



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico

“Caracterización histológica de la expresión de la proteína FTO (del inglés, Fat mass and obesity-associated) y genotípica del alelo de riesgo del polimorfismo rs9939609A del gen FTO en la progresión del cáncer colorrectal”

Alumno: Antonia Luisa Domínguez Beltrando

Tutoras: Dra. Marcela Hermoso Ramello, PhD¹

Dra. Glauben Landskron Ramos, PhD²

(1) Laboratorio de Inmunidad Innata, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

(2) Laboratorio de Investigación en Biomedicina, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Finis Terrae.

Fecha: 8 de Julio del 2022



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico

“Caracterización histológica de la expresión de la proteína FTO (del inglés, Fat mass and obesity-associated) y genotípica del alelo de riesgo del polimorfismo rs9939609A del gen FTO en la progresión del cáncer colorrectal”

Firmas

Marcela A. Hermoso R

Tutora de tesis

Glauben Landskron R.

Co-tutora de tesis

Santiago, 8 de noviembre de 2022

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN


La **Srta. Antonia Luisa Dominguez Beltrando**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: “**Caracterización histológica de la expresión de la proteína FTO (del inglés, Fat mass and obesity-associated) y genotípica del alelo de riesgo del polimorfismo rs9939609A del gen FTO en la progresión del cáncer colorrectal**”, dirigida por la **Prof. Marcela Hermoso**, académica del programa de Inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la **Prof. Glauben Landskron**, académica de la Universidad Finis Terrae.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: **Prof. Marisel González** del Departamento de Tecnología Médica (DETEM) y la **Prof. Carolina Hager** del programa de Inmunología del ICBM, ambas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.


La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Marisel González	7.00	25%
Corrector 2 Carolina Hager	6.87	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	7.00	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.97	

En consecuencia el estudiante **Antonia Luisa Dominguez Beltrando** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Prof. Maroly Müller Sobarzo
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



Prof. Hernán Torres Rivera
PEC curso
Trabajo de Investigación

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación quiero dedicárselo a una persona que siempre está a mí lado y que me inspiró a estudiar Tecnología médica; ella es mi querida madre, Gabriela Beltrando Sepúlveda, que padeció de cáncer mamario, enfrentándose a esta difícil enfermedad y de la cual, logró salir adelante gracias al avance en la investigación clínica. Esta situación me motiva cada día a intentar contribuir en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes con cáncer con el fin de poder mejorar la vida de los pacientes.

Agradecimientos

Primero que todo, quiero agradecer a mis tutoras, Dra. Marcela Hermoso Ramello y Dra. Glauben Landskron Ramos, por haberme brindado la oportunidad de recibirme en su laboratorio como alumna y poder recurrir a sus conocimientos científicos, muchísimas gracias por: ser mi guía constante, el apoyo incondicional, por todos los consejos y comprensión en el desarrollo de la tesis. Por otra parte, quiero agradecer a la TM Daniela Araya y todos los integrantes del Laboratorio de Inmunidad Innata de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por entregarme apoyo, sugerencias, conocimientos y ánimo. Quiero agradecer especialmente a Gonzalo Vázquez por poner a mi disposición todo lo necesario para trabajar en laboratorio en el desarrollo de la tesis. También quiero agradecer a los pacientes que aceptaron participar en el presente estudio permitiendo desarrollar esta tesis, esperamos contribuir en el conocimiento de esta enfermedad. Finalmente, mi eterna gratitud a mis padres queridos Gabriela Beltrando y Alejandro Domínguez que siempre han procurado mi bienestar y gracias a su esfuerzo he podido estudiar. A mis hermanos Camila, Alejandro y Agustín por darme fuerza y cariño.

El trabajo se realizó bajo el marco del proyecto FONDECYT, ANID Fondecyt Regular 1170648 y Fondecyt Postdoctorado 3190931.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
1. Contexto Epidemiológico del Cáncer Colorrectal (CCR)	2
2. Fisiopatología del CCR	3
3. Obesidad como factor de riesgo del CCR	5
4. Función de la proteína FTO	6
5. El gen y la proteína FTO están asociados a obesidad	7
6. El rol de FTO en cáncer	8
7. La Transición epitelio-mesénquima (EMT) en CCR	10
8. Relación entre FTO y la EMT en CCR	11
9. Relación entre variantes génicas del gen FTO, la obesidad y CCR	12
Hipótesis, Objetivo General y Específicos	14
Materiales y Métodos	15
Resultados	25
Discusión	44
Conclusiones	49
Bibliografía	51
Anexos	57

Resumen: La obesidad es un factor de riesgo del cáncer colorrectal (CCR). El gen asociado a masa grasa y obesidad (FTO), codifica una enzima desmetilasa que participa en la remoción N⁶-metiladenosina (m⁶A), regulando la expresión génica, los genes involucrados suelen tener un papel oncogénico, impactando en procesos de progresión tumoral, como la transición epitelio-mesénquima (EMT). La proteína FTO está asociada con una variedad de cánceres, pero el rol promotor o protector es aún controversial en el desarrollo del CCR. El polimorfismo rs9939609**A** del gen FTO ha sido fuertemente asociado a obesidad y ha sido estudiado débilmente su asociación con el CCR, en pacientes chilenos es desconocido. El objetivo fue determinar la relación de la expresión de la proteína FTO y/o el alelo de riesgo rs9939609**A** del gen FTO con la progresión del CCR. Se observó, un aumento en los niveles de expresión de FTO en células tumorales y estroma desde estadios tempranos en tejidos tumorales versus no tumoral (Kruskal Wallis, $p < 0,05$, $n = 22$), mediante inmunohistoquímica. Además, tejidos con alta expresión de FTO tendieron al aumento de marcadores mesenquimales (ZEB-1, N-cadherina, Vimentina) y la expresión del marcador epitelial (E-cadherina) aumento a nivel citoplasmático, tanto en células tumorales como en estroma (Mann-Whitney, $p < 0,05$). Se asoció FTO directamente con el marcador mesenquimal ZEB-1 en el estroma (Pearson, $p < 0,05$ y $r > 0,8025$); mediante inmunofluorescencia doble. El genotipado del polimorfismo rs9939609**A/T** FTO, se realizó mediante secuenciación. La aparición del genotipo **AA** y el alelo de riesgo **A** en pacientes con CCR fue mayor en comparación con los controles (Chi-cuadrado, $p < 0,05$, casos=92 y controles=122). La asociación entre el alelo de riesgo **A** y CCR siguió siendo significativa después de ajustar por modelos (regresión logística binaria). Sugerimos que FTO tiene un rol pro-tumoral en la progresión, impactando en EMT y la presencia del alelo de riesgo **A** del polimorfismo rs9939609 FTO puede estar involucrada a una mayor susceptibilidad de CCR en pacientes chilenos.

Introducción

1. Contexto Epidemiológico del Cáncer Colorrectal (CCR)

El CCR incluye el adenocarcinoma de colon y el adenocarcinoma de recto, los cuales forman parte de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial. Según los datos del GLOBOCAN 2020 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CCR es, a nivel mundial, el segundo cáncer con mayor incidencia en mujeres (865.630 casos) y el tercero en hombres (1.065.960 casos). La mayoría de los casos ocurre en países desarrollados, siendo Eslovaquia el con mayor incidencia y, por su parte, Bangladesh, país menos desarrollado, el con menor incidencia. En términos de mortalidad, el CCR ocupa el segundo lugar a nivel mundial, con un mayor número de muertes en países menos desarrollados (1). En Chile, los informes de datos epidemiológicos registraron 2.417 casos nuevos de CCR en ambos sexos el año 2012. Sin embargo, la Tasa Ajustada de Incidencia (TAI) fue levemente mayor en hombres (10,8 por 100.000 habitantes) en comparación a las mujeres (9,6 por 100.000 habitantes). Por otro lado, la Tasa Anual de Mortalidad (TAM) para el CCR aumentó más del 20% entre los años 2000 y 2016, registrándose, para el año 2016, una TAM de 7,19 por 100.000 habitantes en el cáncer de colon y 1,99 por 100.000 habitantes en el cáncer de recto (2). Debido a su alta relación con la aparición de metástasis, es de suma importancia una detección temprana de esta enfermedad para su supervivencia, considerando que los pacientes con cáncer localizado presentan de un 70 a un 90% de sobrevida libre de enfermedad a 5 años, en comparación a la supervivencia del cáncer metastásico, correspondiente a un 10% (3). Por lo tanto, en Chile, así como a nivel mundial, el CCR es un problema de salud pública.

2. Fisiopatología del CCR

El CCR es una enfermedad multifactorial que, en la mayoría de los casos, comienza con un foco de cripta aberrante y evoluciona con la aparición de pólipos, adenomas y adenocarcinomas, que corresponden a la etapa final de transformación maligna del epitelio. Alrededor del 10% de los adenomas progresan a cánceres invasivos. La evolución de células epiteliales normales a un adenocarcinoma es un proceso impulsado por la acumulación de mutaciones somáticas en genes, tales como *APC* (*del inglés, Adenomatous Polyposis Coli*), *KRAS* (*Kirsten Rat Sarcoma Virus*), *CTNNB1* (*Catenin Beta 1*) y *TP53* (*Tumor Protein p53*), y alteraciones epigenéticas (4). En el diagnóstico histopatológico del carcinoma colorrectal, aproximadamente un 90% corresponde a adenocarcinomas que se originan de las células epiteliales, mientras que otros tipos histológicos menos frecuentes son los tumores neuroendocrinos, mucinosos, de células escamosas, de células en anillo de sellos, entre otros (5). El diagnóstico histopatológico, sumado a la evaluación clínica, permite estadificar bajo el criterio TNM a los pacientes, el cual los agrupa en estadios del I al IV según el grado de invasión tumoral (T), el compromiso en linfonodos (N) y la presencia de metástasis en órganos distantes (M). La extensión de la invasión de células neoplásicas determina la estadificación y la estimación del pronóstico de los pacientes. El estadio 0, denominado cáncer *in situ*, es una etapa temprana en que las células neoplásicas se encuentran solo en la mucosa. Luego, durante el estadio I, las células neoplásicas atraviesan la mucosa e invaden la capa muscular del colon o el recto, pero no se diseminan a tejidos cercanos ni ganglios linfáticos. Cuando el tumor sigue creciendo, se habla de estadio II, donde se invade la pared del colon y estructuras cercanas, pero no los ganglios linfáticos. Cuando el tumor invade linfonodos, se clasifica como estadio III. Finalmente, el estadio IV involucra la presencia de metástasis en órganos distantes (6)

Los factores ambientales y genéticos son importantes en la etiología del CCR. La mayoría de los CCR son esporádicos (88–94%), mientras que los hereditarios representan cerca del 5-10%. Por lo tanto, existe una mayor causalidad de factores ambientales en la generación del CCR. Los factores de riesgo asociados al CCR esporádico están relacionados con mayor edad, sexo masculino, factores medioambientales (obesidad, diabetes mellitus, tabaquismo, sedentarismo y dieta rica en carnes y grasa, pero pobre en fibras), antecedentes familiares (pólipos, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, mamario u ovario) y enfermedades inflamatorias (enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa). En el CCR hereditario, las dos formas principales son la poliposis adenomatosa familiar causada por una mutación del gen *APC* o del gen *MUTYH* (*MutY DNA glicosylasa*) y el síndrome de Lynch (no polipósico) causado por mutaciones en genes de la vía del sistema reparador del ADN (*MLH1* (*del inglés, MutL Homolog 1*), *MSH2* (*MutS Homolog 2*), *MSH6* (*MutS Homolog 6*), *PMS2* (*PMS1 Homolog 2*) o *EPCAM* (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*)) (7). Los factores dietéticos y ambientales, como **obesidad**, tabaquismo y poca actividad física, también pueden interactuar con cambios genéticos para promover el desarrollo de los cánceres de colon (4). Comprender los mecanismos que participan en el fenotipo CCR es esencial para diseñar terapias contra el cáncer. Por lo tanto, se necesitan estudios profundos con la finalidad de mejorar la prevención, diagnóstico y el tratamiento del CCR.

3. Obesidad como factor de riesgo del CCR

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define obesidad como: “Una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud”. Una forma simple de medirla es mediante el Índice de Masa Corporal (IMC). La evidencia epidemiológica asocia la obesidad con una mayor incidencia de cáncer colorrectal. En hombres, existe una asociación positiva entre el IMC y CCR, mientras que es más débil en mujeres (8). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estima que la obesidad es la causa del 11 % de los casos de CCR (9).

Existen varios mecanismos moleculares compartidos entre obesidad y CCR. La obesidad induce una hiperinsulinemia crónica, el aumento de insulina estimula el receptor *IGF-1* (del inglés, *Insulin-like Growth Factor I*) / *IR* (*Insulin Receptor*) y citoquinas proinflamatorias que consiguientemente activan las vías *P13K / Akt* (*Signaling Pathway of Phosphatidylinositol 3-Kinase*) y *MAPK* (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), estimulando la supervivencia y proliferación de células neoplásicas. Hay muchas vías que conducen al cáncer de colon asociado con la obesidad, por ejemplo, la vía de inflamación *NFκB* (*Nuclear Factor Kappa B*), las vías de supervivencia *P13K / Akt* y *MAPK*, la vía *Wnt/β-catenina* y la activación de genes como *FTO*, *leptina*, *ciclina D*, *MMP* (*Matrix Metalloproteinase*) y *STAT3* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*). Los mecanismos de estos genes activados todavía se están investigando intensamente (8) (10). Existen evidencias de que polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) específicos del gen *FTO* están asociados con la obesidad y la susceptibilidad del cáncer (11).

4. Función de la proteína FTO

El gen asociado a la masa grasa y obesidad (*FTO*, de inglés *Fat mass and obesity-associated gene*) ubicado en el cromosoma 16p12.2 contiene 8 intrones y 9 exones. El gen *FTO* pertenece a la familia de las proteínas dioxigenasas dependientes de α ketoglutarato. *FTO* es un enzima que participa en la modificación N⁶-metiladenosina (m⁶A) - (metilación en la posición N⁶ de la adenosina del ARN mensajero (ARNm)) que es una modificación transcripcional interna del ARNm que participa en el empalme, procesamiento, traducción y degradación selectiva del ARNm, regulando la expresión génica (11). La modificación m⁶A es un proceso altamente dinámico y reversible, compuesto por una serie de enzimas como las metiltransferasas denominadas “escritores” que transfieren un grupo metilo (CH₃-) y las desmetilasas denominados “borradores” que eliminan un grupo CH₃- en la adenosina del ARNm. La proteína *FTO* es una desmetilasa que se encarga de regular la expresión génica contrarrestando las metilaciones ejercidas por otras proteínas por medio de las desmetilaciones (12), figura 1. La enzima *FTO* se ubica principalmente en el núcleo y puede desplazarse parcialmente entre el núcleo y el citoplasma (11).

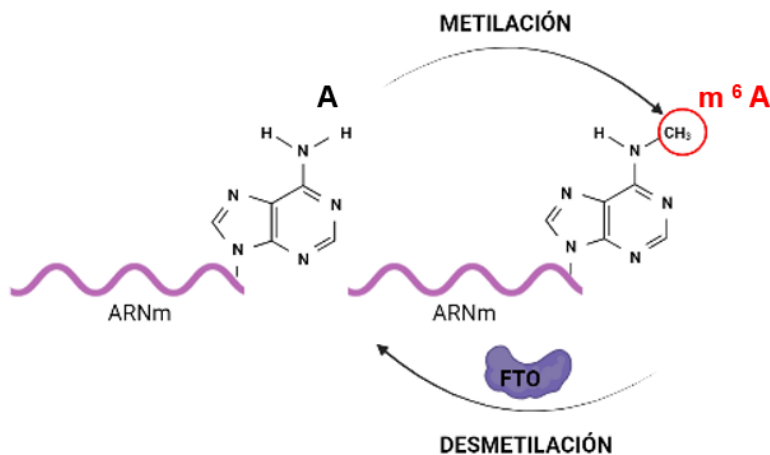


Figura 1:
Modificación de FTO en N⁶-metiladenosina (m⁶A). La proteína FTO remueve grupos metilos (CH₃-) de adenosinas (A).

De acuerdo con los datos The Human Protein Atlas, la enzima FTO se expresa ampliamente en varios tejidos del cuerpo humano, con niveles más altos en el cerebro, los islotes pancreáticos y los órganos digestivos. La enzima FTO se ha asociado con diversos tipos de cáncer y su participación podría impactar procesos involucrados en progresión tumoral, tales como la transición epitelio-mesénquima (por sus siglas en inglés, EMT) (13) (14).

5. El gen y la proteína FTO están asociados a obesidad

La proteína FTO está relacionada al desarrollo de masa grasa en el organismo. Estudios de asociación de todo el genoma han revelado que los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) del primer intrón de FTO como rs9939609, rs9930506, rs8050136, entre otros, están asociados con el IMC y el desarrollo de obesidad. El alelo de riesgo **A** del polimorfismo rs9939609 del gen FTO es el que mayormente ha sido estudiado, encontrándose una fuerte asociación con el aumento del IMC y en el riesgo a obesidad en diferentes poblaciones (14). Un estudio realizado en Chile, en pacientes adultos analizó la genotipificación del polimorfismo rs9939609 para determinar la variante alélica [**TT** - homocigoto para el alelo protector, **AT** - heterocigoto para el alelo de riesgo, **AA** - homocigoto para el alelo de riesgo], asociándolos con distintos marcadores de adiposidad. El principal hallazgo de este estudio confirmó que la variante rs9939609**A** del gen FTO se asocia significativamente con un incremento en el peso corporal, IMC y porcentaje de masa grasa. Concluyendo que según el genotipo presente del polimorfismo rs9939609 **AT**, por cada copia adicional del alelo de riesgo **A** incrementan las variables de adiposidad (15).

En la obesidad, el mecanismo principal para el almacenamiento de energía es la acumulación excesiva de tejido adiposo. En pacientes obesos existe una correlación positiva entre FTO y el IMC, evidenciándose un nivel de ARNm de FTO más alto en el tejido adiposo en comparación a los controles. La evidencia respalda que la desmetilación de m^6A mediada por FTO tiene un rol fundamental en la regulación de la adipogénesis. Los mecanismos exactos de cómo FTO modula la grasa corporal no son conocidos en su totalidad, sin embargo, el alelo de riesgo **A** del polimorfismo rs9939609 del gen FTO, se ha asociado a un aumento en la expresión de la proteína FTO, un aumento en la desmetilación m^6A -Ghrelinina o disminución en la metilación m^6A -Ghrelinina y a una mayor expresión de la hormona Grelina, que induce la sensación de hambre (16). En células de sangre periférica de sujetos con genotipo **AA** se evidenció el aumento del ARNm de FTO, una disminución en la metilación m^6A -Ghrelinina y una mayor cantidad de ARNm de Ghrelinina en comparación a sujetos con genotipo **TT** del polimorfismo rs9939609 del gen FTO (17).

6. El rol de FTO en cáncer

La modificación m^6A y sus enzimas modificadoras, dentro de las cuales se incluye FTO, están desreguladas en varios tipos de cáncer, desempeñando varias funciones, ya que los genes diana metilados pueden ser protooncogenes o genes supresores de tumores (18). Los genes modificados con m^6A se han asociada a la carcinogénesis, invasión y metástasis; y suelen tener un papel oncogénico en el cáncer, lo que conduce a alteraciones de la traducción del ARNm, y la disminución de la modificación de m^6A da como resultado el desarrollo de tumores mediante la activación de vías oncogénicas (19). Diversos estudios respaldan las funciones oncogénicas de FTO como desmetilasa m^6A en varios tipos de cáncer por su expresión anormal y sus efectos en genes diana que afectan diversas

vías de señalización, sin embargo, la función de FTO en diferentes tipos de cáncer depende del contexto, por lo que FTO puede funcionar como promotor o supresor de tumores (18). Los SNPs de la enzima *FTO* se relacionan con mayores riesgos de cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de páncreas, el cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer gástrico, Leucemia mieloide aguda (LMA), Glioblastoma (GBM), cáncer de pulmón y melanoma, con algunas variaciones entre diferentes razas. Sin embargo, el papel molecular subyacente de FTO, los patrones de expresión específicos y el valor clínico de FTO en el cáncer colorrectal son en gran parte todavía desconocidos, discutidos y requieren más investigación (10). En tejido de cáncer mamario con sobreexpresión de *HER-2 (ERBB-2 Receptor Tyrosine Kinase 2)*, el nivel de expresión de la proteína FTO en los tejidos tumoral fue significativamente mayor que en los tejidos adyacentes y en modelos celulares la sobreexpresión de *FTO* en las células de cáncer de mama aumentó el metabolismo energético a través de la vía de señalización *PI3K/AKT* desencadenando proliferación celular (18). En cáncer gástrico, FTO aumenta tanto a nivel de la proteína como del ARNm, asociando su regulación al alza de FTO a un peor pronóstico (20). Otro caso de sobreexpresión de FTO es en LMA que promueve la supervivencia y proliferación de las células cancerígenas, y a la vez inhibe la diferenciación y apoptosis (19). La proteína FTO podría ser un blanco terapéutico en los tratamientos de cánceres con terapias dirigidas mediante el uso de inhibidores farmacológicos, por ejemplo, el R-2-hidroxiglutarato (R-2HG), mostró efectos antiproliferativos en LMA y GBM en ratones, ya que aumenta los niveles de m⁶A, suprimiendo vías oncogénicas como *MYC proto-oncogene/CEBPA (CCAAT enhancer binding protein alpha)* (21). Si bien, en la mayoría de las evidencias, FTO se sobreexpresa en los cánceres humanos teniendo el papel como oncogén, por otro lado, existen evidencias del rol de FTO como un gen supresor de tumor en un conjunto de subtipos de cáncer epitelial. Cuando la expresión de FTO se regula a la baja conduce a un

aumento en la modificación de m⁶A en los ARNm que da como resultado la activación de la vía de señalización *Wnt-β-catenina*, lo cual activa la EMT para promover la progresión del cáncer (22). Por otro lado, una expresión reducida de FTO ha sido detectada en los cánceres de páncreas promoviendo así la proliferación y la invasión de células tumorales, mientras que otros estudios abordan su expresión aumentada, evidenciando el comportamiento dual de FTO (18). Por lo tanto, es importante averiguar el patrón de expresión de FTO y sus vías de señalización molecular involucradas en la progresión del cáncer colorrectal como objetivo potencial para la medicina en el cáncer.

7. La Transición epitelio-mesénquima (EMT) en CCR

La EMT es un proceso en el cual las células epiteliales adquieren características mesenquimales. En los tumores malignos, la EMT es crucial para la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso con propiedades invasivas y metastásicas, lo que conduce a la progresión del tumor (23). Los eventos que ocurren durante la EMT incluyen la pérdida de uniones adherentes y regulación a la baja de marcadores epiteliales específicos (citoqueratinas y E-cadherina) y el aumento de marcadores mesenquimales, como fibronectina, N-cadherina, vimentina y factores de transcripción que incluyen Snail1 / Snail, Snail2 / Slug, Twist (Twist-related protein 1) y ZEB-1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1) (24). En el CCR la EMT se asocia con un fenotipo invasivo o metastásico (25) y se caracteriza por la activación de factores transcripcionales, tales como Snail y ZEB-1 que reprimen la expresión de marcadores epiteliales e inducen los de tipo mesenquimal, por ejemplo, la expresión positiva de ZEB-1 se correlaciona significativamente con una menor expresión de E-cadherina y un aumento en la expresión de vimentina, asociándose a un peor pronóstico en los pacientes con CCR (26). Las células tumorales en estas condiciones

pierden las comunicaciones intercelulares y adquieren un fenotipo fusiforme, que le permite desplazarse a través de la matriz extracelular e invadir otros tejidos (27); histológicamente están representadas por brotes tumorales, que se define como una sola célula tumoral aislada o un grupo compuesto por menos de cinco células tumorales indiferenciadas que están dispersas en el estroma (26).

8. Relación entre FTO y la EMT en CCR

En CCR, se han revelado interacciones físicas y funcionales complejas entre los reguladores de m⁶A y la EMT. Cuando los niveles de m⁶A bajan, se mantienen las células en un estado de pluripotencia, que sugiere un fenotipo de células madre. En pacientes con CCR con subtipos moleculares de consenso únicos (del inglés, CMS), más específicamente, los pacientes de subtipo CMS4, los cuales son de peor pronóstico, mostraron una asociación positiva significativa entre las proteínas reguladores m⁶A (incluido FTO) y genes relacionados con EMT. Observándose, que la expresión génica de FTO se correlacionó significativamente con ZEB-1; además de mayor infiltración estromal e inmunitaria (13). Sin embargo, se ha observado experimentalmente que al inhibir FTO en células tumorales de CCR, al contrario de lo que sucede en otros tipos de cáncer descritos previamente, el desarrollo tumoral se ve favorecido, ya que se produce aumento en la tasa de formación de colonoesferas (células tumorales de CCR) in vitro. Estos mismos resultados se expresan in vivo, en ratones knockout de FTO que se ve mayor tendencia a la formación de tumores. Además, los niveles de metilación m⁶A no varían en los ratones knockout de FTO, en cambio, los salvajes, cuya desmetilación está mediada por FTO, si varían; lo que sugiere que los efectos de la proteína FTO en células tumorales colorrectales se deben una disminución de la desmetilación de m⁶A (3). Por lo tanto, el rol directo de

FTO en la progresión del cáncer colorrectal es aún controversial, ya que es posible que su participación sea como un factor promotor en la progresión del cáncer o un factor protector, inhibiendo la proliferación celular.

9. Relación entre variantes génicas del gen FTO, la obesidad y CCR

La sobreexpresión de la proteína FTO podría aumentar la incidencia de cáncer colorrectal a través de vías dependientes e independientes de la obesidad. Sin embargo, en la tumorigénesis podrían ocurrir en paralelo tanto la vía dependiente como la independiente. La sobreexpresión de FTO a través de la vía dependiente de la obesidad, está relacionado con el aumento en la ingesta de alimentos a través de la hormona del apetito, influyendo en los mediadores de las respuestas inflamatorias como citoquinas que pueden promover alteraciones genéticas o epigenéticas para el desarrollo del CCR. En la vía independiente, la proteína FTO puede iniciar moléculas de señalización celular como STAT3, ciclina D1 y MMP participando en la regulación de la proliferación celular (10). Varios estudios epidemiológicos han informado la fuerte asociación de los polimorfismos FTO con el riesgo de desarrollar obesidad, siendo la variante rs9939609**A** uno de los SNP del gen FTO más ampliamente estudiado. Sin embargo, actualmente, pocos estudios han investigado la asociación de la variante rs9939609**A** con el riesgo de desarrollar CCR, por un lado, se ha informado asociaciones del alelo de riesgo **A** de la variante rs9939609 con un riesgo reducido de cánceres, mientras que otros han identificado una asociación positiva entre el alelo **A** del polimorfismo rs9939609 y el riesgo de cáncer (28). En pacientes chilenos, aún no se ha estudiado esta asociación en CCR.

De acuerdo con las evidencias descritas, la proteína FTO podría estar sobreexpresada en tejidos de pacientes con CCR, participando como un factor promotor en la progresión de CCR e impactar en procesos involucrados en la progresión tumoral, tales como la transición epitelio-mesénquima. Además, el alelo de riesgo **A** de la variante rs9939609 uno de los SNP del gen FTO, ha sido relacionados fuertemente con obesidad, que es un factor de riesgo para la etiología del CCR, por lo tanto, el alelo de riesgo podría estar aumentando el riesgo a desarrollar CCR, estableciéndose una posible asociación genética positiva entre alelo de riesgo A de las variantes rs9939609 del gen FTO y el CCR en pacientes chilenos.

Los resultados obtenidos en esta tesis contribuirán en conocimiento sobre la expresión y localización de FTO en tejidos tumorales y no tumorales, en la progresión del CCR y estudiar la asociación del alelo de riesgo rs9939609**A** del gen FTO con el CCR, ya que rol de FTO es aún controversial y podría ser útil como un marcador pronóstico o un blanco terapéutico.

Hipótesis

La sobreexpresión de la proteína FTO y el alelo de riesgo rs9939609A del gen FTO se asocian con la progresión del cáncer colorrectal.

Objetivo

Objetivo general:

Determinar la relación de la expresión de la proteína FTO y/o el alelo de riesgo rs9939609A del gen FTO con la progresión del cáncer colorrectal.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar histológicamente la expresión y localización tisular de la proteína FTO, en diferentes estadios de progresión del cáncer colorrectal, mediante inmunohistoquímica.
2. Caracterizar genóticamente las variantes alélicas del polimorfismo asociado a obesidad (rs9939609A/T) del gen FTO, mediante secuenciación en pacientes con cáncer colorrectal.
3. Evaluar la asociación entre la expresión de la proteína FTO y marcadores específicos de la transición epitelio-mesénquima en biopsias de pacientes con cáncer colorrectal, mediante inmunofluorescencia indirecta doble.
4. Evaluar la expresión de la proteína FTO según las variantes genéticas del polimorfismo SNP (rs9939609A/T) en pacientes con cáncer colorrectal.

Materiales y Métodos

Diseño experimental

Estudio de *caso y control*, realizado a partir de la recolección de: a) muestras de tejido tumoral y no tumoral de pacientes con CCR; b) muestras de sangre de pacientes con CCR y controles normales o benignos, y c) información clínica de todos los pacientes/sujetos enrolados. Los centros de obtención de las muestras de pacientes fueron desde el Servicio de Cirugía Coloproctología, el Biobanco de Tejidos y Fluidos (BTUCH) del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH) y del Servicio de Coloproctología de Clínica las Condes (Figura 2).

El diseño del estudio es de tipo *prospectivo transversal*, se estudiaron **22** muestras pacientes de mucosa intestinal tumoral y no tumoral correspondiente a tejido adyacente benigno, se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 2 p/v% en PBS y se incluyeron en parafina, obteniéndose cortes histológicos de 4 micrones para la caracterización de la expresión de la proteína FTO. Se utilizó otra cohorte de **92** pacientes con CCR, **49** controles normales (34 sin historial familiar y 15 con historial familiar), **73** pacientes benignos con adenomas (16 con historial familiar y 59 sin historial familiar) para la caracterización de las variantes alélicas del polimorfismo (rs9939609**A/T**) del gen FTO a partir del ADN de sangre. Además, solo 9 de 22 muestras de tejido de pacientes con cáncer colorrectal, se obtuvo el ADN derivado de leucocitos de sangre periférica para la evaluación de los niveles de expresión de la proteína FTO según las variantes genéticas del polimorfismo (rs9939609A/T).

Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (*certificado 29 de septiembre del 2021, ver **Anexo N°1***), la Clínica las Condes (*certificado el 24 de junio de 2019, ver **Anexo N°2***) y el Biobanco de Tejidos y Fluidos del

Hospital Clínico de la Universidad de Chile (*certificado el 7 de junio de 2022, ver **Anexo N°3***), se obtuvo el consentimiento informado de todas las muestras los pacientes con CCR y de los controles. Todas las muestras y la información clínica de los pacientes mantuvieron de forma incógnita la identidad de los pacientes mediante un código único con el fin de mantener el ciego en los análisis posteriores. La evaluación de los cortes histológicos fue realizada por un patólogo respetando el ciego de la información de los pacientes.

Pacientes

Los criterios de inclusión considerados fueron muestras de tejidos obtenidos de pacientes mayores de 18 años con diagnóstico confirmado de adenocarcinoma de colon y se excluyó aquellos pacientes que están sometidos a quimioterapia o radioterapia neoadyuvante o cuya muestra que comprometa el diagnóstico histológico del paciente por tamaño del tejido. Además, se incluyeron sujetos que no padecen cáncer, quienes conformaron el grupo control. Estas personas son del programa Previcolon de la Clínica las Condes, los cuales son sometidos a colonoscopia de screening preventivo de enfermedades intestinales.

A partir de los datos almacenados en las fichas clínicas anonimizadas de los pacientes se consideró para los análisis la clasificación según estadio en base a la estratificación TNM. Además, se utilizó la información de otras características como la edad, sexo, el antecedente familiar de los pacientes.

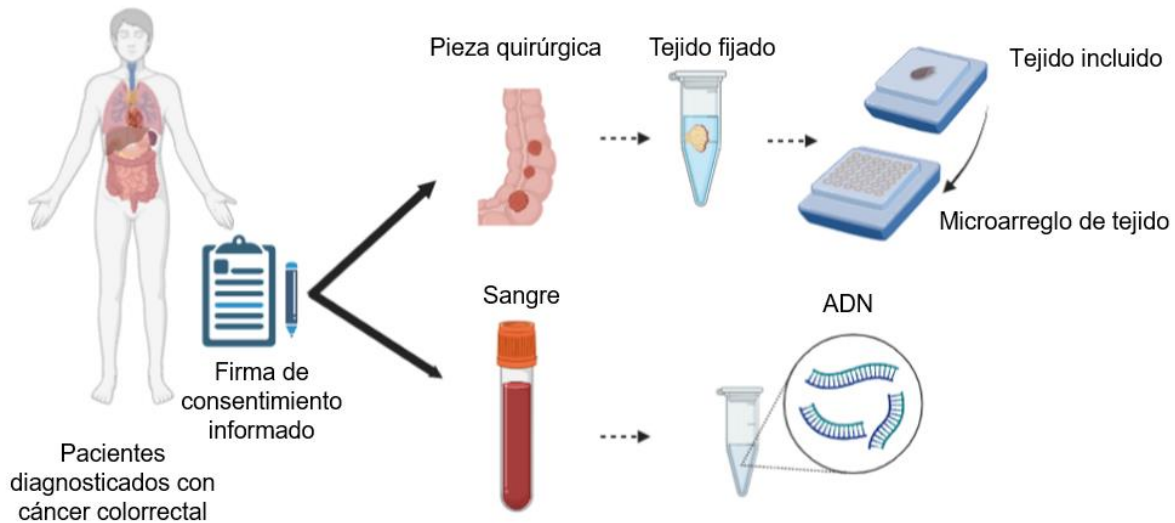


Figura 2: Diagrama de obtención de muestras de pacientes con Cáncer Colorrectal.

Recolección de muestras provenientes de tres centros (el Servicio de Cirugía Coloproctología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, el Biobanco de Tejidos y Fluidos de la Universidad de Chile y el Servicio de Cirugía Coloproctología de la Clínica las Condes). Los pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal previo a la cirugía firmaron un consentimiento informado para la donación de muestras. Se recolectaron muestras de tejido tumoral y adyacente benigno, las cuales se fijaron en paraformaldehído; y muestras de sangre. Las muestras de tejidos fijados se incluyeron en parafina y se confeccionaron microarreglos de tejidos, en cambio, las muestras de sangre se extrajo el ADN de los leucocitos periféricos.

Técnicas

Elaboración de microarreglos de tejidos (del inglés, Tissue MicroArray-“TMA”)

Se construyeron los TMA de tejido tumoral y no tumoral o tejido adyacente benigno a partir de 22 muestras de tejidos fijados en PFA 2% p/v en PBS e incluidos en parafina de pacientes con CCR. Un patólogo seleccionó una zona representativa del tejido cercanas al frente de invasión y al centro tumoral mediante la observación de la Tinción de Hematoxilina / Eosina. Se utilizó un punzón de 0,6 mm de diámetro (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EE. UU.). Los núcleos de tejido incluido en parafina fueron transferidos a un nuevo taco de parafina con distribución de un TMA para el tumor y un TMA para el tejido adyacente benigno. Se agregaron dos núcleos de tejido renal con fines de orientación. Luego, se cortaron secciones de 4 micrómetros siendo transferidas a portaobjetos de vidrio cargados positivamente y se procedió a realizar la inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica indirecta

Para caracterizar el contenido de niveles de expresión de FTO se identificó esta proteína mediante inmunohistoquímica indirecta en los TMA en tejidos tumorales y no tumorales o tejidos adyacentes benignos de 22 pacientes con CCR. Las secciones de tejidos del TMA se dejaron durante 1 hora a 60°C en la estufa, después se desparafinaron y rehidrataron. Se realizó la recuperación antigénica utilizando una solución de Tampón Citrato a pH 6,0 en una vaporera por 20 minutos a 100°C y se enfriaron en agua destilada durante 10 minutos. Luego, se bloquearon las peroxidasas con una solución 3% v/v de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 10 minutos, después se realizó el bloqueo de reactividad inespecífica con suero normal de caballo al 2,5% p/v (S-2012-50, Vector Laboratories) por 30 minutos. Sin lavar, se removió el exceso de suero y se procedió a incubar durante 30 minutos con el anticuerpo primario anti-FTO de ratón isotipo IgG a la dilución 1:250

(anticuerpo monoclonal de ratón, sc-271713, Santa Cruz Biotechnology (SCBT), EE. UU). Posteriormente se aplicó el sistema de detección VECTASTAIN® Elite ABC-HRP kit (Peroxidasa, Universal) (PK.6200, Vector Laboratories CA, USA), el cual se aplicó en dos pasos. Primero, se procedió a incubar por 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de ratón dirigido contra el anticuerpo primario. Segundo, se procedió a incubar por 30 minutos con el sistema de amplificación ABC (avidina, biotina y peroxidasa). Las secciones se revelaron con solución sustrato-cromógeno 3´3-diaminobencidina (DAB) durante 3 segundos y se contrastaron con Hematoxilina de Mayer por 5 minutos. Los tejidos se montaron en medio hidrófobo permanente Entellan. Todo el procedimiento se llevó a cabo a T ° ambiente; y entre las incubaciones se lavó con TBS-Tween 20 3x2 minutos. Para validar la especificidad de la técnica, se utilizó un control negativo paralelo correspondiente a tejido de un paciente con cáncer colorrectal en el cual se reemplazó el anticuerpo primario por suero normal de caballo al 2,5% p/v, por igual tiempo y condiciones que el primario.

Las imágenes de inmunohistoquímicas fueron digitalizadas mediante el equipo Aperio ScanScope. El análisis de imágenes se realizó mediante el programa Aperio ImageScope (Leica Biosystems), utilizando el algoritmo Positive Pixel Count 9 para evaluar píxeles positivos. La porción de píxeles positivos fue detectada mediante el precipitado café capturado en la imagen, entregándonos una aproximación del contenido de la proteína FTO dentro de los TMA. Se cuantificó zonas representativas de cada muestra, sin identificar un tipo celular en específico, pero seleccionando 2 zonas como regiones de interés, la región nº1 exclusivamente células epiteliales en el tejido adyacente benigno y células tumorales para los tejidos tumorales; y la región nº2 exclusivamente células de la lámina propia en el tejido adyacente benigno y células estromales en los tejidos tumorales. Finalmente, la expresión cuantificada del contenido de FTO en cada región se evaluó mediante el Índice

De Positividad que corresponde a la porción de píxeles de inmunotinción positiva con respecto al total de píxeles positivos y negativos por área.

Secuenciación

La variante genética del polimorfismo rs9939609 (**A/T**) del gen FTO se determinó mediante **Secuenciación De Sanger Por Electroforesis Capilar**, a partir de DNA aislado de leucocitos de sangre periférica de pacientes con CCR y controles normales o benignos. La extracción de ADN de las muestras de sangre se realizó utilizando un QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN). Después, se amplificó el segmento genómico del polimorfismo rs9939609 mediante PCR convencional. El par de cebadores directo e inverso del polimorfismo rs9939609 del gen FTO, respectivamente son Fw: 5' TGGCTCTTGAATGAAATAGGATTCA 3'- Rv: 5' CACTCAGCCTCTCTACCATCTT 3'. En la mezcla de PCR se utilizó Invitrogen Platinum *Taq* ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). El procedimiento de PCR consistió en una incubación inicial de 2 min a 94°C, 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, luego 56°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de PCR por electroforesis se analizaron bajo luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio en los geles de agarosa. Luego, el producto de PCR, se envió a una empresa (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) que purifica el producto amplificado del segmento genómico del polimorfismo rs9939609, y que hace la Secuenciación De Sanger Por Electroforesis Capilar, luego los datos de los resultados se proporcionaron en un archivo AVI y se compararon con la secuencia de referencia del The National Center for Biotechnology Information (NCBI) en la plataforma Benchling (<https://www.benchling.com>).

Inmunofluorescencia indirecta doble

Para evaluar la expresión de proteína FTO en células tumorales y el desarrollo de un fenotipo mesenquimal se utilizó inmunofluorescencia indirecta doble en muestras de tejidos fijados en formalina e incluido en parafina de pacientes con CCR con alta y baja expresión de FTO, los tejidos fueron seleccionados después de la cuantificación relativa de inmunohistoquímica de FTO. Se utilizaron anticuerpos específicos dirigidos contra marcadores específicos de la EMT (E-cadherina (E-cad), N-cadherina (N-cad), Vimentina, ZEB-1) y FTO, los cuales fueron estandarizados antes de su uso.

Las muestras de tejidos fueron desparafinadas (Neoclear, Merck), rehidratadas (desde etanol absoluto a etanol 70°) y calentadas en una solución de recuperación antigénica con buffer de citrato, pH 6,0 por 25 minutos en una vaporera ~100°C. Luego, los cortes se enfriaron durante 10 minutos, después se incubaron con glicina 100mM (bloqueo de autofluorescencia) y con albúmina bovina sérica (BSA) 2,5% en PBS1X por 1 hora (bloqueo de proteínas inespecíficas). Los tejidos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en 1% BSA/ 0,05% Tween: anti-FTO isotipo IgG 1/250 (anticuerpo monoclonal de ratón, sc-271713, Santa Cruz, Biotechnology (SCBT), EE.UU), en conjunto con: anti-N-cad isotipo IgG1 1/167 (anticuerpo monoclonal de ratón, 33-3900, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU), anti-E-cad isotipo IgG1 1/200 (anticuerpo monoclonal de ratón, 610181, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.), anti-Vimentina isotipo IgG 1/200 (anticuerpo monoclonal de conejo ,EPR3776, Abcam, Biosonda, S.A), anti-ZEB-1 isotipo IgG 1/200 (anticuerpo policlonal de conejo, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU). Posterior a los lavados con PBS1X, las secciones de tejido se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) IgG anti-ratón de cabra conjugado con Alexa

Fluor 546 (1/200) y IgG anti-conejo/anti-ratón de burro conjugado con Alexa Fluor 488 (1/200) (Tabla 1). Se utilizó Hoechst 33342 (1/500) como contratinción nuclear. Finalmente, los cortes fueron cubiertos con un cubreobjetos más solución de montaje (Dako, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE. UU.). La observación de los cortes fue realizada en un microscopio confocal C2+ (Nikon Instruments Inc, Melville, NY, EE. UU.), se tomaron fotografías con el objetivo 20x. Para validar la especificidad de la técnica, se aplicaron controles paralelos: de autofluorescencia (sin anticuerpo primario ni secundario, se reemplazó por 1% de BSA /0,05% Tween y PBS1X, respectivamente), negativo sin anticuerpo primario (se reemplazó por 1% de BSA /0,05% Tween), de isotipo IgG1 de ratón y IgG de conejo.

El análisis de imágenes se realizó en Image J, se seleccionaron áreas en las muestras en zonas de células tumorales y estroma para todos los marcadores. La medición cuantificada de las intensidades de la expresión de los marcadores fue proporcionada mediante la densidad integrada que agregó píxeles al área marcada de las imágenes.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Suero de bloqueo
Anti-FTO de ratón y Anti-vimentina de conejo	IgG anti-ratón 546 de cabra IgG anti-conejo 488 de burro	Cabra y burro al 3% en 2,5 % de BSA
Anti-FTO de ratón y Anti-ZEB-1 de conejo	IgG anti-ratón 546 de cabra IgG anti-conejo 488 de burro	Cabra y burro al 3% en 2,5 % BSA
Anti-FTO de ratón y Anti-N-cad de ratón *	IgG anti-ratón 546 de cabra IgG anti-ratón 488 de burro	Cabra al 3% en 2,5% BSA Ratón al 5% en 2,5% BSA
Anti-FTO de ratón y Anti-E-cad de ratón *	IgG anti-ratón 546 de cabra IgG anti-ratón 488 de burro	Cabra al 3% en 2,5% BSA Ratón al 5% en 2,5% BSA

**Para vimentina y ZEB-1 se realizará inmunofluorescencia indirecta doble simultánea, mientras que para E-cad y N-cad se realizará inmunofluorescencia indirecta secuencial por ser anticuerpos primarios de la misma especie.*

Tabla 1: Conjugación de inmunofluorescencia indirecta doble.

Análisis Estadístico

Objetivos 1, 3 y 4: Los datos fueron analizados por la prueba normalidad D'Agostino-Pearson para evaluar su distribución. Los datos con distribución normal fueron expresados como medias más desviación estándar y los datos no paramétricos expresados como medianas más rango intercuartil. Para la comparación entre grupos fueron utilizadas las pruebas Mann-Whitney y para comparar más de dos grupos Kruskal Wallis. Las asociaciones fueron evaluadas mediante test de regresión lineal y coeficiente Pearson.

En Detalle, el estudio comparativo de los niveles expresión de la proteína FTO entre tejido tumoral y tejido adyacente benigno, se utilizó la prueba **Mann-Whitney** no paramétrica para datos no pareados en las regiones N°1 células epiteliales/tumorales y N°2 lámina propia/estroma. Para la determinación de la región que más expresa FTO se compararon las regiones de células tumorales con el estroma mediante la prueba **Mann-Whitney** no paramétrica para datos no pareados en los estadios del cáncer I, II, III. Para comprar entre grupos los niveles expresión de FTO en relación con los diferentes estadios del cáncer I, II, III, respecto al tejido adyacente benigno, se utilizó la prueba **Kruskal- Wallis** para datos no pareados en las regiones de células epiteliales/tumorales y lámina propia/estroma. Los niveles de expresión relativa de los marcadores de la EMT se compararon con los tejidos tumorales de alta y baja expresión de FTO, mediante la prueba **Mann-Whitney**, no paramétrica para datos no pareados. La asociación entre FTO y los marcadores EMT tanto células tumorales como estroma, fue mediante la prueba de **correlación de Pearson**. Finalmente, la comparación entre los niveles de expresión de la proteína FTO y las variantes genóticas del polimorfismo rs9939609**A/T** del gen FTO, se utilizó la prueba **Mann-Whitney**, no paramétrica para datos no pareados.

Los resultados fueron analizados mediante el software **Graphpad Prism**, versión 9 para realizar las distintas pruebas estadísticas. Para todos los análisis que se extrajo del programa se consideró **p<0,05** como estadísticamente significativos.

Objetivo 2: Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg para evaluar la distribución del genotipo (**TT, AT y AA**) del gen FTO tanto en casos como controles, mediante la comparación de las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas, utilizando la prueba estadística **chi-cuadrado (X²)**. El X² teórico para un nivel de significación de 0.05 es de 3.84, correspondiente a 1 de grado de libertad (3 clases fenotípicas - 2 alelos). No se rechazó la hipótesis del equilibrio si es que X² experimental es menor que la X² teórica. (47).

Para evaluar si existe una mayor asociación de riesgo del alelo A en pacientes con cáncer colorrectal (CCR), se compararon la frecuencias genotípicas y alélicas de casos y controles mediante el método de chi-cuadrado.

Las características generales de los pacientes casos y controles se compararon mediante **métodos de chi-cuadrado** (para variables cualitativas: sexo, antecedente, genotipo) y **prueba t-student independiente** (para variables cuantitativas: edad). Se realizó un **análisis de regresión logística binaria multivariada**, ajustando modelos de regresión para investigar la asociación entre el cáncer colorrectal y el alelo de riesgo según el modelo genético dominante (**TT frente a AT+AA**) teniendo en cuenta su relación con otras variables. El ajuste de los modelos realizados fue por sexo (modelo 1); sexo y antecedente (modelo 2); sexo, antecedente y edad (modelo 3).

Los análisis estadísticos se realizaron con el software **SPSS versión 26** y en todos los análisis, el valor de **p <0,05** se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Objetivo 1:

Mayor expresión de FTO en células tumorales y estroma en tejidos tumorales de pacientes con CCR

Las biopsias de 22 pacientes (8 hombres y 14 mujeres), edad promedio 65 años (rango 33 – 85) fueron estudiadas en los TMA para identificar la proteína FTO mediante inmunohistoquímica indirecta. Se observó, tinción positiva café para FTO, predominantemente nuclear, con mayor intensidad en células tumorales y en el estroma del tejido tumoral, y menor intensidad en las células epiteliales y la lámina propia del tejido adyacente benigno (Figura 3), a partir de esta descripción histológica se seleccionaron las regiones N°1 y N°2 (descritas en métodos) para su cuantificación.

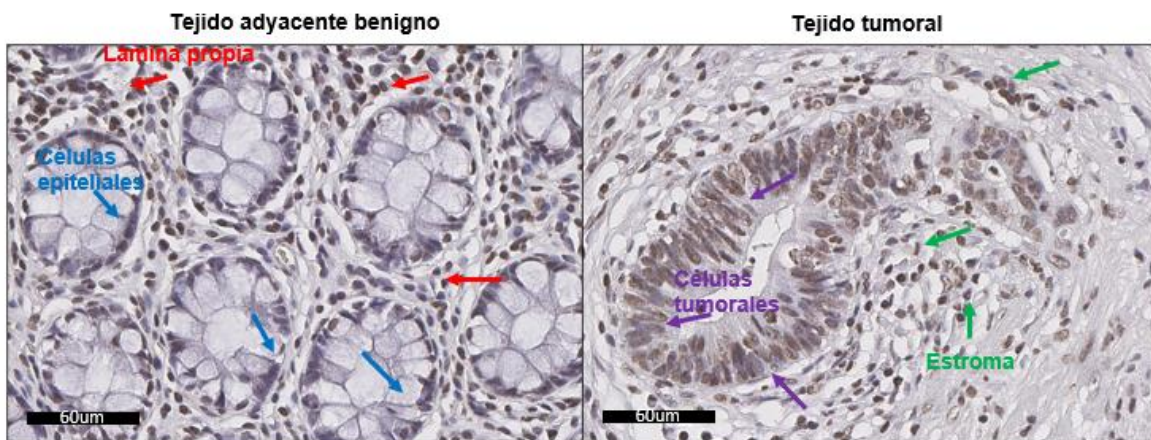


Figura 3: Imágenes representativas de la expresión de FTO en tejidos adyacentes benigno y tumoral de pacientes con CCR mediante inmunohistoquímica en microarreglos de tejido (del inglés, TMA). Ampliación 40X (barra 60µm).

La expresión de FTO cuantificada mediante el Índice de Positividad (células positivas para FTO/células positivas y negativas) fue significativamente mayor en células tumorales ($\mu=0,177$, $\sigma=0,095$) en comparación a las células epiteliales ($\mu=0,142$, $\sigma=0,067$) de la mucosa del tejido adyacente benigno ($p<0,0001$), (Figura 4, A). Por otra parte, la expresión de FTO también fue significativamente mayor en el estroma ($\mu=0,276$, $\sigma=0,078$) en comparación a la lámina propia ($\mu=0,240$, $\sigma=0,082$) del tejido adyacente benigno ($p<0,0058$), (Figura 4, B).

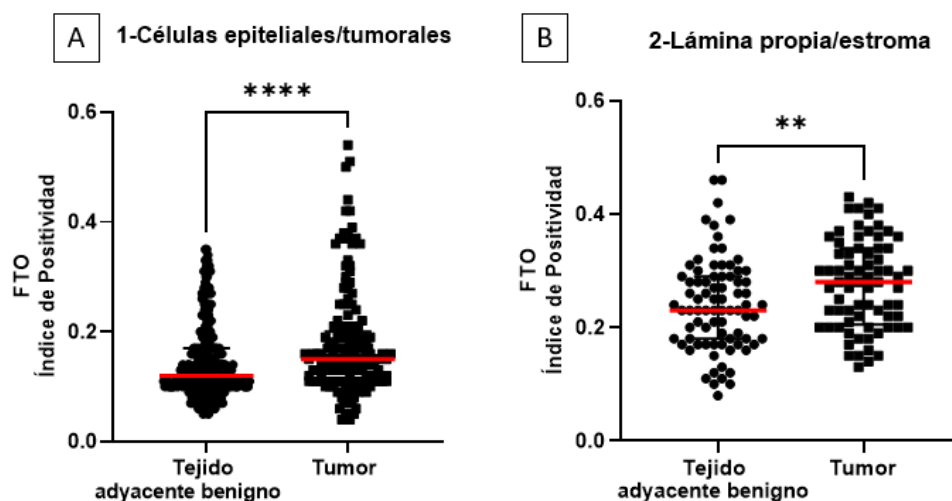
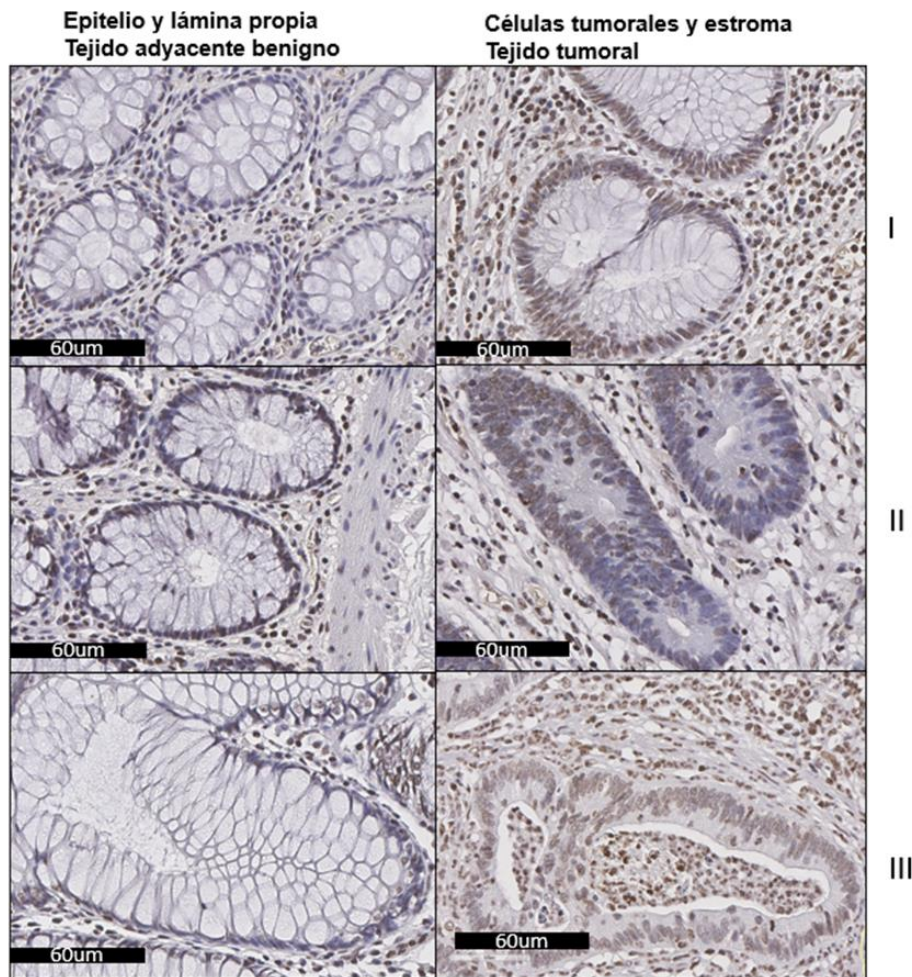


Figura 4: Expresión de FTO en tejido adyacente benigno y tejido tumoral en pacientes con CCR. La expresión de la proteína FTO está significativamente aumentada en tejidos tumorales en las células tumorales (A) y en el estroma (B), en comparación al tejido adyacente benigno. La prueba estadística utilizada fue Mann-Whitney, para datos no pareados y no paramétricos. En los Gráficos (A) $p^{****}=0,0001$ y (B) $p^{**}=0,0058$ son menores que 0,05, indicando un nivel de significancia mayor. Los resultados están expresados en mediana \pm rango intercuartil.

Mayor expresión de FTO en el estroma en comparación a las células tumorales según los estadios I, II y III del CCR

Los niveles de expresión de FTO en células tumorales se compararon con aquellos del estroma según el estadio I, II y III para determinar en cuál zona estos eran mayores. Se observó, mayor intensidad de tinción café nuclear de FTO en los estadios I, II y III en las células tumorales y estroma respecto al tejido adyacente benigno (Figura 5).



Figuras 5: Patrones representativos de expresión de FTO en estadios I, II y III en tejidos tumorales y tejidos adyacentes benignos de pacientes con CCR mediante inmunohistoquímica en los TMA. Ampliación 40X (barra 60µm).

La expresión de FTO es significativamente mayor en el estroma durante los estadios I ($\mu=0,319$, $\sigma=0,060$), II ($\mu=0,263$, $\sigma=0,087$) y III ($\mu=0,253$, $\sigma=0,073$), en comparación a las células tumorales de los estadios I ($\mu=0,177$, $\sigma=0,077$), II ($\mu=0,164$, $\sigma=0,115$) y III ($\mu=0,164$, $\sigma=0,115$), ($P<0,0001$), (Figura 6).

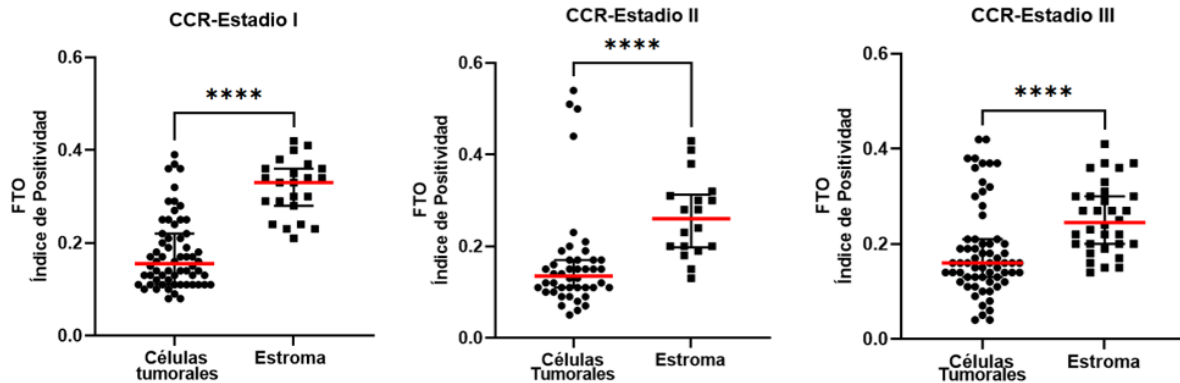


Figura 6: Expresión de FTO en células tumorales y estroma en los estadios I, II y III del CCR. La expresión de FTO es significativamente mayor en el estroma en comparación a las células tumorales en los estadios I, II y III. La prueba estadística utilizada fue Mann-Whitney, para datos no pareados y no paramétricos. **Los $p^{****}=0,0001$** son menores que 0,05, indicando un nivel de significación mayor. Los resultados están expresados en mediana \pm rango intercuartil.

La expresión de FTO aumenta desde estadios tempranos en células tumorales y en el estroma en la progresión del CCR

Los niveles de expresión de FTO según los diferentes estadios se compararon con aquellos del tejido adyacente benigno (N), tanto para células tumorales como estromales. La expresión de FTO en las células tumorales aumentó de manera significativa durante los estadios I y III en comparación a la expresión de las células epiteliales del tejido adyacente benigno (N) ($p=0,0009$) y ($p=0,0002$). No se observaron diferencias significativas durante el estadio II, aunque sí aumentó su proporción en el tumor respecto al tejido adyacente benigno (Figura 7, A). En el caso del estroma, la expresión de FTO en el tejido tumoral aumentó de manera significativa durante el estadio I en comparación a la expresión de la lámina propia del tejido adyacente benigno (N) ($p=0,0002$). En cuanto a los estadios II y III, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en la expresión de FTO, sí aumentó su proporción respecto al tejido adyacente benigno. Además, se observó que decrece la expresión de FTO significativamente durante el estadio III en comparación al estadio I en el estroma del tejido tumoral ($p=0,0121$). (Figura 7, B).

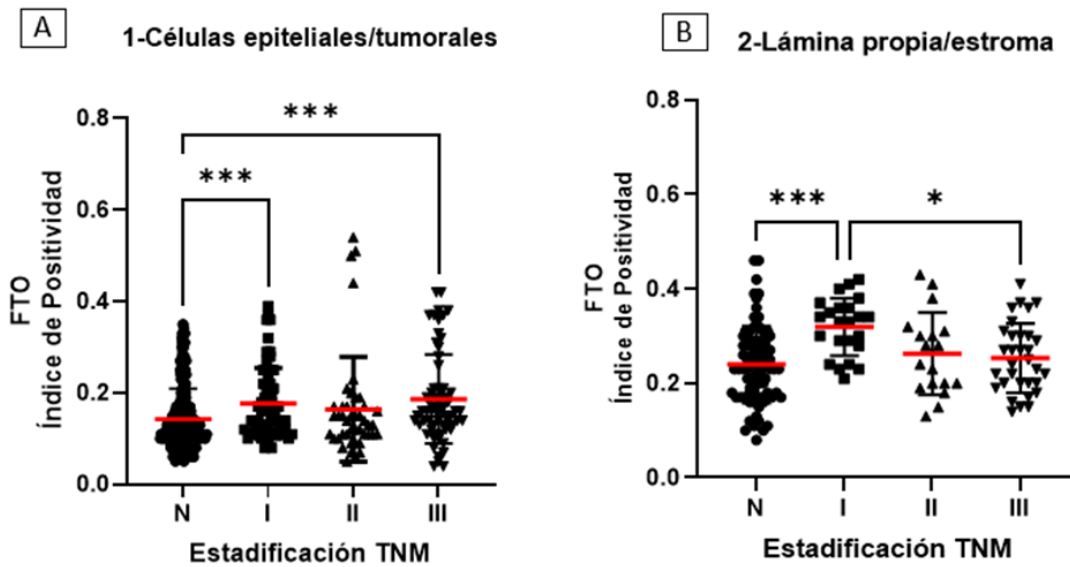


Figura 7: Expresión de FTO asociado a los diferentes estadios del cáncer I, II, III. Los niveles de expresión de FTO aumentan significativamente en células tumorales en el estadio I y III (A). Los niveles de expresión de FTO aumentan significativamente en el estroma en el estadio I (B). N= es tejido adyacente benigno. La prueba estadística utilizada fue Kruskal Wallis, para datos no pareados no paramétricos para comparar entre estadios.. Los p^{***} y p^* son menores que 0,05, indicando un nivel de significación mayor. Los resultados están expresados en mediana \pm rango intercuartil.

Objetivo 2:

Los pacientes con cáncer colorrectal presentan mayor frecuencia del genotipo AA y alelo de riesgo A

La secuenciación del polimorfismo rs9939609 del gen FTO para determinar la variante alélica **A/T** en 92 pacientes CCR, 49 controles sanos (sin hallazgo) y 73 benignos (adenomas y pólipos); y su posterior agrupación de acuerdo con su genotipo permiten vislumbrar que, el grupo de pacientes CCR presentó las siguientes frecuencias genotípicas: **TT=46** (50,00%), **AT=37** (40,22%), **AA=9** (9,78%); mientras que en el grupo control benignos: **TT= 48** (67,75%), **AT=24** (32,88%), **AA=1** (1,37 %) y el grupo control sano: **TT=33** (67,35%), **AT=15** (30,61%), **AA=1** (2,04%). Una mayor frecuencia para los genotipos **AA** y **AT** fue encontrada en pacientes con CCR en comparación a los normales y benignos ($p=0.0368$). (Figura 8, A). En relación con la presencia del alelo A o T dentro del genotipo de los individuos estudiados según los datos analizados, el grupo de pacientes con CCR presentó frecuencias alélicas de: **T= 129** (70,11%), **A= 55** (29,89%); mientras que en el grupo control benigno: **T=120** (82,19%), **A=26** (17,81%) y control sano: **T=81** (82,65%) **A=17** (17,35%). Un predominio por el alelo de riesgo **A** fue observado en pacientes con CCR en comparación a los normales y benignos ($p=0.0114$). (Figura 8, B).

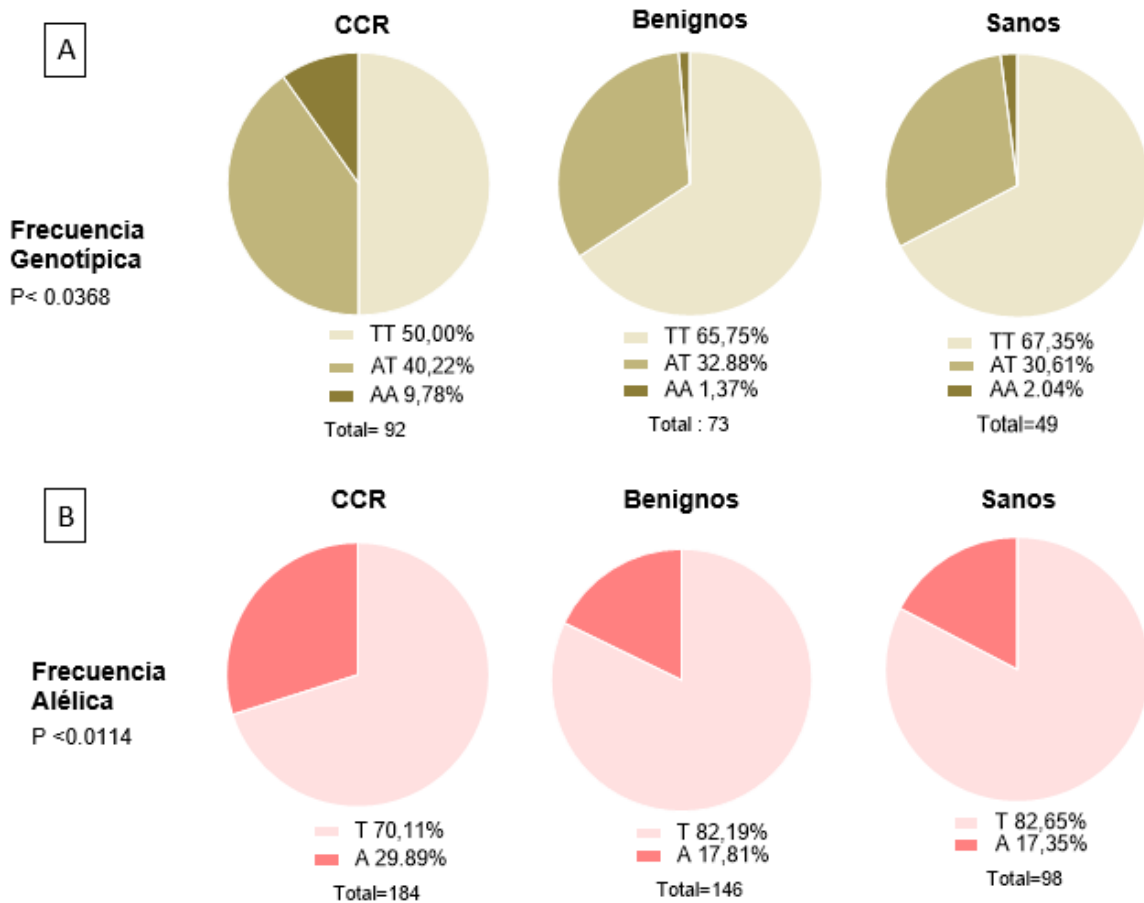


Figura 8: Frecuencia genotípica y alélica en pacientes con CCR, benignos y sanos del polimorfismo rs9939609 del gen FTO. Mayor frecuencia genotípicas AA y AT (A) y frecuencia alélica A (B) en pacientes con CCR. La prueba estadística utilizada fue Chi-cuadrado. Se consideraron $p < 0,05$ estadísticamente significativos. Los resultados están expresados en porcentajes.

Asociación positiva entre el alelo de riesgo A del polimorfismo rs9939609 del gen FTO y el CCR

La población para el estudio de casos y controles se compone de 92 pacientes con CCR y 122 controles (sanos + benignos), los resultados de secuenciación de la genotipificación del polimorfismo rs9939609 del gen FTO en los pacientes, fueron descritos previamente y permitieron evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg encontrándose que las Frecuencias Genotípicas tanto en controles como casos no se desviaron del equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2= 1,262$ y $X^2= 0,245$), respectivamente. La frecuencia genotípica del polimorfismo rs9939609 reveló una diferencia significativa ($p<0,0063$) entre los grupos de casos y controles. El genotipo **AA** está sobrerrepresentado en los casos (9,78%) comparado con los controles (1,64%) así como también el genotipo **AT**, en los casos (40,22%) comparado con los controles (31,97%). Por otra parte, la frecuencia alélica reveló una diferencia significativa ($p<0,0036$) entre grupos de casos y controles. El alelo **A** está sobrerrepresentado en los casos (29,89%) que en los controles (17,62%) (Figura 9).

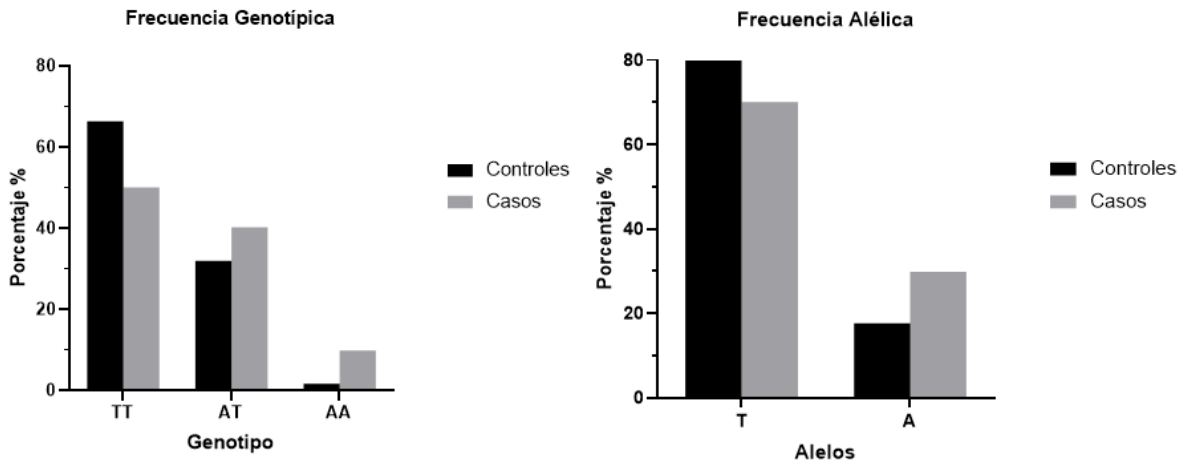


Figura 9: Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo rs9939609 del gen FTO en grupo de casos y controles. Mayor frecuencia genotípica (**AA y AT**) y alélica (**A**) en casos que controles. La prueba estadística utilizada fue Chi-cuadrado. Se consideraron $p < 0,05$ estadísticamente significativos. Los resultados de las Frecuencias Genotípicas y Alélicas están expresados en porcentajes.

Las características generales de los casos y controles incluidos en el estudio de regresión logística binaria se muestran en la Tabla 2. Se excluyeron 4 pacientes con CCR por tener incompletos sus datos, sin embargo, el genotipo **AA** siguió estando sobrerrepresentado en los casos (10,23%) que en los controles (1,64%) ($p < 0.0055$). Se observó, que entre los grupos de casos y controles existen diferencias significativas para el sexo ($p < 0,0004$), teniendo los grupos de casos un mayor número de pacientes hombres en comparación con el grupo control. Los controles presentan un mayor antecedente familiar que los casos, lo cual tiene explicación puesto que estos controles vienen de un programa preventivo de screening de CCR, comparado con los casos que presentan CCR no necesariamente con

un componente familiar ($p < 0,0234$). No hubo diferencias significativas en la edad media (\pm desviación estándar) en los grupos de casos y controles ($p < 0,640$)

Características	Controles n=122	Casos n=88	Valor P
Edad	66,25 \pm 7,61	67,00 \pm 13,55	0,6470
Sexo			
Femenino	83 (68,03%)	38 (43,18%)	0,0004
Masculino	39 (31,97%)	50 (56,82%)	
Antecedente			
Si	31 (25,41%)	11 (12,50%)	0,0234
No	91 (74,59%)	77 (87,50%)	
Genotipo			
0 (AA)	2 (1,64%)	9 (10,23%)	0,0055
1 (AT)	39 (31,97%)	35 (39,77%)	
2 (TT)	81 (66,39%)	44 (50,00%)	

Tabla 2: Características de los pacientes en estudio. Las características cualitativas (sexo, antecedente familiar, genotipo) se utilizó la prueba estadística Chi-cuadrado y para la característica cuantitativa (edad) prueba T-student.

La asociación entre el cáncer colorrectal y el polimorfismo rs9939609A del gen FTO se investigó mediante regresión logística binaria, los resultados se presentan en la Tabla 3. La variable dependiente del estudio es la presencia o ausencia de CCR (pacientes con CCR y controles (sanos + benignos)) y las variables independientes son el genotipo (construida como variable dummy para **TT**, **AT**, **AA**), sexo, antecedente familiar y edad (dicotomizada a mayores de 70 años). En todos los modelos estudiados los chi-cuadrado de la prueba omnibus resultaron con una significancia menor de 0,05 lo que indicó que el modelo ayudó a explicar el evento, es decir, las variables independientes explican a la variable dependiente. La asociación entre el alelo de riesgo (**A**) - Genotipo **AA** y la incidencia de CCR siguió

siendo significativa después del ajuste por sexo (Modelo 1), (B=1,89, p<0,021). Luego, en un ajuste adicional por sexo y el antecedente familiar (Modelo 2) también se mantuvo como efecto que la asociación entre el alelo de riesgo (**A**) - Genotipo **AA** y la incidencia de CCR siguiera siendo significativa, (B=1,76, p<0,032). Finalmente, en un ajuste adicional por sexo, antecedente familiar y edad (Modelo 3) el efecto de asociación entre el alelo de riesgo (**A**) - Genotipo **AA** y la incidencia de CCR siguió siendo significativo (B=1,78, p<0,031).

Modelo	Componentes	Chi-cuadrado	gl	B	Exp (B)	Valor P
Modelo 1		21,337	3			0,000
	Genotipo TT					0,017
	Genotipo AT			0,511	1,667	0,096
	Genotipo AA			1,889	6,614	0,021
	Sexo			0,961	2,615	0,001
Modelo 2		24,27	4			0,000
	Genotipo TT					0,017
	Genotipo AT			0,494	1,639	0,111
	Genotipo AA			1,761	5,817	0,032
	Sexo			0,921	2,513	0,002
Modelo 3	Antecedente			-0,666	0,517	0,095
		24,689	5			0,000
	Genotipo TT					0,017
	Genotipo AT			0,485	1,625	0,118
	Genotipo AA			1,782	5,944	0,031
	Sexo			0,917	2,503	0,002
	Antecedente			-0,622	0,537	0,120
Edad	0,201			1,223	0,517	

Tabla 3: Estimaciones B para la asociación entre el polimorfismo rs9939609A del gen FTO y CCR. El genotipo **AA** sigue siendo significativo después de ajustar al modelo 1, 2 y 3. Prueba estadística utilizada regresión logística binaria. En negrita se indican aquellos valores p<0,05 como estadísticamente significativos para el genotipo AA.

Objetivo 3:

Marcadores mesenquimales se expresan positivamente en tejidos tumorales de alta y baja expresión de la proteína FTO en pacientes con CCR

Los marcadores de la transición epitelio-mesénquima (EMT) en dos tejidos de alta expresión y dos tejidos con baja expresión de FTO en pacientes con CCR, mediante inmunofluorescencia indirecta doble (**FTO y marcadores EMT**). La selección de los tejidos tumorales se realizó utilizando los resultados de la cuantificación de la expresión de la proteína FTO descritos previamente mediante inmunohistoquímica, los tejidos de alta expresión de FTO tienen un Índice de Positividad para FTO de 0,50 y 0,36, correspondiendo a estadio II y III, respectivamente. En cambio, los tejidos de baja expresión de FTO tienen un Índice de Positividad de FTO de 0,17 y 0,13; ambos estadio I.

En la inmunofluorescencia indirecta doble, los niveles de expresión de las proteínas EMT (ZEB-1, N-cadherina, Vimentina, E-cadherina) y FTO, fueron cuantificadas mediante el análisis de densidad integrada tanto para las zonas de células tumorales como estromales. El contenido y localización tisular de los marcadores EMT indicó que el marcador mesenquimal ZEB-1 se distribuye en un patrón citoplasmático y nuclear (verde), N-cadherina en patrón citoplasmático (verde), ambos marcadores mesenquimales localizados tanto en las zonas de células tumorales como estromales. El marcador mesenquimal Vimentina, se observó en un patrón citoplasmático (verde) y se localizó sólo en zonas estromales en células de tipo fibroblastos, mononucleares, endoteliales y tumorales. Por otro lado, el marcador epitelial E-cadherina, en vez de presentarse en un patrón exclusivamente membranoso, cambió de localización a un patrón principalmente citoplasmático (verde), en zonas de células tumorales y estromales. Todos los marcadores EMT fueron observados en paralelo con la expresión de FTO, el cual presentó

principalmente inmunofluorescencia positiva en un patrón nuclear (rojo) tanto en zonas de células tumorales como estromales (Figura 10 y 11).

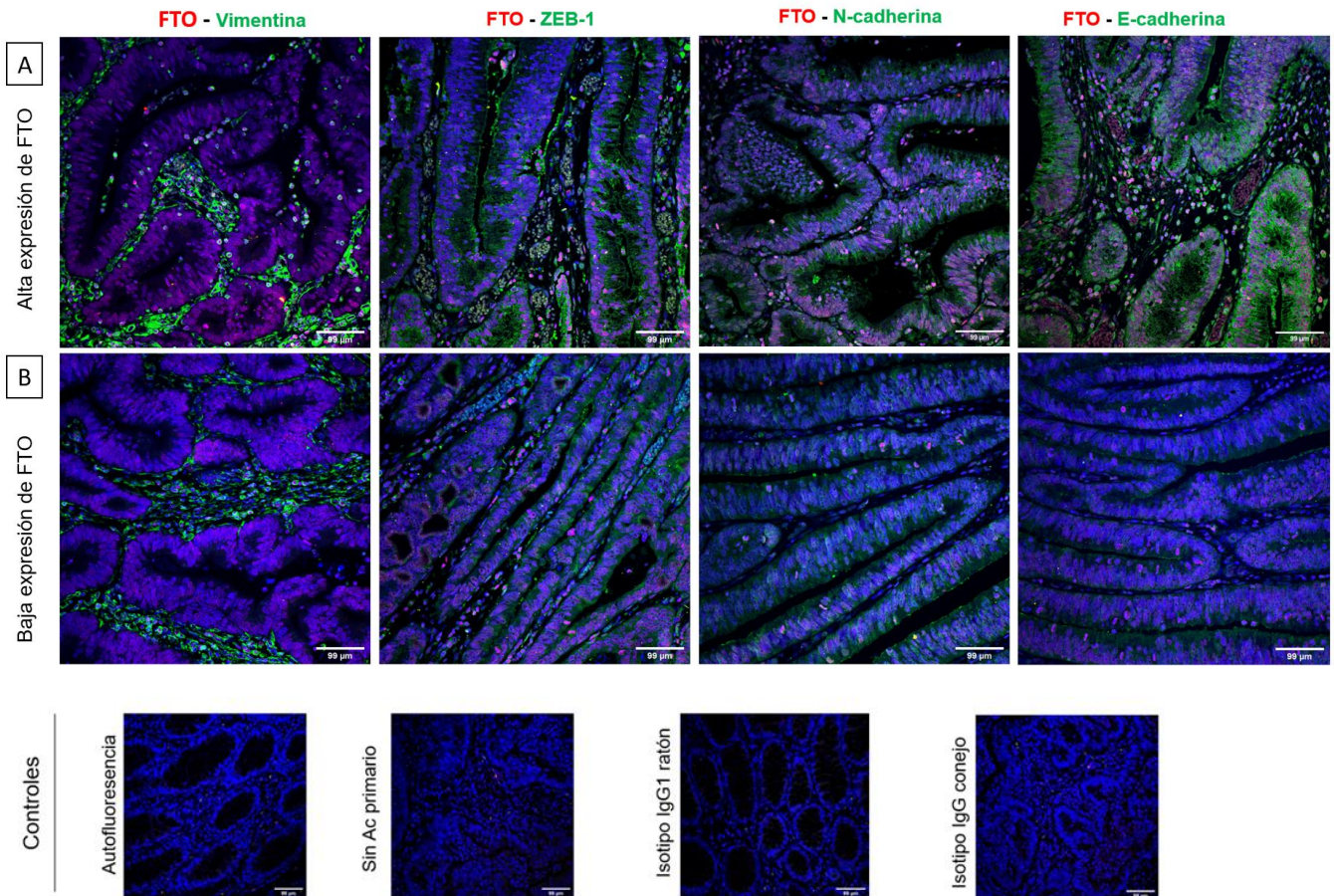


Figura 10: Imágenes representativas de la expresión y localización tisular de Vimentina, ZEB-1, N-cadherina y E-cadherina en tumores de alta y baja expresión de FTO en pacientes con CCR, mediante inmunofluorescencia indirecta doble. Inmunofluorescencia positiva verde para ZEB-1, N-cad, E-cad en zonas tumorales y estromales; Vimentina en zonas estromales e inmunofluorescencia positiva roja para FTO en zonas tumorales y estromales. Inmunofluorescencia negativa en controles validaron la inmunofluorescencia. Los núcleos se contrastaron con Hoechst (azul). Objetivo 20x (barra 99µm).

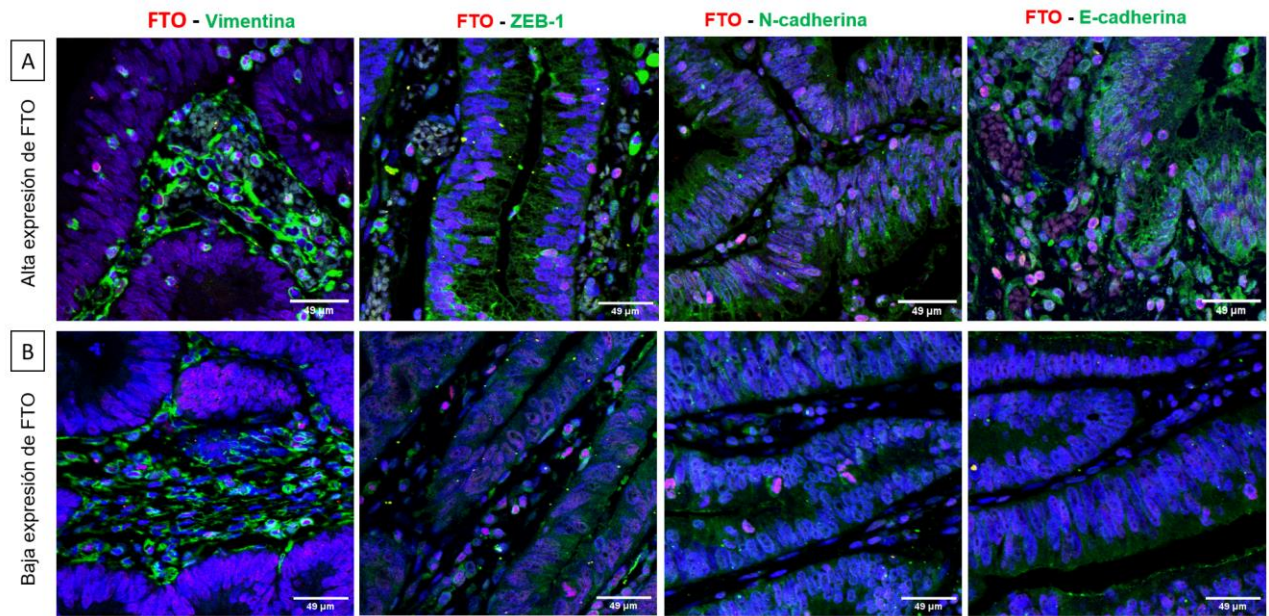


Figura 11: Mayor aumento de imágenes representativas de la expresión y localización tisular de Vimentina, ZEB-1, N-cadherina y E-cadherina en tumores de alta y baja expresión de FTO en pacientes con CCR, mediante inmunofluorescencia indirecta doble. Objetivo 20x (barra 49μm).

Los resultados cuantificados mediante el análisis de densidad integrada arrojaron que tejidos de alta expresión de FTO presentan aumento en la expresión de E-cad (en células tumorales y estroma) ($p < 0,0286$), en comparación a los tejidos de baja expresión de FTO. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento para ZEB-1, N-cad y Vimentina (Figura 12).

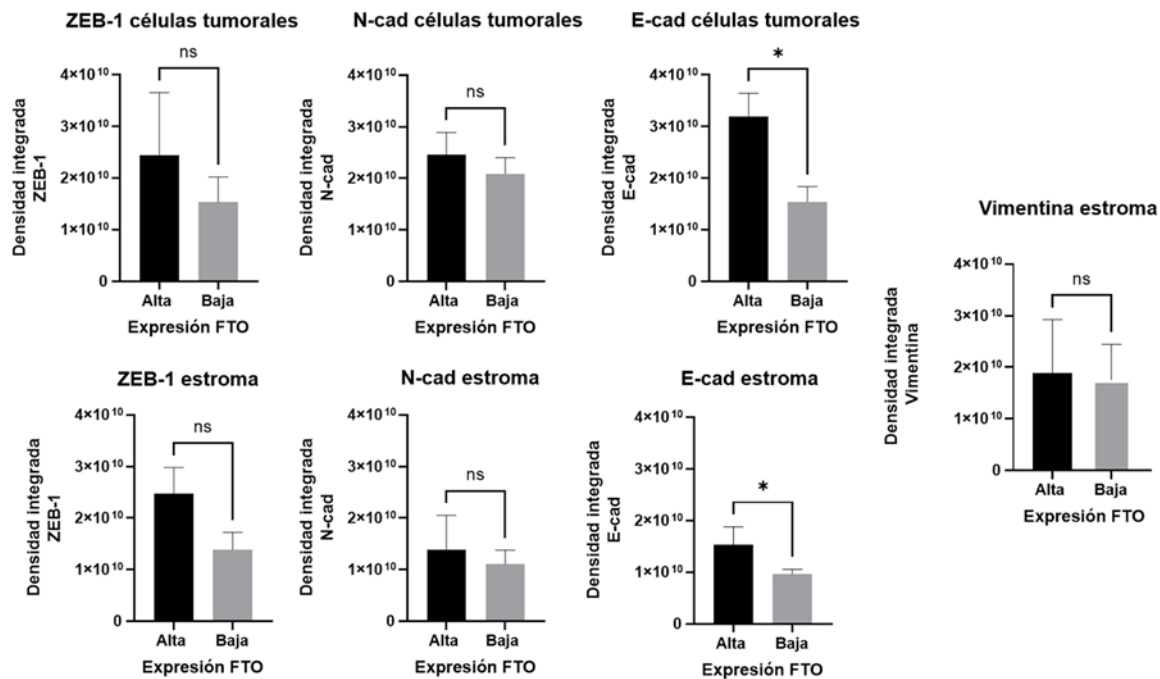


Figura 12: Comparación de los niveles de expresión relativa de los marcadores EMT en tejidos tumorales de alta y baja expresión de FTO en pacientes con CCR. En células tumorales y estromales, los niveles de expresión de ZEB-1, N-cad, E-cad y Vimentina tendieron a ser más altos en los tumores con alta expresión de FTO en comparación con los tumores de baja expresión de FTO, sólo se observaron diferencias significativas en E-cad. Estudio determinado por análisis integrado de densidad. Prueba estadística Mann-Whitney, para datos no pareados y no paramétricos. Se consideraron $P < 0,05$ estadísticamente significativos.

La expresión de FTO junto con la expresión de los marcadores EMT también fue evaluada mediante asociaciones tanto en las zonas de células tumorales como en el estroma. Se evidenció que FTO se asocia de forma directa con ZEB-1 en el estroma (Pearson $r=0,8025$, $p^*=0,0165$, IC= (0,225;0,962)). Mientras que N-cad, vimentina y E-cad, no mostró asociación ni directa ni inversa con el contenido de FTO tanto en las células tumorales como en el estroma (p values mayores a 0,05) (Figura 13).

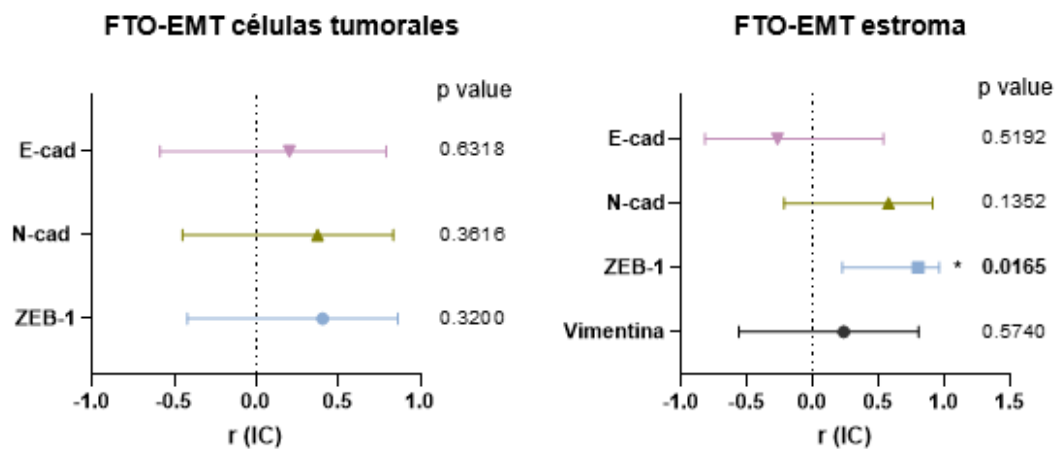


Figura 13: Asociación de FTO y marcadores EMT, tanto en las células tumorales como el estroma en CCR. La expresión de FTO se asocia directamente con ZEB-1 en el estroma, el **p* value** es menor que 0,05, indicando un nivel de significación mayor. Prueba estadística test de correlación de Pearson. Los gráficos muestran los índices de correlación ($r \pm$ intervalos de confianza).

De manera complementaria, se cuantificó los niveles de expresión de FTO obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta doble en los tejidos de alta expresión de FTO y baja expresión de FTO (según inmunohistoquímica), encontrándose que los niveles de expresión de FTO fueron más altos en los tejidos de alta expresión de FTO y que los niveles de expresión de FTO fueron más bajos en los tejidos de baja expresión de FTO, en zonas de células tumorales y estromales. No se observan diferencias significativas entre grupos (Figura 14). Sin embargo, se confirma la selección realizada por inmunohistoquímica.

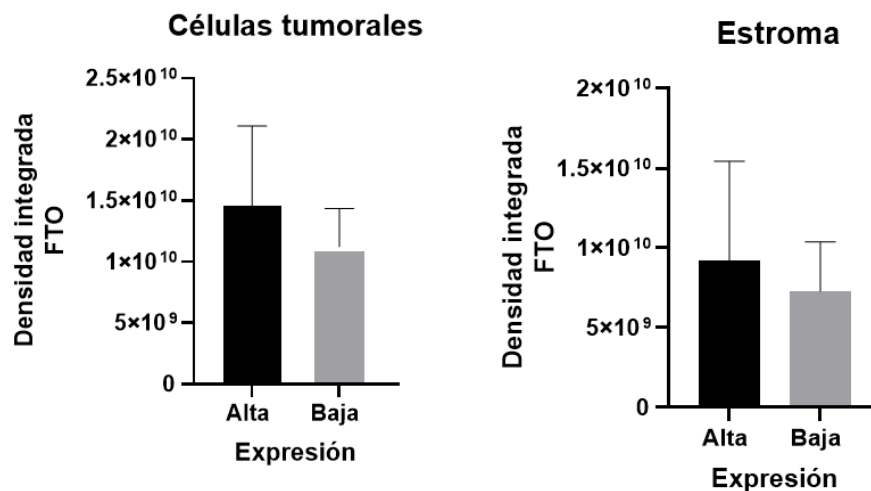


Figura 14: Comparación de los niveles de expresión relativa de FTO en tejidos tumorales de alta y baja expresión de FTO en pacientes con CCR, mediante inmunofluorescencia indirecta. Los niveles de expresión de FTO fueron más altos en los tejidos de alta expresión de FTO en zonas de células tumorales y estromales, no se observaron diferencias significativas. Prueba estadística Mann-Whitney, para datos no pareados y no paramétricos.

Objetivo 4:

Mayores niveles de expresión de la proteína FTO en genotipo TT del polimorfismo rs9939609 del gen FTO

La expresión de la proteína FTO según las variantes genotípicas del polimorfismo rs9939609 del gen FTO, se realizaron en 9 muestras disponibles coincidentes con las 22 muestras del TMA de pacientes con CCR. Cuatro pacientes presentan genotipo AT, 5 genotipo TT, ninguno de los 9 pacientes presentó genotipo AA, por lo que no se pudo considerar en el análisis. Aquellos pacientes con genotipo TT tendieron a presentar mayores niveles de expresión de FTO tanto en estroma tumoral como en tejido no tumoral o adyacente benigno (zonas de células epiteliales y lámina propia), comparados con aquellos con genotipo AT sin alcanzar diferencias significativas. (Figura 15).

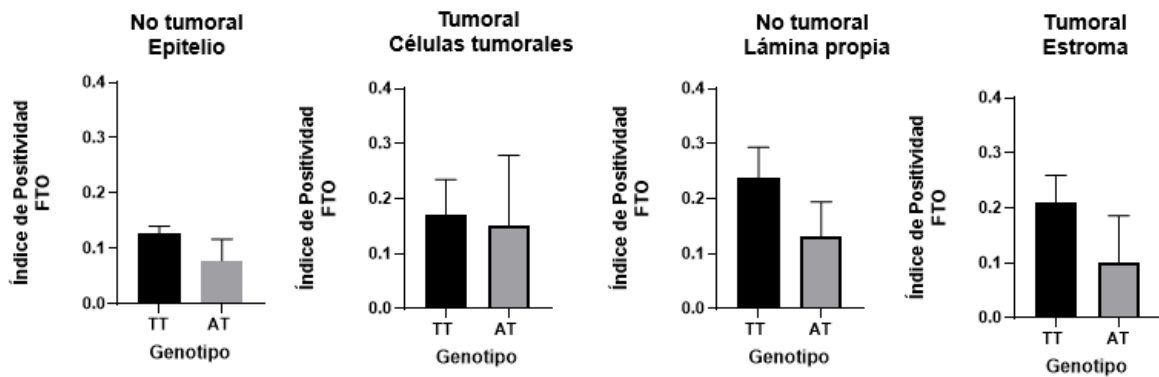


Figura 15: Comparación de los niveles de expresión de FTO en pacientes con genotipo TT y AT del polimorfismo rs9939609. En pacientes con genotipo TT los niveles de expresión de FTO tendieron a ser más altos en comparación a los pacientes de genotipo AT, tanto en tejido tumoral como no tumoral, la diferencia observada no es significativa. Prueba estadística Mann-Whitney, para datos no pareados y no paramétricos.

Discusión

El primer hallazgo de este estudio fue que la proteína FTO aumenta en el tejido tumoral de pacientes chilenos con cáncer colorrectal a nivel de células tumorales y estroma. Se sugiere que está regulado positivamente en CCR al igual que en otros tipos de cánceres (29), por lo tanto, FTO podría promover la tumorigénesis y la carcinogénesis del CCR. Si bien en esta tesis no se estudió el mecanismo de acción subyacente a la sobreexpresión de FTO, se ha reportado en la literatura, en el contexto de CCR, que la desmetilasa FTO acelera la proliferación e induce capacidades de invasión y migración, ya que eleva la expresión de MYC (familia de protooncogenes) al alterar la modificación m⁶A del ARN mensajero de MYC (30). Cuando se comparó el contenido de FTO en los diferentes estadios del CCR, se encontró que su expresión (localizado principalmente en el núcleo) aumenta desde estadios tempranos en células tumorales y estroma en la progresión del CCR, a diferencia de la literatura, donde la expresión global de FTO no mostró ningún cambio significativo en el curso de la evolución del tumor en tejidos de pacientes con CCR, pero sí un cambio de localización citoplasmática. Los autores del estudio respaldaron el papel de FTO como un gen supresor de tumor enfatizando la importancia del contexto tisular (3), por lo cual las características estructurales de la proteína FTO permitirían que logre la desmetilación en diferentes sustratos del ARNm mediante la interacción con diversas proteínas, asociándose a distintas vías de señalización, dependiendo del contexto celular nuclear o citoplasmático (31). Otros investigadores también enfatizaron el rol protector de FTO, informando que está regulado a la baja en los tejidos de CCR, que suprime la migración e invasión de células CCR in vitro y que la hipoxia, la cual es una de las características más importantes del microambiente tumoral, puede disminuir la expresión de FTO en las células de CCR al aumentar su degradación mediada por ubiquitinas (32). En cambio, en el presente estudio, observamos diferencias significativas en el aumento de los niveles de expresión de FTO

durante los estadios I y III en células tumorales, y durante el estadio I en el estroma, además de mayores niveles de expresión de FTO en el estroma en comparación a las células tumorales. Lo anterior sugiere una participación de FTO en distintos componentes del microambiente tumoral, conformado por células tumorales, numerosos tipos celulares del estroma (células del sistema inmune, fibroblastos, endoteliales, mesenquimales), factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, matriz extracelular y estímulos mecánicos que se comunican entre sí, promoviendo el desarrollo del tumor (44)(45)(46). Sin embargo, debemos considerar que en nuestro estudio contamos con un número limitado de pacientes (n=22), ningún paciente estuvo en estadio IV y hubo una proporción desigual en cuanto a la cantidad de muestras que compusieron cada estadio (número mayor de tejidos en estadios I y II en comparación a estadio III), por lo que la estadística podría variar con un número homogéneo de tejidos en cada estadio. Nuestros resultados también podrían ser complementados con otras técnicas (e.g. ELISA, citometría de flujo), evaluando el contenido de la proteína FTO en tejido tumoral y sano; a qué fenotipo celular corresponden, además, el contenido de FTO se podría asociar a otras variables importantes en la progresión del CCR, como grado de diferenciación, invasión perineural, *tumor budding*, desmoplasia e infiltración linfocitaria (5).

El segundo hallazgo fue que el genotipo **AA** y el alelo de riesgo **A** del polimorfismo rs9939609 del gen FTO están sobrerrepresentados en el grupo de pacientes con CCR. Se sugiere una asociación positiva entre el alelo de riesgo **A** y el riesgo de desarrollar CCR en pacientes chilenos, ya que esta relación fue significativa incluso ajustándola con otras variables, como sexo, edad y antecedentes familiares. Otros autores también han informado una asociación positiva de la variante rs9939609**A** FTO con CCR en personas iraníes (28) y en otros tipos de cánceres, como de endometrio, páncreas o mama (33)(34). Sin embargo, en personas chilenas este dato es desconocido, mientras que estudios de otras latitudes

no han encontrado relación entre la variante y el riesgo de cáncer (33) como es el caso de un reporte en pacientes italianos (35). La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo del CCR (9), pues la proteína FTO comparte vías con el CCR mediante la actividad desmetilasa en m⁶A, que permite regular los ARNm de varios genes, como los involucrados en el apetito (Ghrelin y Leptina), y mTOR, clave en el crecimiento celular, regulando así la aparición y progresión de la obesidad y el cáncer (10)(36). La obesidad contribuye a la formación de un ambiente proinflamatorio crónico, mediando la liberación de agentes promotores del desarrollo del tumor, como Interleukin-1 β (IL-1 β), Transforming Growth Factor- β (TGF- β) y Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) los que, sumado a una serie de sucesos inmunológicos, promueven el desarrollo de un microambiente tumoral (37). La variante rs9939609**A** de FTO es la más estudiada, encontrándose una fuerte asociación con el riesgo de obesidad (14). Se ha evidenciado que el alelo de riesgo **A** está asociado con un aumento en la expresión de la proteína FTO y de la hormona Ghrelin (16)(17), aunque no ha sido debidamente estudiado en su relación con CCR. Por lo tanto, es razonable esperar que, si la variante de FTO tiene una asociación positiva con la obesidad, tenga también una asociación genética cercana con el CCR, como se evidenció en nuestros resultados. Además, se debe considerar que hay informes de asociaciones del polimorfismo FTO con la susceptibilidad de desarrollar varios tipos de cáncer independientes de la obesidad (38). Por lo tanto, se requieren estudios profundos para la comprensión de las vías del mecanismo subyacente a la asociación del polimorfismo rs9939609**A** de FTO con CCR, ya que esta podría ser dependiente o independiente de la obesidad, e incluso actuar de manera simultánea a ella (10). El estudio no fue experimental, por lo cual un factor no causa necesariamente al otro. Algunas limitaciones del estudio fueron: a) la mayoría de los integrantes del grupo control son parte de un programa de prevención de CCR, el cual está orientado a personas que presentan antecedentes familiares de CCR; b) algunos controles

tenían patologías como adenomas y pólipos, lesiones precursoras del CCR; c) se excluyeron cuatro pacientes por no tener completos los antecedentes clínicos, siendo el grupo control (n=122) mayor que el grupo de casos (n=88); e) el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño, y f) no se contó con el IMC en todos los sujetos.

Respecto al tercer objetivo, en los tejidos de CCR con alta expresión de FTO, se hallaron indicios de mayor expresión positiva de marcadores mesenquimales (N-cad, ZEB-1) en células tumorales y estroma (evidenciado mediante la tinción de Vimentina), aunque la asociación directa con FTO fue significativa solo con ZEB-1 a nivel del estroma tumoral. Una posible explicación para el hallazgo de la asociación en esta zona es que podría haber células tumorales aparentemente desprendidas del tumor primario aisladas o en agrupaciones de 5 o más células, ubicadas en el frente infiltrante tumoral y, por lo tanto, asociadas a una activación EMT parcial (39) o participación en componentes del microambiente tumoral (45). Sin embargo, para averiguar el tipo celular en particular, sería necesario utilizar marcadores específicos o visualizar la morfología celular mediante una tinción de hematoxilina-eosina del área analizada. En la literatura ha sido reportado que la sobreexpresión de las proteínas relacionadas con la EMT da como resultado una disminución de la expresión de E-cad en la membrana, o bien un cambio de localización al citoplasma (40)(41). Nuestras observaciones revelaron que la expresión de E-cad aumentó de manera significativa, a nivel citoplasmático, en células tumorales y estroma en tejidos con alta expresión de FTO, lo que se podría considerar un paso clave en la progresión hacia la fase de un tumor invasivo (42). Por lo tanto, sugerimos que la sobreexpresión de FTO en la progresión del CCR, sí podría estar impactando en procesos de progresión tumoral, como EMT, lo cual es similar a lo descrito por otros autores (13)(30)(43), quienes informaron que la expresión génica de FTO se correlacionó significativamente con ZEB-1. Además, reportaron mayor infiltración estromal e inmunitaria (13) y que FTO aumenta la expresión

de MYC, cuya desregulación tiene un papel en el CCR mediante la activación de la vía Wnt/ β -catenina, importante en la promoción de la EMT y la metástasis de las células tumorales (30), respaldando más el rol de FTO como promotor en el desarrollo del CCR. No obstante, si FTO está regulado a la baja en cáncer (31)(32), conduce a un aumento de m⁶A en los ARNm, dando como resultado la activación de la vía de señalización Wnt- β -catenina y a su vez activando la EMT para promover la progresión del cáncer (22). Dado que el rol de FTO es controversial, se requieren más estudios con mayor tamaño muestral y estudios experimentales *in vitro* que investiguen la respuesta funcional de los marcadores EMT asociada a la sobreexpresión e inhibición de la proteína FTO en líneas celulares de CCR.

El cuarto hallazgo señala que los niveles de expresión de FTO tendieron a ser más altos en los pacientes CCR con genotipo **TT** del polimorfismo rs9939609 del gen FTO. Las variables relacionadas no han sido evaluadas por otros autores, ni en el CCR ni en otros cánceres. Esperábamos mayor contenido de la proteína FTO en aquellos con genotipos **AA** o **AT**, pues los resultados de esta tesis respaldan la sobreexpresión de la proteína FTO y al alelo de riesgo **A** en el desarrollo del CCR, sugiriendo el rol promotor que ejerce FTO. Empero, es posible que la relación entre el contenido de FTO y el tipo de alelo puede ser célula-específico o modificarse frente a otros factores del microambiente, mas la evaluación de la relación del contenido de FTO con la variante genética rs9939609 **AT** estuvo limitada a un tamaño muestral reducido (n=9) y se dio en ausencia del genotipo **AA**. Esto debe replicarse en un mayor tamaño muestral, que incluya todos los genotipos, sumado a un estudio de mutación sitio dirigida, *in vitro* en células e *in vivo* en ratones, para así poder validar la asociación de estas variables.

Conclusiones

La proteína FTO, localizada principalmente en el núcleo, aumenta en el tejido tumoral de pacientes chilenos con cáncer colorrectal, a nivel de células tumorales y estroma, tanto desde estadios tempranos como en aquellos con mayor avance en el tumor, en comparación al tejido no tumoral. Además, tejidos con alta expresión de FTO tendieron a mayores niveles de expresión de marcadores mesenquimales (N-cadherina, Zeb-1) en células tumorales y estroma (Vimentina) y cambio de localización citoplasmática en la expresión del marcador epitelial (E-cadherina), tanto en células tumorales como en el estroma; la expresión de FTO se asoció directamente con el marcador mesenquimal ZEB-1 a nivel del estroma. **Nuestros datos indican que una mayor expresión de la proteína FTO podría estar involucrada en la progresión del cáncer colorrectal, impactando en procesos como la transición epitelio-mesénquima, respaldando el rol de FTO como promotor en desarrollo del cáncer. Sin embargo, el mecanismo exacto y el papel de la proteína FTO en la progresión del CCR aún no se comprenden por completo; se requieren más estudios que investiguen la participación de FTO en los distintos componentes del microambiente tumoral, ya que la detección de una mayor expresión de FTO podría ser útil para ayudar a confirmar pacientes de peor pronóstico.**

Por otro lado, los pacientes chilenos presentaron mayor frecuencia del genotipo **AA** y alelo de riesgo **A** polimorfismo rs9939609 del gen FTO, en comparación a los controles. Se identificó una asociación positiva entre el alelo **A** del polimorfismo rs9939609 del gen FTO y una mayor susceptibilidad al CCR. El mecanismo subyacente a esta asociación no fue investigado; puede ser dependiente de la obesidad o bien no serlo. En nuestro país, el CCR es uno de los tipos de cáncer que más han aumentado, por lo que es importante abordar aún más esta asociación y sus mecanismos subyacentes, ya que la variante rs9939609**A**

de FTO es un potencial biomarcador en el diagnóstico temprano, u objetivo de la terapia génica, en el CCR.

Finalmente, en los pacientes con genotipo **TT** los niveles de expresión de FTO tendieron a ser más altos en contraste con el genotipo **AT**. Debido al poder estadístico limitado y la necesidad de validar estos resultados con otra técnica, aún no se puede establecer una asociación entre los niveles de contenidos de la proteína FTO y las variantes genéticas del polimorfismo rs9939609 **A/T** del gen FTO en el CCR.

Se necesitan más estudios con tamaños muestrales mayores para descubrir la relación entre la expresión de FTO y/o el alelo de riesgo rs9939609**A** del gen FTO en la progresión del CCR e investigar los mecanismos subyacentes a aquella. **Dado que este tipo de cáncer es el tercero más frecuente tanto en Chile como en el resto del mundo, creemos que es pertinente ahondar más en el conocimiento de la proteína FTO, pues podría ser un blanco terapéutico que nos permita detener la progresión del CCR, lograr un mejor manejo de esta enfermedad e, idealmente, mejorar la expectativa y calidad de vida de los pacientes.**

Bibliografía

- (1) The International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory [Internet]. iarc.fr. [citado el 25 de abril de 2022]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
- (2) Ríos JA, Barake MF, Arce MJ, López-Köstner F, Labbe TP, Villena J, et al. Situación actual del cáncer de colon en Chile: una mirada traslacional. *Rev Med Chil*. 2020;148(6):858–67.
- (3) Relier S, Ripoll J, Guilloit H, Amalric A, Achour C, Boissière F, et al. FTO-mediated cytoplasmic m6Am demethylation adjusts stem-like properties in colorectal cancer cell. *Nat Commun*. 2021;12(1):1716.
- (4) Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2015; 1:15065.
- (5) Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* [Internet]. 2012;3(3):153–73.
- (6) Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging: The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017;67(2):93–9.
- (7) Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* [Internet]. 2005;365(9454):153–65.
- (8) Sánchez R C, Ibáñez C, Klaassen J. The link between obesity and cancer. *Rev Med Chil* [Internet]. 2014;142(2):211–21.

- (9) Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *Oncologist* [Internet]. 2010;15(6):556–65.
- (10) Roslan NH, Makpol S, Mohd Yusof YA. A review on dietary intervention in obesity associated colon cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2019;20(5):1309–19.
- (11) Zheng Q-K, Ma C, Ullah I, Hu K, Ma R-J, Zhang N, et al. Roles of N6-methyladenosine demethylase FTO in malignant tumors progression. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2021; 14:4837–46.
- (12) Chen X-Y, Zhang J, Zhu J-S. The role of m6A RNA methylation in human cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2019;18(1):103
- (13) Kandimalla R, Gao F, Li Y, Huang H, Ke J, Deng X, et al. RNAMethyPro: a biologically conserved signature of N6-methyladenosine regulators for predicting survival at pan-cancer level. *NPJ Precis Oncol* [Internet]. 2019;3(1):13.
- (14) Lan N, Lu Y, Zhang Y, Pu S, Xi H, Nie X, et al. FTO - A common genetic basis for obesity and cancer. *Front Genet* [Internet]. 2020; 11:559138.
- (15) Petermann F, Villagrán M, Troncoso C, Mardones L, Leiva AM, Martínez MA, et al. Association between FTO (ns9939609) genotype and adiposity markers in Chilean adults. *Rev Med Chil* [Internet]. 2018;146(6):717–26.
- (16) Deng X, Su R, Stanford S, Chen J. Critical enzymatic functions of FTO in obesity and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2018;9.
- (17) Karra E, O'Daly OG, Choudhury AI, Yousseif A, Millership S, Neary MT, et al. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3539–51.

- (18) Azzam SK, Alsafar H, Sajini AA. FTO m6A demethylase in obesity and cancer: Implications and underlying molecular mechanisms. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022;23(7):380.
- (19) Lan Q, Liu PY, Haase J, Bell JL, Hüttelmaier S, Liu T. The critical role of RNA m6A methylation in cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2019;79(7):1285–92.
- (20) Xu D, Shao W, Jiang Y, Wang X, Liu Y, Liu X. FTO expression is associated with the occurrence of gastric cancer and prognosis. *Oncol Rep*. 2017;38(4):2285–92.
- (21) Su R, Dong L, Li C, Nachtergaele S, Wunderlich M, Qing Y, et al. R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m6A/MYC/CEBPA signaling. *Cell* [Internet]. 2018;172(1–2):90-105.e23.
- (22) Navickas A, Goodarzi H. A Wnt twist in FTO's role in cancer progression. *Nat Cancer* [Internet]. 2021;2(6):579–80.
- (23) Ieda T, Tazawa H, Okabayashi H, Yano S, Shigeyasu K, Kuroda S, et al. Visualization of epithelial-mesenchymal transition in an inflammatory microenvironment-colorectal cancer network. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):16378.
- (24) Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: A historical overview. *Transl Oncol* [Internet]. 2020;13(6):100773.
- (25) Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in colorectal cancer: A culprit in metastasis. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2017;9(12).
- (26) Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2015;211(8):557–69.
- (27) Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* [Internet]. 2009;119(6):1429–37.

- (28) Gholamalizadeh M, Akbari ME, Doaei S, Davoodi SH, Bahar B, Tabesh GA, et al. The association of fat-mass-and obesity-associated gene polymorphism (rs9939609) with colorectal cancer: A case-control study. *Front Oncol* [Internet]. 2021; 11:732515.
- (29) Li Y, Su R, Deng X, Chen Y, Chen J. FTO in cancer: functions, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Trends Cancer* [Internet]. 2022;8(7):598–614.
- (30) Yue C, Chen J, Li Z, Li L, Chen J, Guo Y. microRNA-96 promotes occurrence and progression of colorectal cancer via regulation of the AMPK α 2-FTO-m6A/MYC axis. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2020;39(1):240.
- (31) Wei J, Liu F, Lu Z, Fei Q, Ai Y, He PC, et al. Differential m6A, m6Am, and m1A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm. *Mol Cell* [Internet]. 2018;71(6):973-985.e5.
- (32) Ruan D-Y, Li T, Wang Y-N, Meng Q, Li Y, Yu K, et al. FTO downregulation mediated by hypoxia facilitates colorectal cancer metastasis. *Oncogene* [Internet]. 2021;40(33):5168–81.
- (33) Huang X, Zhao J, Yang M, Li M, Zheng J. Association between FTO gene polymorphism (rs9939609 T/A) and cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl)* [Internet]. 2017;26(5).
- (34) Doaei S, Bourbour F, Rastgoo S, Akbari ME, Gholamalizadeh M, Hajipour A, et al. Interactions of anthropometric indices, rs9939609 FTO gene polymorphism and breast cancer: A case-control study. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2021;25(7):3252–7.
- (35) Tarabra E, Actis GC, Fadda M, De Paolis P, Comandone A, Coda R, et al. The obesity gene and colorectal cancer risk: a population study in Northern Italy. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2012;23(1):65–9.

- (36) Ropelle ER, Fernandes MFA, Flores MBS, Ueno M, Rocco S, Marin R, et al. Central exercise action increases the AMPK and mTOR response to Leptin. *PLoS One* [Internet]. 2008;3(12): e3856
- (37) Iyengar NM, Gucalp A, Dannenberg AJ, Hudis CA. Obesity and cancer mechanisms: Tumor microenvironment and inflammation. *J Clin Oncol* [Internet]. 2016;34(35):4270–6.
- (38) Delahanty RJ, Beeghly-Fadiel A, Xiang Y-B, Long J, Cai Q, Wen W, et al. Association of obesity-related genetic variants with endometrial cancer risk: a report from the Shanghai Endometrial Cancer Genetics Study. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2011;174(10):1115–26.
- (39) Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol* [Internet]. 2016;47(1):4–19.
- (40) Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med* [Internet]. 2016;5(5):51. Available from:
- (41) Yamada N, Sugai T, Eizuka M, Tsuchida K, Sugimoto R, Mue Y, et al. Tumor budding at the invasive front of colorectal cancer may not be associated with the epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* [Internet]. 2017; 60:151–9. Available from:
- (42) Mantilla Carolina, Suárez Mellado Iris, Duque Jaramillo Alejandra, Navas María Cristina. Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis. *CES Med.* [Internet]. junio de 2015 [citado el 9 de junio de 2022]; 29(1): 109-127.
- (43) Zou D, Dong L, Li C, Yin Z, Rao S, Zhou Q. The m6A eraser FTO facilitates proliferation and migration of human cervical cancer cells. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2019;19(1):321.
- (44) Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* [Internet]. 2014; 2014:149185.

(45) Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res* [Internet]. 2012;72(10):2473–80.

(46) Grivnickov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* [Internet]. 2010;140(6):883–99.

(47) Iniesta Raquel, Guinó Elisabet, Moreno Víctor. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* [Internet]. 2005;19(4):333-341.

Anexos N°1

1

ACTA DE APROBACION N° 43

Santiago, 29 de septiembre de 2021.

El Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dra. Teresa Massardo Vega. Especialista en Medicina Nuclear. Presidenta
Sr. Mauricio Venegas Santos. Bioquímico. Vicepresidente.
Dra. Aída Verónica Araya Quintanilla. Médico Endocrinóloga. Secretaria de actas.
Dr. Sergio Valenzuela Puchulu. Médico Gineco-Obstetra. Integrante.
Dr. Juan Carlos Prieto Domínguez. Médico Farmacología Clínica. Integrante.
Dra. Ana María Madrid Silva. Gastroenteróloga. Integrante.
Srta. Rina Sepúlveda Alfaro. Abogado. Integrante.
Dra. Gloria López Stewart. Médico Endocrinóloga. Integrante.
Dr. Juan Jorge Silva Solís. Médico Cirujano. Integrante.
Dr. Melchor Lemp Miranda. Médico Neurocirujano. Integrante.
Sra. Ginette Zúñiga Navarrete. Miembro de la comunidad.

Ha analizado el proyecto **“Participación de la desmetilasa FTO (fat mass and obesity associated protein) en procesos de transición mesenquimal y de cáncer stem cell en cáncer colorectal”**, cuya **Investigadora Principal es la Dra. Glauben Landskron Ramos, de la Escuela de Medicina de la Universidad Finis Terrae. Participa como Investigador Responsable, el Dr. Mario Abedrapo Moreira del Departamento de Cirugía.** El proyecto será desarrollado en este mismo departamento del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Para estos efectos se tuvo a la vista los siguientes documentos:

1. Carta de presentación.
2. Hoja de especificaciones.
3. Carta de compromiso de la investigadora principal.
4. Carta de compromiso de los co-investigadores.
5. Curriculum vitae de la investigadora principal.
6. Curriculum vitae del investigador responsable.
7. Formulario de solicitud de evaluación de proyecto.
8. Protocolo de proyecto Versión 1.0, fechado 10 de agosto de 2021.
9. Documento de Consentimiento Informado Versión 1.0, fechado 30 de agosto de 2021.
10. Revocación del consentimiento informado Versión 1.0, fechado 25 de agosto de 2021.
11. Carta de Jefe del Departamento de Prevención de Riesgos.

El Proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las pautas Éticas Internacionales para la investigación Biomédica en Seres humanos CIOMS 2002, de las Guías de Buenas prácticas Clínicas de ICH y Normativa Nacional Vigente.

- a) **Carácter de la población estudiada**
No terapéutica.
- b) **Utilidad del Proyecto**
Adecuada.
- c) **Riesgos**
Controlados.
- d) **Beneficios**
Adecuados.
- e) **Confidencialidad del Estudio**
La Investigadora principal asegura la confidencialidad de todos los datos.

Por lo tanto, el Comité estima que el Estudio propuesto estuvo bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores. El consentimiento informado es adecuado en forma y fondo.

En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la Aprobación Ética del estudio propuesto, en sesión ordinaria del 29 de septiembre de 2021, la que se extiende por un plazo de 12 meses a contar de esta fecha. Se adjunta Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.

Se debe tener presente que se debe realizar:

- Envío para aprobación o toma de conocimiento de nueva documentación relacionada al estudio.
- Cambio en los Delegados del Director de la Institución.
- Notificación de reacciones adversas serias o no serias, en que las serias deben ser notificadas en un plazo de 72 horas hábiles de ocurrido el evento.
- Enviar anualmente avances del Proyecto.
- Solicitud de Extensión de plazo de aprobación.
- Enviar Informe Final del Proyecto.

Los ítems mínimos que deben contener los informes semestrales y finales, son los siguientes:

- Cumplimiento de los objetivos.
- Numero de Sujetos enrolados.
- Número y motivo de los sujetos que abandonan o se retiran.

Saluda atentamente a Ud.



29-09-2021

Teresa Massardo Vega
 Presidenta del Comité Ético Científico
 Hospital Clínico de la Universidad de Chile

Anexos N°2



Acta de Aprobación

En Santiago de Chile, con fecha 24 de junio de 2019, el Comité de Ética de Clínica Las Condes, declara conocer el proyecto de investigación denominado **“Participación de la desmetilasa FTO (fat mass and obesity associated protein) en procesos de transición mesenquimal y de cancer stem cell en cancer colorectal”** cuyo investigador responsable es el Dr. Mario Abedrapo del departamento de Coloproctología de esta clínica.

Esta documentación cumple con las normas éticas vigentes en esta institución y considera aspectos específicos del protocolo que deben seguir los sujetos que participarán en el mismo; resguarda su libertad, integridad y confidencialidad en el uso de información; no vulnera la dignidad de los sujetos; no constituye una amenaza bajo ninguna circunstancia ni causa daño emocional o moral a las personas que participen de la investigación. Proporciona información clara y transparente respecto de la investigación, asegurando el derecho a privacidad de los investigados. Asimismo, no se establece pago ni incentivo económico a la participación de las personas, las cuales lo harán a entera voluntad y podrán desistir de participar en cualquier momento mientras la investigación se realice.

Este proyecto, si bien pretende reclutar pacientes de los mismos médicos que participan en el estudio, se asegura la libertad de elección, dejando claramente establecido que pueden rechazar su participación, sin sufrir ningún menoscabo a la atención de salud a la que tienen derecho.

Este proyecto de investigación respeta los derechos de los sujetos a consultar y cuida especialmente de invitar a los diferentes enfermos involucrados en el ámbito que se espera estudiar, señalando adecuadamente que de este estudio no se derivan beneficios individuales y sino para el desarrollo científico.

El Comité de Ética de Clínica Las Condes, es la entidad institucional responsable de velar por los derechos de los sujetos involucrados en este proyecto.

Por lo tanto, a través de este medio se pronuncia favorablemente respecto de este proyecto y suscribe esta declaración.

El Comité de Ética de la Investigación de Clínica Las Condes, está conformado por:

Lic. María Verónica Anguita McKay
Dr. Manuel Sedano Lorca
Dr. Armando Ortiz Pommier
Dr. Octavio Rojas Gutiérrez
Abog. María Angélica Sotomayor
EU. Magdalena Castro Cruz
Dr. Patricio Burdiles Pinto

Teóloga – Magister en Bioética
Médico Ginecólogo-Diplomado en Bioética
Médico Neurocirujano – Magister en Bioética
Médico Psiquiatra – Magister en Bioética
Abogado -Experta en Bioética
E.U. Magíster Epidemiología Clínica
Médico Cirujano-Diplomado en Bioética

Armando Ortiz Pommier

Presidente Comité de Ética de la Investigación
Clínica Las Condes



Nota: Se tuvo a la vista Protocolo de investigación y Formulario de Consentimiento Informado presentado al Comité de Ética de Clínica Las Condes.

AOP/pav
CC: Dirección Médica
Dirección Académica
Subdirección de Investigación

Anexo N°3



Dra. Glauben Landskron
Investigadora Principal

07 de junio 2022

Estimada Dra. Landskron:

Mediante la presente le informo que la solicitud de cesión de muestras y datos N° 43 de su Proyecto "Participación de la desmetilasa FTO (fat-mass and obesity associated protein) en procesos de transición mesenquimal y cancer stem cell en cáncer colorrectal" ha sido aprobada.

La cesión de muestras y datos sólo será realizado una vez que al Acuerdo de cesión de muestras y datos este firmado por todas las partes.

Sin otro particular, le saluda atte.

Alicia Colombo, PhD
Director Científico
Biobanco de Tejidos y Fluidos
Universidad de Chile