

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



Efecto de variantes genéticas de *TYMS*, *ABCC4* y *ABCG2* sobre la supervivencia global de pacientes con cáncer colorrectal avanzado en tratamiento basado en 5-fluorouracilo.

Autora: Sabina Barra Gallardo

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

DIRECTORA:

Dra. Leslie Cerpa Castro, BQ.
Laboratorio de Carcinogénesis Química y
Farmacogenética
Departamento de Oncología Básica – Clínica
Facultad de Medicina. Universidad de Chile

PATROCINANTE:

Dr. Luis Quiñones Sepúlveda, BQ
Laboratorio de Carcinogénesis Química y
Farmacogenética
Departamento de Oncología Básica – Clínica
Facultad de Medicina. Universidad de Chile

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INDICE DE FIGURAS.....	3
2. INDICE DE TABLAS	5
3. ABREVIATURAS	6
4. RESUMEN.....	8
5. ABSTRACT	9
6. INTRODUCCIÓN.....	10
6.1 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CCR.....	10
6.2 DIAGNÓSTICO DEL CCR	11
6.3 TRATAMIENTOS PARA CCR.....	12
6.4 MECANISMO DE ACCIÓN DEL 5-FLUOROURACILO.....	13
6.5 VARIABILIDAD GENÉTICA ASOCIADA A LA RESISTENCIA DE LA TERAPIA CON 5-FLUOROURACILO.....	16
6.5.1 <i>Polimorfismos de TYMS asociada a la resistencia de la terapia con 5- fluorouracilo. .</i>	16
6.5.2 <i>Polimorfismos de ABCC4 Y ABCG2 asociada a la resistencia de la terapia con 5- fluorouracilo.....</i>	18
7. HIPÓTESIS.....	20
8. OBJETIVOS	20
8.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
8.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	20
9. MATERIALES Y MÉTODOS	21
9.1 SELECCIÓN DE PACIENTES.....	21
9.1.1 <i>Tipo de estudio.....</i>	21
9.1.2 <i>Cálculo tamaño muestral.....</i>	21
9.1.3 <i>Criterios de inclusión y exclusión</i>	21

9.2	EXTRACCIÓN DE ADN TUMORAL Y/O GERMINAL DESDE BIOPSIAS FIJADAS EN FORMALINA Y EMBEBIDAS EN PARAFINA (FFPE)	22
9.3	CUANTIFICACIÓN Y CONTROLES DE CALIDAD DEL ADN	22
9.4	ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN ADN GERMINAL Y TUMORAL	22
9.5	RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS	24
9.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	25
9.7	CONSIDERACIONES ÉTICAS	25
10.	RESULTADOS	26
10.1	DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE <i>TYMS</i> , <i>ABCC4</i> Y <i>ABCG2</i> EN PACIENTES DE POBLACIÓN GENERAL CHILENA	26
10.2	DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE <i>TYMS</i> , <i>ABCC4</i> Y <i>ABCG2</i> EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL AVANZADO.	29
10.3	DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE <i>ABCC4</i> Y <i>ABCG2</i> CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL AVANZADO CON TERAPIA BASADA EN 5-FLUOROURACILO.....	32
10.4	RE-CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL	38
11.	DISCUSIÓN.....	39
12.	CONCLUSIONES.....	45
13.	REFERENCIAS.....	46
14.	ANEXO I. CARTA DE APROBACIÓN FONDECYT	56
15.	ANEXO II. SOLICITUD DE DISPENSA AL CONSENTIMIENTO INFORMADO	58
16.	ANEXO III. BUENAS PRÁCTICAS CLÍNICAS.....	60
17.	ANEXO IV. CONSENTIMIENTO INFORMADO	61
18.	ANEXO V. FORMULARIO DE REPORTE DE CASOS (CRF).....	65

I.	ANTECEDENTES DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS AL INGRESO AL CENTRO DE TRATAMIENTO	65
II.	ANTECEDENTES DE CIRUGIA Y ANATOMIA PATOLOGICA.....	67
III.	3. EXÁMENES DE LABORATORIO PRE-QUIOMIOTERAPIA.....	70
IV.	4. EXÁMENES DE LABORATORIO POST-QUIMIOTERAPIA	75
V.	5. EXÁMENES IMAGENOLÓGICOS	80
VI.	6. TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA PARA CÁNCER DE COLON	81
VII.	7. EVALUACIÓN DE RESPUESTA TERAPEUTICA.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de 5-FU en CCR.	15
Figura 2. Polimorfismos de <i>TYMS</i> rs45445694 y <i>TYMS</i> rs2853542.	18
Figura 3. Esquema PCR convencional <i>TYMS</i> rs45445694.	23
Figura 4. Esquema PCR-RFLP para <i>TYMS</i> rs2853542.	24
Figura 5. Representación de la presencia de los genotipos de <i>ABCC4</i> rs9561778 mediante análisis de PCR en tiempo real asociado a sondas <i>TaqMan</i> ®.	26
Figura 6. Representación de los genotipos de <i>TYMS</i> rs45445694 mediante análisis de PCR convencional en gel de poliacrilamida.	27
Figura 7. Representación de los genotipos de <i>TYMS</i> rs2853542 mediante análisis de PCR-RFLP.	28
Figura 8. Curva de sobrevida global de pacientes con CCR en tratamiento basado en 5-FU con modelo recesivo para variante rs2231142 de <i>ABCG2</i>	33
Figura 9. Curva de sobrevida global en variante de pacientes con CCR en tratamiento basado en 5-FU con modelo dominante de la variante rs9561778 de <i>ABCC4</i>	34
Figura 10. Curva de sobrevida global de pacientes con CCR en tratamiento basado en 5-FU en modelo dominante de la variante <i>TYMS</i> rs45445694.	35
Figura 11. Curva de sobrevida global asociado a presencia o ausencia de metástasis hepática en pacientes con CCR en tratamiento con 5-FU.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes genéticas <i>ABCG2</i> rs2231142, <i>ABCC4</i> rs9561778 y <i>TYMS</i> rs45445694 y rs2853542 en población general chilena.....	28
Tabla 2. Características de los pacientes con CCR.....	29
Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes genéticas <i>ABCG2</i> rs2231142, <i>ABCC4</i> rs9561778, <i>TYMS</i> rs45445694 y <i>TYMS</i> rs2853542 en pacientes con cáncer colorrectal.	31
Tabla 4. Modelo univariable, estudio de asociación CCR a sobrevida global, en modelos de herencia dominante, recesivo y codominante en <i>ABCC4</i> rs9561778.	36
Tabla 5. Modelo univariable, estudio de asociación de CCR a sobrevida global, en modelos de herencia dominante, recesivo y codominante en <i>ABCG2</i> rs2231142.	37
Tabla 6. Modelo univariable, estudio de asociación de CCR a sobrevida global, en modelos de herencia dominante, recesivo y codominante en <i>TYMS</i> rs45445694.	37
Tabla 7. Modelo multivariable, estudio de asociación de polimorfismos de <i>TYMS</i> rs45445694 (3R3R), <i>ABCC4</i> (GT+TT) y <i>ABCG2</i> (CC) con sobrevida global de pacientes con CCR.....	38
Tabla 8. Modelo multivariable, estudio de asociación de polimorfismos de <i>TYMS</i> rs45445694 (3R3R), <i>ABCC4</i> (GT+TT) y <i>ABCG2</i> (GG), además de la presencia de metástasis hepática con la sobrevida global de pacientes con CCR.....	38

ABREVIATURAS

5'-UTR	5' -untranslate region
5-DFUR	Fluorodeoxiuridina
5-FU	5-fluorouracilo
ABC	Transportadores de cassette de unión a ATP
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BCRP	Proteína de resistencia al cáncer de mama
BTUCH	Biobanco de Fluidos y Tejidos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile
CapeOX	Esquema Capecitabina y Oxaliplatino
CCR	Cáncer colorrectal
CCRm	Cáncer colorrectal metastásico
CDA	Citidina desaminasa
CES	Carboxilesterasa
CGM	Cáncer gástrico metastásico
CH ₂ THF	5,10-metilenetetrahidrofolato
CIMP	Fenotipo metilador de islas CPG
CIN	Inestabilidad Cromosómica
CPCNP	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
DHFU	5,6-dihidro-5-fluorouracilo
dMMR	<i>Mismatch repair</i> defectuoso
dNTP	Desoxinucleótidos
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
EOF	Oxaliplatino, 5-fluorouracilo y epirrubicina
FBAL	α -fluoro- β -alanina
FdUDP	Fluorodeoxiuridina difosfato
FdUMP	Fluorodesoxiuridina monofosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FFPE	Biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina
FOLFIRI	Esquema 5-fluorouracilo, leucovorina e irinotecán

FOLFOX	Esquema 5-fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino
FUDP	Fluorouridina difosfato
FUMP	5-fluorouridina
FUPA	Ácido α -fluoro- β -ureido-propiónico
FUTP	Fluorouridina trifosfato
GCP	Buenas prácticas clínicas
HR	Hazzard ratio
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
LV	Leucovorina
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MRP	Proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos
MSI	Inestabilidad de microsatélites
n	Tamaño muestral
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPRT	Orotato fosforribosil transferasa
P-gp	Glicoproteína P
PGx	Farmacogenómica
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
RNR	Ribonucleótido reductasa
RR	<i>Risk Ratio</i>
SLC	Transportadores de soluto
TK	Timidina quinasa
TP	Timidina fosforilasa
TS	Timidilato sintasa
<i>TYMS</i>	<i>Gen que codifica para la proteína timidilato sintasa</i>
UK	Uridina quinasa
UP	Uridina fosforilasa
USF-1	Factor de transcripción 1 ascendente estimulador
UTP	Uridina trifosfato
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
χ^2	<i>Valor de test de chi-cuadrado.</i>

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es un tumor maligno que afecta el intestino grueso y representa una importante carga de enfermedad a nivel mundial. Ocupa el tercer lugar en incidencia y el cuarto en mortalidad. Es especialmente relevante en Chile, donde se sitúa como el segundo cáncer más común tanto en hombres como en mujeres. El tratamiento quimioterapéutico de CCR incluye regímenes que combinan 5-fluorouracilo (5-FU) con otros agentes citotóxicos. La farmacogenómica (PGx) permite adaptar la selección y dosificación de fármacos según las características genéticas individuales de los pacientes. Algunos polimorfismos genéticos han demostrado influir en la respuesta de los pacientes al tratamiento con 5-FU. La hipótesis de este estudio es: *“Las variantes genéticas implicadas en la respuesta de la terapia basada en 5-fluorouracilo TYMS rs2853542, ABCC4 rs9561778 y ABCG2 rs2231142 se asocian a una mayor supervivencia y la variante TYMS rs45445694 se asocia a menor supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal avanzado”*. La metodología consistió en un estudio observacional de cohorte retrospectiva que incluyó a pacientes con CCR en etapas III y/o IV tratados con esquemas quimioterapéuticos basados en 5-FU. La respuesta al tratamiento se evaluó mediante un seguimiento retrospectivo hasta los 24 meses. Se utilizó PCR convencional y en tiempo real asociado a sondas *TaqMan®* para analizar la variabilidad genética, y se recopiló los datos clínicos de los pacientes. Los análisis realizados incluyeron pruebas de equilibrio de *Hardy-Weinberg* y análisis de supervivencia con curvas de *Kaplan-Meier* y modelos de regresión de Cox. Los resultados obtenidos revelaron que las variantes genéticas estudiadas estaban en equilibrio de *Hardy-Weinberg* en la población chilena. Se observaron diferencias en los genotipos entre muestras tumorales y no tumorales para las variantes *TYMS* rs45445694 y rs2853542. Se identificó una asociación entre rs9561778 *ABCC4* y una menor supervivencia global, así como la presencia de metástasis hepática en pacientes con CCR avanzado. Sin embargo, estas asociaciones no alcanzaron significancia estadística en todas las pruebas realizadas debido al tamaño limitado de la muestra. Este estudio proporciona información valiosa sobre la variabilidad genética en la población chilena y en pacientes con CCR, así como sobre las posibles asociaciones entre variantes genéticas y la respuesta al tratamiento en este grupo de pacientes.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a malignant tumor that affects the large intestine and represents a significant burden of disease worldwide. It ranks third in incidence and fourth in mortality. It is especially relevant in Chile, where it is the second most common cancer in both men and women. Chemotherapeutic treatment of CRC includes regimens that combine 5-fluorouracil (5-FU) with other cytotoxic agents. Pharmacogenomics (PGx) allows drug selection and dosing to be adapted according to the individual genetic characteristics of patients. Some genetic polymorphisms have been shown to influence the response of patients to treatment with 5-FU. The hypothesis of this study is: "*The genetic variants involved in the response to 5-fluorouracil-based therapy TYMS rs2853542, ABCC4 rs9561778 and ABCG2 rs2231142 are associated with longer survival and the TYMS rs45445694 variant is associated with lower survival in patients with advanced colorectal cancer*". The methodology consisted of a retrospective observational cohort study that included patients with CRC in stages III and/or IV treated with 5-FU-based chemotherapeutic regimens. Response to treatment was assessed by retrospective follow-up up to 24 months. Conventional and real-time PCR associated with *TaqMan*® probes was used to analyze genetic variability, and clinical data of the patients were collected. The analyzes performed included Hardy-Weinberg equilibrium tests and survival analyzes with Kaplan-Meier curves and Cox regression models. The results obtained revealed that the genetic variants studied were in Hardy-Weinberg equilibrium in the Chilean population. Differences in genotypes between tumor and non-tumor samples were observed for the *TYMS* variants rs45445694 and rs2853542. An association was identified between rs9561778 *ABCC4* and lower overall survival, as well as the presence of liver metastasis in patients with advanced CRC. However, these associations did not reach statistical significance in all tests performed due to limited sample size. This study provides valuable information on genetic variability in the Chilean population and in patients with CRC, as well as on possible associations between genetic variants and response to treatment in this group of patients.

1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer ha aumentado en 19,3 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes por cáncer en 2020. En Chile, se diagnosticaron más de 54.000 casos de cáncer (IARC, 2023). Dentro de los más prevalentes se encuentra el cáncer colorrectal (CCR) que se describe como un tumor maligno que se origina dentro de las paredes del intestino grueso. En el mundo, el CCR reporta casi 2 millones de casos nuevos y cerca de 1 millón de muertes en 2020, así mismo, en Chile, fue el segundo cáncer más común, tanto en hombres como en mujeres, con 6 mil casos nuevos y con 3 mil muertes anuales (IARC, 2023).

Sólo el 40% de los CCR son diagnosticados en etapa temprana (etapas I-II) debido a que en esta enfermedad los síntomas son comunes y poco frecuentes en CCR tempranos, a diferencia de estadios avanzados en donde la sintomatología puede incluir cambio en los hábitos intestinales, hemorragia rectal y hematoquecia, entre otros (MINSAL 2013). Debido a esto, la sobrevida disminuye del 90% en pacientes con CCR en etapa temprana a un 11% en pacientes con CCR metastásico (CCRM), a los 5 años. (*American Cancer Society*, 2019).

1.1 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CCR

El CCR se desarrolla a partir de un pólipo, una lesión precursora neoplásica que progresa durante aproximadamente 10 a 15 años en la mayoría de los casos (Dekker *et al.*, 2019). La célula de origen en la mayoría de los casos corresponde a una célula madre del tracto digestivo. Estas células son el resultado de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que inactivan genes supresores de tumores y activan oncogenes (Nassar & Blanpain *et al.*, 2016).

Existen dos principales vías de lesiones precursoras, la vía tradicional de adenoma-carcinoma (también denominada secuencia de inestabilidad cromosómica) que conduce al 70-90% de los cánceres colorrectales, y la vía de la neoplasia serrada (10-20 % de cánceres colorrectales) (Perea *et al.*, 2011). Complementariamente, se han descrito al menos 3 mecanismos asociados al desarrollo de CCR, dentro de los cuales podemos destacar a: La

vía de inestabilidad cromosómica (CIN), la de inestabilidad de microsatélites (MSI) y fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) (Lengauer *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2021).

CIN incluye la activación de la vía Wnt, la inactivación mutacional del gen supresor de tumores APC (*Adenomatous polyposis coli*), la inactivación/delección mutacional de TP53 y la pérdida de función de p53 (Nguyen *et al.*, 2020). CIN se caracteriza por aneuploidías y alteraciones estructurales como el número de copias somáticas, deleciones, inserciones, amplificaciones o pérdida de heterocigosidad, esta vía es la responsable del 70 al 85% de los casos de CCR esporádicos (Lengauer *et al.*, 1998; Worthley & Leggett, 2010; Nguyen *et al.*, 2020).

La vía de inestabilidad de microsatélites forma parte del 15 al 20% de los casos de CCR (Boland & Goel, 2010; Lengauer *et al.*, 1998). Los microsatélites son secuencias de ADN que contienen motivos repetitivos que tienden a acumular más mutaciones que otras regiones genómicas (Richman, 2015). La inactivación de los genes *mismatch repair* (MMR) como *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* y *PMS2* generan un sistema *mismatch repair* defectuoso (dMMR) que resulta en la acumulación de mutaciones, generando la MSI. La pérdida de función de MMR da como resultado una hipermutación genética, impulsando el desarrollo de CCR (Arzimanoglou *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2021).

Por último, el CIMP es un subconjunto de CCR que ocurre a través de una vía de inestabilidad epigenética y que se caracterizan por una gran hipermetilación de los sitios promotores de islas CpG, lo que resulta en el silenciamiento de varios genes supresores de tumores u otros genes relacionados con tumores como genes de reparación del ADN (Lao & Grady, 2011; Simons *et al.*, 2013).

1.2 DIAGNÓSTICO DEL CCR

La etiología de CCR es multifactorial, incluye predisposición genética, presencia de enfermedades inflamatorias intestinales y factores de riesgo como: fumar, el sobrepeso, una dieta rica en carnes rojas y procesadas, el abuso de alcohol y la edad (*American Cancer Society*, 2020; Dekker *et al.*, 2019).

El CCR es generalmente una enfermedad asintomática hasta que alcanza una etapa avanzada, los signos y síntomas más frecuentes son el sangrado rectal oculto o manifiesto,

cambio en los hábitos intestinales, anemia o dolor abdominal (*American Cancer Society* 2020, MINSAL 2013). Para diagnosticar CCR se utiliza la colonoscopia, los CCR tempranos pueden aparecer como lesiones mucosas muy sutiles como un pólipo lateral plano e inocuo. Estas lesiones requieren una inspección de la mucosa completa y una preparación intestinal óptima (Corley *et al.*, 2014).

1.3 TRATAMIENTOS PARA CCR

En algunos cánceres tempranos (Etapa 0 y I) tras el diagnóstico, los pólipos malignos pueden ser resecados endoscópicamente en bloque, permitiendo una evaluación precisa de las características de alto riesgo y de los márgenes profundos y laterales (Hayashi *et al.*, 2013). El principal tratamiento para el CCR en etapa I y II es la cirugía para extraer el tumor o parte del colon (colectomía parcial) (Hayashi *et al.*, 2013).

Para el CCR en etapa III donde el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos, pero no a otras zonas del cuerpo, el tratamiento consiste en colectomía parcial o total, extirpación de ganglios linfáticos cercanos y de quimioterapia adyuvante y/o neoadyuvante (*American Cancer Society*, 2020). En etapa IV el cáncer ya se ha propagado a órganos (como el hígado o pulmones) y tejidos distantes. Se administra quimioterapia antes y/o después de la operación, si el cáncer se ha propagado demasiado como para tratarlo exclusivamente con cirugía. En la mayoría de los casos, el principal tratamiento consiste en quimioterapia paliativa (Haller *et al.*, 2011).

El principal esquema quimioterapéutico para tratar CCR consiste en el uso de 5-fluorouracilo (5-FU) en conjunto con otro citotóxico por vía intravenosa. Para mejorar la citotoxicidad y eficacia terapéutica del 5-FU se utiliza en conjunto con leucovorina (LV, ácido folínico), La LV actúa estabilizando al complejo FdUMP-TS, inhibiendo de forma prolongada y eficaz a la timidilato sintasa (TS) (DeLap, 1988; Chionh *et al.*, 2017). La combinación de 5-FU con la LV ha demostrado la mejora de la supervivencia de los pacientes y la tasa de respuesta tumoral de la salud de los pacientes (Thirion *et al.*, 2004).

Para aumentar la eficacia, 5-FU/LV se combina con oxaliplatino, un complejo de platino de diaminociclohexano que forma aductos de ADN (esquema FOLFOX) o irinotecan que inhibe la topoisomerasa I durante la replicación y/o transcripción (esquema FOLFIRI) (Akhtar *et*

al., 2014; Wellstein *et al.*, 2018). Las terapias combinadas FOLFOX y FOLFIRI se han establecido como regímenes citotóxicos eficaces para el tratamiento del CCRm, mejorando la sobrevida (Gustavsson *et al.*, 2015)

Por otra parte, el 5-FU puede ser administrado como pro-drogas orales lo que permitiría brindar una administración prolongada del fármaco; son absorbidas intactas a través de la mucosa gastrointestinal y posteriormente convertidos enzimáticamente a 5-FU en el hígado o dentro del tumor, esto permite exponer el 5-FU al tumor por más tiempo, en concentraciones más bajas comparadas con la vía intravenosa, minimizando los efectos adversos tóxicos (Lamberti *et al.*, 2005). La capecitabina es una de las principales pro-droga de 5-FU, se desarrolló para imitar la infusión continua de 5-FU y evitar las complicaciones de la administración intravenosa. Es administrada por vía oral junto a oxaliplatino (esquema CapeOX). Los esquemas FOLFOX y CapeOX se utilizan como primera línea del tratamiento del CCR avanzado (etapa III y IV) en Chile (MINSAL, 2013).

1.4 MECANISMO DE ACCIÓN DEL 5-FLUOROURACILO

El 5-FU es un análogo de las pirimidinas y su blanco terapéutico es la enzima TS (codificada por el gen *TYMS*). TS es una enzima clave en la síntesis de *de novo* de desoxitimidina monofosfato (dTMP), un nucleótido que se utiliza como monómero en el ADN a partir de desoxiuridina monofosfato (dUMP), este proceso es necesario para la replicación y reparación del ADN (Strimpakos *et al.*, 2009). La mayor parte de 5-FU se cataboliza a 5,6-dihidro-5-fluorouracilo (DHFU) por la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), lo que lleva a la formación de ácido α -fluoro- β -ureido-propiónico (FUPA) y luego α -fluoro- β -alanina (FBAL), excretada posteriormente por vía renal (Miura *et al.*, 2010; Saif *et al.*, 2009).

Al ingresar 5-FU a la célula, se convierte en 5-fluorouridina (FUMP), por acción de la orotato fosforribosil transferasa (OPRT) en presencia de fosforribosil pirofosfato (PRPP) o por las acciones de uridina fosforilasa (UP) y uridina quinasa (UK). FUMP se fosforila a fluorouridina difosfato (FUDP), que puede fosforilarse nuevamente a fluorouridina trifosfato (FUTP). Además, FUDP a través de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR) se metaboliza a fluorodeoxiuridina difosfato (FdUDP) que puede metabolizarse a fluorodesoxiuridina

monofosfato (FdUMP) o a fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) (Longley *et al.*, 2003). FdUMP puede ser biotrasnformado por otras vías, a partir de 5-FU, por la timidina fosforilasa (TP) y timidina quinasa (TK) (**Figura 1**).

En sí, 5-FU no presenta efectos citotóxicos, los efectos antitumorales se producen tras su interacción con los azúcares fosforilados a través de reacciones catalizadas enzimáticamente y su conversión en metabolitos activos (Saif *et al.*, 2009). Por ejemplo, FUTP se incorpora al ARN en lugar de uridina trifosfato (UTP) y FdUTP se integra al ADN en vez del desoxitimidina trifosfato (dTTP), interfiriendo con la producción normal de proteínas, lo que conduce a la muerte celular (Nicum *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2016). Por otra parte, FdUMP inhibe la actividad de TS formando un complejo ternario con 5,10-metilenetetrahidrofolato (CH₂THF), esto bloquea el acceso de dUMP al sitio de unión de nucleótidos de TS provocando la acumulación de dUMP. dUMP se fosforila a desoxiuridina trifosfato (dUTP) lo que causa daño al ADN (Mitrovski *et al.*, 1994). Además, el bloqueo de dUMP inhibe la síntesis de dTMP que produce el agotamiento de dTTP, esto desequilibra la reserva de desoxinucleótidos (dNTP) que interrumpe la síntesis y reparación del ADN, induciendo la muerte celular en las células tumorales (Longley *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2010).

La capecitabina debido a que se administra por vía oral se absorbe a través de la pared gastrointestinal, luego en el hígado se metaboliza a fluorodeoxiuridina (5-DFUR) por carboxilesterasa (CES) y citidina desaminasa (CDA), el 5-DFUR se transforma en 5-FU mediante TP y/o UP (Johnston & Kaye, 2001) (**Figura 1**).

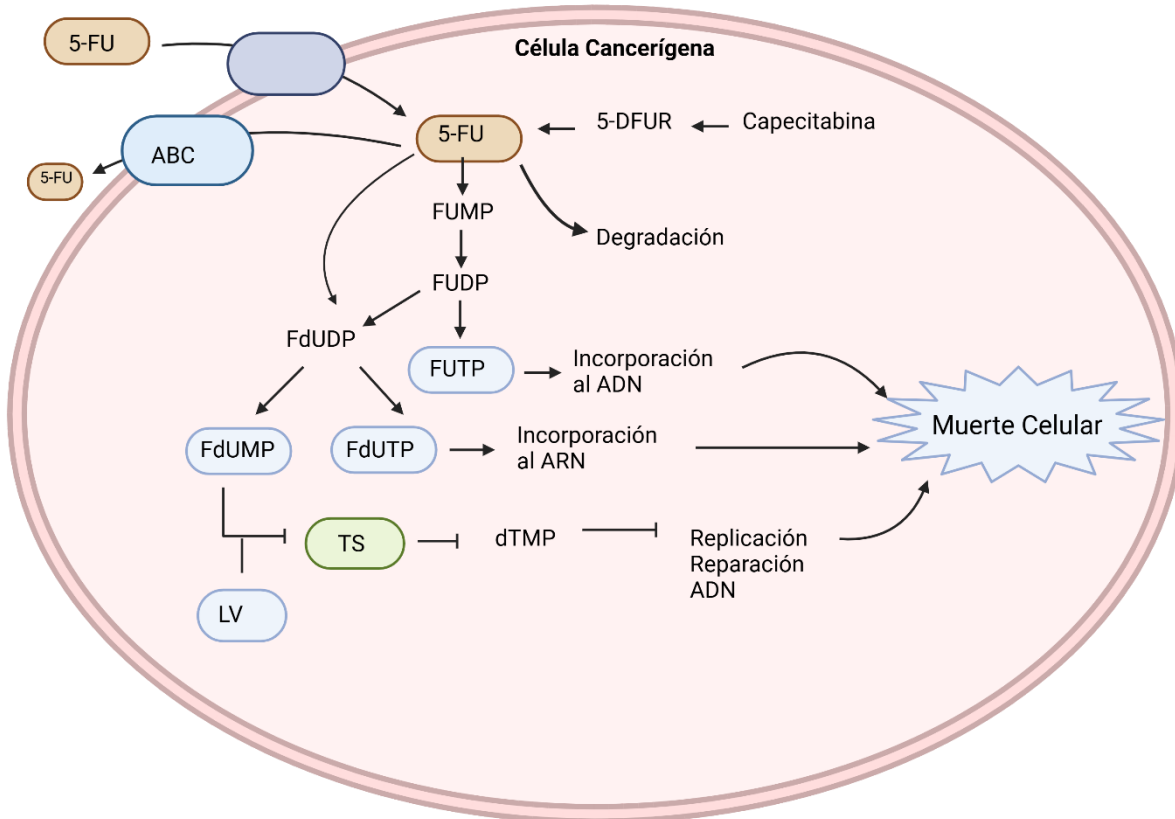


Figura 1. Mecanismo de acción de 5-FU en CCR. Los números representan las diferentes enzimas involucradas en la metabolización de 5-FU. ABC: Transportador de tipo ABC. FUTP: Fluorouridina trifosfato. FdUDP: Fluorodesoxiuridina difosfato. FdUMP: Fluorodesoxiuridina monofosfato. TS: Timidilato sintasa dUMP: desoxiuridina monofosfato. dUTP: desoxiuridina trifosfato. FdUT: Fluorodesoxiuridina trifosfato. 5-DFUR: fluorodesoxiuridina. LV: Leucovorina. dTMP: Desoxitimidina monofosfato. Creado en *Biorender.com*

1.5 VARIABILIDAD GENÉTICA ASOCIADA A LA RESISTENCIA DE LA TERAPIA CON 5- FLUOROURACILO

La medicina de precisión (MP) tiene un enfoque emergente para el tratamiento y prevención de enfermedades donde se considera la variabilidad individual en los genes, el ambiente y estilo de vida de cada paciente (Van der Wouden *et al.*, 2020). Dentro de la MP, la farmacogenómica (PGx) adapta la selección y la dosificación de fármacos a las características genéticas de cada paciente, refiriéndose al polimorfismo de genes específicos que inducen una respuesta individual a los medicamentos o susceptibilidad a reacciones adversas a los medicamentos (Vogel 1959 ; Relling *et al.*, 2020).

1.5.1 Polimorfismos de *TYMS* asociada a la resistencia de la terapia con 5-fluorouracilo.

Uno de los mecanismos de resistencia al 5-FU es el aumento de la expresión de la proteína TS. La sensibilidad de las células a 5-FU puede verse afectado por las variantes genéticas del gen *TYMS*, los niveles de expresión del gen *TYMS*/proteína TS y las concentraciones intracelulares de desoxinucleótidos (dNTP) y CH₂THF (Zhou *et al.*, 2012).

Estudios indicaron que la baja expresión de TS en pacientes con CCR con tumores avanzados se asoció con una mayor sensibilidad individual a la terapia basada en 5-FU (Iyevleva *et al.*, 2007). Estudios con líneas celulares de CCR y tejidos tumorales han demostrado que la terapia con 5-FU contribuyó al aumento de la expresión de TS (Longley *et al.*, 2003). Esto puede ser consecuencia de retroalimentación negativa en el que TS sin ligando se une a su propio ARNm e inhibe su propia traducción (Chu *et al.*, 1994). Cuando TS se une de manera estable a FdUMP, TS ya no puede unirse a su propio ARNm ni suprimir su traducción, aumentando la expresión de TS (Longley *et al.*, 2003).

Una baja cantidad de TS en las células tumorales puede estar asociado con un curso menos agresivo de la enfermedad y un pronóstico más favorable de los pacientes. Los niveles bajos de TS pueden provocar daños graves en el ADN y dado que las células cancerígenas poseen un mayor grado de proliferación en comparación con las células sanas, la

disminución de TS en el tejido tumoral puede conducir a una disminución del sustrato dTMP, inhibiendo su replicación y proliferación. (Allegra *et al.*, 2003; Aprile *et al.*, 2009).

Algunos polimorfismos afectan las diferencias en la sensibilidad de los pacientes al tratamiento con 5-FU. Unos de estos polimorfismos corresponden al rs45445694 que se encuentra en la región 5'-UTR (5'-*untranslate region*) del gen *TYMS*, es una secuencia *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) de 28 pares de bases, repetida 2 o 3 veces (2R o 3R), donde se encuentran los genotipos: 2R/2R, 2R/3R, 3R/3R (**Figura 2a y 2b**) (Funke *et al.*, 2008). El análisis en tejidos tumorales sugirió una correlación entre el genotipo 2R/2R y la baja expresión de *TYMS* en pacientes con CCR avanzado (Castro-Rojas *et al.*, 2017). En un meta-análisis de 39 estudios con datos de hasta 2402 pacientes se encontró que el genotipo *TYMS*, 2R/2R se asoció significativamente con un beneficio clínico mejorado (Jennings *et al.*, 2012).

Otra variante de *TYMS* es rs2853542, que posee un cambio de base de G>C en el nucleótido 12 de la segunda repetición del alelo 3R en el 5' UTR (**Figura 2c**). Esto disminuye la capacidad transcripcional de TS, se cree que es porque el cambio G>C suprime un sitio de unión adicional para el factor de transcripción 1 ascendente estimulador (USF-1). Los genotipos 2R/2R, 2R/3RC y 3RC/3RC se asocian a una baja expresión de TS (Mandola *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2011). Mientras que el alelo G se ha relacionado con el aumento de la expresión de TS, e *in vitro* se ha visto que los genotipos 2R/3G, 3C/3G, 3G/3G son de alta expresión de TS, por lo que se ha descrito que hay menor respuesta al 5-FU, por lo tanto, un aumento en la mortalidad de los pacientes CCR (Yim *et al.*, 2010).

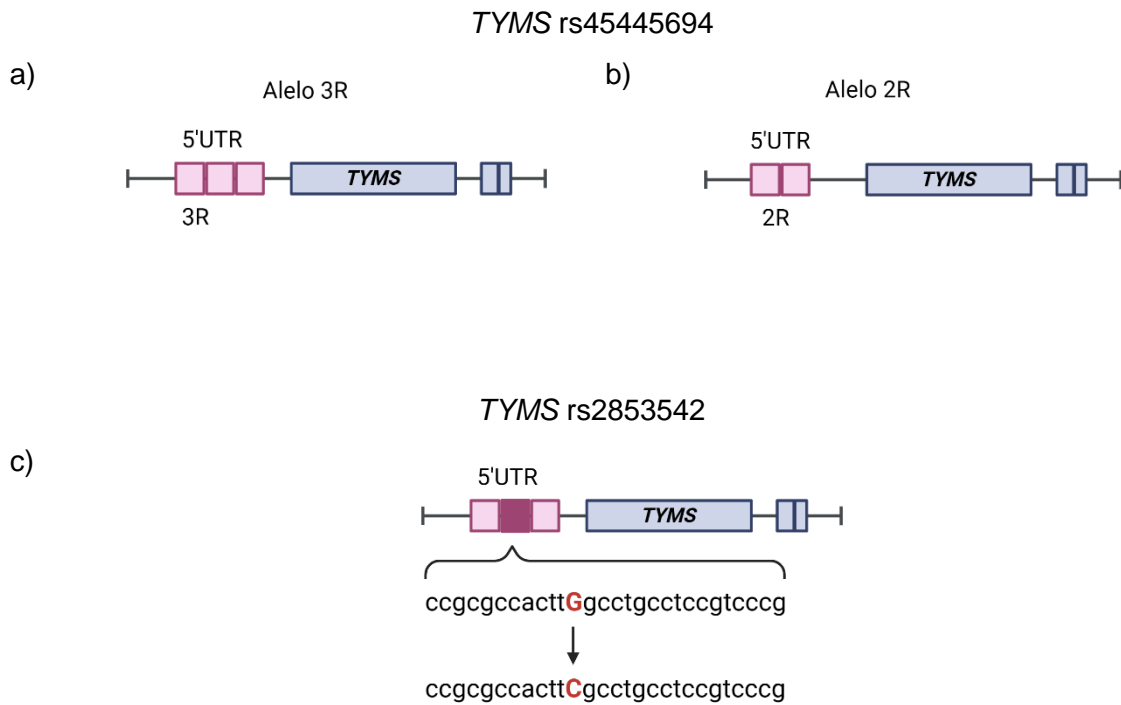


Figura 2. Polimorfismos genéticos de *TYMS* rs45445694 y *TYMS* rs2853542, incluidos en esta tesis

a) *TYMS* rs45445694, 3 repeticiones de 28 pares de bases en 5' UTR. b) *TYMS* rs45445694, 2 repeticiones de 28 pares de bases en 5' UTR c) *TYMS* rs2853542, cambio de base de G>C en el nucleótido 12 de la segunda repetición del alelo 3R en el 5' UTR. Creado por *Biorender.com*

1.5.2 Polimorfismos de *ABCC4* Y *ABCG2* asociada a la resistencia de la terapia con 5- fluorouracilo.

Los transportadores de membrana son proteínas responsables del transporte de sustratos dentro y fuera de las células (*Giacomini et al., 2010*). Se dividen en dos grandes

superfamilias: transportadores de casete de unión a ATP (ABC) y transportadores de soluto (SLC). Dentro de los transportadores ABC están: La glicoproteína P (P-gp, ABCB1 o MDR1), la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP/ABCG2, ABCP o MXR1) y las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP) (Giacomini *et al.*, 2010).

La sobreexpresión de ciertos transportadores en las células cancerígenas en la membrana plasmática es un factor clave en el desarrollo de resistencia a los agentes quimioterapéuticos (Szakacs *et al.*, 2006). Los mecanismos de quimiorresistencia basados en proteínas de transporte consiste en la expulsión de fármacos desde las células cancerígenas a través de proteínas transportadoras de membrana, disminuyendo la disponibilidad intracelular de los fármacos quimioterapéuticos y su acción (Hu *et al.*, 2016). Algunos polimorfismos de interés asociados a CCR son el polimorfismo rs2231142 (8:c.421G>T) que se ubica en el gen *ABCG2*, con un cambio de tipo *missense*, de glutamina por lisina en el aminoácido 141 de la proteína ABCG2, generando una disminución en su función. Estudios mostraron que los pacientes con el genotipo GG que recibieron un régimen FOLFOX/CapeOX (incorporación de la pro-droga de 5-FU, capecitabina) tuvieron una tasa de respuesta reducida, en comparación con aquellos con el genotipo GT o TT (Zhao *et al.*, 2014). El otro polimorfismo es rs9561778, un SNP del gen *ABCC4*, con un cambio intrónico (11:g.95061461G>T). Se ha descrito que este polimorfismo podría estar ubicado dentro de un sitio de unión del factor de transcripción, dentro de una secuencia *enhancer* que afectaría el nivel de expresión del gen *ABCC4*, aumentando su función (Low *et al.*, 2009). Se ha visto que otros polimorfismos de *ABCC4* se han relacionado significativamente con la eficacia de la quimioterapia basada en 5-FU y capecitabina en pacientes con CCR (Chen *et al.*, 2017).

Considerando las implicancias que pueden tener los polimorfismos de las variantes genéticas asociadas a las enzimas de metabolización y transporte de 5-FU y como esto puede afectar la sobrevida global de pacientes con CCR en etapas avanzadas se postula la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

Las variantes genéticas implicadas en la respuesta de la terapia basada en 5-fluorouracilo *TYMS* rs2853542, *ABCC4* rs9561778 y *ABCG2* rs2231142 se asocian a una mayor sobrevida y la variante *TYMS* rs45445694 se asocia a menor sobrevida de pacientes con cáncer colorrectal avanzado.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la relación entre las variantes genéticas de *TYMS* rs45445694 y rs2853542, *ABCC4* rs9561778 y *ABCG2* rs2231142 implicadas en la respuesta de la terapia basada en 5-fluorouracilo y la sobrevida global de pacientes con cáncer colorrectal avanzado.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- 1) Determinar la frecuencia de las variantes genéticas de *TYMS* rs45445694 y rs2853542, *ABCC4* rs9561778 y *ABCG2* rs2231142 en un grupo de la población general chilena.
- 2) Determinar la frecuencia de las variantes genéticas de *TYMS* rs45445694 y rs2853542, *ABCC4* rs9561778 y *ABCG2* rs2231142 en pacientes con cáncer colorrectal avanzado con terapia basada en 5-fluorouracilo.
- 3) Evaluar la relación de las variantes genéticas de *TYMS* rs45445694 y rs2853542, *ABCC4* rs9561778 y *ABCG2* rs2231142 con la sobrevida global de pacientes con cáncer colorrectal avanzado con terapia basada en 5-fluorouracilo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

4.1.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional de cohorte retrospectiva. Con pacientes con CCR etapa III y/o IV tratados con esquemas quimioterapéuticos basados en 5-FU en primera o segunda línea, pertenecientes al Biobanco de Fluidos y Tejidos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (BTUCH) e Instituto Nacional del Cáncer (INC).

Se realizó seguimiento retrospectivo para evaluar la respuesta mediante la sobrevida global (método de *Kaplan Meier* con test de *log-rank* y modelo regresión de Cox) hasta los 24 meses. Se consideraron como expuestos a aquellos pacientes con la(s) variante(s) genética(s) y a los pacientes sin la(s) variante(s) genética(s) como no expuestos.

4.1.2 Cálculo tamaño muestral

Para el cálculo de tamaño muestral se realizó la aproximación basada en el estudio de Ruzzo *et al.*, 2006. Se consideró un *Risk Ratio* (RR) de 2,21 obtenido en dicho estudio para el genotipo *TYMS* rs45445694, que tiene frecuencia de 29%, intervalo de confianza del 95%, poder estadístico del 80% y una tasa de censura del 3%.

El cálculo fue realizado a través de la página *Sample-Size.net* (www.sample-size.net) basados en la fórmula Schoenfeld arrojando un tamaño muestral inicial de 69 pacientes, 20 son el grupo expuesto y 49 el grupo no expuesto. Finalmente, para esta tesis, se logró obtener un total de 65 pacientes.

4.1.3 Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión son:

- (1) Paciente mayor de 18 años diagnosticados con cáncer colorrectal etapa III y IV con consentimiento firmado que autorice que sus muestras pueden ser usados en estudios de investigación.
- (2) Paciente que cuente con identificación del hospital de tratamiento.
- (3) Paciente tratado con esquemas basados en 5-FU como primera línea de tratamiento.

Los criterios de exclusión son:

- (1) Pacientes con histología diferente a adenocarcinoma.
- (2) Pacientes sin muestra de tumor primario en el hospital de cirugía.
- (3) Pacientes incluidos en estudio clínico intervencional como parte del tratamiento de cáncer colorrectal metastásico.
- (4) Pacientes que presenten inestabilidad de microsatélites.
- (5) Pacientes que hayan abandonado el tratamiento por motivos desconocidos.
- (6) Pacientes que presenten algún tipo de cáncer secundario con tratamientos quimioterapéuticos.
- (7) Pacientes que sean tratados con tratamiento biológico como tratamiento de primera línea.

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN TUMORAL Y/O GERMINAL DESDE BIOPSIAS FIJADAS EN FORMALINA Y EMBEBIDAS EN PARAFINA (FFPE)

En las etapas iniciales del proyecto se seleccionaron las áreas de los tejidos FFPE, identificados previamente por el anatomopatólogo del BTUCH, tumorales y/o germinales para la extracción de ADN. Se utilizó el kit *Allprep DNA/RNA FFPE Kit*, Qiagen®, siguiendo el protocolo del proveedor. En el laboratorio se tenía una disponibilidad de 65 pacientes con el ADN ya extraído, por lo que este procedimiento era sólo para las nuevas muestras de pacientes incorporados. Sin embargo, durante el periodo de esta tesis, no se realizó el procedimiento debido a que las muestras no llegaron a tiempo.

4.3 CUANTIFICACIÓN Y CONTROLES DE CALIDAD DEL ADN

El ADN extraído se cuantificó y se determinó su relación 260/280 nm mediante espectrofotometría con el equipo Denovix DS-11 (*nanodrop*). La integridad del ADN fue analizada previamente en un gel de agarosa al 0,8% en las etapas iniciales del proyecto.

4.4 ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN ADN GERMINAL Y TUMORAL

La concentración de ADN usada para los análisis moleculares fue de 10-20 ng/μL. La determinación de los polimorfismos genéticos se realizó mediante PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*® para *ABCC4* rs9561778 y *ABCG2* rs2231142, para esto se

utilizaron los programas de PCR recomendado por el fabricante para estas sondas. Las determinaciones se realizaron en los equipos *Stratagene Mx3000p* y *AriaMx Real-Time PCR* marca *Agilent®*.

Para las determinaciones de las mutaciones de células tumorales y germinales de *TYMS* rs45445694 se utilizó PCR convencional con gel de agarosa al 2% o gel de poliacrilamida al 18%. Los *primers* utilizados fueron *forward* 5'-GCGGAAGGGGTCCTGCCA-3' y el *reverse* 5'-TCCGAGCCGGCCACAGGCAT-3'. La amplificación se realizó con las siguientes condiciones, 5 min a 95°C, luego 30 ciclos con una temperatura de 95°C por 15 s, después 68°C por 15 s, posteriormente una temperatura de extensión 72°C por 10 s, para finalizar con una temperatura de 72°C por 5 minutos (**Figura 3**).

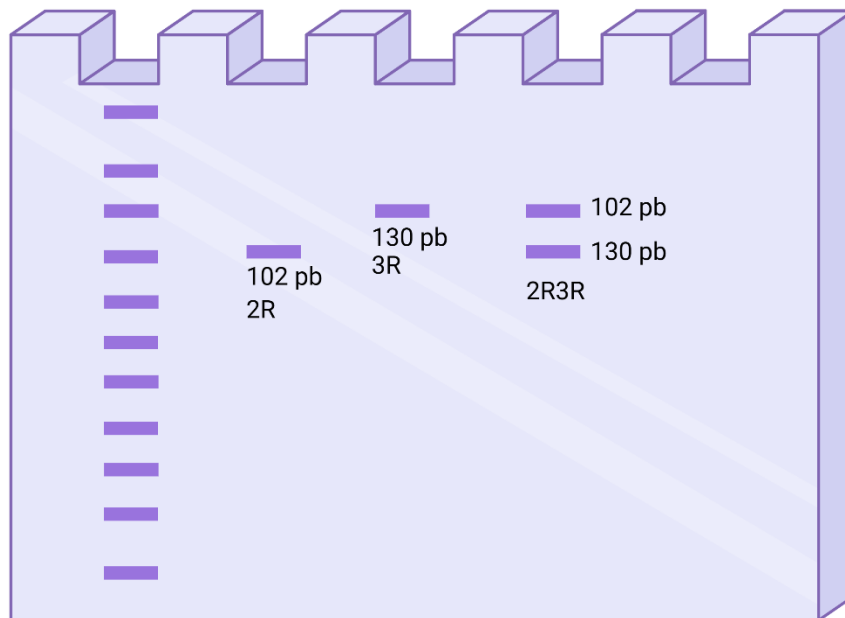


Figura 3. Esquema PCR convencional *TYMS* rs45445694. Fragmento de 102 pares de bases corresponde al genotipo de 2 repeticiones (2R), fragmento de 130 pares de bases corresponde al genotipo de 3 repeticiones (3R), el carril con 2 bandas corresponde al heterocigoto, 2R3R.

La determinación de *TYMS* rs2853542 se realizó mediante PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* PCR). Se utilizaron los productos PCR obtenidos del PCR de *TYMS* rs4544569 junto con la enzima de restricción BsuRI (HaeIII) *Fast Digest*, con una

incubación de 15 minutos a 37°C, posteriormente se visualizó en gel de poliacrilamida al 18% (**Figura 4**).

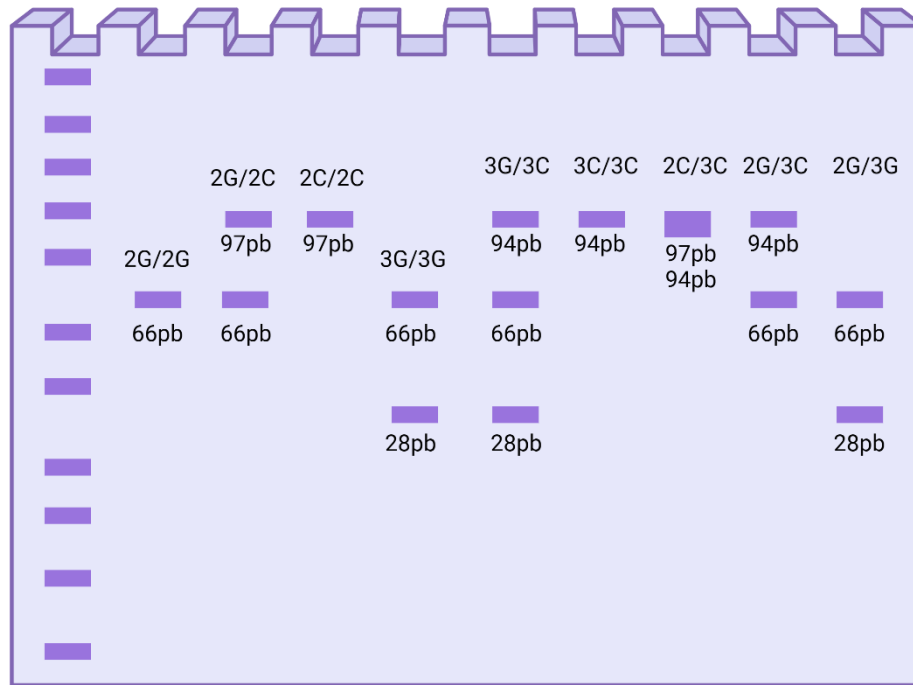


Figura 4. Esquema PCR-RFLP para TYMS rs2853542. 2G/2G: 66pb, 2G/2C: 97 y 66 pb, 2C/2C: 97 pb, 3G/3G: 66 y 28 pb, 3G/3C:94, 66 y 28 pb, 3C/3C: 94 pb, 2C/3C: 97 y 94 pb, 2G/3C: 94 y 66 pb, 2G/3G: 66 y 28 pb.

4.5 RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS

Se realizó la revisión de las fichas clínicas de los pacientes seleccionados para la recopilación de los datos. Entre estos datos incluyeron: Sexo, edad, fecha del diagnóstico, fecha de fallecimiento, fecha de tratamiento quimioterapéutico de primera línea y esquema utilizado, fecha de tratamiento quimioterapéutico de segunda línea y el esquema utilizado, diagnóstico del médico anatomopatólogo, TNM, diagnóstico oncología médica, cáncer secundario, grado del tumor, co-morbilidades asociadas, hábito tabáquico, hábito alcohólico, entre otros. Todos estos datos clínicos se recopilaron en un *Electronic Case Report Form* (CRF) adecuado al estudio, mediante la plataforma RedCap®.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para análisis estadísticos en población general chilena se realizó un test de χ^2 para verificar si la población se encontraba en equilibrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) (Rohlf & Weir, 2008). Para análisis estadísticos de asociación de la respuesta terapéutica, en términos de supervivencia, se realizaron por curvas de *Kaplan-Meier*, donde se utilizaron las fechas de fallecimiento de los pacientes. Para determinar las diferencias significativas entre las curvas se utilizó el test de *log-rank*. Las variables genéticas se analizaron mediante modelos de herencia codominante, recesiva, dominante y multiplicativa. Este análisis se realizó mediante el análisis de regresión de Cox, donde se determinaron los datos de *Hazard Ratio* (HR) de cada una de las variables. Se realizaron de manera univariada y se determinarán aquellos con *p-value* significativo. Los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico *Survival* en el software R 3.5.3 del programa RStudio®. Se consideró para todos los análisis un poder estadístico de 80% y una significancia del 95%.

4.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto fue aprobado por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Norte (SSMN) y el Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, de acuerdo con las normas sugeridas en la Declaración de Helsinki (Helsinki, 1964) y considerando el uso de las buenas prácticas clínicas (GCP) (**Anexo I, Anexo II, Anexo III y Anexo IV**). Los procedimientos realizados en este estudio se realizaron contemplando las leyes nacionales N° 20.120 (sobre la investigación científica en el ser humano, su genoma prohíbe la clonación humana), N° 19.628 (sobre la protección de la vida privada) y N° 20.584 (Regula los derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención de salud).

La toma de datos clínicos se realizó mediante la presentación de una dispensa de consentimiento informado (**Anexo II**). Se completó un eCRF con los datos obtenidos desde las fichas clínicas (**Anexo V**). La recolección de muestras y datos fue mediante el BTUCH, lo que permite asegurar el correcto resguardo de muestras biológicas y datos clínicos de los pacientes.

5. RESULTADOS

5.1 DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE *TYMS*, *ABCC4* Y *ABCG2* EN PACIENTES DE POBLACIÓN GENERAL CHILENA.

La determinación de las variantes genéticas de *ABCC4* y *ABCG2* se realizaron mediante PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*[®]. Los ejemplos de resultados representativos obtenidos son los descritos en la **figura 5**.

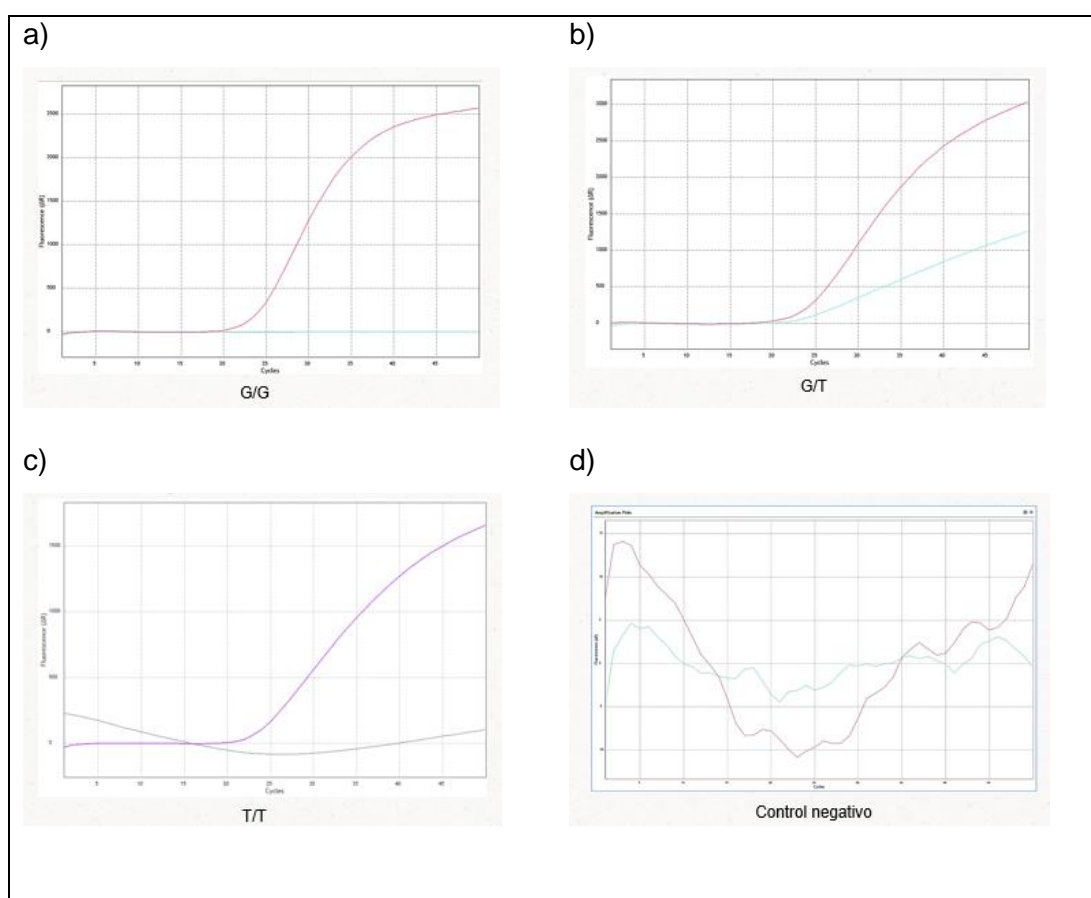


Figura 5. Ejemplo de representación de la presencia de los genotipos mediante análisis de PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*[®].

a) Curva representativa de genotipo homocigoto G/G. b) Curva representativa de genotipo heterocigoto G/T. c) Curva representativa de genotipo homocigoto T/T. d) Curva representativa para control negativo (sin ADN).

La variante genética *TYMS* rs45445694 se analizó por PCR convencional en gel de agarosa al 2% o poliacrilamida al 18%. Los resultados representativos obtenidos son los descritos en la figura 6.

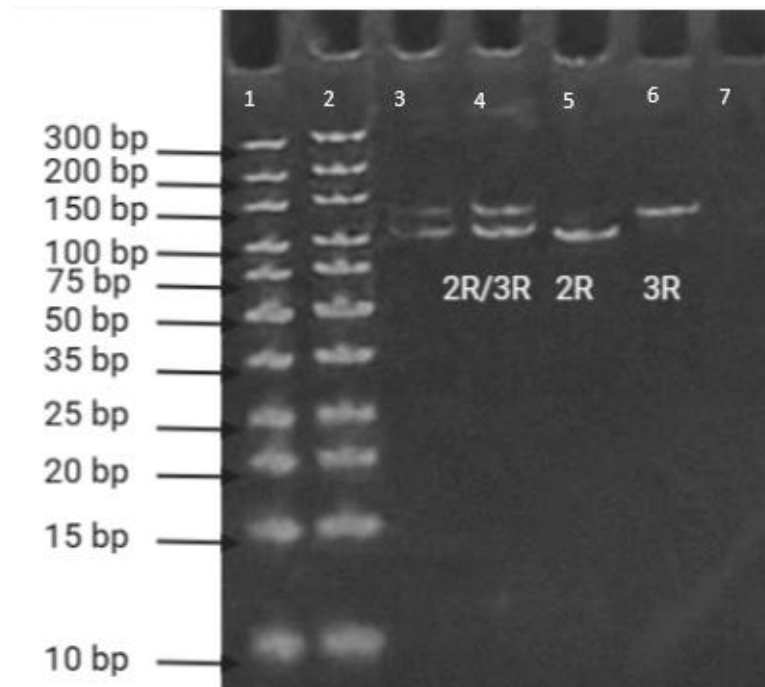


Figura 6. Representación de los genotipos de *TYMS* rs45445694 mediante análisis de PCR convencional en gel de poliacrilamida. Carril 1 y 2: Ladder. Carril 3 y 4: 2R/3R. Carril 5: 2R/2R, Carril 6: 3R/3R.

La variante *TYMS* rs2853542 se analizó por PCR-RFLP. Los resultados representativos obtenidos son los descritos en la **figura 7**.

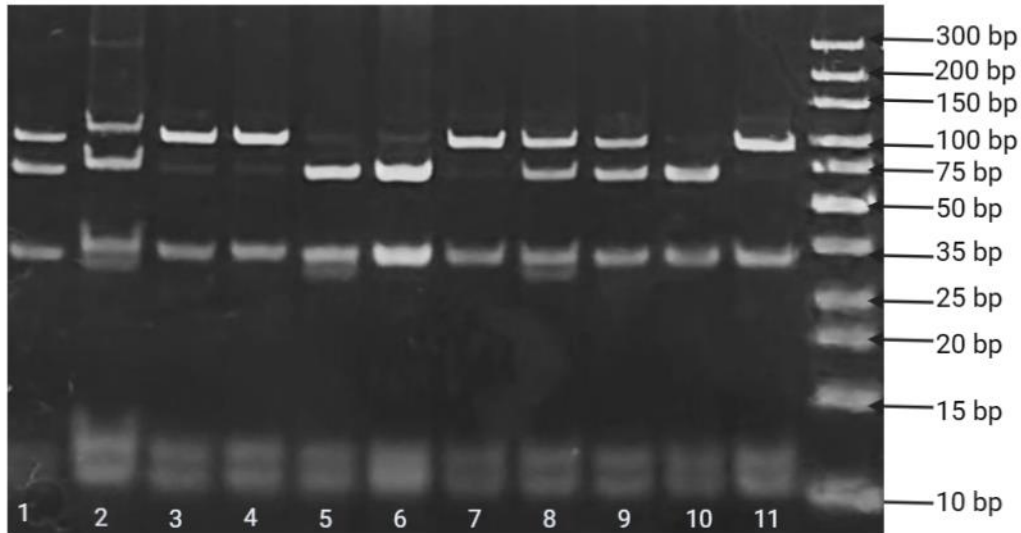


Figura 7. Representación de los genotipos de *TYMS* rs2853542 mediante análisis de PCR-RFLP. Carril 1, 7 y 11: 3C/3C. Carril 2 y 8: 2G/3C. Carril 3: 3C/3G, Carril 4: 2C/3C, Carril 5: 2G/2G, Carril 6 y 10: 3G/3G y Carril 9: 2C/2G.

Las frecuencias alélicas y genotípicas determinadas obtenidas se describen en la **tabla 1**.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes genéticas *ABCG2* rs2231142, *ABCC4* rs9561778 y *TYMS* rs45445694 y rs2853542 en población general chilena.

Variante Genética	Genotipo	Porcentaje (n)	Alelo	Frecuencia	<i>P</i> -value o χ^2 para EHW
<i>ABCC4</i> rs9561778	GG	81,7% (85)	G	0,899	$\chi^2 = 1,031$
	GT	16,3% (17)	T	0,101	
	TT	1,9% (2)			
<i>ABCG2</i> rs2231142	GG	78,6% (81)	G	0,883	$\chi^2 = 0,332$
	GT	19,4% (20)	T	0,117	
	TT	1,9% (2)			
<i>TYMS</i> rs45445694	2R/2R	21,5% (23)	2R	0,453	$\chi^2 = 0,157$
	2R/3R	47,6% (51)	3R	0,547	
	3R/3R	30,8% (33)			
<i>TYMS</i> rs2853542 n=105	CC	9,5% (10)	C	0,395	$\chi^2 = 11,5$ <i>p</i> -value= 0,013
	CG	60% (63)	G	0,605	
	GG	30,5% (32)			

EHW: Equilibrio *Hardy-Weinberg*; *n*: Tamaño muestral; χ^2 : Valor de test de chi-cuadrado.

Las variantes de *ABCG2*, *ABCC4*, *TYMS* se analizaron por el test χ^2 para comprobar si estaban en EHW. Como este valor fue menor a 3,84 (con 1 grado de libertad, $\alpha=0,05$) para las variantes genéticas de *ABCG2*, *ABCC4*, *TYMS* (rs45445694), no se rechazó la hipótesis nula, lo que indica que la población está en EHW.

En el caso de *TYMS* rs2853542, el valor de χ^2 fue mayor a 3,84, esto puede deberse a la presencia de muchos heterocigotos (Stern., 1943). Por lo que se somete a un segundo test, el test exacto, que es más adecuado para la distribución de genotipos para este polimorfismo (Wigginton *et al.*, 2005). El test arrojó un *p-value* de 0,013. Si se considera un *p-value* mayor a 0,01 para cumplir con el EHW (Rohlf & Weir, 2008), se puede indicar que la variante genética *TYMS* rs2853542 se encuentra en EHW.

5.2 DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE *TYMS*, *ABCC4* Y *ABCG2* EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL AVANZADO.

Las características de los 65 pacientes con CCR avanzado se observan en la **tabla 2**. Las características incluyen, sexo, tipo de muestra (si se obtuvo por cirugía o colonoscopia), lugar de la localización del tumor si es en la zona derecha o izquierda del colon y si hay presencia o no de metástasis en el hígado o en el pulmón. Al momento de revisar las fichas clínicas, se observó que no todos los pacientes registraron de la localización del tumor, metástasis hepática y metástasis en el pulmón.

Tabla 2. Características de los pacientes con CCR

Características	Número de Pacientes (%)
Sexo	
Masculino	32 (49,2%)
Femenino	33 (50,8%)
Tipo de muestra	
Cirugía	55 (84,6%)
Colonoscopia	10 (15,4%)
Localización del tumor	
Derecha	13 (20%)

Izquierda	40 (61,5%)
Sin datos	12 (18,5%)
Metástasis hepática	
Si	36 (55,4%)
No	15 (23,1%)
Sin datos	14(21,5 %)
Metástasis en pulmón	
Si	30 (46,2%)
No	29 (44,6%)
Sin datos	6 (9,2 %)

%. Porcentaje

De las 65 muestras tumorales de los pacientes con cáncer de colon extraídas en el laboratorio, alrededor de un 10% de ellas presentaba problemas con su calidad (razón 260/280 menor a 1,6) y, en algunos casos, no se encontraba disponible el ADN del paciente, por lo que el n muestral inicial disminuyó para algunos análisis moleculares. Alrededor de un 50% de los pacientes poseían dos tipos de muestras, tumoral y no tumoral (tejido adyacente), por lo que se utilizaron ambas muestras para los análisis en algunos casos. Los genotipos obtenidos tanto a nivel germinal como tumoral son idénticas para *ABCG2* y *ABCC4*. Para la variante de *TYMS* rs45445694, se encontraron diferencias en células germinales y tumorales, presentándose en el segundo caso principalmente el genotipo 2R/3R para casi todas las muestras de pacientes con cáncer colorrectal. Para *TYMS* rs2853542 también se encontraron diferencias entre células germinales y tumorales, presentándose únicamente el genotipo heterocigoto C/G. Las frecuencias alélicas y genotípicas determinadas en el estudio se observan en la **tabla 3**.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes genéticas *ABCG2* rs2231142, *ABCC4* rs9561778, *TYMS* rs45445694 y *TYMS* rs2853542 en pacientes con cáncer colorrectal.

Variante Genética	Genotipo	Porcentaje (n)	Alelo	Frecuencia
ABCC4 rs9561778 n=45	GG	95,56%(43)	G	0,967
	GT	2,22%(1)	T	0,033
	TT	2,22%(1)		
ABCG2 rs2231142 n=57	GG	85,96%(49)	G	0,903
	GT	8,77%(5)	T	0,096
	TT	5,26%(3)		
TYMS rs45445694 (muestras tumorales) n=59	2R/2R	3,39%(2)	2R	0,500
	2R/3R	93,22% (55)	3R	0,500
	3R/3R	3,39%(2)		
TYMS rs45445694 (muestras tumorales) no n=24	2R/2R	25% (6)	2R	0,500
	2R/3R	50% (12)	3R	0,500
	3R/3R	25% (6)		
TYMS rs2853542 (muestras tumorales) n=14	CC	0% (0)	C	0,500
	CG	100% (14)	G	0,500
	GG	0 (0)		
TYMS rs2853542 (muestras tumorales) no n=11	CC	9,1%(1)	C	0,364
	CG	18,2%(2)	G	0,636
	GG	72,7% (8)		

n: tamaño muestral

5.3 DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE *ABCC4* Y *ABCG2* CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL AVANZADO CON TERAPIA BASADA EN 5-FLUOROURACILO.

En las **figuras 8, 9, 10 y 11** se muestran las curvas *Kaplan-Meier* más representativos de sobrevida para las variantes genéticas de *ABCC4*, *ABCG2* y *TYMS* y la presencia de metástasis hepática. No se realizaron estos análisis para *TYMS* rs2853542, debido a que se presentó sólo un genotipo en las muestras tumorales de pacientes.

En las **tablas 4, 5, 6 y 7** se muestran los resultados obtenidos de las regresiones de Cox y *Hazard ratio* (HR). Estos resultados fueron obtenidos de los análisis de asociación de las variantes genéticas (*ABCC4* rs9561778, *ABCG2* rs2231142 y *TYMS* rs45445694) con la sobrevida global de pacientes con CCR avanzado en modelos de herencia (dominante, recesivo y codominante). Además, se analizó la asociación de la presencia de metástasis hepática con la sobrevida global de pacientes con CCR avanzado.

En pacientes CCR avanzado la menor sobrevida se observó en los genotipos GG de *ABCG2* y 2R3R+3R3R de *TYMS*, sin embargo, no llegaron a valores significativos en el test de *log-rank* (0,41 y 0,44, respectivamente). En el caso de *ABCC4*, el modelo dominante (GT+TT) el test de *log-rank* fue estadísticamente significativo (*p-value* = 0,039). Sin embargo, solo hubo un caso que presentó el genotipo GG y el *p-value* del modelo fue 0,076. Para los pacientes con CCR, se observó que la presencia de metástasis hepática se asoció con una menor sobrevida con un test de *log-rank* de 0,042.

Se realizó un análisis multivariable con los 3 polimorfismos genéticos GG de *ABCG2*, 3R3R de *TYMS*, y GT+TT *ABCC4*. En la **tabla 7** se muestran los datos de las regresiones de Cox (*p-value*), *Hazard ratio* (HR), el R^2 y *p-value* del modelo multivariable (el R^2 fue 0,1555 y el *p-value* del modelo es 0,2554).

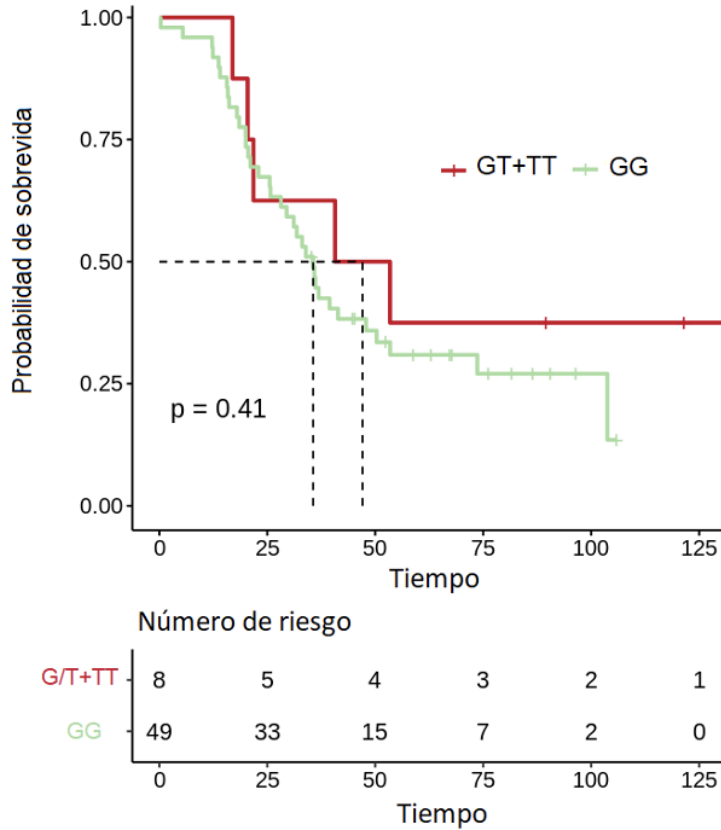


Figura 8. Curva de supervivencia global de pacientes con CCR en tratamiento basado en 5-FU con modelo recesivo para variante rs2231142 de ABCG2. Línea roja representa la supervivencia global de los pacientes que presentan genotipos G/T y T/T y la verde representa la supervivencia global de los pacientes que presentan genotipo G/G de la variante ABCG2 rs2231142.

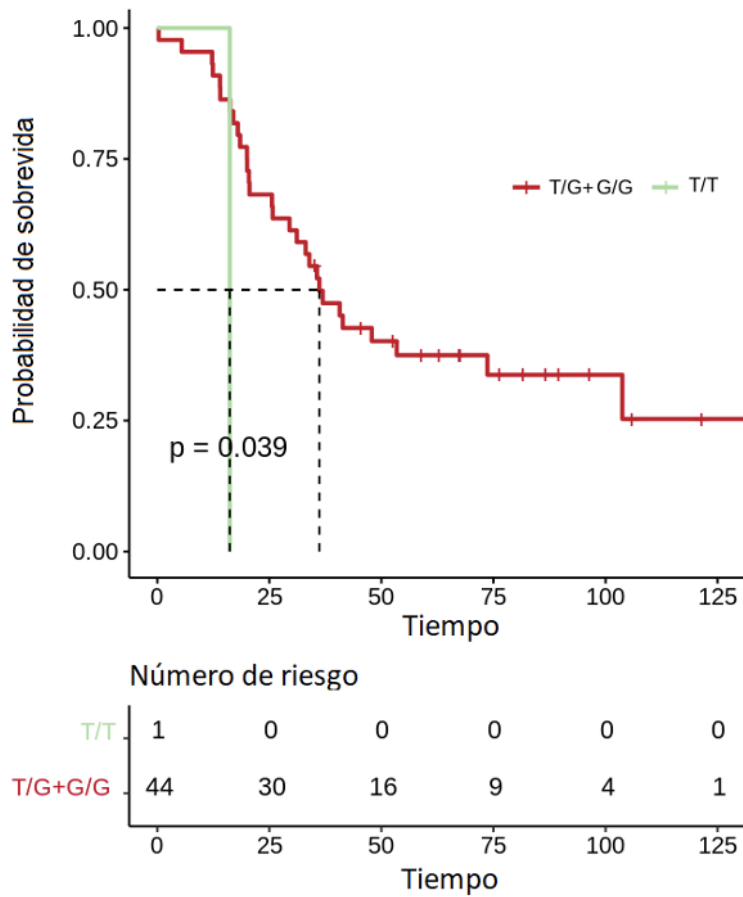
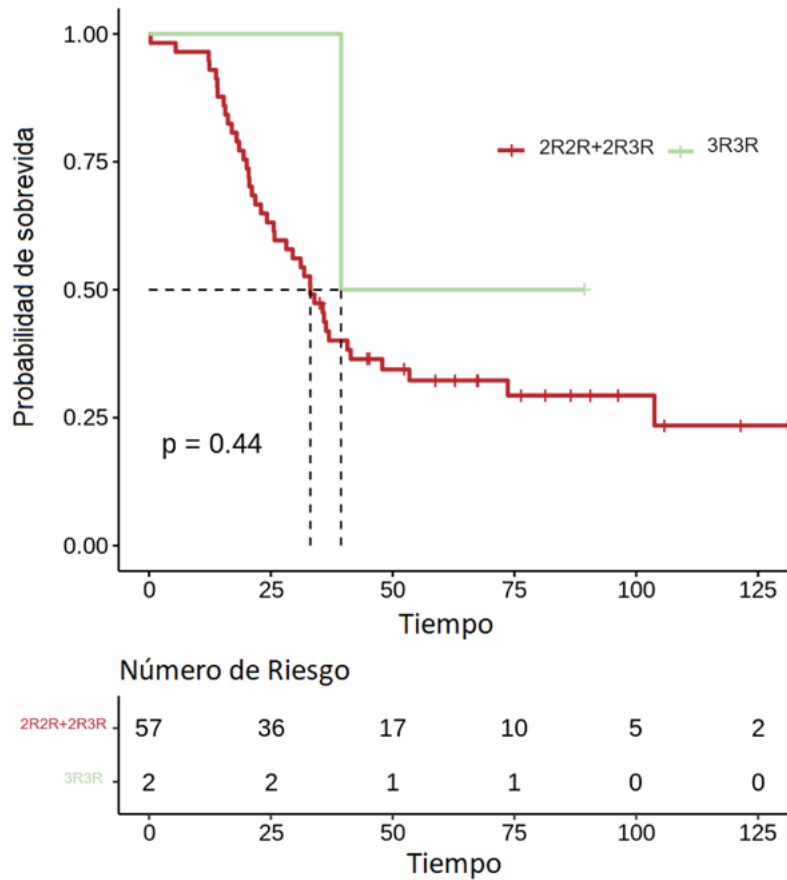


Figura 9. Curva de supervida global en variante de pacientes con CCR en tratamiento basado en 5-FU con modelo dominante de la variante rs9561778 de *ABCC4*. Línea roja representa la supervida de los pacientes que presentan genotipos T/G y T/T y la verde representa la supervida de los pacientes que presentan genotipo G/G de la variante rs9561778 *ABCC4*.



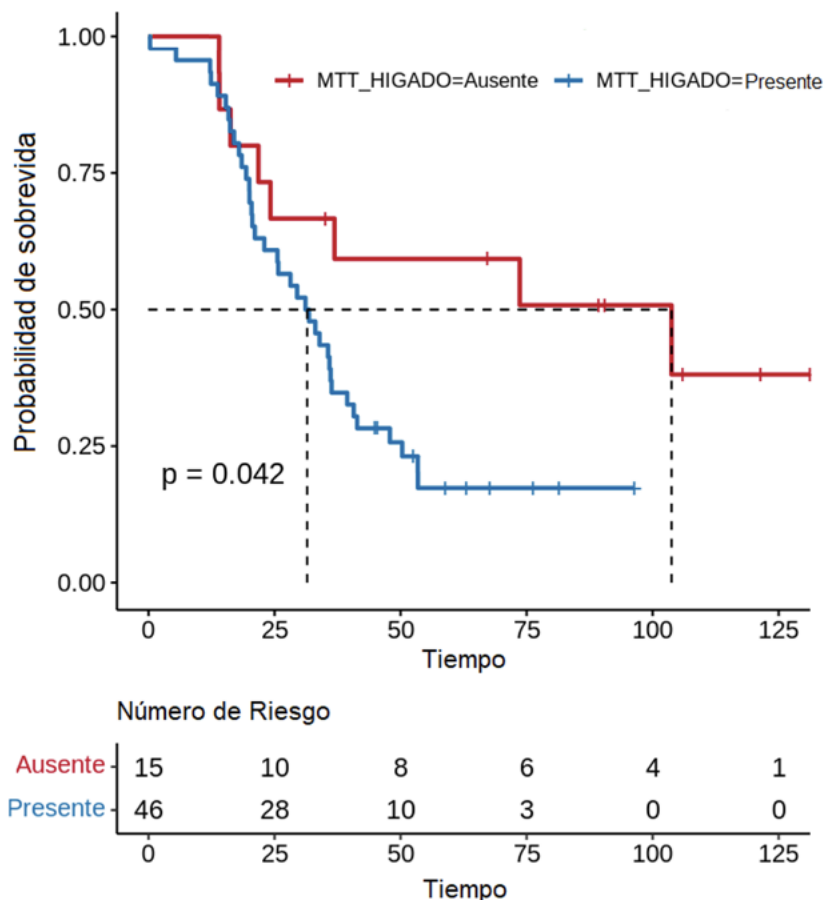


Figura 11. Curva de supervivencia global asociado a presencia o ausencia de metástasis hepática en pacientes con CCR en tratamiento con 5-FU. La línea roja representa la supervivencia de los pacientes con CCR en tratamiento con 5-FU con ausencia de metástasis en el hígado. La línea azul representa la supervivencia de los pacientes con CCR en tratamiento con 5-FU con presencia de metástasis en el hígado.

Tabla 4. Modelo univariable, estudio de asociación CCR a supervivencia global, en modelos de herencia dominante, recesivo y codominante en *ABCC4* rs9561778.

Variante genética	<i>ABCC4</i> rs9561778		
Modelo de herencia	Dominante GG + GT	Recesivo GG	Codominante
<i>p-value</i>	0,076	0,886	Genotipo GT:0,99

			Genotipo TT: 0,08
HR	6,819	0,8639 (Genotipo GG)	Genotipo GG: 1,0 Genotipo GT: 2,346e-08 Genotipo TT:6,65

HR: *Hazard Ratio*.

Tabla 5. Modelo univariable, estudio de asociación de CCR a sobrevida global, en modelos de herencia dominante, recesivo y codominante en *ABCG2* rs2231142.

Variante genética	<i>ABCG2</i> rs2231142		
Modelo de herencia	Dominante GG + GT	Recesivo GG	Codominante
<i>p-value</i>	0,733	0,412	GT: 0,866 GG: 0,682
HR	1,284	1,487	GG:1,0 GT: 0,8567 TT: 1,351

HR: *Hazard Ratio*.

Tabla 6. Modelo univariable, estudio de asociación de CCR a sobrevida global, en modelos de herencia dominante, recesivo y codominante en *TYMS* rs45445694.

Variante genética	<i>TYMS</i> rs45445694		
Modelo de herencia	Dominante 2R2R + 2R3R	Recesivo 3R3R	Codominante
<i>p-value</i>	0,674	0,454	2R3R: 0,655 3R3R: 0,824
HR	1,535	0,4682	2R2R:1 2R3R:1,5776 3R3R:0,7288

HR: *Hazard Ratio*.

Tabla 7. Modelo multivariable, estudio de asociación de polimorfismos de *TYMS* rs45445694 (3R3R), *ABCC4* (GT+TT) y *ABCG2*(CC) con sobrevida global de pacientes con CCR.

Variante genética	<i>TYMS</i> (3R3R)	<i>ABCG2</i> (CC)	<i>ABCC4</i> (GT+TT)
HR	7,974e-01	1,496e-01	3,559e+07
<i>p-value</i>	0,9979	0,7205	0,0837
R²: 0,1555		<i>p-value</i> modelo: 0,2554	

HR: *Hazard Ratio*. R²: pseudo r cuadrado de modelo multivariable.

Tabla 8. Modelo multivariable , estudio de asociación de polimorfismos de *TYMS* rs45445694 (3R3R), *ABCC4* (GT+TT) y *ABCG2*(GG), además de la presencia de metástasis hepática con la sobrevida global de pacientes con CCR.

Variante genética	<i>TYMS</i> (3R3R)	<i>ABCG2</i> (GG)	<i>ABCC4</i> (GT+TT)	Metástasis Hepática Presente
HR	1,316e-08	0,7668	5,669	2,868
<i>p-value</i>	0,9987	0,6758	0,1151	0,0953
R²: 0,3291		<i>p-value</i> modelo: 0,0881		

HR: *Hazard Ratio*. R²: r cuadrado de modelo multivariable.

5.4 RE-CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Para el nuevo cálculo del tamaño muestral se consideró un HR de 6,819 obtenido de este trabajo para el genotipo *ABCC4* rs9561778 que tiene la frecuencia alélica menor de un 3,3% en la población general chilena, intervalo de confianza del 95%, poder estadístico del 80% y una tasa de censura del 3%.

El cálculo se realizó a través de la página Sample-Size.net (www.sample-size.net) basados en la fórmula Schoenfeld arrojando un tamaño muestral de pacientes 142, en donde son el grupo expuesto 128 y el grupo no expuesto 14.

6. DISCUSIÓN

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes genéticas de *TYMS*, *ABCC4* y *ABCG2* en pacientes de población general chilena. Esto se hizo debido a que no hay información de las frecuencias de estos polimorfismos en población general chilena.

Las frecuencias genotípicas para *ABCC4* rs9561778, fueron GG: 81,7%, GT: 16,3% y TT: 1,9% y las frecuencias alélicas fueron G: 0,899 y T: 0,101. Tanto las frecuencias genotípicas como alélicas fueron muy cercanas a las mostradas en población amerindia de *1000 Genomes Project* (*Ensembl.org*, 2023). Dentro de la población amerindia se incluyen los datos de las poblaciones de Medellín Colombia, Lima Perú, Puerto Rico y con ancestría mexicana en los ángeles California. Sin embargo, no se encuentran datos de la población chilena.

Las frecuencias genotípicas para *ABCG2* rs2231142 fueron GG:78,6%, GT:19,4% y TT 1,9% y las frecuencias alélicas fueron G: 0,883 y T: 0,117. Estas frecuencias son muy cercanas a los valores globales, donde los valores se parecen mucho más a las frecuencias de la población asiática del sur, que incluyen datos de poblaciones de Bangladesh, India, Pakistán y Sri Lanka de *1000 Genomes Project* (*Ensembl.org*, 2023).

Para *TYMS* rs45445694 las frecuencias genotípicas fueron 2R2R: 21,5%, 47,6% y 30,8% y las alélicas 2R: 0,453 y 3R: 0,547. No hay información en las bases de las frecuencias genotípicas para población general. Con respecto a las frecuencias alélicas estas tienen valores bastante alejados de los datos de las bases de datos. Por ejemplo, en *gnomAD genomes* las frecuencias alélicas en la población mundial es 2R: 0,992 y 3R: 0,008 y en la población amerindia 2R: 0,997 y 3R: 0,003 (*Ensembl.org*, 2023).

Las frecuencias genotípicas de *TYMS* rs2853542 fueron CC: 9,5% CG: 60% GG: 30,5% y las frecuencias alélicas C: 0,395 y G: 0,605. Las frecuencias alélicas de *gnomAD genomes* para población mundial es C: 0,439 y G: 0,561 y para la población amerindia fue C: 0,504 y G: 0,496 (*Ensembl.org*, 2023). No hay información en las bases de las frecuencias genotípicas para *TYMS* rs2853542.

Las frecuencias en población general chilena de *ABCC4* rs9561778, *ABCG2* rs2231142 y *TYMS* rs45445694 se encuentran en Equilibrio *Hardy-Weinberg* (EHW). El EHW considera que las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en

generación (Rohlf's & Weir, 2008). Esto demostró que las muestras de población general cumplen con ser una población representativa de población general chilena para estas variantes genéticas.

Los genotipos obtenidos en tejido germinal y tumoral son idénticos para los polimorfismos de *ABCG2* y *ABCC4*. Las frecuencias genotípicas para *ABCC4* fueron GG: 95,56% (43), GT: 2,22% (1) y TT: 2,22% (1) y las frecuencias alélicas G: 0,967 y T: 0,033 para muestras de paciente con CCR. Solo hay 3 estudios asociados a la variante genética *ABCC4* rs9561778 hasta la fecha (Che *et al.*, 2018; Takahashi *et al.*, 2022; Low *et al.*, 2009). No hay estudios de este polimorfismo en pacientes con CCR ni con cáncer sólido. En un estudio de caso control donde se correlacionaron varios polimorfismos genéticos del gen *ABCC4* (entre ellos rs9561778) y la susceptibilidad a la enfermedad de Kawasaki en una población del sur de China, las frecuencias genotípicas fueron GG: 49,16% (381), GT: 42,84% (332), TT: 8% (62) (Che *et al.*, 2018). Es difícil la comparación debido a las características de los pacientes, que presentan enfermedades diferentes, son de etnias distintas y la cantidad de pacientes es muy alta, comparado con este estudio. Sin embargo, es un avance al ser de los pocos estudios donde se analiza este polimorfismo en pacientes con CCR en población chilena.

Las frecuencias genotípicas de *ABCG2* rs2231142 en pacientes con CCR fueron GG: 85,96%, GT: 8,77% y TT: 5,26% y las frecuencias alélicas fueron G: 0,903 y T: 0,096. Las frecuencias obtenidas en este trabajo son muy diferentes comparados con otros estudios. Por ejemplo, en un estudio con pacientes con cáncer gástrico (n = 95) y 141 controles (pacientes sin cáncer) de la población de Belén, en la Amazonia brasileña la frecuencia genotípica de GG: 69,9% (65), GT: 26,9% (25) y TT: 3,2% (3) y la frecuencia alélica fue G: 0,8 y T:0,2 (de Castro *et al.*, 2020). En otro estudio de 102 de pacientes de población mexicana con cáncer de mama avanzado, que fueron sometidos a quimioterapia neoadyuvante de 5-fluorouracilo, doxorubicina y ciclofosfamida, la frecuencia genotípica GG: 54,9% y GT: 45,1% y la frecuencia alélica G: 0,775 T: 0,225 (Turiján-Espinoza *et al.*, 2021). En otro estudio con 108 pacientes chinos donde se investigó la función de los polimorfismos genéticos asociados a la hipoxia (entre ellos *ABCG2* rs2231142) en la predicción de la respuesta al tratamiento y la sobrevida en pacientes con cáncer gástrico metastásico (CGM) tratados con EOF (oxaliplatino y 5-fluorouracilo combinados con epirrubicina) como quimioterapia de primera línea, las frecuencias genotípicas fueron GG: 49,4%, GT: 38,2% y TT: 12,4% (Tang *et al.*, 2018). En el estudio de Nichetti *et al.*, 2019, un

donde se analizaron SNPs que afectan los genes implicados en el transporte de oxaliplatino a través de la membrana plasmática de 120 pacientes de Italia con CCRm tratados con quimioterapia basada en oxaliplatino (FOLFOX, CapeOX y FOLFIRI) las frecuencias genotípicas fueron más cercanas a la de este estudio, con GG: 77,5% y GT+TT: 22,5%, además, las frecuencias genotípicas del grupo externo que se utilizó para la validación de datos de un centro externo fue GG: 83,8% y GT+TT: 16,2% (Nichetti *et al.*, 2019).

Para la variante de *TYMS* rs45445694, se encontraron diferencias en muestras tumorales y no tumorales, presentándose en el primer caso principalmente el genotipo 2R/3R para casi todas las muestras de pacientes con cáncer colorrectal. Las frecuencias genotípicas para muestras de pacientes con CCR fueron 2R/2R: 3,39%, 2R/3R: 93,22% y 3R/3R: 3,39%. Mientras que las frecuencias alélicas fueron 2R: 0,500 y 3R: 0,500. Comparado estos resultados con dos estudios siendo el primero, un estudio español donde se evaluó la asociación entre polimorfismos como *TYMS* rs45445694 y reacciones adversas en 239 pacientes con CCR tratados con regímenes basados en capecitabina, las frecuencias genotípicas y alélicas fueron 2R/2R: 18,4%, 2R/3R: 48,5%, 3R/3R: 33,05%, 2R: 0,42 y 3R: 0,58 (García-González *et al.*, 2015). El segundo trabajo corresponde a un estudio retrospectivo de 63 pacientes con CCR tratados con FOLFOX la frecuencia genotípica fue 3R/3R: 25,4%, 2R/3R: 52,4% y 2R/2R: 22,2% (Castro-Rojas *et al.*, 2017). En ambos estudios las frecuencias son muy distintas a la de este trabajo, esto puede deberse a que las muestras de ambos estudios fueron aisladas de sangre, en contraste con la de esta tesis que fueron muestras tumorales. En Brody *et al.*, 2006 se menciona que el análisis de muestras no tumorales no suele reflejar el genotipo del tumor. Por otro lado, se analizaron 24 muestras no tumorales de paciente con CCR, donde 11(45,8%) mantuvieron el genotipo heterocigoto entre las muestras tumorales y no tumorales, 4 (16,7%) presentaron un cambio de homocigoto 3R en las muestras no tumorales a heterocigoto en la muestra tumoral, 2 (8,3%) presentaron un cambio de homocigoto 2R no tumoral a heterocigoto en las muestras tumorales, 1 (4,2%) mantuvo el genotipo homocigoto para 3R en ambas muestras, 2 (8,3%) mantuvieron el genotipo homocigoto 2R para el genotipo homocigoto para 2R, 4 (16,7%) no pudieron ser comparados debido a que no estaban disponibles las muestras tumorales de los pacientes. En Castro-Rojas *et al.*, 2017, se analizaron 16 muestras de tumores y tejidos adyacentes de pacientes con CCR para el análisis de expresión de *TYMS*, mostrando una correspondencia del 100%. Sin embargo, en Uchida *et al.*, 2004 y Kawakami *et al.*, 2002 si se muestran diferencias en los genotipos entre muestras tumorales y de

tejidos adyacentes en pacientes con CCR. Debido a los resultados obtenidos en este trabajo, queda la duda si esta variación entre ambas muestras (tumorales y no tumorales) afecta la expresión de TS, tanto a nivel de ARNm como en los niveles de proteína, por lo que se sugiere realizar un análisis que incluya la expresión del ARNm de *TYMS*. Los datos sugieren que el número de copias de *TYMS* en el tumor de un paciente puede ser una variable que afecta la capacidad de respuesta al 5-FU (Mandola *et al.*, 2003) pero puede ser difícil en la metodología debido a que el número de copias no tiene por qué ser uniforme entre las células de un cáncer metastásico.

Para *TYMS* rs2853542 también se encontraron diferencias entre células germinales y tumorales, presentándose solamente el genotipo heterocigoto C/G en las muestras tumorales. En las muestras germinales, las frecuencias genotípicas fueron CC: 9,1%, CG: 18,2% y GG: 72,2%. Similar a lo que pasó con *TYMS* rs45445694, se presume que el análisis de las muestras de tejido adyacente no suele reflejar el genotipo del tumor (Brody *et al.*, 2006). Las frecuencias genotípicas fueron muy distintas comparadas con un estudio con 130 pacientes del norte de Portugal con cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) avanzado (etapas IIIA, IIIB y IV) tratados con quimioterapia basada en platino. Las frecuencias genotípicas fueron CC: 14,4%, CG: 80,8% y GG: 4,8% (Lima, 2014). Las diferencias pueden deberse a la cantidad de pacientes, además de que en ese estudio utilizaron muestras de sangre, lo que sería más cercano a los resultados de las muestras de tejido adyacente y no a las tumorales. Sin embargo, hay diferencias también en las frecuencias genotípicas de las muestras tumorales y las muestras de sangre, esto puede deberse no solo a la cantidad de pacientes sino también a la población, sin embargo, no hay información en las bases de datos de las frecuencias genotípicas para esta variante genética.

Con respecto a la relación de *TYMS* rs45445694, *ABCC4* rs9561778 y *ABCG2* rs2231142 con la sobrevida global de pacientes con cáncer colorrectal avanzado con terapia basada en 5-fluorouracilo, en el análisis univariable para la relación de la sobrevida asociado a la variante de *ABCC4* rs9561778, el modelo que se ajustó mejor fue el dominante (GG vs GT+TT), el valor del test de *log-rank* fue 0,039, este test permite comparar la distribución del tiempo hasta que ocurre un evento de interés (muerte) en grupos independientes y comprobar que son distintas (Gad & Rousseaux., 2002). Los dos grupos comparados fueron pacientes que poseen genotipo GG y pacientes con genotipo GT+TT, dado que *log-rank* <0,05, se puede comprobar que ambos grupos comparados son distintos. El HR es el riesgo

relativo de que ocurra un evento (en este caso la muerte) de un grupo comparado al otro (Molina, 2015). Se realizó una regresión de Cox, se hizo un análisis univariable que dando un valor HR de 6,819 para el modelo dominante para *ABCC4*, lo que significa que hay 6,819 veces el riesgo de que ocurra el evento. Sin embargo, el *p-value*: 0,076 indica que el resultado no es significativo. Esto puede deberse a la cantidad de pacientes incluidos en los análisis estadísticos. El HR es parecido a lo detallado en Takahashi *et al.*, 2022 (G/T + T/T vs. G/G, HR: 6.69, $p < 0.01$) un estudio farmacogenómico observacional con 85 pacientes adultos con neoplasias hematológicas que recibieron un tratamiento de acondicionamiento inmunosupresor para facilitar un implante progresivo con menor morbilidad, con ciclofosfamida, fludarabina e irradiación corporal total. En este estudio se realizaron análisis univariados y multivariados de variantes genéticas asociados al tratamiento farmacológico.

Para *ABCG2* rs2231142 el modelo que se ajustó mejor fue el recesivo (GG), el valor del test de *log-rank* fue 0,412, el HR: 1,487 y *p-value*: 0,41. Sin embargo, no es significativo (debido a la cantidad de pacientes), esto puede provocar diferencias con otros estudios, como, por ejemplo, en un estudio retrospectivo realizado en la Universidad Médica de China (Shenyang, China) con 580 pacientes con CCR avanzado confirmado histopatológicamente que recibieron régimen FOLFOX (n = 464) y CapeOX (n = 116). La supervivencia global asociada al polimorfismo de *ABCG2* rs2231142 (*log-rank* <0,0001) se prolongó significativamente entre los portadores de GG+GT (Modelo dominante) en comparación con aquellos pacientes portadores del genotipo GG (Huang *et al.*, 2022).

En *TYMS* rs45445694 el modelo que se ajustó mejor fue el modelo recesivo (3R/3R) el test de *log-rank* fue 0,44, *p-value*: 0,454 y HR: 0,4682. El valor de HR muestra que el genotipo 3R/3R, se asociarían con un factor protector, asociándose con una mayor supervivencia del paciente. Sin embargo, no es significativo (debido a la cantidad de pacientes). Sin embargo, sería contrario con lo visto en Huang K *et al.*, 2016 donde se analizaron y correlacionaron genotipos de *TYMS* y su eficacia quimioterapéutica, demostrando que los genotipos 2R/3R y 2R/2R se asociaron con una mejor eficacia quimioterapéutica que el genotipo 3R/3R de *TYMS* rs45445694.

TYMS rs2853542 no se pudo relacionar con la supervivencia global debido a que en las muestras de pacientes con CCR, todas presentaron el mismo genotipo. Se podría haber esperado que la variante G>C mostrara una tendencia a una peor respuesta

quimioterapéutica con cada copia del alelo G (Meulendijks *et al.*, 2017, Castro-Rojas *et al.*, 2017). Además, se observó que la presencia de metástasis hepática se asoció a una disminución de la sobrevida global de los pacientes con CCR, esto se ha visto previamente. (*National Cancer Institute Surveillance*, 2021).

Con respecto al análisis multivariable de la relación de *TYMS* rs45445694, *ABCC4* rs9561778 y *ABCG2* rs2231142 con la sobrevida global de pacientes con cáncer colorrectal avanzado con terapia basada en 5-fluorouracilo. El modelo dio un R^2 : 0,1555 y un *p-value*: 0,2554. No hay estudios en Chile ni en el mundo que incluyan modelos multivariables de todas las variantes genéticas de este trabajo, sin embargo, en Hu *et al.*, 2018 se analizó *ABCG2* rs2231142 junto a 7 variantes genéticas más. Este estudio incluyó un análisis multivariable de 580 pacientes con CCR, entre ellas *ABCG2* rs2231142 donde se evaluaron correlaciones entre los SNPs y biomarcadores de resultados graves en las últimas etapas del desarrollo del CCR como diferenciación tumoral de grado 3 (n = 523), estadio clínico IV (n = 73) y metástasis en los ganglios linfáticos (n = 557). En este estudio, concluyeron que portar del genotipo CT/CC de la variante genética de *XPA* rs10817938, el genotipo GT/TT de la variante genética *ABCG2* rs2231142 y el genotipo CC de la variante genética de *ABCG2* rs2622621 aumentan la sobrevida global en pacientes con diferenciación tumoral de grado III o estadio clínico IV y o estado de ganglio linfático positivo, en este estudio para un modelo multivariable, lo que consideraría que el alelo T de *ABCG2* rs2231142 tiene un efecto protector, apoyando el resultado obtenido de este trabajo en donde se consideró que el alelo G tiene un efecto asociado al riesgo y a la disminución de la sobrevida global.

Por último, respecto al análisis multivariable de la relación de *TYMS* rs45445694, *ABCC4* rs9561778, *ABCG2* rs2231142 y la presencia de metástasis hepática con la sobrevida global de pacientes con cáncer colorrectal avanzado con terapia basada en 5-fluorouracilo. El modelo dio R^2 : 0,3291 y *p-value*: 0,0881. Ambos modelos no alcanzaron la significancia, sin embargo, el modelo con metástasis hepática está más cerca de ser significativo, debido a que la metástasis hepática se asocia con la disminución en la sobrevida global de forma significativa incluso en el modelo univariable. En ambos casos no se alcanzaron *p-value* significativos, probablemente por la cantidad de pacientes analizados, ya que si nos basamos en el re-cálculo del n muestral obtenido con las frecuencias de la población general chilena, en donde se indica que se necesita al menos 142 pacientes, y lo comparamos con el total de pacientes analizados en esta tesis (65 pacientes), nos

encontramos que solo llegamos a un 46% del n muestral requerido para alcanzar la potencia y el poder estadístico necesarios para responder la hipótesis planteada.

7. CONCLUSIONES

- Las frecuencias genotípicas y alélicas para las variantes *ABCC4* rs9561778 y *ABCG2* rs2231142 y *TYMS* rs2853542 obtenidas fueron similares a las encontradas en poblaciones amerindias y asiáticas del sur, respectivamente. Casi todas las variantes genéticas estuvieron en EHW, exceptuando a *TYMS* rs2853542, lo que sugiere que las muestras de población general son representativas y libres de sesgos significativos de selección.
- Se observó que la presencia del alelo T de *ABCG2* rs2231142, el genotipo GG de *ABCC4* rs9561778 y la presencia del alelo 2R muestran una tendencia a ser factores de riesgo en relación con la sobrevida global de pacientes con CCR avanzado. Por otra parte, la presencia de metástasis hepática se asoció significativamente con una disminución de la sobrevida global en pacientes con CCR.
- Se hallaron diferencias entre las frecuencias genotípicas de las muestras tumorales y las no tumorales de pacientes con CCR para las variantes *TYMS* rs45445694 y rs2853542. Estas discrepancias pueden sugerir que el análisis de muestras no tumorales puede no reflejar completamente el genotipo del tumor para estas variantes genéticas.
- En vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que en esta tesis no se cumplió la hipótesis propuesta debido a que los análisis de sobrevida global no alcanzaron resultados significativos.
- Este estudio proporciona una comprensión de las frecuencias genéticas en la población chilena y su posible asociación con la sobrevida de pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Sin embargo, se señala la necesidad de estudios adicionales con muestras más grandes para validar y ampliar estos hallazgos. Además, destaca la importancia de comprender la variabilidad genética en pacientes con CCR y su impacto en la respuesta al tratamiento. Los resultados obtenidos proporcionan una base sólida para investigaciones futuras sobre la farmacogenómica en el contexto del CCR. La identificación de asociaciones entre variantes genéticas específicas y la sobrevida de

los pacientes sugiere la posibilidad de desarrollar algoritmos farmacogenómicos para personalizar la dosificación de medicación en pacientes con CCR en función de sus perfiles genéticos. Estos avances podrían mejorar significativamente la eficacia y la seguridad de los tratamientos, abriendo nuevas vías para la atención clínica más precisa y efectiva de los pacientes con CCR.

8. REFERENCIAS

- Akhtar, R., Chandel, S., Sarotra, P., & Medhi, B. (2014). Current status of pharmacological treatment of colorectal cancer. *World journal of gastrointestinal oncology*, 6(6), 177–183. doi:10.4251/wjgo.v6.i6.177
- Allegra, C. J., Paik, S., Colangelo, L. H., Parr, A. L., Kirsch, I., Kim, G., Klein, P., Johnston, P. G., Wolmark, N., & Wieand, H. S. (2003). Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol*, 21, 241-250.
- American cancer society, Colorectal Cancer Risk Factor: 2020. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/152-chile-fact-sheets.pdf>. Accessed November 11, 2022.
- Aprile, G., Mazzer, M., Moroso, S., & Puglisi, F. (2009). Pharmacology and therapeutic efficacy of capecitabine: focus on breast and colorectal cancer. *Anticancer Drugs*, 20, 217-229.
- Arzimanoglou, I. I., Gilbert, F., & Barber, H. R. (1998). Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer*, 82(10), 1808–1820. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19980515)82:10<1808:aid-cnrcr2>3.0.co;2-j
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073–2087.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064
- Brody, J. R., Hucl, T., Gallmeier, E., Winter, J. M., Kern, S. E., & Murphy, K. M. (2006). Genomic copy number changes affecting the thymidylate synthase (*TYMS*) gene in cancer: a model for patient classification to aid fluoropyrimidine

- therapy. *Cancer research*, 66(19), 9369–9373. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2165
- Castro-Rojas, C., Esparza-Mota, A., Hernandez-Cabrera, F., Romero-Diaz, V., Gonzalez-Guerrero, J., Maldonado-Garza, H., Garcia-Gonzalez, I., Buenaventura-Cisneros, S., Sanchez-Lopez, J., Ortiz-Lopez, R., Camacho-Morales, A., Barboza-Quintana, O. & Rojas-Martinez, A. (2017). Thymidylate synthase gene variants as predictors of clinical response and toxicity to fluoropyrimidine-based chemotherapy for colorectal cancer. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 32(4), 209-218. doi:10.1515/dmpt-2017-0028
 - Che, D., Pi, L., Fang, Z., Xu, Y., Cai, M., Fu, L., Zhou, H., Zhang, L., & Gu, X. (2018). *ABCC4* Variants Modify Susceptibility to Kawasaki Disease in a Southern Chinese Population. *Disease markers*, 2018, 8638096. doi:10.1155/2018/8638096
 - Chen, Q., Meng, F., Wang, L., Mao, Y., Zhou, H., Hua, D., Zhang, H., & Wang, W. (2017). A polymorphism in *ABCC4* is related to efficacy of 5-FU/capecitabine-based chemotherapy in colorectal cancer patients. *Scientific reports*, 7(1), 7059. Doi:10.1038/s41598-017-07491-3
 - Chintala, L., Vaka, S., Baranda, J., & Williamson, S. K. (2011). Capecitabine versus 5-fluorouracil in colorectal cancer: where are we now? *Oncology Reviews*, 5(2), 129-140.
 - Chionh, F., Lau, D., Yeung, Y., Price, T., & Tebbutt, N. (2017). Oral versus intravenous fluoropyrimidines for colorectal cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*; 7(7), CD008398. doi: 10.1002/14651858.CD008398.pub2
 - Chu, E., Voeller, D. M., Jones, K. L., Takechi, T., Maley, G. F., Maley, F., Segal, S., & Allegra, C. J. (1994). Identification of a thymidylate synthase ribonucleoprotein complex in human colon cancer cells. *Mol Cell Biol*, 14, 207-213.
 - Coghill, Anne M.; Garson, Lorrin R., eds. The ACS style guide: effective communication of scientific information (3rd ed.). Washington, D.C.: American Chemical Society. 2006; p. 244. ISBN 978-0-8412-3999-9.
 - Corley, D. A., Levin, T. R., & Doubeni, C. A. (2014). Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *The New England journal of medicine*, 370(26), 2541. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1405329>
 - de Castro, A. N. C. L., Fernandes, M. R., de Carvalho, D. C., de Souza, T. P., Rodrigues, J. C. G., Andrade, R. B., Modesto, A. A. C., Santos, S., Assumpção, P.

- P., & Dos Santos, N. P. C. (2020). Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing and transporter genes, and the risk of gastric and colorectal cancer in an admixed population from the Brazilian Amazon. *American journal of translational research*, 12(10), 6626–6636.
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*, 394(10207), 1467–1480. doi:10.1016/S0140-6736(19)32319-0
 - DeLap R. J. (1988). The effect of leucovorin on the therapeutic index of fluorouracil in cancer patients. *The Yale journal of biology and medicine*, 61(1), 23–34.
 - Funke, S., Brenner, H., & Chang-Claude, J. (2008). Pharmacogenetics in colorectal cancer: a systematic review. *Pharmacogenomics*, 9(8), 1079–1099. doi:10.2217/14622416.9.8.107
 - Gad, S., & Rousseaux, C. (2002). Use and misuse of statistics in the design and interpretation of studies. En W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, & M. A. Wallig (Eds.), *Handbook of Toxicologic Pathology* (pp. 327–418). Elsevier.
 - García-González, X., Cortejoso, L., García, M. I., García-Alfonso, P., Robles, L., Grávalos, C., González-Haba, E., Marta, P., Sanjurjo, M., & López-Fernández, L. A. (2015). Variants in CDA and ABCB1 are predictors of capecitabine-related adverse reactions in colorectal cancer. *Oncotarget*, 6(8), 6422–6430. doi:10.18632/oncotarget.3289
 - Graffelman, J., & Moreno, V. (2013). The mid p-value in exact tests for Hardy-Weinberg equilibrium. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 12(4), 433–448. doi:10.1515/sagmb-2012-0039
 - Gustavsson, B., Carlsson, G., Machover, D., Petrelli, N., Roth, A., Schmoll, H. J., Tveit, K. M., & Gibson, F. (2015). A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 14, 1-10.
 - Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2004). The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Current drug metabolism*, 5(1), 21–53. doi:10.2174/1389200043489199
 - Haller, D. G., Tabernero, J., Maroun, J., de Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Gilberg, F., Rittweger, K., & Schmoll, H. J. (2011). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon

cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(11), 1465–1471. doi:10.1200/JCO.2010.33.6297

- Hammond, W. A., Swaika, A., & Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic advances in medical oncology*, 8(1), 57–84. doi:10.1177/1758834015614530
- Hayashi, N., Tanaka, S., Hewett, D. G., Kaltenbach, T. R., Sano, Y., Ponchon, T., Saunders, B. P., Rex, D. K., & Soetikno, R. M. (2013). Endoscopic prediction of deep submucosal invasive carcinoma: validation of the narrow-band imaging international colorectal endoscopic (NICE) classification. *Gastrointestinal endoscopy*, 78(4), 625–632. doi: 10.1016/j.gie.2013.04.185
- Hu, T., Li, Z., Gao, C. Y., & Cho, C. H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*, 22, 6876-6889.
- Huang, K., Shen, Y., Zhang, F., Wang, S., & Wei, X. (2016). Evaluation of effects of thymidylate synthase and excision repair cross-complementing 1 polymorphisms on chemotherapy outcome in patients with gastrointestinal tumors using peripheral venous blood. *Oncology letters*, 11(5), 3477–3482. doi:10.3892/ol.2016.4423
- Huang, P. H., Yu, J., Chu, Y. Y., Lin, Y. H., & Yeh, C. T. (2022). Child-Pugh Score and *ABCG2*-rs2231142 Genotype Independently Predict Survival in Advanced Hepatoma Patients Treated with Sorafenib. *Journal of clinical medicine*, 11(9), 2550. doi:10.3390/jcm11092550
- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Marzo 2023 (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/152-chile-fact-sheets.pdf>)
- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Marzo 2023 (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>)
- Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., Ware, J. A., Wright, S. H., Yee, S. W., Zamek-Gliszczynski, M. J., & Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 215-236. International Transporter Consortium.
- Iyevleva, A. G., Buslov, K. G., Togo, A. V., Matsko, D. E., Filimonenko, V. P., Moiseyenko, V. M., & Imyanitov, E. N. (2007). Measurement of DPD and TS

transcripts aimed to predict clinical benefit from fluoropyrimidines: confirmation of the trend in Russian colorectal cancer series and caution regarding the gene referees. *Onkologie*, 30, 295-300.

- Jennings, B. A., Kwok, C. S., Willis, G., Matthews, V., Wawruch, P., & Loke, Y. K. (2012). Functional polymorphisms of folate metabolism and response to chemotherapy for colorectal cancer, a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenetics and genomics*, 22(4), 290–304. Doi:10.1097/FPC.0b013e328351875d
- Johnston, P. G., & Kaye, S. (2001). Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anti-cancer drugs*, 12(8), 639–646. Doi: 10.1097/00001813-200109000-00001
- Kawakami, K., Ishida, Y., Danenberg, K. D., Omura, K., Watanabe, G., & Danenberg, P. V. (2002). Functional polymorphism of the thymidylate synthase gene in colorectal cancer accompanied by frequent loss of heterozygosity. *Japanese journal of cancer research: Gann*, 93(11), 1221–1229. doi:10.1111/j.1349-7006.2002.tb01227.x
- Lamberti, C., Sauerbruch, T., & Glasmacher, A. (2005). Adjuvant capecitabine is at least as effective as fluorouracil plus leucovorin for survival in people with resected stage III colon cancer. *Cancer Treat Rev*, 31, 648-652.
- Lao, V. V., & Grady, W. M. (2011). Epigenetics and colorectal cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 8(12), 686–700. doi:10.1038/nrgastro.2011.173
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643–649. doi: 10.1038/25292
- Li, J., Ma, X., Chakravarti, D., Shalapour, S., & DePinho, R. A. (2021). Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes & development*, 35(11-12), 787–820. doi:10.1101/gad.348226.120
- Lima, A., Seabra, V., Martins, S., Coelho, A., Araújo, A., & Medeiros, R. (2014). Thymidylate synthase polymorphisms are associated to therapeutic outcome of advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Molecular biology reports*, 41(5), 3349–3357. doi:10.1007/s11033-014-3197-3
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3, 330-338

- Low, S. K., Kiyotani, K., Mushiroda, T., Daigo, Y., Nakamura, Y., & Zembutsu, H. (2009). Association study of genetic polymorphism in *ABCC4* with cyclophosphamide-induced adverse drug reactions in breast cancer patients. *Journal of human genetics*, *54*(10), 564–571. doi:10.1038/jhg.2009.79
- Mandola, M. V., Stoecklacher, J., Muller-Weeks, S., Cesarone, G., Yu, M. C., Lenz, H. J., & Ladner, R. D. (2003). A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer research*, *63*(11), 2898–2904.
- Marsh, S., Ameyaw, M. M., Githang'a, J., Indalo, A., Ofori-Adjei, D., & McLeod, H. L. (2000). Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Human mutation*, *16*(6), 528. doi:10.1002/1098-1004(200012)16:6<528:AID-HUMU11>3.0.CO;2-W
- Meulendijks, D., Rozeman, E. A., Cats, A., Sikorska, K., Joerger, M., Deenen, M. J., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2017). Pharmacogenetic variants associated with outcome in patients with advanced gastric cancer treated with fluoropyrimidine and platinum-based triplet combinations: a pooled analysis of three prospective studies. *The pharmacogenomics journal*, *17*(5), 441–451. doi:10.1038/tpj.2016.81
- Ministerio de Salud C. Guía Clínica AUGÉ Cáncer Colorrectal.; 2013.
- Mitrovski, B., Pressacco, J., Mandelbaum, S., & Erlichman, C. (1994). Biochemical effects of folatebased inhibitors of thymidylate synthase in MGH-U1 cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, *35*, 109-114.
- Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Ando, T., Yazaki, N., Watanabe, K., Haneda, S., Shibata, C., & Sasaki, I. (2010). 5-fu metabolism in cancer and orally-administrable 5-fu drugs. *Cancers*, *2*(3), 1717–1730. doi:10.3390/cancers2031717
- Molina Arias, M.. (2015). Hazard ratio: cuando el riesgo varía a lo largo del tiempo. *Pediatría Atención Primaria*, *17*(66), 185-188. DOI: 10.4321/S1139-76322015000300023
- Nassar, D., & Blanpain, C. (2016). Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual review of pathology*, *11*, 47–76. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044438

- National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer stat facts: colorectal cancer*. Accessed January 28, 2021. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
- Nazemalhosseini Mojarad, E., Kuppen, P. J., Aghdaei, H. A., & Zali, M. R. (2013). The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 6(3), 120–128.
- Nerad, E., Lahaye, M. J., Maas, M., Nelemans, P., Bakers, F. C., Beets, G. L., & Beets-Tan, R. G. (2016). Diagnostic Accuracy of CT for Local Staging of Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *AJR. American journal of roentgenology*, 207(5), 984–995. doi:10.2214/AJR.15.15785.
- Nguyen, L. H., Goel, A., & Chung, D. C. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291–302. doi:10.1053/j.gastro.2019.08.059
- Nichetti, F., Falvella, F. S., Miceli, R., Cheli, S., Gaetano, R., Fucà, G., Infante, G., Martinetti, A., Antoniotti, C., Falcone, A., Di Bartolomeo, M., Cremolini, C., de Braud, F., & Pietrantonio, F. (2019). Is a pharmacogenomic panel useful to estimate the risk of oxaliplatin-related neurotoxicity in colorectal cancer patients?. *The pharmacogenomics journal*, 19(5), 465–472. Doi:10.1038/s41397-019-0078-0
- Nicum S., Midgley R., Kerr D. (2000) Chemotherapy for colorectal cancer. *J R Soc Med* 93: 416–419
- Perea, J., Lomas, M., & Hidalgo, M. (2011). Molecular basis of colorrectal cancer: towards an individualized management?. *Revista espanola de enfermedades digestivas*, 103(1), 29–35. doi:10.4321/s1130-01082011000100006
- Relling, M. V., Klein, T. E., Gammal, R. S., Whirl-Carrillo, M., Hoffman, J. M., & Caudle, K. E. (2020). The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium: 10 Years Later. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 107(1), 171–175. Doi:10.1002/cpt.1651
- Richman S. (2015). Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *International journal of oncology*, 47(4), 1189–1202. doi:10.3892/ijo.2015.3119
- Rohlfs, R. V., & Weir, B. S. (2008). Distributions of Hardy-Weinberg equilibrium test statistics. *Genetics*, 180(3), 1609–1616. doi:10.1534/genetics.108.088005

- Saif, M. W., Syrigos, K. N., & Katirtzoglou, N. A. (2009). S-1: a promising new oral fluoropyrimidine derivative. *Expert Opin Investig Drugs*, 18, 335-348.
- Simons, C. C., Hughes, L. A., Smits, K. M., Khalid-de Bakker, C. A., de Bruïne, A. P., Carvalho, B., Meijer, G. A., Schouten, L. J., van den Brandt, P. A., Weijenberg, M. P., & van Engeland, M. (2013). A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 24(8), 2048–2056. doi:10.1093/annonc/mdt076
- Stern, C. (1943). "The Hardy–Weinberg law". *Science* 97: 137–138.
- Strimpakos, A. S., Syrigos, K. N., & Saif, M. W. (2009). Pharmacogenetics and biomarkers in colorectal cancer. *The pharmacogenomics journal*, 9(3), 147–160. doi:10.1038/tpj.2009.8
- Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 219-234.
- Takahashi, T., Pearson, R., Cao, Q., Scheibner, A., Sanghavi, K., Weisdorf, D., Brunstein, C., Rogosheske, J., Bachanova, V., Warlick, E. D., Wiseman, A., & Jacobson, P. A. (2022). Effects of cyclophosphamide related genetic variants on clinical outcomes of adult hematopoietic cell transplant patients. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 89(4), 543–549. doi:10.1007/s00280-021-04389-w
- Tang, W., Liu, X., Qiu, L., Zhao, X., Huang, M., Yin, J., Li, J., Guo, W., Zhu, X., & Chen, Z. (2018). Influence of hypoxia-related genetic polymorphisms on the prognosis of patients with metastatic gastric cancer treated with EOF. *Oncology letters*, 15(1), 1334–1342. doi:10.3892/ol.2017.7414
- Thirion, P., Michiels, S., Pignon, J. P., Buyse, M., Braud, A. C., Carlson, R. W., O'Connell, M., Sargent, P., Piedbois, P., & Meta-Analysis Group in Cancer (2004). Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(18), 3766–3775. doi:10.1200/JCO.2004.03.104
- Turiján-Espinoza, E., Ruíz-Rodríguez, V. M., Uresti-Rivera, E. E., Martínez-Leija, E., Zermeño-Nava, J. J., Guel-Pañola, A., Romano-Moreno, S., Vargas-Morales, J. M.,

- & Portales-Pérez, D. P. (2021). Clinical utility of ABCB1 and ABCG2 genotyping for assessing the clinical and pathological response to FAC therapy in Mexican breast cancer patients. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 87(6), 843–853. doi:10.1007/s00280-021-04244-y
- Uchida, K., Hayashi, K., Kawakami, K., Schneider, S., Yochim, J. M., Kuramochi, H., Takasaki, K., Danenberg, K. D., & Danenberg, P. V. (2004). Loss of heterozygosity at the thymidylate synthase (TS) locus on chromosome 18 affects tumor response and survival in individuals heterozygous for a 28-bp polymorphism in the TS gene. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(2), 433–439. doi:10.1158/1078-0432.ccr-0200-03
 - Van der Wouden, C. H., Böhringer, S., Cecchin, E., Cheung, K. C., Dávila-Fajardo, C. L., Deneer, V. H. M., Dolžan, V., Ingelman-Sundberg, M., Jönsson, S., Karlsson, M. O., Kriek, M., Mitropoulou, C., Patrinos, G. P., Pirmohamed, M., Rial-Sebbag, E., Samwald, M., Schwab, M., Steinberger, D., Stingl, J., Sunder-Plassmann, G., ... Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium (2020). Generating evidence for precision medicine: considerations made by the Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium when designing and operationalizing the PREPARE study. *Pharmacogenetics and genomics*, 30(6), 131–144. doi:10.1097/FPC.0000000000000405
 - Vogel, F. (1959). Moderne Probleme der Humangenetik. In: Heilmeyer, L., Schoen, R., de Rudder, B. (eds) Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde. Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde, vol 12. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-94744-5_2
 - Wellstein A., G., G., Atkins, M.B., Sausville, E.A. (2018). Chapter 66: Cytotoxic Drugs. In L. L. Brunton, Hilal-Dandan, R., Knollmann, B.C. (Ed.), Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e.
 - Wigginton, J. E., Cutler, D. J., & Abecasis, G. R. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American journal of human genetics*, 76(5), 887–893. doi:10.1086/429864
 - Worthley, D.L. & Leggett, B.A. (2010) Colorectal Cancer: Molecular Features and Clinical Opportunities. *The Clinical Biochemist Reviews*, 31, 31-38.

- Yim, D. J., Kim, O. J., An, H. J., Kang, H., Ahn, D. H., Hwang, S. G., Oh, D., & Kim, N. K. (2010). Polymorphisms of thymidylate synthase gene 5'- and 3'-untranslated region and risk of gastric cancer in Koreans. *Anticancer research*, 30(6), 2325–2330.
- Zeng, H., Yu, H., Lu, L., Jain, D., Kidd, M. S., Saif, M. W., Chanock, S. J., Hartge, P., PanScan Consortium, & Risch, H. A. (2011). Genetic effects and modifiers of radiotherapy and chemotherapy on survival in pancreatic cancer. *Pancreas*, 40(5), 657–663. doi:10.1097/MPA.0b013e31821268d1
- Zhao, J., Li, W., Zhu, D., Yu, Q., Zhang, Z., Sun, M., Cai, S., & Zhang, W. (2014). Association of single nucleotide polymorphisms in MTHFR and ABCG2 with the different efficacy of first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 31(1), 802. doi: 10.1007/s12032-013-0802-6
- Zhou, J. Y., Shi, R., Yu, H. L., Zeng, Y., Zheng, W. L., & Ma, W. L. (2012). The association between two polymorphisms in the TS gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis. *Int J Cancer*, 131, 2103-2116.

9. ANEXO I. CARTA DE APROBACIÓN FONDECYT



Santiago, octubre 07 de 2022

Dr. Luis Quiñones
Investigador Principal
Dpto. de Oncología
Básico Clínica U. de Chile
Instituto Nacional del Cáncer
Presente

Ref.: Proyecto de Investigación titulado: "Variaciones genéticas y epigenéticas como modificadores de la respuesta clínica después de la quimioterapia en base a 5-fluorouracilo en pacientes con cáncer de colon".

Estimado Dr. Quiñones:

Habiéndose recibido carta de fecha 26 de septiembre de 2022 por la cual se da respuesta a lo indicado por este Comité, se adjunta nueva versión del proyecto y solicitud de Dispensa del Consentimiento Informado (versiones 2.0) con las modificaciones solicitadas, las que se aprueban y se listan a continuación:

1. Protocolo CQF-EC-02-22, versión 2.0, Santiago de Chile, Septiembre de 2022.
2. Anexo II Solicitud de dispensa al Consentimiento Informado al Protocolo CQF EC-02-22.

Esta aprobación es válida por un plazo de 12 meses a contar de esta fecha. En caso de requerir tiempo más allá de ese plazo, se deberá solicitar una extensión del mismo.

El CEI-SSMN solicita al Investigador Responsable presentar un informe final al término del proyecto.

Sírvase recibir adjunto documento de Consentimiento Informado timbrado, fechado y firmado por el suscrito.

Se listan los Integrantes del Comité de Ética de la Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte:

Dr. Juan Jorge Silva Solís

Dr. Marco Clavero Pérez

Dra. María de los Ángeles Avaria Benaprés

Dra. Katherina Llanos Parra

Dra. Carolina Heresi Venegas

Dr. Roberto Torres Ulloa

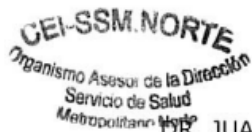
Abogada Carolina Carvajal Tadres

E.U. Marla Solari Verdugo

E.U. Alejandra Cura Capurro

A.S. Luis García Hurtado, Representante de la Comunidad

Lo saluda atentamente,



A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Solís".

DR. JUAN JORGE SILVA SOLÍS
PRESIDENTE - CEI-SSMN

10. ANEXO II. SOLICITUD DE DISPENSA AL CONSENTIMIENTO INFORMADO

SOLICITUD DE DISPENSA AL CONSENTIMIENTO INFORMADO DE INVESTIGACIÓN

INVESTIGADOR RESPONSABLE: DR LUIS QUIÑONES SEPÚLVEDA

INVESTIGADOR PRINCIPAL INC: DRA BETTINA MULLER

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CQF-EC-02-22

VARIACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS COMO MODIFICADORES DE LA RESPUESTA CLÍNICA DESPUÉS DE LA QUIMIOTERAPIA EN BASE A 5-FLUOROURACILO EN PACIENTES CON CÁNCER DE COLON

Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Fono: 02-29770741

Instituto Nacional del Cáncer (INC), C.R. Oncología Médica.

VERSION 2.0

Santiago de Chile – Septiembre de 2022

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



07 OCT 2022

1

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

**SOLICITUD DE DISPENSA AL CONSENTIMIENTO
INFORMADO DE INVESTIGACIÓN**

I.- IDENTIFICACION DEL ESTUDIO:

INVESTIGADOR RESPONSABLE: DR LUIS QUIÑONES SEPÚLVEDA
INVESTIGADOR PRINCIPAL INC: DRA BETTINA MULLER
Titulo del Estudio: VARIACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS COMO MODIFICADORES DE LA RESPUESTA CLÍNICA DESPUÉS DE LA QUIMIOTERAPIA EN BASE A 5-FLUOROURACILO EN PACIENTES CON CÁNCER DE COLON

Fecha de presentación: Septiembre de 2022

I.- JUSTIFICACIÓN DE LA DISPENSA

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

- La investigación hará uso de datos sensibles identificables.
- **NO** se necesitará contactar a los participantes para obtener información adicional
- Esta dispensa solo aplica a los pacientes incluidos en la cohorte de descubrimiento (estudio retrospectivo), y que al momento de considerar su inclusión (historia clínica) estén fallecidos.
- El grupo retrospectivo (cohorte de descubrimiento) incluirá pacientes diagnosticados hasta enero de 2020.

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

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

LUIS ABEL
QUIÑONES
SEPULVEDA

Firmado digitalmente por LUIS
ABEL QUIÑONES SEPULVEDA
Fecha: 2022.09.26 22:02:56
-0300

Investigador Principal:
Dr. B.Q. Luis Quiñones S. PhD
Profesor Titular. U. DE CHILE

Investigador Clínico:
Dra. Bettina Muller
Oncólogo Médico, INC

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

07 OCT 2022

11. ANEXO III. BUENAS PRÁCTICAS CLÍNICAS



Dirección

Comité de Ética de la Investigación
Del Servicio de Salud Metropolitano Norte

Santiago, octubre de 2022

DECLARACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE LAS BUENAS PRACTICAS CLÍNICAS.

Este Comité de Ética de la Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte, está organizado, actúa y emite sus dictámenes en pleno acuerdo con la Declaración de Helsinki (1964 y sus modificaciones de 1975, 1983, 1989, 1996, 2000 y 2013), con las Normas de la "Buena Práctica Clínica" (GCP) establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, WHO) 1996, la ICH Harmonized Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice (1996), por las Normas Éticas Internacionales para las Investigaciones Biomédicas con sujetos humanos (Organización Panamericana de la Salud) y por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), 1996 y 2002 las Operational Guidelines for Ethics Committees that Review Biomedical Research (WHO, 2000) y por las Regulaciones Nacionales: Norma Técnica Numero 57 del 4 DE Junio Del 2001, del Ministerio de Salud del Gobierno de Chile: Regulación de la Ejecución de Ensayos Clínicos que utilizan Productos Farmacéuticos en Seres Humanos, Ley N° 20.120 Sobre la Investigación Científica en el Ser Humano, su Genoma, y Prohíbe la Clonación Humana y Ley N° 20.584 sobre Derechos y Deberes de los Pacientes.

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

DR. JUAN JÓRGE SILVA SOLÍS
PRESIDENTE - CEI-SSMN

CEI-SSM.NORTE
Servicio de Salud
Metropolitano Norte
Comité de Ética de la Investigación
www.ssmn.cl

12. ANEXO IV. CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROTOCOLO CQF-EC-002

CÓDIGO DE PACIENTE: _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El objetivo de este documento es entregar la información necesaria para que Usted decida voluntariamente si desea participar en esta investigación.

Estimado Señor(a)

Nos dirigimos a usted con el propósito de solicitar su colaboración en el proyecto de investigación "VARIACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS COMO MODIFICADORES DE LA RESPUESTA CLÍNICA DESPUÉS DE LA QUIMIOTERAPIA EN BASE A 5-FLUOROURACILO EN PACIENTES CON CÁNCER DE COLON"

OBJETIVO

Este estudio tiene como objetivo obtener información que en un futuro permitirá diseñar un perfil genético y molecular que facilite la predicción de la respuesta a la quimioterapia en cáncer colorrectal, de tal manera que permita optimizar las dosis de los medicamentos utilizados en la quimioterapia, que se presenten menores efectos secundarios y mejor eficacia.

PROCEDIMIENTOS

Su colaboración en este proyecto consiste en la donación voluntaria de una muestra sanguínea del tamaño de una cucharada de sangre (12-15ml), la cual será extraída con un sistema estéril por personal calificado del centro de salud donde Ud. es atendido, de tal manera de evitar cualquier riesgo. Esta muestra será utilizada para obtener derivados de la sangre y material genético (ADN) con el objetivo de estudiar los genes y moléculas relacionados con la respuesta a la quimioterapia en cáncer colorrectal. Adicionalmente, el proyecto contempla tomar parte del remanente de la biopsia del tumor extraído en la cirugía para obtener ADN (material genético) y así estudiar las mutaciones tumorales. Las muestras serán procesadas y almacenadas por el Biobanco de Tejidos y Fluidos de la Universidad de Chile de tal manera que el remanente de sus muestras y material genético que no sean usadas para este estudio, si Ud acepta, podrían ser utilizadas en el futuro en investigaciones científicas que cuenten con la debida autorización ética y que ayuden a comprender mejor esta enfermedad u otras patologías relacionadas.

Un biobanco colecta, procesa, almacena y distribuye muestras y datos para que sean utilizados en investigación científica con la finalidad de acelerar el descubrimiento de nuevas herramientas diagnósticas y tratamiento para diferentes patologías. Si sus datos o muestras fuesen de utilidad para un estudio distinto al descrito en este documento, antes de utilizarlos los investigadores deberán obtener una aprobación del Comité de Ética de la institución en que se realice dicho estudio.

Para oficializar su colaboración voluntaria en este estudio, usted deberá llenar una breve ficha clínica de la investigación que incluye datos de identificación personal y médica a la cual sólo el equipo investigador y el personal del Biobanco de Tejidos y Fluidos de la Universidad de Chile tendrán acceso. Estos datos serán almacenados para este estudio y también para investigaciones futuras.

Los estudios genéticos de este proyecto serán realizados (análisis de las muestras de ADN y almacenamiento transitorio) en el laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, ubicado en Carlos Schachtebeck (ex Las Palmeras) 299 - Quinta Normal.



Carlos Schachtebeck (ex Las Palmeras) 299 - Quinta Normal - PO Box 70111 Santiago 7 - Chile,
Teléfono: (56-9) 90158341

1 de 4

07 OCT 2022

Es importante que sepa que las futuras investigaciones realizadas no necesariamente tendrán beneficios para usted y que podría ser necesario re-contactarlo. No se pagará ni se dará otro incentivo por las muestras que sean entregadas para investigación. Además, es muy importante que sepa que, si no desea que se utilicen sus muestra y datos para futuras investigaciones, tiene la libertad de decir que no, sin afectar de manera alguna la atención de salud que habitualmente recibe en los establecimientos primarios y secundarios a los que accede. Es decir, no habrá ninguna sanción ni menoscabo en la atención médica que en la actualidad o a futuro necesite.

RIESGOS/BENEFICIOS

La única molestia eventual puede ser la aparición de un pequeño hematoma (moretón) en la zona de toma de muestra sanguínea lo cual es infrecuente y no representa un riesgo relevante.

No existirá un beneficio directo a su persona, sin embargo, los resultados obtenidos con su muestra a futuro podrían permitir en pacientes en tratamiento de quimioterapia utilizar esquemas terapéuticos más personalizados, con menos reacciones adversas y más efectivos.

COSTOS

Este estudio no tiene costo alguno para Ud. Todo análisis o examen propio del proyecto y que no son necesarias para el estudio o tratamiento habitual de su enfermedad serán financiados por el presente proyecto de investigación. El estudio no considera reembolso por concepto de movilización.

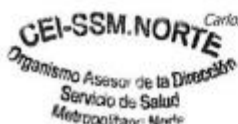
CONFIDENCIALIDAD

Se le asegura que tanto el investigador principal como los demás integrantes del grupo de investigación garantizarán la privacidad de la información que surja por su participación en el estudio. De la misma forma el Biobanco de Tejidos y Fluidos de la Universidad de Chile le garantiza la privacidad, seguridad e integridad de información asociada a sus muestras y datos que quedarán almacenados en el Biobanco para estudios futuros.

La muestra será almacenada mediante un código, el cual no revelará información personal y a la cual sólo tendrán acceso los investigadores del mencionado proyecto y el personal del Biobanco de Tejidos y Fluidos de la Universidad de Chile. Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser dados a conocer a usted, solamente una vez que estos se encuentren disponibles y en la forma y formato que el comité de ética pertinente lo establezca.

Además, es necesario extraer datos clínicos relevantes desde su ficha clínica, para esto, su identidad será codificada igual que sus muestras sanguíneas. Sólo el equipo de investigación y el personal del Biobanco tendrán acceso a su ficha clínica.

Sus muestras serán almacenadas por un periodo de 5 años en el laboratorio CQF, bajo la responsabilidad del Dr. Luis Quiñones Sepúlveda y serán utilizadas exclusivamente para los fines de este estudio en caso que no acepte a donar el remanente para el Biobanco. En el caso que acepte que el remanente de sus muestras y sus datos sean almacenados en el Biobanco de Tejidos y Fluidos, el almacenamiento será de forma indefinida o hasta que se agoten, para el caso de la muestras.



Carlos Schachtebeck (ex Las Palmeras) 299 - Quinta Normal - PO Box 70111 Santiago 7 - Chile,
Teléfono: (56-9) 90158341

07 OCT 2022

2 de 4

SE

VOLUNTARIEDAD

Su decisión de participar en el estudio es absolutamente voluntaria. Si usted decide no participar en el estudio o del almacenamiento de sus muestras y datos en el Biobanco, la atención de salud no se verá afectada en ningún caso.

Ud. tiene el derecho de negarse a participar en el estudio o en el Biobanco. También, puede solicitar la destrucción de sus muestra biológicas, sin expresar razón ni causa y sin que esto signifique perjuicio alguno para usted.

DERECHOS DEL PARTICIPANTE

Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con el Dr. Luis Quiñones Sepúlveda, investigador científico (F: 09-90158341, e-mail: lquinone@med.uchile.cl) y Dra. Bettina Müller investigador Clínico (F: 225757251, e-mail: bettina.muller@incancer.cl).

Si usted requiere más información sobre su participación como donante del Biobanco puede comunicarse con la Dra. Alicia Colombo, Directora Científica, (F: 229789570, e-mail: acolombo@hcuch.cl)

Nota: Este consentimiento informado puede contener palabras que usted no comprenda. Por favor, consulte al médico responsable o a cualquiera de los colaboradores, cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente, antes o durante el estudio



Carlos Schachtebeck (ex Las Palmeras) 299 - Quinta Normal - PO Box 70111 Santiago 7 - Chile,
Teléfono: (56-9) 90158341

67 OCT 2022

3 de 4

HOJA DE CONSENTIMIENTO

Fecha:/...../.....

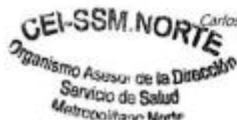
Yo _____, RUT _____
 entiendo que mi participación es completamente voluntaria, puedo elegir no donar datos y muestras, y revocar mi permiso para que estos sean empleados. Si retiro mi autorización, mis muestras serán destruidas. Como participante del estudio, tengo derecho a hacer preguntas sobre el tipo de investigación que se está realizando. Por lo tanto:

Indique: SI o NO	Aspectos o ámbitos
	Conozco y entiendo el OBJETIVO del estudio.
	Conozco y entiendo el OBJETIVO de un Biobanco
	Comprendo y acepto los PROCEDIMIENTOS a los cuales debo someterme.
	Conozco los posibles RIESGOS y BENEFICIOS asociados a mi participación en este estudio.
	Acepto los resguardos sobre la CONFIDENCIALIDAD de mis datos personales, resultados médicos, análisis clínicos de laboratorio.
	Estoy totalmente informado sobre la VOLUNTARIEDAD de mi participación en este estudio, y completamente consciente de la posibilidad de retirarme del estudio si yo así lo determino.
	He sido instruido sobre mi DERECHO a consultar cualquier duda referente al presente estudio y el DERECHO a retirarme del estudio si yo así lo determino cuando desee y el DERECHO de retirar cualquier muestra biológica.
	Estoy de acuerdo con el uso de los datos y muestras para la investigación "VARIACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS COMO MODIFICADORES DE LA RESPUESTA CLÍNICA DESPUÉS DE LA QUIMIOTERAPIA EN BASE A 5-FLUOROURACILO EN PACIENTES CON CÁNCER DE COLON".
	Estoy de acuerdo con que el remanente de mis muestras sea almacenado en el Biobanco de Tejidos y Fluidos de la Universidad de Chile y que mis datos y muestras sean utilizadas en investigaciones futuras de esta patología o relacionadas.
	Autorizo a que ser contactado nuevamente por el Biobanco de tejidos y Fluidos frente a las situaciones que se consideren necesarias .

Se me ha informado de que se me entregará una copia de este documento, así como de que mi participación no implica un gasto económico para mí.
 He leído y comprendido la información entregada para mi consentimiento informado, y se me han explicado todas mis dudas.

RUT y Firma Voluntario	RUT Y Firma Investigador Responsable o Delegado	RUT y Firma Delegado del Director del Centro

**Esta investigación fue evaluada y aprobada por el comité de ética en investigación en seres humanos CEISH de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en caso de dudas sobre sus derechos favor consultar al Fono: +56 22-9789536 o vía email: ccish.med@uchile.cl*



Carlos Schachtebeck (ex Las Palmeras) 299 - Quinta Normal - PO Box 70111 Santiago 7 - Chile,
 Teléfono: (56-9) 90158341

67 OCT 2022

13. ANEXO V. FORMULARIO DE REPORTE DE CASOS (CRF) INSTRUCCIONES DE LLENADO

- ❖ Registrar **TODOS** los campos requeridos con lápiz pasta **azul**. Utilice letra **imprenta y legible**.
- ❖ Si la información no se encuentra en la ficha clínica de papel o electrónica, indicar No disponible (**N/D**).
- ❖ Si la información no corresponde responderse, utilice la abreviatura No aplica (**N/A**).
- ❖ Si comete un error en el llenado corrija de tachando cruzado, registrar su firma y la fecha dd/mm/aaaa.

I. ANTECEDENTES DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS AL INGRESO AL CENTRO DE TRATAMIENTO

A. IDENTIFICACIÓN DEL CASO, CÓDIGOS Y RESPONSABLES							
Ficha clínica hosp. tratamiento		Cód. Biopsia:		Cód. Transitorio:		Cód. NorayBank:	
Nombre de quién recoge los datos				Nombre de quién traspasa a base de datos			
Fecha de recogida de datos (término):				Fecha de traspaso de datos (término):			

B. ANTECEDENTES CLÍNICOS AL INGRESO (HOSPITAL DE TRATAMIENTO)														
Peso (Kg):		Talla (m):		Sexo:	F		M		Etnia:	Si		No		¿Cuál?
IMC:		SC (m ²):		Grupo sanguíneo:				Factor RH:						

C. EXÁMEN FÍSICO AL INGRESO (HOSPITAL DE TRATAMIENTO)											
Código	Sistema	Anormal	Normal	Observaciones							
1	Apariencia general										
2	Sistema cardiaco										
3	Pulmones										
4	Abdomen										
5	Extremidades										
Signos vitales		Pulso (lpm)		Presión diastólica (mmHg)	Presión sistólica (mmHg)						
ECOG	0	1	2	3	4	5	ND				
Comentarios:											

A. ANTECEDENTES MÓRBIDOS AL INGRESO (MARQUE CON UNA X)

Polipos digestivos	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Poliposis colonica o adenomatosa familiar	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Cáncer distinto a colorrectal	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Artritis reumatoide	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Artrosis	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Síndrome de colon irritable	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Hipertensión	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Diabetes	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Hipercolesterolemia	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Insuficiencia renal crónica	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Epilepsia	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Cardiopatías	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Tuberculosis	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Gastritis	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Otras	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Otras	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Otras	Si		No		Fecha de diagnóstico: (dd/mm/aaaa)	
Hábito de droga	Si		No	Desc	Frecuencia	Duración
Hábito tabáquico	Si		No	Desc	Frecuencia	Duración
Hábito alcoholico	Si		No	Desc	Frecuencia	Duración

Comentarios:

II. ANTECEDENTES DE CIRUGIA Y ANATOMIA PATOLOGICA

DATOS DEL DONANTE POSTERIOR A LA CIRUGIA			
E. Estadio Clínico			
E.1 Presunción Diagnostica			
E.2 Tratamiento previo			
__ Si __ No			
*Si la respuesta es No pasar a la pregunta B1			
E.3 Tipo de tratamiento previo			
__ Quimioterapia		__ Hormonoterapia	
__ Radioterapia		__ Ensayo clínico	
__ Inmunoterapia		__ Otros	
E.4 Respuesta al tratamiento previo			
__ Sin respuesta		__ Respuesta moderada	
__ Respuesta Leve		__ Respuesta total	
__ Respuesta moderada			
E.5 Fecha de valoración respuesta al tratamiento previo (dd/mm/aaaa)			
__/__/____			
F. Datos de cirugía			
F.1 Fecha de cirugía (dd/mm/aaaa)			
__/__/____			
F.2 Procedimiento quirúrgico			
Colonoscopia Cirugia			
F.3 Tipo de anestesia			
G. Informe anatomopatológico			
G.1 Diagnostico:		G.2 Órgano:	
G.3 Tumor primario/metastásico/recidiva local			
__ Primario		__ Progresión	
__ Metastásico		__ Recaída	
__ Recidiva Local		__ En transformación	
G.4 Tumor primario			
G.4.1 Grado Histológico	G.4.1.1 Versión de clasificación del grado histológico		
	G.4.1.2 Grado histológico primario		__ GX __ G2 __ G4 __ Bajo __ G1 __ G3 __ Alto __ Otro
	G.4.1.3 Otro grado histológico		
G.4.2 Márgenes quirúrgicos (tumor primario)	__ Positivo __ Negativo	G.4.3 Displasia asociada (tumor primario)	__ Si __ No
G.4.4 Grado de displasia asociado (tumor primario)			
G.4.5 Necrosis (tumor primario)	__ Si __ No __ ND	G.4.6 Infiltración vascular sanguínea (tumor primario)	__ Si __ No
G.4.7 Infiltración vascular linfática	__ Si __ No __ ND	G.4.8 Infiltración perineural (tumor primario)	__ Si __ No

(tumor primario)								
G.4.9 Tumores sincronicos	__Si __No		G.4.10 Tumores metacronicos	__Si __No				
G.4.11 Tumor multifocal	__Si __No		G.4.12 Tamaño del tumor (mm)(tumor primario) G.4.13. Ubicación tumor IZQ DER					
Observaciones:								
G.5 Ganglios								
G.5.1 Ganglios positivos	__Si __No							
	*Si la respuesta es No pasar a pregunta Q.6							
	Numero de ganglios (Unidad)							
G.5.2 Ganglios analizados (unidad)			G.5.3 Extensión extranodal	__Si __No				
G.5.4 Tipo de metástasis ganglionar	__Micrometastasis							
	__Macrometastasis							
	__Células tumorales aisladas							
	__Otra:							
G.6 Estadificación TNM								
G.6.1 Versión TNM (detallar)	__TNM- 5ª edición 1997 (UICC/AJCC)							
	__TNM- 6ª edición 2002 (UICC/AJCC)							
	__TNM- 7ª edición 2010 (UICC/AJCC)							
	__TNM- 8ª edición 2017 (UICC/AJCC)							
	__No se indica en informe							
G.6.2 Descriptor TNM	__p	__mT	__rT	__yT	*Solo si aplica			
G.6.3 T	__TX	__T0	__Tis	__Tis (CDIS)	__Tis (CLIS lobulillar)	__Tis (paget)	__T1	__T1 (mic)
	__T1a	__T1b	__T1c	__T2	__T2a	__T2b	__T2c	__T3
	__T3a	__T3b	__T4	__T4a	__T4b	__T4c	__T4d	
G.6.4 N	__Nx	__N0	__N0 (i-)	__N0 (i+)	__N0 (mol-)	__N0(mol+)	__N0 (ns)	__N1
	__N1(mi)	__N1a	__N1b	__N1c	__N2	__N2a	__N2b	__N3
	__N3a	__N3b	__N3c					
G.6.5 M	__Mx	__M0	__M1	__M1a	__M1b	__M1c		
TNM estandarizado								



G.8. MARCADORES MOLECULARES EN FICHA CLÍNICA						
MARCADOR	SI	NO	RESULTADO	Nº Biopsia	LABORATORIO DE ANÁLISIS	MÉTODO DE ANÁLISIS
G.8.1. NRAS						
G.8.2. KRAS						
G.8.3. BRAF						
G.8.4. HER2						
G.8.5. MSI						
G.8.6. MLH1						
G.8.7. MSH6						
G.8.8. MSH2						
G.8.9. PMS2						

GOT	<37 UI										
GPT	<41 UI										
GGT	8-61 UI										
LDH	135-225 UI/L										
Proteínas totales	6,6-8,7 g/dl										
Albumina	3,4-4,8 g/dl										
Globulinas	2,5-3,5 g/dl										
Índice A/G	1,5-3,1										
Calcio	8,6-10,2 mg/dl										
Fosforo	2,7-4,5 mg/dl										

Magnesio	1,6-2,3 mg/dl										
Sodio	135-145 mmol/L										
Potasio	3,5-5,3 mmol/L										
Cloro	90-109 mmol/l										

I. Hemograma		VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	VISITA 4	VISITA 5	VISITA 6	VISITA 7	VISITA 8	VISITA 9	VISITA 10
EXÁMEN	RANGO	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)
Hematocrito	41-53%										
Hemoglobina	13,5-17,5 g/dl										
Eritrocitos	4,5-5,9 *10 ⁶										
VCM	85-95 fl										
CHCM	32-36%										
HCM	27-31 pg										
Leucocitos	4-10*10 ³ mcl										
Recuento plaquetario	150-400 *10 ³ mcl										
VHS											

Carac de eritrocitos	normales										
Carac de leucocitos	normales										
Caract de plaquetas	normales										
Basofilos	0-90										
Eosinofilos	80-360										
Blastos											
Promielocitos											
Mielocitos											
Juveniles											
Baciliformes	120-450										
Neutrofilos segmentados	2000-6100										
Linfocitos	1000-3100										
Monocitos	160-720										

RAN											
-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

IV. 4. EXÁMENES DE LABORATORIO POST-QUIMIOTERAPIA

J. Química clínica		VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	VISITA 4	VISITA 5	VISITA 6	VISITA 7	VISITA 8	VISITA 9	VISITA 10
EXÁMEN	RANGO	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____
		(dd/mm/aaaa)	(dd/mm/aaaa)	(dd/mm/aaaa)	(dd/mm/aaaa)	(dd/mm/aaaa)	(dd/mm/aaaa)	(dd/mm/aaaa)	(dd/mm/aaaa)	(dd/mm/aaaa)	(dd/mm/aaaa)
Glucosa	<100 mg/dl										
NUS	6-20 mg/dl										
CREA	0,7-1,2mg/dl										
VFG											
Ácido úrico	3,4-7 mg/dl										
Bilirribina total	0,05-1,1 mg/dl										
Fosfatasas alcalinas	40-129 UI/l										
Colesterol total											
Triglicerido											

GOT	<37 UI										
GPT	<41 UI										
GGT	8-61 UI										
LDH	135-225 UI/L										
Proteínas totales	6,6-8,7 g/dl										
Albumina	3,4-4,8 g/dl										
Globulinas	2,5-3,5 g/dl										
Índice A/G	1,5-3,1										
Calcio	8,6-10,2 mg/dl										

Fosforo	2,7-4,5 mg/dl										
Magnesio	1,6-2,3 mg/dl										
Sodio	135-145 mmol/L										
Potasio	3,5-5,3 mmol/L										
Cloro	90-109 mmol/l										

K. Hemograma		VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	VISITA 4	VISITA 5	VISITA 6	VISITA 7	VISITA 8	VISITA 9	VISITA 10
EXÁMEN	RANGO	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)	___/___/___ (dd/mm/aaaa)
Hematocrito	41-53%										
Hemoglobina	13,5-17,5 g/dl										
Eritrocitos	4,5-5,9 *10 ⁶										

VCM	85-95 fl										
CHCM	32-36%										
HCM	27-31 pg										
Leucocitos	4-10*10 ³ mL										
Recuento plaquetario	150-400 *10 ³ mL										
VHS											
Carac de eritrocitos	normales										
Carac de leucocitos	normales										
Caract de plaquetas	normales										
Basofilos	0-90										
Eosinofilos	80-360										

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

V. 5. EXÁMENES IMAGENOLÓGICOS

L. Hallazgo en examen					
Estado de Patología	Fecha	Resultado			
<p style="text-align: center;">L1. Preequimioterapia</p> <p>Tipo: _____</p>	<p>__/__/__</p> <p>dd/mm/aaaa</p>	Tamaño tumor	__ x __ x __ mm		
		Ubicación	Tercio superior <input type="checkbox"/> Tercio medio <input type="checkbox"/>		
			Tercio inferior <input type="checkbox"/>		
		Lateralidad	D <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> No/E <input type="checkbox"/>		
		Compromiso (Metástasis):	Higado <input type="checkbox"/> Pelvis <input type="checkbox"/>		
			Linfonodos >1cm <input type="checkbox"/> Pulmón <input type="checkbox"/>		
		NÚMERO DE METASTASIS Y CAMBIOS	Cerebro <input type="checkbox"/> Hueso <input type="checkbox"/>		
		_____ <input type="checkbox"/> Riñón <input type="checkbox"/>			
		Comentarios (IMPRESIÓN):			
		Sin evidencia de metástasis <input type="checkbox"/>			
<p style="text-align: center;">L2. Post-quimioterapia</p> <p>Tipo: _____</p>	<p>__/__/__</p> <p>dd/mm/aaaa</p>	Tamaño tumor	__ x __ x __ mm		
		Compromiso (Metástasis)	Higado <input type="checkbox"/> Pelvis <input type="checkbox"/>		
			Linfonodos >1cm <input type="checkbox"/> Pulmón <input type="checkbox"/>		
			Cerebro <input type="checkbox"/> Hueso <input type="checkbox"/>		
			_____ <input type="checkbox"/> Riñón <input type="checkbox"/>		
				Comentarios	
				Sin evidencia de metástasis <input type="checkbox"/>	

VI. 6. TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA PARA CÁNCER DE COLON

M.1.Tratamientos farmacológico 1 para Cáncer de Colon (Esquemas de quimioterapia) SI O SI PARA IM			
Medicamento o terapia	Fecha inicio dd/mm/aaaa	Fecha término dd/mm/aaaa	Nº de ciclos

M.2.Tratamientos farmacológico 2 para Cáncer de Colon (Esquemas de quimioterapia)			
Medicamento o terapia	Fecha inicio dd/mm/aaaa	Fecha término dd/mm/aaaa	Nº de ciclos

M.3.Tratamientos farmacológico para Cáncer previo (Esquemas de quimioterapia)			
Medicamento o terapia	Fecha inicio dd/mm/aaaa	Fecha término dd/mm/aaaa	Nº de ciclos

M.4.Medicamentos de uso frecuente (previo a primer ciclo de quimioterapia para cáncer de colon)						
Medicamento	Ruta	Dosis	Frecuencia	Prescrito (sí o no)	Indicación	Tiempo de USO (días, meses, años)

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Dosis:

- 1.g
- 2.mg
- 3.µg
- 4.L
- 5.mL
- 6.UI
- 7.Otra
8. mg/m2

Frecuencia:

- 1.QD (una vez al día)
- 2.BID (dos veces al día)
- 3.TID (tres veces al día)
- 4.QID (cuatro veces al día)
- 5.QOD (cada tantos días)
- 6.QM (cada mes)
- 7.QOM (cada tanto meses)
- 8.QH (cada hora)
- 9.AC (antes de las comidas)
- 10.PC (post comidas)
- 11.PRN (a necesidad)
12. Cada ciclos
13. Otra

Forma de dosis:

- 1.Tabletas
- 2.Cápsulas
- 3.Unguento
- 4.Supositorio
- 5.Aerosol
- 6.Spray
- 7.Suspensión
- 8.Parche
- 9.Gas
- 10.Gel
- 11.Crema
- 12.Polvo
13. Solución

Ruta de administración:

- 1.Oral
- 2.Tópico
- 3.Subcutáneo
- 4.Intradérmico
- 5.Transdérmico
- 6.Intraocular
- 7.Intramuscular
- 8.Inhalación
- 9.Intravenoso
- 10.Intraperitoneal
- 11.Nasal
- 12.Vaginal
- 13.Rectal
- 14.Otro

P. Evaluación de volumen tumoral		
Volumen tumor primario	Fecha dd/mm/aaaa	Comentarios Imágenes
	__/__/__	
	__/__/__	
	__/__/__	
	__/__/__	
	__/__/__	
	__/__/__	

P. Respuesta terapéutica Fecha Diagnóstico:						
Tiempo de seguimiento	Fecha de registro dd/mm/aaaa	Respuesta parcial	Respuesta completa	Progresión de la enfermedad	Enfermedad estable	Sin respuesta
6 meses						
12 meses						
24 meses						
36 meses						
48 meses						
Otro						
Otro						

P. Evaluación de sobrevida SEGÚN INVESTIGADOR					
Tiempo de seguimiento	Fecha de registro dd/mm/aaaa	Estado: Vivo	Estado: Fallecido	Fecha fallecimiento dd/mm/aaaa	Perdida de seguimiento (SI/NO)
6 meses	__/__/__			__/__/__	
12 meses	__/__/__			__/__/__	
24 meses	__/__/__			__/__/__	
36 meses	__/__/__			__/__/__	
48 meses	__/__/__			__/__/__	
Otro	__/__/__			__/__/__	
Otro	__/__/__			__/__/__	

P. Registro de eventos adversos.*													
#	Fecha de reporte dd/mm/aaa	Ciclo	Descripción del EA	Categoría**	Inicio	Término	Resultado ¹	Severidad ²	Serio (Si or No)	Esperado (Si o No)	Tratamiento ³	Acción Tomada ⁴	Atribución ⁵

número correlativo

* **Evento adverso:** cualquier problema físico, emocional o del comportamiento, síntomas o efectos colaterales. Se registran problemas que aparecen o que empeoran.

Ver categoría en: <http://safetyprofiler-ctep.nci.nih.gov/CTC/CTC.aspx> , **impreso al momento de visita de revisión de fichas

<p>Resultado:</p> <ol style="list-style-type: none"> 0.Fatal 1.Intervención 2.No recuperado/no resuelto 3.Recuperado con secuelas 4.Recuperado sin secuelas 5.Recuperandos e/resolviendose 	<p>Severidad:</p> <ol style="list-style-type: none"> 0.Leve 1.Moderado 2.Severo 3.Amenaza la vida 4.Fatal 	<p>Tratamiento:</p> <ol style="list-style-type: none"> 0.Ninguno 1.Medicación 2.Tratamiento sin medicación 	<p>Acción tomada:</p> <ol style="list-style-type: none"> 0.No aplica 1.Ninguno 2.Interrumpido 3.Discontinuado 4.Reducción de dosis 5.Incremento de dosis 	<p>Atribución:</p> <ol style="list-style-type: none"> 0.No relacionada 1.Poco probable 2.Posible 3.Probable 4.Definida
---	---	--	---	--

número correlativo

* **Evento adverso:** cualquier problema físico, emocional o del comportamiento, síntomas o efectos colaterales. Se registran problemas que aparecen o que empeoran.

**Ver categoría en: <http://safetyprofiler-ctep.nci.nih.gov/CTC/CTC.aspx> , impreso al momento de visita de revisión de fichas