este SNP con una menor OS-5y- al presentar un recuento plaquetario bajo. Adicional a esto, el estudio de Jennings *et al* 2013 asociaron la presencia de este SNP a un cambio temprano en la dosis de terapia adyuvante junto con una

mayor presencia de eventos adversos severos (Huang *et al*, 2014, Jennings *et al*, 2013).

Aún se desconoce el cómo este cambio aminoacídico genera tales repercusiones, pero una teoría es que esta variante sea un factor de desequilibrio con otros polimorfismos en otros genes o en el mismo gen, los cuales podrían regularlo de alguna manera, aunque esto aún no está dilucidado (Huang *et al*, 2014). Por otro lado, existen estudios como los de Meulendijk *et al* 2016 y Wang *et al* 2014 en el cual no encuentran una clara correlación entre este SNP con alguna variable como OS-5y-, DFS, tasa de respuesta, toxicidad y tampoco destacan su utilidad como marcador de predicción ante la respuesta con 5-FU (Meulendijk *et al*, 2016, Wang *et al*, 2014).

### **1.5.2 Variante rs12280056 del gen *TYMS***

La variante rs12280056, del gen que codifica *TYMS*, contiene una inserción/delección de 6 pares de bases (6bp+/6bp-) en la región 3' no traducida del gen (3'UTR). El alelo 6bp+ se ha asociado a una mayor estabilidad y expresión del ARNm de TS comparado con los otros alelos (Ruzzo *et al*, 2008). Existen 3 estudios que hablan del rs12280056 en pacientes con CCR y con terapiabasada en 5-FU, dentro de estos Ruzzo *et al* 2008, encontró que el genotipo 6bp+/6bp+ está asociado a un menor DFS si es que el paciente tiene la variante rs861529 perteneciente al gen *XRCC3* (proteína 3 de complemento cruzado de reparación de rayos X) (c. 21071 C > T, T241M) presente. Contradictoriamente en el siguiente estudio de Alzaf *et al* 2011, se encuentra que los genotipos 6bp-/6bp+ y 6bp/6bp- presentan una menor expresión de TS, una peor DFS y no encuentran una asociación con el genotipo 6bp+/6bp+ (Afzal *et al*, 2011). Finalmente, en un estudio de Ulrich *et al* 2014, no se encontró ninguna asociación estadística con el rs12280056 en relación con la eficacia o la toxicidad en un tratamiento basado en 5-FU (Ulrich *et al*, 2014).

Con respecto al potencial predictivo de estas variantes es necesario aclarar que en varios trabajos se ha determinado que tienen un posible potencial predictivo, como es el caso del rs11479, en el cual un estudio de Jennings *et al* 2013, determinó que es posible predecir eventos adversos en terapias tempranas analizando esta variante en conjunto con otras del gen *DPYD* (Jennings *et al*, 2013). Apoyando lo anterior, el estudio de Boige *et al* 2010, determinó que la variante rs45445694 del gen *TYMS* puede ser usada para predecir una mayor o menor DFS en

los pacientes (Boige *et al*, 2010) y, por otra parte, Afzal *et al* 2011, concluyó que esta variante en conjunto con el rs12290056 pueden ser marcadores predictivos y de pronóstico en la efectividad de una terapia basada en 5-FU en CCR (Afzal *et al*, 2011). Finalmente, con respecto al rs12280056 Ruzzo *et al* 2008, asoció este polimorfismo al DFS y OS-5y- de los pacientes con CCR, pero no concluyó que fuese por sí sola un marcador predictivo para estos parámetros (Ruzzo *et al*, 2008); de forma similar se observa esto en otros estudios con los polimorfismos descritos anteriormente (Huang *et al*, 2014, Meulendijks *et al*, 2017, Páez *et al*, 2010, Ulrich *et al*, 2014). Estos resultados controversiales indican la necesidad de esclarecer si estos polimorfismos pueden tener una utilidad en la predicción de la efectividad de la terapia de 5- FU en pacientes con CCR y, por sobre todo, determinar como en la población chilena afectan dichos polimorfismos, ya que, hasta la fecha, se desconoce la frecuencia alélica y su importancia clínica, por lo que es necesario realizar un análisis poblacional para determinar la frecuencia y efectos que tienen estas variantes en nuestra población.

En base a estos antecedentes, se puede establecer que, el análisis de las variantes genéticas de las enzimas encargadas en la metabolización de 5-FU para el tratamiento en CCR, es relevante para, a futuro, generar un tratamiento más personalizado, logrando mejorar la precisión de las terapias de cada paciente, determinando como el tumor de cada persona puede responder a la terapia con 5-FU.

Considerando los antecedentes presentados, es que el presente trabajo de tesis postuló la siguiente hipótesis:

## **2 Hipótesis**

*“Variantes genéticas presentes en TYMS y TYMP se asocian con una disminución en la tasa de supervivencia a 2 años en pacientes con cáncer colorrectal en etapa IV con tratamiento basado en 5-FU”*

Para abordar la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Estudiar, en pacientes con cáncer colorrectal en etapa IV, la asociación entre la presencia de las variantes genéticas de *TYMP* y de *TYMS*, y la tasa de supervivencia a 2 años en pacientes con tratamiento basado en 5-FU.

#### **3.2 Objetivos específicos**

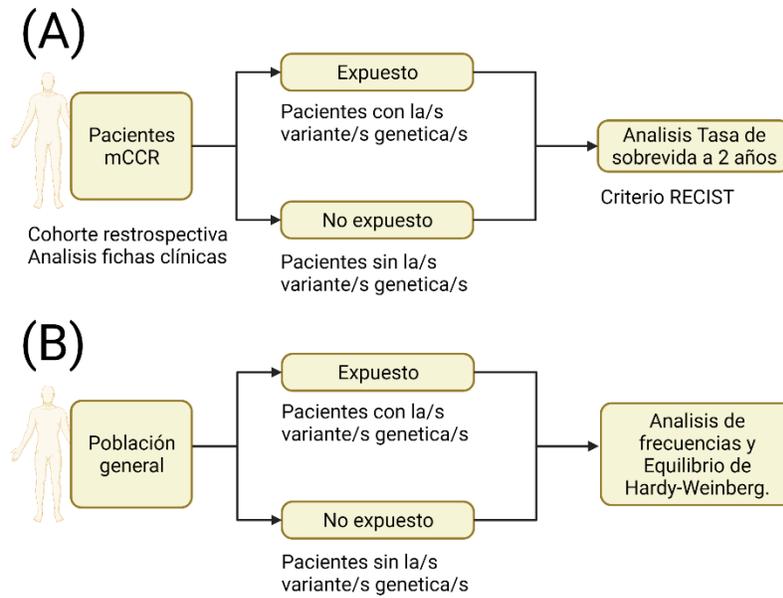
- 1) Determinar las frecuencias de las variantes genéticas de *TYMP* (rs11479) y de *TYMS* (rs12280056) en pacientes con cáncer colorrectal etapa IV y población general.
- 2) Establecer la asociación entre las variantes genéticas y las variables clínicas con la tasa de supervivencia global a dos años en pacientes con cáncer colorrectal etapa IV.

### **4 Materiales y Métodos**

#### **4.1 Selección de individuos y muestras de estudios**

##### **4.1.1 Tipo de estudio**

Se realizó un estudio de tipo observacional utilizando una cohorte retrospectiva. Se consideraron como expuestos y no expuestos a aquellos pacientes con la(s) variante(s) genética(s) y a los pacientes sin la(s) variante(s) genética(s), respectivamente. Se incluyeron pacientes con cáncer colorrectal etapa IV tratados con alguno de los esquemas que contiene 5-fluorouracilo (FOLFOX/FOLFIRI/CAPEOX) pertenecientes al Biobanco de Fluidos y Tejidos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (BTUCH) y al Instituto Nacional del Cáncer (INC) de los cuales se determinó la OS a 2 años (OS-2y-) a cada uno según el criterio RECIST, el cual se basa en la evaluación a la respuesta en tumores sólidos utilizado para determinar la eficacia de los tratamientos en los pacientes con cáncer con tumores sólidos.. Además de esto se realizó un análisis en población general de las variantes genéticas de este estudio en población general para analizar su frecuencia poblacional (**Figura 10**).



**Figura 10:** Flujograma de diseño de estudio. (A) flujograma de estudio de pacientes en cáncer colorrectal (B) flujograma de estudio en población general.

#### 4.1.2 Cálculo del tamaño muestral

Para el cálculo de tamaño muestral se realizó la aproximación basada en el estudio de Stoehlmacher *et al* 2004, en donde se analizó el factor predictivo de algunos polimorfismos en genes, dentro de los cuales se encuentra el gen *TYMS*, en pacientes con cáncer colorrectal metastásico con tratamiento FOLFOX (Stoehlmacher *et al*, 2004). Para esto se consideró un *Hazard Ratio* (HR) de 2,14 obtenido en dicho estudio para el genotipo 6bp-/6bp- del rs12280056 de *TYMS*, el cual tiene una frecuencia mundial de 0,49, un intervalo de confianza del 95%, un error  $\alpha$  de 0,05, un poder estadístico del 80%. El cálculo fue realizado a través de la página Sample-Size.net ([www.sample-size.net](http://www.sample-size.net)) basados en la fórmula Schoenfeld arrojando un tamaño muestral de **61 pacientes, en donde 30 corresponden al grupo expuesto y 31 al grupo no expuesto.**

### **4.1.3 Criterios de Selección de sujetos en estudio**

#### **Criterios de inclusión**

- Pacientes mayores de 18 años diagnosticados con cáncer colorrectal metastásico (mCCR)
- Que cuenten con identificación del hospital de cirugía o centro donde se hizo el diagnóstico
- Tratados con quimioterapia 5-fluorouracilo/Capecitabina, leucovorina y oxaliplatino (FOLFOX/CapeOX).

#### **Criterios de exclusión**

- Pacientes con mCCR de histología diferente a adenocarcinoma
- Presencia de patologías del sistema inmune previo al diagnóstico de mCCR
- Ausencia de biopsia disponible en el hospital de cirugía o centro donde se hizo el diagnóstico.
- Pacientes incluidos en estudio clínico intervencional como parte del tratamiento de mCCR

### **4.1.4 Consideraciones éticas**

El presente proyecto fue aprobado por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Norte (SSMN), cumpliendo con las normas sugeridas en la Declaración de Helsinki (Helsinki 1964) y considerando el uso de las Buenas Prácticas Clínicas (BPC). Los procedimientos realizados en este estudio se realizaron contemplando las leyes nacionales N°20.120 (sobre la investigación científica en el ser humano, su genoma prohíbe la clonación humana), N° 19.628 (sobre la protección de la vida privada) y N° 20.584 (Regula los derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención de salud). Como la recolección de muestras y datos fue bajo protocolos del BTUCH, se aseguró el correcto resguardo de muestras biológicas y datos clínicos de los pacientes. Por otra parte, debido a la alta tasa de mortalidad que presenta el cáncer estudiado y las complicaciones que puede causar el contactarse con los familiares, el SSMN aprobó que las muestras y datos clínicos fueran obtenidos bajo una dispensa al consentimiento informado (ANEXO I).

## **4.2 Etapas experimentales y metodología**

### **4.2.1 Extracción de ADN tumoral y/o germinal desde biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina**

Previo a la realización de esta tesis las muestras de tejido tumoral fueron recolectadas previamente de los servicios de anatomía patológica respectivos, de los cuales se procedió a enviar a revisión dichos cortes histológicos con tinción de eosina y hematoxilina al médico anatomopatólogo del BTUCH para confirmar nuevamente el diagnóstico, demarcar las zonas tumorales y no tumorales, indicar el porcentaje de células y la infiltración linfocitaria.

Para la extracción de ADN del tejido tumoral se realizaron cortes histológicos de los tejidos recolectados basándose en el criterio anatomopatológico previo. Si las zonas tumorales superaban el 80% del tejido inicial se realizaban dos cortes de 10  $\mu\text{m}$  los cuales fueron depositados en tubos Eppendorf estéril de 2,0 mL. Si las zonas tumorales eran menores al 80% del tejido inicial se realizaban entre 6 a 8 cortes (dependiendo del tamaño de la zona) de 10  $\mu\text{m}$  depositados en portaobjetos para realizar la microdissección de la zona de interés y depositarla en un tubo Eppendorf estéril de 2,0 mL. Si la muestra provenía de colonoscopia, se realizaban 8 cortes de 10  $\mu\text{m}$  y se depositaron 2 cortes en tubos Eppendorf estériles de 2,0 ml. Dichos criterios fueron estandarizados en el ANEXO II.

Una vez obtenida las muestras se procede a realizar la extracción de ADN mediante el uso del kit *AllPrep DNA/RNA FFPE Kit* (Qiagen) según las recomendaciones del fabricante.

### **4.2.2 Extracción de ADN germinal a partir de *Buffy coat***

Para la extracción de ADN en población general, se reclutaron voluntarios en el laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) de la Universidad de Chile (ANEXO III). De dichos pacientes se obtuvo una muestra de 5 mL aproximadamente de sangre la cual fue inmediatamente centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos para separar el *Buffy coat* del plasma y los eritrocitos en un tubo Eppendorf estéril de 2,0 mL. Del *buffy coat* obtenido se realizó la extracción de ADN mediante el uso del kit E.Z.N.A.®Blood DNA Mini Kit, Omega Bio-Tek siguiendo las indicaciones del proveedor. Dicho ADN fue almacenado a -80°C hasta su utilización en la genotipificación.

### 4.2.3 Cuantificación y controles de calidad del ADN

El ADN germinal y tumoral fue cuantificado mediante espectrofotometría con el equipo Denovix DS-11 (*nanodrop*), el cual mide la concentración de ADN, RNA, proteínas o compuestos inorgánicos mediante el análisis de absorbancia de dichas moléculas ante un rango de longitudes de onda diferentes. Para controlar que nuestras muestras de ADN fueran lo más puras posibles se realizó una medición de las longitudes de onda 230, 260 y 280 en cada muestra para realizar las proporciones 260/280 y 260/230 nm, las cuales permiten determinar si la muestra no presenta contaminantes con fenoles ácidos, guanidina o proteínas. Una muestra ideal de ADN y utilizada en la determinación de las variantes genéticas tendrá una relación 260/280 entre 1,8 a 2,0 y una relación 260/230 entre 1,9 y 2,2.

### 4.2.4 Análisis de variabilidad genética en ADN genómico o tumoral

La determinación de las variantes se realizó mediante PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*® a una concentración de 20 ng/μL. Se utilizó el programa PCR recomendado por el fabricante con las sondas descritas en la **Tabla 1**. Las determinaciones se realizaron en el equipo Biorad®. De manera paralela se genotipificaron las variantes en tejido tumoral para analizar si existen cambios significativos en la presencia de dichas variantes en células tumorales y no tumorales. (ANEXO IV).

**Tabla 1:** Descripción sondas *TaqMan*® utilizadas

Gen	SNP	ID	Secuencia de contexto sonda <i>TaqMan</i> ®
<i>TYMP</i>	c.1412C>T S471L	rs11479	CGGCAGAACGAGCTCTGCGAAGGGC[A/G]AGGGGGCG GCGAATGGCGCGCGGTC
<i>TYMS</i>	<i>TYMS</i> 3'UTR 6bp <i>ins-del</i>	rs1220086	ATGTAGAGTGTGGTTATGAACT[TTAAAG/~]TTATAGTT GTTTTATATGTTGCT

*TYMP*: Gen timidina fosforilasa, *TYMS*: Gen timidilato sintasa.

#### **4.2.5 Análisis de variables genéticas en población general**

Se realizó un estudio de genotipificación de las variantes genéticas previamente mencionadas en población general. El ADN del grupo de estudio fue extraído a partir de *buffy coat* y analizada según los criterios de cuantificación y control de calidad previamente establecidos en el punto 4.2.3. Del mismo modo se realizó el PCR en tiempo real usando las sondas previamente establecidas en la tabla 1. Con esto podemos determinar la frecuencia de estas variantes en población general chilena y asociar si estos alelos cumplen con el equilibrio de *Hardy-Weinberg* (HWE).

#### **4.2.6 Recolección de datos clínicos**

Se realizó la revisión de las fichas clínicas de los pacientes seleccionados y se recopilaron datos que incluyen: sexo, edad, fecha del diagnóstico, fecha de fallecimiento, fecha de tratamiento quimioterapéutico de primera línea y esquema utilizado, fecha de tratamiento quimioterapéutico de segunda línea y el esquema utilizado, diagnóstico del médico anatomopatólogo, TNM, diagnóstico oncología médica, cáncer secundario, grado del tumor, comorbilidades asociadas, entre otros. Todos estos datos clínicos se recopilaron en un *case report formulary* (CRF) adecuado al estudio (ANEXO V).

#### **4.2.7 Análisis estadísticos**

Para caracterizar a cada uno de los grupos de estudio se realizaron análisis de estadística descriptiva utilizando las medidas de tendencia central promedio, mediana y desviación estándar. Los análisis estadísticos de asociación de la eficacia se realizaron mediante curvas de *Kaplan-Meier*. Para determinar las diferencias significativas entre las curvas se utilizó el *test* de log-rank. Posterior a eso, se analizó la implicancia de cada variante genética y su asociación con la OS a 2 años. Este análisis se realizó mediante el análisis de regresión de Cox, en donde se determinaron los datos de *Hazard Ratio* (HR) de cada una de las variables. Las variantes genéticas se analizaron mediante modelos de herencia codominante, recesiva y dominante. Estos análisis se realizaron de manera univariada y se determinó que aquellos con un *p-value* menor a 0,05 son significativos.

Las variables que presentaron un *p-value* menor a 0,2 fueron consideradas para el análisis multivariado (Dupont *et al*, 2009). Se realizaron análisis de regresión de Cox multivariado mediante el método “*step-by-step*” y se consideró como mejor modelo aquel que presente un mejor *p-value*. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico *Survival en el Stata/SE 11.1*, Considerando para todos ellos un poder estadístico de 80% y una significancia del 95%.

## 5 Resultados

### 5.1 Caracterización clínica de los pacientes mCCR

De un total de 63 pacientes incluidos en el estudio, 49,2% corresponde a hombres y 50,8% a mujeres. Dichos pacientes al momento de ser diagnosticados con cáncer colorrectal metastásico tenían una edad promedio de  $63 \pm 12,2$  años. La localización tumoral más frecuente en este grupo de estudio fue el lado izquierdo con un 50,8% seguido por el derecho con un 24,6% y finalmente recto con un 21,5%, en esta variable también hay un porcentaje de datos no disponibles (ND) con un 3,1% en este apartado. El acrónimo ND corresponde a la ausencia de datos en la ficha clínica entregada (**Tabla 2**).

Los esquemas quimioterapéuticos más frecuentes en los pacientes fueron CapeOX (capecitabina con oxaliplatino) y el esquema FOLFOX, ambos con un 41,5%. Las terapias menos frecuentes fueron: FOLFOX con terapia biológica, FOLFIRI sin terapia biológica y FOLFIRI con terapia biológica. Con respecto a la quimioterapia de segunda línea un 63,1% de los pacientes inició un tratamiento de segunda línea basado en 5-FU (**Tabla2**).

Con respecto a la clasificación histopatológica el 78,8% de los pacientes presentaron histología del tipo adenocarcinoma, 7,7% adenocarcinoma mucinoso, 6,2%, adenocarcinoma tubulopapilar, 3,1% adenocarcinoma con células en forma de anillo de sello, 3,1% adenocarcinoma tubular-mucinoso y sólo 1 paciente presentó una histología de adenocarcinoma cribiforme. El grado de diferenciación tumoral del grupo de estudio presenta un 16,9% de tumores bien diferenciados, un 63,1% de tumores moderadamente diferenciados y un 7,7% de tumores poco diferenciados (12,3% ND) (**Tabla 3**).

En cuanto a la clasificación TNM de los pacientes: el tamaño tumoral (T) más frecuente fue

T3 con un 53,8%, seguido del T4 con un 15,4%, en donde específicamente la clasificación T4a estaba presente en un 10,8% y T4b en un 4,6% (23,1% ND) (**Tabla 3**).

En lo que respecta a los nódulos linfáticos invadidos (N), debido al bajo número de pacientes y a la gran variedad de clasificaciones de este estadio (N0, N1a, N1b, N1c, N2a y N2c) fue necesario agrupar las clasificaciones en estadios N0, N1 y N2 con el fin de tener un mayor poder estadístico para análisis posteriores. Por lo que después de agrupar bajo dicho criterio se determinó que la clasificación N1 era la más frecuente con un 33,8%, seguido de N2 con un 27,7 y finalmente N0 con un 18,5% (20% ND). Finalmente, en lo que respecta a la metástasis todos los pacientes presentaban por lo menos 1 sector metastásico, pero debido a las inespecificidades de los datos clínicos no se pudo determinar una etapa específica para el apartado M. A pesar de esto, dentro de los principales sitios de metástasis indicados en las fichas de los pacientes, la metástasis hepática fue la más frecuente con un 70,8%, seguida de la metástasis depulmón con un 46,2% y un 41,1% de pacientes presentan otro tipo de metástasis, dentro de las cuales se incluyen metástasis en hueso, cerebro, ovarios, entre otros. Un 50% de los pacientes con metástasis hepática presentaron otro foco metastásico, principalmente en pulmón (**Tabla 3**).

**Tabla 2.** Características generales de los pacientes mCCR del estudio.

<b>CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES</b>	
<b>Sexo</b>	<b>Porcentaje (n)</b>
Hombre	49,2% (31)
Mujer	50,8% (32)
<b>Edad Diagnóstico</b>	
Promedio $\pm$ D.E.	63 $\pm$ 12.4
Mediana	66
<b>Localización de tumor primario</b>	<b>Porcentaje (n)</b>
Derecho	23,8% (15)
Izquierdo	50,8% (32)
Recto	22,2% (14)
ND	3,2% (2)
<b>Quimioterapia 1° Línea</b>	<b>Porcentaje (n)</b>
CapeOX	42,9% (27)
FOLFOX	42,9% (27)
FOLFOX+ terapia biológica	6,3% (4)
FOLFIRI	3,2% (2)
FOLFIRI +Terapia biológica	4,8% (3)
<b>Quimioterapia 2° Línea</b>	<b>Porcentaje (n)</b>

Con QMT 2° Línea	65,1% (41)
Sin QMT 2° Línea	34,9% (22)

*CapeOX: Capecitabina + oxaliplatino, FOLFOX: 5-FU, LV, oxaliplatino, FOLFIRI: 5-FU, LV, irinotecan. QTM: quimioterapia.*

**Tabla 3.** Características generales de las muestras de tumor primario obtenidas de pacientesmCCR.

Tipo de muestra		Clasificación TNM	
Tipo Histológico	Porcentaje (n)	T	Porcentaje (n)
Adenocarcinoma	79,4% (50)	T2	7,9% (5)
		T3	54% (34)
Adenocarcinoma tubulopapilar	4,8% (3)	T4a	11,1% (7)
Adenocarcinoma mucinoso	7,9% (5)	T4b	3,2% (2)
Adenocarcinoma tubular y mucinoso	3,2% (2)	ND	23,8% (15)
Adenocarcinoma con células en anillo de sello	3,2% (2)	N	Porcentaje (n)
Adenocarcinoma cribiforme	1,6% (1)	N0	17,5% (11)
<b>Grado de diferenciación</b>	<b>Porcentaje (n)</b>	N1	34,9% (22)
Bien diferenciado	15,9% (10)	N2	27,0% (17)
Moderado	63,5% (40)	ND	20,6% (13)
Poco diferenciado	7,9% (5)		
ND	12,7% (8)		
Tipo de Metástasis			
Metástasis Hepática	Porcentaje (n)	Otras Metástasis	Porcentaje (n)
Presente	73% (46)	Presente	42,9% (27)
Ausente	27% (17)	Ausente	57,1% (36)
Metástasis Pulmonar	Porcentaje (n)	Más de un foco metastásico en distintos órganos	Porcentaje (n)
Presente	46% (29)	Metástasis Hepática más otro foco MTT	42,9% (27)
Ausente	54% (34)		

*ND: No datos disponibles; MTT: metástasis, TNM: Tamaño tumoral (T), nódulos linfáticos invadidos (N), metástasis (M).*

## 5.2 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante de *TYMP* y *TYMS* en pacientes con mCCR y en población general

La determinación de las variantes genéticas de *TYMP* y *TYMS* se realizaron mediante PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*® (ANEXO IV). Las frecuencias genotípicas y alélicas determinada en el estudio se observan en las tablas 4 y 5 respectivamente. Estas variantes fueron obtenidas a partir de *buffy coat* de población general (PG) y a nivel tumoral en pacientes con mCCR, con previa estandarización para determinar si dichas variantes no son alteradas por mutaciones tumorales. Se observó que la variante rs11479 posee la misma frecuencia en tanto los grupos de población general como mCCR. Con respecto al rs11280056 no se logró caracterizar a ningún paciente con el genotipo 6bp+/6bp+. Según la base de datos de *Ensembl* la frecuencia del alelo 6bp+ en el mundo es de 0,51 y dependiendo de cada región de este varían dichas frecuencias, lo que si es necesario destacar es que tanto las frecuencias alelas como genotípicas son estadísticamente diferentes entre ellas ( $p < 0,001$ ) siendo la presencia del alelo de 6bp+ la más notable entre los 2 alelos (**Tabla 4 y 5**).

**Tabla 4.** Frecuencias genotípicas de los rs11479 y rs12280056 en población general (PG) y pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCCR).

rs y genotipos		rs y genotipos	
rs11479 (PG)	<b>Porcentaje (n)</b>	rs11479 (mCCR)	<b>Porcentaje (n)</b>
CC	83% (69)	CC	69,8% (44)
CT	12% (10)	CT	12,7% (8)
TT	5% (4)	TT	3,2% (2)
rs12280056 (PG)	<b>Porcentaje (n)</b>	ND	14,3% (9)
6bp+/6bp+	0	rs12280056 (mCCR)	<b>Porcentaje (n)</b>
6bp+/6bp-	95% (79)	6bp+/6bp+	0
		6bp+/6bp-	50,8% (32)

PG: Población general, mCCR: cáncer colorrectal metastásico, ND: No datos disponibles.

**Tabla 5.** Frecuencias alélicas de diferentes poblaciones obtenidas de la base de datos pública *Ensembl* y nuestros grupos de estudio resaltados en verde (Población general (PG), y pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCCR) junto con un análisis comparativo usando test Chi cuadrado de las poblaciones PG y mCCR con respecto al rs12280056.

Población	rs11479		rs12280056	
	C	T	6bp+	6bp-
PG	0,89	0,11	0,480	0,52
mCCR	0,89	0,11	0,25	0,75
Amerindia	0,83	0,17	0,680	0,32
Africana	0,97	0,03	0,43	0,57
Caucásica	0,93	0,07	0,67	0,33
Asiática	0,71	0,29	0,31	0,69
Sudeste asiático	0,81	0,19	0,53	0,47

p = 0,00073

mCCR: Cáncer colorrectal metastásico.; PG: Población general.

### 5.3 Análisis del equilibrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) en las variantes genéticas en población general

Para determinar si nuestras variantes genéticas están siendo alteradas por cambios externos como selección natural, deriva genética, la cual es definido como la pérdida de alelos por azar y no por selección natural (Masel *et al*, 2011), *hitchhiking* o secuestro genético, el proceso en el cual un alelo sin ventaja evolutiva aumenta su frecuencia debido a que está asociado o es cercano a un alelo que presenta una selección natural (Barton *et al*, 2000), el flujo genético, el cual es el movimiento de alelos entre poblaciones debido a procesos de dispersión como la inmigración (Petit *et al*, 2009), y otros factores más asociados a la evolución se decidió realizar una genotipificación de población general con el fin de definir si nuestras variantes están siendo afectadas y de qué forma asociándolas a un contexto funcional. Por lo cual se realizó una prueba Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) en los genotipos obtenidos de nuestra población para determinar si se cumple con dicho equilibrio y no está siendo afectado por factores evolutivos (**Tabla 6**).

Ninguno de los genotipos asociados cumplió con el HWE en nuestra población general.

**Tabla 6.** Determinación del HWE en población general de los rs11479 y rs12280056.

Genotipo	PG	Esperados	$\chi^2$	$\chi^2$ tabulado	HWE
<b>rs11479</b>					
CC	69	66	11,789	3,841	No cumple
CT	10	16			
TT	4	1			
<b>rs12280056</b>					
6bp+/6bp+	0	19	68,437	3,841	No cumple
6bp+/6bp-	79	41			
6bp-/6bp-	4	23			

$\chi^2$ : Chi-Cuadrado.; HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg. PG: Población general.

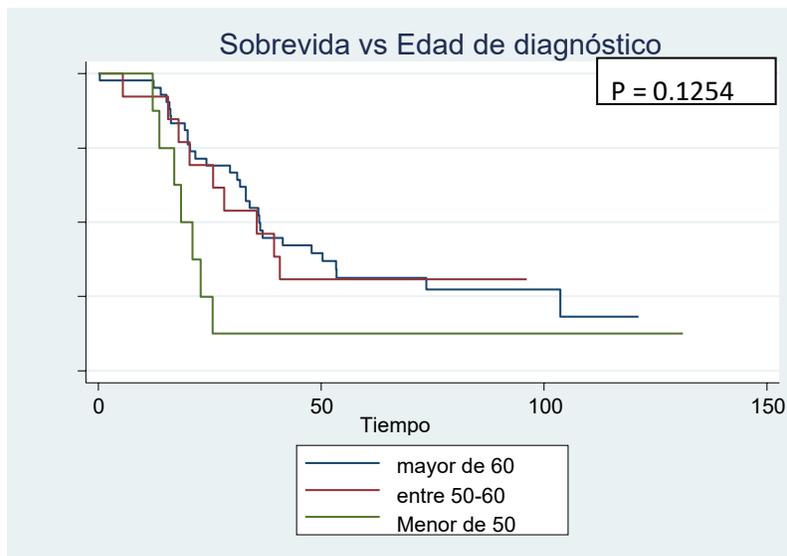
#### 5.4 Análisis estadístico univariado asociado entre variables genéticas y no genéticas con la sobrevida de pacientes con mCCR

##### 5.4.1 Variables no genéticas

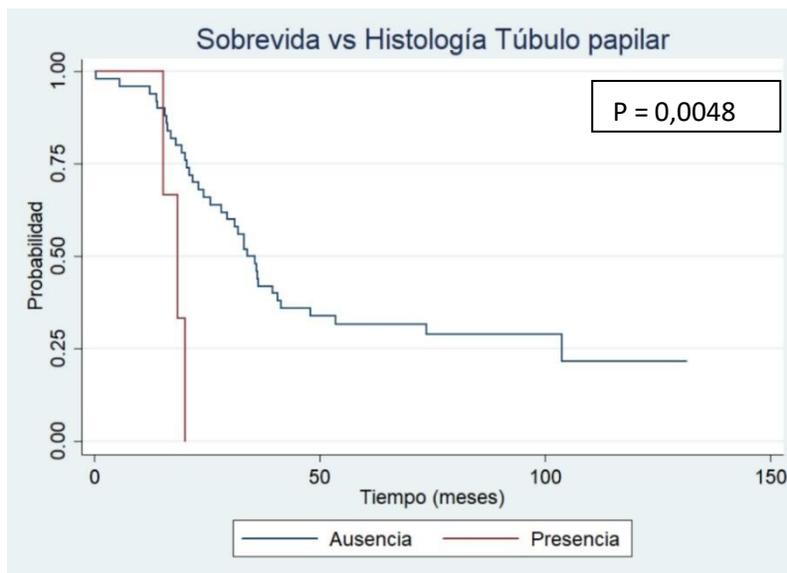
Se compararon de manera univariada las variables no genéticas obtenidas de las fichas clínicas. El sexo no presentó una asociación con la OS-2y- ( $p < 0,05$ ). De la misma manera, otras variables clínicas como la localización del tumor primario, etapas T, N, grado de diferenciación, histología del tumor primario, metástasis pulmonar y tratamiento con CapeOx no lograron asociarse a la OS-2y- de forma independiente ( $p < 0,05$ ) (**Tabla 7**, ANEXO VI).

Entre las variables demográficas evaluadas, la edad de diagnóstico fue una variable la cual presentaba una tendencia a la significancia ( $p < 0,2$ ). Esta variable fue categorizada en 3 grupos para encontrar una mayor correlación estadística con la OS-2y-, estos 3 grupos fueron pacientes menores a 50 años (<50 años), entre 50 y 60 años (50-60 años) y mayores de 60 años (>60 años). La categorización de estos grupos en un análisis de regresión de Cox concluyó que pacientes menores a 50 años presentaban un riesgo mayor de fallecer que el resto de los grupos (HR= 2,33, intervalo de confianza de 95% (IC95) = 1 – 5,41) (**Figura 11**).

Con respecto a los diferentes tipos de histologías analizadas se pudo observar que individualmente solo la histología túbulopapilar está asociada a la OS-2y- en pacientes con mCCR (Figura 12) con un 5,2 veces más el riesgo que pacientes con histología de adenocarcinoma tubular (HR = 5,3, IC95 =1,44 – 18,48).

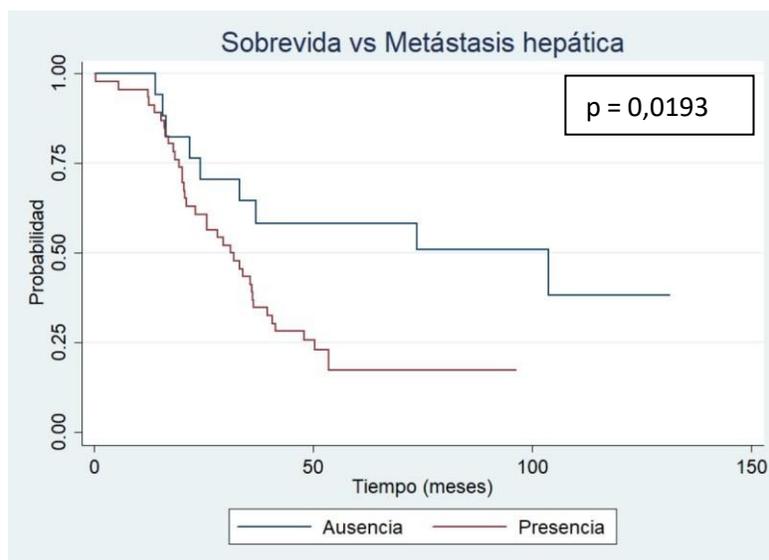


**Figura 11.** Curva *Kaplan-Meier* según la edad de pacientes con mCCR.



**Figura 12.** Curva *Kaplan-Meier* según la presencia de histología túbulo papilar de pacientes con mCCR.

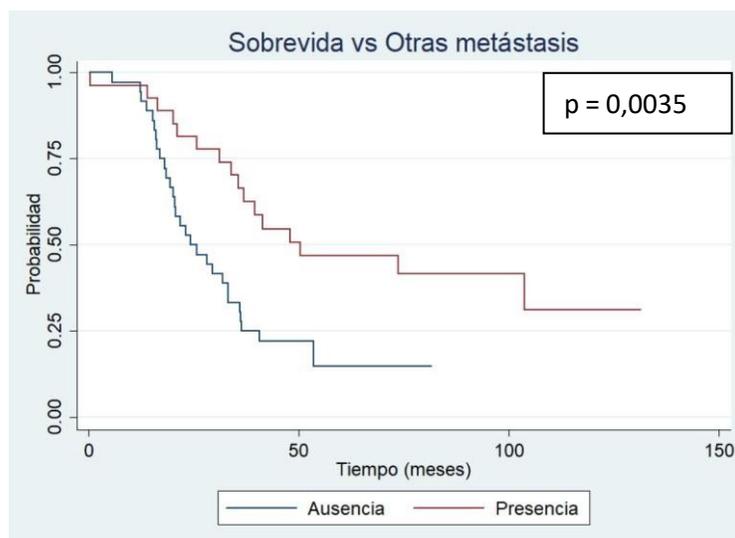
Con relación a la metástasis hepática se observó que la presencia de este factor afecta de manera significativa la OS-2y- de los pacientes con mCCR (**Figura 13**). Dichos pacientes, mediante un análisis de regresión de Cox, tienen un HR = 2,46 con un IC95 =1,13 - 5,34 en comparación con pacientes sin metástasis hepática.



**Figura 13.** Curva *Kaplan-Meier* para metástasis hepática en pacientes con mCCR.

Con respecto a la presencia de otras metástasis se encontró una asociación estadística significativa entre la presencia de otra metástasis y la OS-2y-, mostrándose como un factor protector con un HR = 0,40 con un IC95 = 0,21 – 0,76) (**Figura 14, Tabla 7**). Frente a dicho análisis contradictorio se decidió hacer un análisis más exhaustivo para determinar si algún otro factor estaba alterando los resultados de esta asociación, por lo cual se analizaron los grupos con o sin otras metástasis. De estos análisis se encontró que pacientes sin la presencia de otras metástasis presentaban en un 89% de su grupo pacientes con metástasis hepática, en cambio los pacientes con otras metástasis presentaban solo un 51% de individuos con metástasis hepática. Debido a esta diferencia se pudo inferir que la proporción de pacientes con presencia de metástasis hepática pudo alterar nuestros resultados ya que estos son un factor que influye en la sobrevida de los pacientes. Por esta razón se volvió a realizar dicho análisis, pero esta vez en pacientes que no tuvieran metástasis hepática. Se observó una tendencia a la significancia (p-value = 0,1407), dentro de la cual la presencia de otras metástasis es un factor protector frente a pacientes con solo metástasis hepática, con un HR =0,39 y un IC95 = 0,11 – 1,42. Por último, es necesario aclarar que en el apartado “otras metástasis” se encuentra una

gran variedad de otros tipos de metástasis, siendo la ósea la más común con 2 pacientes de un total de 28, presentando este tipo de metástasis, del resto existe un apartado para cada uno, por lo que los datos pueden no ser 100% confiables debido a una alta heterogeneidad de tipos de metástasis (ANEXO VI).

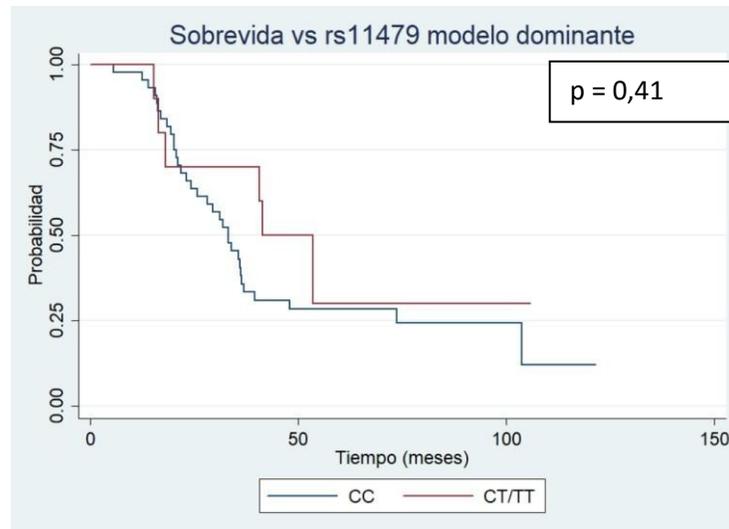


**Figura 14.** Curva *Kaplan-Meier* para la presencia de otras metástasis en pacientes con mCCR.

#### 5.4.2 Variantes genéticas:

Se compararon de manera univariada las variantes genéticas de *TYMP* y *TYMS* mediante el uso de 3 modelos de herencia: dominante, recesivo y codominante. En cada uno de estos análisis se determinó su asociación a la supervivencia en curvas *Kaplan-Meier*.

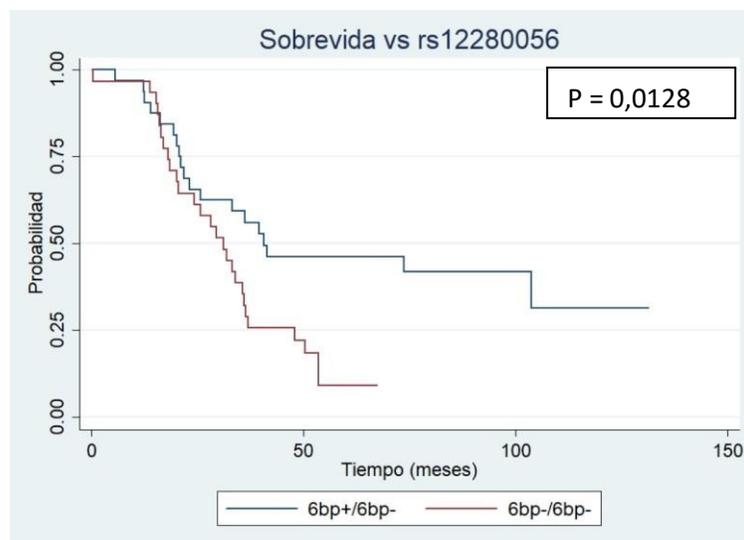
En relación con la variante *TYMP* c.481 C>T (rs11479), se presentaron los 3 genotipos esperados (CC, CT y TT), por lo cual se logró analizar usando los 3 modelos de herencia anteriormente mencionados para determinar su asociación a la OS-2y-. El modelo de herencia dominante fue el que mejor se ajustó a la variante, a pesar de eso no logró llegar a la significancia estadística ( $p = 0,41$ ) (**Figura 15**).



**Figura 15.** Curvas *Kaplan-Meier* asociadas a los genotipos de la variante *TYMP* c.481 C>T (rs11479) en pacientes con mCCR.

En relación con la variante 3'UTR del gen *TYMS* (rs12280056) no se encontraron genotipos 6bp+/6bp+ en el grupo de estudio, por lo que se compararon solo los genotipos 6bp+/bp- y 6bp-/6bp- con la OS-2y-. Se observó una asociación negativa al genotipo 6bp-/6bp- a la OS-2y- con respecto a los pacientes heterocigotos ( $p = 0,0128$ ) (**Figura 16**), aumentando en 2,14 veces el riesgo de fallecer que los pacientes con el genotipo 6bp+/6bp- (HR = 2,14, IC95=1,16 – 3,96) (**Tablas 7 y 8**).

Todas las regresiones de Cox univariadas analizadas cuyo *p-value* del modelo es menor a 0,2 se pueden ver en la **Tabla 7**. Todas las otras regresiones de variables con *p-value* un mayor a 0,2 están en ANEXO VIII.



**Figura 16.** Curvas *Kaplan-Meier* asociadas a los genotipos de la variante 3'UTR del gen *TYMS* (rs12280056) en pacientes con mCCR.

**Tabla 7:** Análisis univariado por regresión de Cox de variables clínicas.

Variable	HR	IC 95%	<i>p-value</i>	<i>p-value del modelo</i>
<b>Edad</b>				
Mayor a 60 años	1	-	ref	0,1927
50-60 años	1,08	0,51 - 2,28	0,84	
Menor a 50 años	2,33	1,02 - 5,42	<b>0,05</b>	
<b>Metástasis Hepática</b>				
Ausencia	1	-	ref	<b>0,0136</b>
Presencia	2,45	1,12 - 5,34	<b>0,023</b>	
<b>Otras metástasis</b>				
Ausencia	1	-	Ref	<b>0,0035</b>
Presencia	0,40	0,21 - 0,76	<b>0,005</b>	
<b>Histología túbulopapilar</b>				
Ausencia	1	-	Ref	<b>0,033</b>
Presencia	5,16	1,44 - 18,48	<b>0,012</b>	

*HR = Hazard Ratio; IC 95% = Intervalo de Confianza; Ref = Referencia para análisis estadístico; en negrita se destacan las variables con  $p\text{-value} < 0,05$*

**Tabla 8:** Análisis univariado por regresión de Cox de variables Genéticas.

Variable	HR	<i>p-value</i>	IC 95%	<i>p-value del modelo</i>
<b>TYMS 3'UTR 6bp+/6bp- (rs12280056)</b>				
6bp+/6bp-	1	Ref	--	<b>0,013</b>
6bp-/6bp-	2,14	<b>0,015</b>	1,16 – 3,96	
<b>TYMP c.1412C&gt;T (rs11479) Modelo codominante</b>				
CC	1	Ref	--	0,6416
CT	0,76	0,54	0,32 - 1,88	
TT	0,5	0,5	0,07 - 3,78	
<b>TYMP c.1412C&gt;T (rs11479) Modelo Dominante</b>				
CC/CT	1	Ref	--	0,3931
TT	0,71	0,41	0,31- 1,61	
<b>TYMP c.1412C&gt;T (rs11479) Modelo recesivo</b>				
CC/CT	1	Ref	--	0,4862
TT	0,52	0,53	0,07 – 3,94	

HR = Hazzard Ratio; IC 95% = Intervalo de Confianza; Ref = Referencia para análisis estadístico; en negrita se destacan las variables con *p-value* < 0,05

### 5.5 Análisis multivariado de variantes genéticas y variables no genéticas en un modelo de regresión de Cox multivariado

Una vez realizado los análisis independientes de cada variable y su asociación a la OS-2y- en este grupo de estudio, se analizaron en conjunto las variables cuyo *p-value* fue menor a 0,2, exceptuando la variable de otras metástasis. Dentro de estos modelos se decidió realizar dos modelos: el primero solo con variables clínicas (**Tabla 9**), y el segundo con variantes genéticas y clínicas (**Tabla 10**).

**Tabla 9:** Análisis de regresión de Cox multivariado para variables clínicas.

Variable	HR	<i>p-value</i>	IC 95%	<i>p-value modelo</i>
<50 años	2,52	0,055	1,07 – 5,94	<b>0,0073</b>
Metástasis Hepática	2,46	<b>0,018</b>	1,16 – 5,20	n= 53, eventos = 39
Histología túbulopapilar	3,41	0,069	0,91 – 12,81	

HR = Hazzard Ratio; IC 95% = Intervalo de Confianza; Ref = Referencia para análisis estadístico; en negrita se destacan las variables con *p-value* < 0,05; Eventos = número de personas fallecidas dentro de los 2 años de seguimiento

**Tabla 10:** Análisis de regresión de Cox multivariado para variantes genéticas y variables clínicas.

Variable	HR	<i>p-value</i>	IC 95%	<i>p-value modelo</i>
<50 años	2,61	<b>0,042</b>	1,03 – 6,16	n= 53, eventos = 39
Metástasis Hepática	2,43	0,059	0,93 – 4,41	
Histología túbulopapilar	2,37	0,208	0,62 – 9,11	
Genotipo 6bp-/6bp-	2,38	<b>0,017</b>	1,16 – 4,85	

HR = Hazard Ratio; IC 95% = Intervalo de Confianza; Ref = Referencia para análisis estadístico; en negrita se destacan las variables con *p-value* < 0,05; Eventos = número de personas fallecidas dentro de los 2 años de seguimiento

De ambos modelos se puede apreciar que una edad de diagnóstico menor y la presencia del genotipo 6bp- homocigoto son variables de riesgo que pueden llegar a duplicar la probabilidad de fallecer en comparación a pacientes que no tienen dichas características.

Con el fin de realizar una asociación entre las variante genética rs11479 y el tratamiento realizado por los pacientes se realizó un análisis multivariado para determinar si los diferentes genotipos de esta variante están asociadas a la sobrevida en pacientes cuya primera línea terapéutica fue CapeOx, de dicho análisis no se encontró una asociación con respecto al modelo dominante de herencia (*p-value* modelo = 0,221), aun así no es posible descartar por completo la falta de asociación del modelo debido al bajo número muestral de genotipos TT en pacientes con mCCR (2 pacientes) (ANEXO VI).

### 5.6 Recálculo del tamaño muestral

Adicionalmente a todo lo anterior se hizo un recálculo del tamaño muestral con los datos obtenidos del análisis multivariado con mejor *p-value* de modelo para determinar el número de pacientes necesario para alcanzar la potencia estadística. Para esto se usó la frecuencia obtenida del alelo 6bp- de la variante genética *TYMS* rs12280056 (0,25), el HR obtenido del análisis multivariado (1,85) y la mediana de sobrevida de los pacientes con 33,9 meses. Todo esto con un poder estadístico de un 80% y una significancia de un 95%. Con estos datos se obtuvo el siguiente tamaño muestra:

- Grupo expuesto (con la variante genética): 37
- Grupo no expuesto (sin la variante genética): 110

- Tamaño muestral total: 147

En nuestro estudio se logró reclutar a 63 pacientes, con los cuales se pudieron asociar algunas variables a la OS-2y-. Posiblemente con el tamaño muestral correspondiente otras variables podrían haber sido incorporadas al modelo multivariado.

## **6 Discusión**

En la presente tesis, se buscó determinar la asociación de diferentes variables, tanto genéticas como no genéticas con la tasa de sobrevida a los dos años de pacientes con mCCR y de esa manera visualizar que factores presentes en dichos pacientes puedan predecir, a futuro, el resultado en terapias basadas en 5-FU, con el fin de crear un modelo de tratamiento personalizado que permita mejorar la eficacia del tratamiento de cáncer colorrectal.

### **6.1 Asociación univariada de variantes genéticas y variables no genéticas en la sobrevida**

En este estudio se investigó la asociación de variables clínicas y variantes genéticas de pacientes con mCCR y su influencia en la OS-2y- de estos. Dentro de las variables clínicas encontramos el sexo, la edad de diagnóstico de los pacientes, la clasificación TNM del tumor primario, su localización, histología, grado de diferenciación y la presencia de metástasis en otros órganos. Con respecto a las variantes genéticas se realizó la genotipificación de las variantes rs11479 del gen *TYMP* y rs12280056 del gen *TYMS* en población general y en pacientes mCCR.

#### **6.1.1 Sexo**

Entre las variables analizadas el sexo no fue una variable estadísticamente significativa en relación con la sobrevida de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico, aun así, existen varios estudios que lo asocian a la sobrevida en pacientes con cáncer colorrectal. Estudios realizados en pacientes con CCR encuentran que la OS-5y- es mayor en mujeres que en hombres (Majek *et al*, 2013, Yang *et al*, 2017, Joachim *et al*, 2019). Las causas de este factor protector se pueden basar en la presencia de hormonas sexuales (estrógenos principalmente), ya que, al separar por edades encontramos que mujeres mayores de 55 años

tienen una menor OS que pacientes hombres de la misma edad (Majek *et al*, 2013, Purim 2013). Otro factor que puede llegar a ser considerado es la poca participación de pacientes hombres en los *screenings*, esto se puede ver en un estudio de White *et al*, en el cual fue un factor que afectó la OS de ambos sexos, siendo las mujeres las que poseía un menor riesgo y una mayor participación de *screenings* (White *et al*, 2018).

### 6.1.2 Edad de diagnóstico

En nuestro estudio, la edad de diagnóstico al ser separada en grupos de menor a mayor grupo etario encontró una asociación significativa con la tasa de supervivencia global, siendo pacientes más jóvenes aquellos con un mayor riesgo a fallecer que el resto de los grupos HR = 2,35. Al agregar la edad de diagnóstico a un análisis multivariado con la presencia o ausencia de metástasis hepática, se obtuvo que el riesgo aumenta al ser un individuo diagnosticado a una edad menor a 50 años (HR= 2,64).

Existen diversos estudios que asocian a los pacientes con diagnóstico de CCR más temprano con una menor OS e incluso con un cáncer más agresivo, ya sea con una mayor capacidad invasiva tanto a nivel linfovascular como perineural, (Gabriel *et al*, 2018), con una peor clasificación TNM (Mitry *et al*, 2001), y hasta, con una histología más agresiva como son las células en forma de anillo de sello (Griffin *et al*, 1991). Estos antecedentes se pueden explicar por 2 posibles causas: una es el retraso en el diagnóstico, debido a que normalmente los *screenings* de cáncer colorrectal se realizan de entre los 45 a los 75 años, por lo que, pacientes menores a 45 con CCR tuvieron un cáncer solo se pudieron enterar de su presencia por ir al médico al presentar síntomas, los cuales aparecen después de 10 a 15 años desde el inicio del CCR (ACS, 2020), debido a esto este grupo de pacientes presentara un cáncer más avanzado debido al mayor tiempo que tuvo esta patología para desarrollarse y expandirse silenciosamente. La segunda es la alta frecuencia de pacientes jóvenes que poseen antecedentes familiares de CCR y/o factores genéticos asociados a una mayor incidencia de este cáncer. Este último punto fue estudiado por Mauri *et al*, en donde el 50% de los pacientes con CCR de inicio temprano tienen por lo menos un factor genético asociado al aumento en la incidencia, del otro 50% se desconocen las causas asociadas a la presencia de CCR en edades tempranas (Mauri *et al*, 2019). La presencia de antecedentes familiares también se respalda en el estudio de Chung *et al* (Chung *et al*, 1998).

Como proyección de este apartado es posible investigar la presencia de mutaciones que puedan aumentar la incidencia de CCR en los ancestros o los hijos de los pacientes incluidos en este estudio, para así determinar si existe un patrón genético asociado al desarrollo de esta enfermedad en Chile.

### 6.1.3 TNM

En relación con la clasificación TNM de los pacientes, diversas investigaciones apuntan a que mientras mayor sea el estadio tumoral menor será la probabilidad de tener OS-5y- (Gunderson *et al*, 2004, O'Connell *et al*, 2004, Oh *et al*, 2007). Del mismo modo la cantidad de nódulos linfáticos invadidos por células tumorales también son un factor que está asociado a una menor OS-5y- (Gunderson *et al*, 2004). Sin embargo, existen estudios que ven la clasificación T y N de diferente forma. Por más de 80 años la clasificación TNM se ha mantenido para cáncer colorrectal y las nuevas subcategorías de cada etapa generan más especificidad (T4a/T4b, N1a/N1c/N1c, N2a/N2b, M1a/M1b/M1c) (AJCC *8th edition*), pero no reflejan de manera objetiva el impacto en la sobrevida, sobre todo en etapas II y III (Li *et al*, 2014, Li *et al*, 2016, Kong *et al*, 2018).

En Chile, el diagnóstico, la clasificación TNM y la toma de decisión sobre el óptimo tratamiento se realizan basándose únicamente en los informes obtenidos desde anatomía patológica y en los resultados de imagenología. Estos parámetros fueron establecidos por el Ministerio de Salud (MINSAL 2012). Este diagnóstico es observacional, por lo que depende del juicio del profesional a cargo que realice dicho análisis y de la guía AJCC de referencia que utilice el servicio de salud correspondiente (AJCC *8th edition*, Minsal 2012). En nuestro estudio, no se encontraron asociaciones estadísticas con ninguna de las clasificaciones TNM. Dentro de los posibles factores que pueden influir, uno de los más relevantes es la falta de información de la clasificación TNM en algunos de los informes de anatomía patológica de los pacientes. Otros factores que pueden afectar corresponden al número de pacientes incluidos en este estudio, las diferentes versiones de la clasificación TNM y la gran variedad de subclasificaciones de estas. En la octava edición del manual de etapificación del cáncer para cáncer colorrectal se han descrito las siguientes clasificaciones: para T se encuentran T0, T1, T2, T3, T4a y T4b, para N se encuentran N0, N1a, N1b, N1c, N2a y N2b y finalmente para la clasificación M están M0,

M1a y M1b (AJCC 8th edition). Cada uno de estos factores posee diferentes requerimientos y análisis por parte de un anatomopatólogo para poder ser etapificados correctamente. Del mismo modo puede haber errores en este tipo de caracterizaciones, ya sea esto en el marco de que se encontraron datos con una clasificación de N3, la cual no está presente en la etapificación de cáncer colorrectal, pero si en otros tipos de cáncer como, por ejemplo, cáncer rectal (AJCC 8th edition), además decir que dicho paciente en específico posee un tumor primario en colon sigmoide por lo que es posible que exista una confusión con respecto a las 2 evaluaciones.

Esta gran variedad de etapas, junto a diferentes criterios de anatomopatólogos y un acotado número de pacientes pudieron generar un bajo poder estadístico en el presente estudio, llegando a tener casos en los cuales clasificaciones como N2 presentan un menor riesgo respecto a las otras clasificaciones N. Con respecto a cómo cada etapa, de forma individual, afecta directamente la sobrevida, existen varios estudios que asocian una mayor progresión del tamaño tumoral a una peor sobrevida (Kornprat *et al*, 2011, Moghimi-Dehkordi *et al*, 2008, Saha *et al*, 2015). Sin embargo, es necesario aclarar que el tamaño tumoral no es lo único relevante, ya que un estudio de Huang *et al* asoció al estadio T4b menor de 4 cm con una peor OS-5y- en pacientes T4bN0/1/2M0 (Huang *et al*, 2016), de forma similar el modo de infiltración puede influir en la sobrevida de los pacientes, esto se demostró en un estudio de Dai *et al* en el cual se encontró que un tumor que invada de manera vertical y no horizontalmente el intestino tiene una peor OS que el resto del grupo de estudio (Dai *et al*, 2020).

La presencia de células tumorales en nódulos linfáticos nódulos adyacentes al tumor son factor de mayor riesgo en la OS-5y- y la DFS de pacientes con CCR a medida que más nódulos son invadidos (McDonald *et al*, 2020, Ong *et al*, 2016) y en un meta-análisis realizado por Karjol *et al* se encontró que mientras mayor es el porcentaje de linfonodos metastásicos presentes en una extracción quirúrgica, peor es el pronóstico que tendrán los pacientes, ya sea en OS como en DFS (Karjol *et al*, 2020).

A pesar de todo lo anterior, con respecto al tamaño tumoral no se encontraron asociaciones estadísticas significativas, y de forma contradictoria, se encontró una tendencia en la clasificación N de factor protector ante la OS en pacientes N2. Estos resultados, debido a la

gran variedad de clasificaciones y al bajo tamaño muestral, pudo influenciar en una inadecuada interpretación de los resultados, por lo que se considero necesario a futuro aumentar el número de pacientes con el fin de abarcar el mayor número posible de clasificaciones TNM y determinar si dichas asociaciones son correctas, además de una ayuda externa por un anatomopatólogo el cual reanalice y clasifique cada una de las muestras de estudio y unifique los estadios.

Con respecto al apartado de metástasis (M) las principales metástasis en CCR ocurren en hígado y pulmón, seguidas con un porcentaje menor al 10% que ocurren en hueso, sistema nervioso, peritoneo, entre otros (Wang *et al*, 2020, Filip *et al*, 2020, Qiu *et al*, 2015, Holch *et al*, 2017). En el mundo, un 22% de la población con CCR posee una o más metástasis y de estos solo un 14% tendrá una OS de 5 años o más, dentro de las cuales la metástasis hepática es aquella con peor pronóstico clínico con respecto al resto (Wang *et al*, 2020). En nuestro estudio se encontró que la presencia de metástasis hepática se asoció a un riesgo de 2,45 veces más de fallecer que aquellas personas que no presentan esta metástasis en específico (Grinscom *et al*, 2019, Engstrand *et al*, 2018, Ge *et al*, 2019). Este último asoció de manera multivariada los factores de edad de diagnóstico, sexo, estado marital, raza, sitio tumoral, clasificación T, N y presencia de metástasis hepática, pulmonar, cerebral y/o hueso, en cerca de 20,000 pacientes, generando un modelo predictivo capaz de estimar el riesgo de supervivencia en pacientes con CCR (Ge *et al*, 2019).

En nuestro estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia o ausencia de metástasis pulmonar y la OS-2y- en pacientes mCCR. Sin embargo, en el estudio de Wang *et al* se comparó la presencia de metástasis pulmonar, ósea y cerebral con respecto a la presencia de metástasis hepática y encontraron que existía una correlación negativa en la OS de pacientes con cáncer cerebral y óseo, y de forma contradictoria solo la presencia de metástasis pulmonar era un factor protector si se comparaba con metástasis hepática (Wang *et al*, 2020). Este resultado contradictorio puede ser encontrado en otros estudios (Khattal *et al*, 2012, Miyoshi *et al*, 2015, Roth *et al*, 2009) y aun no se ha encontrado una explicación a esto más que en la potencia estadística de los datos, ya que el bajo número de pacientes o las diferencias entre la proporción de factores que afectan a la supervivencia (edad, estadio TNM, histología, grado de diferenciación, entre otros) van cambiando su proporción a medida de que se analizan separadamente los grupos y esta segregación implica una posible

alteración de los resultados estadísticos (Wang *et al*, 2020). Con respecto a esto último es necesario abordar la presencia de otras metástasis, ya que en este estudio se encontró que la presencia de otras metástasis está asociada a un factor protector en la tasa de supervivencia global (HR = 0,48), lo cual es contradictorio. Este hecho puede ser explicado por 2 posibles razones estadísticas, la primera de estas es la amplia diferencia entre los otros tipos de metástasis (ANEXO VII) los cuales debido a su bajo número a un valor estadísticamente significativo como para ser utilizados como variables independientes entre sí. El segundo punto es como la segregación de la presencia de otras metástasis posee una diferente proporción en diferentes variables clínicas, pero, sobre todo, la presencia de metástasis hepática, en la cual se encontró que pacientes con otras metástasis 51% presentaba metástasis hepática mientras que el grupo de pacientes sin otras metástasis presentaba un 89% de metástasis hepática. Esta diferencia de un 38% puede ser la causa de esta “mejor prognosis en la OS-2y-” en pacientes con otras metástasis, por lo cual es necesario en futuros estudios tener un mayor número muestral de pacientes y determinar si estos grupos presentan diferencias de proporción en diferentes variables ya sea clínicas o genéticas para tener un resultado lo más fidedigno posible.

#### **6.1.4 Histología**

En relación con la histología del tumor primario en los pacientes CCR se han establecido asociaciones con la supervivencia. Dentro de los principales tipos histológicos descritos para CCR, los subtipos adenocarcinoma mucinoso y de anillo en forma de sello son las que más se han asociado a una baja en la OS-5y- de los pacientes con CCR (Teka *et al*, 2021). Entre las posibles causas de esto se encuentra que estos subtipos están asociados a un mayor estadio T y N, localización en colon derecho y una alta incidencia de invasión linfovascular y nerviosa (Teka *et al*, 2021). A pesar de esto, dentro de los CCR, la presencia de adenocarcinoma mucinoso es de aproximadamente un 10% y células de anillo en sello cercana al 1% (Li *et al*, 2019). Dicho esto, en nuestro estudio no se encontró asociaciones estadísticas significativas con dichas histologías debido a la escasa cantidad de pacientes que presentaban dichas histologías. Por otra parte, existe una histología menos conocida en la literatura respecto al CCR es la histología de adenocarcinoma tubulopapilar, la cual es referida como una histología indiferenciada. De esta histología se ha descrito en Chile que existe en aproximadamente un 5% de los adenocarcinomas en CCR (Tapia *et al*, 2010). Según la Organización Mundial de la Salud se han clasificado diversas histologías de carcinomas y adenocarcinomas colorrectales,

entre los cuales encontramos a los adenocarcinomas mucinoso, célula en forma de anillo de sello, medular, micropapilar, cribiforme, adeno-escamoso, células fusiformes y no diferenciadas, en nuestro caso la histología tubulopapilar entra dentro de adenocarcinomas no diferenciados (Fleming *et al*, 2012, Remo *et al* 2019). Con respecto a la asociación de los adenocarcinomas no diferenciados y la sobrevida no existen estudios que lo asocien directamente, ya que, en el único estudio asociado a la sobrevida, perteneciente a Qiu *et al*, muestra una asociación de todos los cánceres digestivos no diferenciados con una mejor tasa de sobrevida, sin ahondar en el cáncer colorrectal específicamente (Qiu *et al*, 2021). Con todo lo anterior mencionado en nuestra investigación encontramos una asociación estadísticamente significativa con el tipo histológico tubulo-papilar en pacientes con mCCR teniendo estos 5,17 veces más el riesgo de fallecer que aquellos pacientes con mCCR con histología de adenocarcinoma tubular, aunque este factor deja de tener un impacto estadístico significativo en un análisis multivariado, por lo que es necesario tener un mayor número de pacientes con esta histología para determinar si se puede asociar a un modelo multivariado en el cual tenga significancia estadística.

### **6.1.5 Grado de diferenciación**

Cuando se analiza el tumor primario, una variable clínica a considerar por el anatomopatólogo es el grado de diferenciación celular, ya que las células pueden pasar por un proceso de indiferenciación, el cual corresponde al cambio gradual tanto de forma genotípica como fenotípica hacia un tipo celular semejante a una célula madre, generando un cambio fenotípico en su expresión genética y su agresividad (Jögi *et al*, 2012). Por regla general, un tumor con un grado de diferenciación mayor está asociado a una mejor prognosis para el paciente que uno poco diferenciado, ya que este último pierde de forma gradual su capacidad de organización estructural y sus uniones celulares, teniendo una mayor probabilidad de invadir estructuras vasculares y neurales en comparación a su contraparte diferenciada (Jögi *et al*, 2012). En CCR la presencia de tumores primarios pobremente diferenciados se asocian a una menor OS-5y- (Halvorsen *et al*, 1988, Huang *et al*, 2019), junto con esto la incidencia de tumores pobremente diferenciados se ha asociado con la edad, siendo los jóvenes aquellos con mayor frecuencia de presentarlos (Ghodssi-Ghassemabadi *et al*, 2019). En nuestra investigación no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con respecto al grado de diferenciación y la OS-2y- en pacientes con CCR metastásico, esto posiblemente al

bajo número de pacientes en el estudio junto con la baja variedad de pacientes con diferentes grados de diferenciación, ya que en nuestro estudio se presentaba una amplia mayoría de tumores medianamente diferenciados, pero carecíamos de pacientes con un tumor poco diferenciado

### **6.1.6 Localización tumoral**

El CCR no contempla a un solo tipo de tumor, sus características varían dependiendo de su localización e histología, y estas dependen de las mutaciones genéticas que gatillaron la formación del tumor primario (Baran *et al*, 2018). Frente a esto, podemos encontrar claras diferencias en los pacientes con tumores LCC y RCC. Respecto a los tumores LCC, se ha descrito que poseen principalmente una histología tubular, con morfología en forma de pólipos y con una vía mutagénica asociada a la inestabilidad cromosomal (CIN); en cambio, los tumores RCC se han asociado principalmente a una histología de adenocarcinoma mucinoso, de morfología plana, lo que dificulta la detección de estos por colonoscopia, y una vía mutacional asociada a la inestabilidad de microsatélites (MSI) (Baran *et al*, 2018). En lo que respecta al tratamiento, diferentes estudios asocian a los tumores LCC con una mejor prognosis ante terapias convencionales con 5-FU y terapia biológica, mientras que pacientes con tumores RCC la terapia convencional por sí sola no genera una respuesta óptima, sin embargo, nuevos estudios demuestran resultados prometedores con la inmunoterapia, debido a la alta carga antigénica que poseen los tumores RCC (Baran *et al*, 2018). En relación con la efectividad y la OS, se ha descrito que estas también pueden depender de la localización tumoral. Se ha asociado que existe una leve disminución, pero significativa en la OS-5y- de pacientes con tumores RCC (de entre un 5-13% menos de OS que pacientes con tumores LCC) (Meguid *et al*, 2008, Lim *et al*, 2017, Qiu *et al*, 2018). En otros estudios, en contraste a lo anterior se ha observado que, de forma individual, la localización tumoral no presenta asociaciones estadísticamente significativas, e incluso llegan a mostrar resultados contradictorios. Tal es el caso del estudio de Qiu *et al*, en el cual, el grupo de estudio con tumores RCC analizado presentó una menor OS-5y-, excepto en pacientes con ciertas características: mayores de 68 años, clasificación TNM T3-4 N0 o poca diferenciación celular de tumor primarios. Además de esto pacientes con tumores RCC con histología adenocarcinoma mucinoso o en forma de anillo de sello tienen mayor supervivencia que pacientes con tumores LCC (Qiu *et al*, 2018). Teniendo en consideración estos resultados

contradictorios y como las diferentes variables clínicas pueden alterar nuestros resultados, en nuestra investigación no se logró encontrar una asociación estadísticamente significativa entre la localización tumoral y la OS-2y-, lo cual se puede atribuir al bajo tamaño muestral de nuestro estudio, el cual pudo influir en la falta de asociación estadística. Es necesario mencionar que la gran mayoría de estos estudios se realizaron en más de 1.000 pacientes, a diferencia de esta tesis que sólo incluyó 63 pacientes mCCR.

### **6.1.7 Equilibrio de HWE**

El equilibrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) es una relación matemática que establece que, si no existe una presión por el ambiente (por ejemplo, la selección natural, migraciones o mutaciones), la genética poblacional permanecerá en equilibrio (Mayo *et al*, 2008). En esta tesis se analizó, en primera instancia, a un grupo de personas conocidas como población general (n = 83), las cuales se caracterizan por no tener ningún tipo de cáncer, siendo un grupo de estudio ideal para determinar el comportamiento de los polimorfismos genéticos rs11479 y rs12280056, ya sea su frecuencia y si cumplen con el HWE.

En nuestro estudio se pudo determinar que ninguno de los SNPs analizados cumplían con el equilibrio de HWE. Esto puede tener 2 explicaciones, la primera es que el tamaño muestral no fue el suficiente para poder representar de manera correcta la población, y la segunda explicación se puede asociar a variados factores como la migración, la centralización de la toma de las muestras, entre otros. En el caso del rs11479, a pesar de no estar en HWE, su valor muestra que se encuentra cercano del equilibrio, por lo cual si se aumenta el número de pacientes sanos es posible demostrar si efectivamente está en dicho equilibrio o no. No es el caso del rs12280056, el cual notoriamente está en desequilibrio en nuestra población, esto debido principalmente a la gran cantidad de heterocigotos presentes en la población. Este fenómeno se puede explicar por un concepto llamado exceso de heterocigosidad, el cual es un fenómeno en genética de poblaciones que es definido como un aumento estadísticamente significativo en la presencia de un genotipo heterocigoto en la población estudiada (Abramovs *et al* 2020). Este proceso puede ser influenciado por la selección natural como mecanismo de ventaja ante ciertas enfermedades de carácter recesivo causando que los genotipos homocigotos ocurran con menor frecuencia (Abramovs *et al*, 2020). Lo interesante es que la presencia de heterocigotos disminuyó en la población con mCCR, lo cual podría ser un

indicio de que el genotipo 6bp-/6bp- podría estar asociado con una mayor incidencia a cáncer. Sin embargo, esto es una afirmación sin estudios previos en los cuales apoyarse. A pesar de esto, si se puede describir que este genotipo se ha asociado, en diversos estudios, con una peor DFS o un mayor riesgo de relapse temprano (Afzal *et al*, 2011, Marques *et al*, 2017).

#### **6.1.8 Asociaciones entre los rs11479 y rs12280056 en la OS de pacientes mCCR**

En este estudio se decidió analizar como los diferentes modelos de herencia de los polimorfismos genéticos afectaban a OS de pacientes con mCCR. Para la variante genética de *TYMS* rs12280056 (3'UTR 6bp+/6bp-) no se encontró pacientes con el genotipo 6bp+/6bp+, ya sea en población general o en pacientes mCCR, por lo que en este estudio solo se analizó la presencia del genotipo heterocigoto (6bp+/6bp-) y el homocigoto 6bp-/6bp-. De este análisis se pudo determinar que existe un mayor riesgo en la supervivencia global al presentar el genotipo 6bp-/6bp- (HR = 2,36, *p-value* = 0,014). Son variados los estudios que hablan de esta variante, los cuales han descrito asociaciones con solo ciertos genotipos o en conjunto con otras variables, como lo es por ejemplo la expresión genética o proteica de *TYMS*, y han descrito que los pacientes con los genotipos 6bp-/6bp- o 6bp+/6bp- presentan una peor DFS (Afzal *et al*, 2011). En otros estudios se han descrito que de manera individual el alelo 6bp- se ha asociado a un mayor riesgo de recurrencia temprana (Marques *et al*, 2017), mientras que otros han indicado que al alelo 6bp+ se ha asociado con una mayor expresión de *TYMS* y una peor OS-5y- que el resto de los genotipos (Mandola *et al*, 2004, Gao *et al*, 2013). Esta mayor expresión por parte del alelo 6bp+ se puede asociar a una mayor estabilidad presente en el ARNm de *TYMS*, por lo que este cambio en la expresión podría ser un futuro factor a utilizar para determinar el pronóstico de los pacientes mCCR. Esto es algo que se ha descrito en variados estudios, los cuales asocian la disminución de la expresión de *TYMS* con una mejor prognosis en pacientes con cáncer (Bai *et al*, 2015, Hua *et al*, 2007, Soong *et al*, 2008, Ciaparrone *et al*, 2006, Ahn *et al*, 2005, Lassmann *et al*, 2005, Ohrling *et al*, 2005, Tomiak *et al*, 2001). Sin embargo, existen estudios que no han encontrado asociación entre la expresión de *TYMS* y OS (Jiang *et al*, 2019, Abdallah *et al*, 2015, Chiorean *et al*, 2012, Vallböhmer *et al*, 2007, Aguiar *et al*, 2005, Ma *et al*, 2004,) o han encontrado asociaciones que contradicen lo anteriormente mencionado (Sasako *et al*, 2015, Edler *et al*, 2002). Junto con los cambios en la expresión de *TYMS* también hay que enfocarse en que no solo las variantes genéticas en el mismo gen conducirán a cambios en su expresión, sino que también existen factores externos al propio gen que

pueden regular su expresión. Un ejemplo de esto se encuentra en el estudio realizado por Varghese *et al*, en el cual se asocia al factor de transcripción “*Forkhead box protein M1*” o FOXM1, con la resistencia a 5-FU mediante el aumento de la expresión genética de *TYMS*, *TK1* y *TYMP* cuando este factor de transcripción es sobre expresado en diferentes líneas celulares de CCR (Varghese *et al*, 2019). En vista de todos estos antecedentes, una proyección de este estudio podría ser enfocarse en la expresión de *TYMS* junto con sus variantes genéticas que mayor implicancia podrían tener en la sobrevida como son el rs12280056, rs45445694 y el rs34743033 (Panczyk *et al*, 2014), y la sobreexpresión del factor de transcripción FOXM1 (Shimamoto *et al*, 2016) para generar un modelo predictivo de la efectividad de la terapia basada en 5-FU junto con sus reguladores transcripcionales en pacientes con CCR.

Con respecto a los análisis realizados del gen *TYMP* se pudo determinar que no existe una asociación estadística significativa entre la presencia del rs11479 con la sobrevida global en pacientes con mCCR, tanto de manera independiente como de manera multivariada. Debido a que se alcanzó el número muestral necesario para realizar este análisis estadístico se puede establecer que este gen por sí mismo ni en asociación al rs12280056 de *TYMS*, no está influenciado la sobrevida en pacientes con mCCR, lo cual también se ha observado en otros 2 estudios analizando estavariante genética (Meulendijks *et al*, 2017, Wang *et al*, 2014).

La enzima *TYMP*, cumple otras funciones adicionales a la regulación de la disponibilidad de timina, las cuales son migración endotelial y angiogénesis en diferentes tipos de cáncer, incluyendo CCR (Bronckaers *et al*, 2009), y de algunas enfermedades inflamatorias, en donde se atribuye una alta expresión de *TYMP* con un peor pronóstico clínico (Bai *et al*, 2015, Meropol *et al*, 2006). Por otro lado, esta enzima es necesaria para la metabolización de capecitabina y 5-FU (Bronckaers *et al*, 2009), por lo cual podemos encontrar estudios en los cuales la alta expresión de este gen está asociada a una mejora en la tasa de respuesta patológica, mejor respuesta a la terapia y mejor OS (Chiorean *et al*, 2012, Sadahiro *et al*, 2012, Mitselou *et al*, 2012). Por otra parte, podemos encontrar estudios en los cuales una baja expresión está asociada a un mejor pronóstico clínico (Soong *et al*, 2008). Finalmente podemos encontrar estudios en los cuales no se encuentra una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de este gen con respecto a las OS de pacientes con CCR (Sasako *et al*, 2015, Hua *et al*, 2007, Vallböhmer *et al*, 2007, Ciaparrone *et al*, 2006, Ahn *et al*, 2005, Ma *et al*, 2004). Dada una vista general aún queda mucho para llegar a un consenso si

es que tanto estas variantes genéticas como la expresión de estos genes pueden tener una asociación significativa con la sobrevida de los pacientes mCCR, pero es necesario seguir realizando estudios poblacionales para determinar cómo en cada población se comportan estos parámetros y como irán cambiando en el futuro por la migración y globalización.

## **6.2 Asociaciones multivariadas de las variables genéticas y no genéticas**

Finalmente, en esta investigación se buscó determinar la implicancia de las variantes genéticas y no genéticas, de manera individual y en conjunto, para determinar su implicancia predictora en la OS. Dentro de nuestro grupo de estudio de 63 pacientes con mCCR, se observó que la edad de diagnóstico, la presencia de metástasis hepática, la presencia de una histología túbulo-papilar y la presencia del genotipo 6bp-/6bp- (rs12280056) de *TYMS* en conjunto son factores estadísticamente significativos que disminuyen la sobrevida global. De todos los análisis realizados solo estas 4 variables pudieron ser asociadas de manera significativa con la OS-2y- de pacientes con mCCR.

En lo que respecta a la literatura existen varios estudios que asocian la presencia del rs12280056 y otras variantes en relación con la sobrevida global y/o la toxicidad en estudios multivariados. Por ejemplo, en un estudio de Hamzic *et al* se detalla que la presencia del alelo 6bp+ del rs12280056 y la presencia del alelo de 2 repeticiones (2R) del rs45445694 de forma conjunta están asociados con el síndrome pie-mano en pacientes con CCR ante un tratamiento con 5-FU (Hamzic *et al*, 2020). Aunque existen estudios los cuales no encuentran relación entre dichas variantes genéticas en conjunto, incluyendo el rs11479 (Gusella *et al*, 2009, Meulendijks *et al*, 2017), o solo encuentran que una variante se asocia a alguna condición clínica, como el caso de Ntavatzikos *et al*, el cual en estudios del 2017 y 2019 encontró asociaciones solamente en el rs12280056 y no en conjunto al rs45445694 u otras variables clínicas. De sus resultados se determinó específicamente que los genotipos de 6bp+/6bp+ y 6bp+/LOH (Pérdida de heterocigosidad: concepto referente a la pérdida de un genotipo heterocigoto a uno homocigoto debido a inestabilidad cromosómica (Ryland et al, 2015)) están asociadas a un peor pronóstico clínico en pacientes con mCCR (Ntavatzikos *et al*, 2017 y 2019).

### 6.3 Limitaciones y proyecciones

Las principales limitaciones del estudio fueron el bajo número de centros que se incluyeron para la obtención de los pacientes mCCR, el complejo reclutamiento de los pacientes con muestras de tumor primario, la recuperación de las muestras de ADN que se encontraban almacenadas por largos periodos, la falta de datos de fichas clínicas y la falta de información específica con respecto a la causa de muerte de los pacientes y la pandemia mundial por el SARS-COV2. Como proyección de esta tesis se espera lograr un modelo predictivo de la supervivencia global en pacientes con mCCR al aumentar el número de pacientes e incorporar otras variables que estén involucradas en la metabolización de 5-FU y su pro-droga capecitabina, como las anteriormente mencionadas variantes rs45445694 y el rs34743033 del gen *TYMS*, entre otras. Por otro lado, se espera que este estudio tenga una futura aplicación clínica para permitir la mejor prognosis de los pacientes mCCR de forma personalizada.

En Chile, el diagnóstico de CCR se realiza mediante anatomía patológica e imagenología, dentro de la cual puede determinarse la etapa y el mejor tratamiento para el paciente según los protocolos establecidos por el Ministerio de Salud. Sin embargo, una falencia que existe en esta metodología es la subjetividad, entre cada anatomopatólogo, de determinar el mismo diagnóstico y, del mismo modo, el tratamiento de la persona depende del médico o del comité clínico que realice la evaluación. El objetivo de esta investigación es utilizar marcadores moleculares que puedan dar un enfoque más objetivo a la hora de elegir el mejor tratamiento del paciente, el cual genere la mejor prognosis y, así prevenir una nula eficacia del fármaco dado.

Este tipo de estudios es una puerta a la medicina personalizada, al determinar qué factores pueden identificar que tratamiento es el óptimo para el paciente y así evitar que la enfermedad, o en este caso, el cáncer colorrectal, pueda seguir invadiendo con la misma facilidad que tenía antes, logrando ser controlado y erradicado a tiempo, mejorando la calidad de vida del paciente y sus familiares.

## 7. Conclusiones

- a) En población general, existe un desequilibrio HWE en las variantes genéticas de TYMP y TYMS, en la que el rs12280056 presenta un exceso de heterocigosidad.
- b) Existe un mayor riesgo en la sobrevida de pacientes con mCCR con respecto a la edad de su diagnóstico, metástasis hepática, histología tubulo-papilar y genotipo 6bp- homocigoto de manera uni y multivariada.
- c) Con estos datos se puede dar paso a la generación de modelos predictivos de la sobrevida para determinar la eficacia en los tratamientos de los pacientes con cáncer colorrectal.

## 8. Referencias

- Abdallah, E. A., Fanelli, M. F., Buim, M. E., Machado Netto, M. C., Gasparini Junior, J.L., Souza E Silva, V., Dettino, A. L., Míngues, N. B., Romero, J. V., Ocea, L. M., Rocha, B. M., Alves, V. S., Araújo, D. V., & Chinen, L. T. (2015). Thymidylate synthase expression in circulating tumor cells: a new tool to predict 5-fluorouracil resistance in metastatic colorectal cancer patients. *International journal of cancer*, 137(6), 1397–1405. doi:10.1002/ijc.29495
- Abramovs, N., Brass, A., & Tassabehji, M. (2020). Hardy-Weinberg Equilibrium in the Large Scale Genomic Sequencing Era. *Frontiers in genetics*, 11, 210. doi:10.3389/fgene.2020.00210
- The American Cancer Society medical and editorial content team (ACS). (2020) Colorectal Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging [En línea], atlanta, Estados Unidos. <<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8606.00.pdf>> [consulta: 21 Agosto 2022]
- Afzal, S., Gusella, M., Jensen, S. A., Vainer, B., Vogel, U., Andersen, J. T., Brødbæk, K., Petersen, M., Jimenez-Solem, E., Adleff, V., Budai, B., Hitre, E., Láng, I., Orosz, E., Bertolaso, L., Barile, C., Padriani, R., Kralovánszky, J., Pasini, F., & Poulsen, H. E. (2011). The association of polymorphisms in 5-fluorouracil metabolism genes with outcome in adjuvant treatment of colorectal cancer. *Pharmacogenomics*, 12(9), 1257– 1267. doi: 10.2217/pgs.11.83
- Aguiar, S., Jr, Lopes, A., Soares, F. A., Rossi, B. M., Ferreira, F. O., Nakagawa, W. T.,

- Carvalho, A. L., & Filho, W. J. (2005). Prognostic and predictive value of the thymidylate synthase expression in patients with non-metastatic colorectal cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 31(8), 863–868. doi:10.1016/j.ejso.2005.03.014
- Ahn, M. J., Choi, J. H., Oh, H. S., Lee, Y. Y., Kim, I. S., Choi, I. Y., Lee, K. H., Song, K. W., & Park, C. K. (2005). Thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, VEGF and p53 protein expression in primary colorectal cancer for predicting response to 5- fluorouracil-based chemotherapy. *Cancer research and treatment*, 37(4), 216–222. doi:10.4143/crt.2005.37.4.216
  - Amin M., Edge S., Greene F., Byrd D., Brookland R., Washington M., Gershenwald J., Compton C., Hess K., (2017), *AJCC Cancer Staging Manual* (8th edition). Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer.
  - Alzu'bi, A. A., Zhou, L., & Watzlaf, V. (2019). Genetic Variations and PrecisionMedicine. *Perspectives in health information management*, 16 Spring, 1a. PMID: 31019429
  - Azzam, N., AlRuthia, Y., Alharbi, O., Aljebreen, A., Almadi, M., Alarfaj, M., Alsaleh, K., Almasoud, A., Alsharidah, M., Alseneidi, S., Alali, F., & Alalwan, M. (2020). Predictors of Survival Among Colorectal Cancer Patients in a Low Incidence Area. *Cancer management and research*, 12, 451–459. doi: 10.2147/CMAR.S233215
  - Bai, W., Wu, Y., Zhang, P., & Xi, Y. (2015). Correlations between expression levels of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase, and efficacy of 5-fluorouracil-based chemotherapy for advanced colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(10), 12333–12345.
  - Baran, B., Mert Ozupek, N., Yerli Tetik, N., Acar, E., Bekcioglu, O., & Baskin, Y. (2018). Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology research*, 11(4), 264–273. doi:10.14740/gr1062w
  - Baraniskin, A., Buchberger, B., Pox, C., Graeven, U., Holch, J. W., Schmiegel, W., & Heinemann, V. (2019). Efficacy of bevacizumab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer* (Oxford, England: 1990), 106, 37–44. doi: 10.1016/j.ejca.2018.10.009
  - Barton N. H. (2000). Genetic hitchhiking. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355(1403), 1553–1562. doi:10.1098/rstb.2000.0716
  - Boige, V., Mendiboure, J., Pignon, J. P., Lorient, M. A., Castaing, M., Barrois, M., Malka, D., Trégouët, D. A., Bouché, O., Le Corre, D., Miran, I., Mulot, C., Ducreux, M., Beaune, P., & Laurent- Puig, P. (2010). Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients

with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(15), 2556–2564. doi: 10.1200/JCO.2009.25.2106

- Bronckaers, A., Gago, F., Balzarini, J., & Liekens, S. (2009). The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Medicinal research reviews*, 29(6), 903–953. doi:10.1002/med.20159
- Brouwer, N., Bos, A., Lemmens, V., Tanis, P. J., Hugen, N., Nagtegaal, I. D., de Wilt, J., & Verhoeven, R. (2018). An overview of 25 years of incidence, treatment and outcome of colorectal cancer patients. *International journal of cancer*, 143(11), 2758–2766. doi: 10.1002/ijc.31785
- Brouwer, N., van der Kruijssen, D., Hugen, N., de Hingh, I., Nagtegaal, I. D., Verhoeven, R., Koopman, M., & de Wilt, J. (2020). The Impact of Primary Tumor Location in Synchronous Metastatic Colorectal Cancer: Differences in Metastatic Sites and Survival. *Annals of surgical oncology*, 27(5), 1580–1588. doi: 10.1245/s10434-019-08100-5
- Chidharla A, Parsi M, Kasi A. Cetuximab. (Actualizado 2021 May 7). En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Enero 2021 -. Disponible desde: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459293/>> [Consulta: 21 Agosto 2022]
- Chiorean, E. G., Sanghani, S., Schiel, M. A., Yu, M., Burns, M., Tong, Y., Hinkle, D. T., Coleman, N., Robb, B., LeBlanc, J., Clark, R., Bufill, J., Curie, C., Loehrer, P. J., & Cardenes, H. (2012). Phase II and gene expression analysis trial of neoadjuvant capecitabine plus irinotecan followed by capecitabine-based chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: Hoosier Oncology Group GI03-53. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 70(1), 25–32. doi:10.1007/s00280-012-1883-1
- Chung, Y. F., Eu, K. W., Machin, D., Ho, J. M., Nyam, D. C., Leong, A. F., Ho, Y. H., & Seow-Choen, F. (1998). Young age is not a poor prognostic marker in colorectal cancer. *The British journal of surgery*, 85(9), 1255–1259. doi:10.1046/j.1365-2168.1998.00805.x
- Ciaparrone, M., Quirino, M., Schinzari, G., Zannoni, G., Corsi, D. C., Vecchio, F. M., Cassano, A., La Torre, G., & Barone, C. (2006). Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Oncology*, 70(5), 366–377. doi:10.1159/000098110
- Dai, W., Mo, S., Xiang, W., Han, L., Li, Q., Wang, R., Xu, Y., & Cai, G. (2020). The

Critical Role of Tumor Size in Predicting Prognosis for T1 Colon Cancer. *The oncologist*, 25(3), 244–251. doi: 10.1634/theoncologist.2019-0469

- Dupont, W. D. (2009). *Statistical Modeling for Biomedical Researchers: A Simple Introduction to the Analysis of Complex Data*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 522p. doi: 10.1017/CBO9780511575884
- Edler, D., Glimelius, B., Hallström, M., Jakobsen, A., Johnston, P. G., Magnusson, I., Ragnhammar, P., & Blomgren, H. (2002). Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(7), 1721–1728. doi:10.1200/JCO.2002.07.039
- Engstrand, J., Nilsson, H., Strömberg, C., Jonas, E., & Freedman, J. (2018). Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival. *BMC cancer*, 18(1), 78. doi:10.1186/s12885-017-3925-x
- Filip, S., Vymetalkova, V., Petera, J., Vodickova, L., Kubecek, O., John, S., Cecka, F., Krupova, M., Manethova, M., Cervena, K., & Vodicka, P. (2020). Distant Metastasis in Colorectal Cancer Patients-Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5255. doi: 10.3390/ijms21155255
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology*, 3(3), 153–173. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
- Fornasier, G., Francescon, S., & Baldo, P. (2018). An Update of Efficacy and Safety of Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer: A Narrative Review. *Advances in Therapy*. doi:10.1007/s12325-018-0791-0
- Francesca Colombo. (2019). *OECD Reviews of Public Health: CHILE*. [en línea] <<https://www.oecd.org/health/health-systems/Launch-presentation-OECD-Reviews-of-Public-Health-Chile.pdf>> [consulta: 27 octubre 2021]
- Fujita, K., Kubota, Y., Ishida, H., & Sasaki, Y. (2015). Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 21(43), 12234–12248. doi: 10.3748/wjg.v21.i43.12234
- Gabriel, E., Attwood, K., Al-Sukhni, E., Erwin, D., Boland, P., & Nurkin, S. (2018). Age-related rates of colorectal cancer and the factors associated with overall survival. *Journal of*

gastrointestinal oncology, 9(1), 96–110. doi: 10.21037/jgo.2017.11.1315.070

- GCA, World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. [homepage on the internet]; 2012 [Revisado 28 Agosto 2022]. Disponible desde: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>
- Ge, H., Yan, Y., Xie, M., Guo, L., & Tang, D. (2019). Construction of a nomogram to predict overall survival for patients with M1 stage of colorectal cancer: A retrospective cohort study. *International Journal of Surgery*. doi:10.1016/j.ijso.2019.10.021
- Gerriets V, Kasi A. Bevacizumab. (Actualizado 2021 Mar 25). En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Enero 2021 -. Disponible desde:
  - <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482126/>> [Consulta: 18 mayo 2022]
- Griffin, P. M., Liff, J. M., Greenberg, R. S., & Clark, W. S. (1991). Adenocarcinomas of the colon and rectum in persons under 40 years old. A population-based study. *Gastroenterology*, 100(4), 1033–1040. doi:10.1016/0016-5085(91)90279-t
- Griscom JT, Wolf PS. Liver Metastasis. (Actualizado 2021 abril 13). En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022-. Disponible desde:
  - <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553118/>> [Consulta: 18 mayo 2022]
- Grothey, A., & Goldberg, R. M. (2004). A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5(10), 2159–2170. doi:10.1517/14656566.5.10.2159
- Halvorsen TB and Seim E. Degree of differentiation in colorectal adenocarcinomas: a multivariate analysis of the influence on survival. *J Clin Pathol*. (1988); 41(5): 532–537. doi: 10.1136/jcp.41.5.532
- Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P. (2010). Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 134-46
- He, J., Pei, L., Jiang, H., Yang, W., Chen, J., & Liang, H. (2017). Chemoresistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil is associated with silencing of the BNIP3 gene through aberrant methylation.
- Hua, D., Huang, Z. H., Mao, Y., & Deng, J. Z. (2007). Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase gene expression as predictive parameters for the efficacy of 5-

fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for gastric cancer. *World journal of gastroenterology*, 13(37), 5030–5034. doi:10.3748/wjg.v13.i37.5030

- Huang, L., Chen, F., Chen, Y., Yang, X., Xu, S., Ge, S., Fu, S., Chao, T., Yu, Q., Liao, X., Hu, G., Zhang, P., & Yuan, X. (2014). Thymidine phosphorylase gene variant, platelet counts and survival in gastrointestinal cancer patients treated by fluoropyrimidines. *Scientific reports*, 4, 5697. doi: 10.1038/srep05697
- Huang, B., Feng, Y., Mo, S. B., Cai, S. J., & Huang, L. Y. (2016). Smaller tumor size is associated with poor survival in T4b colon cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(29), 6726–6735. doi:10.3748/wjg.v22.i29.6726
- Jennings, B. A., Loke, Y. K., Skinner, J., Keane, M., Chu, G. S., Turner, R., ... Willis, G. (2013). Evaluating Predictive Pharmacogenetic Signatures of Adverse Events in Colorectal Cancer Patients Treated with Fluoropyrimidines. *PLoS ONE*, 8(10), e78053. doi: 10.1371/journal.pone.0078053
- Jiang, H., Li, B., Wang, F., Ma, C., & Hao, T. (2019). Expression of ERCC1 and TYMS in colorectal cancer patients and the predictive value of chemotherapy efficacy. *Oncology letters*, 18(2), 1157–1162. doi:10.3892/ol.2019.10395
- Joachim, C., Macni, J., Drame, M., Pomier, A., Escarmant, P., Veronique-Baudin, J., & Vinh-Hung, V. (2019). Overall survival of colorectal cancer by stage at diagnosis: Data from the Martinique Cancer Registry. *Medicine*, 98(35), e16941. doi:10.1097/MD.00000000000016941
- Khattak, M. A., Martin, H. L., Beeke, C., Price, T., Carruthers, S., Kim, S., Padbury, R., & Karapetis, C. S. (2012). Survival differences in patients with metastatic colorectal cancer and with single site metastatic disease at initial presentation: results from South Australian clinical registry for advanced colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*, 11(4), 247–254. doi: 10.1016/j.clcc.2012.06.004
- Karjol, U., Jonnada, P., Chandranath, A., & Cherukuru, S. (2020). Lymph Node Ratio as a Prognostic Marker in Rectal Cancer Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cureus*, 12(5), e8047. doi:10.7759/cureus.8047
- Kochanek KD, Xu JQ, Arias E. Mortality in the United States, (2019). NCHS Data Brief, no 395. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2020. Disponible desde < <https://www.cdc.gov/nchs/products/databriefs/db395.htm#References>> [Consulta 20 octubre 2021]
- Kornprat, P., Pollheimer, M. J., Lindtner, R. A., Schlemmer, A., Rehak, P., & Langner, C. (2011). Value of tumor size as a prognostic variable in colorectal cancer: a critical reappraisal.

American journal of clinical oncology, 34(1), 43–49. doi: 10.1097/COC.0b013e3181cae8dd

- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15065. doi: 10.1038/nrdp.2015.65
- Lassmann, S., Hennig, M., Rosenberg, R., Nährig, J., Schreglmann, J., Krause, F., ... Werner, M. (2005). Thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase mRNA expression in primary colorectal tumors—correlation to tumor histopathology and clinical follow-up. *International Journal of Colorectal Disease*, 21(3), 238–247. doi:10.1007/s00384-005-0767-9
- Lee, C. H., Cheng, S. C., Tung, H. Y., Chang, S. C., Ching, C. Y., & Wu, S. F. (2018). The Risk Factors Affecting Survival in Colorectal Cancer in Taiwan. *Iranian journal of public health*, 47(4), 519–530. PMID: 29900136
- Li, C., Zheng, H., Jia, H., Huang, D., Gu, W., Cai, S., & Zhu, J. (2019). Prognosis of three histological subtypes of colorectal adenocarcinoma: A retrospective analysis of 8005 Chinese patients. *Cancer medicine*, 8(7), 3411–3419. doi:10.1002/cam4.2234
- Lim, D. R., Kuk, J. K., Kim, T., & Shin, E. J. (2017). Comparison of oncological outcomes of right-sided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection: Which side is better outcome?. *Medicine*, 96(42), e8241. doi:10.1097/MD.0000000000008241
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338. doi:10.1038/nrc1074
- Ma, T., Zhu, Z. G., Ji, Y. B., Zhang, Y., Yu, Y. Y., Liu, B. Y., Yin, H. R., & Lin, Y. Z. (2004). Correlation of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase with sensitivity of gastrointestinal cancer cells to 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *World journal of gastroenterology*, 10(2), 172–176. doi:10.3748/wjg.v10.i2.172
- McDonald, J. R., Renehan, A. G., O'Dwyer, S. T., & Haboubi, N. Y. (2012). Lymph node harvest in colon and rectal cancer: Current considerations. *World journal of gastrointestinal surgery*, 4(1), 9–19. doi: 10.4240/wjgs.v4.i1.9
- Majek, O., Gondos, A., Jansen, L., Emrich, K., Holleczeck, B., Katalinic, A., Nennecke, A., Eberle, A., Brenner, H., & GEKID Cancer Survival Working Group (2013). Sex differences in colorectal cancer survival: population-based analysis of 164,996 colorectal cancer patients in Germany. *PloS one*, 8(7), e68077.

doi:10.1371/journal.pone.0068077

- Mandola, M. V., Stoecklacher, J., Zhang, W., Groshen, S., Yu, M. C., Iqbal, S., Lenz, H. J., & Ladner, R. D. (2004). A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics*, 14(5), 319–327. doi:10.1097/00008571-200405000-00007
- Masel J. (2011). Genetic drift. *Current biology: CB*, 21(20), R837–R838. doi:10.1016/j.cub.2011.08.007
- Mauri, G., Sartore-Bianchi, A., Russo, A. G., Marsoni, S., Bardelli, A., & Siena, S. (2019). Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Molecular oncology*, 13(2), 109–131. doi:10.1002/1878-0261.1
- Mayo, O. (2008). A Century of Hardy–Weinberg Equilibrium. *Twin Research and Human Genetics*, 11(03), 249–256. doi:10.1375/twin.11.3.249
- Meguid, R. A., Slidell, M. B., Wolfgang, C. L., Chang, D. C., & Ahuja, N. (2008). Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers?. *Annals of surgical oncology*, 15(9), 2388–2394. doi:10.1245/s10434-008-0015-y
- Meulendijks, D., Rozeman, E. A., Cats, A., Sikorska, K., Joerger, M., Deenen, M. J., Beijnen, J. H., & Schellens, J. (2017). Pharmacogenetic variants associated with outcome in patients with advanced gastric cancer treated with fluoropyrimidine and platinum- based triplet combinations: a pooled analysis of three prospective studies. *The pharmacogenomics journal*, 17(5), 441–451. doi: 10.1038/tpj.2016.81
- MINSAL, ministerio de salud. (2012). Guía clínica Cáncer colorrectal en personas de 15 años y más. Santiago, Chile, MINSAL <<https://www.minsal.cl/portal/url/item/db8329dc44e6371de0400101640126b5.pdf>> [21 Agosto 2022]
- Mitry, E., Benhamiche, A. M., Jouve, J. L., Clinard, F., Finn-Faivre, C., & Faivre, J. (2001). Colorectal adenocarcinoma in patients under 45 years of age: comparison with older patients in a well-defined French population. *Diseases of the colon and rectum*, 44(3), 380–387. doi:10.1007/BF02234737
- Miyoshi, N., Ohue, M., Shingai, T., Noura, S., Sugimura, K., Akita, H., Gotoh, K., Motoori, M., Takahashi, H., Kishi, K., Okami, J., Marubashi, S., Fujiwara, Y., Higashiyama, M., & Yano, M. (2015). Clinicopathological characteristics and prognosis of stage IV colorectal cancer. *Molecular and clinical oncology*, 3(5), 1093–1098. doi: 10.3892/mco.2015.598
- Moghimi-Dehkordi, B., Safaee, A., & Zali, M. R. (2008). Prognostic factors in 1,138

Iranian colorectal cancer patients. *International journal of colorectal disease*, 23(7), 683–688. doi:10.1007/s00384-008-0463-7

- Moghimi-Dehkordi, B., & Safaee, A. (2012). An overview of colorectal cancer survival rates and prognosis in Asia. *World journal of gastrointestinal oncology*, 4(4), 71–75. doi: 10.4251/wjgo.v4.i4.71
- National Institutes of Health (NIH). *Understanding Cancer*. [en línea]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/?report=classic>> [Consulta: 28 Agosto 2022]
- O'Connell, J. B., Maggard, M. A., & Ko, C. Y. (2004). Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(19), 1420–1425. doi:10.1093/jnci/djh275
- Oh, H. S., Chung, H. J., Kim, H. K., & Choi, J. S. (2007). Differences in overall survival when colorectal cancer patients are stratified into new TNM staging strategy. *Cancer research and treatment*, 39(2), 61–64. doi:10.4143/crt.2007.39.2.61
- Ohrling, K., Edler, D., Hallström, M., Ragnhammar, P., & Blomgren, H. (2005). Detection of thymidylate synthase expression in lymph node metastases of colorectal cancer can improve the prognostic information. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(24), 5628–5634. doi:10.1200/JCO.2005.12.130
- Ong, M. L., & Schofield, J. B. (2016). Assessment of lymph node involvement in colorectal cancer. *World journal of gastrointestinal surgery*, 8(3), 179–192. doi: 10.4240/wjgs.v8.i3.179
- Páez, D., Paré, L., Altés, A., Sancho-Poch, F. J., Petriz, L., Garriga, J., Monill, J. M., Salazar, J., del Rio, E., Barnadas, A., Marcuello, E., & Baiget, M. (2010). Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5- fluorouracil. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 136(11), 1681–1689. doi: 10.1007/s00432-010-0826-7
- Panczyk M. (2014). Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World journal of gastroenterology*, 20(29), 9775–9827. doi:10.3748/wjg.v20.i29.9775
- Petit, R. J., & Excoffier, L. (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in ecology & evolution*, 24(7), 386–393. doi:10.1016/j.tree.2009.02.011
- Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, Passalacqua R,

- Sgroi G, Barni S. (2017). Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 1;3(2):211-219. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.4227
- Ponz de Leon, M., & Di Gregorio, C. (2001). Pathology of colorectal cancer. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 33(4), 372–388. doi: 10.1016/s1590-8658(01)80095-5
  - Purim, O., Gordon, N., & Brenner, B. (2013). Cancer of the colon and rectum: potential effects of sex-age interactions on incidence and outcome. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 19, 203–209. doi: 10.12659/MSM.883842
  - Qiu, M., Hu, J., Yang, D., Cosgrove, D. P., & Xu, R. (2015). Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget*, 6(36), 38658–38666. doi: 10.18632/oncotarget.6130
  - Qiu, J., & Xin, Y. (2021). Incidence and prognosis of undifferentiated cancers of the digestive system: a population-based cohort study. *Annals of translational medicine*, 9(1), 15. <https://doi.org/10.21037/atm-20-1615>
  - Recio-Boiles A, Cagir B. [actualizado 14 de mayo 2022]. Colon Cancer. [en línea]. Treasure Island (FL): StatPearls. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>> [consulta: 01 julio 2022]
  - Remo, A., Fassan, M., Vanoli, A., Bonetti, L. R., Barresi, V., Tatangelo, F., Gafà, R., Giordano, G., Pancione, M., Grillo, F., & Mastracci, L. (2019). Morphology and Molecular Features of Rare Colorectal Carcinoma Histotypes. *Cancers*, 11(7), 1036. <https://doi.org/10.3390/cancers11071036>
  - Ritchie H. and Roser M. (2018) - "Causes of Death". Published online at OurWorldInData.org. Disponible desde : <<https://ourworldindata.org/causes-of-death>> [Consulta 19 mayo 2022]
  - Roth, E. S., Fetzer, D. T., Barron, B. J., Joseph, U. A., Gayed, I. W., & Wan, D. Q. (2009). Does colon cancer ever metastasize to bone first? a temporal analysis of colorectal cancer progression. *BMC cancer*, 9, 274. doi: 10.1186/1471-2407-9-274
  - Ruzzo, A., Graziano, F., Loupakis, F., Santini, D., Catalano, V., Bisonni, R., Ficarelli, R., Fontana, A., Andreoni, F., Falcone, A., Canestrari, E., Tonini, G., Mari, D., Lippe, P.,

- Pizzagalli, F., Schiavon, G., Alessandroni, P., Giustini, L., Maltese, P., Testa, E., ... Magnani, M. (2008). Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFIRI chemotherapy. *The pharmacogenomics journal*, 8(4), 278–288. doi: 10.1038/sj.tpj.6500463
- Ryland, G. L., Doyle, M. A., Goode, D., Boyle, S. E., Choong, D. Y., Rowley, S. M., Li, J., Australian Ovarian Cancer Study Group, Bowtell, D. D., Tothill, R. W., Campbell, I. G., & Gorringer, K. L. (2015). Loss of heterozygosity: what is it good for?. *BMC medical genomics*, 8, 45. doi: 10.1186/s12920-015-0123-z
  - Saha, S., Shaik, M., Johnston, G., Saha, S. K., Berbiglia, L., Hicks, M., Gernand, J., Grewal, S., Arora, M., & Wiese, D. (2015). Tumor size predicts long-term survival in colon cancer: an analysis of the National Cancer Data Base. *American journal of surgery*, 209(3), 570–574. doi:10.1016/j.amjsurg.2014.12.008
  - Sasako, M., Terashima, M., Ichikawa, W., Ochiai, A., Kitada, K., Kurahashi, I., Sakuramoto, S., Katai, H., Sano, T., & Imamura, H. (2015). Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 18(3), 538–548. doi: 10.1007/s10120-014-0413-8.
  - Shimamoto, Y., Nukatsuka, M., Takechi, T., & Fukushima, M. (2016). Association between mRNA expression of chemotherapy-related genes and clinicopathological features in colorectal cancer: A large-scale population analysis. *International journal of molecular medicine*, 37(2), 319–328. doi: 10.3892/ijmm.2015.2427
  - Smyth, E., Zhang, S., Cunningham, D., Wotherspoon, A., Soong, R., Peckitt, C., Valeri, N., Fassan, M., Rugge, M., Okines, A., Allum, W., Stenning, S., Nankivell, M., Langley, R., & Tan, P. (2017). Pharmacogenetic Analysis of the UK MRC (Medical Research Council) MAGIC Trial: Association of Polymorphisms with Toxicity and Survival in Patients Treated with Perioperative Epirubicin, Cisplatin, and 5-fluorouracil (ECF) Chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(24), 7543–7549. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3142
  - Soong, R., Shah, N., Salto-Tellez, M., Tai, B. C., Soo, R. A., Han, H. C., Ng, S. S., Tan, W. L., Zeps, N., Joseph, D., Diasio, R. B., & Iacopetta, B. (2008). Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Annals of*

oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 19(5), 915–919. doi: 10.1093/annonc/mdm599

- Stoecklacher, J., Park, D. J., Zhang, W., Yang, D., Groshen, S., Zahedy, S., & Lenz, H. J. (2004). A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *British journal of cancer*, 91(2), 344–354. doi: 10.1038/sj.bjc.6601975
- Tapia E, Oscar, Roa S, Juan Carlos, Manterola D, Carlos, & Bellolio J, Enrique. (2010). Cáncer de Colon y Recto: Descripción Morfológica y Clínica de 322 Casos. *International Journal of Morphology*, 28(2), 393-398. doi:10.4067/S0717-95022010000200010
- Teka, M. A., Yesuf, A., Hussien, F. M., & Hassen, H. Y. (2021). Histological characteristics, survival pattern and prognostic determinants among colorectal cancer patients in Ethiopia: A retrospective cohort study. *Heliyon*, 7(2), e06366. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06366
- Thorn, C. F., Marsh, S., Carrillo, M. W., McLeod, H. L., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(4), 237–242. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833c6107
- Tomiak, A., Vincent, M., Earle, C. C., Johnston, P. G., Kocha, W., Taylor, M., Maroun, J., Eidus, L., Whiston, F., & Stitt, L. (2001). Thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer: a retrospective review. *American journal of clinical oncology*, 24(6), 597–602. doi: 10.1097/00000421-200112000-00014
- Ulrich, C. M., Rankin, C., Toriola, A. T., Makar, K. W., Altug-Teber, Ö., Benedetti, J. K., Holmes, R. S., Smalley, S. R., Blanke, C. D., & Lenz, H. J. (2014). Polymorphisms in folate-metabolizing enzymes and response to 5-fluorouracil among patients with stage II or III rectal cancer (INT-0144; SWOG 9304). *Cancer*, 120(21), 3329–3337. doi: 10.1002/cncr.28830
- Vallböhmer, D., Yang, D. Y., Kuramochi, H., Shimizu, D., Danenberg, K. D., Lindebjerg, J., Nielsen, J. N., Jakobsen, A., & Danenberg, P. V. (2007). DPD is a molecular determinant of capecitabine efficacy in colorectal cancer. *International journal of oncology*, 31(2), 413–418. PMID: 17611699
- Varghese, V., Magnani, L., Harada-Shoji, N., Mauri, F., Szydlo, R. M., Yao, S., Lam, E. W., & Kenny, L. M. (2019). FOXM1 modulates 5-FU resistance in colorectal cancer through regulating TYMS expression. *Scientific reports*, 9(1), 1505. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38017-0>

- Wang, J., Wang, X., Zhao, M., Choo, S. P., Ong, S. J., Ong, S. Y., Chong, S. S., Teo, Y.Y., & Lee, C. G. (2014). Potentially functional SNPs (pfSNPs) as novel genomic predictors of 5-FU response in metastatic colorectal cancer patients. *PloS one*, 9(11), e111694. doi: 10.1371/journal.pone.0111694
- Wang, J., Li, S., Liu, Y., Zhang, C., Li, H., & Lai, B. (2020). Metastatic patterns and survival outcomes in patients with stage IV colon cancer: A population-based analysis. *Cancer medicine*, 9(1), 361–373. doi: 10.1002/cam4.2673
- Weiser M. R. (2018). AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Annals of surgical oncology*, 25(6), 1454–1455. doi: 10.1245/s10434-018-6462-
- Yang, Y. C., Wu, G. C., Jin, L., Wang, K. L., Bai, Z. G., Wang, J., & Zhang, Z. T. (2017). Association of thymidylate synthase polymorphisms with the tumor response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *The pharmacogenomics journal*, 17(3), 265–273. doi: 10.1038/tpj.2016.11
- White, A., Ironmonger, L., Steele, R., Ormiston-Smith, N., Crawford, C., & Seims, A. (2018). A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC cancer*, 18(1), 906. doi: 10.1186/s12885-018-4786-7
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., ... Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic acids research*, 46(D1), D1074–D1082. doi: 10.1093/nar/gkx1037
- Yang, Y., Wang, G., He, J., Ren, S., Wu, F., Zhang, J., & Wang, F. (2017). Gender differences in colorectal cancer survival: A meta-analysis. *International journal of cancer*, 141(10), 1942–1949. doi: 10.1002/ijc.30827

## ANEXOS:

### - ANEXO I: Dispensa al consentimiento informado.

PROTOCOLO CQF-EC-001-17

#### SOLICITUD DE DISPENSA AL CONSENTIMIENTO INFORMADO DE INVESTIGACIÓN

##### I.- IDENTIFICACION DEL ESTUDIO:

<b>INVESTIGADOR RESPONSABLE:</b> DR LUIS QUIÑONES SEPÚLVEDA
<b>INVESTIGADOR PRINCIPAL INC:</b> DR JOSE LUIS LEAL
<b>Título del Estudio:</b> FACTORES GENÉTICOS GERMINALES Y SOMÁTICOS ASOCIADOS CON INFILTRACIÓN INMUNE COMO HERRAMIENTAS PREDICTICAS DE RESPUESTA A FOLFOX EN CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO
<b>Fecha de presentación:</b> Julio de 2017

##### I.- JUSTIFICACIÓN DE LA DISPENSA

Se solicita la dispensa del Documento de Consentimiento Informado de acuerdo a los siguientes motivos:

- La investigación hará uso de datos sensibles identificables.
- La investigación y/o sus resultados **NO** provocará algún cambio en la conducta clínica hacia los participantes
- **NO** se necesitará contactar a los participantes para obtener información adicional

Adicionalmente mencionamos que la información indicada como datos sensibles serán antecedentes clínicos recogidos mediante el anexo II del protocolo (formulario de reportes de casos, CRFs) desde las fichas clínicas de los centros participantes, sin necesidad de comunicación con los sujetos para información adicional.

Por otra, la metodología del estudio incluye los análisis moleculares de la biopsia de diagnóstico del tipo FFPE (3-5 cortes de 10 µm) y que permanecen en el archivo de anatomía-patológica del hospital o centro de diagnóstico del cáncer.

Finalmente, comentamos que el presente estudio es del tipo retrospectivo en una enfermedad con alta mortalidad, por tanto, gran parte de los sujetos habrán fallecido.

**Investigador Principal:**

**Dr. B.Q. Luis Quiñones S. PhD**

**Profesor Titular. U. DE CHILE**

Carlos Schachtebeck (ex Las Palmeras) 299 - Quinta Normal - PO Box 70111 - Santiago - Chile

**Investigador Clínico:**

**Dr. José Luis Leal.**

**Oncólogo Médico. INC**

36

06 OCT 2017  
CEISAMORTE  
Registra: Asesor: de la Dirección  
Servicio de Salud  
Metropolitano Suror

## **ANEXO II: Estandarización de extracción de ADN desde muestras FFPE**

Para realizar la extracción de ácidos nucleicos, primero se llevó a cabo la estandarización de la técnica usando el kit AllPrep DNA/RNA FFPE, Qiagen. Esta estandarización consistió en 6 pilotos, donde se determinó: tipo de corte, reproducibilidad de la técnica, estabilidad de los cortes a corto plazo, como mejorar rendimiento y pureza de las extracciones. Mediante estos pilotos se generó una “calculadora” del área tumoral necesaria para obtener un mínimo de ácidos nucleicos; con ella podemos determinar la cantidad de cortes necesarios. Queda pendiente el último piloto para determinar los cortes necesarios para extraer ácidos nucleicos desde muestras de colonoscopia.

Como resultado de esta estandarización se llegaron a las siguientes conclusiones:

- *Tipo de corte:* será rollo si el área tumoral marcada por el anatomopatólogo es mayor a un 80%, si es menor a esta área debe ser microdissección. Si es rollo es mejor 2 cortes de 10 $\mu$ m o 3 cortes de 8 $\mu$ m que un corte de 20 $\mu$ m, ya que con más cortes de menor grosor es mejor la desparafinación del tejido.
- *Estabilidad de los cortes a corto plazo:* se observa una mínima disminución en la cantidad de ADN inicial, posterior a 4 semanas del almacenamiento a 4°C. Esto solo se notó en los 2 cortes de 10 $\mu$ m.
- *Rendimiento del kit:* para cáncer de colon se observó un rendimiento promedio de 56,7ng/ $\mu$ L/cm<sup>2</sup>, usando xileno como desparafinante y con las condiciones indicadas en el kit.

## ANEXO III: Ficha de reclutamiento población general

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### PROYECTO: CONFIGURACIÓN DE UN BANCO DE COLECCIÓN DE ADN PARA ESTUDIOS FARMACOGENÓMICOS EN POBLACIÓN GENERAL CHILENA

PATROCINANTE: Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética  
Nombre del Investigador principal: Luis Quiñones S. / Matías Martínez O.  
Institución: Facultad de medicina, Universidad de Chile  
Teléfonos: 29770741-29770744.

**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "Configuración de un banco de colección de ADN para estudios farmacogenómicos en población general chilena", debido a la alta tasa de variabilidad de respuesta a los tratamientos farmacológico y la falta de conocimiento de los factores de relevancia clínica involucrados en esta respuesta.

**Objetivos:** Este proyecto tiene por objetivo generar una colección física de material genético, anónima para el análisis de variantes genéticas (polimorfismos) y no genéticas de factores asociados a la respuesta a medicamentos, en la población general chilena. Con ello se podrá contar con una base de datos y un sistema informático para estudios farmacológicos en Chile, lo que será relevante para mejorar la terapia en numerosas enfermedades.

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar será sometido, solamente una vez a:

- Extracción de una muestra de sangre de 10 mL aproximadamente, la cual será realizada con un sistema estéril y por personal calificado, de tal manera de evitar cualquier riesgo. Si usted presenta problemas con la extracción de sangre, podemos brindarle la posibilidad de que su donación sea a través de un sistema de extracción de mucosa oral.
- Llenado de una ficha clínica que incluye datos de identificación personal e historia médica. Tanto la información de la ficha, como los resultados obtenidos en este estudio son absolutamente confidenciales y pueden ser dados a conocer solamente a usted, una vez se encuentren disponibles.
- La muestra obtenida y toda documentación asociada a ella tendrá un plazo máximo de almacenamiento de 15 años, luego de lo cual será eliminado del biobanco, a menos que en dicha fecha usted vuelva a consentir su uso y/o la extracción de una nueva muestra.

**Riesgos:** La única molestia eventual que se prevé derivado de su participación la constituye la eventual aparición de hematoma en la zona de toma de muestra. El equipo de investigación tomará las medidas necesarias para minimizar la aparición de cualquier problema.

CEI-SSM.NORTE  
Organismo Asesor de la Dirección  
Servicio de Salud  
Metropolitano Norte

  
20 MAY 2016

Página 1 de 3 versión 3.0

Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse de la toma de la muestra deberá comunicarlo a Dr. Luis A. Quiñones en el teléfono 29770741 o 90158341.

**Costos:** El procedimiento se realizará sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto. El proyecto no contempla la toma de exámenes para alguna patología en particular.

**Beneficios** Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio no contempla otros beneficios directos que el de aumentar la información con respecto a su posible respuesta a ciertos tratamientos con medicamentos.

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Las muestras serán analizadas utilizando solo un código y el listado que relaciona nombres con códigos se mantendrá guardada con acceso solo al investigador principal.

**Usos potenciales de los resultados de la investigación:** los resultados de esta investigación podrán ser utilizados para en un futuro modificar las pautas terapéuticas de diversas enfermedades.

**Información adicional:** Ud. o su médico tratante para cualquier tratamiento farmacológico que a futuro pudiese tener, podrán ser informados si lo requieren, con objeto de disponer de nuevos conocimientos o cautelar potenciales complicaciones que puedan afectar sus tratamientos con medicamentos.

**Voluntariedad:** Se reitera que su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y puede solicitar de manera escrita que se retire su muestra y datos personales de la base de datos generada. Ello no significará ningún perjuicio a su persona.

**Derechos del participante:** Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

Investigador: Luis Quiñones S. Teléfono: 29770741 o 90158341, mail: [lquinone@med.uchile.cl](mailto:lquinone@med.uchile.cl)

CEI-SSM.NORTE  
Organismo Asesor de la Dirección  
Servicio de Salud  
Metropolitano Norte

20 MAY 2016

Página 2 de 3 versión 3.0

**Otros Derechos del participante**

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Comité de Ética del Servicio Metropolitano de Salud Norte al Teléfono: 25758506, Email: [lorena.carrasco@redsalud.gov.cl](mailto:lorena.carrasco@redsalud.gov.cl), cuya oficina se encuentra ubicada al interior del Hospital San José, Comuna de Independencia.

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto **“Configuración de un banco de colección de ADN para estudios farmacogenómicos en población general chilena”**.

Nombre del participante: \_\_\_\_\_

RUT \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre del Investigador designado \_\_\_\_\_

RUT \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre del Delegado del Director o Ministro de Fe \_\_\_\_\_

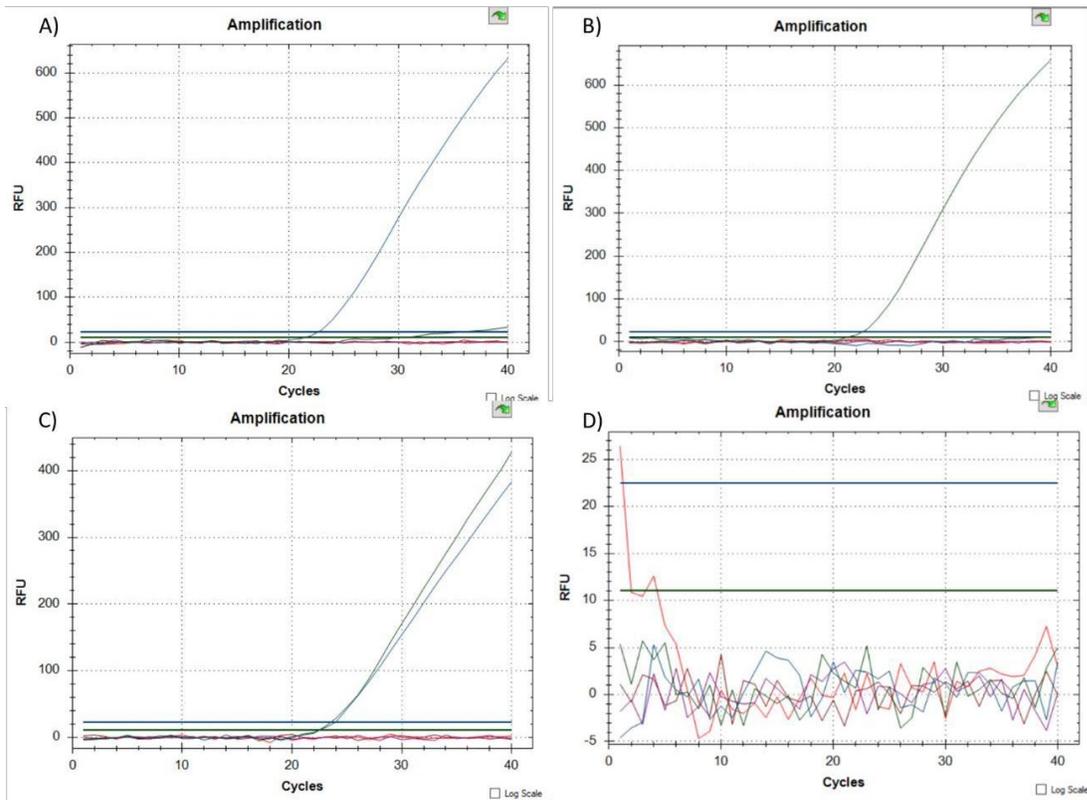
RUT \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

**CEI-SSM.NORTE**  
Organismo Asesor de la Dirección  
Servicio de Salud  
Metropolitano Norte



20 MAY 2016

**ANEXO IV: RT-PCR rs11479: A) homocigoto TT, B) Homocigoto CC, C) Heterocigoto CT, D) Control negativo**



## ANEXO V: Ficha de reclutamiento de los pacientes mCCR

	<b>BASE DE DATOS</b>	<b>Cód.: REG-001</b>
	<b>Ficha de reclutamiento: Protocolo CQF-EC-001-17</b>	<b>Revisión: 02</b>
		<b>Fecha: 09/10/2018</b>
		<b>Página 1 de 2</b>

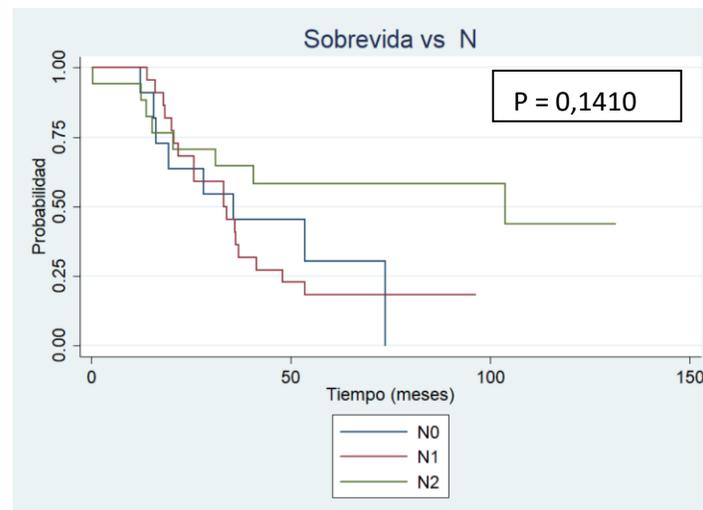
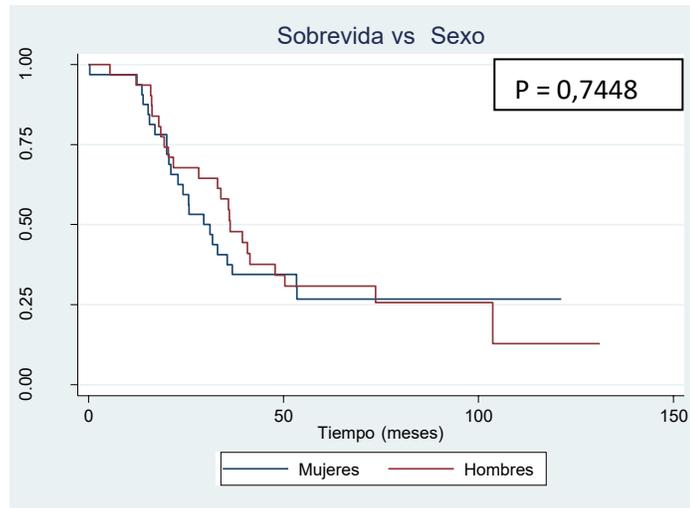
1. Antecedentes sociodemográficos						
Nombres:		Ap. paterno:		Ap. materno:		
Fecha de nacimiento:	Fecha de screening:	Último control:	Fallecido:	Vivo al:	Consulta Registro Civil:	RUT:
___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	_____
Hospital de tratamiento		Hospital de biopsia		Hospital de biopsia		
Ficha hospital de tratamiento		Ficha hospital de biopsia		Ficha hospital de biopsia		
Fecha y N° Biopsia en hospital de tratamiento	___/___/___ N°	Fecha y N° Biopsia	___/___/___ N°	Fecha y N° Biopsia	___/___/___ N°	
Tipo biopsia		Tipo biopsia		Tipo biopsia		
Seleccionada (Si/No):		Seleccionada (Si/No):		Seleccionada (Si/No):		

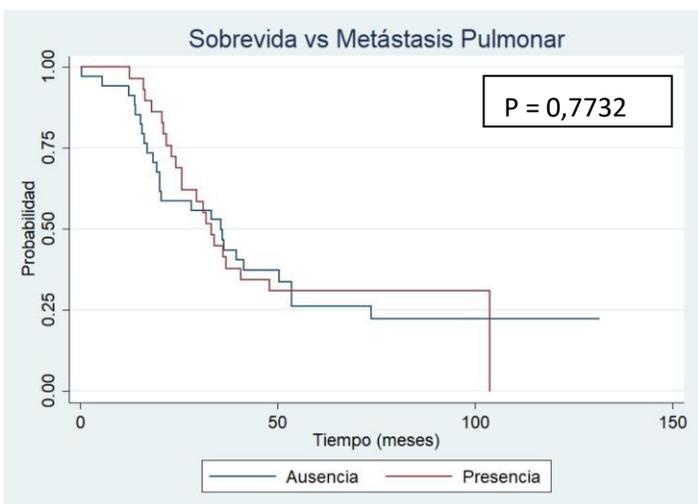
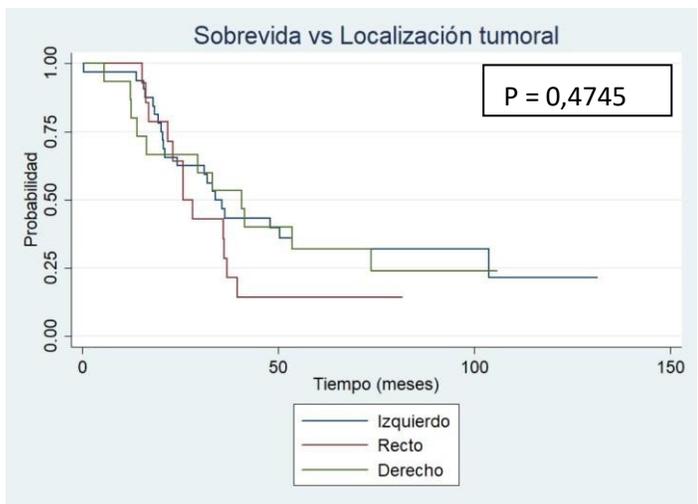
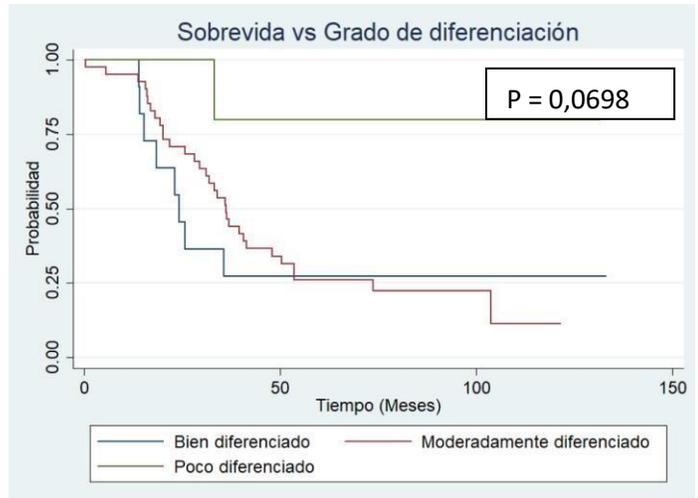
Cumple		2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN
Si	No	
		Pacientes mayores de 18 años diagnosticados con cáncer colorrectal metastásico (CCRM)
		Pacientes que cuenten con identificación del hospital de cirugía o centro donde se hizo el diagnóstico
		Pacientes tratados con quimioterapia 5-fluorouracilo/Capecitabina, leucovorina y oxaliplatino (FOLFOX/CAPOX)
*si tiene al menos una casilla "No", paciente es excluido		
<b>TNM informe AP:</b>		<b>Fecha de diagnóstico:</b> ___/___/___ Inicial ___ Progresión ___ Recaída ___
<b>Diagnóstico AP:</b>		<b>Fecha de radioterapia:</b> ___/___/___ a ___/___/___ <b>NA</b>
<b>Grado:</b>		<b>Fecha Quimioterapia 1:</b> ___/___/___ a ___/___/___ <b>NA</b> Tipo: _____ Ciclos _____
<b>TNM según OM:</b>		<b>Fecha de diagnóstico 2:</b> ___/___/___ Inicial ___ Progresión ___ Recaída ___
<b>Etapas según OM:</b>		<b>Fecha radioterapia:</b> ___/___/___ a ___/___/___ <b>NA</b>
<b>Cáncer secundario (si/no):</b>		<b>Fecha Quimioterapia 2:</b> ___/___/___ a ___/___/___ <b>NA</b> Tipo: _____ Ciclos _____
<b>Observaciones:</b>		

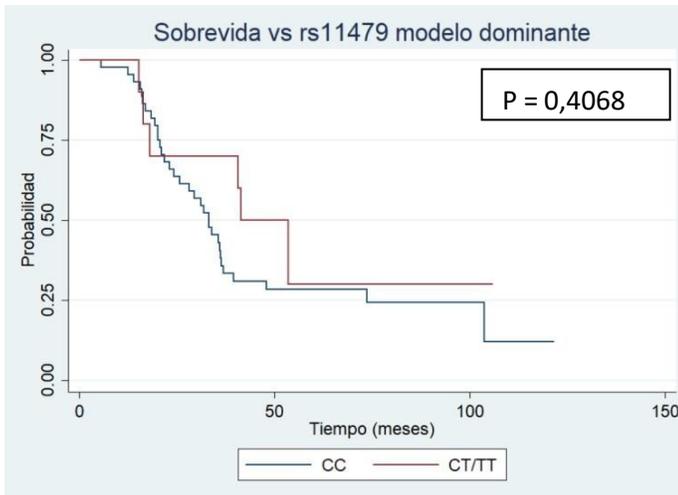
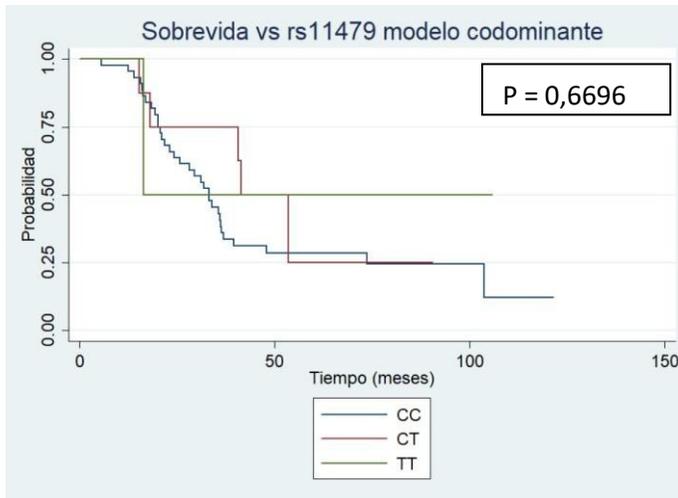
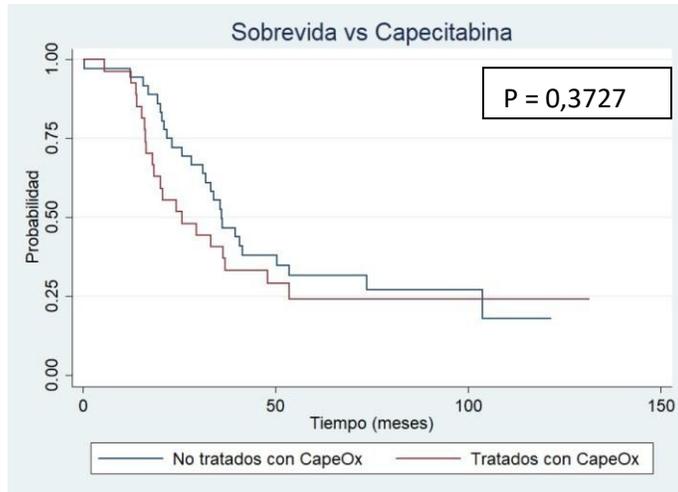
	<b>BASE DE DATOS</b>	<b>Cód.: REG-001</b>
	<b>Ficha de reclutamiento: Protocolo CQF-EC-001-17</b>	<b>Revisión: 02</b>
		<b>Fecha: 09/10/2018</b>
		<b>Página 2 de 2</b>

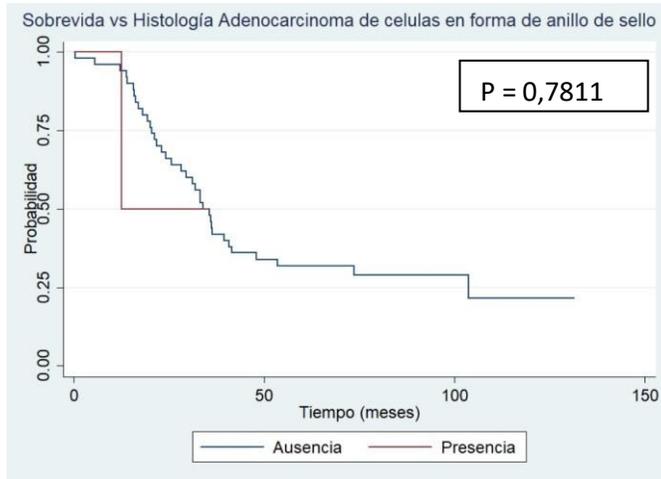
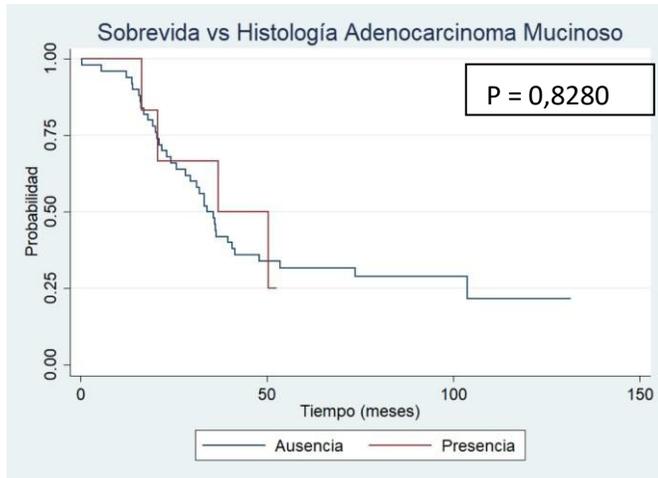
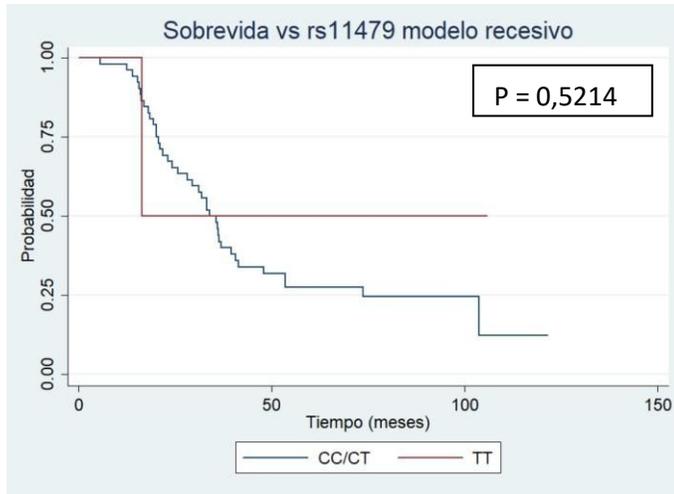
<b>Cumple</b>		<b>3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</b>
<b>Si</b>	<b>No</b>	
		Pacientes con histología diferente a adenocarcinoma
		Pacientes con patologías del sistema inmune previo al diagnóstico de CCRm
		Pacientes sin muestra de biopsia disponible en el hospital de cirugía o centro donde se hizo el diagnóstico.
		Pacientes incluidos en estudio clínico intervencional como parte del tratamiento de CCRm
*si tiene al menos una casilla "Si", paciente es excluido		
<b>¿Paciente es incluido?</b>	Si: _____ No: _____	<b>Código de transitorio:</b>

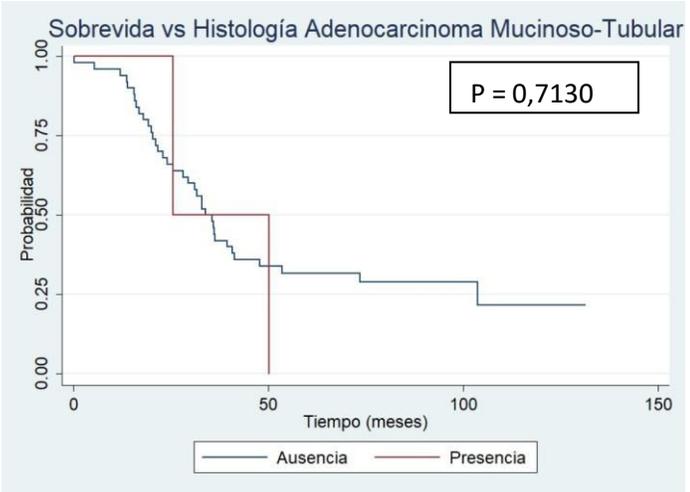
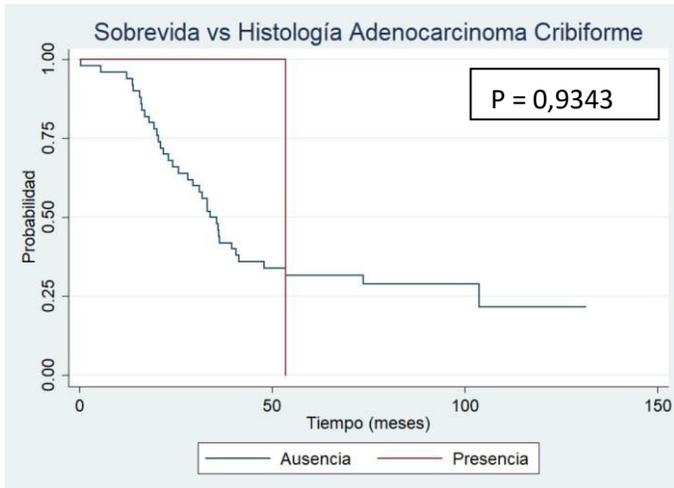
## ANEXO VI: Análisis estadístico no significativos











**ANEXO VII: Tabla de especificación “Otras metástasis”**

<b>Tipo de metástasis</b>	<b>n pacientes</b>
Abdomen	1
Bazo	1
Cerebro	1
Epiplón	1
Estomago	1
Ganglios mesentéricos	1
Implante anexial	1
Implantes retrocucaes	1
Meosigma	1
Mesocolon	1
Mesocolon transverso	1
Epiplón mayor	1
Osea	2
Osteomuscular	1
Ovario	1
Páncreas	1
Para-aorta	1
Paratraqueal	1
Pelvis	1
Peritoneo	3
Retroperitoneo	1
Riñón	1
Sacro	1
Sistema nervioso central	1
ND	4

*ND: No datos disponibles*

### ANEXO VIII: Análisis de Cox univariada, variables no significativas

Variable	HR	<i>p value</i>	IC 95%	<i>p value</i>
<b>sexo</b>				
Femenino	1	ref	--	0,7452
Masculino	0,91	0,745	0,51 - 1,62	
<b>T</b>				
T2	1	Ref	--	0,9028
T3	1,34	0,687	0,31 - 5,72	
T4	1,40	0,667	0,3 - 6,52	
<b>N</b>				
N0	1	Ref	--	0,1206
N1	1,11	0,801	0,48 - 2,56	
N2	0,47	0,151	0,17 - 1,31	
<b>Histología</b>				
Adenocarcinoma	1	Ref	--	0,8257
Mucinoso	0,89	0,828	0,32 - 2,52	
Anillo en forma de sello	1,32	0,782	0,18 - 9,8	
Cribiforme	0,92	0,934	0,13 - 6,75	
Papilar-mucinoso	1,31	0,714	0,31 - 5,45	
<b>Grado de diferenciación</b>				
Bien diferenciado	1	Ref	--	0,0281
Moderadamente diferenciado	0,70	0,399	0,31 - 1,6	
Poco diferenciado	0,11	<b>0,042</b>	0,13 - 0,92	
<b>Localización tumoral</b>				
Izquierda	1	Ref	--	0,501
Recto	1,54	0,236	0,75 - 3,13	
Derecha	1,06	0,877	0,51 - 2,19	
<b>Metástasis pulmonar</b>				
Ausencia	1	Ref	--	0,7733
Presencia	0,92	0,774	0,51 - 1,64	

HR = Hazzard Ratio; IC 95% = Intervalo de Confianza; Ref = Referencia para análisis estadístico; en negrita se destacan las variables con *p-value* < 0,05