

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



***“Determinación del estado mutacional de genes de relevancia oncológica
En tumores de pacientes chilenos con Cáncer de Vesícula Biliar”***

Nicolás Sebastián Miranda González

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN GENÉTICA
Directora de Tesis: Prof. Dra. Katherine Marcelain Cubillos**

22.04.2020

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

NICOLÁS SEBASTIÁN MIRANDA GONZÁLEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en GENÉTICA en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de abril del 2020.

**Prof. Dra. Katherine Marcelain Cubillos
Directora de Tesis
Universidad de Chile**

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Ricardo Verdugo

Prof. Dra. Leonor Bustamante

Prof. Dra. Olga Barajas

Prof. Dr. Patricio González

DEDICATORIA

A la Dra. Beatriz González Muñoz.

AGRADECIMIENTO

Mis agradecimientos a mi tutora Dra. Katherine Marceline.

Agradecimientos al equipo académico del Magíster de Genética, particularmente agradecer el apoyo de la Dra. Patricia Iturra, Dra. Leonor Bustamante, y del Dr. Patricio Olguín.

Agradecimientos al equipo del Laboratorio de Genómica del Cáncer y GENOMED, en particular a Jessica Toro, Evelin González, Camilo Villaman, Víctor Pola, Vania Montecinos e Ignacio Maureira.

Agradecimientos a todas las personas que donaron sus muestras biológicas utilizadas en el desarrollo de la presente tesis, y en el marco del proyecto *FONDEF IT16110051 “TumorSec: Optimización, validación y masificación de un ensayo de secuenciación de genes para mejorar la precisión de terapias oncológicas”*.

Agradecimientos a Dra. Cristina Dorador, Dra. Martha Hengst, Dr. Fernando Silva, Dr. Ricardo Verdugo, Dra. Olga Barajas, y al Dr. Patricio González.

Agradecimientos a mi Familia, amistades, y generación 2018/2019 de Magíster de Genética.

Beca de Magíster Nacional *CONICYT*, 2019.

Financiamiento *FONDEF IT1611005*.

Muchas gracias.

ÍNDICE

Resumen	5
Abstract.....	6
1. Introducción	7
1.1 Cáncer de vesícula biliar: Características y Epidemiología.....	7
1.2 Modelo de carcinogénesis en CVB	10
1.3 Características moleculares de CVB.....	11
1.4 Mutaciones predictivas de respuesta a terapias en CVB.....	13
2. Hipótesis y Objetivos	16
3. Metodología	17
3.1 Muestras de estudio.....	17
3.2 Extracción de ácidos nucleicos.....	17
3.3 Cuantificación y análisis de la integridad del DNA.....	18
3.4 Preparación de Librerías y Secuenciación.....	19
3.5 Análisis bioinformático.....	21
3.6 Análisis y filtrado de variantes.....	22
3.7 Análisis de bases de datos internacionales.....	23
3.8 Análisis estadístico y generación de gráficos.....	24
4. Resultados	26
4.1 Registro e información de Pacientes considerados en el estudio.....	26
4.2 Resultados de Librerías y Secuenciación.....	27
4.3 Métricas de Secuenciación.....	28
4.4 Análisis de variantes.....	31
4.5 Comparación de mutaciones entre pacientes de distintas poblaciones.....	37
5. Discusión	45
6. Conclusiones	55
7. Referencias	56
8. Anexos	65

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.....	25
Figura 2. Número de muestras de CVB durante el proceso de extracción de DNA, preparación de librerías, y secuenciación final.....	27
Figura 3. Electroferogramas de Multiplex utilizados para las 11 corridas de secuenciación...	28
Figura 4.; Esquema de proceso general de filtrado de variantes.....	32
Figura 5. Resumen de mutaciones somáticas totales detectadas en muestras de tumor.....	33
Figura 6. Oncoplot del estado mutacional de genes detectados para filtrado de variantes.....	34
Figura 7. Gráficos de mapa de mutaciones.....	35
Figura 8. Análisis de variantes con efecto en proteína por CGI.....	36
Figura 9. Variantes identificadas según valor de (<i>Deleterious Score, CADD</i>);.....	36
Figura 10. Resumen de las opciones terapéuticas para las alteraciones detectadas en CGI...	38
Figura 11. Comparación de mutaciones somáticas en diagramas de Venn (cBioPortal).....	41
Figura 12. Comparación de mutaciones somáticas en diagramas de Venn (ICGC).....	42
Figura 13. Comparación de los genes alterados detectados entre cada cohorte.....	42
Figura 14. Heatmap de comparación de la frecuencia de mutaciones somáticas.....	45
Tabla 1. Presentación clínica de 30 pacientes con ficha clínica disponible.....	26
Tabla 2. Métricas de control de calidad de corridas secuenciación.....	29
Tabla 3. Métricas de calidad para cada muestra secuenciada.....	30
Tabla 4. Alteraciones detectadas en genes biomarcadores.....	39

ABREVIATURAS

APBDJ: *Unión Ductal Pancreatobiliar Anómala*

CAAD: *Combined Annotation Dependent Depletion*

CGI: *Cancer Genome Interpreter*

CNV: *Copy Number Variation*

COSMIC: *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*

CVB: *Cáncer de Vesícula Biliar*

FDA: *Food and Drug Administration*

FFPE: *Formalin Fixed and Paraffin Embedded*

GBC: *Gallbladder Cancer*

LOH: *Pérdida de heterocigosidad*

MAF: *Mutation Annotation File*

MSK: *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*

NGS: *Next Generation Sequencing*

SG: *Singapur*

SNV: *Single Nucleotide Variant*

TNM: *Classification of Malignant Tumours*

VCF: *Variant Call File*

Resumen

El cáncer de vesícula biliar (CVB) es un cáncer agresivo y de mal pronóstico, que requiere la implementación de nuevas estrategias terapéuticas. En Chile, su incidencia y mortalidad son de las más altas registradas globalmente.

Este estudio busca identificar la presencia de mutaciones somáticas en CVB descritas como predictoras de respuesta a terapias en otros tipos tumorales, y evaluar potenciales diferencias regionales, contrastando las mutaciones detectadas para pacientes de Chile con cohortes de poblaciones de Japón, China, Singapur, y EEUU. Así, a través de la secuenciación NGS de un panel de 25 genes biomarcadores de respuesta a terapia en 34 pacientes de CVB, se identificaron 26 pacientes (76%) con al menos una mutación somática exónica. Los genes mutados de mayor frecuencia incluyen a *TP53* (47%), *KRAS* (15%), y *ARIDIA* (12%). Si bien no se detectaron diferencias significativas al momento de comparar frecuencia mutacional entre cohortes de Japón, China, Singapur, y EEUU, se registraron distintas mutaciones puntuales entre grupos contrastados. Los resultados obtenidos podrían reflejar una fracción del perfil de mutaciones de tumores de CVB en pacientes de Chile, generando información relevante para la caracterización molecular de este tipo de cáncer, y futuras opciones de terapias a nivel nacional.

Abstract

Gallbladder Cancer (GBC) is a rare, aggressive malignancy of the biliary tract associated with a poor prognosis, underlining the necessity of new therapeutic strategies. In Chile, the incidence and mortality of GBC are among the highest worldwide.

This study aims to identify the presence of somatic actionable alterations that could potentially guide future treatment options, and to evaluate the effect of a regional context upon particular somatic mutations present in GBC tumors, contrasting the mutations detected for patients from Chile against cohorts of populations from Japan, China, Singapore, and the USA.

NGS target capture-based deep sequencing was performed for a panel of 25 actionable genes. Overall, the most frequently mutated genes include *TP53* (47%), *KRAS* (15%), and *ARID1A* (12%), with 26 out of 34 patients (76%) having at least one somatic mutation in exonic regions. Although mutation frequency did not appear to significantly differ among the cohorts, discrepancies were observed in the mutations identified. Altogether, our results represent a first approach aiming to identify the mutational profile of GBC in Chilean patients, providing relevant information that may contribute to the molecular characterization of GBC and to guide the implementation of future therapy options in Chile.

1. Introducción

1.1 Cáncer de vesícula biliar: Características y Epidemiología

El cáncer de vesícula biliar (CVB) es un tipo de cáncer del tracto hepatobiliar, representando la sexta forma más común entre cánceres del tracto gastrointestinal, y la forma más común entre cánceres del tracto biliar ¹. Los cánceres del tracto biliar incluyen cánceres de las vías biliares intrahepáticas, cánceres de las vías biliares extrahepáticas y los cánceres de vesícula biliar ². Debido a una sintomatología vaga y frecuentemente indetectable, este tipo de cáncer se caracteriza por una progresión rápida y silenciosa, lo cual lo define a su vez como un cáncer muy agresivo y de mal pronóstico ^{1,3}.

A nivel mundial, el cáncer de vesícula biliar tiene una baja incidencia representando aproximadamente sólo el 2% de todos los cánceres globalmente, registrándose alrededor de 219 mil casos nuevos para el año 2020, y proyectándose alrededor de 343 mil casos para el año 2035 (*International Agency for Research on Cancer*, 2018). Pese a esta baja incidencia, el cáncer de vesícula biliar se destaca por presentar una incidencia global muy heterogénea, con patrones de distribución geográficos altamente definidos ⁴. Se presume que esta distribución se debe a una combinación de factores genéticos, así como de factores ambientales locales ^{2, 5-7}. Así, en Estados Unidos se presentan bajos valores de incidencia de este cáncer, con menos de 5 mil casos por año, con tasas de incidencia de 0,9 y 0,5 por cada 100 mil mujeres y hombres, respectivamente ². En contraste, en Bangladesh se registra una tasa de incidencia de 5,1 individuos en 100 mil habitantes, y en Japón una tasa de 4,5 individuos en 100 mil habitantes. Para el continente Africano, hay escasa o nula información sobre la incidencia de CVB, sin embargo, se ha reportado una frecuencia alta de este cáncer en Argelia, con una incidencia estimada de 6 a 8 en 100 mil mujeres, representando el segundo cáncer digestivo más frecuente en esa población. Otras poblaciones de alta incidencia corresponden a poblaciones

de Tailandia (7,4/100.000), República de Corea (6,8/100.000), Nepal (6,7/100.000), y principalmente países de América del Sur, tales como Perú (4,8/100.000), Bolivia (14,0/100.000), y Chile (9,4/100.000), en donde se encuentran las mayores incidencias registradas a nivel global ⁸⁻¹⁰. En particular, las tasas más altas de CVB se encuentran generalmente en las poblaciones indígenas amerindias de tales países. En Chile, las tasas son superiores a 25 casos por cada 100 mil mujeres y 9 casos por cada 100 mil hombres, presentando la segunda tasa de mortalidad de cáncer de vesícula biliar más alta en el mundo ⁹, constituyendo una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres a nivel nacional, junto con cánceres de mama, pulmón, estómago, y colon ^{9, 11}. La tasa de incidencia más alta registrada a nivel global corresponde a mujeres Mapuche-Huilliche en la ciudad de Valdivia, con una tasa de 27,3 mujeres por cada 100 mil habitantes ^{7, 12}.

A nivel global, el cáncer de vesícula biliar es el único cáncer del sistema digestivo que se presenta de forma más común en mujeres que en hombres ¹³. Según la literatura, la incidencia en mujeres y hombres oscila en proporciones de 2:1 y de 6:1 ⁸⁻¹⁰. Esta frecuencia probablemente esté relacionada con la alta prevalencia de litiasis vesicular en mujeres ^{1, 7}. Esto ha sido relacionado con la hormona estrógeno, la que aumenta la saturación de colesterol en la bilis, lo que a su vez aumenta el riesgo de formación cálculos biliares ¹⁴. Pese a que se registra esta notoria preponderancia en mujeres, hay excepciones reportadas para poblaciones de la República de Corea, Islandia y Costa Rica, donde la mayor incidencia y mortalidad ocurre en el sexo hombre ⁸. La incidencia de CVB aumenta con la edad en ambos sexos, con una edad promedio global de 72 años para hombres y 74 años para mujeres, siendo un cáncer muy raro en pacientes menores de 50 años.

A nivel global, las tasas estandarizadas de mortalidad de CVB para ambos sexos (por cada 100 mil habitantes) son más altas para América del Sur (*e.g.* Bolivia 10,6/100.000), Europa Central

(e.g. Eslovaquia 3,2/100.000), y Asia Oriental (e.g. Corea 4,1/100.000) ^{8, 13}. En Chile, la tasa de mortalidad fue de 6,3/100.000 el año 2014 a nivel nacional, y de 10,4/100.000 en la región de la Araucanía ⁹.

Se han estudiado numerosos factores de riesgo en CVB, los que incluyen una serie de factores demográficos, enfermedades de la vesícula biliar preexistentes, y exposiciones ambientales ⁵.

Otros factores de riesgo relevantes asociados comúnmente a CVB incluyen principalmente el sexo y edad, antecedentes de infecciones bacterianas por *Salmonella spp.* (e.g. *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*) o *Helicobacter spp.* (e.g. *Helicobacter pylori* y *Helicobacter bilis*), exposición a metales pesados, químicos o aflatoxinas, consumo de tabaco, presencia de pólipos, antecedentes de Colecistitis, Colangitis, y una unión ductal pancreatobiliar anómala (APBDJ). Por lo demás, altas tasas de obesidad e inactividad física en los países desarrollados se correlacionan con el crecimiento en la incidencia de CVB. Es necesario mencionar que los reportes de este conjunto de factores de riesgo descritos para CVB son muy variables regionalmente ^{1, 8, 15-17}. En referencia a este último punto, es importante hacer énfasis en el hecho que los factores de riesgo en CVB discrepan notoriamente según el país de origen, presentándose por ejemplo un mayor riesgo asociado a una unión anormal pancreática-biliar en pacientes en Japón y en otros países Asiáticos, en contraste con pacientes en poblaciones de América del Sur o de Europa Central y Occidental ¹⁸, mientras que en Chile, hay un mayor riesgo asociado a colelitiasis en relación a pacientes de poblaciones de menor incidencia ¹⁷ y se estima que por cada 1% de ancestría Mapuche, aumenta en un 3,7% el riesgo de muerte por CVB ¹⁹.

La historia familiar de CVB es también un factor de riesgo considerable, lo que apoya la hipótesis del rol de la genética y el medio ambiente en la susceptibilidad a la enfermedad ^{1, 5, 10}.

En este contexto, se ha propuesto que fisiopatogénesis diferirá según región, lo que estaría

relacionado a su vez con las diferencias referentes a presentación clínica-patológica y factores de riesgo asociados a CVB a nivel global ^{9, 20}. Una publicación reciente aborda estas diferencias contrastando muestras de CVB de pacientes de distintas poblaciones (Japón, EEUU, y Chile). Los resultados sugieren que las diferencias en las variables clínico-patológicas en pacientes de Japón podría denotar una patogénesis distintiva para pacientes de esa población en particular, lo que a su vez se sustentaría por diferencias detectadas en el patrón mutacional de tumores en pacientes de tal población ²¹.

1.2 Modelo de carcinogénesis en CVB

Pese a que la etiología exacta de CVB es aún desconocida, se ha propuesto que la inflamación crónica de la vesícula biliar es uno de los procesos que conduce a la displasia y malignidad de la enfermedad ²². De hecho, el CVB ha sido descrito en la literatura como un ejemplo "clásico" de la patogénesis del cáncer impulsada por inflamación crónica ⁵. La iniciación y progresión del CVB se presume que ocurre bajo cambios histológicos, acompañados de diversas anomalías moleculares progresivas ^{1, 22, 23}. Al igual que lo reportado en otros tipos de tumores sólidos, el desarrollo de la enfermedad dependería entonces de la adquisición de alteraciones moleculares, las que conferirá ventajas proliferativas o invasivas sustanciales a las células, lo que les permitiría crecer a tasas significativas, invadir tejidos, y metastatizar ²⁴. Sin embargo, el orden exacto de la manifestación de estas diversas modificaciones genéticas sigue sin estar claro. La determinación de esta cronología podría ser útil para evaluar los riesgos y permitir la detección de CVB en una etapa temprana ²⁵. Así, para CVB, en etapas iniciales se han reportado mutaciones en el gen *TP53*, y mutaciones en el DNA mitocondrial; mientras que la aparición de neoplasia intraepitelial se ha asociado frecuentemente con una pérdida de heterocigosidad en los loci 3p, 8p y sobreexpresión de *HER2* ^{6, 24}. Adicionalmente, se ha descrito que en este proceso desde hiperplasia hacia adenocarcinoma invasivo hay una pérdida

del brazo pequeño del cromosoma 16, ganancia de *CDK4*/ciclina *D1*, y sobreexpresión de *COX2* ²². En este proceso, la pérdida de heterocigosidad (LOH) se encuentra en al menos 21 regiones cromosómicas durante el desarrollo del cáncer y la displasia en CVB ²⁴.

3.3 Mutaciones somáticas en CVB

En los últimos años, el uso de la secuenciación de última generación (NGS) en el ámbito de la investigación y la clínica, ha permitido avanzar enormemente en el conocimiento de las mutaciones presentes en cáncer. No obstante, para el CVB, los estudios disponibles acerca de la frecuencia de mutaciones aún son muy limitados, particularmente aquellos estudios enfocados en pacientes de Sudamérica ^{1, 21, 22}. Según lo señalado en la base de datos COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, 2019), las principales mutaciones reportadas para CVB corresponden a mutaciones en genes *TP53*, *KRAS*, y *CDKN2A*. No obstante, como se mencionó previamente, considerando las diferencias poblacionales (genéticas y ambientales) que pueden afectar la biología tumoral en CVB, se presume que las mutaciones somáticas presentes puedan variar en las distintas poblaciones en estudio ²⁶. Entre estos genes, las alteraciones en el gen *KRAS* han sido ampliamente reportadas en pacientes de poblaciones tales como Japón, China, Taiwan, Corea, India, Grecia, Brasil, y Estados Unidos, pero con un amplio rango de frecuencia ²⁰. A través de la recopilación de aquellos estudios, se perciben tendencias de menor incidencia de mutaciones en *KRAS* en pacientes de poblaciones de países occidentales, frente a pacientes orientales (0 – 80%) ^{9, 20}. Estos estudios sugieren además que las mutaciones en este gen jugarían un papel principalmente durante la fase de transformación maligna de la displasia en cáncer invasivo en CVB ^{20, 22}. Un efector clave de la actividad oncológica de *KRAS* es el gen *BRAF*. En referencia a este gen, se han encontrado mutaciones en *BRAF* en el valores de hasta 33% en tumores de CVB. Además, se ha reportado que estas mutaciones son mutuamente excluyentes, lo que también se ha observado en otros tipos de

cáncer ¹⁰. Se ha reportado que la frecuencia de mutaciones en el gen *KRAS* en CVB es mayor en sujetos con una anomalía de la unión bilio-pancreática, reportándose mutaciones en *KRAS* en al menos 50% de los cánceres asociados con APBDJ, y presentes solo en el 6% de los casos sin aquella anomalía ⁵. Por el contrario, mutaciones en *KRAS* se encuentran usualmente ausentes, o en baja frecuencia, en pacientes con antecedentes de Colelitiasis y Colecistitis crónica, en donde prevalecen mutaciones tempranas del gen *TP53* ²⁷. La inactivación por delección o mutación del gen que codifica la proteína p53 es también común en muchos tipos de cáncer ²⁸. De igual forma, las mutaciones en el gen supresor tumoral *TP53*, se han reportado con un rango fluctuante para pacientes con CVB de poblaciones de Estados Unidos, China, India, Corea, Grecia, Brasil, Taiwán, Eslovenia, Japón, Alemania, Italia, y Chile, entre otros ^{1, 20, 25}. La alta incidencia de sobreexpresión de p53 en carcinomas, y su presencia también en displasias, sugieren que esta anomalía es un evento temprano e importante en la patogenia de CVB ²⁵. Las alteraciones en *TP53* incluyen mutaciones puntuales, pérdida de heterocigosidad (LOH), y sobreexpresión en estos genes; y han sido reveladas a través de metodologías clásicas de detección (*i.e.* PCR-RFLP, IHC), así como de alto rendimiento (*i.e.* secuenciación NGS) ^{5, 20}. Estas diferencias técnicas podrían explicar las diferencias encontradas en los distintos estudios. No obstante, además de las variaciones en frecuencia mutacional para *TP53*, un estudio de contraste entre pacientes de población de Chile y pacientes de Japón, exploró las diferentes alteraciones en gen *TP53* presentes en carcinomas de vesícula biliar, reportando que la frecuencia de las mutaciones encontradas era similar en ambos países, pero que el tipo de mutaciones no era el mismo ²⁹.

1.4 Mutaciones predictivas de respuesta a terapias en CVB

El principal tratamiento para el CVB sigue siendo la cirugía para extirpar el tumor con intención curativa. Sin embargo, no todos aquellos pacientes diagnosticados podrán ser considerados como candidatos quirúrgicos³⁰. Dado que alrededor del 70% de los pacientes tienen más de 70 años al momento del diagnóstico, la colecistectomía para la litiasis vesicular asintomática no es recomendada e incluso parece reducir la esperanza de vida según ciertos estudios⁷. En particular, para aquellos casos en que la enfermedad sea metastásica al momento del diagnóstico, generalmente la cirugía no será una opción viable para el paciente y será considerada la quimioterapia como la primera opción de tratamiento^{3, 31}. En base al estadio tumoral, serán tres potenciales casos clínicos^{30, 32}: para el primero de ellos, en donde el tumor será resecable, la cirugía para su extracción permitirá tener una sobrevida de 65% en los próximos 5 años. El segundo caso corresponde a un tumor no resecable, encontrándose con una infiltración a tejido conectivo o muscular, el cual deberá ser tratado con radiación y quimioterapia, permitiendo una sobrevida de 26% en 5 años. Por último, la tercera situación clínica será cuando el tumor ya se encuentre metastizado, donde las opciones remanentes corresponden a radioterapia y cuidados paliativos, teniendo una sobrevida de sólo 5% para los próximos 5 años³⁰. En base a esto, evidentemente nace la necesidad de adquirir e implementar nuevas estrategias de tratamiento para el cáncer de vesícula biliar^{22, 33}, particularmente para aquellos pacientes en etapas más avanzadas. En la actualidad, una respuesta frente a esta problemática, ha sido la implementación y el desarrollo de terapias dirigidas^{22, 34} como una herramienta de la medicina de precisión. En este contexto, actualmente se están desarrollando investigaciones que buscan identificar enfoques terapéuticos específicos para cánceres menos estudiados y de alta mortalidad³⁵. Para la *Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos* (FDA), el término medicina personalizada se trata de *obtener los mejores*

resultados médicos al elegir los tratamientos que correspondan al perfil genómico del paciente o a ciertas características de sus proteínas, que circulan o están ubicadas en la superficie celular ³⁶. Actualmente, la prescripción de terapias dirigidas efectivamente está guiada por las características moleculares del tumor de cada paciente, en donde genes marcadores pueden estar asociados con la respuesta a estos tratamientos, lo que hace necesario evaluar a los pacientes para identificar a aquellos que son portadores (o no portadores) de una determinada alteración molecular ^{34, 35}. Así, los pacientes pueden ser candidatos al uso de una determinada terapia de acuerdo a la presencia o ausencia de mutaciones en genes específicos ^{21, 37}, utilizándose para la evaluación del paciente en múltiples entornos clínicos, incluido el monitorear el estado de la enfermedad, ya sea para detectar la recurrencia o determinar la respuesta o la progresión a una determinada terapia ³⁸.

La implementación de estas terapias ha mejorado el pronóstico y la calidad de vida de pacientes con cánceres de diversos tipos tumorales ³⁵. Sin embargo, en la actualidad no existen terapias dirigidas aprobadas para el tratamiento de CVB, lo que obedece en parte a la escasa información que existe en relación a las alteraciones moleculares y mutaciones que presentan estos tumores ^{25, 27}. Esto redundando en una escasez de estudios clínicos que permitan evaluar la efectividad de estos tratamientos en pacientes con CVB, y por ende, limitando su implementación en la clínica. Por ejemplo, para quimioterapia sistemática, sólo un régimen de gemcitabina y agentes de platino (cisplatino/gemcitabina) ha sido aprobado para pacientes con cánceres del tracto biliar avanzado ³⁹; y en la actualidad, sólo hay nueve (9) ensayos clínicos en curso que incluyen pacientes con CVB a nivel global (Ver **Anexo , Tabla 8.1**).

Por lo tanto, uno de los desafíos importantes, es la capacidad de incrementar las limitadas opciones de tratamiento farmacológico para este tipo de cáncer y enfoques terapéuticos específicos para CVB ^{20, 22, 37, 40}.

Recientemente, ensayos con terapias dirigidas hacia genes EGFR, IDH1/2, y ERBB2 han demostrado potenciales beneficios en cánceres del tracto biliar ³⁷. Parte de estos genes utilizados como biomarcadores de respuesta a terapia, se encuentran contenidos en el panel denominado “*TumorSec*” (FONDEF IT16110051). Este panel fue diseñado para capturar regiones que corresponden a secuencias codificantes completas o *hotspots* de 25 genes, 24 de los cuales son biomarcadores predictivos de respuesta a terapias dirigidas (*e.g* EGFR y KRAS); y 1 es biomarcador con valor pronóstico y predictivo de respuesta a quimioterapia (TP53) en tumores sólidos. En la presente tesis se utilizó este panel para identificar mutaciones somáticas, a través de la secuenciación dirigida de alta profundidad, en muestras de cáncer de vesícula biliar de pacientes de Chile y se contrastaron los resultados con aquellos previamente reportados para pacientes de otras poblaciones.

2. Hipótesis

Pacientes de Chile con cáncer de vesícula biliar presentan mutaciones somáticas en genes descritos como biomarcadores de respuesta a terapias, con un patrón mutacional distintivo frente a otras poblaciones con menor incidencia de la enfermedad.

2.1 Objetivo General

Identificar, en pacientes chilenas y chilenos con cáncer de vesícula biliar, mutaciones somáticas en genes descritos como biomarcadores de respuesta a terapias en otros tipos tumorales; y contrastarlas con las mutaciones descritas en pacientes de otras poblaciones.

2.2 Objetivos Específicos

Objetivo 1. Identificar, mediante secuenciación dirigida de alta profundidad, mutaciones somáticas en un panel de 25 genes, en muestras de cáncer de vesícula biliar de pacientes de Chile.

Objetivo 2. Determinar la potencial relevancia clínica de las mutaciones detectadas en cáncer de vesícula biliar, de acuerdo a su valor predictivo y nivel de patogenicidad.

Objetivo 3. Comparar la frecuencia de las mutaciones encontradas en cáncer de vesícula biliar de pacientes de Chile, con las frecuencias reportadas para otras poblaciones en los 25 genes analizados.

3 Metodología

3.1 Muestras de estudio

Las muestras utilizadas en el presente estudio corresponde a muestras de tejido de tumor fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE) de pacientes de Chile diagnosticada(o)s con cáncer de vesícula biliar, obtenidas desde múltiples centros de distinto origen, entre los que se incluyen Hospital Padre Hurtado, Hospital San Juan de Dios, Hospital de Puerto Montt, Hospital Regional de Talca, Hospital de Coquimbo, Hospital de Concepción, Hospital del Salvador, e Instituto Nacional del Cáncer (INC), entre otros. Para los pacientes reclutados se cuenta con las actas de aprobación de comité de bioética, Consentimiento Informado, y Protocolo de Aprobación de Proyectos Clínicos (Ver **Anexo, Punto 9**)

3.2 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos desde muestras de tejido FFPE de cáncer de vesícula biliar, y cada respectivo control de calidad, se realizó siguiendo los protocolos previamente estandarizados en el Laboratorio Genómica del Cáncer.

Inicialmente, se realizó la extracción y cuantificación de DNA genómico desde muestras de tumores de cáncer de vesícula biliar FFPE. Para esto, se utilizó el kit comercial de extracción '*RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit*' (Invitrogen, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor, y la estandarización realizada en el Laboratorio de Genómica del Cáncer. Al momento de la ejecución del protocolo se anotaron los registros correspondientes y observaciones; como cantidad de tejido inicial, el número de lavados durante el protocolo, y los volúmenes utilizados para la dilución final. El protocolo consiste básicamente en una serie de pasos para la limpieza y eliminación de parafina de la muestra, en conjunto con la digestión del tejido tumoral. Una modificación que se realizó fue la extensión de las 4 horas de digestión descritas en el protocolo hasta un periodo de digestión *overnight* (con alrededor de 15 horas).

Una vez realizada la extracción, los tubos de ácidos nucleicos extraídos se almacenaron a - 20 grados Celsius y se realizó posteriormente la medición de absorbancia, utilizando el lector de microplaca multifuncional Cytation 3 (Biotek, USA). Se utilizó como blanco para la medición la solución de elusión del kit o buffer de elusión.

De forma adicional, y según disponibilidad del kit anterior, se utilizó el kit '*GeneJET FFPE DNA Purification Kit*' (Thermo Scientific, USA), el cual está diseñado específicamente para obtención de alta calidad de DNA desde muestras de tejido FFPE. A diferencia de la extracción por kit '*RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation*' (Invitrogen, USA) señalada anteriormente, no se incluyó un paso overnight para la eliminación de parafina de la muestra.

3.3 Cuantificación y análisis de la integridad del DNA

Una vez extraído el DNA genómico de las muestras de tumores FFPE, se realizó su medición de absorbancia 260/280 utilizando el lector de microplaca multifuncional *Cytation 3* (Biotek, USA). Adicionalmente, se visualizó integridad de muestras de DNA a través de electroforesis en gel de agarosa 1,7%. Otros métodos de cuantificación utilizados corresponden a cuantificación por fluorescencia, a través de kit *PicoGreen 'Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit'* (Invitrogen, USA) y el kit '*Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit*' (Thermo Fisher Scientific, USA) para la determinación cuantitativa de DNA, según disponibilidad, y de forma complementaria entre sí. Por otra parte, la integridad y el tamaño del DNA genómico se evaluaron en el equipo *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical, USA), previo a la confección de librerías. El Sistema Automatizado *Fragment Analyzer* se utilizó para evaluar el grado de fragmentación de muestras de DNA extraídas del tejido FFPE con el objetivo de posteriormente realizar la preparación de librerías para secuenciación.

3.4 Preparación de Librerías y Secuenciación

Previo a la secuenciación de muestras, para la captura de zonas específicas del DNA se requiere la previa construcción de librerías de fragmentos, lo que consiste en un procesamiento del DNA para tener segmentos enriquecidos e identificables de entre 150 y 300 pb de longitud. Para la confección de librerías se utilizó el kit *KAPA HyperPlus Kit* (Roche Molecular Biochemicals, USA) según instrucciones del proveedor, con modificaciones en el protocolo para el uso de muestras FFPE estandarizadas en el Laboratorio de Genómica del Cáncer.

Primeramente, para garantizar un buen rendimiento en este kit, se debió contar con una concentración mínima de DNA de 200 ng en 35 μ L para cada una de las muestras candidatas para ser secuenciadas, por lo que fue necesario realizar previamente una dilución (esto es, DNA genómico en buffer de elusión) de cada una de las muestras, siendo este el primer criterio limitante de selección de muestras para ser posteriormente secuenciadas. Los principales pasos para la preparación de librerías, luego de tener la concentración deseada de 200 ng de DNA genómico, son los siguientes: **(a)** se inicia con un proceso de fragmentación del DNA, la que se realiza a través de una digestión enzimática por un mix de enzimas (10 μ L, *KAPA Frag Enzyme*) durante 5 a 10 minutos (dependiendo del grado de fragmentación de la muestra, identificado previamente), con una temperatura de 37°C ininterrumpidas en termociclador. Luego, se continúa con un paso de **(b)** reparación de los extremos digeridos, y adición de cola de adeninas (*i.e.* proceso de *A-tailing*) (10 μ L, *End Repair & A-Tailing Master Mix*) durante 30 minutos a una temperatura de 65°C. Posteriormente, se continúa con un paso crítico de **(c)** ligamiento de los adaptadores, los que contienen adicionalmente los índices o *Indexs* (5 μ L, *Single Indexed Adapter*), lo que permitirá diferenciar cada una de las muestras con un selecto Index identificador, el cual es independiente y único para cada librería que corresponda a la misma muestra de origen tumoral. Es importante mencionar que en este

paso se modifica notoriamente el protocolo original para el uso de DNA genómico desde muestras de tumor FFPE, estableciéndose previamente en el laboratorio una estandarización del periodo de ligación, extendiéndose este paso a un total de 24 horas (incubación *overnight* a 20°C). Una vez cumplido el tiempo de ligación, se continúa al día siguiente con una selección del tamaño de los fragmentos, la que se realiza a través del uso de *beads* magnéticos *AMPure XP* (Roche Molecular Biochemicals, USA), en una relación de 0,8 entre volumen de librería y *beads*, lo que permite la selección de tamaño y los consecutivos pasos de lavado (pasos de *clean-up*) con etanol 80%, y finalmente elución en buffer. Otra modificación realizada debido a las características de DNA genómico proveniente de muestras FFPE con mayor grado de degradación, fue limitarse a sólo una selección de tamaño (*single-size selection*), y no una selección doble (*double-size selection*). Posteriormente, se realizó una **(e)** amplificación de la muestra por PCR, para luego un nuevo proceso de lavado (*clean-up*), eluyendo la muestra en 53 µl de buffer de elución, para obtener un volumen total de 50 µl. Finalmente, el último paso corresponde al **(f)** enriquecimiento por hibridación de sondas de la librería. La hibridación se realizó utilizando el kit *SeqCap EZ probe pool* y el kit *HyperCap Target Enrichment Kit* (Roche Molecular Biochemicals, USA). Se utilizaron 300 ng de librería por pool de librerías. Posteriormente, luego de una hibridación de 24 horas a 47°C, se realizó una captura de híbridos de DNA con *beads* (*SeqCap capture beads*), con cada respectivo proceso de lavado. Se concluye el proceso con un PCR Post-Captura (25 µL, *KAPA HiFi Hotstart Ready Mix*) y un lavado final con *beads* (*AMPure XP*).

La calidad de las librerías generadas se evaluó en el equipo *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical, USA) en las etapas correspondientes, según concentración e integridad de la muestra, así como de tamaños de fragmentos (*pb*) esperados para cada paso. Una vez finalizada la confección de librerías, se realizaron agrupaciones de librerías (*i.e.* “Multiplex”

de las librerías en proceso de pre-captura, conformadas como un conjunto integro de librerías combinadas, identificadas cada una de ellas por su índice individual), las cuales fueron utilizadas para el cálculo final del pool de secuenciación (*i.e* Multiplex individual o grupo de Multiplexs que serán secuenciados) y su posterior denaturación.

Como se mencionó previamente en Introducción (Ver Punto 1.5), se utilizó para el desarrollo de la metodología de esta tesis el panel de genes *TumorSec*, el que fue diseñado para uso en pacientes de Chile, contemplando genes de importancia oncológica tales como *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *KIT*, *EGFR*, *PDGFRA*, y *ERBB2*. Además se incluyen genes *AKT1*, *PIK3CA*, *PTEN*, *ARID1A*, y *TP53*, entre otros (Ver **Anexo, Tabla 8.2**). La secuenciación fue realizada en el equipo *Illumina MiSeq* (Illumina, USA), utilizando el kit de secuenciación *MiSeq Reagent Kit V2, 300 cycle* (Illumina, USA). Se descargó posteriormente la información obtenida directamente del secuenciador MiSeq (o a través de plataforma online de *BaseSpace*), obteniéndose archivos de extensión **.fastq*.

3.5 Análisis bioinformático

El flujo de trabajo bioinformático para el llamado de variantes fue previamente establecido para su uso en el Laboratorio de Genómica del Cáncer. El flujo de trabajo *TumorSec* contempla la detección de variantes sin utilizar una muestra de tejido sano o germinal (*e.g.* muestra de sangre), basándose principalmente en la descripción de flujo bioinformático de trabajo para el llamado de variantes *GATK Best Practices*. Se trabaja inicialmente desde archivos **.fastq*, en un ambiente *UNIX*, donde se contempla 3 etapas principales: inicialmente se realiza un **(1)** control de calidad de las secuencias (*fastQC*), y un proceso de **(2)** alineamiento *i.e.* determinación de la posición de las lecturas en un genoma de referencia (*SAMtools*, *BWA-MEM*). Se incluyen además pasos intermedios de control de calidad, procesos de *trimming* (*i.e.* limpieza a través de remoción de secuencias), eliminación de

duplicados (*Picards tools*), realineamiento de *indels*, re-calibración de puntaje de calidad de bases (*BQSR*), y la evaluación de métricas de alineamiento (*Mosdepth*), antes de finalmente realizar un último paso de (3) llamado de variantes *i.e* detección de variantes en los fragmentos secuenciados. Para este último paso, se utiliza *SomaticSeq*, un conjunto de herramientas el cual utiliza el consenso de diferentes llamadores de variantes (*Mutect2*, *VarScan2*, *VarDict*, y *LoFreq*) para asegurar la correcta filtración de falsos positivos. Luego de obtener el archivo que contiene el listado de variantes (archivo de extensión **.vcf*), se realiza una anotación por *ANNOVAR*, obteniéndose un archivo de texto (**.vcf.multianno.txt*) con la anotación de las variantes encontradas.

3.6 Análisis y filtrado de variantes

Se utilizó como principal criterio de calidad de secuenciación de la variantes una profundidad promedio por sobre 200X en más del 70% de las regiones blanco, y un número de lecturas >12 para el alelo alternativo. Cada archivo de variantes (**.vcf*), correspondiente a cada muestra, se cargó en la plataforma web *Cancer Genome Interpreter* (CGI) (acceso a través de dirección <http://www.cancergenomeinterpreter.org>), analizándose según la opción de cánceres sólidos. Esta plataforma facilita la identificación de alteraciones tumorales *drivers*, y la detección de aquellas que pueden ser de utilidad terapéutica, basándose en conocimiento existente en distintas fuentes que registran las alteraciones con distintos niveles de evidencia.

Una vez obtenido aquel archivo, se realizó el primera filtrado de variantes: inicialmente, se filtró por frecuencia alélica, eliminando en base a frecuencia alélica (AF) igual a cero ($AF = 0$) e igual a uno ($AF = 1$), para eliminar así potenciales mutaciones germinales. Se filtraron demás aquellas variantes con una frecuencia menor a 0,05. Es importante también mencionar aquellos filtros referentes a la calidad de secuencia, tales como profundidad de secuenciación ($DP > 12$); así como también aquellos filtros realizados en el análisis bioinformático que se

reflejan en el archivo de variantes, eliminando variantes de baja calidad “*LowQual*” en la columna de filtrado. Posteriormente, se filtró adicionalmente aquellas variantes reportadas como polimorfismos en base a valor en reservorio de datos exónicos germinales “*ExAC*” (*Exome Aggregation Consortium*), o identificadas como polimorfismos para CGI.

Para el segundo proceso de filtrado, se filtró por tipo de mutación, eliminando todas las mutaciones exónicas que no representaban un efecto para las proteínas codificadas, y que por ende, en teoría no corresponden a variantes patogénicas. Se eliminaron entonces mutaciones clasificadas como alteraciones en regiones 3’UTR y 5’UTR, deleciones e inserciones intrónicas, variaciones de nucleótido único intrónicas, y alteraciones en sitio de *Splicing*.

3.7 Análisis de bases de datos internacionales

Las comparaciones de los resultados obtenidos frente la información asequible en pacientes con CVB en otras poblaciones fueron realizadas utilizando las bases de datos disponibles en las plataformas web *cBioPortal* y *CGCI* (acceso a través de las direcciones web: *cbioportal.org*, y *dcc.icgc.org*, respectivamente). En la plataforma *cBioPortal*, se encuentra disponible (hasta la fecha) información sólo sobre dos estudios que contemplan muestras tumorales de CVB. El primero de ellos, corresponde a una cohorte de 32 pacientes de China (acceso a través de dirección *cbioportal.org/study/summary?id=gbc_shanghai_2014*) que contempla 17 mujeres y 15 hombres, con una edad de diagnóstico promedio de 65 años, y con un total de 18 pacientes que presentan antecedentes de cálculos biliares (56%). El segundo estudio corresponde a 81 pacientes de tres distintos cohortes analizados en el centro de cáncer Memorial Sloan-Kettering (MSK), compuesto por un cohorte de 49 pacientes de Estados Unidos, un cohorte menor de 11 pacientes de Japón, y un cohorte 21 pacientes de Chile (acceso a través de dirección *cbioportal.org/study/summary?id=gbc_msk_2018*). El cohorte de 49 pacientes de Estados Unidos se compone de 28 mujeres y 19 hombres, con una edad media

de diagnóstico de 66 años, y con 32 pacientes con antecedentes de cálculos biliares (65%). Por otra parte, el cohorte reducido de 11 pacientes de Japón se compone de 7 hombres y 4 mujeres, con una edad promedio de diagnóstico de 72 años, y con sólo 4 pacientes con antecedentes de cálculos biliares (36%), mientras que el cohorte de pacientes de Chile, presenta 17 mujeres y 4 hombres, con una edad promedio de 59 años, y con 14 pacientes con antecedentes de cálculos biliares (67%). En la plataforma CGCI, de igual forma, se encuentra disponible información sobre dos grandes proyectos: el primero de ellos corresponde a 239 pacientes del Centro Nacional del Cáncer de Japón, con 139 hombres y 79 mujeres, y con una edad promedio de diagnóstico de 70 años para ambos sexos (acceso a través de dirección icgc.org/icgc/cgp/91/420/1012366). El segundo proyecto corresponde a 72 pacientes del Centro Nacional del Cáncer de Singapur, compuesto por 41 hombres y 30 mujeres, con una edad promedio de 65 años para ambos sexos (acceso a través de dirección icgc.org/icgc/cgp/91/542/1003894).

3.8 Análisis estadístico y generación de gráficos

A través de la plataforma *Cancer Genome Interpreter*, se determinó el grado de patogenicidad de las variantes encontradas en base a un puntaje de patogenicidad denominado *CADD* (*Combined Annotation Dependant Depletion*), valor ampliamente utilizado para el estudio de variantes en cáncer, que permite la segregación de mutaciones altamente deletéreas ⁴¹. Los análisis estadísticos para determinar el grado significancia de mutaciones detectadas y su asociación con características de los pacientes se realizaron en software R y Rstudio v.3.1 (RStudio, Inc., Boston, USA) ⁴². Para la visualización de las variantes se obtuvieron gráficos a través de los paquetes de R *maftools* ⁴³ y *ggplot2* ⁴⁴. El análisis de agrupación, con un método de *Bootstrap* para determinar robustez, fue realizado con paquete de R *pvclust* ⁴⁵. Los gráficos adicionales y cálculos estadísticos fueron realizados complementariamente con el software

GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software, California, USA). Para el cálculo del tamaño muestral y del poder estadístico del test no paramétrico Kruskal-Wallis, se utilizó el software *PASS 2019 Power Analysis and Sample Size Software* (NCSS LLC., Utah, USA).

La metodología utilizada en el presente trabajo se ilustra en el siguiente flujograma (Figura 1). Como se mencionó previamente, el análisis bioinformático corresponde al único paso que no se contempla dentro del trabajo desarrollado directamente de esta tesis, es decir, el análisis de los archivos de secuencias crudas **.fastq*, hasta la obtención del archivo de variantes **.vcf* no filtrado. Este análisis ha sido estandarizado y realizado por la Ingeniera en Bioinformática Evelin González Feliu, del laboratorio Genómica del Cáncer y laboratorio GENOMED, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se detalla adicionalmente el panel de genes analizados con TumorSec, donde se incluyen regiones de secuenciación de exones completos (color azul) así como regiones ‘hotspot’ target (color rosado) (Ver Anexo, Tabla 8.2).

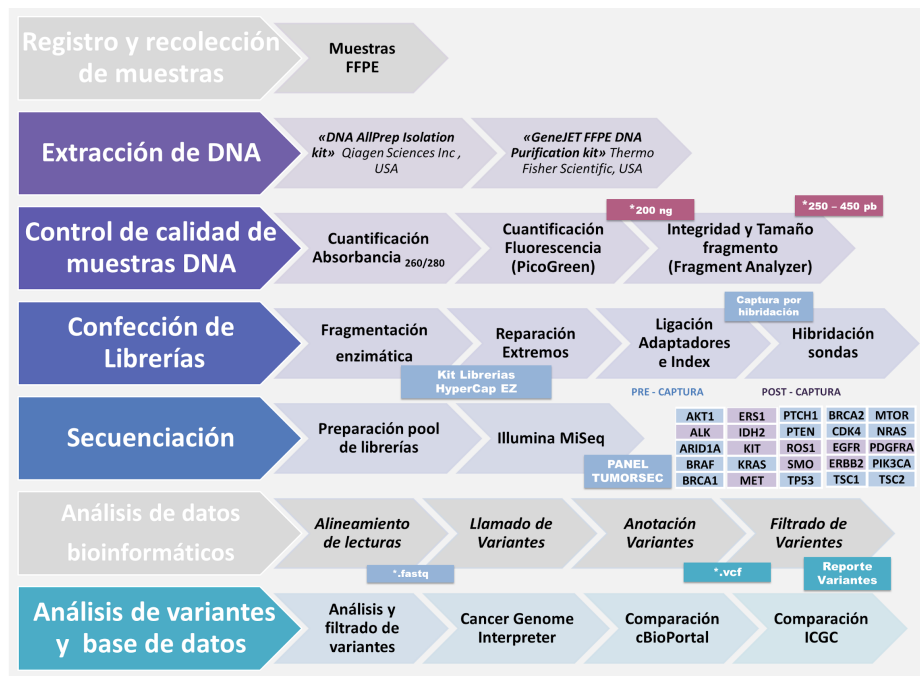


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología utilizada en esta tesis, identificando las actividades en orden secuencial. Se destacan en color aquellas actividades realizadas explícitamente en el desarrollo de la tesis presentada.

4. Resultados

4.1 Registro e información de Pacientes incluidos en el estudio

El número final de pacientes con CVB cuyos tumores fueron exitosamente secuenciados corresponde a un total de 34. Estos provienen de diversos centros de origen a lo largo de Chile. En general, corresponden a pacientes en su mayoría de sexo Mujer (80%), con un promedio de edad de 72 años, y con antecedentes de Colelitiasis (93%). Es necesario mencionar, que al término de este trabajo no se contó con la ficha clínica de 4 de los 34 pacientes totales (Ver **Tabla 1**).

Tabla 1. Presentación clínica del total de 30 pacientes con ficha clínica disponible

Parámetros		n = 30
Edad	Promedio	72
	Rango	(52-91)
Sexo	Mujer	24 (80%)
	Hombre	6 (20%)
Etnia	Chilena	27 (90%)
	Mapuche	2 (7%)
	Aymara	1 (3%)
Colelitiasis	Si	28 (93%)
	No	2 (7%)
Grado Histológico	G1	5 (17%)
	G2	7 (23%)
	G3	2 (7%)
	UNK	16 (53%)

4.2 Resultados de Librerías y Secuenciación

El total de las muestras que fueron consideradas inicialmente para este estudio corresponde a 78 muestras de tumores de cáncer de vesículas biliares FFPE que contaban con ADN genómico disponible, extraído durante o al inicio del desarrollo de la metodología. De estas muestras, se realizó la secuenciación dirigida de alta profundidad (tNGS) para un total de 56 librerías, de las cuales se obtuvieron 39 librerías secuenciadas exitosamente, con datos de una

calidad utilizable para el presente estudio (**Tabla 2**). Considerando que cinco (5) de ellas fueron realizadas en duplicado, se contó finalmente con un total de 34 pacientes (Ver **Figura 2**). De esta forma, 44 muestras (de un total de 78) no pasaron los criterios de calidad suficientes para iniciar o continuar la confección de librerías para secuenciación, o bien no lograron alcanzar las métricas de calidad deseadas al momento de ser secuenciadas (Ver **Anexo, Tabla 8.4 — 8.9**).

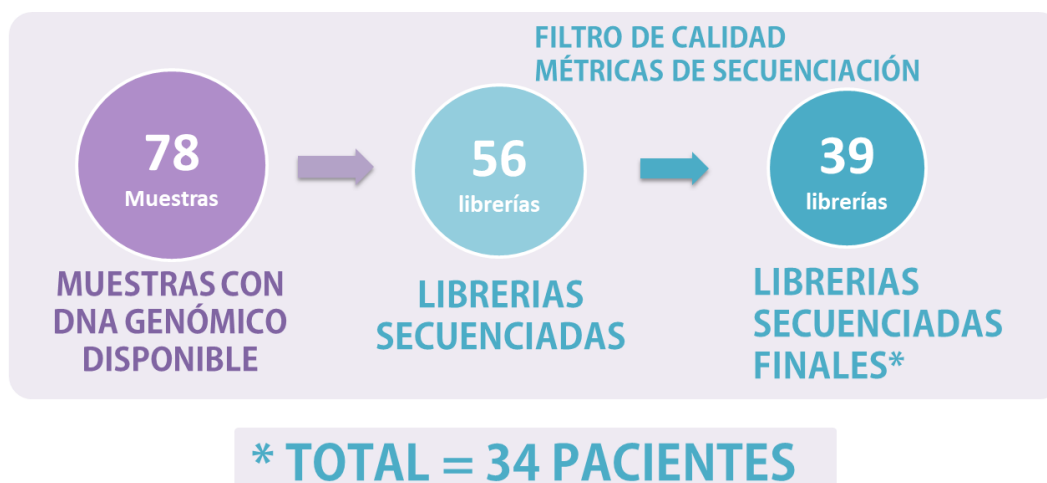


Figura 2. Número de muestras de CVB durante el proceso de extracción de DNA, preparación de librerías, y secuenciación final. (*) *Las muestras finales corresponden a la secuenciación de 39 librerías, de las cuales se incluyen 5 duplicados, representando finalmente un total de 34 pacientes.*

Se realizaron un total de 11 corridas de secuenciación NGS. Inicialmente, se realizaron pools de secuenciación que contemplaban únicamente muestras de tipo tumoral de CVB, siendo la primera de ellas realizada el día 06 de Junio del 2019, utilizando dos *Multiplex* de 4 librerías, respectivamente (*Multiplex A* y *Multiplex C*; para un total de 8 muestras). Posteriormente, el día 1ero de Julio se realizó una segunda corrida de secuenciación, con dos *Multiplex*s de 3 librerías cada uno (*Multiplex D* y *Multiplex E*, total de 6 muestras). Finalmente, el día 05 de Julio se realizó la tercera corrida, la cual fue realizada con 1 *Multiplex* único de 6 muestras (*Multiplex F*, total de 6 muestras). Posteriormente, se realizaron secuenciaciones que

contemplaban muestras de CVB así como de otros tipos tumorales (por ejemplo, librerías de cáncer de ovario), por motivos operacionales. Estas secuenciaciones se realizaron los días 02, 22, y 30 de Agosto, 14 y 25 de Septiembre, 17 y 26 de Octubre, y finalmente el día 04 de Noviembre. En todos los casos, se llevó cada pool a una concentración de 4,0 nM, para luego dejar una concentración final del pool entre un rango de 9,6 a 9,4 pM. Los electroferogramas obtenidos en el equipo *Fragment Analyzer*, los cuales reflejan la integridad y tamaño de fragmentos de cada *Multiplex* utilizado, se muestran en la **Figura 3**.

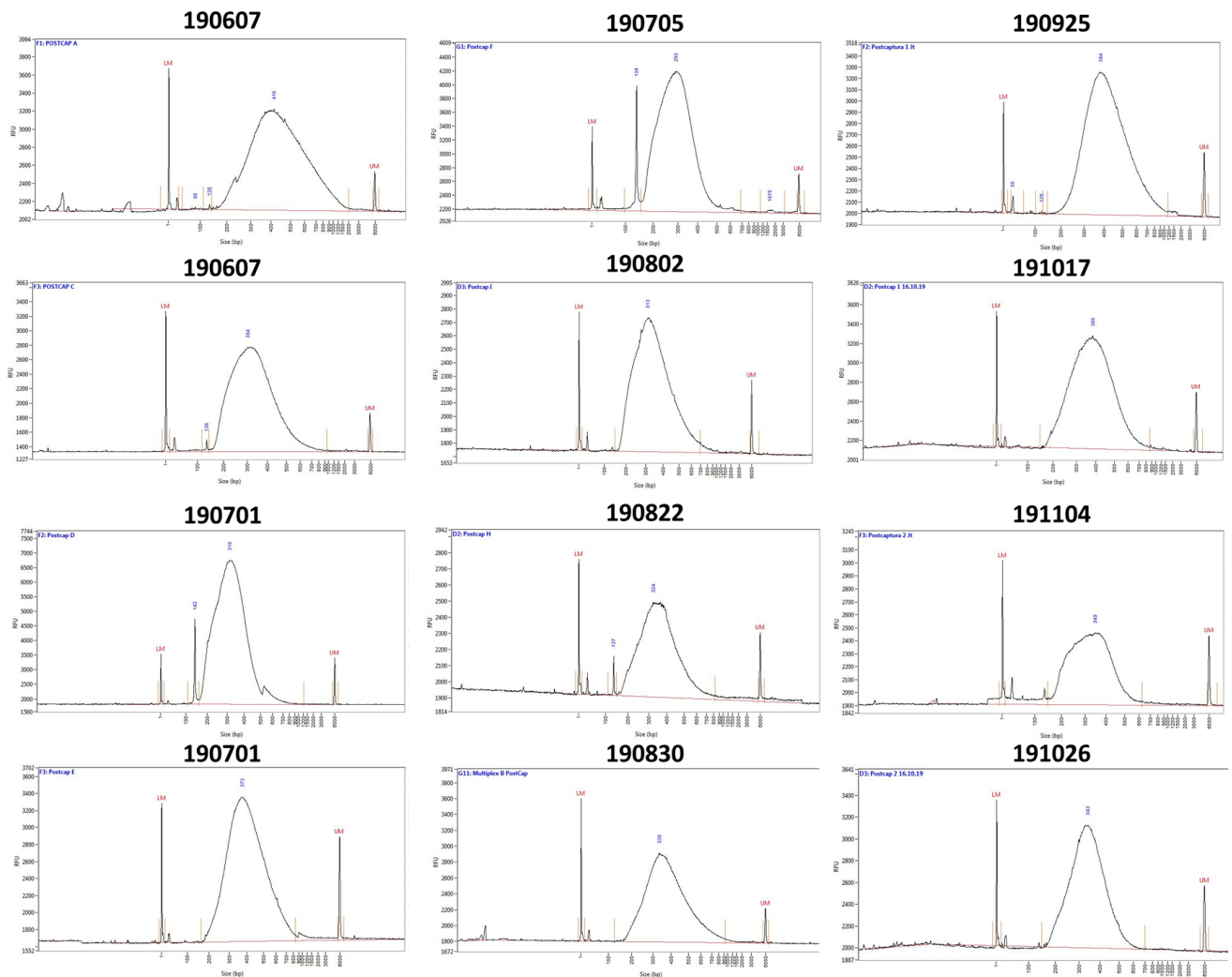


Figura 3. Electroferogramas de *Multiplex*s utilizados para las 11 corridas de secuenciación. Se indica número de identificador (ID) de cada corrida y tamaño de fragmento de cada *Multiplex* (pb).

4.3 Métricas de Secuenciación y de llamado de variantes

Se realizó la secuenciación de 56 muestras de CVB distribuidas en 11 corridas de secuenciación (entendiéndose como aquellos procesos de secuenciación individuales efectuados en el equipo de secuenciación MiSeq, Illumina). En base a las métricas para las 11 corridas de secuenciación exitosas, se determinó una cantidad final de 39 librerías que superaron los criterios de calidad en cada paso crítico de la metodología (Ver **Anexo, Tabla 8.10 — 8.12**), las que representaron un total de 34 pacientes. Las métricas generales obtenidas para las corridas y muestras se indican en **Tabla 2** y **Tabla 3**, respectivamente. El porcentaje de lecturas que pasaron el filtro inicial fue superior a 80% para gran parte de las corridas, obteniéndose en general valores adecuados, según métricas de calidad, que permitieron el procesamiento de la corrida sin interrupciones. Cabe destacar que se obtuvieron altos valores de *clusterización*, sin superar el valor máximo recomendado de $1,300\text{ K/mm}^2$, finalizando apropiadamente cada una de las corridas con al menos un total de 70% de las lecturas por sobre el puntaje de calidad $Q30$ (1 error cada 1000 bases). Es importante notar que a pesar del bajo porcentaje de lecturas en las regiones *on-target* (lecturas en la región blanco / lecturas alineadas totales) que se obtuvo en la corrida *190705*, las lecturas obtenidas luego del procesamiento bioinformático sí fueron suficientes para hacer el llamado de variantes con la profundidad deseada. La profundidad promedio de regiones blanco para cada una de las muestras y para cada una de regiones blanco se muestra en la **Figura 8.3**, en la sección de **Anexos**. Además, se obtuvo información respecto a la profundidad obtenida de cada variante específica que pueda ser de interés en cuanto a su accionabilidad o que sea de valor predictivo de respuesta a terapia en base a la información disponible en plataforma Cancer Genome Interpreter (GCI) (Ver **Anexo, Tabla 8.13**).

Tabla 2. Métricas de control de calidad de corridas secuenciación

ID Corrida	Cantidad de Lecturas que pasan filtro (%PF)	Calidad de Lecturas	Densidad (K/mm2)	Clúster PF (%)
190607	92,5	74,44% > Q30	965 ±27	92,50
190705	89,9	85,61% > Q30	1,266 ±49	89,89
190701	92,1	88,13% > Q30	1,123 ±41	90,85
190802	79,4	87,77% > Q30	1,023 ±21	87,77
190822	89,8	89,81% > Q30	1,166 ±36	89,80
190830	92,8	92,18% > Q30	1,008 ±37	92,84
190914	93,4	94,06% > Q30	994 ± 32	93,38
190925	93,8	91,82% > Q30	909 ±31	92,80
191017	92,5	89,42 % > Q30	1,031 ±24	92,52
191026	90,4	87,10 % > Q30	1,156 ±50	93,33
191104	91,7	91,69 % > Q30	1,068±49	92,28

4.4 Análisis de variantes

Inicialmente, para las 39 librerías secuenciadas, se detectaron 6111 variantes en 25 de 25 genes, distribuidas en la totalidad de los 34 pacientes, las cuales se sometieron a dos procesos de filtrado de variantes (Ver **Metodología, Punto 3.6**). Para el primer filtrado, se redujo el valor a un total de 863 variantes para los 34 pacientes en estudio, detectando al menos 1 de estas variantes en 20 de los 25 genes que componen el panel utilizado (Ver **Figura 4**). La clasificación de estas variantes incluyeron inicialmente alteraciones en elementos 3'UTR y 5'UTR, mutaciones *missense* (*i.e.* mutación con *cambio de sentido*), deleciones *In-frame* (*i.e.* mutación que no produce un cambio en el marco de lectura), mutaciones en intrones, y mutaciones silenciosas o *silentes* (Ver **Anexo, Figura 8.4 – 8.5**).

Tabla 3. Métricas de calidad para cada muestra secuenciada. Se consideran un total de 39 librerías, correspondiente a 34 pacientes. Se indica cada respectiva corrida de secuenciación. Se señalan muestras en duplicado con asteriscos sombreados (*).

ID Corrida	Muestra	Nº reads antes trimming	Nº reads despues trimming	Porcentaje duplicados	Porcentaje de reads on targets	Profundidad promedio en regiones targets	Porcentaje de uniformidad
190607	CR106-INC	5534960	4642244	34,7	68,0	1822,6	94,5
190607	CR132-HCO	4489610	3735292	39,5	50,1	814,3	87,1
190607	CR20-HPH	3030770	2518948	41,1	54,1	581,0	98,2
190607	CR286-HPH	4979546	3652428	13,2	69,9	2013,5	96,3
190607	CR45-HRT	4792932	3898006	38,6	53,7	857,0	96,9
190607	CR65-HRT	4382494	3761982	43,7	52,1	623,0	97,5
190607	CR67-HRT	3365670	2778142	21,7	70,7	1140,4	96,3
190607	CR68-HRT	2828738	2055170	16,1	65,9	976,1	91,1
190701	CR101-INC	3668128	3307714	37,3	69,1	1155,0	93,9
190701	CR253-HCC	7320008	5868832	9,1	17,7	682,7	96,0
190701	CR27-HPH	6434478	5733778	4,7	15,0	572,5	92,0
190701	CR326-HPH	6853884	6398008	50,5	70,8	1719,5	98,5
190701	CR54-HPH	5793328	5350142	46,2	69,7	1544,4	96,9
190705	CR140-HDS*	4702348	4251822	12,2	21,4	604,4	91,7
190705	CR247-HCC	8287274	5851354	12,4	12,0	377,9	97,2
190705	CR29-HSJD*	14548232	12216214	7,6	11,3	842,3	75,5
190705	CR30-HPH*	4530360	4093018	5,9	18,8	515,4	92,9
190705	CR325-HCC	4323622	3936924	12,0	17,8	464,1	92,9
190705	CR60-HPM*	5373036	4748596	8,7	14,1	407,6	95,7
190802	CR140-HDS*	5892752	5481186	49,8	61,5	1365,0	96,3
190802	CR255-HCC	3785426	3310950	58,3	42,5	294,7	98,8
190802	CR29-HSJD*	6461398	5783490	40,3	59,8	1386,7	81,3
190802	CR30-HPH*	3747548	3459228	27,0	67,7	1277,7	95,7
190802	CR325-HCC	4947682	4481864	52,6	58,2	965,9	98,5
190802	CR60-HPM*	3844984	3502768	44,2	58,8	782,4	98,5
190822	CR111-HPM	6277642	5878092	54,0	60,0	1184,2	96,3
190822	CR33-HCOR	4251718	3816800	51,9	57,1	680,6	97,9
190830	CR114-HPM	7213420	6815210	43,4	68,1	1942,5	98,2
190830	CR300-HPH	2446990	2252978	36,8	66,5	746,2	90,5
190830	CR309-HPH	6365742	6013258	46,8	65,4	1397,5	98,8
190830	CR59-HPH	7761350	7193402	41,8	63,5	2234,3	86,2
190914	1293-UC	3596604	3460772	32,2	66,6	1289,2	97,2
190914	1703-UC	5226158	4945784	61,9	55,6	778,2	97,2
190914	1788-UC	4478022	4311346	42,1	67,0	1408,3	96,9
190925	CR19-HPM*	4697292	4493180	56,5	39,5	632,8	99,1
190925	CR19-HPM*	5187084	4820200	47,4	51,2	1067,7	98,5
191017	CR39-HPM	4514150	4162762	57,7	55,8	732,3	98,5
191026	1573-UC	10385000	9633808	76,0	45,8	787,9	98,5
191030	CR113-HPM*	14055090	2350872	49,8	32,5	233,5	84,0

Luego del primer proceso de filtrado, se realizó un segundo filtrado más detallado de las variantes, en el cual se eliminó aquellas variantes que no fueran exónicas y las mutaciones sinónimas sin efecto en la proteína (**Figura 4**), quedando entonces seleccionadas finalmente un total de 57 variantes somáticas en 12 de los 25 genes del panel utilizado, en 26 de los 34 pacientes en estudio (76%) (**Figura 5.A**). Para estas, se detectaron cuatro clases distintas de mutaciones en los 12 genes a lo largo de las muestras secuenciadas (**Figura 5.B**), estas corresponden a: mutaciones con cambio de sentido (*Missense*) (87,88%), mutaciones sin sentido (*Nonsense*) (7,58%), y mutaciones con desplazamiento del marco de lectura por inserción (*Frame_Shift_Ins*) (1,52%) y por delección (*Frame_Shift_Del*) (3,03%). Estas mutaciones fueron en su amplia mayoría variantes de tipo SNV (*i.e.* variaciones de nucleótido único) (**Figura 5.C**), principalmente a través de sustituciones ‘*T>C*’ y ‘*C>T*’ (**Figura 5.D**).



Figura 4. Esquema de proceso general de filtrado de variantes. Se muestra número de variantes detectadas inicialmente, y luego de un primer (863 variantes) y un segundo (57 variantes) proceso de filtrado.

Los genes que presentaron mutaciones con mayor frecuencia corresponden a *TP53* (47%), *KRAS* (15%), *ARIDIA* (12%), *TSC2* (12%), *BRCA1* (9%), y *ERBB2* (9%) (**Figura 6**). Se destaca que mutaciones por desplazamiento del marco de lectura se registraron solamente en los genes *ARIDIA* (delección e inserción) y *TP53* (inserción), mientras que mutaciones sin sentido fueron detectadas sólo en genes *AKT1* y *TP53*.

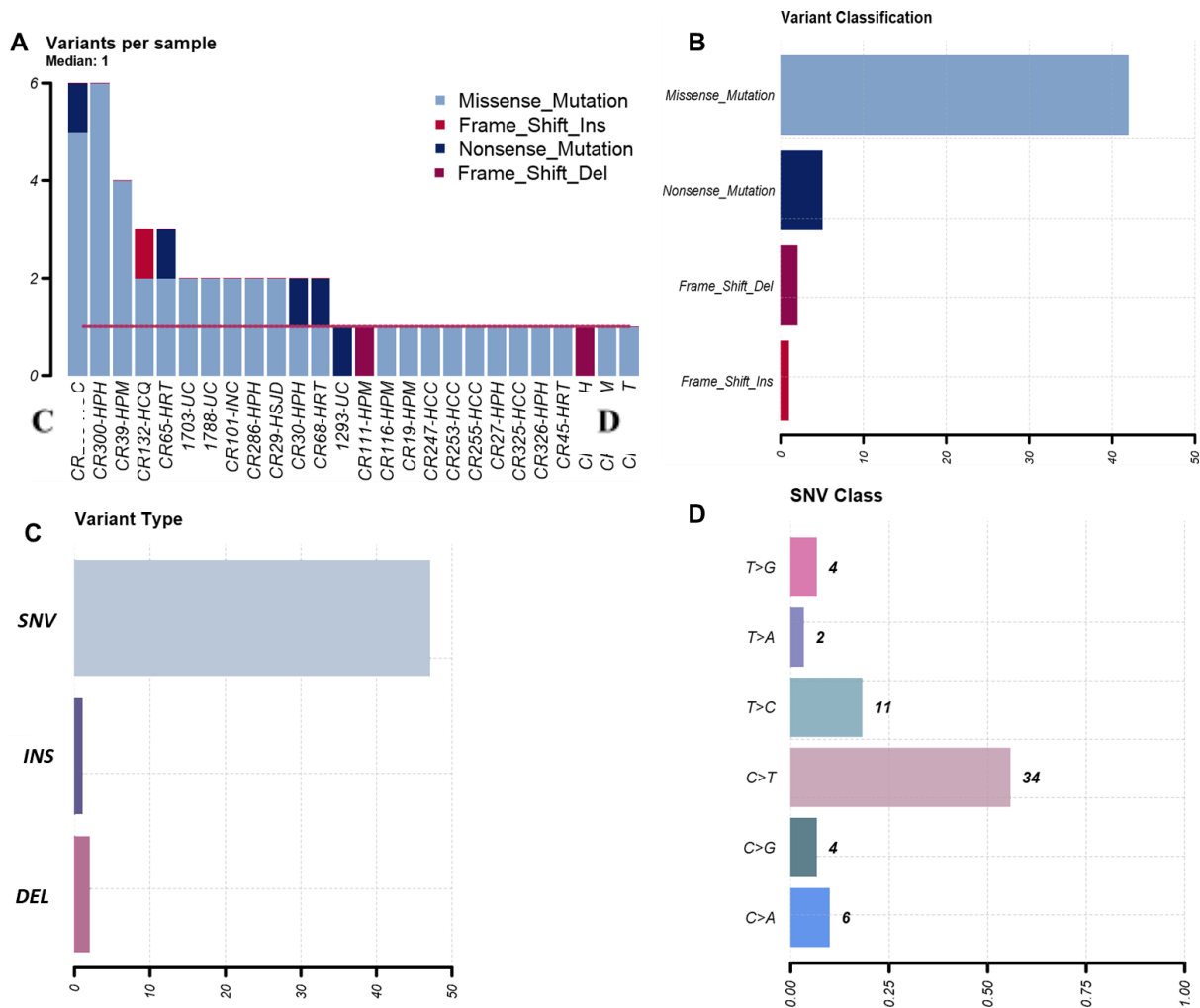


Figura 5. Resumen de mutaciones somáticas totales (57) detectadas en muestras de tumores (n=34); **(A)** Número de variantes detectadas (eje Y) en cada paciente (eje X). Línea roja indica la media obtenida (= 1) para total de mutaciones por muestra. Colores de columna indican los distintos tipos de mutaciones y se muestran en la leyenda: color Celeste para mutaciones *missense*, Azul Oscuro para *nonsense*, Rojo para cambio de lectura por inserción, y Rojo Oscuro para cambio de lectura por delección; **(B)** Cantidad total de mutaciones detectadas (eje X) según tipos de mutaciones identificadas (Eje Y), con su respectivo color; **(C)** Número de mutaciones (eje X) según clasificación de variantes detectadas; **(D)** Número de mutaciones (eje X) según tipos de variaciones de nucleótido único identificadas (eje Y).

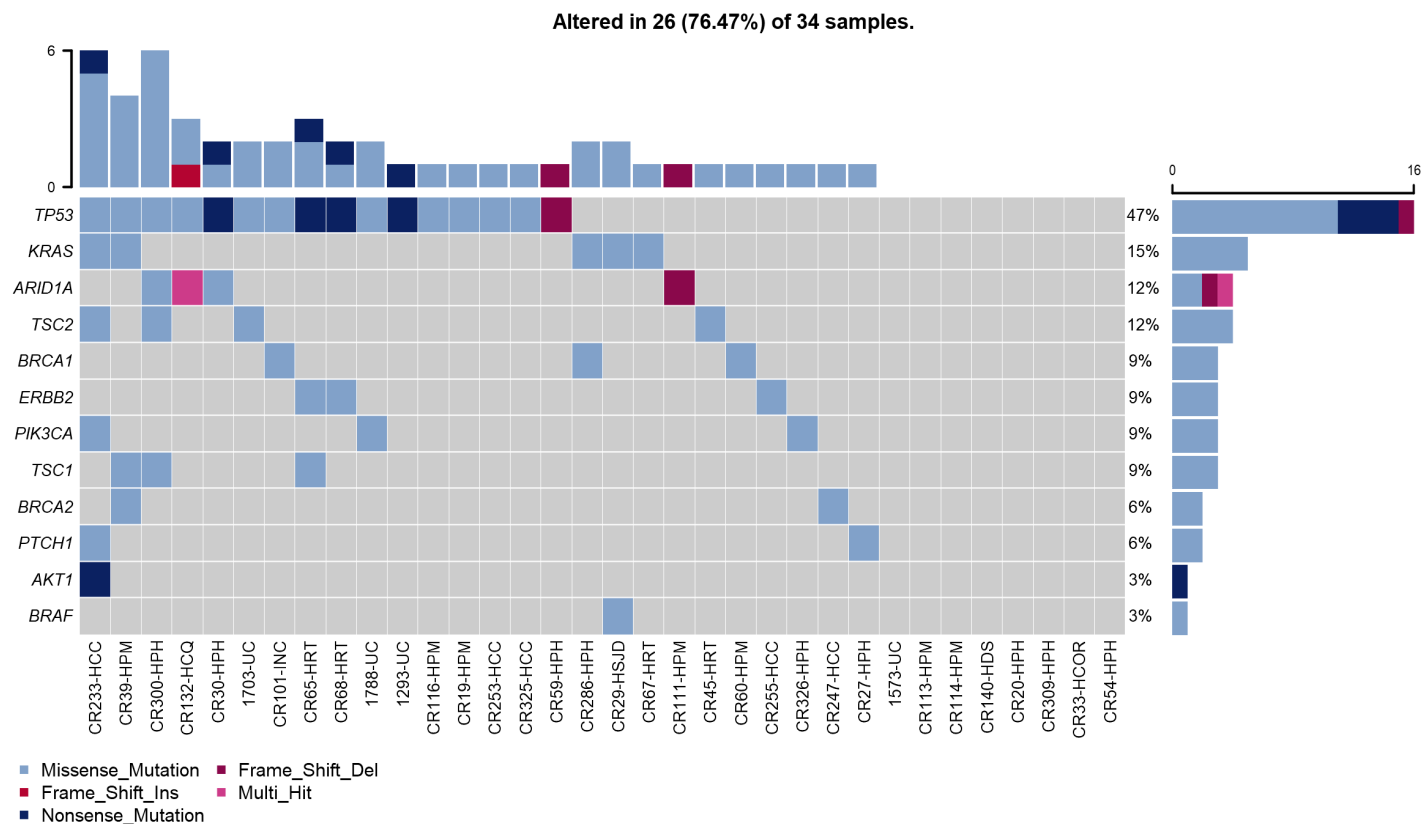


Figura 6. OncoPrint (gráfico de distribución) del estado mutacional de genes detectados para filtrado final de variantes (57) distribuidas en 26 de 34 pacientes (76%). A lo largo de las columnas se señalan las muestras (eje X) con las variantes detectadas para el total de 25 genes del panel TumorSec (eje Y). Gráficos de barras para columnas indican número de variantes por muestras, mientras que gráfico lateral según filas indican número de variantes según cada gen, junto con su frecuencia (%). Para los genes representados por más de un tipo de mutación, se utiliza la denominación “Multi-Hit”. Los colores en cada cuadrado representan el tipo de mutación, de acuerdo a lo que se indica en la leyenda inferior de la figura.

Para las 45 mutaciones que producen cambio en la proteína (Ver **Anexo, Tabla 8.14**), en el total de los 12 genes mutados, se obtuvieron gráficos con información acerca de la ubicación y distribución de las mutaciones a lo largo de la proteína codificada por cada respectivo gen (**Figura 7** y **Anexo, Figura 8.6**). De igualmente forma, utilizando la clasificación en base a CGI, de las 57 alteraciones identificadas, 39 fueron identificadas como mutaciones conductoras o *drivers*, con 21 de ellas clasificadas como *drivers* previamente reportadas en otros tipos tumorales (36%), y 18 mutaciones descritas como potencialmente *drivers* (31%) (**Figura 8**).

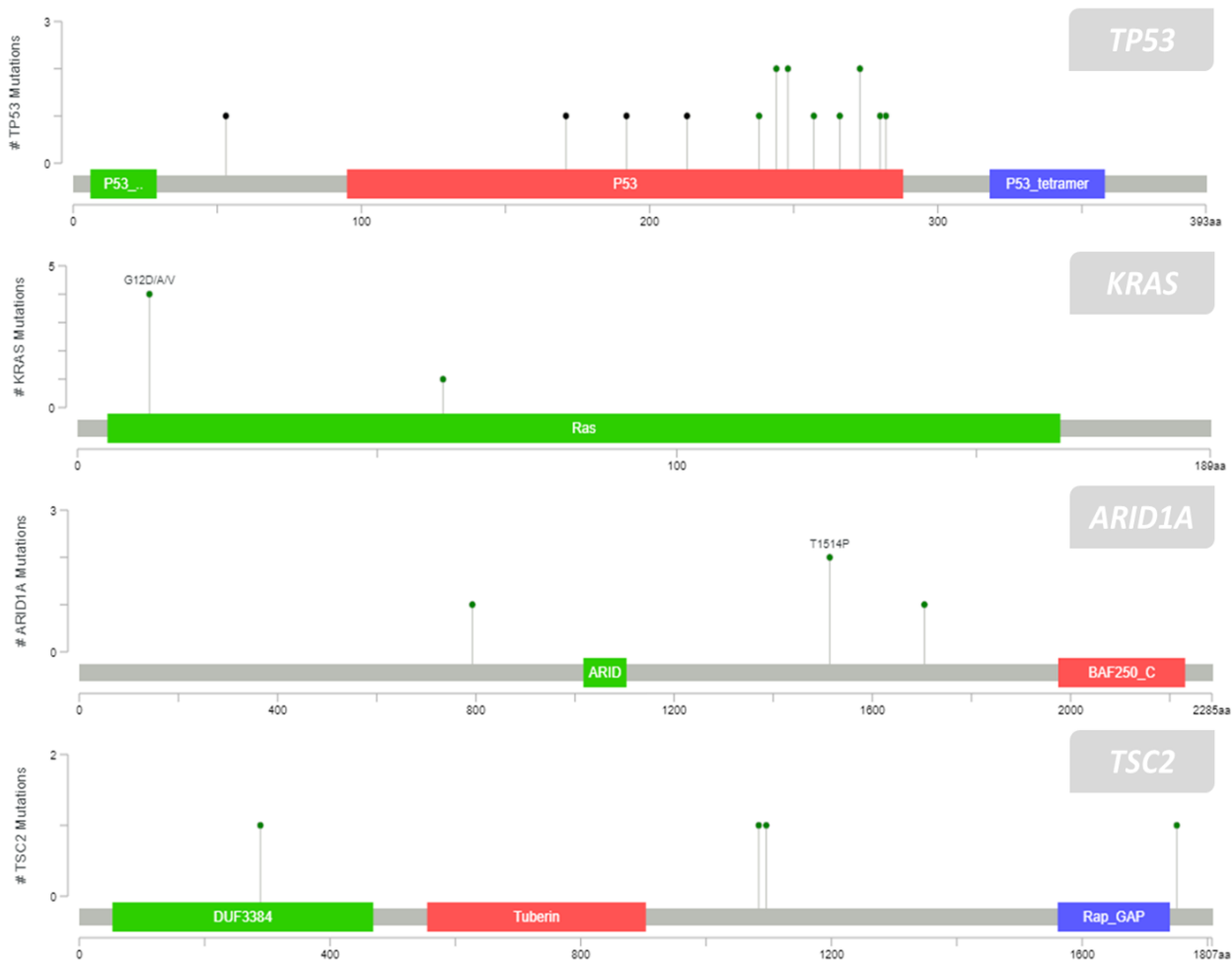


Figura 7. Gráficos de mapa de mutaciones (“Lollipop”) que ilustran la localización de las mutaciones en las proteínas codificadas por los genes analizados en el cohorte de pacientes. Se presentan gráficos de mapas de mutaciones para los 4 genes alterados con mayor frecuencia; *TP53*; *KRAS*; *ARID1A*; y *TSC2*.

Para la clasificación de las variantes de acuerdo al puntaje *CADD*, para la clasificación de las variantes obtenidas según su grado de patogenicidad, se obtuvo que un 38,6% de las mutaciones fueron clasificadas como mutaciones *muy altamente deletéreas*, un 26,3% como *mutaciones altamente deletéreas*; y un 21,0% fueron clasificadas como *mutaciones medianamente deletéreas* (**Figura 9**).

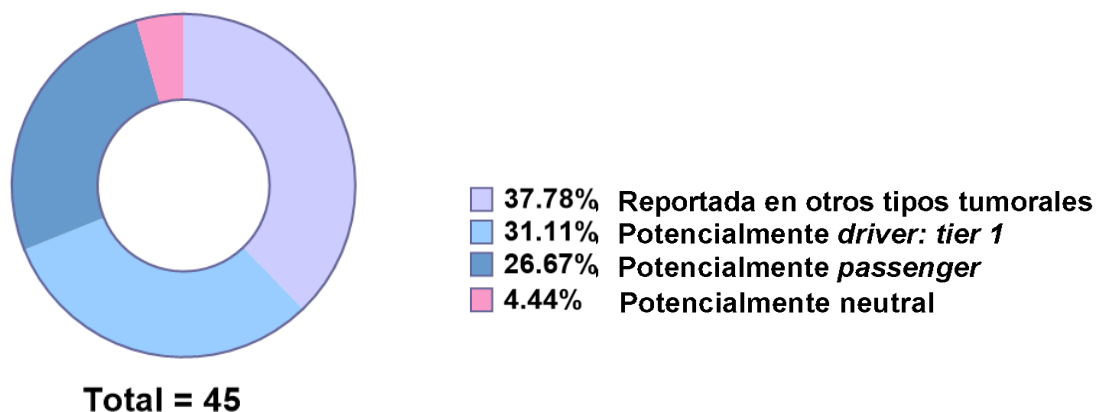


Figura 8. Análisis de variantes con efecto en proteína por CGI. Se indican variantes descritas con “*clasificación oncogénica*”. Se detalla clasificación *Tier 1*; como aquellas mutaciones *drivers* que presentan evidencia que ha demostrado su papel oncogénico en procesos de carcinogénesis.

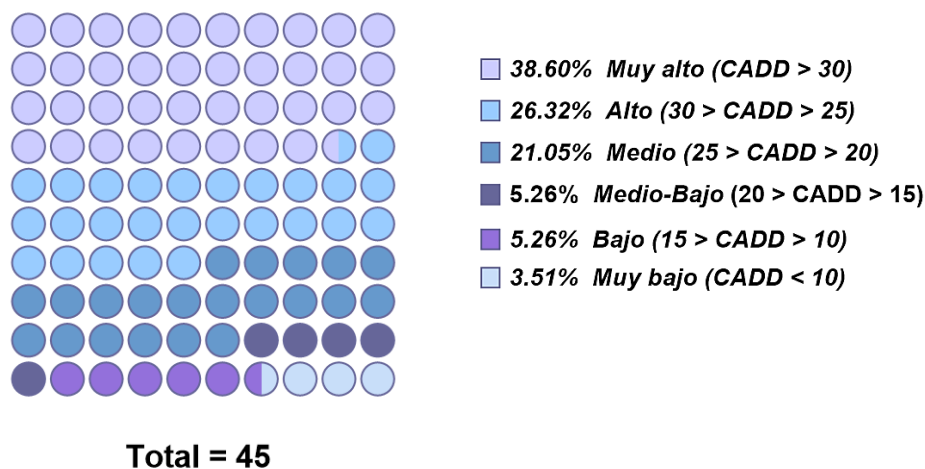


Figura 9. Variantes identificadas según valor de patogenicidad (*Deleterious Score, CADD*); clasificadas de acuerdo al grado “*deleterio*” de una variante, según lo indicado por plataforma CGI. Se indica en leyenda color para cada clasificación, desde ‘Muy Alto’ (valor *CADD* por sobre 30), hasta “Muy Bajo” (valor *CADD* menor a 10).

El análisis de variantes en la plataforma web *Cancer Genome Interpreter* (CGI), permitió la clasificación de un total de 45 variantes únicas con efecto en la proteína, detectadas para 26 de los 34 pacientes en el presente estudio (76%) (**Figura 10.A**), con 8 de ellos (24%) no presentando ninguna alteración identificada con tal efecto.

Así, la clasificación de las variantes caracterizadas a través de CGI, permitió identificar aquellos genes con la presencia de alteraciones accionables en este grupo de pacientes, que han sido previamente reportadas para otros tipos de tumores sólidos. Estas alteraciones fueron identificadas en su amplia mayoría para los genes *TP53*, *ARID1A*, *KRAS*, *TSC1/2*, y *BRCA2* (Ver **Anexo, Tabla 8.4**). El análisis de las variantes en CGI permitió de igual forma, el poder identificar el nivel de evidencia de estas mutaciones descritas como biomarcadoras de respuesta a terapia. En este grupo, se detectó un porcentaje de 13% de los biomarcadores con un nivel alto de evidencia, de acuerdo a la guía de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) (**Figura 10.B**). Entre ellos, se incluyen alteraciones en los genes *TSC2*, *TSC1*, *KRAS*, *BRCA2*, *BRAF*, *ERBB2* y *PTCH1* (**Tabla 4**). Referente al cómo la presencia de una determinada mutación en un gen biomarcador afecta la respuesta a un determinado medicamento en terapia; ocho de diez de estas alteraciones corresponden a biomarcadores de *respuesta* a tratamiento (es decir, en donde la alteración genómica confiere sensibilidad al fármaco), mientras que dos (2) alteraciones fueron clasificadas como *resistente* (esto es, que la alteración confiere resistencia al fármaco utilizado). En cuanto al resto de evidencia, se encontraron también alteraciones en biomarcadores con un grado de evidencia ‘Alto’ según la guía de la Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN), así como también en una etapa de “*Ensayos Avanzados*” (**Figura 10.B**). No obstante, el resto de las mutaciones presentaron un grado de evidencia menor; en su mayoría clasificadas en una etapa “*Pre-clínica*”, seguidas por “*Ensayos tempranos*” y “*Reportes de casos*”. Se considerado como “*Ensayos tempranos*” a ensayos clínicos en fase I-II, y se refiere como “*Ensayos tardíos*” a fases III-IV.

Tabla 4. Alteraciones detectadas en genes biomarcadores descritas con un alto grado de evidencia (según guías FDA/ NCCN). Se indica tipo de mutación detectada en pacientes del presente estudio (n=34), para cada gen marcador, y con su droga asociada. Adicionalmente se indica el tipo de cáncer en el cual se ha descrito previamente la mutación. BRCA: Carcinoma invasivo de mama; ST: Adenocarcinoma de estómago; GEJA: Adenocarcinoma de unión gastroesofágica; BCC: Basalioma; COREAD: Adenocarcinoma colorrectal; GCA: Cáncer Gástrico; RA: Angiomliopomas renal; L: Pulmón; OV: Cáncer de Ovarios; NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas; LUAD: Adenocarcinoma de Pulmón; CM: Melanoma cutáneo; MB: Meduloblastoma.

Gen	Mutación	Droga	Tipo de Cáncer
<i>ERBB2</i>	L755S , S310F	<i>Pertuzumab</i>	<i>BRCA</i>
		<i>Lapatinib</i>	<i>BRCA</i>
		<i>Trastuzumab</i>	<i>ST, BRCA, GEJA</i>
		<i>Ado-Trastuzumab Emtansine</i>	<i>BRCA</i>
		<i>Pertuzumab</i>	<i>BRCA</i>
		<i>Trastuzumab</i>	<i>BRCA</i>
		<i>Trastuzumab</i>	<i>ST, GEJA</i>
		<i>Ado-Trastuzumab Emtansine</i>	<i>BRCA</i>
<i>PTCH1</i>	A478T, P725S	<i>Lapatinib</i>	<i>BRCA</i>
		<i>Vismodegib</i>	<i>BCC, MB</i>
<i>KRAS</i>	G12D,G12A, G12V, Q61H	<i>Panitumumab</i>	<i>COREAD</i>
		<i>Cetuximab</i>	<i>COREAD</i>
		<i>Cetuximab</i> (EGFR inhibitor)	<i>L</i>
		<i>Panitumumab</i>	<i>COREAD</i>
<i>TSC2</i>	R1751C, A289T, S1096C, D1084G	<i>Everolimus</i>	<i>RA, GCA</i>
<i>TSC1</i>	R908W, A84T, L826Q, L827Q	<i>Everolimus</i>	<i>RA</i> <i>GCA</i>
<i>BRCA2</i>	A2951T	<i>Olaparib</i>	<i>OV</i>
		<i>Rucaparib</i>	<i>OV</i>
<i>BRAF</i>	E501K	<i>Vemurafenib</i>	<i>HISEC, HISLC,</i> <i>NSCLC</i>
		<i>Vemurafenib</i>	<i>CM</i>
		<i>Vemurafenib;Cobimetinib</i>	<i>CM</i>
		<i>Trametinib</i>	<i>CM</i>
		<i>Dabrafenib;Trametinib</i>	<i>CM</i>
		<i>Irinotecan;Vemurafenib;Cetuximab</i>	<i>COREAD</i>
		<i>Dabrafenib;Trametinib</i>	<i>LUAD</i>
		<i>Dabrafenib</i>	<i>NSCLC</i>
<i>Vemurafenib</i>	<i>CM</i>		
<i>Dabrafenib</i>	<i>CM</i>		

4.5 Comparación de mutaciones entre pacientes de distintas poblaciones

Se realizó la comparación de mutaciones somáticas detectadas entre los pacientes del presente estudio frente a las mutaciones somáticas de pacientes de distintas poblaciones internacionales, con el propósito de explorar y evaluar el efecto del contexto regional para este tipo de cáncer, caracterizado principalmente por una alta heterogeneidad geográfica en cuanto a su incidencia y mortalidad. Así, fue posible el contrastar las frecuencias de mutaciones en pacientes de Chile en las 34 muestras secuenciadas, para el conjunto de genes analizados (Ver **Anexo, Tabla 8.15**). Como se mencionó en la sección de metodología, hasta la fecha del desarrollo de este escrito, se encontraba disponible información de datos de secuenciación NGS de tumores de pacientes con CVB en pacientes de población de Japón (cBioPortal, ICGC), de China (cBioPortal), de Singapur (ICGC), de Estados Unidos (cBioPortal), y de Chile (cBioPortal) ²¹.

El primer contraste correspondió a la comparación entre el estado mutacional de los 25 genes que componen el panel TumorSec que fueron detectados para cada uno de los conjuntos, es decir, si es que se logró identificar al menos una alteración para un determinado gen entre las muestras de cada respectivo cohorte, lo que se puede ilustrar a través de diagramas de Venn (**Figura 11 — Figura 13**).

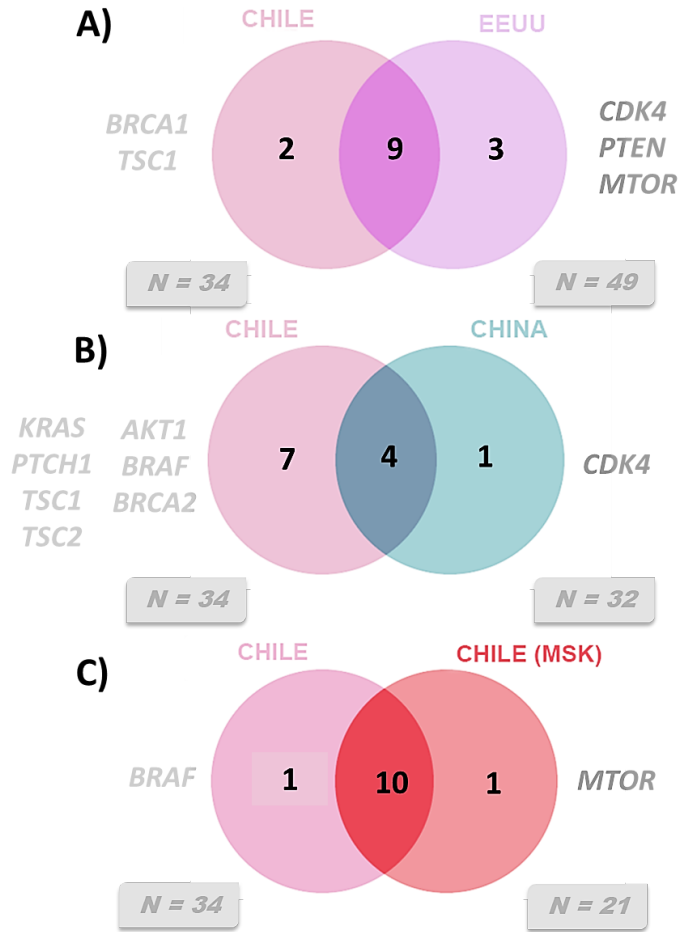


Figura 11. Número de genes que presentan al menos una mutación en distintas cohortes de pacientes. Se ilustra comparación a través de diagramas de Venn, para resultados de muestras secuenciadas para pacientes de Chile del presente estudio (n = 34) versus pacientes de base de datos disponibles en cBioPortal.; **(A)** pacientes de EEUU, **(B)** pacientes de China, y **(C)** pacientes de Chile, de centro MSK. Se indica el tamaño muestral de cada cohorte (n; número de pacientes) y se detallan los genes exclusivos para cada grupo.

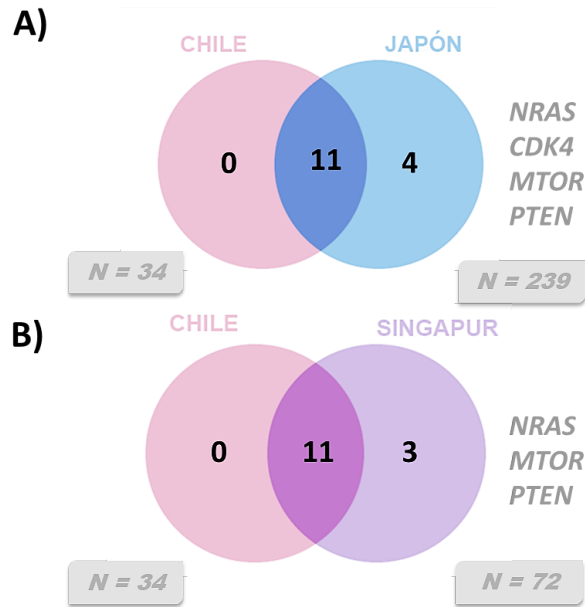


Figura 12. Número de genes que presentan al menos una mutación en distintas cohortes de pacientes. Se ilustra comparación a través de diagramas de Venn, para resultados de muestras secuenciadas para pacientes de Chile del presente estudio (n = 34) versus pacientes de base de datos disponibles en ICGC.; (A) pacientes de Japón, y (B) pacientes de Singapur (SG). Se indica el tamaño muestral de cada cohorte (n; número de pacientes) y se detallan los genes exclusivos para cada grupo.

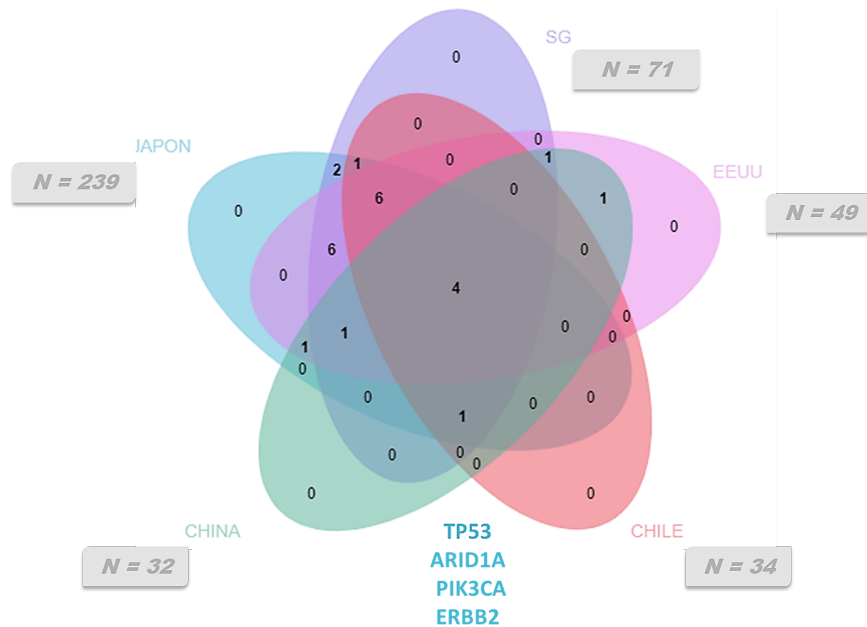


Figura 13. Número de genes que presentan al menos una mutación en distintas cohortes de pacientes. Se ilustra la comparación a través de un diagrama de Venn, en resultados de muestras secuenciadas para pacientes de Chile del presente estudio (n=34) y pacientes de base de datos disponibles, los que incluyen; pacientes de China (cBioPortal), pacientes de Japón (ICGC), pacientes de Singapur (SG; ICGC), y pacientes de EEUU (cBioPortal). Se indica el tamaño muestral de cada cohorte (n; número de pacientes) y se detallan los genes compartidos entre las 5 cohortes contrastadas.

Así, la comparación general entre los genes detectados con al menos 1 alteración en cada respectiva cohorte, permitió identificar el estado mutacional compartido de este grupo de genes en pacientes de Chile frente a los pacientes de Estados Unidos (**Figura 11.A**), y pacientes de China (**Figura 11.B**). Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con la información de muestras de pacientes chilenos publicada previamente en el estudio del centro Memorial Sloan Kettering (cBioPortal), se encontró que ambos grupos comparten 10 genes alterados, mientras que sólo se encuentran 2 genes alterados no compartidos entre ellos (**Figura 11.C**). Estas alteraciones que difieren entre ambas cohortes, corresponden a alteraciones en los genes *MTOR*, la que fue reportada para la cohorte de centro MSK, y alteraciones en gen *BRAF*, identificadas sólo en pacientes de Chile del presente estudio. En cuanto al contraste entre los pacientes de Chile y los pacientes de Estados Unidos, se destaca la ausencia absoluta de mutaciones en genes *BRCAl* y *TSCI* para grupo de EEUU. En contraste, sí fue posible detectar alteraciones en estos genes en pacientes de Chile con una frecuencia de 9%, en ambos casos. Por otra parte, mutaciones en genes *CDK4*, *PTEN*, y *MTOR* no fueron detectadas en pacientes de Chile, pero sí en pacientes de EEUU. De igual forma, se realizó el contraste de cohorte de Chile frente a pacientes de Japón (**Figura 12.A**), y de Singapur (**Figura 12.B**). Se destaca la ausencia de genes *MTOR*, *PTEN*, y *CDK4* para los resultados obtenidos en pacientes de Chile, frente a pacientes de Japón y de Singapur. Además, sólo se detectaron mutaciones en el gen *NRAS* para cohortes de Japón y Singapur, notablemente ausentes en las cohortes de China, EEUU, y Chile. Al momento de contrastar genes alterados detectados entre todos los cohortes en un diagrama de Venn de múltiples elementos, se identificaron un total de 4 genes alterados detectados en común para las 5 cohortes contrastadas (Ver **Figura 13**); los que corresponden a los genes *TP53*, *ARIDIA*, *PIK3CA*, y *ERBB2*.

Luego de la comparación entre el número de genes con alteraciones identificadas para cada uno de los grupos, se contrastaron las frecuencias de las mutaciones en los genes detectados para los distintos grupos de pacientes a través de una comparación entre grupos múltiples (*Test Kruskal-Wallis, no paramétrico*). Con esta comparación, no se detectaron diferencias significativas entre los datos de la frecuencia de mutaciones en los pacientes de Chile en contraste con los datos de pacientes de los distintos grupos. Por otra parte, los principales genes mutados (*i.e.* genes mutados con una mayor frecuencia entre las muestras) sí difirieron entre las cohortes contrastadas (Ver **Figura 14** y **Anexo, Figura 8.7 — 8.8**). Al contrastar las frecuencias detectadas para cada gen individualmente entre la cohorte de Chile frente a las cohortes de China, Japón, EEUU, y Singapur, sí se detectó una diferencia estadísticamente significativa para genes *TSCI*, *KRAS*, y *TP53* ($p\text{-value} < 0.01$, *Test exacto de Fisher*), particularmente entre cohorte de China, frente a los resultados obtenidos en esta tesis para pacientes de Chile (Ver **Anexo, Tabla 8.16 — 8.17**).

Considerándolo como otra aproximación a los resultados obtenidos, el análisis de clusterización a través de una métrica Eucladiana, para los cinco grupos contrastados, presentó una separación de dos clados; el primero de ellos correspondió a una agrupación entre grupo de pacientes de Japón y China, y el segundo fue conformado por los grupos de pacientes de Singapur, y guardando una mayor distancia, los grupos de pacientes de EEUU y Chile, los que formaron a su vez un clado en común (**Figura 14**). Con la finalidad de determinar la robustez de éste análisis de agrupación, se utilizó un método de *bootstrapping*⁴⁵ (*i.e.* simulación de re-muestreo), considerando al menos 1000 iteraciones del proceso. Así, se determinó finalmente una baja fidelidad de los clados formados entre grupos (Ver **Anexo, Figura 8.9**).

Se analizaron también las tendencias de exclusividad mutua o de co-ocurrencia de las mutaciones detectadas, por pares de genes. Estos resultados no presentaron valores significativos entre sí (Ver **Anexo, Figura 8.12**). Se contrastaron además estos valores con los registrados en la base de datos cBioPortal, no compartiéndose ninguna de las tendencias entre grupos.

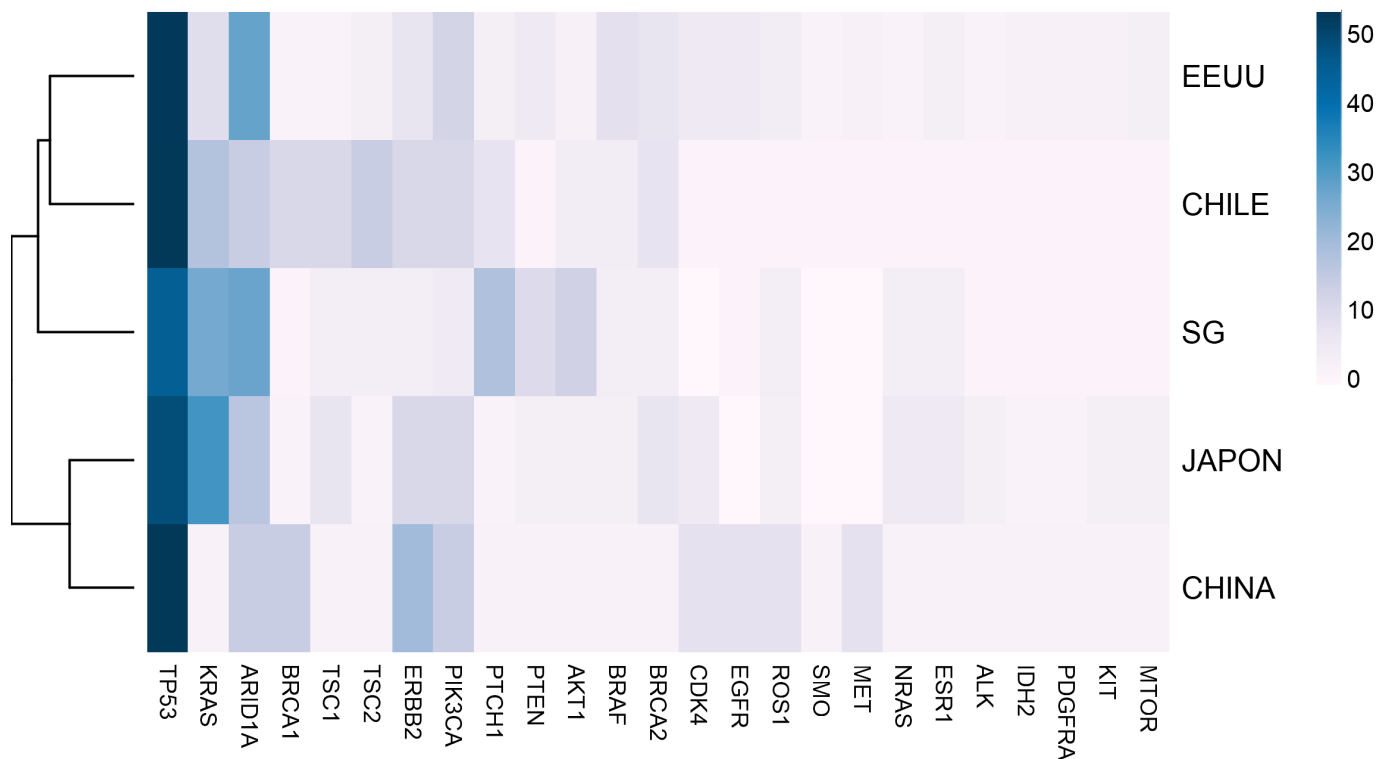


Figura 14. Heatmap de comparación de la frecuencia de mutaciones somáticas para genes de panel TumorSec (columnas), según centro de origen de pacientes (filas). Al extremo Izquierdo del heatmap se muestra cladograma de grupos según cada centro de origen de pacientes. *SG; Singapur.*

5. Discusión

El Cáncer de Vesícula Biliar (CVB) es un cáncer de una incidencia heterogénea, de mal pronóstico, y de limitadas opciones terapéuticas disponibles^{10,46}. Se ha reportado que para un tratamiento efectivo, e implementación factible de oncología de precisión en CVB, es de suma importancia contar con información sobre su perfil mutacional y su patogénesis⁴⁶. Sin embargo, los estudios que profundizan las alteraciones y los componentes moleculares de CVB son aún limitados en la literatura, más aún en los pacientes de poblaciones latinas e hispanas, de alto riesgo e incidencia³³. El presente estudio de tipo exploratorio-observacional, examinó una delimitada pero precisa fracción del carácter mutacional de muestras de tumores de CVB en pacientes de una población de alto riesgo e incidencia, como lo es Chile, específicamente en genes descritos como biomarcadores predictores de respuesta a terapias, reportados en otros tipos de tumores sólidos. Esta fracción se comparó además con la información disponible de CVB en los pacientes de poblaciones de menor incidencia, permitiendo evaluar el efecto del contexto regional para este tipo de cáncer de una alta heterogeneidad geográfica a nivel global. Las herramientas utilizadas para tal propósito corresponden a la secuenciación dirigida de alta profundidad, donde se consideró un panel de 25 genes de interés oncológico, en conjunto con un exhaustivo análisis bioinformático y una anotación detallada de las variantes detectadas.

Pese a que se contaba con un mayor tamaño muestral, finalmente un número considerable de 39 librerías, correspondientes a un total de 34 pacientes, fueron secuenciadas de forma exitosa, utilizándose sus variantes detectadas para el consiguiente desarrollo de esta tesis. Este número concluyente de muestras que se consideró para el presente estudio se limitó principalmente a la restringida disponibilidad de muestras de CVB utilizables, y a su referida calidad. En relación al alto número de muestras que no lograron presentar una concentración o

un tamaño de fragmento óptimo para el desarrollo de la metodología de confección de librerías, o bien de bajas métricas de calidad de secuenciación, se presume podría estar relacionado como un resultado directo de las características de las muestras tumorales *per se*, esto es considerando que estas **(1)** corresponden a muestras de tumor fijadas (FFPE), por lo que, pese a que es adecuado su uso para la metodología de secuenciación propuesta, sus ácidos nucleicos extraídos sí presentarán una menor integridad, presentando una mayor fragmentación y menor concentración de la que se podrían obtener desde muestras de tejido fresco o de sangre ⁴⁷, y **(2)** considerando que las muestras presentan distintos procesos de fijación y de almacenamiento en base a los distintos centros de origen. Siendo estas muestras obtenidas desde diferentes ciudades y desde múltiples centros clínicos a lo largo del país, se presume que la calidad e integridad de las muestras sería inherentemente variable entre sí. Ejemplo de este último punto, fue lo registrado para las muestras de origen común HRA (Hospital Regional de Arica), en el que para la mayoría de las muestras (8 de 10 muestras) no se obtuvieron los tamaños de fragmentos y/o concentración esperada en sus librerías, por ende no se consideraron aptas para ser secuenciadas. Por lo demás, las dos librerías HRA restantes que si cumplieron con los criterios de calidad, una vez secuenciadas no lograron una profundidad de secuenciación suficiente para ser consideradas en las muestras finales para el análisis de variantes. Por otra parte, el grupo de muestras obtenidas desde el centro HPH (Hospital Padre Hurtado) presentó un rendimiento de secuenciones exitosas de 61% (8 de 13 muestras), mientras que muestras obtenidas desde el centro HCC (Hospital de Concepción) prestaron un menor rendimiento, de 32% (6 de 19 muestras). En su mayoría, las muestras que no pasaron los filtros de calidad presentaron una baja integridad y/o concentración durante el proceso de preparación de librerías, con una menor fracción de ellas presentando tal dificultad en pasos previos, en cuanto a su ADN genómico inicial (Ver **Anexo, Tabla 8.4 – 8.9**).

Los resultados referentes al **Objetivo 1**, permitieron identificar al menos una (1) alteración somática para la totalidad de los pacientes analizados, con 26 de ellos (76%) presentando al menos una (1) mutación somática exónica. La gran parte de las mutaciones identificadas corresponde a mutaciones *con cambio de sentido*, lo que se condice con la literatura en donde la mayoría de las mutaciones reportadas para CVB corresponden efectivamente a mutaciones con cambio de sentido o *missense* (75%), seguidas por mutaciones sin sentido o *nonsense* (14%)²⁵. Cada muestra en el estudio presentó al menos una (1) clase distinta de estas variantes. Los genes más frecuentemente mutados en este estudio correspondieron a *TP53* (47%), *KRAS* (15%), *ARIDIA* (12%), *TSC2* (12%), *BRCA1* (9%), y *ERBB2* (9%). Alteraciones para este conjunto de genes han sido reportadas en la literatura para CVB, y en otros cánceres de vías biliares⁴⁸, no obstante, con rangos de frecuencias mutacionales muy fluctuantes^{20, 49}. Así, a través de distintas técnicas, y a lo largo de un gran número de cohortes de pacientes de diversas poblaciones, se han reportado mutaciones en el gen *TP53* con frecuencias en un rango de 4 a 59% en tumores de CVB, mientras que mutaciones en el oncogen *KRAS* abarcan un rango igualmente amplio, desde un 0 hasta 41%. Por otra parte, mutaciones en gen *ARIDIA* han sido reportadas desde un 0 hasta un 27%, en gen *BRAF* han sido reportadas desde un 0 hasta 33%, en gen *ERBB2* desde un 7 hasta 19%, y en gen *EGFR* con un rango de frecuencia reportado de un 9 hasta un 20%, entre otros^{9, 25, 27, 50}.

En cuanto al **Objetivo 2**, un total de 26 pacientes (76%) presentaron al menos una alteración génica descrita como accionable, incluyendo mutaciones en los genes *TP53*, *KRAS*, *BRCA2*, *BRAF*, *TSC1/2*, y *ERRB2*. Estas mutaciones presentaron clasificaciones de relevancia oncológica, es decir, que han sido previamente descritas en la literatura para otros tipos

tumorales, y/o con anotaciones en bases de datos (*e.g* COSMIC, ClinVar). Se determinó también su importancia funcional, obteniendo puntajes elevados de variantes deletéreas (determinado en base a puntaje de patogenicidad CADD; *Combined Annotation Dependent Depletion*). Estos resultados coinciden con la literatura, en donde las alteraciones génicas recurrentes en pacientes con CVB incluyen la inactivación del supresor tumoral *TP53*, la activación oncogénica de *KRAS*, y el aumento de señalización a través de varios componentes de la vía *ERBB* ²⁰.

Asimismo, se ha reportado que tumores de cánceres de vías biliares se caracterizan por presentar alteraciones en genes biomarcadores de prospectiva terapéutica, accionables en una futuras aplicaciones clínicas ^{51, 52}. Tomando en consideración los resultados obtenidos en este estudio, estos apoyarían tal noción para CVB.

En el contexto de opciones de terapias primigenias en CVB, estudios recientes han abierto la posibilidad de que pacientes de CVB puedan ser indicados para terapias *anti-Her-2* ^{46, 53}. En otros tipos de cáncer, el gen *ERBB2* se ha definido como un impulsor clave de la oncogénesis, y su sobreexpresión como resultado de la amplificación génica es un objetivo crítico para la terapia en cáncer de mama y cáncer gástrico ⁵⁴. Además, terapias dirigidas en vía *HER2 / EGFR* se han vuelto cada vez más atractivas en una variedad de neoplasias malignas gástricas y de vías biliares ⁵³. Sin embargo, la evidencia de la eficacia de la inhibición de *HER2* en CVB se limita a informes de casos retrospectivos, presentado resultados promisorio para tratamiento con *trastuzumab* en pacientes de CVB positivos para *HER2*, pero con resultados de terapia *anti-HER2* sin respuesta clínica para estudios de fase II en cánceres de vías biliares ^{34, 53, 54}. En este contexto, se ha reportado que mediante una selección de pacientes, la terapia dirigida a *HER2* sí podría mostrar un beneficio futuro significativo para este subgrupo de pacientes con CVB ⁵⁴.

Como se mencionó previamente, en la actualidad no existen fármacos de terapias dirigidas aprobadas por la FDA para el tratamiento específico de CVB, con sólo 1 fármaco (*pembrolizumab*) aprobado para su uso en cáncer de tracto biliar para aquellos pacientes con tumores que presenten una alta inestabilidad de microsatélites (*i.e.* tumores *MSI-H*) o con células deficientes de reparación por *mismatch* (*i.e.* tumores *dMMR*)⁵⁴. Sin embargo, se reporta en la literatura reciente un gran potencial para el futuro de terapias en cánceres de vías biliares, especialmente debido a la alta presencia de mutaciones en genes biomarcadores^{46, 49, 51}. Otras vías de interés para fines de terapia dirigida en CVB incluyen alteraciones en genes *BRAF*, *KRAS* y *TP53*^{27, 46}, los que también presentaron alteraciones entre las muestras de este estudio. De esta forma, los resultados obtenidos, para la cohorte de los pacientes descritos en este trabajo, podrían entregar una aproximación hacia conocer el carácter mutacional de genes biomarcadores en pacientes de Chile, entregando una limitada pero concreta identificación de las alteraciones accionables que ocurre en este conjunto de genes detectados.

En orden de desarrollar y concretar el **Objetivo 3**, se realizó la comparación de las frecuencias de mutaciones entre los resultados obtenidos para pacientes de Chile y la información disponible de las cohortes de pacientes de Japón, China, Singapur, y Estados Unidos. Pese a no obtener diferencias estadísticamente significativas para las comparaciones de la frecuencia de mutaciones entre los distintos cohortes contrastados, sí se observaron genes alterados que no fueron compartidos entre los grupos, como se ilustra a través de diagramas de Venn (Ver **Figura 13**), y adicionalmente se registraron diferencias significativas reportadas entre la frecuencia de mutación de genes *KRAS*, *TSC1*, y *TP53* entre la cohorte de China (cBioPortal) contra los resultados obtenidos para pacientes de Chile. En un estudio reciente, las mutaciones somáticas de otro cohorte de pacientes de población de China fueron

comparadas frente a pacientes de Estados Unidos del mismo estudio, a través de secuenciación dirigida de alta profundidad, centrándose concretamente en las mutaciones potencialmente accionables ²⁶. De tal forma, se describieron los genes compartidos entre ambos grupos, así como las diferencias entre ambos cohortes, en donde se destacó una disparidad en la frecuencia de mutación de genes de la familia *ERBB*, registrándose una mayor frecuencia de mutaciones en el gen *ERBB2* para pacientes de China ²⁶. En los resultados obtenidos para esta tesis, no se presentaron diferencias significativas para tal gen entre las cohortes, en relación a pacientes de Chile. Sin embargo, sí fue posible detectar un grupo de genes en común entre los grupos contrastados, los cuales fueron detectados con al menos una (1) alteración entre las muestras de cada uno de los centros.

En contraste, también se registraron genes alterados detectados exclusivamente en una determinada población. Entre estas comparaciones, se enfatiza principalmente el contraste que fue posible realizar entre los resultados obtenidos frente a los pacientes de Chile del centro Memorial Sloan-Kettering (MSK) en cBioPortal, en donde si bien coincidieron la gran mayoría de los genes mutados, se detectó un (1) gen exclusivo en tumores de pacientes del centro MSK, y un (1) gen sólo detectado en los resultados del presente estudio (Ver **Figura 11.C**). En este punto, es importante mencionar que no se contó con la información de los pacientes de Chile del centro Memorial Sloan-Kettering referente a su origen étnico o genotipado, por lo que se limitan las posibles inferencias sobre la heterogeneidad de ambos grupo de pacientes, que puedan explicar las discrepancias entre ambos grupos. Además, las muestras del centro Memorial Sloan-Ketterin, presentaron ciertas limitantes anexas, primordialmente respecto a que sólo se contemplan 8 muestras de tejido reportadas como provenientes de tejido tumoral de CVB, con 5 muestras de tejido hepático, y 8 muestras sin información referente al sitio de tejido. El contar con un bajo número de muestras tumorales

(n=8) limitó entonces las potenciales comparaciones con los resultados obtenidos para la presente tesis, que sólo contempló muestras de tumores de cáncer de vesícula biliar.

En los resultados obtenidos, el gen más frecuente mutado entre las muestras analizadas corresponde a *TP53* (47%, n =34). Esto se condice con lo reportado previamente en pacientes de la población de Chile, y se condice de igual forma con el enriquecimiento de mutaciones en gen *TP53* reportado anteriormente en los tumores de CVB frente a otros tipos de cánceres de vías biliares⁵⁵. No obstante, el tipo de mutaciones detectadas difieren entre los grupos comparados, como se refleja a través de gráficos de mapa de mutaciones (**Anexo, Figura 8.6**). Como se mencionó previamente en Introducción, diferencias entre el tipo de mutaciones detectadas en los pacientes de población de Chile y en pacientes de Japón han sido reportadas anteriormente para el gen *TP53*²⁹. Esto se pudo observar para los resultados obtenidos en el gen *TP53* en contraste con las poblaciones de EEUU, China y Japón, así como para los genes *KRAS*, *ERBB2*, y *BRCA2* (Ver gráfico de mutaciones en **Anexo, Figura 8.11 – 8.14**). El tipo de mutaciones y la frecuencia en gen *TP53* obtenidas en este estudio se condice de igual forma con los reportado en pacientes de países limítrofes a Chile con un componente étnico amerindio en común, tales como Bolivia (50%, N = 36) y Perú (33%, N = 30)⁵⁶. Por otra parte, para los pacientes de poblaciones de Perú y Bolivia usualmente el gen *KRAS* no se encuentra mutado (0%, N = 30)⁵⁶. De forma similar, alteraciones en el gen *KRAS* son poco frecuentes en algunas regiones de países occidentales para CVB, como por ejemplo en Estados Unidos (0%, N = 83; 8%, N=49). Esta diferencia es destacable ya que los pacientes de Chile presentaron una frecuencia mutacional de 15% para gen *KRAS* en el presente trabajo (N=34), siendo más similar a lo reportado en los tumores de pacientes en poblaciones de Argentina (17%; N=58) y de Brasil (33%; N=12)^{9, 40, 57}, por sobre a lo reportando en Bolivia y Perú. No obstante, este es aún un valor considerablemente alto para lo que se esperaría en poblaciones

occidentales, y sobre todo en pacientes sin antecedentes de una unión ductal pancreatobiliar anómala (APBJ) ²⁷. En cuanto al tipo de mutaciones que se identificaron en el gen *KRAS*, se detectaron principalmente mutaciones en el codón 12, siendo una mutación frecuente en distintos tipos de cánceres gástricos y de las vías biliares. Se detectó particularmente la mutación *G12A*, la que es prevalente para CVB en pacientes de población de Argentina, China, e Italia ²⁶, y poco frecuente en pacientes de la población de Brasil y de regiones de India, donde se favorecen mutaciones en el codón 25 ^{40, 58}. En tal sentido, habría una mayor similitud entre los resultados obtenidos en el contraste con los pacientes de Argentina, que con aquellos pacientes de Brasil. Esto concuerda de igual forma con una mayor similitud en la heterogeneidad étnica entre los países de Chile y Argentina (con una alta preponderancia en la etnia Mapuche-Huilliche), frente a la diversidad poblacional registrada en cohortes de pacientes de Brasil ⁹. Pese a que en la literatura de CVB se ha reportado exclusión entre mutaciones en el gen *KRAS* y mutaciones en el gen *BRAF* ^{59, 60}, contrariamente en tumores de pacientes de Chile se observó una tendencia a la co-ocurrencia entre estas mutaciones (**Anexo, Figura 8.10**). En cuanto al tipo de mutaciones en el gen *BRAF*, los grupos de Chile y EEUU comparten la mutación E501K, mientras que los pacientes de Singapur presentan predominantemente la mutación K482E.

Por su parte, pacientes de Japón presentan la mutación V599E, mientras que pacientes de Grecia presentan frecuentemente la mutación V600R, en conjunto con V599E, las que se encuentran notoriamente ausentes en gen *BRAF* en tumores de pacientes de Estados Unidos y Chile. De forma similar, mutaciones en el gen *PIK3CA* E545K han sido descritas en tumores de CVB para pacientes de Chile y EEUU, tanto para carcinomas tempranos y avanzados, donde se ha enfatizando su potencial utilidad para selección de terapias ⁶¹. Esta mutación se encontró en pacientes de Chile del presente estudio, así como en chilenos del centro MSK.

Por otra parte, en los resultados obtenidos en esta tesis se presenta una mutación de tipo G505R (*chr3:g.178936091G>A*) en el gen *PIK3CA*, no presente en la literatura para CVB, ni en las bases de datos disponibles, previamente reportada sólo en pacientes con cáncer gástrico⁶². En este punto, para asegurar una comparación apropiada de las alteraciones detectadas entre cohortes, es importante contar con métricas de calidad específicas de las variantes obtenidas (Anexo, Figura 8.1 – 8.2). Con el propósito de detallar tal aspecto, en el presente estudio se precisaron las métricas de profundidad de regiones blancas en específicas para cada muestra (Anexo, Tabla 8.10 – 8.12, Figuras 8.3), así como la profundidad alcanzada en variantes accionables (Anexo, Tabla 8.13). De esta forma, es posible precisar la detección de las mutaciones con cambio en proteína en genes biomarcadores, definiendo de mejor forma aquellas alteraciones presentes o ausentes para cada respectiva cohorte. Esto a su vez, sería un aspecto importante a considerar al momento de implementar opciones de terapias dirigidas en pacientes de Chile, tomando en cuenta el rol de cada variante específica en referencia a la sensibilidad y respuesta a diversos fármacos en medicina de precisión⁶³.

En cuanto a los parámetros clínico-patológicos, una característica de los pacientes de Chile fue la predominante presencia de cálculos biliares. En los pacientes del presente estudio, se identificaron 28 de 30 pacientes con antecedentes de colelitiasis (93%), representando un alto porcentaje en contraste con pacientes de EEUU del centro MSK (con un 64% de pacientes con cálculos biliares), y pacientes de Japón (con sólo un 36%). Esto se condice con la literatura, donde se ha descrito que la prevalencia de los cálculos biliares es mayor en las poblaciones hispanas de América del Sur, y en hispanoamericanos con ascendencia amerindia de Estados Unidos⁶⁴. Las poblaciones nativas de América del Norte y de Sudamérica representan de hecho los grupos con mayor riesgo de cálculos biliares en todo el mundo⁶⁴. Cabe destacar que en el presente estudio sólo se contó con 3 individuos de ascendencia

amerindia registrada en el proceso de inclusión de pacientes, limitando el poder profundizar su análisis en relación a su atributo étnico.

Adicionalmente, debido a la falta de los datos clínicos de gran parte de los pacientes, no fue posible el evaluar de igual forma la variación de las mutaciones detectadas con respecto a los factores de riesgo de la enfermedad; como la presencia de cálculos biliares, ni con factores clinicopatológicos; como la estadificación tumor

6. Conclusiones

La secuenciación dirigida de alta profundidad de tumores de Cáncer de Vesícula Biliar fue realizada de forma exitosa para un total de 34 pacientes, identificándose 26 pacientes (76%) que presentaron mutaciones somáticas con cambio en proteína, presentando al menos 1 alteración en genes descritos como biomarcadores de respuesta a terapia. Se identificaron aquellos genes más frecuentemente mutados dentro de este cohorte, los que corresponden a *TP53* (47%), *KRAS* (15%), *ARIDIA* (12%), *TSC2* (12%), *BRCA1* (9%), y *ERBB2* (9%).

Se determinó que la frecuencia de mutaciones somáticas identificadas en pacientes de Chile con cáncer de vesícula biliar, no difiere significativamente a lo reportado entre cohortes de pacientes provenientes de distintos centros de Japón, China, Singapur, y EEUU.

Sin embargo, se aprecian tendencias que sugieren no descartar la importancia de disparidades en mutaciones somáticas según un contexto regional.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis representan una aproximación que busca reflejar una delimitada fracción del carácter mutacional de tumores de CVB en pacientes de Chile, generando información relevante y basal para la caracterización génica de este tipo de cáncer, y evaluar sus opciones de terapias a nivel nacional. Las alteraciones detectadas en común entre todos los cohortes podrían ser de interés para analogar futuras estrategias terapéuticas entre pacientes de estas poblaciones, junto a pacientes de Chile.

7. Referencias

1. Sharma A, Sharma KL, Gupta A, Yadav A, Kumar A (2017) Gallbladder cancer epidemiology, pathogenesis and molecular genetics: Recent update. *World J Gastroenterol* 23: 3978–3998, <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i22.3978>.
2. Wernberg JA, Lucarelli DD (2014) Gallbladder cancer. *Surg Clin North Am* 94: 343–360, <https://doi.org/10.1016/j.suc.2014.01.009>.
3. Aloia TA, Járufe N, Javle M, Maithel SK, Roa JC, Adsay V, Coimbra FJF, Jarnagin WR (2015) Gallbladder Cancer: Expert consensus statement. *Hpb* 17: 681–690, <https://doi.org/10.1111/hpb.12444>.
4. Lai CHE, Lau WY (2008) Gallbladder cancer - A comprehensive review. *Surgeon* 6: 101–110, [https://doi.org/10.1016/S1479-666X\(08\)80073-X](https://doi.org/10.1016/S1479-666X(08)80073-X).
5. Shaffer EA (2008) Gallbladder Cancer: The Basics.4: 737–741.
6. Kuroki T, Tajima Y, Matsuo K, Kanematsu T (2005) Genetic alterations in gallbladder carcinoma. *Surg Today* 35: 101–105, <https://doi.org/10.1007/s00595-004-2906-2>.
7. Hundal R, Shaffer EA (2014) Gallbladder cancer: Epidemiology and outcome. *Clin Epidemiol* 6: 99–109, <https://doi.org/10.2147/CLEP.S37357>.
8. Are C, Ahmad H, Ravipati A, Croo D, Clarey D, Smith L, Price RR, Butte JM, Gupta S, Chaturvedi A, Chowdhury S (2017) Global epidemiological trends and variations in the burden of gallbladder cancer. *J Surg Oncol* 115: 580–590, <https://doi.org/10.1002/jso.24546>.
9. Salazar M, Ituarte C, Abriata MG, Santoro F, Arroyo G (2019) Gallbladder cancer in South America: epidemiology and prevention. *Chinese Clin Oncol* 8: 32–32, <https://doi.org/10.21037/cco.2019.07.12>.
10. Schmidt MA, Marcano-Bonilla L, Roberts LR (2019) Gallbladder cancer: epidemiology and genetic risk associations. *Chinese Clin Oncol* 8: 31–31, <https://doi.org/10.21037/cco.2019.08.13>.
11. Lorenzo Bermejo J, Boekstegers F, González Silos R, Marcelain K, Baez Benavides P,

- Barahona Ponce C, Müller B, Ferreccio C, Koshiol J, Fischer C, Peil B, Sinsheimer J, Fuentes Guajardo M, Barajas O, Gonzalez-Jose R, Bedoya G, Cátira Bortolini M, Canizales-Quinteros S, Gallo C, Ruiz Linares A, Rothhammer F (2017) Subtypes of Native American ancestry and leading causes of death: Mapuche ancestry-specific associations with gallbladder cancer risk in Chile. *PLoS Genet* 13: 1–24, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006756>.
12. Eslick GD (2010) Epidemiology of Gallbladder Cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 39: 307–330, <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2010.02.011>.
 13. Dutta U, Bush N, Kalsi D, Popli P, Kapoor VK (2019) Epidemiology of gallbladder cancer in India. *Chinese Clin Oncol* 8: 93–102, <https://doi.org/10.21037/cco.2019.08.03>.
 14. Everson GT, McKinley C, Kern F (1991) Mechanisms of gallstone formation in women. Effects of exogenous estrogen (Premarin) and dietary cholesterol on hepatic lipid metabolism. *J Clin Invest* 87: 237–246, <https://doi.org/10.1172/JCI114977>.
 15. Andia ME, Hsing AW, Andreotti G, Ferreccio C (2008) Geographic variation of gallbladder cancer mortality and risk factors in Chile: A population-based ecologic study. *Int J Cancer* 123: 1411–1416, <https://doi.org/10.1002/ijc.23662>.
 16. Lugo A, Peveri G, Gallus S (2019) Should we consider gallbladder cancer a new smoking-related cancer? A comprehensive meta-analysis focused on dose-response relationships. *Int J Cancer*, <https://doi.org/10.1002/ijc.32681>.
 17. Roa I, De Aretxabala X (2015) Gallbladder cancer in Chile: What have we learned? *Curr Opin Gastroenterol* 31: 269–275, <https://doi.org/10.1097/MOG.000000000000164>.
 18. Urushihara N (2018) *Classification of pancreaticobiliary maljunction and congenital biliary dilatation* Pancreaticobiliary Maljunction Congenit Biliary Dilatation, https://doi.org/10.1007/978-981-10-8654-0_7.
 19. Lorenzo Bermejo J, Boekstegers F, González Silos R, Marcelain K, Baez Benavides P, Barahona Ponce C, Müller B, Ferreccio C, Koshiol J, Fischer C, Peil B, Sinsheimer J, Fuentes Guajardo M, Barajas O, Gonzalez-Jose R, Bedoya G, Cátira Bortolini M, Canizales-Quinteros

- S, Gallo C, Ruiz Linares A, Rothhammer F (2017) Subtypes of Native American ancestry and leading causes of death: Mapuche ancestry-specific associations with gallbladder cancer risk in Chile. *PLoS Genet* 13: 1–24, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006756>.
20. Mishra SK, Kumari N, Krishnani N (2019) Molecular pathogenesis of gallbladder cancer: An update. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 816: 111674, <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2019.111674>.
 21. Narayan RR, Creasy JM, Goldman DA, Gönen M, Kandath C, Kundra R, Solit DB, Askan G, Klimstra DS, Basturk O, Allen PJ, Balachandran VP, D’Angelica MI, DeMatteo RP, Drebin JA, Kingham TP, Simpson AL, Abou-Alfa GK, Harding JJ, O’Reilly EM, Butte JM, Matsuyama R, Endo I, Jarnagin WR (2019) Regional differences in gallbladder cancer pathogenesis: Insights from a multi-institutional comparison of tumor mutations. *Cancer* 125: 575–585, <https://doi.org/10.1002/cncr.31850>.
 22. Barreto SG, Dutt A, Sirohi B, Shrikhande S V. (2018) Gallbladder cancer: A journey of a thousand steps. *Futur Oncol* 14: 1299–1306, <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0576>.
 23. Sicklick JK, Fanta PT (2016) *Molecular pathogenesis of biliary tract cancer*, Sixth Edit Blumgart’s Surg Liver, Biliary Tract Pancreas Sixth Ed, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-34062-5.00122-9>.
 24. Maurya SK, Tewari M, Mishra RR, Shukla HS (2012) Genetic aberrations in gallbladder cancer. *Surg Oncol* 21: 37–43, <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2010.09.003>.
 25. Mehrotra R, Tulsyan S, Hussain S, Mittal B, Singh Saluja S, Singh S, Tanwar P, Khan A, Javle M, Hassan MM, Pant S, De Aretxabala X, Sirohi B, Rajaraman P, Kaur T, Rath GK (2018) Genetic landscape of gallbladder cancer: Global overview. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 778: 61–71, <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.08.003>.
 26. Yang P, Javle M, Pang F, Zhao W, Abdel-wahab R, Chen X, Meric-bernstam F, Chen H, Borad MJ, Liu Y, Zou C, Mu S, Xing Y, Wang K, Peng C, Che X (2019) Somatic genetic aberrations in gallbladder cancer : comparison between Chinese and US patients. *Hepatobiliary Surg Nutr*

- 8: 604–605, <https://doi.org/10.21037/hbsn.2019.04.11>.
27. Nemunaitis JM, Brown-Glabeman U, Soares H, Belmonte J, Liem B, Nir I, Phuoc V, Gullapalli RR (2018) Gallbladder cancer: Review of a rare orphan gastrointestinal cancer with a focus on populations of New Mexico. *BMC Cancer* 18: 1–14, <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4575-3>.
 28. Tan DSW, Mok TSK, Rebbeck TR (2016) Cancer genomics: Diversity and disparity across ethnicity and geography. *J Clin Oncol* 34: 91–101, <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.0096>.
 29. N Yokoyama, J Hitomi, H Watanabe, Y Ajioka, M Pruyas, I Serra YS and KH (2019) Mutations of p53 in gallbladder carcinomas in high-incidence areas of Japan and Chile. *J Chem Inf Model* 53: 1689–1699, <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
 30. Søreide K, Guest R V., Harrison EM, Kendall TJ, Garden OJ, Wigmore SJ (2019) Systematic review of management of incidental gallbladder cancer after cholecystectomy. *Br J Surg* 106: 32–45, <https://doi.org/10.1002/bjs.11035>.
 31. Sachs TE, Akintorin O, Tseng J (2018) How Should Gallbladder Cancer Be Managed? *Adv Surg* 52: 89–100, <https://doi.org/10.1016/j.yasu.2018.04.003>.
 32. Krell RW, Wei AC (2019) Gallbladder cancer: Surgical management. *Chinese Clin Oncol* 8: 36–36, <https://doi.org/10.21037/cco.2019.06.06>.
 33. Søreide K, Harrison EM, Wigmore SJ (2018) Research gaps and unanswered questions in gallbladder cancer. *Hpb* 20: 685–686, <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2018.03.006>.
 34. Jin J, Wu X, Yin J, Li M, Shen J, Li J, Zhao Y, Zhao Q, Wu J, Wen Q, Cho CH, Yi T, Xiao Z, Qu L (2019) Identification of genetic mutations in cancer: Challenge and opportunity in the new era of targeted therapy. *Front Oncol* 9: 1–7, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00263>.
 35. Cox S, Rousseau-Tsangaris M, Abou-Zeid N, Dalle S, Leurent P, Cutivet A, Le HH, Kotb S, Bogaert B, Gardette R, Baran Y, Holder JM, Lerner L, Blay JY, Cambrosio A, Tredan O, Denèfle P (2019) Precision medicine in oncology: Challenges, stakes and new paradigms. *Bull Cancer* 106: 97–104, <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2019.01.007>.

36. FDA (2013) Paving the way for personalized medicine paving the way for personalized medicine - FDA's role in a new era of medical product development. *Dep. Heal. Hum. Serv.* .
37. Hyman DM, Taylor BS, Baselga J (2017) Implementing Genome-Driven Oncology. *Cell* 168: 584–599, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.015>.
38. Henry NL, Hayes DF (2012) Cancer biomarkers. *Mol Oncol* 6: 140–146, <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>.
39. Weigt J, Malfertheiner P (2010) Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4: 395–397, <https://doi.org/10.1586/egh.10.45>.
40. Sábato C, Bastos-Rodrigues L, Moraes DC, Friedman E, De Marco L, Resende V (2019) Genetic Analysis of Brazilian Patients with Gallbladder Cancer. *Pathol Oncol Res* 25: 811–814, <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0407-7>.
41. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M (2019) CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 47: D886–D894, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1016>.
42. Andy Bunn MK (2008) An Introduction to dplR. *Ind Commer Train* 10: 11–18, <https://doi.org/10.1108/eb003648>.
43. Mayakonda A, Lin DC, Assenov Y, Plass C, Koeffler HP (2018) Maftools: Efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Res* 28: 1747–1756, <https://doi.org/10.1101/gr.239244.118>.
44. Ginestet C (2010) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *J R Stat Soc* 35: 245–246, <https://doi.org/10.18637/jss.v035.b01>.
45. Suzuki R, Shimodaira H (2006) Pvcust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22: 1540–1542, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl117>.
46. Lin J, Dong K, Bai Y, Zhao S, Dong Y, Shi J, Shi W, Long J, Yang X, Wang D, Yang X, Zhao L, Hu K, Pan J, Sang X, Wang K, Zhao H (2019) Precision oncology for gallbladder cancer:

- insights from genetic alterations and clinical practice. *Ann Transl Med* 7: 467–467, <https://doi.org/10.21037/atm.2019.08.67>.
47. Einaga N, Yoshida A, Noda H, Suemitsu M, Nakayama Y, Sakurada A, Kawaji Y, Yamaguchi H, Sasaki Y, Tokino T, Esumi M (2017) Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. *PLoS One* 12: 1–18, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176280>.
 48. Valle JW, Lamarca A, Goyal L, Barriuso J, Zhu AX (2017) New horizons for precision medicine in biliary tract cancers. *Cancer Discov* 7: 943–962, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0245>.
 49. Kashyap MR, Garcia CP, Leal AL, Mittal B, Singh MK (2020) A genetic roadmap of gallbladder cancer disparities : a potential for development of targeted therapies. *Cancer Heal Disparities*, <https://doi.org/10.9777/chd.2019.1014>.
 50. Montalvo-Jave EE, Rahnama- Azar AA, Papaconstantinou D, Deloiza ME, Tsilimigras DI, Moris D, Mendoza-Barrera GE, Weber SM, Pawlik TM (2019) Molecular pathways and potential biomarkers in gallbladder cancer: A comprehensive review. *Surg Oncol* 31: 83–89, <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2019.09.006>.
 51. Bogenberger JM, DeLeon TT, Arora M, Ahn DH, Borad MJ (2018) Emerging role of precision medicine in biliary tract cancers. *npj Precis Oncol* 2: 1–9, <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0064-z>.
 52. Jain A, Javle M (2016) Molecular profiling of biliary tract cancer: A target rich disease. *J Gastrointest Oncol* 7: 797–803, <https://doi.org/10.21037/jgo.2016.09.01>.
 53. Javle M, Churi C, Kang HC, Shroff R, Janku F, Surapaneni R, Zuo M, Barrera C, Alshamsi H, Krishnan S, Mishra L, Wolff RA, Kaseb AO, Thomas MB, Siegel AB (2015) HER2/neu-directed therapy for biliary tract cancer. *J Hematol Oncol* 8: 1–9, <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0155-z>.

54. Albrecht T, Rausch M, Roessler S, Geissler V, Albrecht M, Halske C, Seifert C, Renner M, Singer S, Mehrabi A, Vogel MN, Pathil-Warth A, Busch E, Köhler B, Rupp C, Weiss KH, Springfield C, Röcken C, Schirmacher P, Goeppert B (2019) HER2 gene (ERBB2) amplification is a low-frequency driver with potential predictive value in gallbladder carcinoma. *Virchows Arch*, <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02706-6>.
55. Wardell CP, Fujita M, Yamada T, Simbolo M, Fassan M, Karlic R, Polak P, Kim J, Hatanaka Y, Maejima K, Lawlor RT, Nakanishi Y, Mitsuhashi T, Fujimoto A, Furuta M, Ruzzenente A, Conci S, Oosawa A, Sasaki-Oku A, Nakano K, Tanaka H, Yamamoto Y, Michiaki K, Kawakami Y, Aikata H, Ueno M, Hayami S, Gotoh K, Ariizumi S ichi, Yamamoto M, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Getz G, Scarpa A, Hirano S, Nakamura T, Nakagawa H (2018) Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations. *J Hepatol* 68: 959–969, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.009>.
56. Vidaurre T, Casavilca S, Montenegro P, Gomez H, Calderón M, Navarro J, Aramburu J, Poquioma E, Tsuchiya Y, Asai T, Ajioka Y, Sato A, Ikoma T, Nakamura K (2019) Tumor protein p53 and K-ras gene mutations in Peruvian patients with gallbladder cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* 20: 289–294, <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.1.289>.
57. Arroyo GF, Gentile A, Parada LA (2016) Gallbladder cancer: South American experience. *Chinese Clin Oncol* 5: 67–67, <https://doi.org/10.21037/cco.2016.10.01>.
58. Pramanik V, Sarkar BN, Kar M, Das G, Malay BK, Sufia KK, Lakkakula BVKS, Vadlamudi RR (2011) A novel polymorphism in codon 25 of the KRAS gene associated with gallbladder carcinoma patients of the eastern part of India. *Genet Test Mol Biomarkers* 15: 431–434, <https://doi.org/10.1089/gtmb.2010.0194>.
59. Javle M, Rashid A, Churi C, Kar S, Zuo M, Eterovic AK, Noguerras-Gonzalez GM, Janku F, Shroff RT, Aloia TA, Vauthey JN, Curley S, Mills G, Roa I (2014) Molecular characterization of gallbladder cancer using somatic mutation profiling. *Hum Pathol* 45: 701–708, <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.11.001>.

60. Saetta AA, Papanastasiou P, Michalopoulos N V., Gigelou F, Korkolopoulou P, Bei T, Patsouris E (2004) Mutational analysis of BRAF in gallbladder carcinomas in association with K-ras and p53 mutations and microsatellite instability. *Virchows Arch* 445: 179–182, <https://doi.org/10.1007/s00428-004-1046-9>.
61. Roa I, Garcia H, Game A, De Toro G, De Aretxabala X, Javle M (2016) Somatic Mutations of PI3K in Early and Advanced Gallbladder Cancer: Additional Options for an Orphan Cancer. *J Mol Diagnostics* 18: 388–394, <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.12.003>.
62. Kong SL, Liu X, Suhaimi N-AM, Koh KJH, Hu M, San Lee DY, Cima I, Phyo WM, Lee EXW, Tai JA, Foong YM, Vo JH, Koh PK, Zhang T, Ying JY, Lim B, Tan M-H, Hillmer AM (2017) Molecular characterization of circulating colorectal tumor cells defines genetic signatures for individualized cancer care. *Oncotarget* 8: 68026–68037, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19138>.
63. Iorio F, Knijnenburg TA, Vis DJ, Bignell GR, Menden MP, Schubert M, Aben N, Gonçalves E, Barthorpe S, Lightfoot H, Cokelaer T, Greninger P, van Dyk E, Chang H, de Silva H, Heyn H, Deng X, Egan RK, Liu Q, Mironenko T, Mitropoulos X, Richardson L, Wang J, Zhang T, Moran S, Sayols S, Soleimani M, Tamborero D, Lopez-Bigas N, Ross-Macdonald P, Esteller M, Gray NS, Haber DA, Stratton MR, Benes CH, Wessels LFA, Saez-Rodriguez J, McDermott U, Garnett MJ (2016) A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell* 166: 740–754, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.017>.
64. Lammert F, Gurusamy K, Ko CW, Miquel JF, Méndez-Sánchez N, Portincasa P, Van Erpecum KJ, Van Laarhoven CJ, Wang DQH (2016) Gallstones. *Nat Rev Dis Prim* 2: 1–17, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.24>.

8. Anexos

Tabla 8.1 Ensayos clínicos actualmente en curso para opciones terapéuticas dirigidas para CVB. Tabla adaptada desde Nemunaitis y colaboradores (2018) ²⁷

Agente	Gen Target	Terapia	Fase	Institución	Código NCI
Cetuximab, Trastuzumab, Gefitinib, Lapatinib, Everolimus, Sorafenib, Crizotinib	EGFR, HER2, mTOR, VEGF, ALK/ROS1, PDL-1	GEMOX + Terapia dirigida por perfil génico	II	Xinhua Hospital, Shanghai	NCT02836847
Durvalumab	PDL-1	Guadecitabine + Durvalumab	I	University of Southern California	NCT03257761
Pazopanib	cKIT, FGFR, VEGFR	Gemcitabine + Pazobanib	II	Hellenic Cooperative Oncology Group	NCT01855724
Pembrolizumab	PD-1	Pembrolizumab + Cisplatin + Gemcitabine	II	European Organization for Research and Treatment of Cancer	NCT03260712
Selumetinib	MEK1, MEK2	Selumetinib + Cisplatin + Gemcitabine	II	University Health Network, Toronto	NCT02151084
ADH-1	N-Cadherin	ADH-1 + Cisplatin + Gemcitabine	I	University of Nebraska	NCT01825603
Canlisib	PI3K	Copanlisib + Cisplatin + Gemcitabine	II	H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute	NCT02631590
Merestinib	MET	Merestinib + Cisplatin + Gemcitabine	I	Eli Lilly and Company	NCT03027284
Regorafenib	VEGF	Regorafenib	II	H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute	NCT0211554

Tabla 8.2 Listado con información de 25 genes que componen el panel *TumorSec*. Se detalla la región que será secuenciada (exones completos o región ‘hotspot’ target) para cada uno de estos genes.

Gen	Tipo de mutación	Región	Drogas	Tipo de Tumor	Nivel de Evidencia
AKT1	Puntual	Exones	AZD-5363	BC, OV, Endom	B
ALK	Puntual	Target	Crizotinib, inhibidor ALK	LUNAD	B
ARID1A	Puntual	Exones	inhibidor ATM, erlotinib	BC, OV	C
BRAF	Puntual	Exones	Vemurafenib, dabrafenib, Trametinib, cetuximab, panitumumab	MEL, NSCLC, CRC, THY	A
BRCA1	Puntual	Exones	Olaparib	OV, BC, CRC, MEL, SAR, PRO	A
BRCA2	Puntual	Exones	Olaparib	OV, BC, CRC, MEL, SAR, PRO	A
CDK4	Amplificación	Exones	Palbociclib/Abemaciclib	liposarcoma, MEL	B
EGFR	Puntual/Amplificación	Target	Erlotinib, Gefitinib, Neratinib, Osimertinib, Rociletinib	NSCLC	A
ERBB2	Amplificación	Exones	Trastuzumab	BC, Gástrico	A
ERS1	Puntual	Exones	Palbociclib	BC	B
IDH2	Puntual	Exones	Enasidenib	AML	B
KIT	Puntual	Target	Nilotinib, Imatinib, Dasotinib	MEL, GIST, AML	B
KRAS	Puntual	Exones	Cetuximab, Erlotinib, Egorafenib, Selumetinib, Irinotecan	CRC, Panc, NSCLC	A
MET	Puntual/Amplificación	Target	Foretinib, Rilotumumab	RCC papilar, MEL	B
MTOR	Puntual	Exones	inhibidor mTOR	RCC	B
NRAS	Puntual	Exones	inhibidor EGFR	CCR	A
PDGFRA	Puntual	Target	Imatinib, Sunitinib	GIST	B
PIK3CA	Puntual/Amplificación	Exones	Buparlisib, Serabelisib, Alpelisib, Copanlisib	BC	B
PTCH1	Puntual	Exones	Vismodegib	Meduloblastoma	B
PTEN	Puntual	Exones	Everolimus	Varios	B
ROS1	Puntual	Target	Crizotinib	NSCLC	C
SMO	Puntual	Target	Vismodegib	Basal CC	B
TP53	Puntual	Exones	<i>Prognosis</i>	Varios	A
TSC1	Puntual	Exones	inhibidor mTOR, Everolimus	RCC	B
TSC2	Puntual	Exones	inhibidor mTOR	RCC	B

***Nivel de Evidencia A: Validada ; B:Clínica ; C: Caso Clínico**

Tabla 8.3 Lista de estudios de secuenciación de alto rendimiento en cáncer de vesícula biliar según número de tamaño total de muestras utilizadas para cada publicación, respectivamente. Se detalla profundidad promedio de secuenciación, y técnica de secuenciación utilizada.

Tamaño muestral	Profundidad secuenciación	Diseño Experimental	Población de Estudio
85*	>600X	<i>Hybrid capture–based comprehensive genomic profiling</i>	USA
57	367X	<i>Exome sequencing</i>	China
49*	–	<i>Sequenom Massarray technology</i>	India
40	≥10X	<i>Whole Genome Sequencing, Whole Exome Sequencing & Targetted Sequencing</i>	Japón
33*	–	<i>OncoMap</i>	USA
29	>20X	<i>Exome sequencing</i>	Japón
26*	1800X	<i>50-gene Ion AmpliSeq Cancer Hotspot panel v2 & AmpliSeq custom panel</i>	Italia
26*	≥10X	<i>Whole Genome Sequencing, Whole Exome Sequencing & Targetted Sequencing</i>	Italia
15	–	<i>Espectroscopia de masa y NGS</i>	USA
14	≥100X	<i>Ion AmpliSeq Cancer Panel</i>	Japón
12*	>500X	<i>Ion AmpliSeq cancer hotspot panel V2</i>	India
11	1365X	<i>AmpliSeq comprehensive cancer panel</i>	India
9	1276X	<i>Whole exome sequencing</i>	USA e Italia

* *muestras tejido FFPE*

Tabla 8.4. Estado final de muestras del centro HCC (Hospital de Concepción) respecto al control de calidad realizado en metodología de extracción de ADN genómico, preparación de librerías, y secuenciación. La columna ‘ADN’ contempla concentración y pureza de ácido nucleico de cada muestra; FA corresponde a integridad por análisis de tamaño de fragmento (*Fragment Analyzer*). Ticket de color verde (√) indica que se superó de forma exitosa cada control de calidad, mientras que equis roja (X) indica que no se lograron las condiciones necesarias para aprobar el criterio de calidad en un determinado paso de la metodología.

Muestra	Centro	ADN genómico		Preparación Librerías		Secuenciación
		ADN	FA	ADN	FA	
CR233-HCC	HCC	√	√	√	√	√
CR247-HCC	HCC	√	√	√	√	√
CR253-HCC	HCC	√	√	√	√	√
CR255-HCC	HCC	√	√	√	√	√
CR325-HCC	HCC	√	√	√	√	√
CR326-HCC	HCC	√	√	√	√	√
CR235-HCC	HCC	√	√	√	√	X
CR229-HCC	HCC	√	√	√	√	X
CR236-HCC	HCC	√	√	√	√	X
CR250-HCC	HCC	√	√	√	√	X
CR242-HCC	HCC	√	√	√	X	X
CR265-HCC	HCC	√	√	√	X	X
CR320-HCC	HCC	√	√	√	X	X
CR231-HCC	HCC	√	√	X	X	X
CR232-HCC	HCC	√	√	X	X	X
CR237-HCC	HCC	√	√	X	X	X
CR240-HCC	HCC	√	√	X	X	X
CR251-HCC	HCC	√	√	X	X	X
CR264-HCC	HCC	√	√	X	X	X

Tabla 8.5. Estado final de muestras de centro HPH (Hospital Padre Hurrutado) respecto al control de calidad realizado en metodología de extracción de ADN genómico, preparación de librerías, y secuenciación. La columna ‘ADN’ contempla concentración y pureza de ácido nucleico de cada muestra; FA corresponde a integridad por análisis de tamaño de fragmento (*Fragment Analyzer*). Ticket de color verde (√) indica que se superó de forma exitosa cada control de calidad, mientras que equis roja (X) indica que no se lograron las condiciones necesarias para aprobar el criterio de calidad en un determinado paso de la metodología.

Muestra	Centro	ADN genómico		Preparación Librerías		Secuenciación
		ADN	FA	ADN	FA	
CR20-HPH	HPH	√	√	√	√	√
CR27-HPH	HPH	√	√	√	√	√
CR286-HPH	HPH	√	√	√	√	√
CR300-HPH	HPH	√	√	√	√	√
CR309-HPH	HPH	√	√	√	√	√
CR30-HPH	HPH	√	√	√	√	√
CR54-HPH	HPH	√	√	√	√	√
CR59-HPH	HPH	√	√	√	√	√
CR26-HPH	HPH	√	√	√	√	X
CR26-HPH	HPH	√	√	√	√	X
CR227-HPH	HPH	√	√	X	X	X
CR258-HPH	HPH	√	√	X	X	X
CR308-HPH	HPH	√	√	X	X	X

Tabla 8.6 Estado final de muestras de centro HPM (Hospital de Puerto Montt) respecto al control de calidad realizado en metodología de extracción de ADN genómico, preparación de librerías, y secuenciación. La columna ‘ADN’ contempla concentración y pureza de ácido nucleico de cada muestra; FA corresponde a integridad por análisis de tamaño de fragmento (*Fragment Analyzer*). Ticket de color verde (√) indica que se superó de forma exitosa cada control de calidad, mientras que equis roja (X) indica que no se lograron las condiciones necesarias para aprobar el criterio de calidad en un determinado paso de la metodología.

Muestra	Centro	ADN genómico		Preparación Librerías		Secuenciación
		ADN	FA	ADN	FA	
CR111HPM	HPM	√	√	√	√	√
CR113-HPM	HPM	√	√	√	√	√
CR114-HPM	HPM	√	√	√	√	√
CR116-HPM	HPM	√	√	√	√	√
CR19HPM	HPM	√	√	√	√	√
CR39-HPM	HPM	√	√	√	√	√
CR60HPM	HPM	√	√	√	√	√
CR119-HPM	HPM	√	√	√	√	X
CR108-HPM	HPM	√	√	√	X	X
CR115-HPM	HPM	√	√	X	X	X
CR110-HPM	HPM	X	X	X	X	X

Tabla 8.7 Estado final de muestras de centro HRA (Hospital Regional de Arica) respecto al control de calidad realizado en metodología de extracción de ADN genómico, preparación de librerías, y secuenciación. La columna ‘ADN’ contempla concentración y pureza de ácido nucleico de cada muestra; FA corresponde a integridad por análisis de tamaño de fragmento (*Fragment Analyzer*). Ticket de color verde (√) indica que se superó de forma exitosa cada control de calidad, mientras que equis roja (X) indica que no se lograron las condiciones necesarias para aprobar el criterio de calidad en un determinado paso de la metodología.

Muestra	Centro	ADN genómico		Preparación Librerías		Secuenciación
		ADN	FA	ADN	FA	
CR184-HRA	HRA	√	√	√	√	X
CR120-HRA	HRA	√	√	√	X	X
CR181-HRA	HRA	√	√	X	√	X
CR121-HRA	HRA	√	√	X	X	X
CR123HRA	HRA	√	√	X	X	X
CR179-HRA	HRA	√	√	X	X	X
CR182HRA	HRA	√	√	X	X	X
CR186-HRA	HRA	√	√	X	X	X
CR122-HRA	HRA	X	X	X	X	X
CR180-HRA	HRA	X	X	X	X	X

Tabla 8.8 Estado final de muestras de centro HRT (Hospital Regional de Talca) respecto al control de calidad realizado en metodología de extracción de ADN genómico, preparación de librerías, y secuenciación. La columna ‘ADN’ contempla concentración y pureza de ácido nucleico de cada muestra; FA corresponde a integridad por análisis de tamaño de fragmento (*Fragment Analyzer*). Ticket de color verde (√) indica que se superó de forma exitosa cada control de calidad, mientras que equis roja (X) indica que no se lograron las condiciones necesarias para aprobar el criterio de calidad en un determinado paso de la metodología.

Muestra	Centro	ADN genómico		Preparación Librerías		Secuenciación
		ADN	FA	ADN	FA	
CR45-HRT	HRT	√	√	√	√	√
CR65-HRT	HRT	√	√	√	√	√
CR67-HRT	HRT	√	√	√	√	√
CR68-HRT	HRT	√	√	√	√	√
CR42-HRT	HRT	√	√	√	X	X
CR49-HRT	HRT	√	√	√	X	X
CR44-HRT	HRT	√	√	X	X	X
CR63-HRT	HRT	√	√	X	X	X

Tabla 8.9 Estado final de muestras, desde distintos centros de origen (UC: Universidad Católica; HCOR: Hospital Santiago Oriente Doctor Luis Tisné Brousse; HCQ: Hospital de Coquimbo; INC: Instituto Nacional del Cáncer; HDS: Hospital del Salvador; HSJD: Hospital San Juan de Dios; HSBJ: Hospital San Borja; CLI: Clínica INDISA; DA: Clínica Dávila) respecto al control de calidad realizado en metodología de extracción de ADN genómico, preparación de librerías, y secuenciación. La columna ‘ADN’ contempla concentración y pureza de ácido nucleico de cada muestra; FA corresponde a integridad por análisis de tamaño de fragmento (Fragment Analyzer). Ticket de color verde (√) indica que se superó de forma exitosa cada control de calidad, mientras que equis roja (X) indica que no se lograron las condiciones necesarias para aprobar el criterio de calidad en un determinado paso de la metodología.

Muestra	Centro	ADN genómico		Preparación Librerías		Secuenciación
		ADN	FA	ADN	FA	
1293-UC	UC	√	√	√	√	√
1573-UC	UC	√	√	√	√	√
1703-UC	UC	√	√	√	√	√
1788-UC	UC	√	√	√	√	√
CR33HCOR	HCOR	√	√	√	√	√
CR132-HCQ	HCQ	√	√	√	√	√
CR101-INC	INC	√	√	√	√	√
CR106-INC	INC	√	√	√	√	X
CR57-INC	INC	√	√	X	X	X
CR140-HDS	HDS	√	√	√	√	√
CR139-HDS	HDS	√	√	X	X	X
CR24-HDS	HDS	√	√	X	X	X
CR29-HSJD	HSJD	√	√	√	√	√
CR304-HSJD	HSJD	√	√	X	X	X
CR07-HSBJ	HSBJ	√	√	√	√	X
CR35-CLI	CLI	√	√	X	X	X
CR13-DA	DA	√	√	X	X	X

Tabla 8.10 Métricas de calidad de secuenciación para cada muestra secuenciada (correspondiente a un total de 34 pacientes). Se indica para cada respectiva corrida de secuenciación y muestras, las métricas de profundidad, y el porcentaje de lecturas que alcanzan una profundidad de 100X, 200X, y 300X.

ID Corrida	Muestra	Porcentaje de reads on targets	Profundidad promedio en regiones targets	Porcentaje de uniformidad	PCT_100X	PCT_200X	PCT_300X
190607	CR286-HPH	69,9	2013,5	96,3	100,0	100,0	100,0
190607	CR68-HRT	65,9	976,1	91,1	100,0	99,6	98,5
190607	CR67-HRT	70,7	1140,4	96,3	100,0	99,7	99,1
190607	CR106-INC	68,0	1822,6	94,5	100,0	100,0	100,0
190607	CR132-HCQ	50,1	814,3	87,1	99,8	98,5	95,3
190607	CR45-HRT	53,7	857,0	96,9	100,0	99,7	99,2
190607	CR65-HRT	52,1	623,0	97,5	99,4	97,8	94,7
190607	CR20-HPH	54,1	581,0	98,2	100,0	99,2	95,3
190701	CR253-HCC	17,7	682,7	96,0	99,6	98,8	97,3
190701	CR27-HPH	15,0	572,5	92,0	99,1	95,9	83,6
190701	CR54-HPH	69,7	1544,4	96,9	100,0	99,9	99,6
190701	CR326-HPH	70,8	1719,5	98,5	100,0	100,0	99,9
190701	CR101-INC	69,1	1155,0	93,9	100,0	100,0	99,7
190705	CR30-HPH	18,8	515,4	92,9	97,9	91,7	79,1
190705	CR140-HDS	21,4	604,4	91,7	99,0	96,2	89,3
190705	CR325-HCC	17,8	464,1	92,9	98,4	93,2	79,4
190705	CR60-HPM	14,1	407,6	95,7	97,9	90,8	75,7
190705	CR29-HSJD	11,3	842,3	75,5	97,7	87,4	76,8
190705	CR247-HCC	12,0	377,9	97,2	98,2	90,9	71,5
190802	CR30-HPH	67,7	1277,7	95,7	100,0	99,7	99,0
190802	CR140-HDS	61,5	1365,0	96,3	100,0	100,0	99,8
190802	CR325-HCC	58,2	965,9	98,5	100,0	99,9	99,6
190802	CR60-HPM	58,8	782,4	98,5	99,8	99,2	98,4
190802	CR29-HSJD	59,8	1386,7	81,3	100,0	99,4	96,6
190802	CR255-HCC	42,5	294,7	98,8	98,7	86,8	38,3
190822	CR33-HCOR	57,1	680,6	97,9	99,6	99,1	98,0
190822	CR111-HPM	60,0	1184,2	96,3	100,0	99,7	99,4
190830	CR300-HPH	66,5	746,2	90,5	99,8	99,3	96,7
190830	CR309-HPH	65,4	1397,5	98,8	100,0	99,8	99,6
190830	CR59-HPH	63,5	2234,3	86,2	100,0	100,0	100,0
190830	CR114-HPM	68,1	1942,5	98,2	100,0	100,0	99,9
190914	1293-UC	66,6	1289,2	97,2	100,0	100,0	99,6
190914	1788-UC	67,0	1408,3	96,9	100,0	99,9	99,5
190914	1703-UC	55,6	778,2	97,2	100,0	99,4	98,6
190925	CR19-HPM	39,5	632,8	99,1	100,0	99,6	98,7
190925	CR19-HPM	51,2	1067,7	98,5	100,0	100,0	99,6
191017	CR39-HPM	55,8	732,3	98,5	100,0	99,7	99,1
191026	1573-UC	45,8	787,9	98,5	100,0	99,8	99,4
191104	CR113-HPM	17,7	488,0	93,3	99,7	96,8	90,6

Tabla 8.11 Métricas de calidad de secuenciación según corrida y muestra secuenciada. Se incluyen todas las muestras que no pasaron los criterios de calidad establecidos.

ID Corrida	Muestra	Nº reads antes trimming	Nº reads despues trimming	Porcentaje trimmed	Porcentaje duplicados
190701	CR116-HPM	4606872	3983166	13,5	6,0
190830	CR181-HRA	339804	273284	19,6	24,1
191030	CR119-HPM	4620222	892090	80,7	24,3
191030	CR120-HRA	5083838	1012920	80,1	28,1
191030	CR26-HPH	4141232	804860	80,6	24,3
191030	CR233-HCC	6171302	1240284	79,9	35,1
191030	CR229-HCC	6250016	1236054	80,2	28,2
191030	CR113-HPM	14055090	2350872	83,3	49,8
191104	CR120-HRA	4610430	4262614	7,5	46,5
191104	CR119-HPM	4218068	3892246	7,7	43,6
191104	CR26-HPH	3815630	3300620	13,5	46,9
191104	CR229-HCC	5643366	4996452	11,5	48,7
191104	CR233-HCC	5612078	5180424	7,7	56,4

Tabla 8.12 Métricas de calidad de secuenciación según corrida y muestra secuenciada. Se incluyen todas las muestras que no pasaron los criterios de calidad establecidos. Se indica para cada respectiva corrida de secuenciación y muestras, las métricas de profundidad, y el porcentaje de lecturas (*reads*) que alcanzan una profundidad de 100X, 200X, y 300X.

ID Corrida	Muestra	Porcentaje de reads on targets	Profundidad promedio en regiones targets	Porcentaje de uniformidad	PCT_100X	PCT_200X	PCT_300X
190701	CR116-HPM	9,9	279,1	94,5	98,5	75,1	32,0
190830	CR181-HRA	39,1	37,1	92,3	0,2	0,0	0,0
191030	CR119-HPM	17,1	64,9	89,9	6,3	0,1	0,0
191030	CR120-HRA	20,3	87,2	96,3	10,9	0,2	0,0
191030	CR26-HPH	37,5	109,7	94,5	36,2	1,1	0,0
191030	CR233-HCC	31,3	136,8	96,9	65,4	2,7	0,2
191030	CR229-HCC	28,9	134,1	92,9	52,2	5,3	0,7
191030	CR113-HPM	32,5	233,5	84,0	88,7	48,3	17,2
191104	CR120-HRA	11,1	173,7	97,5	94,0	18,4	3,6
191104	CR119-HPM	10,8	187,2	92,9	90,2	30,6	5,5
191104	CR26-HPH	26,3	216,8	94,2	86,7	46,2	12,2
191104	CR229-HCC	17,6	241,1	92,9	93,3	55,3	20,6
191104	CR233-HCC	18,7	246,9	98,8	99,2	72,2	13,7

Tabla 8.13 Detalle de métricas de profundidad de secuenciación según variantes específicas, accionables descritas en genes biomarcadores de respuesta a terapia, en plataforma de interpretación de variantes *Cancer Genome Interpreter* (CGI). *DP*: profundidad de secuenciación *i.e* número total de lecturas que leen una determinada posición

Gen	Alteración	Cambio en Proteína	DP Promedio	DP mínimo	DP máximo
<i>TP53</i>	chr17:g.7577568C>A	p.C238F	1524	1403	1645
<i>PIK3CA</i>	chr3:g.178936082G>A	p.E542K	1754	1754	1754
<i>PIK3CA</i>	chr3:g.178936091G>A	p.E545K	2639.5	2312	2967
<i>KRAS</i>	chr12:g.25398284C>G	p.G12A	2464	2464	2464
<i>KRAS</i>	chr12:g.25398284C>T	p.G12D	1406	396	2478
<i>KRAS</i>	chr12:g.25398285C>T	p.G12S	1559	1202	1916
<i>KRAS</i>	chr12:g.25398284C>A	p.G12V	2064	2064	2064
<i>KRAS</i>	chr12:g.25398281C>T	p.G13D	1420	1420	1420
<i>TP53</i>	chr17:g.7577551C>T	p.G244S	1081	1081	1081
<i>BRAF</i>	chr7:g.140481402C>A	p.G469V	1664	1664	1664
<i>PIK3CA</i>	chr3:g.178952085A>G	p.H1047R	351	351	351
<i>BRCA2</i>	chr13:g.32907428dupA	p.L605Nfs*11	360	360	360
<i>ERBB2</i>	chr17:g.37880220T>C	p.L755S	2067	1047	3088
<i>KIT</i>	chr4:g.55593464A>C	p.M541L	582	371	816
<i>TSC2</i>	chr16:g.2137898C>T	p.P1675L	775	775	775
<i>KRAS</i>	chr12:g.25380275T>G__chr12:g.25380275T>A	p.Q61H	1859	1801	1917
<i>BRCA2</i>	chr13:g.32900639C>T	p.R174C	795	404	1187
<i>TP53</i>	chr17:g.7577538C>T	p.R248Q	1660	1528	1793
<i>TP53</i>	chr17:g.7577539G>A	p.R248W	909	557	1128
<i>TP53</i>	chr17:g.7577138C>T	p.R267Q	509	509	509
<i>TP53</i>	chr17:g.7577121G>A	p.R273C	1155	1155	1155
<i>TP53</i>	chr17:g.7577120C>T	p.R273H	1079	805	1353
<i>TP53</i>	chr17:g.7577099C>T	p.R280K	1859	1859	1859
<i>TP53</i>	chr17:g.7577099C>G	p.R280T	440	440	440
<i>TP53</i>	chr17:g.7577094G>A	p.R282W	559	559	559
<i>BRCA2</i>	chr13:g.32945129C>T	p.R2842C	465	465	465
<i>ERBB2</i>	chr17:g.37868208C>T	p.S310F	588	588	588
<i>ERBB2</i>	chr17:g.37868208C>A	p.S310Y	2247	2247	2247
<i>KRAS</i>	chr12:g.25398279C>T	p.V14I	1948	1948	1948
<i>BRCA1</i>	chr17:g.41245594dupT	p.Y655Vfs*18	1500	1500	1500

Tabla 8.14. Listado de las 45 mutaciones somáticas individuales, con efecto en proteína, identificadas para un total de 26 pacientes (76%) en muestras de tumores de CVB de pacientes de Chile (N=34), luego de análisis en plataforma CGI.

Gen	Alteración	Cambio en proteína	Tipo de mutación	Clasificación CGI
AKT1	chr14:g.105246534C>T	p.W22*	Nonsense	Potencialmente Mutación Pasajera
ARID1A	chr1:g.27087898_27087908del	p.P729Vfs*84	Frameshift	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
ARID1A	chr1:g.27088768A>C	p.M793L	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
ARID1A	chr1:g.27101258A>C	p.T1514P	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
ARID1A	chr1:g.27102188A>G	p.N1705S	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
ARID1A	chr1:g.27105937dupG	p.D1850Gfs*4	Frameshift	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
BRAF	chr7:g.140477807C>T	p.E501K	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
BRCA1	chr17:g.41222975C>T	p.M1652I	Missense	Potencialmente neutral para oncogenesis
BRCA1	chr17:g.41226488C>A	p.S1512I	Missense	Potencialmente neutral para oncogenesis
BRCA2	chr13:g.32953550G>A	p.A2951T	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
ERBB2	chr17:g.37868208C>T	p.S310F	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
ERBB2	chr17:g.37880220T>C	p.L755S	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
KRAS	chr12:g.25380275T>G	p.Q61H	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
KRAS	chr12:g.25398284C>A	p.G12V	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
KRAS	chr12:g.25398284C>G	p.G12A	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
KRAS	chr12:g.25398284C>T	p.G12D	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
PIK3CA	chr3:g.178928327G>C	p.G505R	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
PIK3CA	chr3:g.178936091G>A	p.E545K	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
PIK3CA	chr3:g.178952085A>G	p.H1047R	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
PTCH1	chr9:g.98231110G>A	p.P725S	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
PTCH1	chr9:g.98239900C>T	p.A478T	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
TP53	chr17:g.7576869_7576885del	p.K321Ifs*10	Frameshift	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
TP53	chr17:g.7577094G>A	p.R282W	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
TP53	chr17:g.7577099C>G	p.R280T	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
TP53	chr17:g.7577120C>T	p.R273H	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
TP53	chr17:g.7577121G>A	p.R273C	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
TP53	chr17:g.7577141C>A	p.G266V	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
TP53	chr17:g.7577511A>G	p.L257P	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
TP53	chr17:g.7577538C>T	p.R248Q	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
TP53	chr17:g.7577539G>A	p.R248W	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
TP53	chr17:g.7577550C>A	p.G244V	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
TP53	chr17:g.7577551C>T	p.G244S	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
TP53	chr17:g.7577568C>A	p.C238F	Missense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
TP53	chr17:g.7578212G>A	p.R213*	Nonsense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
TP53	chr17:g.7578275G>A	p.Q192*	Nonsense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
TP53	chr17:g.7578419C>A	p.E171*	Nonsense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
TP53	chr17:g.7579528C>T	p.W53*	Nonsense	Mutación Driver, reportada en otro tipo tumoral
TSC1	chr9:g.135772901G>A	p.R908W	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
TSC1	chr9:g.135776998A>T	p.L827Q	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
TSC1	chr9:g.135777001A>T	p.L826Q	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
TSC1	chr9:g.135801087C>T	p.A84T	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
TSC2	chr16:g.2108764G>A	p.A289T	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)
TSC2	chr16:g.2129396A>G	p.D1084G	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
TSC2	chr16:g.2129560C>G	p.S1096C	Missense	Potencialmente Mutación Pasajera
TSC2	chr16:g.2138318C>T	p.R1751C	Missense	Potencialmente Mutación Driver (TIER 1)

Tabla 8.15. Frecuencia de mutaciones (%) en genes detectados para los distintos cohortes de pacientes según centro de origen. Se indica el número de muestras de cada respectivo cohorte (N). *SG; Singapur.*

GEN	FRECUENCIA DE MUTACIONES (%)					
	JAPON N = 239	SG N = 71	EEUU N = 49	CHINA N = 32	CHILE MSK N = 21	CHILE N = 34
<i>TP53</i>	26	34	54	25	76	47
<i>KRAS</i>	17	20	8	0	19	15
<i>TSC2</i>	1	3	2	0	10	12
<i>ARID1A</i>	9	21	28	6	38	12
<i>ERBB2</i>	6	3	6	9	10	9
<i>PIK3CA</i>	6	4	11	6	14	9
<i>TSC1</i>	4	3	0	0	10	9
<i>BRCA1</i>	1	1	0	6	5	9
<i>BRCA2</i>	4	3	6	0	10	6
<i>PTCH1</i>	1	14	2	0	5	6
<i>AKT1</i>	2	10	1	0	5	3
<i>BRAF</i>	2	3	7	0	0	3
<i>ROS1</i>	2	3	3	3	5	0
<i>ALK</i>	2	1	0	0	5	0
<i>CDK4</i>	3	0	4	3	0	0
<i>EGFR</i>	0	1	4	3	0	0
<i>MET</i>	0	0	1	3	0	0
<i>PTEN</i>	2	8	4	0	0	0
<i>ESR1</i>	3	3	2	0	0	0
<i>MTOR</i>	2	1	2	0	10	0
<i>KIT</i>	2	1	1	0	0	0
<i>IDH2</i>	1	1	1	0	0	0
<i>PDGFRA</i>	1	1	1	0	0	0
<i>NRAS</i>	3	3	0	0	0	0
<i>SMO</i>	0	0	0	0	0	0

Tabla 8.16. Test exacto de Fisher para el número de alteraciones entre cohorte de Chile (n=34) versus cohorte de EEUU (n=49) y cohorte de China (n=32).

COHORTE EEUU		COHORTE CHINA	
Gen	p-value	Gen	p-value
<i>AKT1</i>	0,754	<i>AKT1</i>	0,320
<i>ARID1A</i>	0,042	<i>ARID1A</i>	0,320
<i>BRAF</i>	0,625	<i>BRAF</i>	0,320
<i>BRCA1</i>	0,028	<i>BRCA1</i>	0,642
<i>BRCA2</i>	> 0,999	<i>BRCA2</i>	0,063
<i>CDK4</i>	0,344	<i>CDK4</i>	0,320
<i>KRAS</i>	0,444	<i>KRAS*</i>	0,0005
<i>MTOR</i>	0,705	<i>PIK3CA</i>	0,642
<i>PIK3CA</i>	0,923	<i>PTCH1</i>	0,063
<i>PTCH1</i>	0,593	<i>TP53*</i>	0,008
<i>PTEN</i>	0,344	<i>TSC1</i>	0,011
<i>TP53</i>	0,674	<i>TSC2*</i>	0,002
<i>TSC1</i>	0,028		
<i>TSC2</i>	0,043		

Tabla 8.17. Test exacto de Fisher para número de alteraciones entre cohorte de Chile (N=34) versus cohorte de Japón (n=237) y cohorte de Singapur (n=72).

COHORTE SINGAPUR		COHORTE JAPÓN	
Gen	p-value	Gen	p-value
<i>AKT1</i>	0,253	<i>AKT1</i>	> 0,999
<i>ARID1A</i>	0,253	<i>ARID1A</i>	0,844
<i>BRAF</i>	> 0,9999	<i>BRAF</i>	> 0,999
<i>BRCA1</i>	0,157	<i>BRCA1</i>	0,105
<i>BRCA2</i>	0,604	<i>BRCA2</i>	0,908
<i>CDK4</i>	> 0,9999	<i>CDK4</i>	0,533
<i>KRAS</i>	0,598	<i>MTOR</i>	0,840
<i>NRAS</i>	0,355	<i>NRAS</i>	0,533
<i>PIK3CA</i>	0,355	<i>PIK3CA</i>	0,840
<i>PTCH1</i>	0,253	<i>PTCH1</i>	0,503
<i>PTEN</i>	0,115	<i>PTEN</i>	0,840
<i>TP53</i>	0,253	<i>TP53</i>	0,027
<i>TSC1</i>	0,253	<i>TSC1</i>	0,533
<i>TSC2</i>	0,162	<i>TSC2</i>	0,027

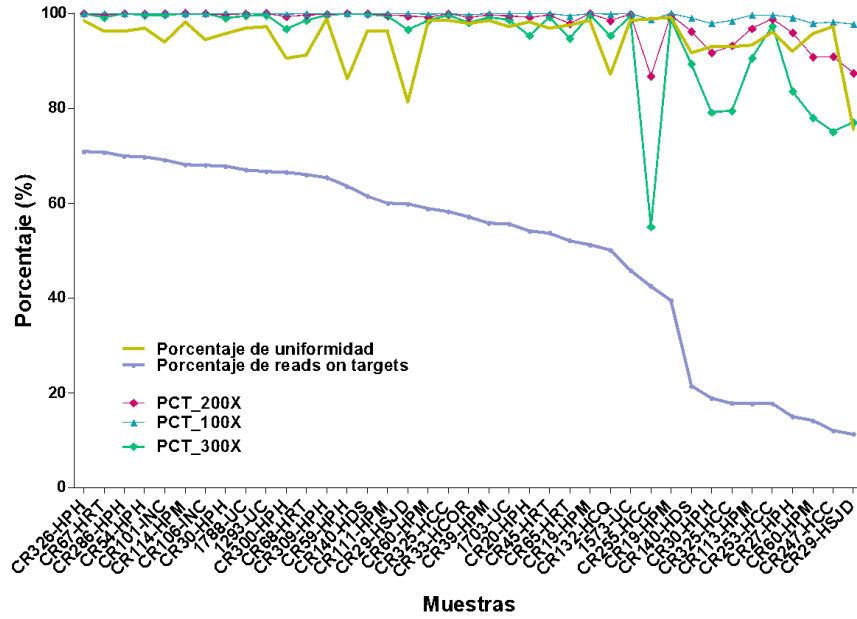


Figura 8.1 Métricas de secuenciación para cada muestra. Se representa porcentaje de profundidad de lecturas en regiones blanco (*reads on target*) y porcentaje de uniformidad (línea amarilla). Se contrasta además porcentaje de bases *on-targets* que poseen una cobertura mayor o igual a 100X (rojo), 200X (azul), y 300X (verde).

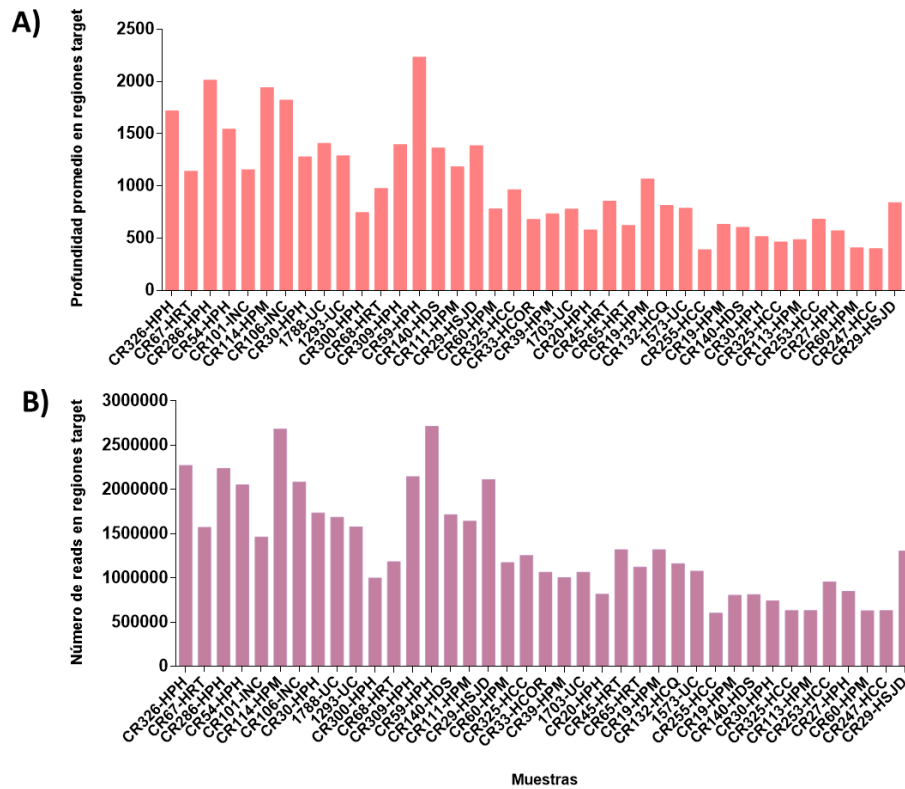


Figura 8.2 (A) Profundidad promedio de lecturas en regiones blanco (Eje Y). (B) Número total de lecturas (*reads*) en regiones blanco (Eje Y). En Eje X se señalan las muestras en estudio (n=34).

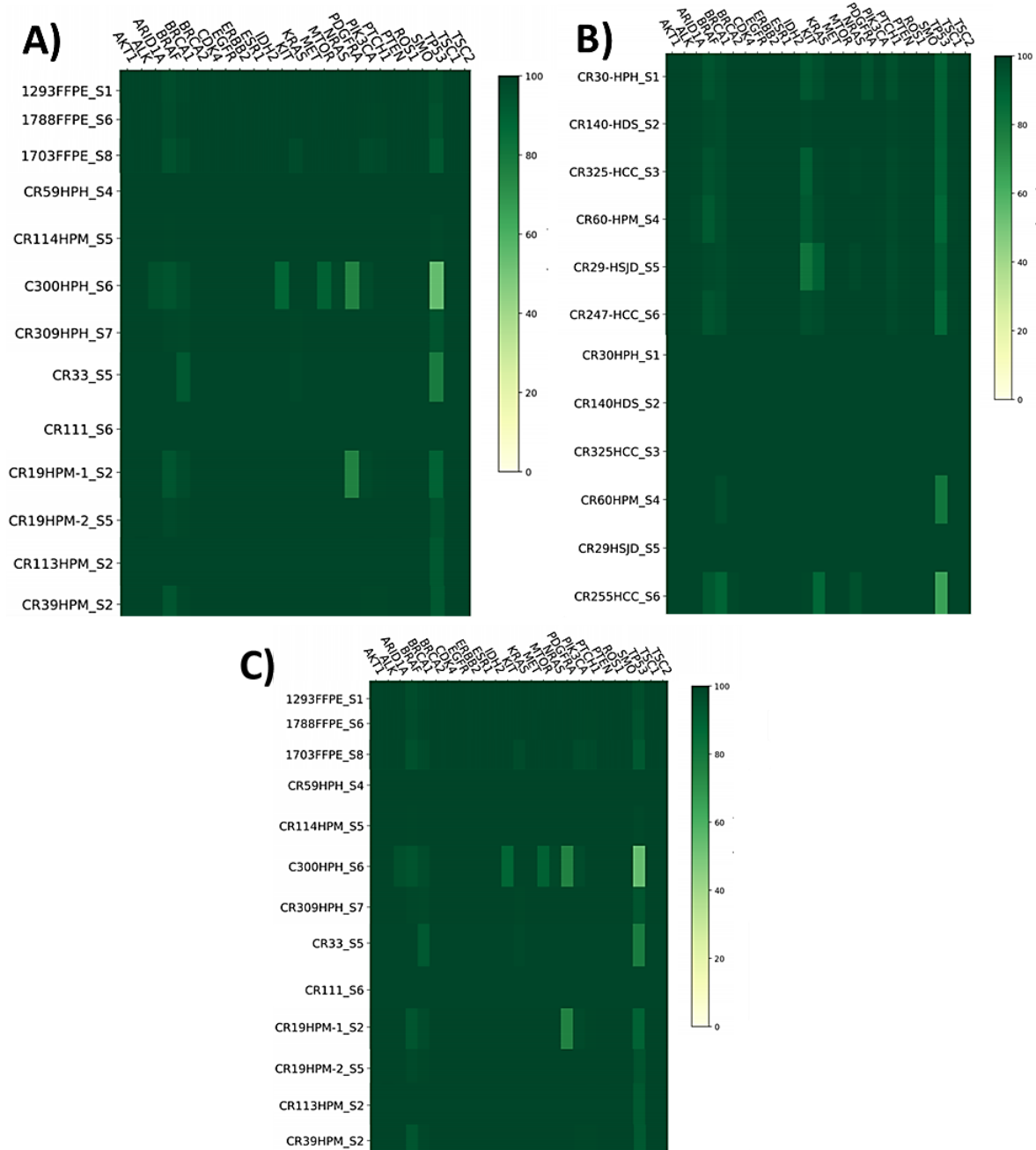


Figura 8.3 Heatmap para porcentaje de bases *on targets* que poseen una cobertura mayor o igual a 300X, columnas indican 25 genes de panel TumorSec, y filas indican cada respectiva muestra. Gráfico realizado como parte del análisis bioinformático de muestras, por la Ingeniera en Bioinformática Evelin Gonzalez Feliu, del laboratorio Genómica del Cáncer y laboratorio GENOMED. En orden descendiente, se incluyen las siguientes muestras: **(A)** CR286-HPH; CR68-HRT; CR67-HRT; CR106-INC; CR45HRT; CR65-HRT; CR20-HPH; CR253-HCC; CR27-HPH; CR54-HPH; CR326-HPH; CR101-INC **(B)** CR30-HPH; CR140-HDS; CR325-HCC; CR60-HPM; CR29-HSJD; CR247-HCC; CR30-HPH; CR140-HDS; CR325-HCC; CR60-HPM; CR29-HSJD; CR255-HCC. **(C)** 1293-UC; 1788-UC; 1703-UC; CR59-HPH; CR114-HPM; CR300-HPH; CR33-HCOR; CR111-HPM; CR19-HPM; CR113-HPM; CR39-HPM.

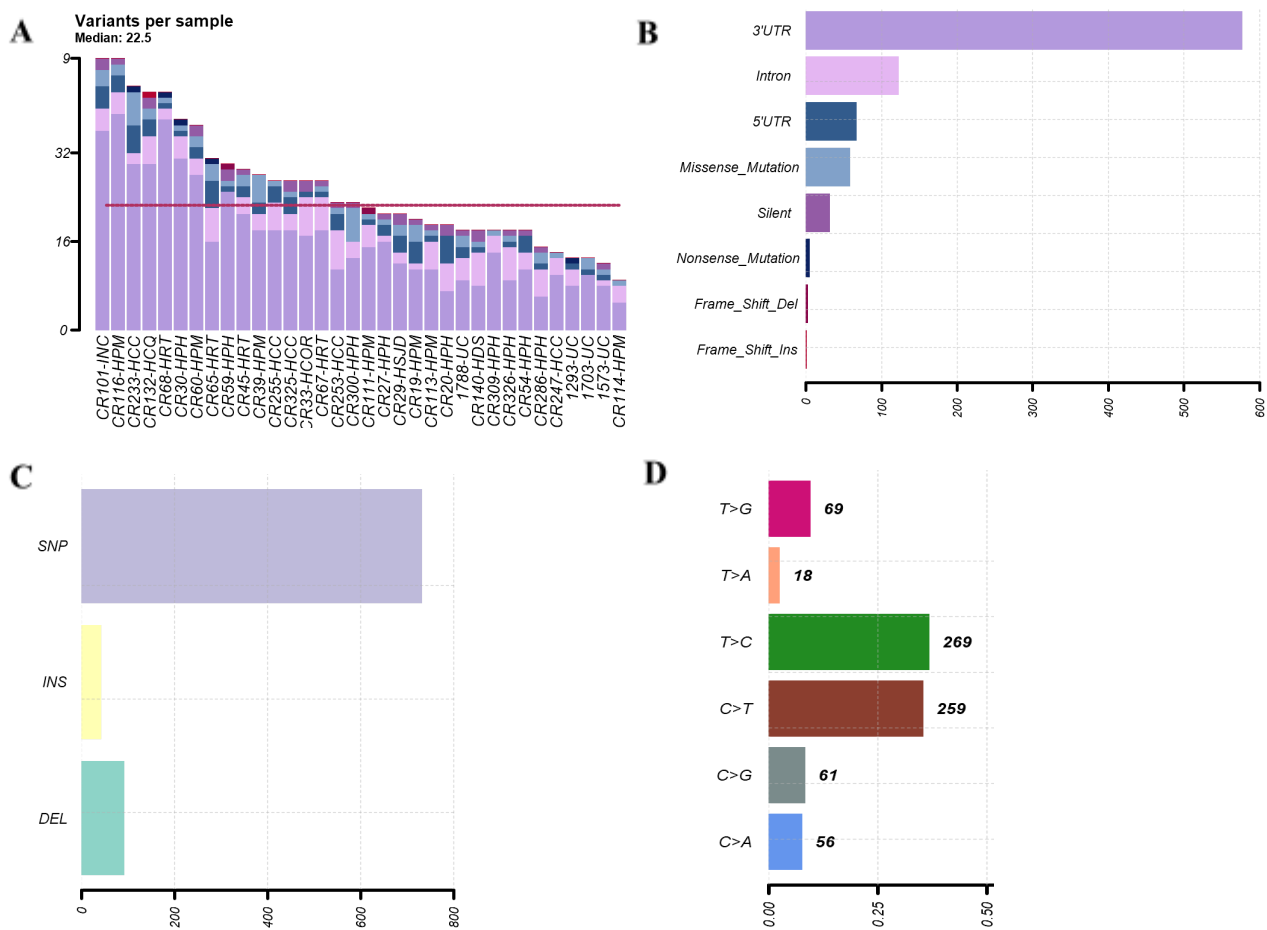


Figura 8.4 Resumen del total de variantes (**863**) detectadas en muestras de tumores CVB (N=34) para primer proceso de filtrado. **(A)** Número de variantes detectadas (eje Y) en cada paciente (eje X). Línea roja indica la media obtenida (= 22.5) para total de mutaciones por muestra. Colores de columna indican los distintos tipos de mutaciones: celeste para mutaciones missense, azul oscuro para nonsense, rojo para cambio de lectura por inserción, rojo oscuro para cambio de lectura por delección; morado para 3'UTR, rosado para Intrón, azul para 5'UTR, y morado oscuro para Silentes **(B)** Cantidad total de mutaciones detectadas (eje X) según tipos de mutaciones identificadas (Eje Y), con su respectivo color; **(C)** Número de mutaciones (eje X) según clasificación de variantes detectadas; **(D)** Número de mutaciones (eje X) según tipos de variaciones de nucleótido único identificadas (eje Y).

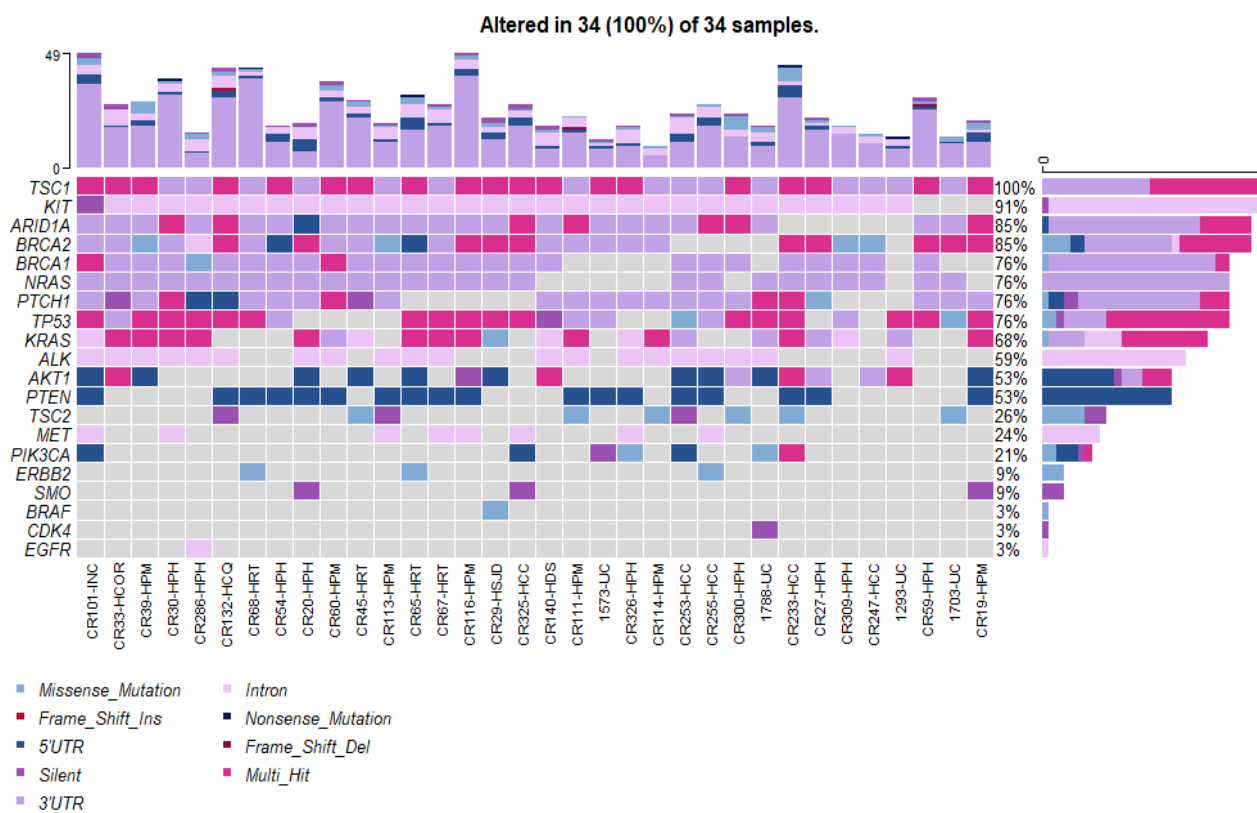
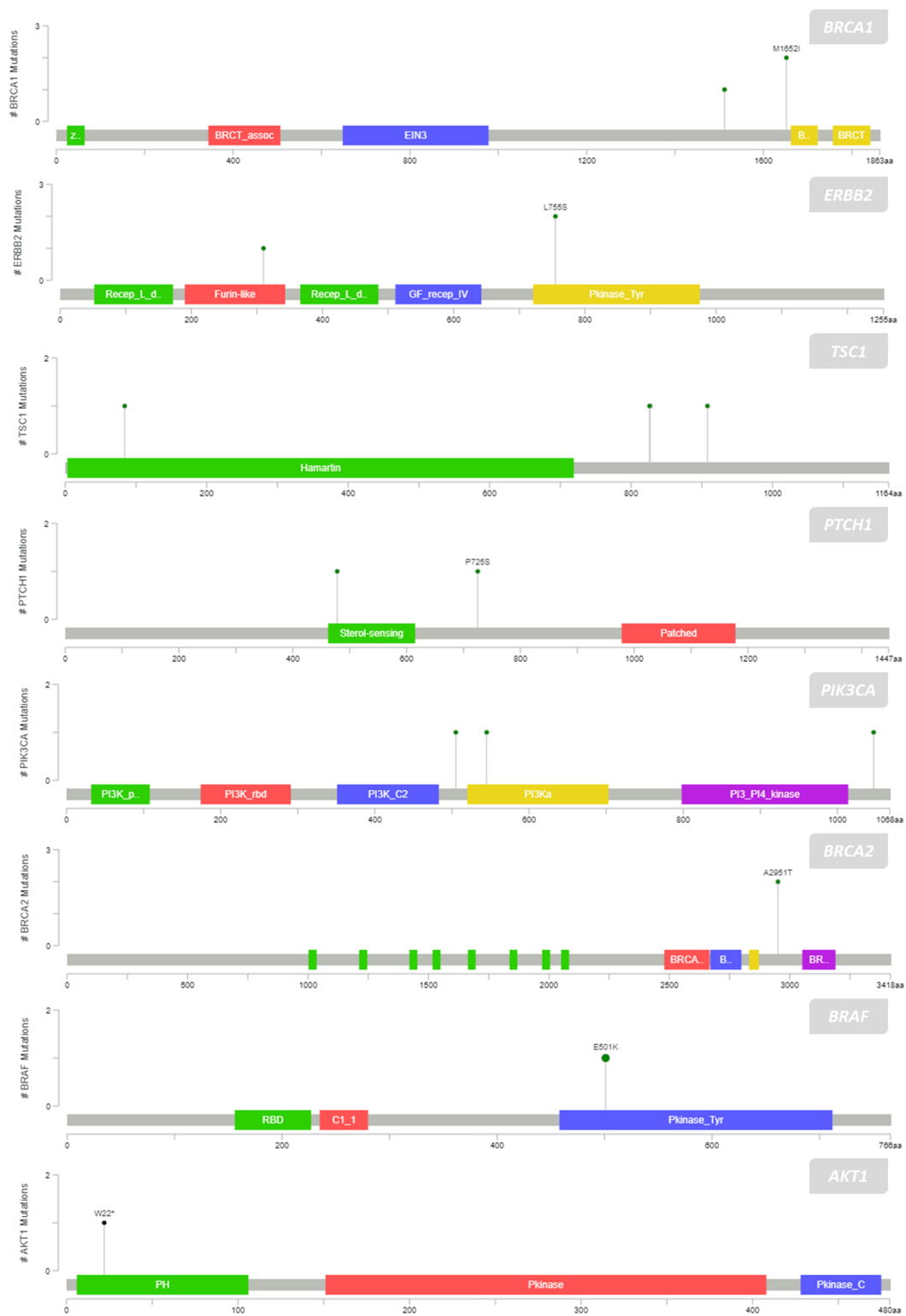


Figura 8.5 Oncoplot (gráfico de distribución) del estado mutacional de genes detectados para primer filtrado de variantes (863) distribuidas en 34 pacientes. A lo largo de las columnas se señalan las muestras (eje X) con las variantes detectadas para el total de 25 genes del panel TumorSec (eje Y). Gráficos de barras para columnas indican número de viantes por muestras, mientras que gráfico lateral según filas indican número de variantes según cada gen, junto con su frecuencia (%). Para los genes representados por más de un tipo de mutación, se utiliza la denominación “Multi-Hit”. Colores en cada cuadrado representan el tipo de mutación, de acuerdo a lo que se indica en la leyenda inferior de la figura.



Figuras 8.6 Gráficos de mapa de mutaciones ilustrando el efecto de mutaciones en proteínas codificadas por los genes analizados en los pacientes. Se muestra gráficos para *BRCA1*, *ERBB2*, *TSC1*, *PTCH1*, *PIK3CA*, *BRCA2*, *BRAF*, y *AKT1*.

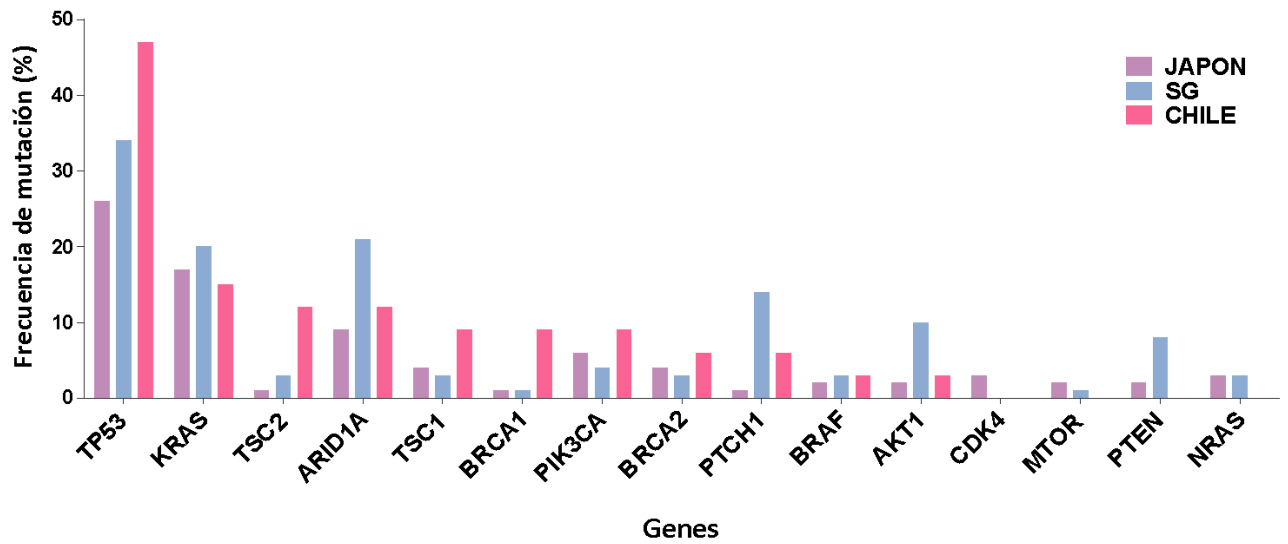


Figura 8.7 Comparación entre la frecuencia de mutaciones (%) detectadas en genes para los cuales se analizó la secuencia codificante completa (todos los exones) dentro del panel TumorSec. Las columnas indican el país de origen de la cohorte de pacientes (datos ICGC). *SG*; *Singapur*

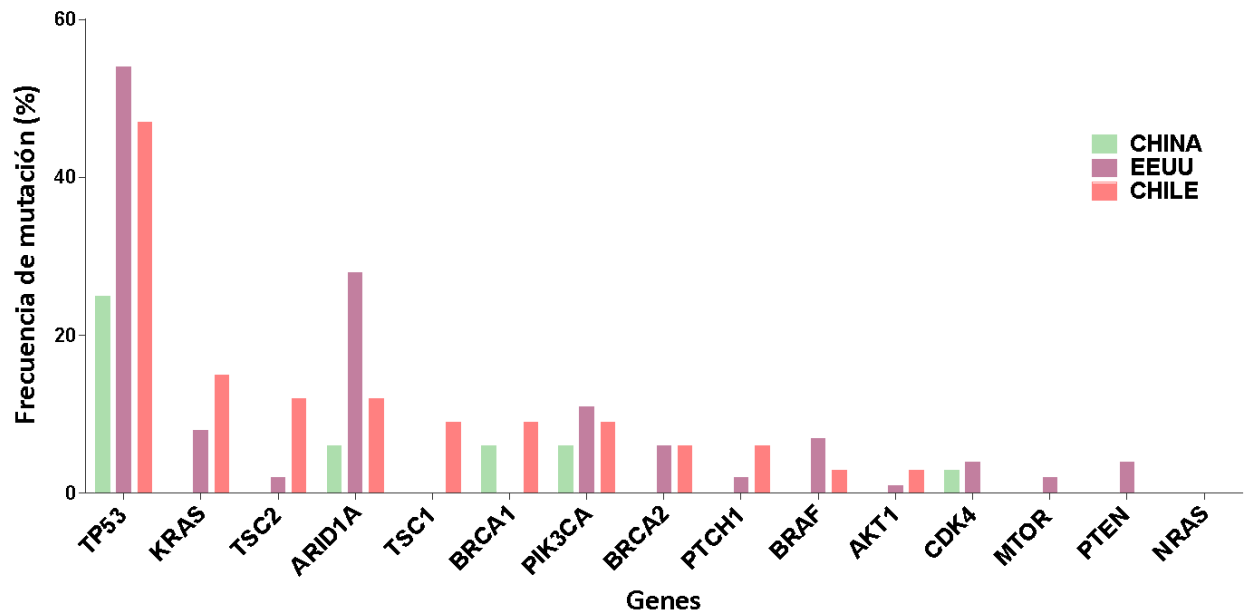


Figura 8.8 Comparación entre la frecuencia de mutaciones (%) detectadas en genes para los cuales se analizó la secuencia codificante completa (todos los exones) dentro del panel TumorSec. Las columnas indican el país de origen de la cohorte de pacientes (datos cBioportal). *EEUU*; *Estados Unidos*

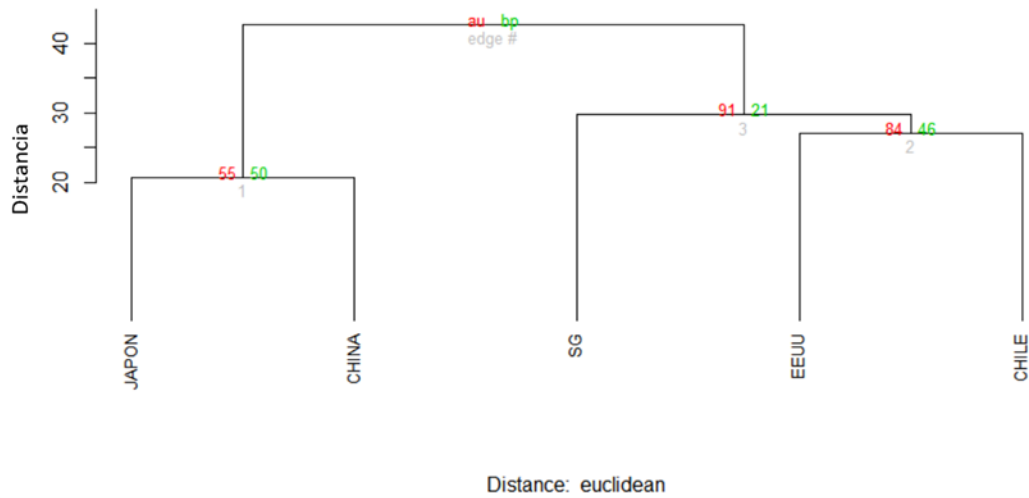


Figura 8.9 Dendrograma de agrupación en base a frecuencia mutacional; para un total de 5 grupos contrastados: Estados Unidos; Chile; China; Japón; y Singapur. Eje Y señala métrica de distancia Euclidiana. Para análisis de *bootstrapping*, en cada agrupación se calculan dos tipos de “*p-value*”: AU (*Approximately Unbiased*; color rojo) y BP (*Bootstrap Probability*; color verde). Clusters con un valor de AU igual o por encima del 95% se consideran con una fiabilidad alta ⁴⁵.

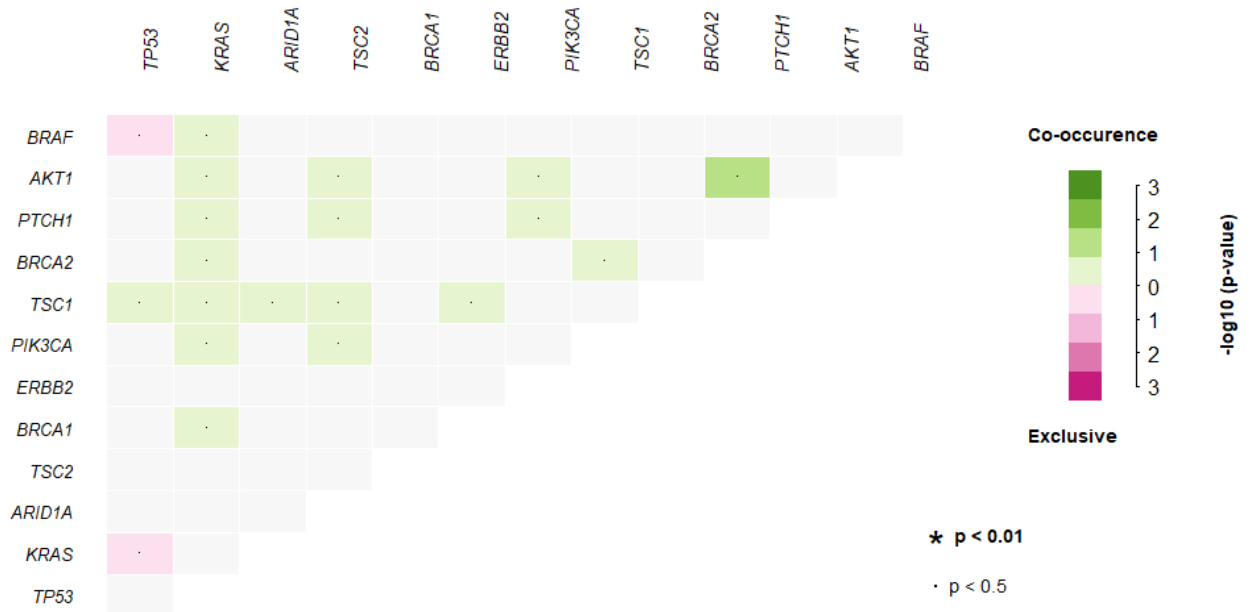
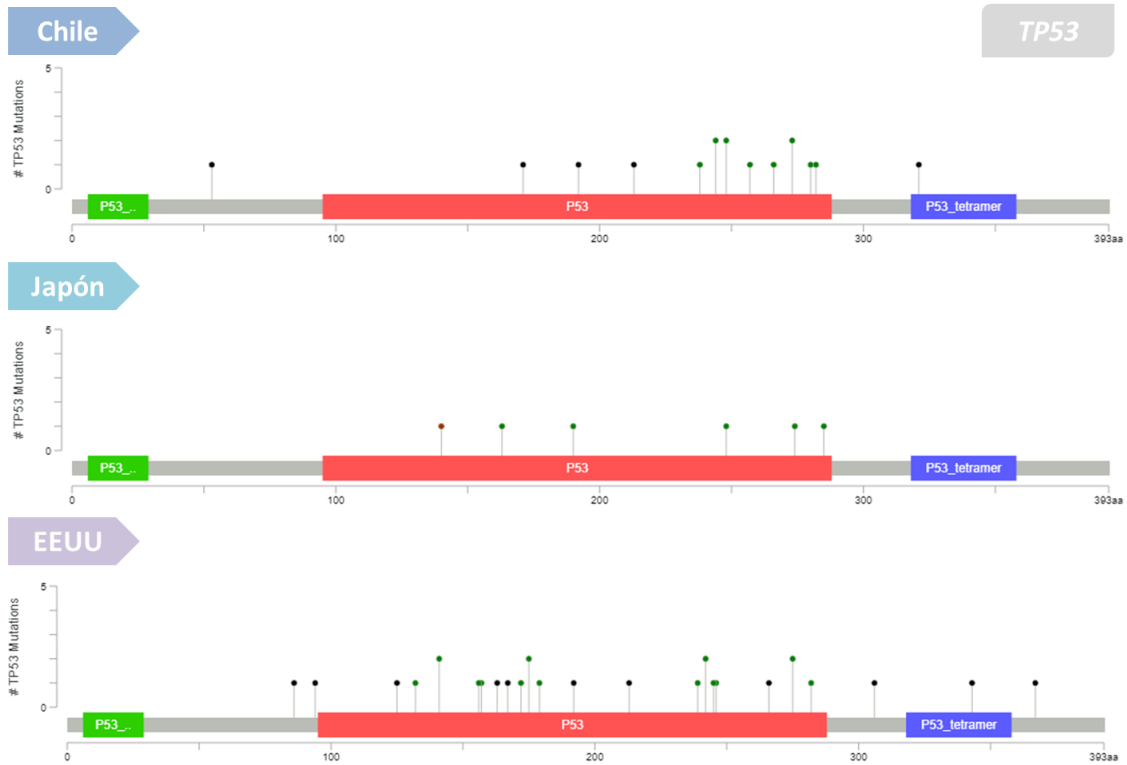
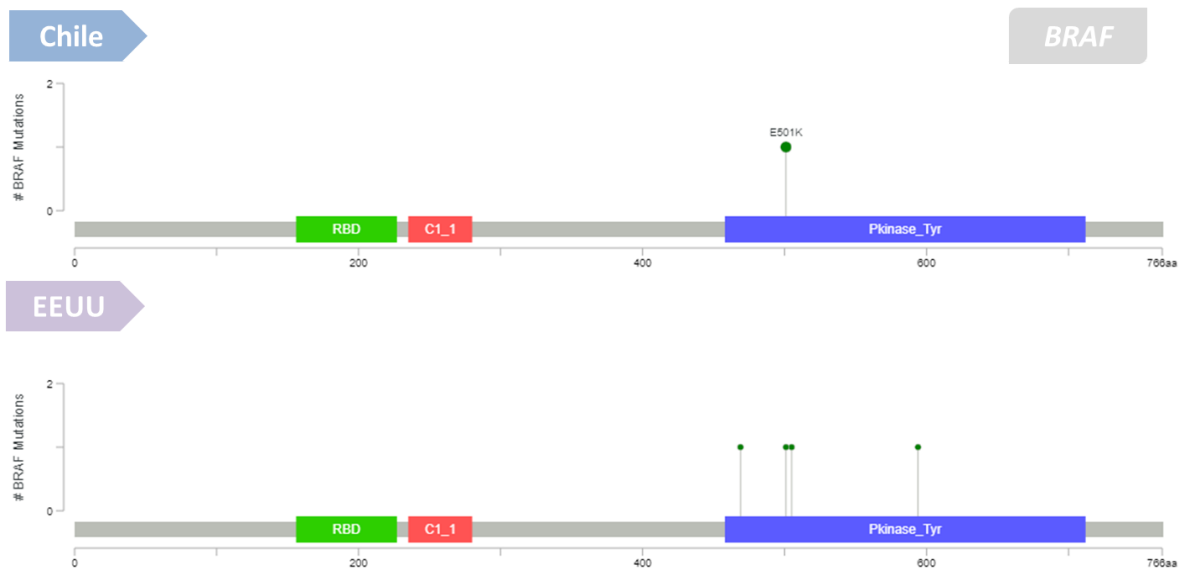


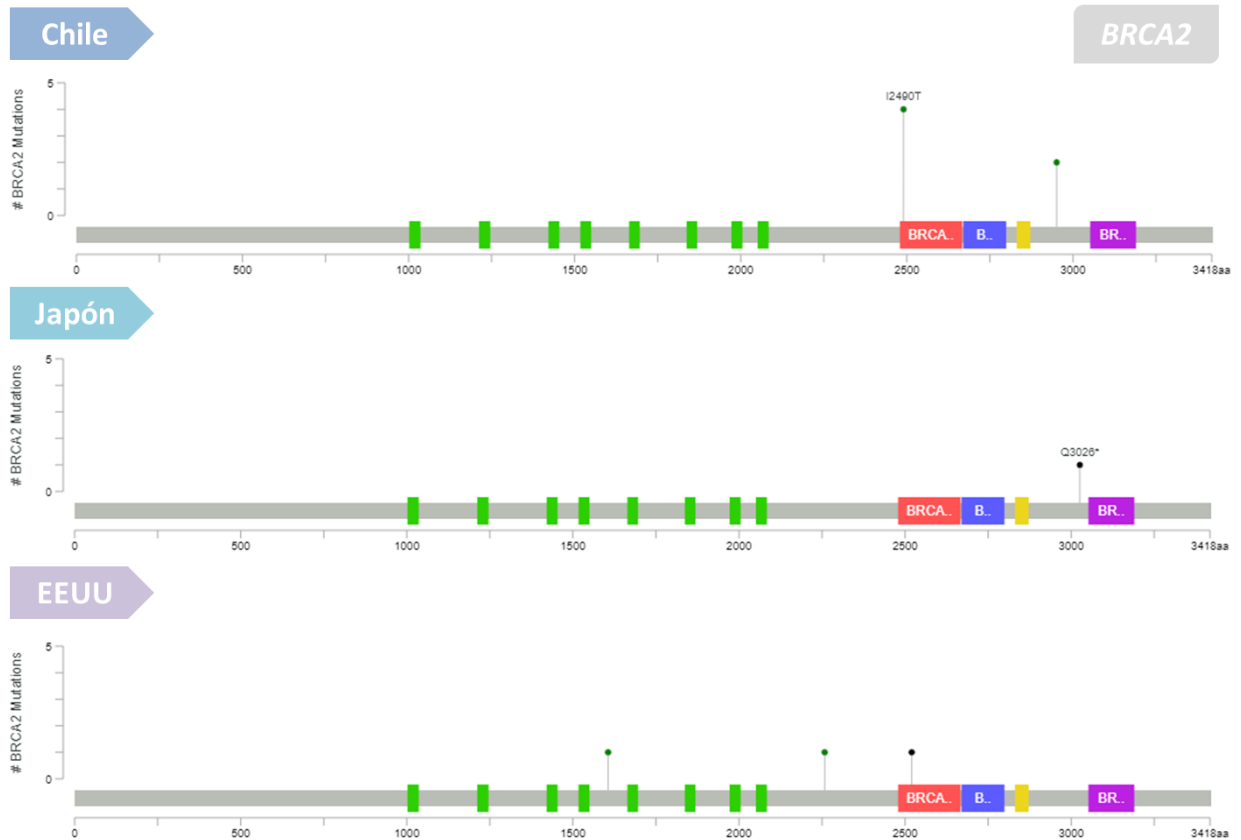
Figura 8.10 Patrones de coocurrencia y exclusividad mutua entre 12 genes con al menos una alteración somáticas con efecto en proteína, detectados en el cohortes de pacientes de Chile del presente estudio (n=34).



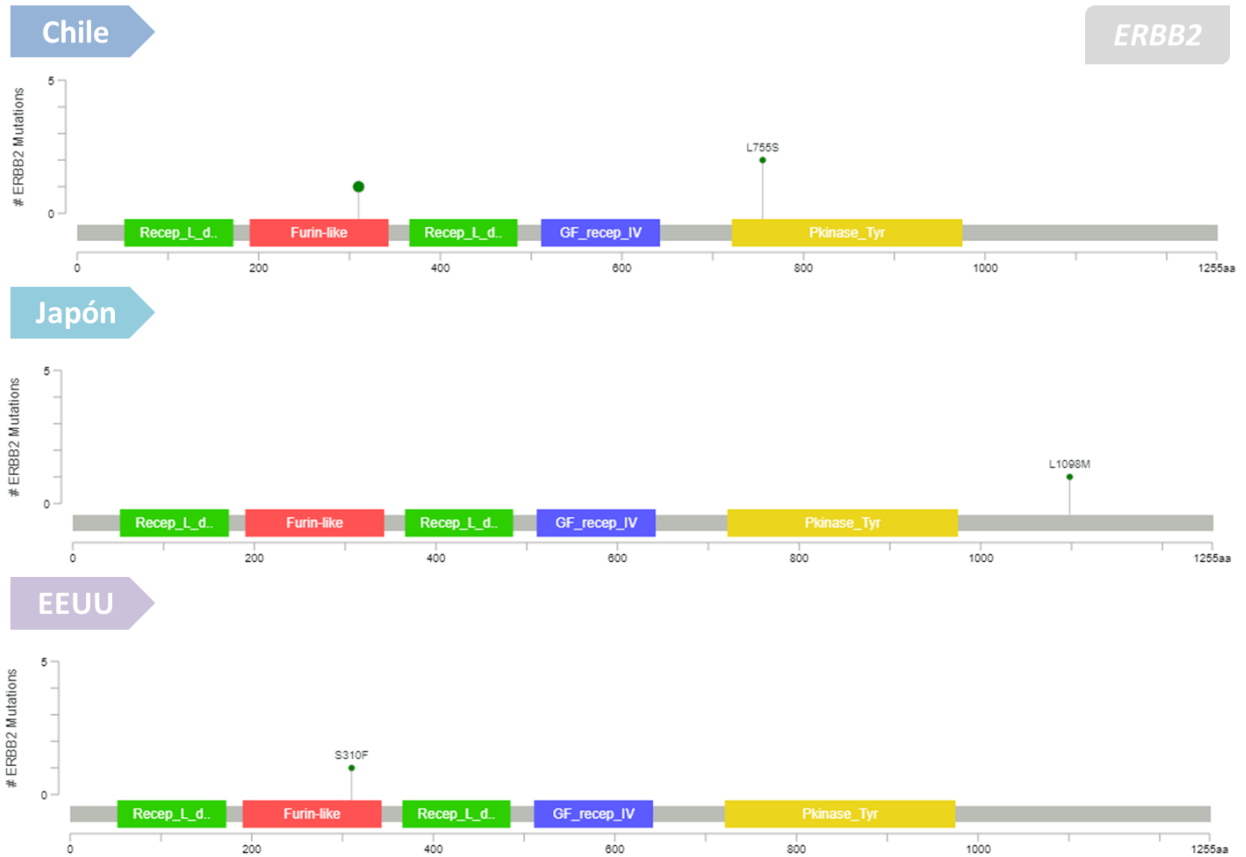
Figuras 8.11 Gráficos de mapa de mutaciones ilustrando el efecto de mutaciones en proteínas codificadas por los genes analizados en los pacientes. Se muestran gráficos para *TP53*, en contraste con gráfico correspondiente a pacientes de Japón y EEUU (MSK).



Figuras 8.12 Gráficos de mapa de mutaciones ilustrando el efecto de mutaciones en proteínas codificadas por los genes analizados en los pacientes. Se muestran gráficos para *BRAF*, en contraste con gráfico de pacientes de EEUU (cBioPortal, MSK).



Figuras 8.13 Gráficos de mapa de mutaciones ilustrando el efecto de mutaciones en proteínas codificadas por los genes analizados en los pacientes. Se muestran gráficos para *BRCA2*, en contraste con gráfico correspondiente a pacientes de Japón y EEUU (MSK).



Figuras 8.14 Gráficos de tipo Lollipop del efecto de mutaciones en proteínas codificadas por los genes analizados en los pacientes. Se muestran gráficos para ERBB2, en contraste con gráfico correspondiente a pacientes de Japón y EEUU (MSK)

9. Actas de aprobación de comité de bioética, Consentimiento Informado, y Protocolo de Aprobación de Proyectos Clínicos



Servicio de Salud Metropolitano Oriente
Comité de Ética Científico

PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS

Con fecha 08 de Noviembre de 2016, el CEC del S.S.M. Oriente analizó y aprobó el Proyecto de Investigación Clínica, patrocinado por la Universidad de Chile, Fundación Arturo López Pérez y el Instituto de Salud Pública (ISP), titulado:

“TumorSec: Optimización, validación y masificación de un ensayo de secuenciación de genes para mejorar la precisión de terapias oncológicas,

y que conducirá como Investigador Responsable la **Dra. Katherine Marcelain Cubillos** en la **Fundación Arturo López Pérez** ubicada en Rancagua 878 Providencia, Santiago de Chile.

Se analizó y aprobó el siguiente documento del Proyecto:

- Proyecto de Investigación Clínica in extenso “TumorSec: Optimización, validación y masificación de un ensayo de secuenciación de genes para mejorar la precisión de terapias oncológicas,
- Consentimiento Informado el estudio “TumorSec: Optimización, validación y masificación de un ensayo de secuenciación de genes para mejorar la precisión de terapias oncológicas Versión 1.0 Octubre 2016, fechado por el CEC del S.S.M. Oriente el 08 de Noviembre de 2016

Tomó conocimiento de:

- Carta de apoyo proyecto de investigación emitida por el Dr. Hugo Marsiglia Director Médico Instituto Oncológico Fundación Arturo López Pérez, de fecha 13 Octubre 2016.
- Carta de compromiso del Investigador Principal.
- CV del Investigador Principal: Dra. Katherine Marcelain Cubillos.

Envío la nómina de los miembros permanentes del CEC del S.S.M. Oriente al 08 de Noviembre de 2016:

Dra. Sara Chernilo S.	Broncopulmonar (Presidente)	Inst. Nacional del Tórax
Dra. M. Esther Meroni L.	Geriatra (Secretaria)	Inst. Nac. de Geriatria
Dr. Ricardo Vacarezza	Asesor en Bioética	No institucional
EU Elena Núñez M.	Coordinadora	No institucional
Dr. Carlos Rey C.	Cardiólogo	Hospital del Salvador
Dr. Rómulo Melo Monsalve	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugia
Dr. Manuel Sedano Lorca	Gineco-Obstetra	Hospital Dr. Luis Tisné
Dr. Lientur Taha M.	Neurocirujano	Inst. Nac. de Neurocirugia
Dr. Jorge Plasser Troncoso	Cirujano- Oncólogo	Hospital del Salvador
Sra. Angélica Sotomayor	Abogado	No institucional
Sr. Hugo Gutiérrez Guerra	Miembro de la Comunidad	No institucional


Dra. M. Esther Meroni Layes
 Secretaria



Santiago, 08 de Noviembre de 2016



**ACTA DE APROBACIÓN
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS**

14 MAR. 2017

Con fecha 14 de Marzo de 2017, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Prof. Gina Raineri B., Abogado y Enfermera-Matrona, Mg. Bioética, Secretaria
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dra. Lucia Cifuentes O., Médico Genetista
Dra. María Angela Delucchi Bicocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.
Dr. Miguel O'Ryan Médico Infectólogo
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **""TUMORSEC: OPTIMIZACIÓN, VALIDACIÓN Y MASIFICACIÓN DE UN ENSAYO DE SECUENCIACIÓN DE GENES PARA MEJORAR LA PRECISIÓN DE TERAPIAS ONCOLÓGICAS""**. Cuyo investigador responsable es Dra. Katherine Marcelain Cubillos, quien desempeña funciones en el Departamento de Oncología Básico Clínico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso.*
- *CV del Investigador responsable y de los Co-investigadores.*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) **Carácter de la población estudiada:** cautiva, de apoyo al diagnóstico y a la terapia.
- b) **Utilidad del Proyecto:** Tiene una clara utilidad diagnóstica y terapéutica.
- c) **Riesgos y Beneficios:** los de una toma de sangre y la obtención de biopsias esta dentro de una cirugía programa por su médico tratante.



2/2
14 MAR. 2017

- d) Protección de los participantes: los pacientes están protegidos por el procedimiento solicitado por su tratante en una institución responsable.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: los pacientes están protegidos por el procedimiento solicitado por su tratante en una institución responsable.
- f) Compromiso del investigador responsable en la notificación de los resultados del estudio al finalizar el proyecto: Si, se compromete

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Santiago, 14 de Marzo de 2017.



Prof. Gina Raineri B.
Secretaria Ejecutiva CEISH

- Archivo Proy. Nº 179-2016.
- Archivo ACTA 002

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl

CONSENTIMIENTO INFORMADO



14 MAR. 2017

TUMORSEC: OPTIMIZACIÓN, VALIDACIÓN Y MASIFICACIÓN DE UN ENSAYO DE SECUENCIACIÓN DE GENES PARA MEJORAR LA PRECISIÓN DE TERAPIAS ONCOLÓGICAS

PATROCINANTE:

Nombre del Investigador principal: Katherine Marcelain Cubillos.

R.U.T. 12.903.456-4

Institución: Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Teléfonos: 2978 6705

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "TumorSec: Optimización, validación y masificación de un ensayo de secuenciación de genes para mejorar la precisión de terapias oncológicas". Este estudio busca generar nuevo conocimiento relacionado con el cáncer, a través de proyectos de investigación (tanto el presente como otros futuros), empleando la muestra que está siendo solicitada.

El término "secuenciación" se refiere a determinar la información codificada en el material genético contenido en las células de su organismo (también conocido como ADN). En este proyecto se identificarán cambios en la secuencia de genes (mutaciones) que permitirán anticiparse al funcionamiento de ciertos tratamientos farmacológicos. Estos cambios pueden estar involucrados en la forma en que un paciente responde a un tratamiento. Para generar este conocimiento, necesitamos obtener y estudiar un gran número de muestras y tumores de diferentes personas.

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivos generar avances científicos que permitan mejorar la indicación terapéutica en pacientes oncológicos.

El estudio incluirá a un número total de 190 muestras, obtenidas de pacientes del HCUCH, a través del Biobanco de Tejidos y Fluidos de la Universidad de Chile, y de pacientes reclutados en la Fundación Arturo López Pérez (FALP).

Procedimientos: Si usted está de acuerdo en participar de este estudio, se le solicita donar parte de la muestra del tejido que se obtendrá con fines diagnósticos, o de la cirugía que se realice como parte de su tratamiento, según sea la indicación médica. Bajo ninguna circunstancia se realizarán cirugías o procedimientos especiales con el único fin de obtener muestras para este estudio. Adicionalmente, se le solicitará donar 10 cc (dos cucharaditas de té) de sangre en otro tubo, que fue o será recolectada para sus exámenes de laboratorio.

De las muestras que usted donó, se obtendrá el ADN y se secuenciarán diversos genes que son relevantes para el cuidado del paciente con cáncer. Este procedimiento se realizará indistintamente en nuestros laboratorios o en el laboratorio de Investigadores Asociados a este proyecto.



14 MAR. 2017

Todas las muestras de ADN serán almacenadas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Dado que la investigación avanza rápidamente y se generan nuevas preguntas respecto al cáncer, los investigadores le solicitan (a través de este documento) autorización para almacenar su muestra (o el ADN de ésta), en forma indefinida o hasta que sea utilizada en su totalidad. Las muestras serán empleadas sólo para investigación.

Si las muestras fuesen de utilidad para otra investigación (distinta a la que se explica en este documento), entonces para poder utilizarlas, los investigadores deberán obtener la aprobación del Comité de Ética de la Institución en que se realizará dicho estudio, previo a que se realice cualquier tipo de análisis.

Solo se obtendrán datos de su ficha clínica relacionados con las características de su enfermedad y que sean relevantes para el estudio, respetando la confidencialidad de la información.

Riesgos: La obtención de las muestras (tejido y sangre) para este estudio no implica un riesgo adicional para usted, ya que estas muestras serán derivadas de las obtenidas para los procedimientos indicados por su Médico.

Costos: Este estudio no tendrá ningún costo para Usted.

Beneficios: Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio no le proporcionará ningún beneficio personal.

Alternativas: Usted tiene la alternativa de participar o no en este estudio. La no participación no tendrá ninguna consecuencia para usted en su atención en éste Centro.

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

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, no se liberará o publicará ninguna información relacionada a su identidad. Su identidad tampoco será entregada en ningún informe sobre este estudio, cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Cualquier tipo de muestra o información que se facilite para investigación será codificada. La información se mantendrá asegurada en gabinetes especiales (de acceso restringido) o en archivos computacionales con claves. Ningún

resultado derivado de este u otros estudios será entregado directamente a su médico o institución de salud (FONASA o ISAPRE) sin su aprobación.



Cualquier dato o muestra que se envíe fuera de Chile será codificada (esto quiere decir que no contendrán su nombre ni ningún tipo de información personal) y se realizará cumpliendo todas las exigencias que la ley chilena establece. Al firmar este consentimiento, usted autoriza a que se transfiera información derivada de sus muestras, de manera anónima, hacia organizaciones que se encuentran fuera de Chile y que participan de este estudio.

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

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

Investigador: Dra. Katherine Marcelain Email: kmarcelain@med.uchile.cl, Teléfono: 229786705.

Investigadora: Dra. Olga Barajas Barajas. Teléfono: 229788917 Email: olbeba@gmail.com

Otros Derechos del participante

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con:

Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos, Presidente Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 229789536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia, Santiago.

Comité Ético Científico de Investigación del Hospital Clínico Universidad de Chile, Teléfono: 229789008, Email: comiteetica@hcuch.cl, ubicado en Santos Dumont 999, 4 Piso Sector D, Comuna de Independencia, Santiago.

Comité Ético Científico de la Fundación Arturo López Pérez (FALP) Teléfono: 224457348, Email: cec@falp.org, ubicado en Rancagua 878, Comuna de Providencia, Santiago.



14 MAR. 20

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "TumorSec: Optimización, validación y masificación de un ensayo de secuenciación de genes para mejorar la precisión de terapias oncológicas".

Nombre del sujeto
Rut.

Firma

Fecha

Nombre de informante
Rut.

Firma

Fecha

Nombre del investigador
Rut.

Firma

Fecha

ACTA DE APROBACION Nº 18

Santiago, 26 abril de 2017.

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

Dr. Antonio Morales Barria. Médico Gastroenterólogo. Presidente
Dra. Ana María Madrid S. Médico Gastroenterólogo. Vicepresidente
Prof. Verónica Anguita Mackay. Académico. Secretaria de Acta
Dr. Sergio Valenzuela P. Médico Gineco-Obstetra
Dr. Juan Carlos Prieto D. Médico Farmacología Clínica
Srta. Rina Sepúlveda A. Abogado.
Dra. Gloria López Stewart. Médico Endocrinóloga.
Dra. Teresa Massardo Vega. Médico Cirujano.
Dr. Juan Jorge Silva. Médico Cirujano.

Ha analizado el Proyecto "TumorSec: Optimización, Validación y Masificación de un Ensayo de Secuenciación de Genes para Mejorar la Imprecisión de Terapias Oncológicas", cuya investigadora principal es la Dra. Katherine Marcelain Cubillos, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Participa como co-investigadora la Dra. Olga Barajas Barajas, de la Sección de Oncología, quienes realizarán el proyecto en este mismo servicio del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

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

- Carta de presentación a Comité.
- Formulario de Solicitud de Evaluación de Proyecto de Investigación por Comité.
- Carta de compromiso de la investigadora.
- Curriculum vitae de la investigadora.
- Protocolo de Estudio.
- Documento de Consentimiento Informado Versión 3.0, fechado 26 Abril 2017.

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

a) **Carácter de la población estudiada**
Población con patología específica.



Comité Ético Científico - Teléfono: (+56) 22778 9008 - Email: comiteetico@hucuch.cl
www.redclinica.cl - Mesa Central (+56) 22778 8000 - Santos Dumont 999, Independencia - RM



b) Utilidad del Proyecto

Buena.

c) Riesgos

Controlados.

d) Beneficios

Adecuados.

e) Confidencialidad del Estudio

La investigadora principal asegura la confidencialidad de todos los datos.

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

En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la Aprobación Ética con seis votos a favor, uno en contra en ausencia de uno de los miembros, para la realización del Estudio propuesto, en sesión del día 26 de abril de 2017, la que se extiende por un plazo de 12 meses a contar de esta fecha. Se adjunta nómina de los integrantes del Comité presentes en la sesión y Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.

Se debe tener presente que se debe realizar:

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

Los items minimos que deben contener los informes semestrales y finales, son los siguientes:

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

Saluda atentamente a Ud.



DRA. ANA MARIA MADRID
PRESIDENTE (S) DEL COMITE ETICO CIENTIFICO
HOSPITAL CLINICO U. DE CHILE



ASISTENCIA A SESION COMITE ETICO CIENTIFICO

NOMBRE	ESPECIALIDAD	CARGO	FIRMA
Dr. Antonio Morales	Gastroenterólogo	Presidente	<i>A. Morales</i>
Dra. Ana María Madrid Silva.	Gastroenteróloga	Vicepresidente	<i>A. Madrid</i>
Dr. Sergio Valenzuela Puchulu	Ginecólogo	Integrante	<i>S. Valenzuela</i>
Sra. Rina Sepúlveda Alfaro	Asesoría Jurídica	Integrante	<i>R. Sepúlveda</i>
Dr. Juan Carlos Prieto Domínguez	Cardiólogo	Integrante	<i>J. Prieto</i>
Dra. Gloria López Stewart	Endocrinóloga	Integrante	<i>G. López</i>
Dr. Juan Jorge Silva	Cirujano	Integrante	<i>J. Silva</i>
Dra. Teresa Massardo	Medicina Nuclear	Integrante	<i>T. Massardo</i>
Prof. Verónica Anguita Mackay	Académico Facultad de Medicina	Secretaria de Acta	<i>V. Anguita</i>



DRA. ANA MARÍA MADRID
PRESIDENTE (S) DEL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
HOSPITAL CLINICO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

Miércoles 26 abril 2017