

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**



***“ASOCIACIÓN ENTRE LAS VARIANTES DE LA REGIÓN  
ENHANCER DE LA TIMIDILATO SINTASA (TSER) Y  
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TIMIDILATO SINTASA (TS)  
EN PACIENTES CHILENOS CON CÁNCER COLORRECTAL”***

**EDUARDO RAFAEL ALVAREZ RIVERA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCION GENÉTICA**

.....  
MÓNICA ACUÑA PATZKE  
Directora de Tesis

**2013**

# INDICE

Resumen.....	3
Summary.....	6
<b>CAPITULO I: Introducción.....</b>	<b>9</b>
1.1 Timidilato Sintasa (TS).....	15
1.2 5-Fluorouracilo (5-FU) y su pro droga Capecitabina .....	15
1.3 Estructura del gen Timidilato Sintasa.....	18
1.3.1 Región no traducida 5' (5'UTR) .....	19
1.3.2 Región no traducida 3' (3'UTR) .....	21
1.3.3 Promotor del gen TS.....	21
1.4 Locus <i>TSER</i> y resistencia al 5-FU.....	22
<b>CAPITULO II: Hipótesis.....</b>	<b>27</b>
<b>CAPITULO III: Objetivos.....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo General.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
<b>CAPITULO IV: PACIENTES, MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 Selección de pacientes.....	32
4.2 Obtención y análisis de las muestras.....	33
4.2.1 Extracción de DNA a partir de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (TFFIP) .....	34
4.2.2 Genotipificación del locus <i>TSER</i> , según repeticiones en tándem dobles o triples de 28 pares de bases .....	35

4.2.3	<i>Genotipificación del locus TSER, según SNP (G&gt;C) localizado en el 12º nucleótido de la segunda repetición del alelo TSER*3.....</i>	36
4.2.4	<i>Determinación de la expresión de Timidilato Sintasa (TS) en muestras de tejido normal y tumoral, mediante técnica inmunohistoquímica (IHQ).....</i>	37
4.3	Análisis estadísticos.....	39
<b>CAPITULO V: Resultados.....</b>		<b>41</b>
<b>CAPITULO VI: Discusión.....</b>		<b>60</b>
Anexos.....		69
Bibliografía.....		74

## RESUMEN

**Introducción:** El cáncer es la segunda causa de muerte en Chile, y el digestivo es responsable del 46,2% del total de los fallecimientos por esa causa; de ellos, el cáncer colorrectal (CCR) es la tercera causa de muerte después del gástrico y biliar. Entre los fármacos más empleados para el tratamiento del CCR se encuentran los análogos de las pirimidinas (5-FU y su pro droga Capecitabina), que tienen como blanco de acción a la enzima Timidilato Sintasa (TS), que cumple un rol clave en la síntesis de DNA. La respuesta a este tratamiento no es igual para todos los individuos, se ha postulado que la resistencia farmacológica en algunos pacientes, se debería a la presencia de variantes genéticas en la región enhancer del gen *TS*, que producirían modificaciones cuantitativas y/o cualitativas de la enzima TS. La farmacogenética ha logrado avances en la búsqueda de marcadores biológicos que están permitiendo predecir la respuesta interindividual a las terapias farmacológicas.

Los estudios clínicos realizados en pacientes con CCR sugieren que el locus *TSER* (*Thymidilate Synthase Enhancer Region*) sería un buen indicador de la respuesta al tratamiento a los análogos de la pirimidinas. En todas las poblaciones estudiadas, se ha descrito, la presencia de dos polimorfismos en el locus *TSER*, el primero consiste en un VNTR (variable number tandem repeats), de 28 pares de bases (pb) que origina los alelos *TSER\*2* y *TSER\*3*, y el segundo en un SNP (single nucleotide polymorphism), que produce una sustitución nucleotídica G>C, dentro de la segunda repetición del alelo *TSER\*3*. Ambos afectarían la expresión de la proteína TS.

**Objetivo:** Discernir la relación entre las variantes genotípicas del locus *TSER* y la expresión de la proteína TS en tejido normal y tumoral en pacientes chilenos con cáncer de colon y/o recto.

**Pacientes y muestras:** En el presente estudio participaron 53 pacientes con CCR, atendidos en el Hospital San Juan de Dios-Santiago de Chile, de las biopsias fijadas en formalina e incluidas en parafina se obtuvo muestras de tejido normal y tumoral.

**Métodos:** Se genotificaron las muestras de los distintos individuos de acuerdo a los dos polimorfismos descritos para el locus *TSER*. Se emplearon las técnicas de PCR para las dobles y triples repeticiones en tándem de 28pb y RFLP para la sustitución G>C, ubicada en la segunda repetición del alelo *TSER\*3*. Mientras que la expresión intratumoral de la proteína TS fue evaluada por inmunohistoquímica (IHQ) en tejido fijado e incluido en parafina.

**Resultados:** Las frecuencias genotípicas para el locus *TSER* según VNTR y SNP (G>C) en tejido normal fueron las siguientes: *TSER\*2/\*2* (22,6%), *TSER\*2/\*3C* (15,1%), *TSER\*2/\*3G* (35,9%), *TSER\*3C/\*3C* (3,8%), *TSER\*3G/\*3C* (15,1%), *TSER\*3G/\*3G* (7,6%). Se observó pérdida de heterocigocidad en tejido tumoral en individuos con genotipo *TSER\*2/\*3C* (3,8%) y *TSER\*2/\*3G* (11,4%), generando los genotipos *TSER\*2/--* (5,7%), *TSER\*3C/--* (1,9%) y *TSER\*3G/--* (7,6%). Se encontró

asociación estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre las variantes genóticas del locus *TSER* y la expresión de proteína TS en tejido normal y tumoral.

**Conclusiones:** Hemos encontrado que la mayor expresión de la proteína se asocia fuertemente con la presencia de los genotipos que tienen al menos un alelo *TSER\*3G*. Por lo tanto la genotipificación en tejido normal y tumoral de los polimorfismos ya descritos, podrían servir como potenciales predictores de la eficacia de los tratamientos con 5-FU en pacientes chilenos con diferentes tipos de cánceres. Se requieren más estudios para clarificar el verdadero rol que estarían jugando estos polimorfismos en el tratamiento con 5-FU en nuestra población.

## SUMMARY

**Introduction:** Cancer is the second leading cause of death in Chile, and the tract is responsible for 46.2% of total deaths for that cause, of which colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of death after gastric and bile. Among the most commonly used drugs for the treatment of CRC are pyrimidine analogs (5-FU and its pro-drug Capecitabine), which target the enzyme action Thymidylate Synthase (TS), which plays a key role in the DNA synthesis. The response to this treatment is not the same for all individuals, it has been postulated that the drug resistance in some patients, be due to the presence of genetic variants in the region TS gene enhancer, which produce modifications quantitative and/or qualitative of TS enzyme. Pharmacogenetics has made progress in the search for biomarkers that predict response are allowing interindividual to pharmacological therapies.

Clinical studies in patients with CRC suggest that *TSER* locus (*Thymidylate Synthase Enhancer Region*) would be a good indicator of treatment response to pyrimidine analogs. In all populations studied, has been described, the presence of two polymorphisms in the *TSER* locus, the first is a VNTR (variable number tandem repeats) of 28 base pairs (bp) that originates *TSER\*2* allele and *TSER\*3*, and the second in a SNP (single nucleotide polymorphism), which produces a nucleotide substitution G>C, in the second repeat of *TSER\*3* allele. Both affect the TS protein expression.

**Objective:** To discern the relationship between the genotypic variants of locus *TSER* and TS protein expression in normal and tumor tissue in Chilean patients with colon and/or rectum.

**Patients and samples:** The present study included 53 patients with CRC treated at the Hospital San Juan de Dios, Santiago, Chile, from biopsies fixed in formalin and embedded in paraffin samples obtained normal and tumor tissue.

**Methods:** We genotyped samples from different individuals according to the two polymorphisms described for *TSER* locus. We used PCR techniques for double and triple tandem repeats of 28pb and RFLP for substitution G>C, located in the second repeat of *TSER*\*3 allele. While the intratumoral expression of TS protein was evaluated by immunohistochemistry (IHC) on tissue fixed and embedded in paraffin.

**Results:** The genotype frequencies for *TSER* according VNTR locus SNP (G>C) in normal tissue were: *TSER*\*2/\*2 (22.6%), *TSER*\*2/\*3C (15.1%), *TSER*\*2/\*3G (35.9%), *TSER*\*3C/\*3C (3.8%), *TSER*\*3G/\*3C (15.1%), *TSER*\*3G/\*3G (7.6%). Loss of heterozygosity (LOH) was observed in tumor tissue in individuals with genotype *TSER*\*2/\*3C (3.8%) and *TSER*\*2/\*3G (11.4%), generating genotype *TSER*\*2/-- (5.7%), *TSER*\*3C/-- (1.9%) and *TSER*\*3G/-- (7.6%). Statistically significant association was found ( $P<0.05$ ) between a locus *TSER* genotype and TS protein expression in normal and tumor tissue.



**Conclusions:** Were found that the enhanced expression of the protein is strongly associated with the presence of the genotypes that have at least one allele *TSER\*3G*. Therefore genotyping in normal and tumor tissue of the polymorphisms described above, could serve as potential predictors of efficacy of treatment with 5-FU in Chilean patients with different cancers. Further studies are needed to clarify the true role they would play these polymorphisms on treatment with 5-FU in our population.

# I.- INTRODUCCIÓN

---

La probabilidad de presentar un cáncer durante la vida es, uno de cada dos varones y una de cada tres mujeres, según la base de datos *Surveillance, Epidemiology and End-Results* (SEER), de 1998-2000 [1]. En el año 2008, se contabilizaron 12.4 millones de casos diagnosticados y 7.6 millones de muertes por cáncer en el mundo[2]. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud del año 2008 el cáncer colorrectal (CCR) representó el 9,4% del total de cánceres a nivel mundial. En general las tasas de incidencia y mortalidad de CCRson cerca del 35 a 40% mayor en hombres que en mujeres, las razones de este predominio en el sexo masculino no están completamente clarificadas[3].En cuanto a la tasa de incidencia mundial por tumores malignos según sexo, el CCR se encuentra en cuarto lugar en hombres y tercero en mujeres[2]. El 91% de casos diagnosticados como CCR se presentan en individuos sobre los 50 años de edad [4].

La prevalencia de CCR muestra una amplia distribución geográfica, observándose altas tasas en Nueva Zelanda, Australia, Norte América, Europa y también en Japón, y con bajas tasas reportadas en Asia y África[2]. Según datos de la Sociedad Americana de Cáncer, en EE.UU. se esperan cerca de 142.820 nuevos casos y 50.830 muertes por CCR en ambos sexos para el año 2013 [3]. La prevalencia esta correlacionada con el desarrollo del país, siendo máxima en zonas industrializadas como EE.UU. y Europa. En consecuencia, los estudios epidemiológicos se han centrado en la identificación de los factores prevalentes en estas poblaciones que aumentan o reducen el riesgo de presentar CCR, demostrándose deforma constante que múltiples factores dietéticos y del estilo de vida modifican este riesgo. Estudios de cohortes prospectivos asocian una elevada

ingesta de carne roja, una ingesta baja de ácido fólico y una reducción del calcio y la vitamina D, al aumento del riesgo de presentar CCR. El aumento del índice de masa corporal y los menores niveles de actividad física aumentan el riesgo de presentar un CCR hasta dos veces [1,4].

En Chile no existen registros epidemiológicos de tasas de incidencia de tumores. El 2008, según datos publicados por el Ministerio de Salud, la mortalidad por tumores para el cáncer de colon y de recto alcanzó una tasa de 7,2 y 2,4 por cien mil habitantes, respectivamente [5].

En el mundo y en Chile se han hecho esfuerzos para mejorar las terapias y programas de lucha contra el cáncer; no obstante no se ha logrado disminuir significativamente las tasas de mortalidad, lo que deja en evidencia que falta mucho por hacer para alcanzar el éxito esperado[6]. En este sentido la farmacogenética, subdisciplina de la genética, está dando un nuevo enfoque a las estrategias terapéuticas, con importantes avances conceptuales y metodológicos para abordar esta temática [7].

El término farmacogenética fue introducido por Vogel en 1959 como “la subdisciplina de la genética que estudia las variaciones hereditarias clínicamente importantes en la respuesta a drogas”. El objetivo más importante en la investigación en farmacogenética es el estudio de la influencia de la variabilidad genética en la respuesta (eficacia, seguridad y tolerancia) a los medicamentos [7,8]. Puede afirmarse que este concepto fue introducido hace más de 100 años con los

descubrimientos del médico británico Sir Archibal Garrod. Este investigador estudiando enfermedades poco frecuentes (alcaptonuria y porfiria), se dio cuenta de que algunas de ellas se manifestaban por anomalías metabólicas heredables, y propuso que la variación interindividual a la respuesta a drogas, también podría surgir de desarreglos de factores metabólicos. Esta visión profética de las bases de la farmacogenética fue publicada en “The Inborn Errors of Metabolism” y en “The Inborn Factors of Disease”. Garrod reemplazó a William Osler en la Universidad de Oxford. Ambos tenían poco en común en cuanto al concepto de enfermedad. Osler consideraba que las personas tenían enfermedades y que todas las enfermedades poseían características bien definidas que las distinguían entre sí; por lo tanto, para Osler todos los pacientes que padecían una determinada enfermedad deberían ser tratados de forma idéntica. Sin embargo, Garrod daba mayor importancia a las diferencias interindividuales, y para él no hay enfermedades sino enfermos, cada uno con una “individualidad química” que hay que tener en cuenta para su curación [9].

La farmacogenética cobró un gran interés en la década 1970 cuando Vesell demostró a través de estudios en mellizos que la variabilidad en la velocidad del metabolismo de drogas tiene una base genética [10]. A partir de este momento se comienzan a describir respuestas notablemente distintas en la eficacia de los fármacos administrados, las cuales han sido explicadas por la existencia de polimorfismos genéticos de los blancos farmacéuticos o dianas terapéuticas y de las enzimas que metabolizan fármacos. La mayoría de estos polimorfismos son de nucleótido simple (SNP), los que representan aproximadamente más del 90 % de variación genética en el genoma humano. El resto de la variación es causada por

inserciones y deleciones (ins/del), duplicaciones, microsatélites repetitivos, entre otras [11].

Todos los regímenes antineoplásicos conocidos son tóxicos para el huésped. Esto es debido a que los tumores malignos se originan a partir de tejido normal y sólo hay pequeñas diferencias bioquímicas entre los dos tipos de células, por lo tanto cualquier tratamiento antineoplásico va afectar “calculadamente” a las células normales. Además de este tipo de toxicidad existe la no premeditada, las RAM (reacciones adversas a medicamentos). La OMS las define como: *“una respuesta a un medicamento que es nociva y no intencionada, y que ocurre a dosis normalmente utilizadas en el hombre”* [12]. Entre los mecanismos comunes que dan origen a las RAM, podemos encontrar factores farmacocinéticos anormales, que están relacionados principalmente con polimorfismos genéticos que alteran la funcionalidad de las enzimas que participan en la biotransformación de fármacos. Por ejemplo, el 5-FU, tras su administración, es catabolizado en el hígado en una ruta de tres pasos a 2-fluoro- $\beta$ -alanina, actuando en primer lugar la enzima Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD). La deficiencia de la cantidad y/o calidad de esta enzima puede conducir a una toxicidad severa a 5-FU. El 59% de los casos reportados que desarrollan toxicidad se deben a niveles bajos de DPD. Se han identificado en estos pacientes 11 mutaciones en el gen *DPYD*, dentro de las cuales la mutación IVS14+1 G>A se observa en el 52% de los casos. Por lo tanto, la toxicidad a medicamentos “intencionada o no” es una gran limitante de todas las terapias antineoplásicas [13,14,15].

Otro punto que siempre se debe evaluar de un fármaco es su eficacia y su tolerancia. La eficacia se define como *“la capacidad del complejo fármaco-receptor, evaluada por métodos científicos, de producir un efecto previsto”*[16]. El efecto terapéutico de un fármaco se logra alcanzando un intervalo preciso de concentración. Por debajo de este intervalo no se observará ningún efecto farmacológico y por encima, el efecto puede ser excesivo y es posible que aparezcan efectos no deseados. En cambio, la tolerancia a las drogas es básicamente la capacidad del cuerpo para adaptarse a la presencia de una droga [17].

La resistencia es un concepto biológico que se refiere a la capacidad heredada del individuo de no ser sensible a un fármaco a las dosis habituales. Esta reducción a la sensibilidad se manifiesta en un grupo de individuos de la población que probarán ser tolerantes a dosis que son letales para la mayoría. Esta resistencia puede presentarse específicamente en las células neoplásicas, producto a sus genomas mutables e inestables. Esta singularidad no se presenta en las células normales [18].

Los principales mecanismos de resistencia farmacológica por variantes genéticas puede producirse por: *a)* modificación cualitativa y/o cuantitativa de las dianas moleculares (p.ej., Timidilato Sintasa); *b)* aumento de la velocidad de inactivación farmacológica (p.ej., metabolismo ultra rápido, CYP2D6); *c)* disminución de la velocidad de penetración del fármaco en las células; *d)* incremento en la actividad de los mecanismos de salida o expulsión del fármaco; entre otros [18].

La eficacia y la tolerancia de los análogos de pirimidinas (5-FU y su pro-droga oral Capecitabina) han sido extensamente estudiadas, debido a que el blanco o diana de estos fármacos es la enzima Timidilato Sintasa, clave en la síntesis del DNA.

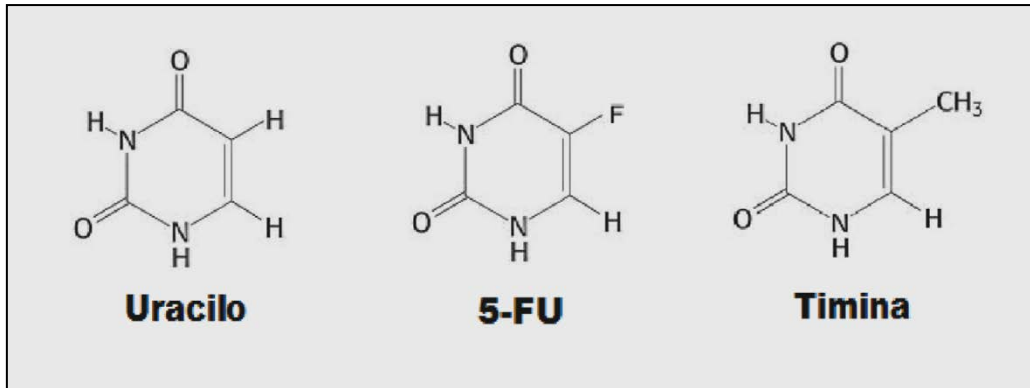
## 1.1 Timidilato Sintasa (TS)

Timidilato Sintasa (EC 2.1.1.45) es una enzima dimérica citosólica, que cataliza la metilación reductiva de deoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) a 2'-deoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP). Este dTMP conocido también como *timidina*, es un precursor esencial en la biosíntesis DNA [19]. El rol de esta enzima en el metabolismo nucleotídico del DNA la convierte en el principal blanco o diana para las drogas “antimetabólicas”, análogas estructurales a las pirimidinas, tales como el 5-Fluorouracilo (5-FU) y su pro-fármaco oral de menor toxicidad, la Capecitabina [19,20].

## 1.2 5-Fluorouracilo (5-FU) y su pro droga Capecitabina

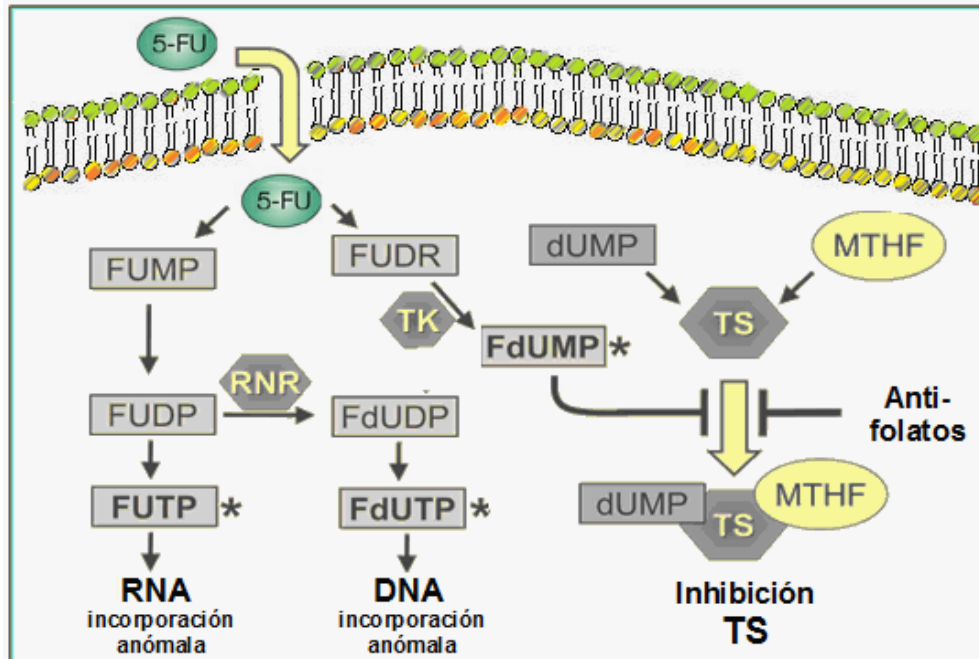
El 5-Fluorouracilo (5-FU) es un agente antineoplásico, que hace varias décadas ha sido empleado en el tratamiento del CCR y otros tumores sólidos [22]. 5-FU fue sintetizado en 1957 como una droga antineoplásica, análogo fluorado del uracilo (*figura 1*), que actúa durante la fase S del ciclo celular a través de su metabolito activo 5-fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), impidiendo la síntesis de DNA. Esto provoca un desbalance de la proliferación celular lo que implica apoptosis [21].





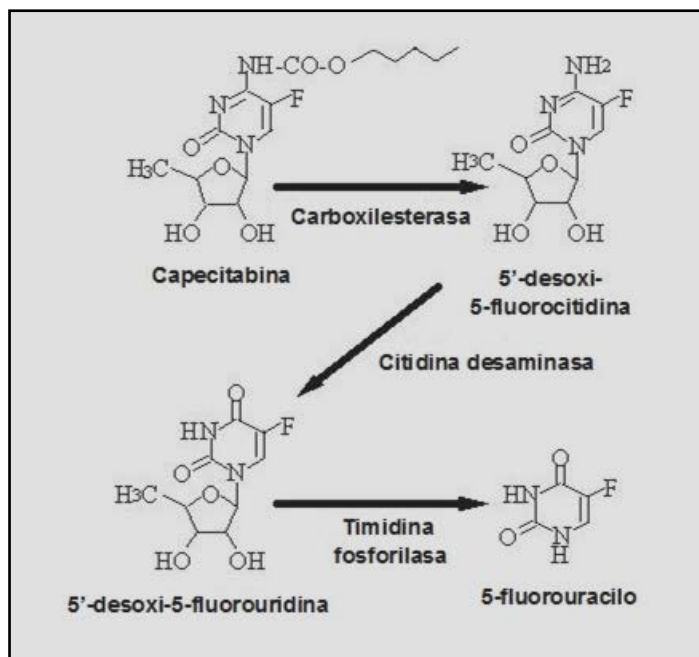
**Figura 1:** Estructura química de Uracilo, 5-FU y Timina.  
 (<http://es.wikipedia.org/wiki/Pirimidina>, modificado)

Tanto en las células normales como en las tumorales los metabolitos activos que se generan a partir del 5-FU son 3: **FUTP**, **FdUMP** y **FdUTP** conocidos por sus efectos citotóxicos. Si el 5-FU es administrado por *vía oral* o por *bolo*, actúa a través del metabolito **5-FUTP**, que se incorpora al RNAm intracelular, lo que conlleva a su disfunción e inhibición de la síntesis de proteínas. En cambio si el 5-FU es administrado por *vía intravenosa* su acción es a través de **FdUMP**, provocando un bloqueo en forma irreversible con TS, por la formación de un complejo ternario inactivo entre FdUMP, TS y su cofactor 5-10 metilentetrahidrofolato (MTHF). **FdUMP** también puede ser fosforilado a **FdUTP** e incorporado directamente al DNA. Esta incorporación errónea inhibe la elongación de la cadena y altera su estabilidad, lo que resulta en la producción de roturas de hebra simple y fragmentación del DNA (*figura 2*) [21].



**Figura 2:** Vías de conversión intracelular del 5-FU (\*: metabolitos activos).  
 (Cancer Biology & Therapy 7:7,995-996; 2008, modificado).

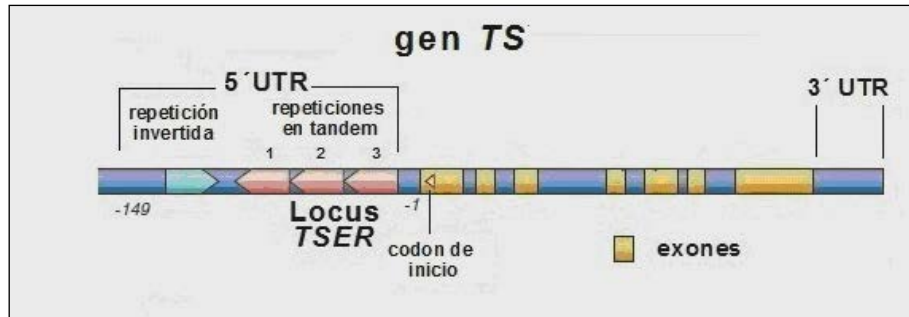
El 5-FU puro es muy tóxico, por lo que habitualmente es administrado como Capecitabina, con mayor biodisponibilidad para la célula, ingresando a ella por transportadores de nucleósidos. La Capecitabina es transformada en las células hepáticas por la carboxilesterasa (CE) en 5'-deoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR) y este a su vez en 5'-deoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) por la enzima citidina deaminasa (CyD), cuya concentración es elevada en hígado, plasma y tejido tumoral. Finalmente, 5'-DFUR es convertido 5-FU por la acción timidina fosforilasa (TP), cuya concentración es de 3 a 10 veces más alta en tejido tumoral que en el tejido normal adyacente (figura 3) [22,23].



**Figura 3: Conversión enzimática de Capecitabina a 5-FU.** Capecitabina se absorbe en el tubo digestivo y se procesa en el hígado para obtener 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR). La citidina deaminasa, una enzima que se encuentra en la mayoría de los tejidos, convierte posteriormente la 5'-DFCR en 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR). Después la enzima Timidina fosforilasa hidroliza la 5'-DFUR para dar el fármaco activo 5-fluorouracilo (5-FU). (*Cáncer Colorrectal, Dana-Farber Cancer Institute, pág.69*)

### 1.3 Estructura del gen Timidilato Sintasa

El gen Timidilato Sintasa (*TYMS* o *TS*; OMIM#188350), se ubica en el cromosoma 18p11.32. *TS* está constituido por 7 exones, 6 intrones, 2 regiones flanqueadoras que se transcriben pero no se traducen (5'UTR y 3'UTR) y su promotor (*figura 4*). Los exones presentan secuencias que van entre 72 y 250 pares de bases (pb) y los intrones entre 507 y 6271pb [24,25].



**Figura 4:** Representación esquemática del gen **Timidilato Sintasa (TS)**.  
(*Clinical Colorectal Cancer*, Vol. 1, No. 3, 175-178, 2001, modificado)

### 1.3.1 Región no traducida 5' (5'UTR)

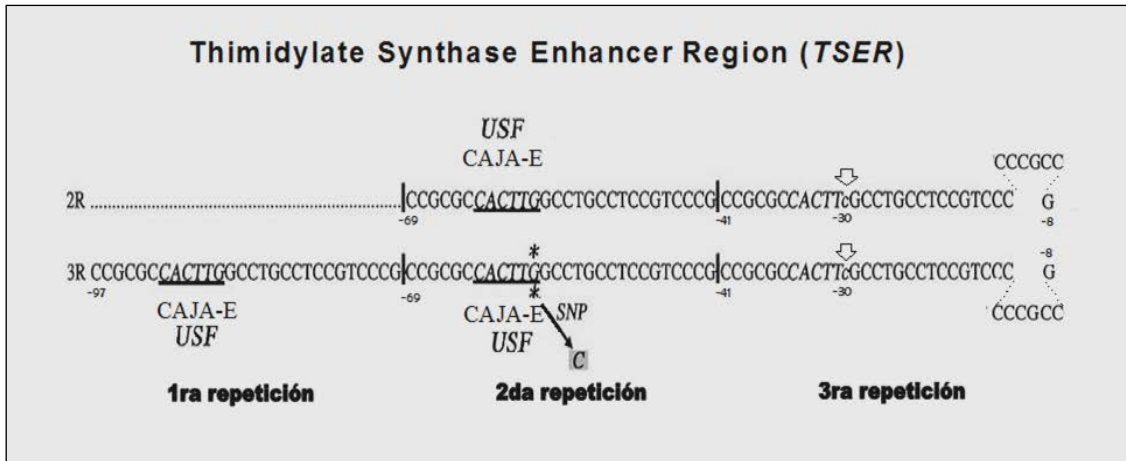
La región 5'UTR se localiza río arriba inmediatamente después del codon de inicio de la transcripción (ATG). Kaneda y colaboradores (1990) describieron que 5'UTR presenta un alto contenido de nucleótidos G y C, desde el residuo -1 al -140 (79%), y un área rica en purinas entre los residuos -101 y -140 (G+A, 70%) [24].

5'UTR está constituido por una: a) región polimórfica de secuencias repetidas en tándem de 28pb, que pueden variar entre 2 a 9 repeticiones (VNTR, variable number tandem repeats) [26] y b) secuencia de 14pb ubicada entre la primera repetición de 28pb del VNTR y una de igual número de nucleótidos pero invertida, localizada entre -139 y -112. Esta secuencia invertida tiene una complementariedad del 75% con cada una de las repeticiones del VNTR [24].

En todas las poblaciones estudiadas se ha encontrado variación para este VNTR, siendo las repeticiones dobles (2R) y triples (3R) las más frecuentes. Cuando el VNTR presenta 2R, la primerasecuencia repetida se localiza a -69pb del codón de inicio de la transcripción y la segunda se encuentra adyacente a éste, río abajo. En el

caso, de presentarse 3R, se ha descrito que la primera y segunda repetición son idénticas y colindantes, ubicadas entre -97 y -70pb y entre -69 y -42pb, respectivamente, mientras que la tercera repetición se encuentra entre -41 y -8pb, ésta contiene siempre una inserción de 6pb (-13 a -8pb) y una sustitución G>C en el residuo nucleotídico -30 [24]. La zona que incluye las repeticiones ha sido denominado por consenso locus *TSER* (*Thymidilate Synthase Enhancer Region*). Por lo tanto, los alelos se designan según el número de repeticiones como *TSER*\*2, *TSER*\*3, etc. [26,27].

En el locus *TSER* se ha descrito, excluyendo la tercera repetición, entre el 7<sup>mo</sup> y 12<sup>o</sup> nucleótido una secuencia de consenso: CACTTG denominada **caja-E**, que tiene un efecto potenciador o *enhancer* de la transcripción del gen *TS*. Este sitio une factores estimulantes de la transcripción o USF (*UpstreamStimulatory Factor*). Mandola y colaboradores (2003) describieron un polimorfismo de nucleótido simple (SNP, *single nucleotide polymorphism*) dentro de la caja-E, que consiste en la sustitución G>C en el 12<sup>o</sup> nucleótido de la segunda repetición, dando lugar a los alelos *TSER*\*3G y *TSER*\*3C (*figura 5*) [28].



**Figura 5:** Secuencia nucleotídica del locus *TSER* tanto para el alelo 2R (superior), y el alelo 3R (inferior). Se señala la ubicación del SNP dentro de la caja- E (\*), y la sustitución G>C (flecha) (*Cancer Research*2003; 63:2898-2904, 2003, modificado).

### 1.3.2 Región no traducida 3' (3'UTR)

Esta región flanqueadora de 496pb se ubica inmediatamente después del codon de finalización de la transcripción (TAG). Ulrich y colaboradores (2000) identificaron una deleción de 6pb entre los nucleótidos 15198 y 15204. En población caucásica el rango de frecuencia de esta deleción es de 27 a 29%. La función de este polimorfismo es desconocida [28,29,30].

### 1.3.3 Promotor del gen *TS*

El promotor del gen *TS* no presenta las secuencias de iniciación de la transcripción típicas de la mayoría de los genes eucarióticos (TATA, CAAT y GC). La región más importante que promueve la transcripción del RNAm de *TS* es la conformada por tres secuencias que unen proteínas (Ets, Sp1 y LSF) entre -161 y -141pb río arriba. La secuencia que une Ets esta adyacente a la secuencia que une la Sp1, mientras que la que liga a LSF se sobrepone a ambas secuencias [24,31].

## 1.4 Locus *TSER* y resistencia al 5-FU

Kawakami y colaboradores (1999) estudiaron la asociación entre genotipo *TSER* y la expresión de la proteína en tejidos tumorales de 70 pacientes con cáncer gastrointestinal, 49 de ellos no recibieron tratamiento (grupo control) y 21 fueron tratados con UFT (Tegafur+Uracilo) antes de la cirugía. En el grupo control hallaron, niveles decrecientes de proteína TS según los genotipos:  $TSER^3/TSER^3 > TSER^2/TSER^3 > TSER^2/TSER^2$ . Esta gradiente sugirió una dependencia entre niveles de la proteína y genotipo. En el grupo tratado con UFT cuantificaron los sitios de unión covalente del complejo binario: FdUMP y proteína TS, mediante el ensayo estequiométrico  $H^3$ -FdUMP, este ensayo midió los niveles de TS total y TS libre (no forma el complejo FdUMP-TS), encontrando niveles significativamente mayores de TS libre en tejidos tumorales con genotipos  $TSER^3/TSER^3$  versus  $TSER^2/TSER^3$ , y bordeando la significación hallaron mayor nivel de TS total en los individuos  $TSER^3/TSER^3$  con respecto a los  $TSER^2/TSER^3$ . No estudiaron estas relaciones en los pacientes con genotipo  $TSER^2/TSER^2$  debido al pequeño tamaño muestral (3 de 70). Es por esto que ellos proponen que los genotipos para el locus *TSER* y los niveles de proteína pueden ser usados como predictor de la respuesta de los pacientes tratados con 5-FU [32].

En un trabajo publicado por Marsh y colaboradores (2001), estudiando 24 pacientes caucásicos con diagnóstico de cáncer colorrectal y tratados con 5-FU, encontraron que la sobrevida media fue mayor en los pacientes que presentaban el genotipo  $TSER^2/TSER^2$  que la de los  $TSER^3/TSER^3$ . El riesgo que ellos

estimaron a la resistencia al 5-FU fue 2,33 veces mayor en pacientes que presentaban al menos un alelo *TSER\*3* en comparación con los homocigotos *TSER\*2/TSER\*2* [33]. Pullarkat y colaboradores (2001), encuentran la misma relación entre genotipo y sobrevida en pacientes de EE.UU., estimando una sobrevida en promedio de 16,2 meses para los pacientes *TSER\*2/TSER\*2* con cáncer colorrectal tratados con 5-FU en relación a 8,5 y 8,3 meses en los pacientes *TSER\*2/TSER\*3* y *TSER\*3/TSER\*3*, respectivamente. Además, encuentran una asociación estadísticamente significativa entre grado de toxicidad a 5-FU y genotipos para *TSER*. Los pacientes *TSER\*3/TSER\*3* presentan una menor toxicidad comparados con los *TSER\*2/TSER\*3* y *TSER\*2/TSER\*2*. Esto se explicaría porque los pacientes con genotipo *TSER\*3/TSER\*3* tienen mayor nivel de expresión de proteína TS y por ende el fármaco tiene menor eficacia, lo que lleva a una disminución de la muerte celular en tejido tumoral y a una baja toxicidad en las células normales [34].

Uchida y colaboradores (2004) estudiaron la pérdida de la heterocigocidad del locus *TSER*, en células tumorales y evaluaron como esta pérdida afectaba la respuesta y sobrevida en individuos heterocigotos para la repetición de 28pb de *TSER*. Estudiaron tejido sano (control) y tumoral en 30 pacientes con cáncer colorrectal, tratados con la combinación basada en fluoropirimidas S-1, todos ellos en estadio IV. La frecuencia del genotipo heterocigoto *TSER\*2/TSER\*3* en tejido sano fue un 73% (22 de 30), de este set de individuos heterocigotos el 45% (10) mostraron un genotipo *TSER\*2/---*, mientras que el 32% (7) mostró un genotipo *TSER\*3/---* en tejido tumoral. La tasa de respuesta en pacientes con genotipo *TSER\*2/---* en las



células tumorales fue del 80% (8 de 10) en comparación con el 14% (1 de 7) en el grupo con genotipo *TSER\*3/---* ( $P = 0,029$ ). Los pacientes que presentaban en los tumores genotipos *TSER\*3/---*, tuvieron una supervivencia significativamente menor en comparación con los que presentaban en el tejido tumoral genotipo *TSER\*2/---*. Estos resultados proporcionan más apoyo a la evidencia de que el alelo *TSER\*3* actúa como un determinante negativo en la respuesta a la terapia basada en fluoropirimidas, y que podría ser utilizado como un marcador biológico de la respuesta a la quimioterapia dirigida contra la enzima TS [35].

Acuña y colaboradores (2005) describieron las frecuencias genotípicas y alélicas para locus *TSER* en dos poblaciones de Santiago de Chile de distintos estratos socioeconómicos, pacientes de la Clínica las Condes (CLC) y donantes de sangre del Hospital San José. No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias para el locus *TSER* (**CLC**: *TSER\*3/TSER\*3*=33,7%; *TSER\*2/TSER\*3*=46,3%; *TSER\*2/TSER\*2*=20%; ***TSER\*3*=56,8%**. **HSJ**: *TSER\*3/TSER\*3*=29,2%; *TSER\*2/TSER\*3*=48,3%; *TSER\*2/TSER\*2*=22,5%; ***TSER\**=53,4%**). Por lo tanto, si suponemos que estas frecuencias son las de los pacientes con cáncer colorrectal tratados con fluoropirimidas (5-FU y Capecitabina), aproximadamente el 30% de ellos presentaría el genotipo *TSER\*3/TSER\*3* y por ende una respuesta ineficaz al tratamiento con fluoropirimidas; es decir, estos pacientes tendrían una esperanza de vida disminuida al compararlos con pacientes de genotipo *TSER\*2/TSER\*2* [36].

Yu y colaboradores (2008) estudiaron la región 5'UTR del gen *TS* y la expresión tisular de la proteína TS en 68 biopsias de pacientes con cáncer de colon, los cuales

no recibieron quimioterapia antes de la cirugía. La longitud de las repeticiones en tándem fue determinada mediante amplificación de DNA genómico por PCR, mientras que la expresión intratumoral de la proteína TS fue evaluada por inmunohistoquímica (IHQ) en tejido fijado e incluido en parafina. Los niveles de TS fueron valorados semicuantitativamente mediante un score de inmunoreactividad (*SIR*), que consideró la intensidad de la inmunotinción y el porcentaje de células tumorales positivas para la inmunotinción. Encontrándose que los pacientes con genotipo *TSER\*3/TSER\*3* (40/68) presentaban un *SIR* significativamente mayor que los que presentaban genotipo *TSER\*2/TSER\*3* (22/68) ( $5.73 \pm 3.25$  vs.  $3.77 \pm 2.64$ ,  $p$  value = 0.015). El *SIR* de pacientes con genotipo *TSER\*3/TSER\*3* en tejido tumoral fue mayor que para los que presentaban genotipos *TSER\*2/TSER\*2* (6/68) ( $5.73 \pm 3.25$  vs.  $2.17 \pm 1.47$ ,  $p$  value = 0.008). El *SIR* no fue estadísticamente significativa entre los genotipos *TSER\*3/TSER\*2* y *TSER\*2/TSER\*2* (datos no mostrados) [37].

En un estudio publicado por Kristensen y colaboradores (2010) estudiaron la relación entre las variantes del locus *TSER* versus niveles de expresión de RNAm y proteína TS en 68 pacientes daneses con cáncer colorrectal. Ellos encontraron que los pacientes con genotipo *TSER\*3/TSER\*3* tenían niveles significativamente mayores de proteína TS comparados con los pacientes con genotipo *TSER\*3/TSER\*2* ( $8.8 \pm 1.3$  vs.  $5.3 \pm 0.9$ ,  $P=0.01$ ) y *TSER\*2/TSER\*2* ( $8.8 \pm 1.3$  vs.  $3.1 \pm 0.1$ ,  $P=0.003$ ). No detectaron diferencias significativas entre los pacientes con genotipo *TSER\*3/TSER\*2* y *TSER\*2/TSER\*2*. Estos autores correlacionaron genotipo y los niveles de RNAm, encontrando que los pacientes con genotipo *TSER\*3/TSER\*3* presentaban un incremento significativo en la expresión de RNAm

TS comparado con los pacientes con genotipo  $TSER^*3/TSER^*2$  ( $P=0.01$ ) y  $TSER^*2/TSER^*2$  ( $P=0.02$ ). No hallaron diferencias significativas en los niveles de expresión del RNAm TS entre los pacientes con genotipo  $TSER^*3/TSER^*2$  y  $TSER^*2/TSER^*2$  ( $P=0.11$ ) [38].

Por último es necesario mencionar que los niveles de RNAm y de proteína TS son considerados indicadores pronósticos para varios cánceres, entre los cuales se encuentra el cáncer de colorrectal. En una revisión conjunta de datos de 73 publicaciones analizadas por meta-análisis, se encontró que los individuos  $TSER^*2/TSER^*2$  o  $TSER^*2/TSER^*3$  presentan un menor riesgo a cáncer de colorrectal a diferencia del cáncer de mama, donde los individuos  $TSER^*2/TSER^*2$  presenta un riesgo significativamente alto [39].

Los resultados explicitados en la literatura apoyan la existencia de un gradiente de expresión diferencial de proteína TS según genotipo  $TSER$  ( $TSER^*3G/TSER^*3G > TSER^*3G/TSER^*3C > TSER^*3G/TSER^*2 > TSER^*3C/TSER^*3C > TSER^*3C/TSER^*2 > TSER^*2/TSER^*2$ ). Es por ello que se hace necesario realizar estudios prospectivos, para confirmar si este polimorfismo podría utilizarse como un marcador biológico útil para la optimización de la terapia con fluoropirimidas en pacientes chilenos con cáncer.

## **II.- HIPOTESIS**

---

Timidilato Sintasa (TS) presenta una expresión proteica diferencial, influenciada por los polimorfismos (VNTR y SNP) del locus *TSER*, según genotipos que generan mayor (*TSER\*3G/TSER\*3G* > *TSER\*3G/TSER\*3C* > *TSER\*3G/TSER\*2*) y menor expresión (*TSER\*3C/TSER\*3C* > *TSER\*3C/TSER\*2* > *TSER\*2/TSER\*2*), tanto en tejido normal como tumoral de pacientes chilenos con cáncer colorrectal.

## **III.- OBJETIVOS**

---

### **3.1 Objetivo General**

Determinar si existe asociación entre las variantes alélicas del locus *TSER* y los niveles de expresión de la proteína TS en tejido normal y tumoral, de pacientes chilenos con cáncer colorrectal.

### **3.2 Objetivos Específicos:**

- a. Seleccionar según criterios clínicos y anatomopatológicos, pacientes con diagnóstico de cáncer de colon y/o recto, tratados en el Hospital San Juan de Dios – Santiago de Chile.
- b. Conocer las frecuencias genotípicas y alélicas para el locus *TSER*, considerando los polimorfismos (VNTR y SNP), tanto en tejido normal como tumoral, de los pacientes seleccionados.
- c. Valorar mediante un score de inmunoreactividad (*SIR*), los niveles de expresión de TS en tejido normal y tumoral.
- d. Determinar si existe pérdida de heterocigocidad en tejido tumoral en los pacientes.
- e. Relacionar los niveles de expresión de TS con los distintos genotipos del locus *TSER*.

# **IV.- PACIENTES, MATERIALES Y METODOS**

---



## 4.1 Selección de pacientes

En el presente estudio se contempló la participación de pacientes chilenos de ambos sexos, menores a 86 años de edad, diagnosticados con cáncer de colon y/o recto sigmoides (CCR), sometidos a quimioterapia coadyuvante en base a fluoropirimidas (5-FU o Capecitabina), entre Noviembre del 2008 a Marzo del 2012, atendidos en el Hospital San Juan de Dios (HSJD) – Santiago de Chile, que es parte de la Red de Salud Metropolitana Occidente, la cual recibe a los pacientes pertenecientes a las comunas de Pudahuel, Renca, Cerro Navia, Quinta Normal y Lo Prado, también le corresponde atender a las provincias de Melipilla y Talagante. La población en estas comunas según el mapa de nivel socioeconómico de Chile, basado en el censo 2002 (fuente Adimark), pertenecen principalmente a los estratos socioeconómicos medio-bajo y bajo (C2, C3 y D), y son homologables con la población que atiende el Complejo Hospitalario San José [40].

Los criterios para la inclusión de pacientes en este estudio, además de los mencionados, se basaron en el diagnóstico anatomopatológico, considerando exclusivamente pacientes con diagnóstico de CCR de tipo histológico: adenocarcinoma, por ser el más frecuente, en estadio II o III de la enfermedad, de acuerdo a la clasificación TNM 2002 del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)[41]. No se consideraron los pacientes en estadio I y IV dado que no nos servirán para estudios posteriores, la idea es tener una base de datos lo más homogénea posible, considerando que el tratamiento curativo para los pacientes en estadio I es la resección quirúrgica del tumor primario y en el estadio IV el

tratamiento terapéutico combina el uso de fluoropirimidas con anticuerpos monoclonales (Cetuximab y Panitumumab), dirigidos específicamente contra el factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En cambio el estadio II y III el tratamiento es la resección quirúrgica del tumor primario y posterior a ésta el uso de fluoropirimidas [42].

De la ficha de cada paciente se obtuvo datos tales como edad, sexo, antecedentes familiares, localización, tipo y estadio del tumor, dosis de agente quimioterapéutico, fechas de inicio y término de la quimioterapia, y recidivas del cáncer, entre otras variables, las que se ordenarán en una planilla computacional para el registro y análisis de la información. Todos los pacientes aprobaron su participación mediante la firma de un consentimiento informado.

## **4.2 Obtención y análisis de las muestras**

A partir de las biopsias, almacenadas en los archivos histológicos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios, se obtuvieron muestras de tejido fijado en formalina e incluidas en parafina (TFFIP). Para la obtención de tejido normal y tumoral de las biopsias, se examinaron al microscopio láminas con cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina (HE). A partir de éstas se delimitaron áreas, adyacentes al tumor primario, de tejido tumoral y tejido normal, y mediante la técnica de macrodissección manual por perforación (punching) de las biopsias incluidas en bloques de parafina, se obtuvieron fragmentos tisulares de 7 mm de diámetro.

#### **4.2.1 Extracción de DNA a partir de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (TFFIP).**

La extracción de DNA tanto de tejido normal y tumoral, se realizó empleando el kit comercial QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen) [43], bajo el siguiente protocolo de desparafinización:

- Desde las muestras obtenidas mediante punching, se cortaron 10 a 15 secciones de 10  $\mu\text{m}$  de grosor con micrótomo, las cuales fueron colocadas en tubos eppendorf de 1,5 ml.
- Se agregó 1 ml de xilol, dejando a temperatura ambiente por 10 min., y agitando brevemente cada 3 min., seguido de una centrifugación a 14500 r.p.m. por 5 min., y eliminando el sobrenadante por aspiración con pipeta.
- Luego, se agregó etanol absoluto, agitando durante 15 segundos, y se procedió a centrifugar a 14500 r.p.m. durante 2 minutos, eliminando el sobrenadante (este paso se repitió 1 vez más).
- Se dejó secar a 56°C durante 10 minutos.
- Una vez obtenido el pellet de tejido, se continuó con el protocolo de extracción de DNA descrito por el fabricante (Qiagen, Cat. no. 56404).

#### **4.2.2 Genotipificación del locus *TSER*, según repeticiones en tándem dobles o triples de 28 pares de bases.**

La genotipificación del VNTR de 28 pb localizado en el locus *TSER*, fue realizada mediante reacción en cadena de polimerasa convencional (PCR), usando partidores *sentido* 5`AAAAGGCGCGCGGAAGGGGTCCT3` y *antisentido* 5`TCCGAGCCGGCCACAGGCAT3` descritos por Iacopetta y colaboradores (2001) [44]. La mezcla de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 25µL, conteniendo 4 µL de DNA genómico, 2,5µL de buffer 10X incluido MgCl<sup>2+</sup>, 2,5 µL de DMSO al 10%, 2,0µL de cada partidore a una concentración 10 µM, 0,2U de *Taq* Polimerasa (*New England Biolabs*) y 11,4µL de agua desionizada grado PCR. El protocolo para la reacción de PCR consistió en una denaturación del DNA durante 5 minutos a 94°C, para luego continuar con 32 ciclos de amplificación en 3 etapas: una denaturación de 40 segundos a 94°C, seguida por un apareamiento a 60°C durante 40 segundos y una extensión a 72°C durante 60 segundos, la extensión final fue durante 5 minutos a 70°C, la reacción de amplificación fue realizado en sistema termociclador (PTC-100<sup>TM</sup> MJ Research INC.).

Las secuencias de los partidores sintetizados son complementarias a la región que flanquea al VNTR de 28 pb del locus *TSER*, de modo que la presencia de 3 repeticiones exhibió un producto de PCR de mayor longitud que uno de 2 repeticiones. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 3% y resueltos con tinción de Bromuro de Etidio en un transluminador UV Vilber Loumat modelo TFX-20M, obteniéndose bandas de 144pb y 116pb, para el alelo *TSER*\*3 y

*TSER\*2*, respectivamente. Para corroborar el tamaño de los amplificadores (144 y 116pb) se utilizó un estándar de peso molecular a una escala de 25pb.

#### **4.2.3 Genotipificación del locus *TSER*, según SNP (G>C) localizado en el 12<sup>o</sup> nucleótido de la segunda repetición del alelo *TSER\*3*.**

Se empleó la técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), descrita por Kawakami y colaboradores (2003) [45], para la identificación del SNP (G>C) localizada en el 12<sup>o</sup> nucleótido de la segunda repetición del alelo *TSER\*3*, y que produce los alelos *TSER\*3G* y *TSER\*3C*. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, conteniendo 5U de enzima de restricción *Hae III*, 5µL de producto de PCR obtenido de la genotipificación del VNTR de 28 pb del locus *TSER* (excluyendo de la genotipificación a los pacientes con genotipo *TSER\*2/\*2*) y agua desionizada grado PCR, hasta completar el volumen final. La digestión enzimática fue realizada a 37°C durante toda una noche. Los productos de la digestión fueron separados en gel de acrilamida:bisacrilamida 19:1 al 8% p/v, por electroforesis en cámara vertical (Protean II Xi Cell, Biorad) y resueltos con tinción de Nitrato de Plata al 0,3%, obteniéndose bandas de 66, 37, y 28pb de longitud para el alelo *TSER\*3G* y de 94 y 37pb para el alelo *TSER\*3C*. Para corroborar el tamaño de los amplificadores se utilizó un estándar de peso molecular a una escala de 25pb.

#### **4.2.4 Determinación de la expresión de Timidilato Sintasa (TS) en muestras de tejido normal y tumoral, mediante técnica inmunohistoquímica (IHQ).**

A las muestras histológicas de 7mm de diámetro previamente seleccionadas, tanto de tejido normal como tumoral, se les realizaron cortes de 4 micrones de espesor, que fueron colocados en portaobjetos silanizados, alineando cortes de tejido normal (TN) y tumoral (TT) de un mismo paciente. A lo largo de un portaobjeto se dispusieron cortes de TN y TT de 3 pacientes, además de un control positivo correspondiente a tejido colónico normal con intensidad leve de reactividad, un control negativo que consistió en un corte al azar de las mismas muestras estudiadas, y al que se le dio el mismo tratamiento inmunohistoquímico, excepto que no se le agregó el anticuerpo primario (TS-106: SC-33679).

Los portaobjetos con las muestras histológicas fueron desparafinadas y rehidratadas en pasos sucesivos de xilol por 10 min. y alcoholes de 100°, 95° y 70° por 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente, la reactividad antigénica fue recuperada colocando los portaobjetos en una jarra de Coplin con solución de EDTA (ácido etilen diamino tetracético) 1mM pH 8,0, precalentando a  $94\pm 1^{\circ}\text{C}$  y colocados en un sistema de vapor adaptado para IHQ (Oster 5711) por 40 minutos, luego fueron dejadas enfriar a temperatura ambiente por 15 minutos, y posteriormente lavadas 2 veces en agua destilada por 3 minutos.

La expresión de la TS, fue determinada agregando 50µL de anticuerpo IgG monoclonal murino TS 106: SC-33679 (Santa Cruz Biotechnology, INC.) a una dilución de 1:50 e incubadas por 40 minutos a 37°±1°C en cámara húmeda. Seguidamente, se realizaron 2 lavados con buffer PBS 1X, pH 7,4, durante 5 minutos.

Para la visualización de la reacción inmunohistoquímica, se empleó el sistema de detección NovoLink™ Polymer Detection System (*Leica* microsystems Product No: RE7140-K)[46], siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La evaluación inmunohistoquímica fue realizada con un microscopio de luz (Olympus BX43).

Para valorar semicuantitativamente la expresión de proteína TS, se le asignó una puntuación en una escala de 0 a 3 al grado de **intensidad** de la inmunotinción (**0**: indetectable, **1**: débil, **2**: moderada, **3**: fuerte), y de 0 a 4 al grado de **extensión** de la inmunotinción (**0**: 0% de células, **1**: reacción en 1 a 25% células tumorales, **2**: reacción en 26 a 50 % células, **3**: reacción en 51 a 75% células, **4**: reacción en 76 a 100% de células), los valores obtenidos de cada parámetro analizado fueron multiplicados para obtener un **score de inmunoreactividad (SIR)**. La evaluación de las muestras las realizaron dos médicos patólogos experimentados.

### 4.3 Análisis estadísticos

Se construyeron tablas y gráficas descriptivas de variables nominales como sexo, localización de tumor, genotipos, alelos y numéricas, como rango de edad, estadio del tumor y *score de inmunoreactividad (SIR)*. Se estimaron por conteo directo las frecuencias genotípicas y alélicas para el locus *TSER* y luego se evaluó si las frecuencias genotípicas observadas para el locus *TSER* se encuentran en equilibrio genético de Hardy y Weinberg (prueba de Bondad de Ajuste,  $\chi^2$ ,  $p \leq 0,05$ ).

La estimación del porcentaje de mezcla indígena se realizó de acuerdo al método de Bernstein [47]. Las frecuencias alélicas utilizadas para estimar este porcentaje de mezcla, fueron las de los alelos *A*, *B* y *O* del sistema ABO y “*d*” del sistema Rh. Las frecuencias alélicas para ABO y Rh de las poblaciones ancestrales se obtuvieron de la literatura; Españoles  $ABO^*O = 0,65$ ;  $RHD^*d = 0,41$  y Aborígenes Chilenos  $ABO^*O = 0,98$ ;  $RHD^*d = 0,0$ [48]. Esto nos permite comparar objetivamente nuestros datos con los de otras poblaciones de orígenes étnicos similares o distintos. Por último, para indagar una posible asociación entre cáncer de colorrectal y locus *TSER*, se cotejó si las frecuencias genotípicas y génicas de la Clínica las Condes (CLC) y Hospital San José (HSJ) fueron significativamente distintas a las del Hospital San Juan de Dios (HSJD). La CLC y el HSJ son considerados poblaciones controles de nuestros datos.

Se estimaron los promedios y las desviaciones estándares de las puntuaciones obtenidas al semicuantificar los niveles de TS, de acuerdo al genotipo del VNTR y



SNP del locus *TSER*. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis [49], con un  $\alpha \leq 0,05$ , fue utilizada para evaluar la existencia de diferencias significativas entre las medias de los rangos del *score de inmunoreactividad*, según genotipo del locus *TSER*.

# **V.- RESULTADOS**

---

En este estudio participaron 53 pacientes de ambos sexos, diagnosticados con cáncer de colon y/o recto sigmoideo (CCR), atendidos en el Hospital San Juan de Dios (HSJD) - Santiago de Chile, entre Noviembre del 2008 a Marzo del 2012. De éstos, 30 (56,6%) fueron hombres y 23 (43,4%) mujeres, y las edades, al momento de la resección quirúrgica del tumor, oscilaron entre 35 y 85 años.

La tabla 1 presenta la distribución de la localización y estadio del tumor de los pacientes estudiados, separados por sexo y edad, en ésta podemos observar que el rango de edad más frecuente de presentación de la enfermedad en hombres se encuentra entre los 55 - 64 años (10 casos; 33,3%), y en mujeres entre los 65 - 74 años (9 casos; 39,1%). En nuestro estudio encontramos 25 hombres (83%) y 17 mujeres (74%) mayores de 54 años.

La localización anatómica más frecuente de presentación del tumor en los pacientes estudiados es el colon sigmoideo (CS); 11 mujeres (47,8%) y 15 hombres (50%). La segunda en frecuencia es el colon derecho (CD); 7 mujeres (30%) y 6 hombres (20%). La tercera localización fue el colon izquierdo (CI) y recto sigmoideo (RS) con 2 casos (8,7%) de mujeres en cada uno, y en los hombres fue el colon transversal (CT) con 4 casos (13,3%), seguido del RS con 3 casos (10%). La localización menos frecuente en mujeres fue el CT con 1 caso (4,4%), y en los hombres el CI con 2 casos (6,7%).

Todos los casos estudiados correspondieron a adenocarcinomas, de los cuales y según la estadificación de acuerdo a la clasificación TNM 2002 del

**TABLA 1**

**Localización del tumor y estadio tumoral en 53 pacientes con CCR, según sexo y edad, HSJD- Santiago Chile.**

Edad	HOMBRES												Total	N	%
	Localización						Total			Estadio					
	CD	CI	CS	CT	RS		N	%	I	II	III	N			
35-44	1	3,3	1	3,3			2	6,7	1	3,3	1	3,3	2	6,7	
45-54	1	3,3	3	10,0			3	10,0	3	10,0			3	10,0	
55-64	1	3,3	4	13,3	2	6,7	1	3,3	1	3,3	5	16,7	10	33,3	
65-74	4	13,3	2	6,7	1	3,3	2	6,7	5	16,7	4	13,3	9	30,0	
75-85	6	20,0	5	16,7	1	3,3	3	10,0	3	10,0	3	10,0	6	20,0	
<b>Total</b>			15	50,0	4	13,3	3	10,0	17	56,7	13	43,3	30	100,0	
Edad	MUJERES												Total	N	%
	Localización						Total			Estadio					
	CD	CI	CS	CT	RS		N	%	I	II	III	N			
35-44	1	4,4					1	4,4					2	8,7	
45-54	1	4,4	2	8,7			1	4,4					4	17,4	
55-64	2	8,7	2	8,7			4	17,4	3	13,1	1	4,4	4	17,4	
65-74	1	4,4	6	26,1	1	4,4	9	39,1	4	17,4	5	21,7	9	39,1	
75-85	2	8,7	1	4,4			4	17,4	2	8,7	2	8,7	4	17,4	
<b>Total</b>			11	47,8	1	4,4	2	8,7	11	47,8	12	52,2	23	100,0	
Edad	HOMBRES Y MUJERES												Total	N	%
	Localización						Total			Estadio					
	CD	CI	CS	CT	RS		N	%	I	II	III	N			
35-44	2	3,8	1	1,9			4	7,6	1	1,9	3	5,7	4	7,6	
45-54	1	1,9	5	9,4			7	13,2	5	9,4	2	3,8	7	13,2	
55-64	3	5,7	6	11,3	2	3,8	14	26,4	8	15,1	6	11,3	14	26,4	
65-74	5	9,4	8	15,1	2	3,8	18	34,0	9	17,0	9	17,0	18	34,0	
75-85	2	3,8	6	11,3	1	1,9	10	18,9	5	9,4	5	9,4	10	18,9	
<b>Total</b>			26	49,1	5	9,4	53	100,0	28	52,8	25	47,2	53	100,0	

CD: colon derecho, CI: colon izquierdo, CS: colon sigmoideo, CT: colon transverso, RS: recto sigmoideo

*American Joint Committee on Cancer (AJCC)* [41], encontramos 17 hombres (57%) y 11 mujeres (48%) en el estadio II, mientras que 13 hombres (43%) y 12 mujeres (52%) fueron diagnosticados en el estadio III. Cabe destacar que no fueron incluidos en este estudio pacientes en estadio I y IV, como se mencionó anteriormente, este grupo de pacientes formará parte de un estudio prospectivo a futuro, para evaluar la respuesta en términos de sobrevida sin progresión de la enfermedad y toxicidad farmacológica [42].

La tabla 2 describe las frecuencias genotípicas y alélicas para los loci *ABO*, *Rh* y *TSER* en los pacientes con CCR del HSJD. Al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas para los loci *TSER*, *ABO*, *Rh* y el componente amerindio entre dos poblaciones hospitalarias (HSJ: Hospital San José y CLC: Clínica Las Condes) versus nuestros pacientes con CCR del HSJD (Hospital San Juan de Dios-Santiago de Chile), se puede destacar que la población de pacientes con CCR, presentan un componente amerindio similar al observado en los pacientes del HSJ y diferente a los de la CLC. La población en estudio muestra un componente indígena levemente menor a la del HSJ, situación que es homologable a las frecuencias encontradas para el locus *TSER*; la frecuencia mayor del alelo *TSER\*3* se encuentra en la CLC y la menor en el HSJ. Las frecuencias genotípicas obtenidas en tejido normal para el locus *TSER* se encuentran en equilibrio genético de Hardy Weinberg, y corresponden a las descritas para población chilena de estrato socioeconómico bajo [36,48]. No hay asociación entre los genotipos *TSER* y CCR en los pacientes estudiados ( $p > 0,05$ )

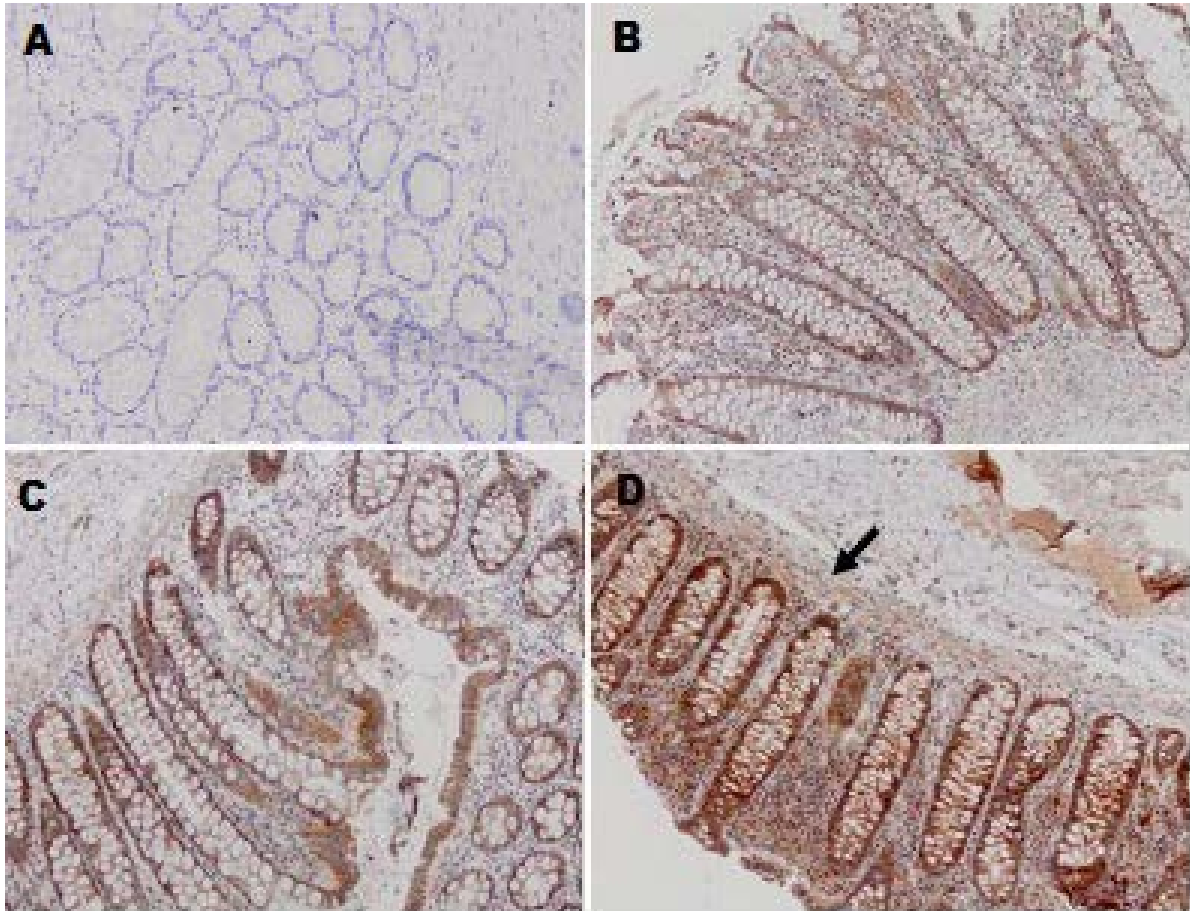
**TABLA 2**

Descripción de las frecuencias genotípicas y alélicas para loci *TSER*, *ABO*, *Rh* y componente amerindio de población en estudio, y comparación de estas variables, con otras dos poblaciones en Santiago de Chile

<i>TSER</i>	<i>HSJ</i>		<i>HSJD</i>		<i>CLC</i>	
	N°	Frec. ± IC (95%)	N°	Frec. ± IC (95%)	N°	Frec. ± IC (95%)
<i>TSER</i> *2/2	40	22.47 ± 6.13	12	22.64 ± 10.41	38	22.00 ± 5.69
<i>TSER</i> *2/3	86	48.31 ± 7.34	27	50.94 ± 13.45	88	46.32 ± 7.09
<i>TSER</i> *3/3	52	29.21 ± 6.68	14	26.42 ± 11.80	64	33.68 ± 6.72
Total	178		53		190	
<b>Alélos</b>						
<i>TSER</i> *3		53.37 ± 5.18		52.83 ± 9.51		56.84 ± 4.98
<b>ABO</b>						
Fenotipo						
AB	2	1.40 ± 1.93	0	0	2	1.31 ± 1.80
A	50	34.97 ± 7.82	20	37.73 ± 13.06	68	44.44 ± 7.87
B	11	7.69 ± 4.37	5	9.44 ± 12.72	14	9.15 ± 4.57
O	80	55.94 ± 8.14	28	52.83 ± 13.43	69	45.10 ± 7.88
Total	143		53		153	
<b>Alélos</b>						
<i>ABO</i> *A		20.26 ± 4.66		21.71 ± 7.88		26.49 ± 4.94
<i>ABO</i> *B		4.66 ± 2.44		4.96 ± 4.14		5.40 ± 2.53
<i>ABO</i> *O		75.08 ± 5.01		73.32 ± 8.45		68.10 ± 5.22
<b>Rh</b>						
Fenotipo						
DD+Dd	130	94.89 ± 3.69	50	94.4 ± 6.39	137	90.73 ± 4.63
dd	7	5.11 ± 3.69	3	5.6 ± 6.39	14	9.27 ± 4.63
Total	137		53		151	
<b>Alélo</b>						
<i>RHD</i> *d		22.60 ± 4.95		23.97 ± 8.13		30.45 ± 5.19
<b>Componente Amerindio</b>						
		34.51%		32.25 %		15.87 %

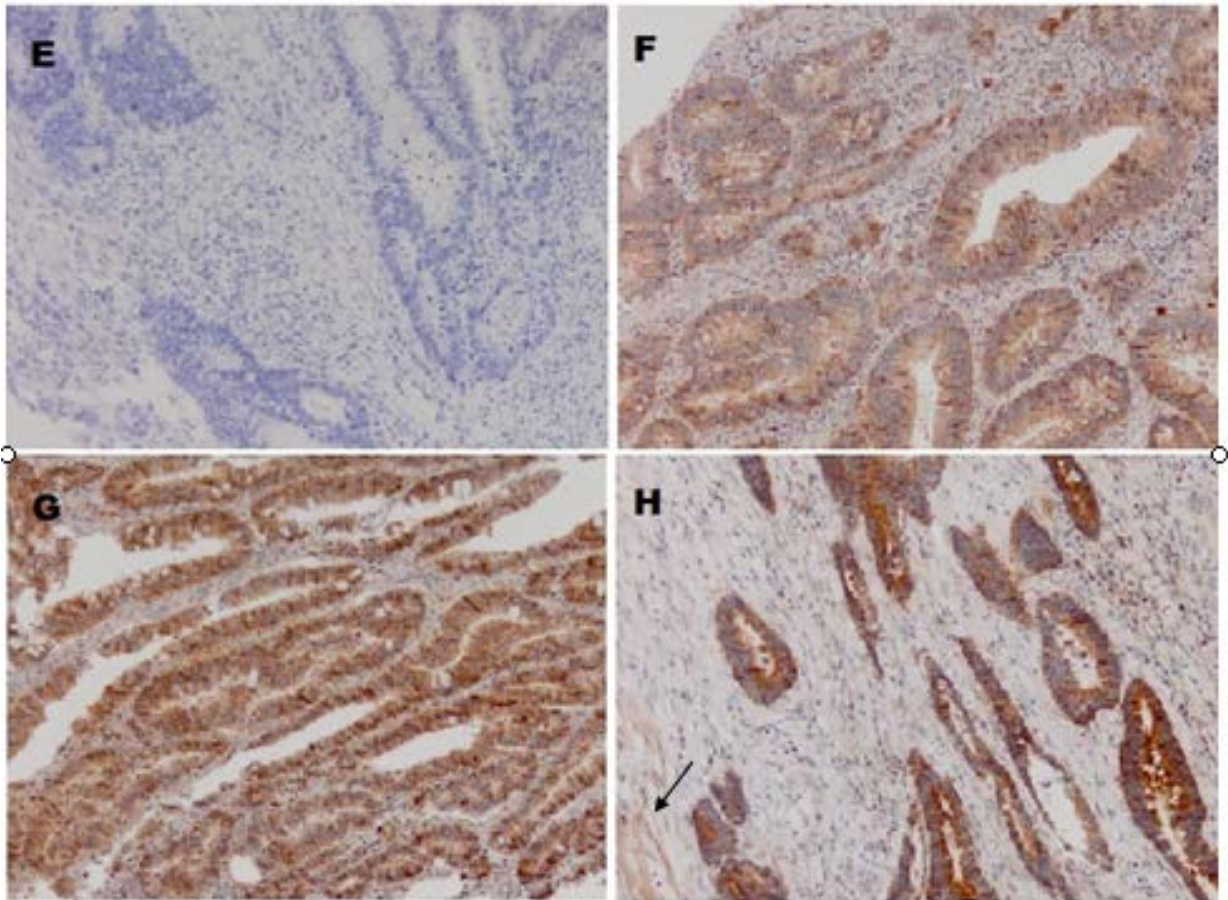
La figura 1 muestra imágenes obtenidas por microscopía convencional de 4 pacientes, donde: (A) corresponde al control negativo de reactividad y (B), (C) y (D) a tejido colónico normal, evaluados inmunohistoquímicamente para TS. La imagen B corresponde a un paciente que presentó inmunotinción de intensidad leve [24 casos (45%): 11 hombres (20%) y 13 mujeres (25%)], (C) a un paciente que muestra inmunotinción de intensidad moderada [23 casos (43%): 15 hombres (28%) y 8 mujeres (15%)] y (D) a un paciente que presenta inmunotinción de intensidad fuerte [6 casos (12%): 4 hombres (8%) y 2 mujeres (4%)]. El patrón de marcación celular fue de tipo granular citoplasmático, encontrándose en el tejido normal una marcación homogénea, localizada predominantemente en la membrana basal del epitelio colónico y en fibras musculares.

En la figura 2 se observa imágenes obtenidas de la evaluación inmunohistoquímica en tejido tumoral de distintos pacientes, en las que también se representan los niveles de intensidad inmunohistoquímica para TS. La imagen (E) corresponde al control negativo de reactivo. La imagen (F) corresponde a una inmunotinción de intensidad leve, encontrada en un paciente de sexo femenino (2%), la imagen (G) muestra una inmunotinción de intensidad moderada [30 casos (56%): 17 hombres (32%) y 13 mujeres (24%)], y la imagen (H) representa una inmunotinción de intensidad fuerte [22 casos (42%): 13 hombres (25%) y 9 mujeres (17%)], en esta última imagen, se puede observar la infiltración del adenocarcinoma hacia la capa muscular (la flecha señala fibras musculares), propia del epitelio colónico.



**Figura 1:** Presencia de proteína TS, visualizada por inmunotinción en células del epitelio colónico normal  
**A:** control negativo, **B:** leve, **C:** moderado, **D:** fuerte. La flecha indica reacción positiva en fibras de músculo liso (20x).





**Figura 2:** Presencia de proteína TS en adenocarcinoma tubular de colon, donde se aprecia los distintos niveles de intensidad de inmunotinción en distintas estructuras tisulares. **E:** control negativo, **F:** leve, **G:** moderado, **H:** fuerte. La flecha indica la reacción positiva en fibras de músculo liso (20x)

En el tejido tumoral la distribución de la tinción fue mixta, predominando en el citoplasma celular (90%), aunque también se encontró tinción nuclear en un 10% de las células tumorales.

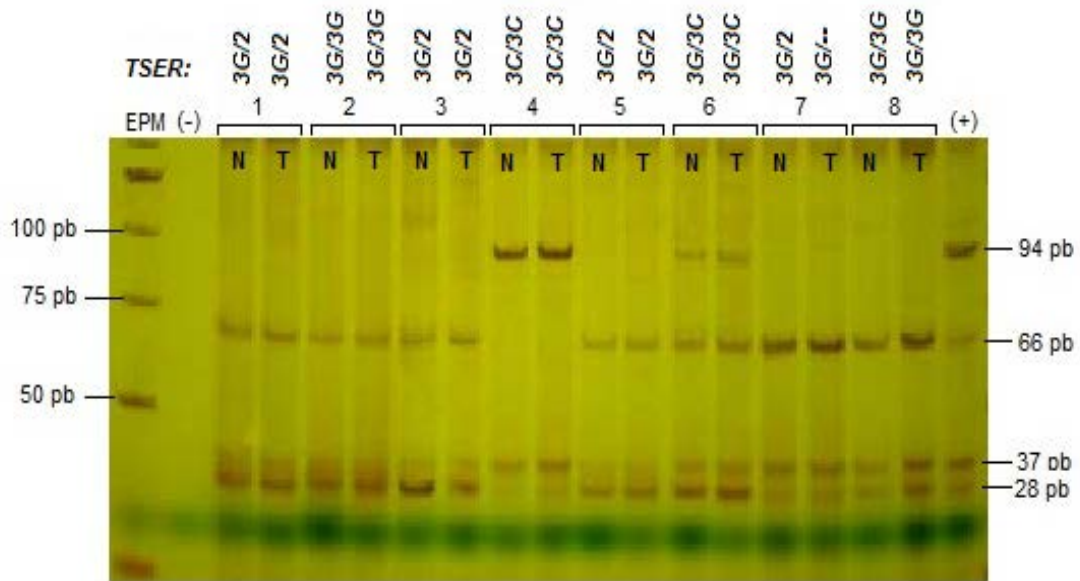
La figura 3 muestra los perfiles electroforéticos (PE) obtenidos de la amplificación de la región del locus *TSER* que contiene las repeticiones dobles o triples en tándem de 28pb, tanto en tejido normal (**N**), como tumoral (**T**) en 9 pacientes. Los pacientes 1 y 5 representan el PE esperado para el genotipo *TSER*\*3/\*2, los pacientes 2, 4, 6 y 9 mostraron el PE para el genotipo *TSER*\*3/\*3, y en el paciente 7 se visualizó el PE esperado para el genotipo *TSER*\*2/\*2, coincidiendo los PE tanto en tejido normal como tumoral. Sin embargo, al realizar la misma comparación en los pacientes 3 y 8 se observó que los PE no coinciden. Estos pacientes en tejido normal son genotípicamente heterocigotos *TSER*\*3/\*2, en cambio en el tumoral, el paciente 3 sólo presentó la banda de 144 pb (*TSER*\*3/--), mientras que en el paciente 8 sólo se detectó la banda de 116 pb (*TSER*\*2/--). La pérdida de heterocigocidad en tejido tumoral se evidenció en 8 casos (29,6%) de un total de 27 pacientes tipificados en tejido normal como *TSER*\*3/\*2. De éstos pacientes analizados se observó pérdida de la banda de 116 pb en 5 casos (9,4%, ej: paciente 3), y en otros 3 casos (5,7%) se encontró pérdida de la banda de 144 pb (ej: paciente 8). Las frecuencias para los genotipos homocigotos fueron iguales tanto en tejido normal como tumoral, identificándose en 12 pacientes el genotipo *TSER*\*2/\*2 (22,64%), y en 14 pacientes el genotipo *TSER*\*3/\*3 (26,42%).



**Figura 3:** Visualización por electroforesis en gel de agarosa (3%) de los productos de PCR de 9 pacientes genotificados para VNTR de 28pb presente en locus *TSER*. Control negativo (-), control positivo (+), estándar de peso molecular (EPM), tejido normal (N) y tejido tumoral (T). El alelo *TSER*\*2 presenta una banda de 116pb, mientras que el alelo *TSER*\*3 de 144pb.

La figura 4 corresponde al análisis realizado mediante técnica RFLP con enzima de restricción *Hae III*, para la identificación del SNP (G>C) localizado en el 12º nucleótido de la segunda repetición del alelo *TSER*\*3, que genera los alelos *TSER*\*3G y *TSER*\*3C. Este análisis fue complementario a la genotipificación del VNTR del locus *TSER*, y se llevó a cabo en pacientes de genotipo *TSER*\*3/\*3 y *TSER*\*3/\*2, y en donde la electroforesis vertical post-digestión enzimática permitió homologar las bandas de 66, 37 y 28 pb al alelo \*G y las de 94 y 37 pb al alelo \*C. Como se puede observar en la figura los pacientes 1, 3, 5 y 7 presentan el alelo \*G (PE: 66, 37 y 28 pb), éstos previamente habían sido genotificados como *TSER*\*3/\*2, por lo tanto el genotipo combinado fue para cada uno de ellos *TSER*\*3G/\*2, por lo tanto el genotipo combinado fue para cada uno de ellos *TSER*\*3G/\*2. El paciente 4, de acuerdo a la técnica que permite visualizar el VNTR, es homocigoto para las tres repeticiones y por RFLP también es homocigoto \*C/\*C (PE: 94 y 37 pb), por lo tanto su genotipo considerando ambas variantes es *TSER*\*3C/3C. El paciente 6 presenta un genotipo homocigoto *TSER*\*3/3 para el

locus *TSER* y un genotipo heterocigoto \*G/\*C para el SNP. Por lo tanto cuando se consideran ambos polimorfismos, este paciente presenta un genotipo heterocigoto *TSER\*3G/3C*. No se puede evaluar en los PE la pérdida o no de alelos cuando los individuos presentan genotipos homocigotos, ya sea para el VNTR y/o SNP.



**Figura 4:** Visualización porelectroforesis en gel de acrilamida:bisacrilamida 19:1 al 8% p/v, de los productos de digestión con enzima de restricción *Hae III*, para identificar SNP (G>C) localizado en el 12<sup>o</sup> nucleótido de la segunda repetición del alelo *TSER\*3*. Control negativo (-), control positivo (+), estándar de peso molecular (EPM), tejido normal (N) y tejido tumoral (T). El alelo *TSER\*3G* presenta bandas de 66, 37 y 28pb, mientras que el alelo *TSER\*3C* presenta bandas de 94 y 37pb.

**TABLA 3**  
**Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas considerando las variantes de número (VNTR) y del SNP (G>C) del locus TSER como una entidad, en tejido normal y tumoral, según sexo, HSJD - Santiago Chile**

Genotipo TSER	TEJIDO NORMAL				TEJIDO TUMORAL			
	Masculino N	Femenino N	%	Total N	Masculino N	Femenino N	%	Total N
TSER*2/*2	4	8	15,1	12	4	8	15,1	12
TSER*2/*3C	4	4	7,5	8	2	4	7,5	6
TSER*2/*3G	13	6	11,3	19	10	3	5,7	13
TSER*3C/*3C	2		3,8	2	2		3,8	2
TSER*3G/*3C	4	4	7,5	8	4	4	7,6	8
TSER*3G/*3G	3	1	1,9	4	3	1	1,9	4
TSER*2/--					2	1	1,9	3
TSER*3C/--					1		1,9	1
TSER*3G/--					2	2	3,8	4
Total	30	23	43,4	53	30	23	43,4	53
Alelo								
TSER*2	25	26	0,24	51	22	24	0,22	46
TSER*3C	12	8	0,08	20	11	8	0,08	19
TSER*3G	23	12	0,11	35	22	11	0,10	33
TSER*--					5	3	0,03	8
Total	60	46	0,43	106	60	46	0,43	106

La tabla 3 describe la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas considerando ambas variantes de número (VNTR) y de SNP (G>C) como una entidad, en tejido normal/tumoral, según sexo. De ésta se puede destacar la pérdida de heterocigocidad en 8 individuos con genotipo heterocigoto para las repeticiones dobles y triples de 28 pb (15,11%), correspondiendo 6 casos (11,4%) al genotipo  $TSER^*2/^*3G$  [3 hombres (5,7%) y 3 mujeres (5,7%)] y 2 hombres al genotipo  $TSER^*2/^*3C$  (3,8%). De los 6 individuos con genotipo  $TSER^*2/^*3G$  se obtuvieron en 4 casos el genotipo  $TSER^*3G/--$  (7,6%) [2 pacientes de cada sexo (3,8%)] y en 2 casos el genotipo  $TSER^*2/--$  (3,8%) [1 paciente de cada sexo (1,9%)]. En los 2 individuos con genotipo  $TSER^*2/^*3C$  se obtuvo en un caso el genotipo  $TSER^*3C/--$  (1,9%) y en otro  $TSER^*2/--$  (1,9%), ambos de sexo masculino. Esto produjo la aparición de un nuevo "alelo" ( $TSER^*--$ ) en el tejido tumoral, cambiando las frecuencias genotípicas ( $TSER^*2/-- = 5,7%$  y  $TSER^*3/-- = 9,5%$ ) y alélicas ( $TSER^*-- = 0,08%$ ) en este tejido. El alelo que se pierde con mayor frecuencia es el alelo  $TSER^*2$  (5%) versus el  $TSER^*3$  (\*3G un 2% y \*3C un 1%). Es importante destacar, que los 8 individuos  $TSER^*3G/^*3C$  no presentaron pérdidas de alelos en el tejido tumoral. Por lo tanto en ambos tejidos la frecuencias genotípicas coinciden (15,1%).

La tabla 4 muestra los promedios ( $\bar{X}$ ) y las desviaciones estándar (DS) del *score de inmunoreactividad (SIR)* para TS en tejido normal (TN) y tumoral (TT), de acuerdo al sexo y a los genotipos del locus  $TSER$ . Cuando se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (KW), los rangos promedios del *SIR* según genotipo fueron estadísticamente distintos para las siguientes comparaciones: a) tejido normal:  $TSER^*2/^*2$  vs  $TSER^*2/^*3$  vs  $TSER^*3/^*3$ ; KW: 13,965  $P_{VTN} = 0,0009$ . El test

Dunn's de comparaciones múltiples arrojó diferencias significativas para los rangos promedios de *SIR* entre los individuos *TSER\*2/\*2* y *TSER\*3/3* ( $P < 0.001$ ), como también para los *TSER\*2/\*3* y *TSER\*3/\*3* ( $P < 0.05$ ). b) Tejido tumoral: *TSER\*2/--* vs *TSER\*2/\*2* vs *TSER\*2/\*3* vs *TSER\*3R/\*3R* vs *TSER\*3R/--*;  $KW=19,747P_{vTT} = 0,0006$ . El test Dunn's arrojó diferencias significativas entre los individuos *TSER\*2/\*2* y *TSER\*3G/\*3C* ( $P < 0.01$ ), como también para los *TSER\*3G/--* y *TSER\*3G/\*3C* ( $P < 0.001$ ). c) Tejido normal: *TSER\*2/\*2* vs *TSER\*2/\*3C* vs *TSER\*2/\*3G* vs *TSER\*3C/\*3C* vs *TSER\*3G/\*3C* vs *TSER\*3G/\*3G*;  $KW= 14,116P_{vTN} = 0,0149$ . El test de Dunn's arrojó diferencia significativa entre *TSER\*2/\*2* vs *TSER\*3G/\*3C*  $p < 0,05$  y d) tejido tumoral: *TSER\*2R/--* vs *TSER\*2/\*2* vs *TSER\*3C/--* vs *TSER\*2/\*3C* vs *TSER\*2G/--* vs *TSER\*2/\*3G* vs *TSER\*3C/\*3C* vs *TSER\*3G/\*3C* vs *TSER\*3G/\*3G*.  $KW=21,414 P_{vTT} = 0,0061$ , no se encuentran diferencias significativas por test de Dunn's.

Los resultados de esta tabla fueron llevados a las gráficas N°1 y N°2, separando los genotipos del locus *TSER* según el VNTR y VNTR+SNP, las cuales permiten visualizar la existencia de un gradiente de expresión de TS tanto en TN y TT.

**TABLA 4**

Promedio ( $\bar{X}$ ) y desviación estándar (DS) del score de Inmunoreactividad para TS, según sexo, en tejido normal y tumoral, de acuerdo al genotipo del VNTR y del SNP del locus TSER

Genotipos VNTR	TEJIDO NORMAL						TEJIDO TUMORAL					
	Femenino		Masculino		Total		Femenino		Masculino		Total	
	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$
TSER*2/*2 *	8	3,6 ± 1,1	4	3,2 ± 0,9	12	3,5 ± 1,0	8	8,3 ± 1,6	4	7,7 ± 1,2	12	8,2 ± 1,5
TSER*2/*3 **	10	3,7 ± 1,0	17	4,5 ± 1,3	27	4,2 ± 1,3	7	7,4 ± 1,8	12	8,2 ± 0,9	19	7,9 ± 1,3
TSER*3/*3 * / **	5	6,0 ± 1,4	9	5,2 ± 1,0	14	5,2 ± 1,2	5	10,4 ± 1,5	9	10,2 ± 1,3	14	10,1 ± 1,3
TSER*2/--							1	8,0	2	8,5 ± 0,7	3	8,3 ± 0,5
TSER*3/--							2	10,0 ± 2,8	3	9,3 ± 2,3	5	9,6 ± 2,1
<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	<b>4,1 ± 1,7</b>	<b>30</b>	<b>4,5 ± 1,3</b>	<b>53</b>	<b>4,3 ± 1,4</b>	<b>23</b>	<b>8,6 ± 1,9</b>	<b>30</b>	<b>8,9 ± 1,5</b>	<b>53</b>	<b>8,7 ± 1,7</b>

Genotipos VNTR/ SNP (G>C)	TEJIDO NORMAL						TEJIDO TUMORAL					
	Femenino		Masculino		Total		Femenino		Masculino		Total	
	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$	N	$\bar{X} \pm DS$
TSER*2/*2	8	3,6 ± 1,1	4	3,2 ± 0,9	12	3,5 ± 1,0	8	8,3 ± 1,6	4	7,7 ± 1,2	12	8,2 ± 1,5
TSER*2/*3C	4	3,7 ± 0,5	4	4,5 ± 1,0	8	4,1 ± 0,8	4	7,6 ± 1,5	2	8,0	6	7,8 ± 0,9
TSER*2/*3G	6	3,6 ± 1,3	13	4,5 ± 1,5	19	4,3 ± 1,4	3	7,2 ± 2,2	10	8,3 ± 1,0	13	8,0 ± 1,5
TSER*3C/*3C	0		2	5,0 ± 1,4	2	5,0 ± 1,4	0		2	9,0	2	9,0
TSER*3G/*3C	4	6,0 ± 1,6	4	5,0 ± 1,1	8	5,5 ± 1,4	4	10,7 ± 1,5	4	10,0 ± 1,4	8	10,4 ± 1,4
TSER*3G/*3G	1	6,0 ± 0,0	3	5,3 ± 1,1	4	5,0 ± 1,5	1	9,0	3	11,3 ± 1,1	4	10,8 ± 1,5
TSER*2/--							1	8,0	2	8,5 ± 0,7	3	8,3 ± 0,5
TSER*3C/--							0		1	8,0	1	8,0
TSER*3G/--							2	10,0 ± 2,8	2	10,0 ± 2,8	4	10,0 ± 2,3
<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	<b>4,1 ± 1,7</b>	<b>30</b>	<b>4,5 ± 1,3</b>	<b>53</b>	<b>4,3 ± 1,4</b>	<b>23</b>	<b>8,6 ± 1,9</b>	<b>30</b>	<b>8,9 ± 1,5</b>	<b>53</b>	<b>8,7 ± 1,7</b>

\* \*\* p<0,05.

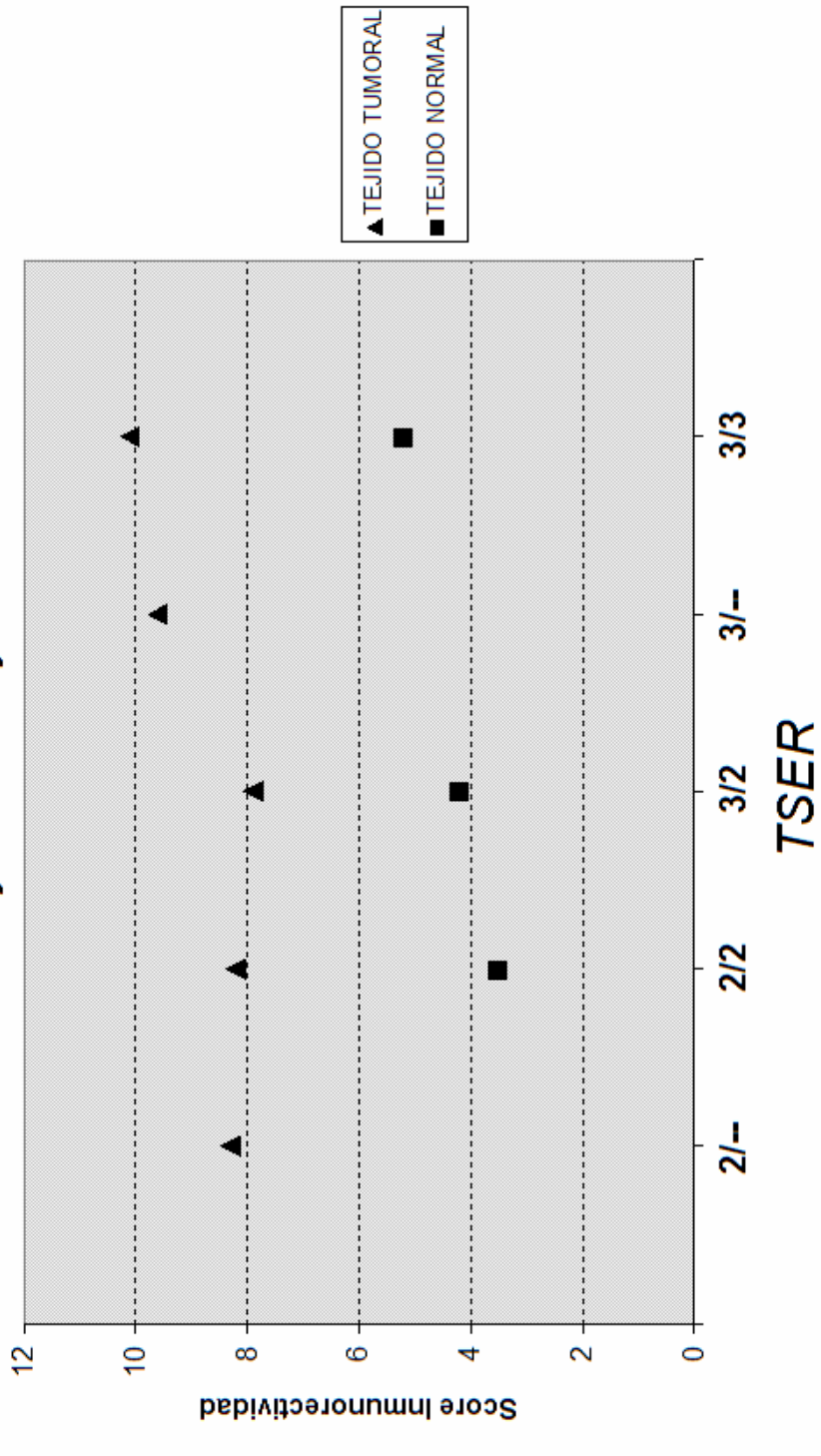


En la gráfica N°1 se muestra la relación entre los promedios del *SIR* obtenidos para cada genotipo del locus *TSER* según VNTR, en tejido normal (TN) y tumoral (TT). Los genotipos fueron dispuestos en orden creciente de expresión de TS, de acuerdo a lo reportado en la literatura [37,38,45]. En este gráfico se puede distinguir un incremento del *SIR* en TN, que mantiene relación directa con el número de repeticiones en tándem de 28 pb, en donde el genotipo homocigoto para las repeticiones triples, evidenció mayores niveles de expresión de TS ( $\bar{X}$ : *SIR*=5,2), en comparación con los genotipos heterocigoto ( $\bar{X}$ : *SIR*=4,2) y homocigoto para las repeticiones dobles ( $\bar{X}$ : *SIR*=3,5). En tanto los promedios del *SIR* en el TT, si bien no exhibieron un incremento marcado entre las distintas categorías, el genotipo homocigoto para las repeticiones triples fue el que presentó el mayor promedio de *SIR*, *TSER*\*3/\*3 ( $\bar{X}$ : *SIR*=10,1), en concordancia con lo hallado en TN. Asimismo, se puede destacar que el genotipo *TSER*\*3/-- ( $\bar{X}$ : *SIR*=9,6), evidenció niveles de expresión de TS similares al genotipo *TSER*\*3/\*3, lo que haría suponer que la pérdida de heterocigocidad produciría alteraciones en los niveles de expresión de TS. Por otra parte, contrariamente a lo esperado, el promedio del *SIR* para el genotipo heterocigoto *TSER*\*3/\*2 ( $\bar{X}$ : *SIR*=7,9), fue menor que el estimado para el genotipo homocigoto para las repeticiones dobles *TSER*\*2/\*2 ( $\bar{X}$ : *SIR*=8,2).

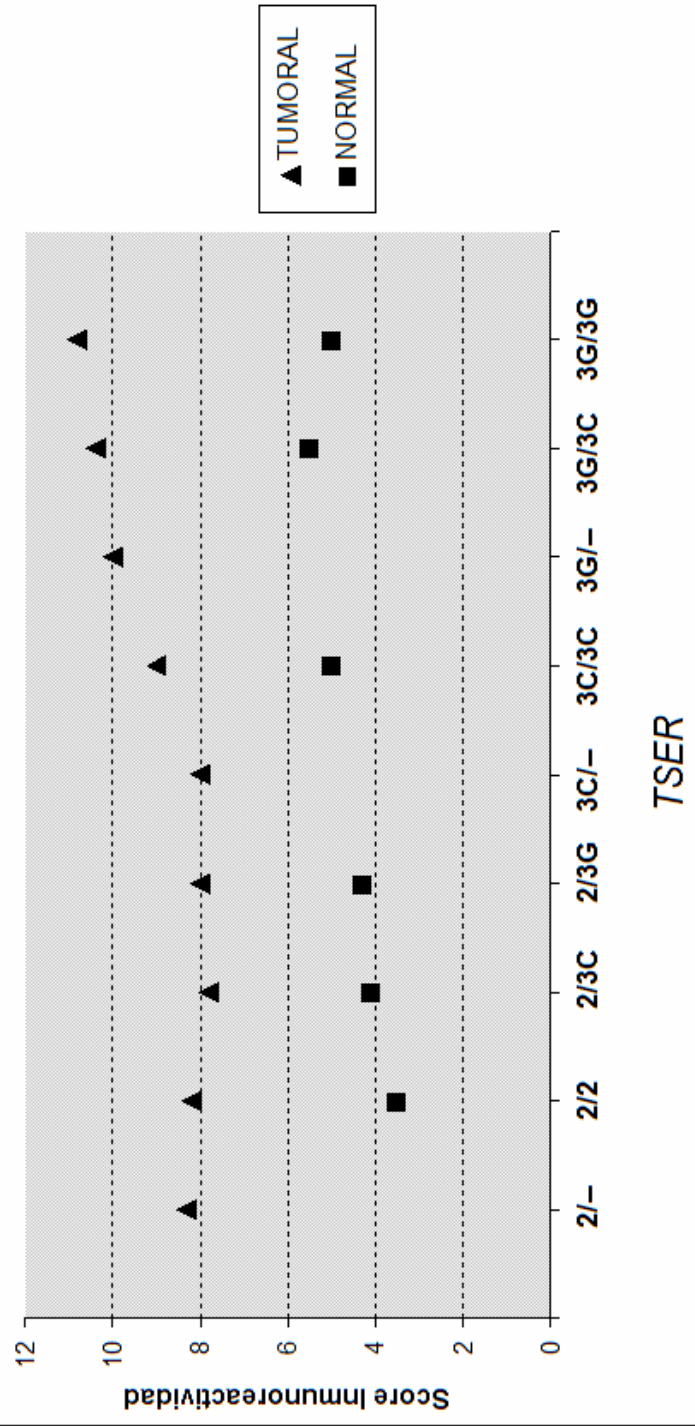
En la gráfica N°2, se muestra la relación entre los promedios del *SIR* y los genotipos del locus *TSER* según VNTR y SNP, en tejido normal (TN) y tumoral (TT), que permite visualizar el valor promedio del *SIR* para cada categoría, y en donde se puede evidenciar una mayor expresión diferencial a favor de los genotipos que

contienen el alelo *TSER\*3G*, por sobre los alelos *TSER\*3C*, y *TSER\*2*, siendo en TT: *TSER\*3G/\*3G* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 10,8), *TSER\*3G/\*3C* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 10,4), *TSER\*3G/--* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 8,0), *TSER\*3C/\*3C* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 9,0), *TSER\*3C/--* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 8,0), *TSER\*2/\*3G* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 8,0), *TSER\*2/\*3C* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 7,8), *TSER\*2/\*2* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 8,2) y *TSER\*2/--* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 8,3); mientras que en el TN: *TSER\*3G/\*3G* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 5,0), *TSER\*3G/\*3C* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 5,5), *TSER\*3C/\*3C* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 5,0), *TSER\*2/\*3G* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 4,3), *TSER\*2/\*3C* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 4,1) y *TSER\*2/\*2* ( $\bar{X}$ : *SIR* = 3,5). En esta gradiente diferencial se puede distinguir que complementariamente al número de repeticiones en tándem de 28 pb (VNTR), la sustitución G>C (SNP), influiría en los niveles de expresión de TS, ya que al comparar los promedios del *SIR* entre las variantes genotípicas producidas por los alelos *TSER\*G* y/o *TSER\*C*, se encontraron valores de *SIR* levemente inferiores en los genotipos que presentaban la sustitución G>C, siendo más evidente esta relación en TT. En general, esta relación también se mantiene en TN, con la excepción, de que al considerar el mayor valor promedio de *SIR* entre las distintas categorías, este recayó en el genotipo *TSER\*3G/\*3C* ( $\bar{X}$ : *SIR* > 5,5), y no en el genotipo *TSER\*3G/\*3G* ( $\bar{X}$ : *SIR* > 5), como se esperaba, sin embargo esta diferencia puede deberse a que no existe una paridad en el número de individuos por categoría.

**Gráfico 1:**  
**Score promedio de inmunoreactividad TS versus genotipo**  
**TSER en tejido normal y tumoral**



**Gráfico 2:**  
**Score promedio de Inmunoreactividad TS versus genotipos TSER**  
**en tejido normal y tumoral**



# **VI.- DISCUSSION**

---

La distribución de las variables clínicas (edad, género) y morfológicas (localización y estadio tumoral) en nuestro grupo de estudio (ver tabla 1), constituido por 53 pacientes (30 hombres y 23 mujeres) diagnosticados con cáncer de colon o recto sigmoideo en estadio II o III de la enfermedad, coincidieron con las reportadas por Tapia y colaboradores (2010) [50]. Al igual que estos autores, encontramos que la localización más frecuente es en el colon sigmoideo (CS) del segmento izquierdo del intestino grueso. En tanto, la segunda localización fue el colon derecho (CD), seguida por la del recto sigmoideo (RS) y luego el colón transversal (CT). En cuanto a la edad de diagnóstico de la enfermedad también encontramos resultados similares con el trabajo mencionado, en donde la edad media de la cohorte estudiada fue de 66 años (25 a 99 años), mientras que en nuestra población fue de 65 años [(35 a 85 años) datos no mostrados]. Los antecedentes epidemiológicos reportados por diversos estudios señalan que el carcinoma de colon es más frecuente en hombres que en mujeres, en una relación aproximada de 1,5:1. La relación según sexo en nuestro estudio fue de 1,3:1 similar a las reportadas por los distintos estudios [51, 52, 53].

Antes de ahondar en nuestros resultados queremos exponer brevemente las particularidades de la técnica inmunohistoquímica (IHQ). La IHQ es un ensayo sencillo y versátil, que permite evidenciar a través de anticuerpos específicos una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos, hecho que la convierte en una buena alternativa para medir en tejido fijado expresión proteica intratumoral. No obstante de estas ventajas, hay causas que pueden llevar a resultados espurios. Por lo tanto, se deben considerar para una correcta estandarización del ensayo IHQ, los

siguientes factores. 1) El factor pre-analítico (intrínseco), que se refiere a las características del tejido y su preservación antigénica y 2) el factor analítico (extrínseco), son los elementos externos al tejido que pueden controlarse en el laboratorio e incluyen: la naturaleza y concentración del anticuerpo utilizado, su sensibilidad y especificidad, el sistema de detección, el método de recuperación antigénica empleado y la interpretación de la marcación por el patólogo. En la actualidad los laboratorios de histopatología siguen protocolos sumamente exigentes para lograr una adecuada estandarización y reproductibilidad del ensayo.

En nuestro trabajo fuimos extremadamente rigurosos en la implementación y estandarización de la técnica de IHQ. Así por ejemplo:

- a. Se utilizó anticuerpo primario monoclonal IgG1 específico contra TS recombinante de origen humano, probando distintas diluciones del anticuerpo dentro del rango sugerido por el fabricante, hasta obtener una concentración óptima.
- b. Se utilizaron controles positivos y negativos de reacción, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- c. Se siguieron distintos protocolos de recuperación antigénica en base a métodos físicos que utilizan calor (microondas y vapor), variando los tiempos de incubación, y empleando distintas soluciones recuperadoras de antigenidad (Buffer Citrato y EDTA), hasta poner a punto este paso tan importante.

d. La valoración de los parámetros inmunohistoquímicos (intensidad y extensión de la inmunotinción) estuvieron a cargo de dos médicos patólogos calificados, quienes evaluaron las muestras por separado y a ciegas (ver anexo 1).

Con respecto a la etiología del cáncer, en más de un estudio se ha demostrado que la disminución de los niveles plasmáticos de folato, un importante micronutriente que está envuelto en la síntesis de DNA, está asociada a un mayor riesgo de carcinogénesis [54,55,56,57]. La vía metabólica del folato es compleja, participan al menos 30 enzimas diferentes, entre ellas está la Timidilato Sintasa, la cual, como ya se mencionó en la introducción, es una enzima clave en el proceso de síntesis de dTMP. También se sabe que los sitios polimórficos colindantes del gen TS influyen en la expresión de la proteína TS, lo que repercute en el metabolismo del folato [58,59]. Esto ha llevado a la realización de muchos estudios epidemiológicos de asociación, entre estos sitios polimórficos y riesgo a cáncer en humanos. Los resultados han sido divergentes [60,61,62], por este motivo se ha indagado en esta tesis, si las variantes examinadas (tabla 1) se asociaban a un mayor o menor riesgo de desarrollar un CCR, considerando como población control la del Hospital San José (HSJ) del trabajo realizado por Acuña y colaboradores (2006) [38]. En nuestra tesis, a diferencia de otros trabajos [60,61,62], no se encontraron disimilitudes entre población control y casos. Entonces, de acuerdo a estos resultados, el abordaje de esta discusión solo tiene relevancia en término farmacogenético.



El presente trabajo demuestra que el score de inmunoreactividad (SIR) depende del genotipo de los individuos, tanto en tejido normal como tumoral. Pacientes con el genotipo *TSER\*3R/\*3R* muestran, como se menciona detalladamente en los resultados, un SIR promedio significativamente mayor cuando se compara con los pacientes *TSER\*2R/\*2R* y *TSER\*2R/\*3R*. No obstante, cuando se compara *TSER\*2R/\*2R* y *TSER\*2R/\*3R* no se encuentran diferencias. Cuando se considera el SNP G>C del alelo *TSER\*3R*, aún se mantiene las diferencias significativas entre los promedios de los SIR y genotipos. En tejido normal la disimilitud que pesa más es la diferencia entre los promedios de los genotipos *TSER\*2R/\*2R* vs *TSER\*3G/\*3C*. No obstante, que el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis es estadísticamente significativo en todos los cotejos, las comparaciones múltiples (test de Dunn's) van perdiendo significancia a medida que se aumentan las categorías o clases a comparar, debiéndose posiblemente a la disminución del número de individuos por clase. Por lo tanto para confirmar esta inferencia, es decir, cuales son los genotipos combinados (VNTR + SNP) que aportarían más a las diferencias, necesariamente debiéramos aumentar el número de pacientes. Sin embargo, las diferencias entre los rangos promedios son tan significativas, que podemos afirmar que nuestro resultados, con una alta probabilidad, son extrapolables a los encontrados en distintos estudios clínicos, los cuales han demostrado que los pacientes *TSER\*3R/\*3R* obtienen menos beneficios con el fármaco 5-FU comparados con los que poseen al menos un alelo *TSER\*2R*.

Al agrupar a los genotipos de acuerdo a la clasificación planteada por Kawakami y Watanabe [45], de mayor *TSER\*3G/TSER\*3G* > *TSER\*3G/TSER\*3C* >

$TSER^*3G/TSER^*2$ ) a menor expresión de TS ( $TSER^*3C/TSER^*3C > TSER^*3C/TSER^*2 > TSER^*2/TSER^*2$ ), encontramos que los genotipos de mayor expresión representan el 58,4% (31/53, ver Tabla 3), porcentaje que difiere a lo descrito para grupos étnicos Caucásicos e Hispánicos, con 40% y 49% respectivamente [28]. En cambio es similar a la población Mongoloide donde los genotipos de mayor expresión representan un porcentaje mayor al 60% [63,64,65]. Por lo tanto, considerando estos resultados obtenidos de la genotipificación del locus TSER, podemos colegir que en la población chilena existe una alta frecuencia de genotipos de alta expresión de TS.

En este trabajo encontramos que el 36% de los alelos  $TSER^*3$  presentan la sustitución C. La frecuencia de este SNP varía según el grupo étnico; Caucásicos presenta un 56%, Hispánicos 46%, Mongoloide 43% y Negroide 29% [28,65]. La presencia del alelo \*C toma importancia cuando hay pérdida de heterocigocidad (LOH, por sus siglas en inglés Loss of Heterozygosity), ya que se afecta el nivel predictivo de la expresión cuantitativa de la proteína en tejido tumoral, por ejemplo los individuos con genotipo  $TSER^*2/*3G$  cuando pierden el alelo  $TSER^*3G$  presentan, de acuerdo a nuestros resultados, menor cantidad de proteína en el tejido tumoral. En nuestro estudio no se encontró LOH para los individuos heterocigotos  $TSER^*3G/*3C$  (ver Tabla 4) pero sí para los individuos  $TSER^*2/*3G$ ,  $TSER^*2/*3C$ .

LOH es un fenómeno que se ha descrito muy frecuente en distintos tipos de cáncer en la literatura [66]. El gen TS se localiza en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 18, banda 18p11.32, y se sabe que es un sitio inestable

cromosómicamente, donde ocurren deleciones con una alta frecuencia, especialmente en pacientes con CCR [35]. La LOH en el locus TS fue descrita por Zinzindohoue y colaboradores (2001), y desde entonces LOH ha sido considerada en diferentes estudios [67]. En nuestro estudio encontramos 27 pacientes heterocigotos ( $TSER^*2/^*3$ ), hallamos disparidad entre los perfiles electroforéticos (PE) de tejido tumoral y sano en 8 pacientes (29,63%, ver tabla 3), detectándose la pérdida o bien del alelo  $TSER^*2$  (18,51%) o el  $TSER^*3$  (11,12%). En la literatura el análisis de LOH en pacientes de distintas poblaciones con enfermedades asociadas a carcinogénesis y con CCR propiamente tal, varía desde un 15% hasta un 80%, en pacientes con genotipo  $TSER^*3/^*2$  [35,38,67,68,69,70]. La explicación a esta variación en los porcentajes de LOH, puede deberse en parte a la heterogeneidad en las metodologías empleadas. En nuestro caso, el porcentaje de LOH fue mayor al reportado por Kristensen y colaboradores (2010), quienes encontraron LOH en 15% de individuos con genotipo  $TSER^*3/^*2$  (7/44), empleando un método de extracción comercial similar al utilizado en el presente estudio [38]. Sin embargo, los porcentajes de LOH fueron significativamente más elevados en aquellos trabajos en donde emplearon técnicas de extracción y detección más sensibles como la microdissección láser o electroforesis capilar, respectivamente [35,68,69,70]. En nuestro estudio, empleamos la técnica de macrodissección por perforación para obtener tejido de biopsias incluidas en parafina, esta metodología permite obtener muestras seleccionadas de tejido tumoral, pero no asegura que éstas se encuentren libres de células estromales contaminantes, que de encontrarse en un número substancial en relación a las células tumorales, puede llevar a obtener resultados falsos negativos al examinar LOH [72,73].

Recapitulando, en la región promotora del gen de la proteína TS existen distintos sitios polimórficos: a) un VNTR de 28 pb, los alelos con 2 y 3 repeticiones son los más frecuentes en todas las poblaciones, b) un SNP (G>C) en el 12º nucleótido de la segunda repetición en el alelo *TSER\*3*, c) un SNP (C>G) en la última repetición de los alelos *TSER\*2* y *TSER\*3*, y d) un SNP (C>G) en el 12º nucleótido de la primera repetición del alelo *TSER\*2*.

El cambio G>C señalado en las letras b) y d), sustituye un residuo crítico en la secuencia de consenso del USF caja-E, eliminando el sitio de unión del factor de transcripción USF-1, mientras que la sustitución de C>G, señalada en la letra c), aboliría una caja-E. En consecuencia, estas diferencias estructurales determinan el número y la funcionalidad de los lugares de unión del factor de transcripción [28,44,73]. Por esta razón, es imperativo conocer las frecuencias de los distintos y posibles alelos (*TSER*: 2RGG, 2RGC, 2RCG, 2RCC, 3RCCC, 3RCCG, 3CGC, 3CGG, 3GCC, 3GCG, 3GGC y 3GGG) presentes en nuestra población. En el trabajo de Lincz y colaboradores en 59 pacientes con CCR encontraron las siguientes frecuencias alélicas *TSER\*2RGC* 44,1%, *TSER\*2RCC* 4,2%, *TSER\*3RGGC* 18,6% y *TSER\*3RGCC* 33,1% [74]. Por lo tanto, del punto de vista farmacogenético se debiera considerar todos los alelos generados por las distintas combinatorias de los SNPs.

En conclusión, nosotros hemos encontrado que la mayor expresión de la proteína se asocia fuertemente con la presencia de los genotipos que tienen al menos un alelo *TSER\*3G*. Por lo tanto la genotipificación en tejido normal y tumoral

de los polimorfismos ya descritos, podrían servir como potenciales predictores de la eficacia de los tratamientos con 5-FU en pacientes chilenos con diferentes tipos de cánceres.

La pérdida de heterocigocidad involucraría un cambio no sólo genotípico sino también fenotípico, que afectaría directamente la expresión de proteína TS, produciendo en algunos casos que un tumor adquiriera mayor resistencia al tratamiento con 5-FU.

Se requieren más estudios para clarificar el verdadero rol que estarían jugando estos polimorfismos en el tratamiento con 5FU en nuestra población.

# ANEXOS

---

## ANEXO 1

Valoración de parámetros de inmunoreactividad de proteína TS en tejido normal por dos médicos patólogos: intensidad (leve (L)=1, moderado (M)=2, fuerte(F)=3), y extensión (1-25%=1; 26-50%=2; 51-75%=3; 76-100%=4).

<b>TEJIDO TUMORAL</b>							
N°	PATOLOGO 1		PATOLOGO 2		SCORE (Sc) INMUNOREACTIVIDAD		
	intensidad	extensión	intensidad	extensión	sc. parcial intensidad	sc. parcial extensión	score total
1	L	50 - 60%	L	50%	1	2	2
2	L	70 - 75%	L	75%	1	3	3
3	M	50%	M	50%	2	2	4
4	L	75%	L	75%	1	3	3
5	L	75%	L	70%	1	3	3
6	M	40 -50%	M	40%	2	2	4
7	M	50%	M	50%	2	2	4
8	L	40%	L	50%	1	2	2
9	L	60%	L	75%	1	3	3
10	M	10%	L a M	20%	2	1	2
11	L	75%	L	60%	1	3	3
12	L	60%	L	70%	1	3	3
13	M	30%	M	50%	2	2	4
14	M	50%	M	50%	2	2	4
15	M	50%	M	40%	2	2	4
16	F	30 - 40%	F	50%	3	2	6
17	L	75%	L	60%	1	3	3
18	M	50%	M	50%	2	2	4
19	L	95%	L	90%	1	4	4
20	M	30%	M	25%	2	1	4
21	L	80%	L	95%	1	4	4
22	M	40%	M	50%	2	2	4
23	L	95%	L	99%	1	4	4
24	F	50%	F	50%	3	2	6
25	F	30 - 35%	F	50%	3	2	6
26	M	40%	M	50%	2	2	4
27	L	90%	L	95%	1	4	4
28	M	70%	M	75%	2	3	6
29	L	95%	L a M	95%	1	4	4
30	M	35 - 40%	M	50%	2	2	4
31	F	50%	F	40%	3	2	6
32	L	90%	L	95%	1	4	4
33	M	60%	M	75%	2	3	6
34	L	95%	L	95%	1	4	4
35	L	90%	L	95%	1	4	4
36	M	50 - 60%	M	75%	2	3	6
37	M	75%	L a M	75%	2	3	6
38	F	40%	F	50%	3	2	6
39	L	60%	L	75%	1	3	3
40	M	75%	M	60%	2	3	6
41	L	95%	L	95%	1	4	4
42	L	95%	L	95%	1	4	4
43	L	60%	L	50%	1	3	3
44	L	75%	L	75%	1	3	3
45	M	50 -60%	M	60%	2	3	6
46	L	90%	L	80%	1	4	4
47	M	75%	M	75%	2	3	6
48	M	50%	M	75%	2	3	6
49	F	40%	F	50%	3	2	6
50	M	95%	M	90%	2	4	8
51	L	90%	L	95%	1	4	4
52	M	80 -90%	M	95%	2	4	8
53	M	30%	M	50%	2	2	4

## ANEXO 2

Valoración de parametros de inmunoreactividad de proteína TS en tejido tumoral por dos médicos patólogos: intensidad (leve (L)=1, moderado (M)=2, fuerte(F)=3), y extensión (1-25%=1; 26-50%=2; 51-75%=3; 76-100%=4).

TEJIDO TUMORAL							
PATOLOGO 1			PATOLOGO 2		SCORE (Sc) INMUNOREACTIVIDAD		
N°	intensidad	extensión	intensidad	extensión	sc. parcial intensidad	sc. parcial extensión	score total
1	L	95%	L	90%	1	4	4
2	M	95%	M	80%	2	4	8
3	F	75%	M a F	75%	3	3	9
4	M	95%	M	90%	2	4	8
5	M	90%	M	90%	2	4	8
6	M	90%	M a F	90%	2	4	8
7	F	75%	F	70%	3	3	9
8	M	90%	M	80%	2	4	8
9	F	75%	F	75%	3	3	9
10	M	50-60%	F	50%	3	2	6
11	M	95%	M	90%	2	4	8
12	M	75%	M	50-60%	2	3	6
13	F	90%	F	80%	3	4	12
14	M	95%	M	90%	2	4	8
15	M	80%	F	75%	3	3	9
16	F	90%	F	90%	3	4	12
17	M	70%	M	75%	2	3	6
18	M	90%	M	90%	2	4	8
19	F	60%	F	75%	3	3	9
20	F	75%	F	75%	3	3	9
21	F	70%	M a F	60%	3	3	9
22	F	75%	F	75%	3	3	9
23	F	95%	M a F	90%	3	4	12
24	F	70%	F	75%	3	3	9
25	F	90%	F	90%	3	4	12
26	F	75%	F	75%	3	3	9
27	M	90%	M	90%	2	4	8
28	M	95%	M	95%	2	4	8
29	F	90%	F	90%	3	4	12
30	F	80%	F	80%	3	4	12
31	F	75%	F	60%	3	3	9
32	M	95%	M	90%	2	4	8
33	M	95%	M	90%	2	4	8
34	M	90%	M	90%	2	4	8
35	F	75%	F	75%	3	3	9
36	M	95%	M	90%	2	4	8
37	M	90%	M	90%	2	4	8
38	M	90%	M	90%	2	4	8
39	M	60%	L a M	50%	2	2	4
40	F	90%	F	75%	3	3	9
41	M	95%	M	95%	2	4	8
42	M	80%	M	90%	2	4	8
43	M	90%	M	90%	2	4	8
44	M	85%	M	90%	2	4	8
45	M	95%	M	90%	2	4	8
46	M	90%	M	90%	2	4	8
47	F	75%	F	75%	3	3	9
48	M	80%	M	90%	2	4	8
49	F	95%	F	90%	3	4	12
50	F	70%	F	75%	3	3	9
51	F	75%	F	75%	3	3	9
52	F	85%	F	90%	3	4	12
53	M	95%	M	90%	2	4	8



## COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### Título del proyecto

**ASOCIACION ENTRE LAS VARIANTES DE LA REGION ENHANCER DE LA TIMIDILATO SINTASA (T<sub>SER</sub>) Y EXPRESION DE LA PROTEINA TIMIDILATO SINTASA (TS) EN PACIENTES CHILENOS CON CANCER COLORRECTAL.**

Nombre del Investigador principal: Mónica Acuña Patzke  
Nombre del Investigador responsable: Eduardo Alvarez Rivera  
Institución: Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina.  
Universidad de Chile  
Teléfonos: 9786479

**Invitación a participar:** Se solicita su participación en el proyecto de investigación: **“ASOCIACION ENTRE LAS VARIANTES DE LA REGION ENHANCER DE LA TIMIDILATO SINTASA (T<sub>SER</sub>) Y EXPRESION DE LA PROTEINA TIMIDILATO SINTASA (TS) EN PACIENTES CHILENOS CON CANCER COLORRECTAL”**, debido a que Ud. puede contribuir a una investigación que será importante para los futuros enfermos de cáncer de colon del país.

Este es un examen de participación voluntaria; lea detenidamente este documento para tomar una decisión informada.

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivos: Determinar los niveles de expresión de la proteína TS, y los genotipos del locus T<sub>SER</sub> en pacientes con cáncer colorrectal (CCR).

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar, se le solicitará consentimiento para obtener datos de su ficha clínica, utilizar el material de biopsias de tejido colónico que se encuentran archivados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios.

**Riesgos:** Este estudio no representa ningún riesgo para su salud, ya que no se realizará ningún procedimiento invasivo.

**Costos:** Los exámenes genéticos serán financiados por fondos de investigación y serán sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto. Como participante en este estudio, el financiamiento de las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y manejo de su enfermedad, serán las que corresponden a su sistema provisional.

**Beneficios:** Este estudio podrá tener un impacto positivo para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes con cáncer de colon y recto.

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

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada con estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador. Sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad.

**Derechos del participante:** Ud. tiene derecho como participante a conocer los resultados del estudio. Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Investigador principal: Prof. Académico. Mónica Acuña P. Fono: 9786479

Investigador responsable: Eduardo Alvarez Rivera

**Declaración del participante:**

Consiento voluntariamente, participar en este estudio genético.

SI

NO

Cédula de Identidad.....

Nombre(s).....  
.....

Apellido paterno..... Apellido materno.....

.....

Firma paciente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Gloeckler, L.A.; Reichman, M.E.; Riedel, L.D. "Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program". *Oncologist*. 8: 541-552, 2003.
2. World Health Organization. "International agency for research on Cancer". *World Cancer Report 2008*: 374-377, 2008.
3. American Cancer Society. "Cancer Facts & Figures 2013". Atlanta: American Cancer Society 2013: 12-15, 2013.
4. American Cancer Society. "Cancer Colorectal Facts & Figures 2011-2013". Atlanta: American Cancer Society 2010: 52-55, 2011.
5. Ministerio de Salud Chile. "Mortalidad por causa Tumores malignos, 1990-2008". [http://deis.minsal.cl/deis/ind\\_2007.asp](http://deis.minsal.cl/deis/ind_2007.asp).
6. Donoso, A.D.; Villarroel, P.L.; Pinedo, M.G. "Aumento de la mortalidad por cáncer de colon en Chile, 1990-2003". *Rev Méd Chile*. 134: 152-158, 2006.
7. Horton, R. "The refiguration of medical thought. *The Lancet*". 356 (923): 2-4, 2000.
8. Meyer, A. "Pharmacogenetics-five decades of therapeutic lessons from genetic diversity". *Nature Reviews*. 5(9): 669-676, 2004.
9. Garrod, A.E. "The incidence of alkaptonuria. A study in chemical individuality". *The Lancet*. (2): 1616-1620, 1902.
10. Vesell, E. "Twin studies in pharmacogenetics". *Hum. Genet*. 1:19-30, 1978.

11. Sherry, S.T.; Ward, M.H.; Kholodov, M.; Baker, J.; Phan, L.; Smigielski, E.M.; Sirotkin, K. "dbSNP: the NCBI database of genetic variation". *Nucleic Acids Res.* 29 (1): 308-311, 2001.
12. Organizacion Mundial de la Salud. "WHO Chronicle". 27:476-480, 1973.
13. Mini, E.; Nobili, S. "Implementing personalized medicine, Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism"; *Pharmacogenetics.* 6 (1): 17-24, 2009.
14. Johnson, M.R.; Wang, K.; Tillmanns, S.; Albin, N.; Diasio, R.B. "Structural organization of human DPD gene". *Cancer Res.* 57: 1660-1663, 1997.
15. Van Kuilenburg, A.B. "Dihydropyrimidine Dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-Fluorouracil". *Eur J Cancer.* 40: 939-950, 2004.
16. Fattorusso, O.; Ritter, O. "Vademecum Clínico: del diagnóstico al tratamiento". Editorial El Ateneo. 3ra Edición: 1-3, 2001.
17. Florez, J. "Farmacología Humana". Elsevier. 5ta Edición: 97-102, 2008.
18. Chabner, B.; Ryan, D.P.; Paz-Ares, L.; García –Carbonero, R.; Calabresi, P. "Antineoplasticagents. In: Goodman & Gillman A. (ed). *The pharmacological basis of therapeutics*". New York, McGraw-Hill 10th Edition: 1405-1461, 2001.
19. Carreras, C.; Santi, D. "The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase". *Annu Rev Biochem.* 64: 721-62, 1995.
20. Graziano, F.; Ruzzo, A.; Loupakis, F.; Santini, D.; Catalana, V.; Canestrari, E.; Maltese, P.; Bisonni, R.; Fornaro, L.; Baldi, G.; Masi, G.; Falcone, A.; Tonini, G.; Giordani, P.; Alessandrini, P.; Giustini, L.; Vincenzi, B.; and Magnani, M. "Liver-only metastatic colorectal cancer patients and thymidylate synthase

polymorphisms for predicting response to 5-fluorouracil-based chemotherapy". British J. Cancer. 99: 716 -721, 2008.

21. Shahrokni, M.; Rajebi, M.R.; Saif, M.W. "Toxicity and Efficacy of 5-Fluorouracil and Capecitabine in a Patient With *TYMS* Gene Polymorphism: A Challenge or a Dilemma?". Clin Colorectal Cancer. 8(4): 231-234, 2009.
22. Comella, P. "A review of the role of capecitabine in the treatment of colorectal cancer". Therapeutics and Clinical Risk Management. 3(3): 421-431, 2007.
23. Roche Farma. "Xeloda® Capecitabina". Monografía del Producto. pg: 11-14, 2002.
24. Kaneda, S.; Nalbantoglu, J.; Takeishi, K.; Shimizu, K.; Gotoh, O.; Seno, T.; Ayusawa, D. "Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene". J Biol Chem. 265 (33): 20277-20284, 1990.
25. Horie, N.; Aiba, H.; Oguro, K.; Hojo, H.; Takeishi, K. "Functional analysis and DNA polymorphism on the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase". Cell StructFunct. (20): 191-197, 1995.
26. Marsh, S. "Thymidylate synthase pharmacogenetics". Invest New Drugs. (23): 533-537, 2005.
27. Marsh, S.; Collie-Duguid, E.; Liu, T.; Liu, X.; McLeod, H. "Ethnic variation in the Thymidylate Synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations". Genomics. 58: 310-312, 1999.
28. Mandola, M.; Stoehlmacher J.; Muller-Weeks S.; Cesarone, G.; Yu, M.C.; Lenz, H.J.; and Ladner R.D. "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 Res.* 63: 2898-2904, 2003.
29. Mandola, M.V.; Stoehlmacher, J.; Zhang, W.; Groshen, S.; Yu, M.C.; Iqbal, S.; Lenz, H.J.; and Ladner, R.D. "A 6 pb polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels". *Pharmacogenetics.* (14): 319-322, 2006.
  30. Ulrich, C.M.; Bigler, J.; Velicer, C.M.; Greene, E.A.; Farin, F.M.; Potter, J.D. "Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene". *Cancer Epidemiol Biomark.* (9): 1381-85, 2000.
  31. Dong, S.; Lester, L.; Johnson, L. "Transcriptional control elements and complex initiation pattern of the TATA-less bidirectional human thymidylate synthase promoter". *J Cell Biochem.* 77: 50-64, 2000.
  32. Kawakami, K.; Omura, K.; Kanehira, E.; Watanabe, Y. "Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers". *Anticancer Res.* 19: 3249-3252, 1999.
  33. Marsh, S.; McKay, J.; Cassidy, J.; McLeod, H. "Polymorphism in the Thymidylate Synthase promoter enhancer region in colorectal cancer". *Internat J Oncology.* 19: 383-386, 2001.
  34. Pullarkat, S.T.; Stoehlmacher, J.; Ghaderi, V.; Xiong, Y-P.; Ingles, S.A.; Sherrod, A.; Warren, R.; Tsao-Wei, D.; Groshen, S.; Lenz, H-J. "Thymidylate Synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy". *The Pharmacogenomics J.* 1: 65-70, 2001.

35. Uchida, K.; Hayashi, K.; Kawakami, K. "Loss of Heterozygosity at the Thymidylate Synthase (TS) Locus on Chromosome 18 Affects Tumour Response and Survival in Individuals Heterozygous for a 28-bp Polymorphism in the TS Gene". *Clinical Cancer Res.* 10: 433-439, 2004.
36. Acuña, M.; Eaton, L.; Cifuentes, L.; Massardo, D. "Genetic variants in the enhancer region of the thymidylate synthase gene in the Chilean population". *British J Clinical Pharmacology.* 61 (6): 778-782, 2006.
37. Yu, K.H.; Wang, W.X.; Ding, Y.M.; Li, H.; Wang, Z.S. "Polymorphism of thymidylate synthase gene associated with its protein expression in human colon cancer". *World J Gastroenterol.* 14(4): 617-621, 2008.
38. Kristensen, M.H.; Weidinger, M.; Bzorek, M.; Pedersen, P.L.; and Mejer, J. "Correlation between Thymidylate Synthase Gene Variants, RNA and Protein Levels in Primary Colorectal Adenocarcinomas". *The Journal of Int Med Res.* 38: 484 – 497, 2010.
39. Zhou, J.Y.; Shi, R.; Yu, H.L.; Zeng, Y.; Zheng, W.; and Ma, W.L. "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, 2012.
40. [http://www.adimark.cl/medios/estudios/mapa\\_socioeconomico\\_de\\_chile.pdf](http://www.adimark.cl/medios/estudios/mapa_socioeconomico_de_chile.pdf).
41. American Joint Committee on Cancer AJCC. "Cancer Staging Manual". Springer (6<sup>ta</sup> edición). pg. 113 - 117, 2002.
42. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002290-pdf.pdf>
43. QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook – June 2012 – En (pdf).

44. Iacopetta, B.; Grieu, F.; Joseph, D.; Elsaleh, H. "A polymorphism in the enhancer region the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluoruracil". Br J Cancer. 85: 827-830, 2001.
45. Kawakami, K.; and Watanabe, G. "Identification and Functional Analysis of Single Nucleotide Polymorphism in the Tandem Repeat Sequence of Thymidylate Synthase Gene". Cancer Res. 63: 6004 - 6007, 2003.
46. [http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img\\_uploads/novocastra\\_reagents/Novocastra\\_datasheets/re7140-ce.pdf](http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/novocastra_reagents/Novocastra_datasheets/re7140-ce.pdf)
47. Bernstein, F. "Die geographische Verteilung der Blutgruppen und ihre anthropologische Bedeutung. In: Comitato Italiano Per Lo Studio Dei Problemi Della Popolazione". Istituto Poligrafico dello Stato. pg. 227 - 243, 1937.
48. Cavalli-Sforza, L.; Bodmer, W.F. "Genética de las Poblaciones Humanas". Omega. pg. 483 - 485, 1981.
49. Walpole, R.E.; and Myers, R.H. "Probabilidad y Estadística para Ingenieros". Interamericana. 3ra edición: 620 – 623, 1989.
50. Tapia, E.O.; Roa, J.C.; Manterota, C.; Bellolio, E. "Cancer de Colon y Recto: Descripción Morfológica y Clínica de 322 casos". Int. J. Morphol. 28 (2): 393 - 398, 2010.
51. McMillan, D.C.; Hole, D.J.; McArdle, C.S. "The impact of old age on cancer-specific and non-cancer-related survival following elective potentially curative surgery for Dukes A/B colorectal cancer". Br J Cancer. 99 (7): 1046 - 1049, 2008.



52. Viñes, J.J.; Ardanaz, E.; Aráosla, A.; Gaminde, I.; “Epidemiología poblacional de cáncer colorrectal: revisión de la causalidad”. *Anales Sis San Navarra*. 26 (1): 79 - 97, 2003.
53. Ferlay, J.; Autier, P.; Boniol, M.; Heanue, M.; Colombet, M.; and Boyle, P. “Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006”. *Ann Oncol*. 18(3): 581 – 92, 2007.
54. Johnston, P.; Fisher, E.; Rockette, H.; Fisher, B.; Wolmark, N.; Drake, J.; Chabner, B.; and Allegra, C. “The role of Thymidilate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer”. *J ClinOncol*. 12 (12): 2640-47, 1994.
55. Giovannucci, E.; Rimm, E.B.; Ascherio, A.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.A.; and Willett, W.C. “Alcohol, low-methionine–low-folate diets, and risk of colon cancer in men”. *J. Nat. Cancer Inst*. 87:265 - 273, 1995.
56. Ma, J.; Stampfer, M.J.; Giovannucci, E.; Artigas, C.; Hunter, D.J.; Fuchs, C.; Willett, W.C.; Selhub, J.; Hennekens, C.H.,; and Rozen, R. “Methylenetetrahydrofolatereductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer”. *Cancer Res*. 57: 1098 - 1102, 1997.
57. Kato, I.; Dnistrian, A.M.; Schwartz, M.; Toniolo, P.; Koenig, K.; Shore, R.E.; Akhmedkhanov, A.; Zeleniuch-Jacquotte, A.; and Riboli, E. “Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study”. *Br. J. Cancer*. 79:1917–1922, 1999.
58. Trinh, B.N.; Ong, C.N.; Coetzee, G.A.; Yu, M.C.; and Laird, P.W. “Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels”. *Hum. Genet.*, 111: 299 - 302, 2002.

59. Ulrich, C.M.; Bigler, J.; Bostick, R.; Fosdick, L.; and Potter, J.D. "Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas". *Cancer Res.* 62:3361 - 3364, 2002.
  
60. Chen, J.; Hunter, D.J.; Stampfer, M.J.; Kyte, C.; Chan, W.; Wetmur, J.G.; Mosig, R.; Selhub, J.; and Ma, J. "Polymorphism in the Thymidylate Synthase Promoter Enhancer Region Modifies the Risk and Survival of Colorectal Cancer". *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 12: 958 - 962, 2003.
  
61. Lenz, H-J.; Zhang, W.; Zahedy, S.; Gil, J.; Yu, M.C.; and Stoehlmacher, J.A. "6 base-pair deletion in the 3' UTR of the thymidylate synthase (TS) gene predicts TS mRNA expression in colorectal tumors: A possible candidate gene for colorectal cancer risk". *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 43: 660, 2002.
  
62. Ulrich, C.M.; Curtin, K.; Potter, J.D.; and Bigler, J. "Polimorphism in the reduced Folate Carrier, Thymidylate synthase, or Methionine Synthase and Risk of Colon Cancer". *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*; 14:2509 - 2516, 2005.
  
63. Kawakami, K.; Graciano, F.; Watanabe, G.; Ruzzo, A.; Santini, D.; Catalana, V.; Bissoni, R.; Arduini, F.; Bearzi, I.; Cascinu, S.; Mureto, P.; Perrone, G.; Rabitti, C.; Giustini, L.; Tonini, G.; Pizzagalli, F.; and Magnani, M. "Prognostic Role of Thymidylate Synthase Polymorphisms in Gastric Cancer Patients Treated with Surgery and Adjuvant Chemotherapy". *Clin Cancer Res.* 11: 3778 - 3783, 2005.
  
64. Seo, B-G.; Kwon, H-C.; Oh, S.Y.; Lee, S.; Kim, S.G.; Kim, S.; Han, H.; and Kim, H.J.; "Comprehensive analysis of excision repair complementation group 1, glutathione S-transferase, thymidylate synthase and uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1 polymorphisms predictive for treatment outcome in patients with advanced gastric cancer treated with FOLFOX or FOLFIRI". *Oncology Reports.* 22: 127-136, 2009.

65. Ma, B.Y.; Hui, E.P.; Mok, T.S. "Population-based differences in treatment outcome following anticancer drug therapies". *Lancet Oncol.* 11: 75 - 84, 2010.
66. Roa, J.C.; Araya, J.C.; Villaseca, M.A.; Roa, I.; Correa, P. "Inestabilidad microsatelital y pérdida de la heterocigocidad en lesiones neoplásicas y preneoplásicas gástricas". *Rev. méd. Chile.* 131 (11): 1227- 1236, 2003.
67. Zinzindohoue, F.; Ferraz, J.M. "Thymidylate Synthase Promoter Polymorphism". *J ClinOncol.* 19 (14): 3438 - 3442, 2001.
68. Kawakami, K.; Ishida, Y.; Danenberg, K.D.; Omura, K.; Watanabe, G.; Danenberg, P.V.; "Functional Polymorphism of the Thymidylate Synthase Gene in Colorectal Cancer Accompanied by Frequent Loss of Heterozygosity". *Jpn J. Cancer Res.* (93): 1221 - 1229, 2002.
69. Brody, J.; Hucl, T.; Gallmeier, E.; Winter, J.; Kern, S.; Murphy, K.M.; "Genomic Copy Number Changes Affecting the Thymidylate Synthase (*TYMS*) Gene in Cancer: A Model for Patient Classification to Aid Fluoropyrimide Therapy". *Cancer Res.* (66): 9369-9373, 2006.
70. Kuramochi, H.; Uchida, K.; Peters, J.; Shimizu, D.; Vallbohmer D.; Schneider, S.; Danenberg, K.D.; Danenberg, P.V. "Loss of heterozygosity at thymidylate synthase locus in Barrett's". *Bio Med Central.* (9): 157, 2009.
71. Sugiyama, Y.; Sugiyama, K.; Hirai, Y.; Akiyama, F.; Hasumi, K.; "Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected cancer tissues". *Am J ClinPathol.* (1):109-16, 2002.
72. De Bruin, E.C.; Van de Pas, S.; Lips, E.H.; Van Eijk, R.; Van Der Zee, M.M.; Lombaerts, M., Van Wezel, T.; Marijnen, C.A.; Van Krieken, J.H.; Medema, J.P.; Van De Velde, C.J.; Eilers, P.H.; Peltenburg, L.T.;

“Macrodissection versus microdissection of rectal carcinoma: minor influence of stroma cells to tumor cell gene expression profiles”. *Bio Med Central*. (14): 6 – 142, 2005.

73. Gusella, M.; and Padrino, R. “G>C SNP of thymidylate synthase with respect to colorectal cancer”. *Pharmacogenomics*. 8(8): 985-996, 2007.

74. Linz, L.F.; Scorgie, F.E.; Garg, M.B.; and Ackland, S.P. “Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the thymidylate synthase 2R allele”. *Int. J. Cancer*. 120: 1930 - 1934, 2007.