

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**ASOCIACIÓN ENTRE VARIANTES GENÉTICAS
RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DEL ESQUEMA
FOLFOX, INFILTRACIÓN TUMORAL DE LINFOCITOS Y
VARIABLES CLÍNICAS, Y LA SOBREVIDA GLOBAL EN
CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO**

Tesis presentada en la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular, y Memoria para optar al título de Bioquímico por:

LESLIE CAROL CERPA CASTRO

Directores de Tesis: Dr. B.Q. Luis Quiñones S. PhD
Q.F. Juan P. Cayún P. PhD(c)

SANTIAGO - CHILE

ENERO 2020

A mi familia, por el tiempo de espera y apoyo constante

A Christopher, por la paciencia y amor entregado

A mis amigos, por el apoyo constante

A Juan Pablo, “porque el proyecto está listo”

Al profe Luis, por toda la paciencia y enseñanzas

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por ser siempre mi máximo apoyo. Fueron y seguirán siendo mi máximo pilar de apoyo. Todas sus palabras de aliento, sus tardes escuchándome hablar de cosas que quizás no entendían, pero aun así usaban parte de su tiempo en mí y mis “cosas científicas”. Los amo y siempre estaré agradecida de todo. ¡Mamá, papá y Kati al fin me titularé!

A mi pareja, Christopher, que pasamos de compañeros de laboratorio a compañeros de vida. Gracias por la paciencia, las enseñanzas y todo el amor entregado durante todo este periodo. Ahora a cumplir nuevos sueños y metas juntos.

A mis amigos, por todo el apoyo entregado desde mis tiempos de pregrado. Rosalía, Héctor, Vicky, Gabriela, Claudia y Mauro, han sido lo mejor que pude ganar en la universidad. Todas las risas, los chancheos, las penas, los pelambres y cada uno de los momentos vividos con ustedes han sido los mejores. Es lo mejor que pude tener de la universidad. Los adoro, gracias por todo el apoyo y amor que me han entregado. No puedo dejar de mencionar a mi querida amiga Rafaela, quien desde el colegio siempre ha estado a mi lado. Amiga hermosa, aunque no entendías de que miercale te hablaba, siempre estuviste ahí para mí. Te adoro.

A todo los miembros de mi laboratorio, por ser una constante fuente de conocimientos, correcciones, enseñanzas y risas. De todos aprendí algo y siempre estaré agradecida. Principalmente estoy muy agradecida de Alejandra, por tener el tiempo y la paciencia de enseñarme estadística, un mundo desconocido para mí.

Al BTUCH por todo el tiempo dedicado para enseñarnos y guiarnos mediante estándares internacionales de biobanco, incluyendo todo el apoyo técnico para el proyecto. A todos sus miembros por todo el apoyo en el proyecto, principalmente a Gerardo, Jorge, Pamela y a la Dra. Alicia Colombo. Cada uno de ellos nos apoyo en técnicas, enseñanzas y consejos para nuestro proyecto.

Al profesor Nelson, por todas esas enseñanzas y risas que lo caracterizan tanto. Todas mis dudas de trabajo siempre me las resolvió. Muchas gracias por todo.

A Juan Pablo, que pasó de ser mi tutor a un buen amigo. Por todas esas tardes en el biobanco, todas esas noches de trabajo en el laboratorio, por todas esos chancheos tratando de solucionar los problemas de nuestras tesis. Muchas gracias por cada una de tus enseñanzas y por tus consejos.

“El proyecto está comenzando”

Finalmente, al profesor Luis, por todo el apoyo y enseñanzas que me ha otorgado en este tiempo. Gracias por cada una de las charlas que tuvimos, por la confianza que tuvo en mí, por todo el apoyo que siempre me ha dado. Espero poder seguir aprendiendo de usted y compartiendo por largo tiempo más con el laboratorio.

LUGAR DE REALIZACIÓN

Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF)

Departamento de Oncología Básico-Clínico

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

Santiago, Chile

Biobanco de Tejidos y Fluidos (BTUCH)

Universidad de Chile

Santiago, Chile

FINANCIAMIENTO

Tesis financiada por recursos propios del laboratorio CQF y del BTUCH

A la fecha este trabajado ha dado origen a las siguientes comunicaciones:

- 2017 **Cerpa, L.** Cayún, JP. Sandoval, C. Cerro, R. Lavanderos, A. Varela, N. Donoso, G. Colombo, A. Leal, J, Quiñones, L.”*In silico* study on levels of intratumoral expression of genes related with 5-FU chemotherapy and immune markers in survival of colorectal patients”. Presentación en el XXXIX Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile (SOFARCHI). Puerto Varas, Región de los Lagos. Chile
- 2018 **Cerpa, L.** Cayún, JP. Varela, N. Donoso, G. Colombo, A. Leal, J. Quiñones, L. “Association of the genetic variants (*TYMS*, *GSTP1* and *DPYD*) related to the FOLFOX scheme and the tumor infiltration of lymphocytes (TILs) with the therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer”. Presentación en el XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile (SOFARCHI). Santa Cruz, Región de O’Higgins. Chile
- 2019 **Cerpa, L.** Cayún, JP. Varela, N. Donoso, G. Colombo, A. Leal, J. Reyes, F. Quiñones, L. “Asociación entre las variaciones genéticas relacionadas con el metabolismo del esquema FOLFOX y la infiltración tumoral de linfocitos con la eficacia terapéutica en cáncer colorrectal metastásico”. Presentación en el 3° Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Cuzco, Perú. Este trabajo obtuvo el premio “Dr. Friedrich Vogel” por mejor poster expuesto en el congreso.

ÍNDICE GENERAL

Índice General	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal	1
1.2 Diagnóstico e histología del cáncer colorrectal	3
1.3 Biología molecular de los tumores de cáncer colorrectal	5
1.4 Tratamiento del cáncer colorrectal	7
1.4.1 Variabilidad genética en genes relacionados con 5-Fluorouracilo	8
1.4.2 Variabilidad genética en genes relacionados con Oxaliplatino	11
1.5 Inmunogenicidad del cáncer colorrectal	13
1.5.1 Linfocitos T infiltrantes (TILs)	14
2. Hipótesis	16
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo General	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4. Materiales y Métodos	17
4.1 Selección de individuos y muestras de estudio	17
4.1.1 Tipo de estudio	17
4.1.2 Cálculo tamaño muestral	18
4.1.3 Selección de muestras	18
4.1.4 Consideraciones éticas	20
4.2 Etapas experimentales y metodología	20
4.2.1 Extracción de ADN tumoral y/o germinal desde biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina	20
4.2.2 Cuantificación y controles de calidad del ADN	21
4.2.3 Análisis de variabilidad genética en ADN germinal y tumoral	22

4.2.4	Recolección de datos clínicos	23
4.2.5	Análisis de infiltración de linfocitos T	23
4.2.6	Análisis estadísticos	24
5.	Resultados	25
5.1	Caracterización clínica de los pacientes	25
5.2	Determinación de frecuencias alélicas y genóticas de las variantes genéticas <i>TYMS</i>, <i>DPYD</i> y <i>GSTPI</i> en pacientes con cáncer colorrectal metastásico	28
5.3	Análisis estadísticos univariados de asociación entre las variables genéticas y no genéticas con la sobrevida de pacientes mCRC	30
5.3.1	Variables no genéticas	30
5.3.2	Variables genéticas	36
5.4	Análisis univariado para determinar la implicancia de cada variable con la sobrevida global mediante Regresión de Cox	40
5.5	Análisis multivariado para determinar la implicancia del conjunto de variables con la sobrevida global mediante un modelo de Regresión de Cox multivariado	42
5.6	Recalculo de n muestral con datos obtenidos en este estudio	44
5.7	Resultados adicionales: Análisis de pacientes mCRC de base de datos TCGA	45
6.	Discusión	46
6.1	Asociación univariada de variables genéticas y no genéticas con la sobrevida	46
6.2	Asociación multivariada de variables genéticas y no genéticas con la sobrevida	52
7.	Conclusiones	55
8.	Referencias	56
9.	Anexos	66
	Anexo I: Dispensa al consentimiento informado	66
	Anexo II: Estandarización de extracción de ADN desde muestras FFPE	67
	Anexo III: Parámetros considerados para determinar calidad de ADN extraído desde muestras FFPE	68
	Anexo IV: Estandarización de concentración mínima de ADN para genotipificación mediante PCR en Tiempo Real	69
	Anexo V: Ficha de reclutamiento de los pacientes	70
	Anexo VI: Análisis estadísticos no significativos	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico dual de incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en hombres en Chile y el mundo	2
Figura 2. Gráfico dual de incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en mujeres en Chile y el mundo	3
Figura 3. Tipos de tumores primarios según ubicación en el colon.	5
Figura 4. Estructura química de los fármacos usados en el tratamiento del cáncer colorrectal.	8
Figura 5. Esquema representativo del metabolismo de 5-Fluorouracilo.	9
Figura 6. Mecanismo de acción Oxaliplatino.	12
Figura 7. Farmacocinética y Farmacodinamia de Oxaliplatino	13
Figura 8. Diseño de estudio.	17
Figura 9. Flujograma de selección de pacientes mediante la revisión previa de fichas clínicas.	19
Figura 10. Patrón electroforético de las muestras de ADN extraído desde FFPE	21
Figura 11. Control de calidad mediante PCR múltiplex.	22
Figura 12. Esquema de la distribución de las muestras del TMA (a) y fotografía de una de las HE realizadas en este estudio (b).	24
Figura 13. Representación de la presencia de los genotipos mediante análisis de PCR en tiempo real asociado a sondas TaqMan®.	28
Figura 14. Curvas Kaplan-Meier para metástasis hepática.	31
Figura 15. Curvas Kaplan-Meier para metástasis, excluyendo hepática y pulmonar.	32
Figura 16. Curvas Kaplan-Meier para modelo de agrupación de metástasis.	32
Figura 17. Curvas Kaplan-Meier de los distintos porcentajes de infiltración de linfocitos T (TILs).	33
Figura 18. Curvas Kaplan-Meier del cumplimiento del tratamiento FOLFOX/XELOX.	34
Figura 19. Curvas Kaplan-Meier para número de ciclos del tratamiento FOLFOX/XELOX.	35
Figura 20. Curvas Kaplan-Meier para segunda línea de quimioterapia.	35
Figura 21. Curvas Kaplan-Meier para los genotipos de la variante <i>TYMS 3'UTR 6bp ins-del</i> (rs151264360).	37
Figura 22. Curvas Kaplan-Meier para el modelo dominante de la variable <i>DPYD c.85T>C</i> (rs1801265).	38

Figura 23. Curvas Kaplan-Meier para el modelo multiplicativo de la variante *GSTP1* c.313A>G (rs1695). 39

Figura 24. Estandarización concentración ADN para PCR en tiempo real 69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. SNPs correspondientes a <i>DPYD</i> , <i>TYMS</i> y <i>GSTP1</i> con la secuencia de la sonda <i>TaqMan</i> ® correspondiente utilizada para sus análisis.	23
Tabla 2A. Características generales de los pacientes mCRC incluidos en este estudio.	26
Tabla 2B. Características generales de las muestras de los pacientes mCRC incluidos en este estudio.	27
Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas para las variantes analizadas de <i>TYMS</i> , <i>DPYD</i> y <i>GSTP1</i> (n=51).	29
Tabla 4. Frecuencias alélicas de diferentes poblaciones obtenidas de la base de datos pública <i>Ensembl</i> y de la cohorte de este estudio.	30
Tabla 5. Medianas de sobrevida de variables no genéticas.	36
Tabla 6. Medianas de sobrevida de variables genéticas.	39
Tabla 7. Análisis univariado por Regresión de Cox.	41
Tabla 8. Análisis multivariado de Regresión de Cox para variables genéticas.	42
Tabla 9. Análisis multivariado de Regresión de Cox para variables no genéticas.	43
Tabla 10. Análisis multivariado de Regresión de Cox con todas las variables con p-value < 0,2.	44
Tabla 11. Criterios de integridad del ADN extraído desde muestras FFPE mediante análisis electroforético	68
Tabla 12. PCR múltiplex para control de ADN extraído desde muestras FFPE	68
Tabla 13. Medianas de sobrevida de variables genéticas y no genéticas no significativas.	78

ABREVIATURAS

5-FdUTP: 5-fluorodeoxina trifosfato

5-FU: 5-Fluorouracilo

5-FUTP: 5-fluorouridina trifosfato

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AJCC: American Joint Committee on Cancer. Sistema internacional de estadificación del cáncer.

APC: Proteína Adenomatous polyposis coli

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BRAF: proteína homóloga B1 al oncogén viral del sarcoma murino v-raf

CD4RO: Linfocitos T de memoria

CD8: Linfocitos T citotóxicos

CIN: Inestabilidad cromosómica

CRC: Cáncer colorrectal

CRF: *Case Report Form*

DPD: Enzima Dihidropirimidina Deshidrogenasa

DPYD: Gen que codifica para la enzima Dihidropirimidina Deshidrogenasa

FdUMP: Flurodeoxiuridina monofosfato

FFPE: Biopsias embebidas en formalina e incluidas en parafina

FOLFIRI: Esquema quimioterapéutico con 5-FU/LV más Irinotecan

FOLFOX: Esquema quimioterapéutico con 5-FU/LV más Oxaliplatino

FOXP3: Proteína forkhead box P3.

GST: Enzima Glutación-S-transferasa

GSTP1: Gen que codifica para la proteína Glutación-S-transferasa P

HCUCH: Hospital Clínico Universidad de Chile

HE: Tinción de tejido con Hematoxilina-Eosina

JNK: c-jun N-terminal kinasa

KRAS: Proteína Kirsten Ras

LCC: Tumores primarios del colon Izquierdo

MAPK: Proteína kinasa de activación mitogénica (*Mitogen-activated protein kinase*)

mCRC: Cáncer colorrectal metastásico

MMR: Sistema de reparación del ADN (*Mismatch Repair*)

MSI: Inestabilidad microsatélites

NRAS: Proteína neuroblastoma RAS

Nrf2: nuclear factor-erythroid 2-related factor 2

RCC: Tumores primarios del colon derecho

SNP: Polimorfismo de nucleótido único (*Single nucleotide polymorphism*)

TCGA: The Cancer Genome Atlas. Base de datos de secuenciación de diferentes tipos de cáncer

TILS: Linfocitos T infiltrantes de tumor

TNM: Sistema de estadificación de los tumores, indica cantidad y diseminación de tumores.

TP53: Gen que codifica para la proteína P53

Treg: Linfocitos T reguladores. Expresan en su membrana FOXP3

TS: Enzima Timilidato Sintasa

TYMS: Gen que codifica para la enzima Timilidato Sintasa

UTR: Región no traducida del ADN (*Untranslated region*)

VNTR: Número variable de repeticiones en tándem (*Variable Number of Tandem Repeats*)

XELOX/CapeOX: Esquema quimioterapéutico con Capecitabina más Oxaliplatino

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CRC) es considerado como una de las enfermedades con mayor relevancia en Chile. Los principales tratamientos de este cáncer se basan en la cirugía del tumor, seguido de quimioterapia adyuvante basada en 5-FU, conocida como esquema FOLFOX (5-fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino). Se han descrito polimorfismos genéticos relacionados con las enzimas que eliminan y son blancos de 5-FU, tales como Timilato Sintasa (*TYMS*) y Dihidropirimidina Deshidrogenasa (*DPYD*). Por otra parte, también se han descrito polimorfismos que afectan la eliminación de oxaliplatino, principalmente GSTs (*GSTP1*). Sin embargo, los resultados de la asociación entre la presencia de los polimorfismos genético y la eficacia del esquema FOLFOX, han sido controversiales. Por otra parte, se ha observado que distintos microambientes inmunológicos en el tumor pueden generar inmunosensibilidad a la quimioterapia, influyendo en la sobrevida del paciente. Frente a el porcentaje de infiltración de linfocitos T podría llegar a ser utilizados como un marcador pronóstico de la enfermedad. De acuerdo con lo anterior, el presente trabajo tiene por objetivo estudiar retrospectivamente la asociación entre la respuesta terapéutica al esquema FOLFOX/CapeOX, las variaciones genéticas en *TYMS*, *DPYD* y *GSTP1*, y la infiltración tumoral en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Para cumplir los objetivos se realizó extracción de ADN de muestras de biopsia de pacientes con mCRC (n=51 pacientes) y se analizaron variables genéticas de *TYMS*, *DPYD* y *GSTP1* mediante PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*®. Los genotipos se asociaron con TILs y con variables clínicas obtenidas desde las fichas de los pacientes. Se realizaron análisis de sobrevida de cada variable mediante la construcción de curvas de Kaplan-Meier y test de log-rank. Posterior a eso se realizó un análisis multivariado mediante un modelo de Regresión de Cox. Se observó una relación significativa, con la sobrevida global, en las variables *GSTP1* (HR=2,03 p-value=0,048 IC95%= 1,00-4,10), *DPYD* (HR=2,42 p-value=0,016 IC95%=1,176-5,016), la presencia de metástasis hepáticas (HR=4,21 p-value=0,21 IC95%=1,24-14,28) y el modelo de metástasis: Solo hepática (HR=3,9 p-value=0,039), hepática más otra (HR=4,6 p-value=0,022). En relación con el análisis multivariado se observa, con significancia estadística, que el alelo C de la variante genética en *DPYD* y no completar los 12 ciclos del esquema FOLFOX/CapeOX, aumentan su significancia (HR=6,97 p-value=0,002 y HR=6,69 p-value=0,017, respectivamente). En conclusión, nuestros resultados muestran que existe una relación entre variantes genéticas de *GSTP1* y *DPYD* con las variables clínicas (presencia de metástasis hepáticas y completar los ciclos del esquema FOLFOX) con un aumento en la sobrevida de los pacientes con mCRC. Interesantemente variables genéticas de *TYMS* parecen ser promisorias, aun cuando no se alcanzó una significancia estadística, posiblemente debido al aún bajo tamaño muestral. Estos resultados, a futuro, pueden dar pie a la construcción de un modelo de predicción de respuesta al esquema FOLFOX en pacientes con cáncer colorrectal en Chile.

Palabras clave: cáncer colorrectal metastásico, FOLFOX/CapeOX, timilidato sintasa, dihidropirimidina deshidrogenasa, glutatión-s-transferasa, metástasis hepática, sobrevida.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is considered one of the most important diseases in Chile. The main treatments for this cancer are based on tumor surgery, followed by adjuvant chemotherapy based on 5-FU, known as the FOLFOX scheme (5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin). Genetic polymorphisms related to the enzymes that eliminate and are targets of 5-FU have been described, such as Thymidilate Synthase (*TYMS*) and Dihydropyrimidine Dehydrogenase (*DPYD*). On the other hand, polymorphisms affecting elimination of oxaliplatin, mainly GSTs (*GSTP1*), have also been described. However, the results of the association between the presence of genetic polymorphisms and the efficacy of the FOLFOX scheme have been controversial. On the other hand, it has been observed that different immunological microenvironments in the tumor can generate immunosensitivity to chemotherapy, influencing the patient's survival. Against the percentage of infiltration of T lymphocytes, it could be used as a prognostic marker of the disease. In accordance with the above, the present work aims to retrospectively study the association between the therapeutic response to the FOLFOX / CapeOX scheme, the genetic variations in *TYMS*, *DPYD* and *GSTP1*, and tumor infiltration in patients with metastatic colorectal cancer. To achieve the objectives, DNA was extracted from biopsy samples from patients with mCRC (n = 51 patients) and genetic variables of *TYMS*, *DPYD* and *GSTP1* will be analyzed using real-time PCR associated with *TaqMan*® probes. Genotypes were associated with TILs and clinical variables obtained from patient records. Survival analysis of each variable was performed by building Kaplan-Meier curves and log-rank test. After that, a multivariate analysis was performed using a Cox Regression model. A significant relationship was observed, with the overall survival, in the variables *GSTP1* (HR = 2.03 p-value = 0.048 95% CI = 1.00-4.10), *DPYD* (HR = 2.42 p-value = 0.016 95% CI = 1.176-5.016), the presence of liver metastases (RH = 4.21 p-value = 0.21 95% CI = 1.24-14.28) and the metastasis model: Hepatic only (RH = 3, 9 p-value = 0.039), liver plus another (HR = 4.6 p-value = 0.022). In relation to the multivariate analysis, it was observed that C allele of *DPYD* and not finishing the 12 cycles of the FOLFOX/CapeOX scheme, increase the significance (HR = 6.97 p-value = 0.002 and HR = 6.69 p-value = 0.017, respectively). In conclusion, our results show a relationship between genetic variants of *GSTP1* and *DPYD* with clinical variables (presence of liver metastases and complete cycles of the FOLFOX scheme) with an increase in the survival of patients with mCRC. Genetic variables of *TYMS* appear to be promising, even when statistical significance was not reached, possibly due to the still small sample size. These results, in the future, may lead to the construction of a prediction model of response to the FOLFOX scheme in patients with colorectal cancer in Chile.

Keywords: metastatic colorectal cancer, FOLFOX / CapeOX, thymidilate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, glutathione-s-transferase, liver metastasis, survival.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de muerte. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), al año 2018 hubo aproximadamente 18,1 millones de nuevos casos y 9,6 millones de muertes a nivel mundial. Dentro de las mismas estadísticas los que más destacan por su gran incidencia son el cáncer de mama, próstata, pulmón y colorrectal (GLOBOCAN, 2018).

En Chile, el cáncer es la segunda causa de muerte, ocupando un 21% de las muertes totales del país en el año 2017. Se estima que para el año 2023 será la primera causa de muerte, superando así a las enfermedades del sistema circulatorio (MINSAL, 2019). Dentro de los tipos de cáncer más relevantes, se encuentran los cánceres gastrointestinales, teniendo una tasa de mortalidad de un 41,8% del total de los fallecimientos por esta causa. Dentro de estos cánceres se encuentra el cáncer colorrectal como segundo causante de muertes por cáncer gástricos, alcanzando el 5,9% del total por muertes por cáncer, durante el año 2010 (Itriago, L. *et al.*, 2013). Según la Guía clínica AUGÉ del cáncer colorrectal del MINSAL, se observa, al año 2013, una diferencia en la incidencia del cáncer colorrectal, dependiendo del sexo: en hombres este cáncer representa el tercer diagnóstico más frecuente y el segundo en mujeres (MINSAL, 2013). Esto se ha mantenido hasta al año 2018 con la misma distribución, según datos de GLOBOCAN, esto se describe para hombres y mujeres en la Figura 1 y 2, respectivamente. A diferencia de lo que ocurre en países desarrollados, tanto la incidencia como la mortalidad han aumentado de manera sostenida desde la década de los noventa en nuestro país, llegando a una tasa de 20,7 cada 100 mil habitantes y de 10,2 cada 100 mil habitantes el año 2018, respectivamente (GLOBOCAN, 2018). Posibles causantes de esta diferencia tienen relación con la ubicación geográfica de las poblaciones y/o sus hábitos alimenticios (Rocco, A. *et al.*, 2003; Watson, A. y P. Collins, 2011). En países desarrollados, como Estados Unidos, se ha observado una disminución tanto en la incidencia y como en la mortalidad. Se ha relacionado directamente estas disminuciones con las políticas públicas implementadas que permiten realizar exámenes de prevención precoz y remoción de lesiones precursoras detectadas en este screening (Edwards, B., *et al.*, 2010). En cambio, otros tipos de cáncer en Chile, tales como el de estómago, cervicouterino y vesícula, han mostrado una disminución o mantención de sus cifras de incidencia y mortalidad hasta el año 2010 (Itriago, L. *et al.*, 2013).

En general, el diagnóstico del cáncer colorrectal ocurre de manera tardía, lo cual es fundamentalmente por la rápida formación de metástasis (Arvelo, F., *et al.*, 2015). Alrededor de un 25%

de los pacientes debutan con enfermedad metastásica y hasta un 50% de los pacientes desarrollarán enfermedad metástasis a distancia durante la evolución de la enfermedad (Itriago, L. *et al.*, 2013). La tasa de sobrevida del cáncer colorrectal es variable y depende de la etapa diagnosticada. En etapas tempranas (I, IIA y IIB) los pacientes tienen una tasa de sobrevida a los 5 años de hasta un 90%, en etapas ya más avanzadas (IIC y III) su sobrevida disminuye hasta un 71%. En cambio, cuando el cáncer colorrectal ya presenta algún grado de metástasis, principalmente en hígado y/o pulmón, la tasa de sobrevida de los pacientes a los 5 años es de 14% aproximadamente (American Cancer Society, 2019).

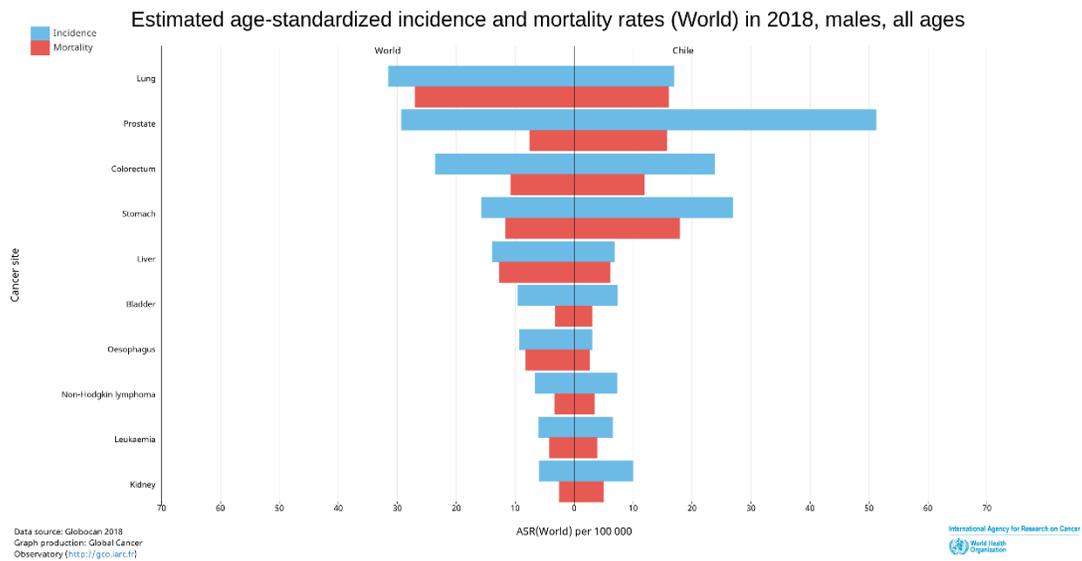


Figura 1. Gráfico dual de incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en hombres en Chile (lado derecho) y el mundo (lado izquierdo). Barra roja corresponde a mortalidad y barra azul a incidencia. Imagen obtenida de *Cancer Today*, WHO.

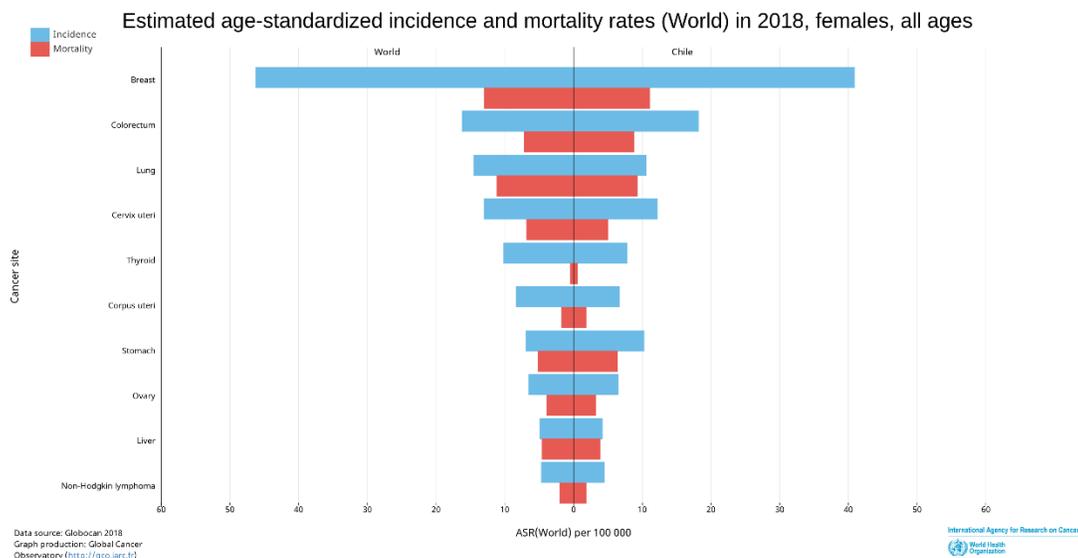


Figura 2. Gráfico dual de incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en mujeres en Chile (Lado derecho) y el mundo (Lado izquierdo). Barra roja corresponde a mortalidad y barra azul a incidencia. Imagen obtenida de *Cancer Today*, WHO.

1.2 Diagnóstico e histología del cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal contempla a los tumores malignos originados dentro de las paredes del intestino grueso y/o recto. El 90% de los CRC son esporádicos sin ningún factor hereditario o antecedentes familiares asociados. Es un cáncer de edad avanzada, ya que el 85% de los pacientes lo desarrollan posterior a los 60 años. Dentro de los posibles factores de riesgo, destaca el estilo de vida, principalmente se menciona la baja actividad física o el consumo aumentado de carnes rojas y grasas animales. La mayoría de los pacientes son asintomáticos o con sintomatología inespecífica (90%), lo que dificulta una temprana detección, causando que la mayoría de los pacientes debuten con etapas avanzadas. Dentro de los síntomas más comunes que se pueden presentar, destaca el dolor abdominal, cambio en el hábito intestinal, rectorragia y hematoquecia (MINSAL, 2013).

Si se sospecha de CRC, el método estándar de diagnóstico es mediante una colonoscopia larga más una biopsia de la zona en sospecha. El anatomopatólogo, según AJCC, determina el TNM del tumor primario o el foco metastásico, el tipo histológico y el grado de diferenciación. El TNM indica el tamaño del tumor (T), la cantidad de ganglios linfáticos con metástasis (N) y el tipo de metástasis a distancia (M) (Weiser, M., 2018). Histológicamente, el 90% de los tumores de CRC corresponden a adenocarcinoma

originados desde las células epiteliales de la mucosa del colon (Hamilton, S., *et al.*, 2010). Alrededor de un 25% de estos tumores pueden presentar componentes como mucina, lo que puede permitir una mayor propagación de las células tumorales a sitios distantes (Saidi, H., *et al.*, 2008). De manera adicional, los adenocarcinomas son caracterizados por su formación glandular, es decir cuan similares son a las células sanas, lo cual corresponde al grado de diferenciación del tumor. Los tumores bien diferenciados corresponden a aquellos que tienen más del 95% de glándulas formadas, los moderadamente diferenciados muestran entre un 50% a un 95% de formación de glándulas y los pobremente diferenciados son mayoritariamente sólidos con menos de un 50% de formación de glándulas. Se ha descrito que el 70%, 20% y 10% de los tumores de CRC corresponden a moderadamente, pobremente y bien diferenciados, respectivamente (Flemming, M., *et al.*, 2012). Se ha observado que el grado de diferenciación tiene una implicancia en la sobrevida de los pacientes con CRC, mientras menos diferenciado el tumor, peor prognosis presentan los pacientes (Halvorsen, T. y E. Seim, 1988).

El colon puede ser separado en 4 grandes áreas: colon ascendente, transverso, descendente, sigmoide y recto. Según la vascularización de cada una de estas áreas, se sugiere que existen tres diferentes tipos de tumores primarios malignos: tumores de colon derecho o RCC (ascendente y transverso), tumores de colon izquierdo o LCC (descendente y sigmoides) y tumores de recto (Ponz de Leon, M. y C. Di Gregorio, 2001), todo esto se puede observar en la Figura 3. Se ha observado que la localización de estos tumores muestra características clínicas distintas, por ejemplo, la anemia por baja de hierro es más prevalente en los pacientes RCC, en cambio presentar síntomas como hematoquecia (sangrado en las deposiciones) o cambios en el tránsito intestinal es más prevalente en los pacientes LCC (Saidi, H., *et al.*, 2008). Se han realizado diversos estudios para asociar la sobrevida de los pacientes a la localización del tumor primario, ajustándolos por la etapa de cada uno de estos tumores. Un meta-análisis de estos estudios muestra que principalmente los pacientes con RCC se han asociado con un peor pronóstico que aquellos con LCC (Petrelli, F., *et al.*, 2016). En mCRC se ha observado que aquellos pacientes LCC con metástasis muestran un mejor pronóstico que aquellos RCC con metástasis (Brouwer, N., *et al.*, 2019).

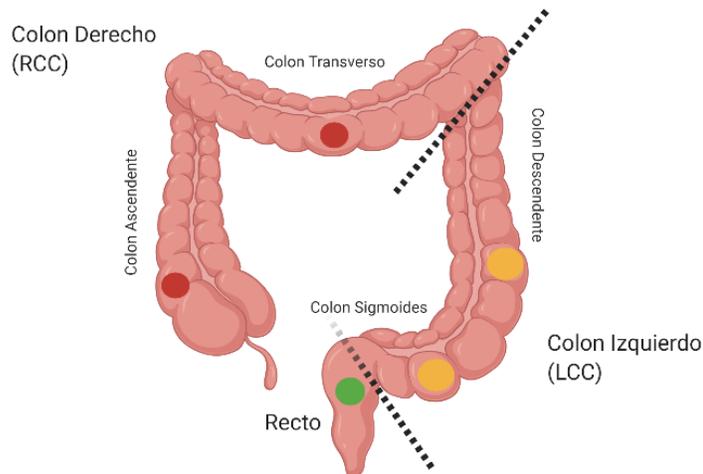


Figura 3. Tipos de tumores primarios según ubicación en el colon. Los círculos rojos representan a tumores primarios ubicados en el colon derecho (RCC), los círculos en amarillo representan a tumores primarios ubicados en el colon izquierdo (LCC) y los círculos verdes a los tumores primarios ubicados en el recto. Imagen creada con *BioRender.com*.

1.3 Biología molecular de los tumores de cáncer colorrectal

Uno de los aspectos centrales en la formación de CRC es la acumulación progresiva de cambios genéticos y epigenéticos que transforman una célula epitelial glandular normal en adenocarcinomas invasivos. Volgestein y Fearon, propusieron en 1990 un modelo de progresión tumoral de CRC secuencial relacionado con la activación de oncogenes, por ejemplo, genes *RAS*, en conjunto con la inactivación de genes supresores de tumores, por ejemplo, el gen *APC*, esto explicaría el desarrollo del cáncer de colon desde una neoplasia benigna hasta estadios más avanzados (Grady, W. y S. Markowitz, 2015). En la actualidad se ha descrito que existen tres importantes vías que permiten el desarrollo de CRC: (i) Inestabilidad cromosómica (CIN), caracterizado por anomalías estructurales y numéricas de cromosomas, también se incluyen acumulación de diferentes genes supresores de tumores y oncogenes, tales como *APC*, *RAS* (*KRAS* y *NRAS*), *BRAF*, *PIK3CA*, *SMAD4* y *TP53*; (ii) Inestabilidad de microsatélites (MSI), causado principalmente por defectos en la reparación del ADN debido a fallas en los genes del *mismatch repair* (MMR); (iii) Metilación descontrolada del ADN, principalmente en islas CpG (CIMP) (Yamagishi, H., *et al.*, 2016; Aghagolzadeh, P. y R. Radpour, 2016). Estas tres vías no son mutuamente excluyentes, por lo que es común ver que converjan incluso las tres vías en un mismo tumor (Yamagishi, H., *et al.*, 2016; Aghagolzadeh, P. y R. Radpour, 2016). El crecimiento y la proliferación de

la metástasis del CRC depende principalmente de dos vías: la vía VEGF y la de EGFR (Schmoll, H. *et al.*, 2012).

En relación con las vías anteriormente descritas, se pueden distinguir dos tipos de cáncer colorrectal, los hipermutados y los no hipermutados (Cancer Genome Atlas Network, 2012; An, N. *et al.*, 2016), cada uno con diferentes características mutacionales. Hoy en día, la carcinogénesis se ve como un balance entre el desarrollo de mutaciones y los mecanismos de control del ciclo celular (Kanthan, R., *et al.*, 2012). Cuando el ciclo celular ya no es capaz de controlar la tasa de mutaciones, se conoce como "Inestabilidad Genómica" mediante varias vías, una de estas es la inestabilidad de microsatélites, ampliamente estudiada en cáncer colorrectal (Kanthan, R., *et al.*, 2012; Kudryavtseva, A., *et al.*, 2016; Aghagolzadeh, P., *et al.*, 2016). Alrededor de un 15% de los adenocarcinomas de cáncer colorrectal están caracterizados por presentar un aumento en la tasa de mutaciones en los genes MMR, lo cual genera un alto nivel de inestabilidad de microsatélites y se asocia a un peor pronóstico en pacientes con cáncer metastásico (Venderbosch, S., *et al.*, 2014; Nöpel-Dünnebacke, S., *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha observado en cáncer colorrectal que la proteína KRAS, perteneciente a la vía del factor de crecimiento epidermal (vía EGFR), se encuentra altamente mutada (alrededor de un 40% de tumores colorrectal, presentan mutaciones en *KRAS*) (Kanthan, R., *et al.*, 2012; Grady, W. y C. Pritchard, 2014). Los pacientes que presentan mutaciones en KRAS no pueden ser tratados con fármacos inhibidores del receptor EGFR, ya que se ha observado una disminución de su eficacia (Tol, J., *et al.*, 2009). Otra de las proteínas mutadas que ha mostrado un efecto en la tumorigénesis, es BRAF. Mutaciones en el gen *BRAF*, se han encontrado entre 10 a 15% de los tumores de cáncer colorrectal. Se ha visto que mutaciones en el gen *BRAF* y *KRAS* son mutuamente excluyentes, es decir que con solo presentar una se puede afectar la tumorigénesis vía MAPK (Grady, W. y C. Pritchard, 2014). Por otra parte, se ha visto que, en etapas avanzadas del cáncer, *BRAF* mutado es un factor pronóstico de utilidad clínica por estar asociados a disminución en términos de supervivencia, por lo cual en las últimas guías clínicas se ha recomendado analizar (Venderbosch, S., *et al.*, 2014; Nöpel-Dünnebacke, S., *et al.*, 2014).

1.4 Tratamiento del cáncer colorrectal

Posterior al diagnóstico de CRC, y dependiendo de la etapificación del tumor primario, se determina el tratamiento a seguir, el cual consiste principalmente en cirugía total o parcial, quimioterapia y/o radioterapia. En etapas tempranas la cirugía es el tratamiento de primera línea, la cual puede ser acompañada de quimioterapia neoadyuvante más radioterapia, dependiendo del estadio y de la decisión del comité oncológico (American Cancer Society, 2019). En etapa metastásica, dependiendo de la edad del paciente y de las enfermedades concomitantes, se puede realizar cirugía total o parcial del tumor primario y/o de la metástasis, en conjunto con el esquema quimioterapéutico determinado por el equipo oncológico. En Chile, los principalmente esquemas usados son el esquema FOLFOX/CapeOX y FOLFIRI (MINSAL, 2013).

Desde mediados del siglo pasado, las fluoropirimidinas han sido el principal fármaco en la quimioterapia del cáncer colorrectal y se ha demostrado que la administración de ellos ha conducido a una mejor sobrevida de los pacientes con mCRC. La principal fluoropirimidina usada es el 5-Fluorouracilo (5-FU) (Figura 4.a), el cual se ha usado en conjunto con leucovorina (5-FU/LV) para potenciar su efecto (MINSAL, 2013). En los últimos años se ha visto que al introducir otro citotóxico, el efecto puede ser potenciado. Los citotóxicos adyuvantes usados son Irinotecan (Figura 4.c), un inhibidor de la topoisomerasa I, y Oxaliplatino (Figura 4.b), un derivado de los platinos. El efecto de estos fármacos fue demostrado en pacientes que eran resistentes a la terapia con 5-FU. Cuando se usan en conjunto al 5-FU se ve un aumento de un 50% de la respuesta y de la sobrevida. Es por esto por lo que se determinó, como primera línea de tratamiento, al esquema FOLFOX (5-FU/LV más Oxaliplatino) o al esquema FOLFIRI (5-FU/LV más Irinotecan) (Mohelnikova-Duchonova, B., *et al.*, 2014). En Chile, el esquema FOLFOX es el principal tratamiento de primera línea usado en los pacientes mCRC. Este esquema se administra por vía intravenosa u oral, siendo este último conocido como XELOX/CapeOX, que contiene una prodroga de 5-FU, Capecitabina (Figura 4.d). Se ha observado que ambas vías de administración tienen el mismo efecto en la sobrevida global y en la tasa de progresión. La dosis de cada esquema es ajustada por el peso y la talla de los pacientes (MINSAL, 2013).

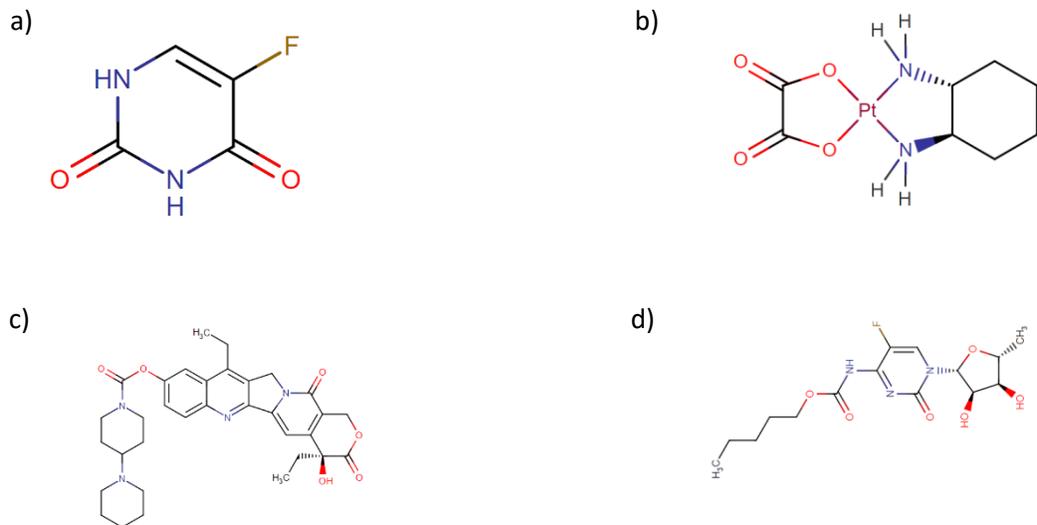


Figura 4. Estructura química de los fármacos usados en el tratamiento del cáncer colorrectal. a) 5-Fluorouracilo, b) Oxaliplatino, c) Irinotecan y d) Capecitabina. Imágenes obtenidas de la base de datos *DrugBank* (<https://www.drugbank.ca/>).

1.4.1 Variabilidad genética en genes relacionados con 5-Fluorouracilo

5-Fluorouracilo (5-FU), es un fármaco análogo de las pirimidinas que tiene como blanco terapéutico inhibir a la enzima Timilidato sintasa (TS) (codificada por el gen *TYMS*), mediante la unión de uno de los metabolitos activos, FdUMP (flurodeoxiuridina monofosfato) (Figura 5.b). FdUMP inhibe a TS en la presencia de 5,10-metilenetetrahidrofolato (MTHF), producto formado en la vía de los folatos (Strimpakos, A., *et al.*, 2009; Afzal, S., *et al.*, 2011). Al inhibir esta enzima, se genera la acumulación del metabolito deoxiuridina monofosfato (dUMP), el cual se incorpora en la hebra del ADN en la forma de deoxiuridina trifosfato (dUTP), lo cual finalmente causa la inhibición de la replicación del ADN (Dotor, E., *et al.*, 2006). Adicionalmente, los otros metabolitos de 5-FU, 5-fluorouridina trifosfato (5-FUTP) y 5-fluorodeoxina trifosfato (5-FdUTP), generados por distintas vías de metabolización, son reconocidos e incorporados como nucleótidos en el ARN y al ADN, respectivamente, causando interferencia en la traducción de la proteína (Dotor, E., *et al.*, 2006; Thor, C., *et al.*, 2011). Ver Figura 5.

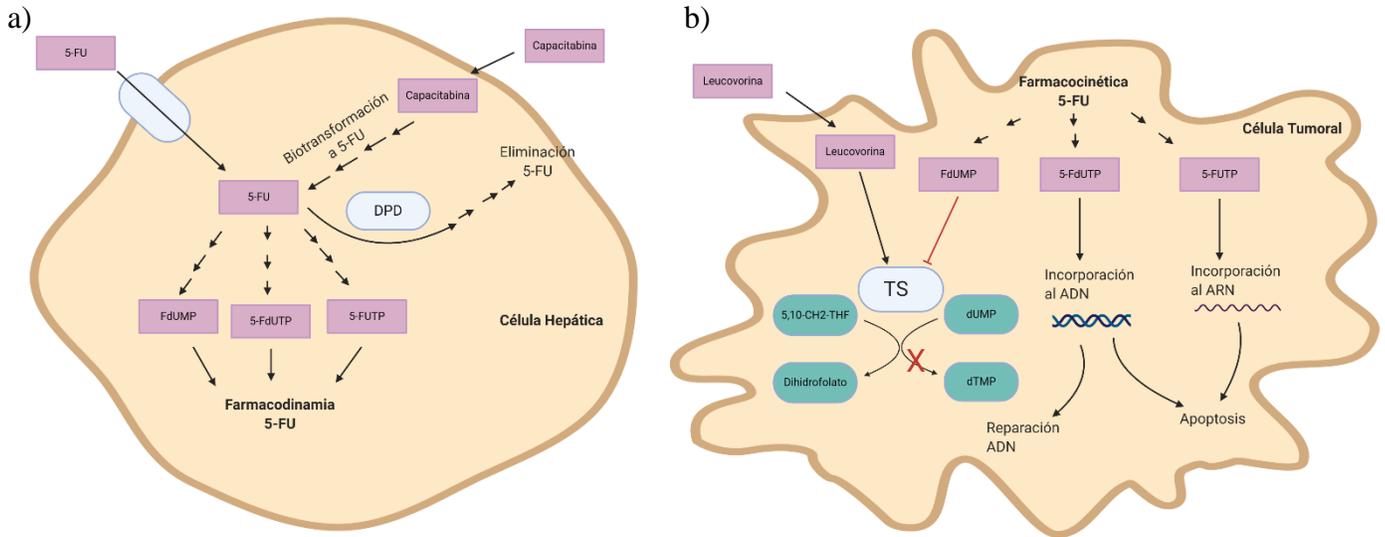


Figura 5. Esquema representativo del metabolismo de 5-Fluorouracilo. a) Farmacocinética de 5-FU. b) Farmacodinamia de 5-FU. Imagen creada con *BioRender.com*.

Uno de los mecanismos de resistencia mejor establecido al 5-FU es el incremento de TS (Hammond, W., *et al.*, 2016). En pacientes con CRC, se ha observado que una baja expresión de la proteína TS causa una mayor sobrevida media, por lo que se postula que existe una relación inversa entre la expresión de la proteína TS con la sobrevida y la respuesta a la terapia con 5-FU (Hammond, W., *et al.*, 2016). Se han observado alteraciones genéticas, tales como variaciones en el número de copias o alteraciones en el promotor del gen *TYMS* (Hammond, W., *et al.*, 2016). Existen tres polimorfismos relacionados con la expresión de *TYMS*, ubicados en el 5' y 3'-UTR, regiones no codificantes que contienen a los elementos reguladores (Yim, D., *et al.*, 2010). En la región 5'-UTR se encuentra presente una secuencia VNTR (*variable number of tandem repeats*) de 28 pares de bases, que puede estar 2 o 3 veces repetida (2R o 3R). Se pueden encontrar 3 genotipos: 2R/2R, 2R/3R, 3R/3R (Hammond, W., *et al.*, 2016; Funke, S., *et al.*, 2008). El primero, está relacionado con el grupo de referencia, es decir con el grupo *wild type* (wt). Con este genotipo se observa una baja expresión de TS, lo cual lleva a una mejor acción del fármaco 5-FU, por lo tanto, una mejor progresión de la enfermedad y mejor sobrevida (Funke, S., *et al.*, 2008). En el caso de los genotipos 2R/3R y 3R/3R se han observado resultados contradictorios. En relación con la presencia del genotipo 3R/3R, se ha visto en algunos estudios un incremento significativo en la mortalidad del paciente (Funke, S., *et al.*, 2008); en cambio, en otros estudios se ha observado una disminución de la mortalidad de los pacientes cuando presentan este genotipo (Funke, S.,

et al., 2008; Dotor, E., *et al.*, 2006; Hitre, E., *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha observado la presencia de un cambio de base de G>C (rs2847153) en el nucleótido 12 de la segunda repetición del alelo 3R, relacionado con la actividad transcripcional o traduccional de TS (Yim, D., *et al.*, 2010; Mandola, M., *et al.*, 2003; Kawakami, K., *et al.*, 2003). El alelo G se ha relacionado con aumento de la expresión de TS (Hammond, W., *et al.*, 2016). *In vitro* se ha visto que los genotipos 2R/3G, 3C/3G, 3G/3G son de alta expresión, por lo que hay menor respuesta al 5-FU y un aumento de la mortalidad (Funke, S., *et al.*, 2008). El tercer polimorfismo más común, es una delección de 6 pares de bases en la región 3'-UTR (*TYMS 3'UTR 6bp ins-del*), la cual influye en la estabilidad del ARNm de TS (Hammond, W., *et al.*, 2016). Al presentar la delección de estos 6 pares de bases, se ha observado una disminución de la expresión de TS (Mandola, M., *et al.*, 2004). En relación con la terapia con 5-FU se han encontrado resultados inconsistentes. En algunos estudios se ha encontrado que la presencia de la delección se encuentra relacionada con una baja respuesta al tratamiento y aumento en la mortalidad (Hitre, E., *et al.*, 2005; Salgado, J., *et al.*, 2007). En cambio, en otros se ha visto todo lo contrario (Dotor, E., *et al.*, 2006; Ruzzo, A., *et al.*, 2007). En estudios con pacientes de cáncer colorrectal se observó que la presencia de los genotipos 3R/3R junto a *ins/ins* y 2R/3R presentan una alta expresión de TS (Hitre, E., *et al.*, 2005).

Por otra parte, 5-FU es biotransformado por la enzima catabólica dihidropirimida dehidrogenasa (DPD) para ser eliminado de la célula (Figura 5.a)5. Se excreta cerca de un 80% de 5-FU por vía renal (Milano, G. y A. Chamorey, 2002). Se ha observado una relación en la expresión de esta enzima y la respuesta al tratamiento con 5-FU (Strimpakos, A., *et al.*, 2009; Hammond, W., *et al.*, 2016). Una reducida actividad de DPD está asociado con una reducción de la eliminación de 5-FU, lo que genera un aumento en la toxicidad, relacionada con mielosupresión, mucositis, neurotoxicidad y diarrea, y en la efectividad del fármaco (Zhu, A., *et al.*, 2004; Caudle, K., *et al.*, 2013), frente a esto se debe dar una dosis adecuada del fármaco, ya que si los niveles de 5-FU son muy elevados puede llegar a causar la muerte, por lo que se recomienda usar una droga alternativa para el tratamiento (Caudle, K., *et al.*, 2013). *DPYD*, el gen que codifica para la proteína DPD, puede presentar una gran cantidad de variantes genéticas de nucleótido único (SNPs). Alrededor de un 5% de la población presenta algunos de estos SNPs, lo que puede causar una parcial o completa deficiencia de esta enzima (Hammond, W., *et al.*, 2016). Dentro de los SNPs más estudiados, encontramos a tres relacionados con toxicidad hematológica (grado 3 y 4) y variaciones en los niveles de la proteína funcional (Caudle, K., *et al.*, 2013): IVS14+1G>A (*DPYD**2), c.2846A>T y 1679T>G (*DPYD**13) (17). La variante *DPYD**2 al presentar adenina en la posición IVS14+1 genera un cambio en el intrón 14 en el sitio dador de corte y empalme causando que el exón 13 se empalme

directamente al exón 15, generando una enzima no funcional (Zhu, A., *et al.*, 2004); la variante c.2846A>T genera un cambio de ácido aspártico por valina en la posición 949, causando una enzima con baja actividad; la variante *DPYD**13 al presentar guanina en la posición 1679 cambia el aminoácido isoleucina por serina, causando una enzima con baja actividad (Caudle, K., *et al.*, 2013). Estos tres SNPs se encuentran en bajo porcentaje en la población, menor de 0,1%, pero se ha determinado que su presencia se asocia fuertemente con reacciones adversas a 5-FU o a capecitabina, por lo que se recomienda genotipificar previamente estas variantes a los pacientes antes de administrar 5-FU (Amstutz, U., *et al.*, 2017). Existen otros SNPs que presentan porcentajes mayores de frecuencia (desde un 0,7% hasta 30%), tales como *DPYD* c.85T>C (*DPYD**9) o *DPYD**5, los cuales, a pesar de su alta frecuencia, presentan resultados contradictorios en los estudios asociados a su funcionalidad o a toxicidad con 5-FU (Caudle, K., *et al.*, 2013).

1.4.2 Variabilidad genética en genes relacionados con Oxaliplatino

El oxaliplatino, fármaco de tercera generación de los platinos, se ha usado ampliamente en la terapia del cáncer colorrectal en conjunto con 5-FU (Mohelnikova-Duchonova, B., *et al.*, 2014; Hammond, W., *et al.*, 2016). Comparado con otros platinos, como el cisplatino, se ha visto que el oxaliplatino tiene una mejor solubilidad en agua, permitiendo una mejor absorción, es más efectivo y muestra menos efectos tóxicos en CRC que el cisplatino (Graham, J., *et al.*, 2004; Kline, C. y W. El-Deiry, 2013). El principal mecanismo de acción del oxaliplatino (y de los platinos en general) es la inhibición de la síntesis del ADN, mediante su unión en dímeros G-G o G-A, ubicados en el mismo surco o en surcos distintos del ADN, generando aductos en el ADN (Figura 6). Los aductos covalentes en el ADN generados por los platinos son reconocidos por el mecanismo MMR, el cual, al no poder repararlo, permite que la célula vaya a apoptosis. Como la mayoría de las células cancerígenas tienen el MMR defectuoso, no se reconoce esta unión y permitiéndole a las células cancerígenas sobrevivir. Cuando esto ocurre se genera una resistencia a los platinos (Kline, C. y W. El-Deiry, 2013). Hasta el momento se ha observado que el oxaliplatino no genera este tipo de resistencia, ya que la estructura del anillo que forma al unirse al ADN evita la unión del MMR, por lo que su acción no depende de que este sistema sea funcional o no (Scheeff, E., *et al.*, 1999). Se ha observado que este sistema genera resistencia en la mayoría de los platinos, exceptuando al oxaliplatino (Mamenta, E., *et al.*, 1994). La inactivación de todos los platinos es mediada por la conjugación con glutatión (GSH). Esta acción es causada por las enzimas

Glutación S-transferasas (GSTs), principalmente GSTP1, GSTT1 y GSTM1 (Figura 7) (Hammond, W., *et al.*, 2016). Estudios han mostrado que las GSTs podrían ser considerados como marcadores de toxicidad frente al oxaliplatino, por ejemplo, se ha estudiado el efecto del genotipo AA, de la variante GSTP1 rs1695 A>G (Ile105Val), en relación con la neutropenia (Peng, Z., *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha descrito que el mismo polimorfismo está relacionado con sobrevida en pacientes de cáncer colorrectal. Se ha observado que pacientes metastásicos tratados con FOLFOX y que presentan el alelo A en GSTP1 rs1695, tienen un aumento en el riesgo de la progresión y en la mortalidad, a diferencia de los pacientes con el alelo G (Kumamoto, K., *et al.*, 2013).

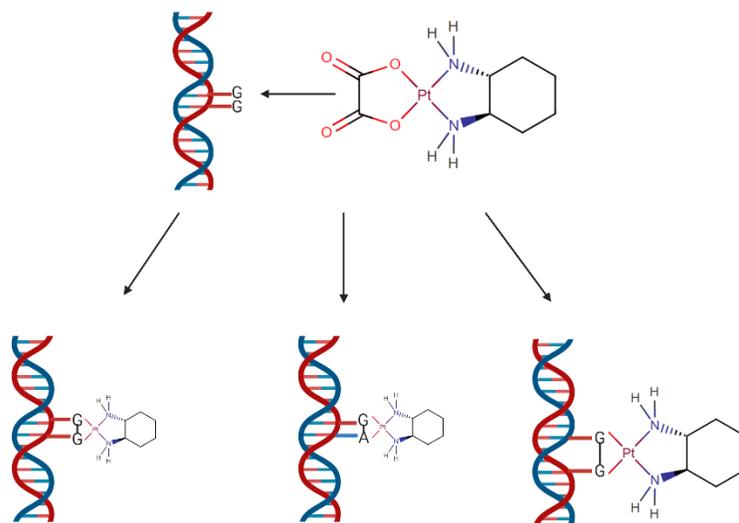


Figura 6. Mecanismo de acción Oxaliplatino. Adaptación de Kline, C. y W. El-Deiri, 2013; Reardon, J., *et al.*, 1999. Imagen creada con BioRender.com

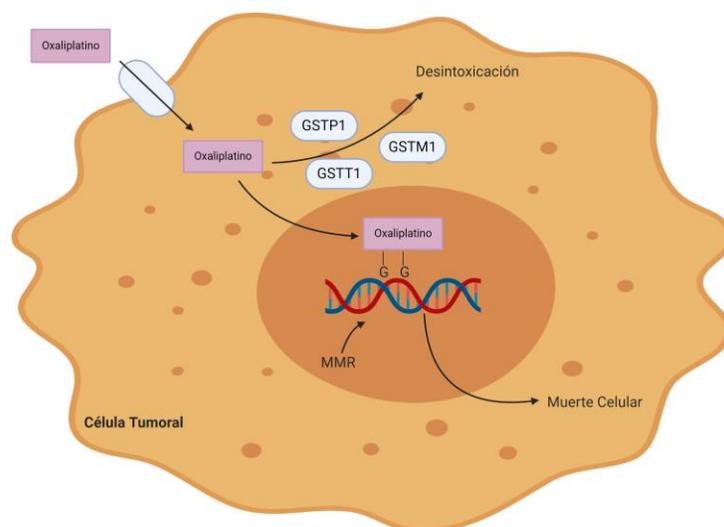


Figura 7. Farmacocinética y Farmacodinamia de Oxaliplatino. Imagen creada con *BioRender.com*

1.5 Inmunogenicidad del cáncer colorrectal

Tradicionalmente, se ha propuesto que el cáncer es una enfermedad que involucra alteraciones dinámicas presentes en el genoma y en el epigenoma. En la actualidad, se ha tratado de enfocar la enfermedad tanto en estas alteraciones como en el microambiente tumoral, principalmente en el sistema inmune (Hanahan, D. y R. Weinberg, 2011). En los últimos años se ha observado que el sistema inmune tiene un importante rol desde el desarrollo del cáncer como en su progresión y se ha mostrado que puede tener una gran implicancia clínica (de Vries, N. *et al.*, 2016; Deschoolmeester, V., *et al.*, 2011). Recientemente se han descrito una nueva clase de antígenos específicos que presenta exclusivamente el tumor derivado de las proteínas mutadas, llamadas neoantígenos (Schumacher, T. y R. Schreiber, 2015). Se ha descrito que la respuesta inmune contra el tumor podría correlacionarse positivamente con la presencia de estos neoantígenos (Rooney, M., *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha relacionado la presencia de MSI y de CIMP positivo con un aumento en la inmunogenicidad contra el tumor (Phillips, S., *et al.*, 2004).

Finalmente, se ha estudiado como el sistema inmune actúa sobre los tumores primarios de CRC. Se sabe que en una etapa temprana del crecimiento del tumor se activa el sistema inmune como resultado de citoquinas y quimioquinas liberadas por el tejido dañado cuando crece el tumor (West, N. *et al.*, 2015). Múltiples estudios han destacado que los tumores sólidos, como éste, son infiltrados por distintas células del sistema inmune, dentro de las cuales podemos encontrar linfocitos T y B, natural killer (NK), células

dendríticas y macrófagos, entre otros (Pagès, F., *et al.*, 2010). Esta infiltración tiene la habilidad de inducir un ambiente inflamatorio, el cual influye en la progresión del tumor (Di Caro, G., *et al.*, 2013). Dentro de las células que infiltran, las más estudiadas son los diferentes tipos de linfocitos T, ya que han mostrado ser posibles predictores de la respuesta clínica en CRC (Galon, J. *et al.*, 2006).

1.5.1 Linfocitos T infiltrantes (TILs)

Se ha visto que una gran infiltración de linfocitos T, es un indicador de buen pronóstico en varios tipos de cáncer, tales como melanoma, cáncer de mamas y cáncer colorrectal (Pagès, F., *et al.*, 2010). Dentro de las células T, se ha observado una alta infiltración de células T con distintos marcadores moleculares, principalmente CD45RO, FOXP3 y CD8 (Masugi, Y., *et al.*, 2016). Naito, en el año 1998, mostró que la infiltración de TILs CD8+ relacionada con la localización del tumor primario, se asocia con una mejor supervivencia. Estudios más actuales, han mostrado que la presencia de una densa infiltración de TILs CD8+ se correlaciona con una disminución del riesgo de recurrencia del tumor y una mejor supervivencia en pacientes CRC (de Vries, N. *et al.*, 2016). En estudios de asociación de marcadores de TILs, se ha observado que la presencia CD8+, en conjunto con CD45RO+, en los linfonodos con metástasis puede ser usado como predictor de la supervivencia (Oberg, A. *et al.*, 2002). Interesantemente, se realizó un estudio de TILs CD4+ y CD8+ en metástasis hepáticas de pacientes mCRC para mostrar su función a nivel hepático, ya que a nivel de tumor primario se sabe que si están presentes mejora la progresión de la enfermedad. En este estudio se observó una correlación del efecto de las TILs en la metástasis hepática con lo observado en el tumor primario (Wagner, P. *et al.*, 2009). En relación con los linfocitos T reguladores (Treg) se han observado resultados contradictorios, los cuales se podrían asociar con la etapa de CRC. En etapas tempranas, se ha observado que una alta densidad de estas TILs, en el tumor primario, se asocia con una peor progresión de la enfermedad, ya que impiden que las otras células inmunes actúen en el tumor (Gang, W. *et al.*, 2018). La función de los Treg en nuestro cuerpo se asocia a prevenir respuestas excesivas del sistema inmune, por lo tanto, mantienen la tolerancia inmune (Campbell, D. y M. Koch, 2011), lo que explicaría por su presencia en exceso empeorarían la progresión de la enfermedad. Interesantemente, en mCRC se ha observado un efecto totalmente contrario. Estudios han mostrado que una alta infiltración de Treg en pacientes mCRC que reciben quimioterapia, podría ser un factor de buen pronóstico (Correale, P. *et al.*, 2010).

Por otra parte, se sabe que alrededor de un 15% de los tumores de CRC presenta MSI y que dicha inestabilidad ha sido asociada con infiltración linfocitaria, principalmente de linfocitos T CD8+. En CRC etapa III se ha visto que la presencia de MSI está asociada a un buen pronóstico, por lo cual se ha postulado como hipótesis que un mecanismo de reparación de ADN deficiente podría generar múltiples péptidos inmunogénicos, los cuales podrían generar una respuesta inmune antitumoral (Pagès, F., *et al.*, 2010; Klingbiel, D., *et al.*, 2015). Sin embargo, en cáncer colorrectal metastásico la presencia de la inestabilidad está asociada con un peor pronóstico (Venderbosch, S., *et al.*, 2014; Nöpel-Dünnebacke, S., *et al.*, 2014; Van Cutsem, E., *et al.*, 2016), lo cual indica que diferentes mecanismos podrían explicar la variabilidad en la respuesta frente a esquemas de quimioterapia relativamente similares.

Tal y como se ha señalado anteriormente, el tratamiento del cáncer colorrectal es multifactorial, por lo que puede ser influenciado por más de un factor, tales como mutaciones germinales, inestabilidad de microsatélites, presentación de neoantígenos y la presencia de ciertas subpoblaciones en el microambiente del tumor. Por lo tanto, una mirada integral de la respuesta terapéutica podría ayudar a mejorar la comprensión de la variabilidad inter-paciente y describir nuevos biomarcadores, a través de modelos de asociación y posteriormente modelos predictivos de respuesta que incluyan algunas de las variables descritas anteriormente.

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

2. HIPÓTESIS

Variantes genéticas implicadas en el metabolismo y respuesta al esquema FOLFOX/CapeOX, en conjunto con la infiltración tumoral de linfocitos y variables clínicas, se asocian de forma sinérgica con baja sobrevida en cáncer colorrectal metastásico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la asociación entre la sobrevida global al esquema FOLFOX/CapeOX, las variaciones genéticas en *TYMS* (rs151264360), *DPYD* (rs3918290, rs67376798, rs55886062, rs1801265) y *GSTP1* (rs1695), el porcentaje de infiltración tumoral de linfocitos T y variables clínicas, en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar de manera individual la asociación entre la presencia de las variantes genéticas en *TYMS* (rs151264360), *DPYD* (rs3918290, rs67376798, rs55886062, rs1801265) y *GSTP1* (rs1695), los porcentajes de linfocitos infiltrantes tumorales (TILs), y variables clínicas, con la sobrevida global a 2 años en una cohorte retrospectiva de pacientes con cáncer colorrectal metastásico.
2. Evaluar de manera conjunta el efecto de variables clínicas, las variables genéticas e inmunes con la sobrevida global a 2 años en una cohorte retrospectiva de pacientes con cáncer colorrectal metastásico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Selección de individuos y muestras de estudio

4.1.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional retrospectivo de tipo cohorte. Se consideraron como expuestos y no expuestos a los pacientes con la o las variaciones genéticas y a los pacientes sin la o las variaciones genéticas, respectivamente (Figura 8). Se incluyeron pacientes con mCRC, tratados con el esquema quimioterapéutico FOLFOX o CapeOX en primera o segunda línea. La evaluación de respuesta se realizó con un seguimiento retrospectivo hasta los 24 meses mediante análisis de sobrevida global (método de Kaplan Meier con test de log-rank y modelo regresión de Cox). El resultado terapéutico (*outcome*) primario será la sobrevida global a 2 años.

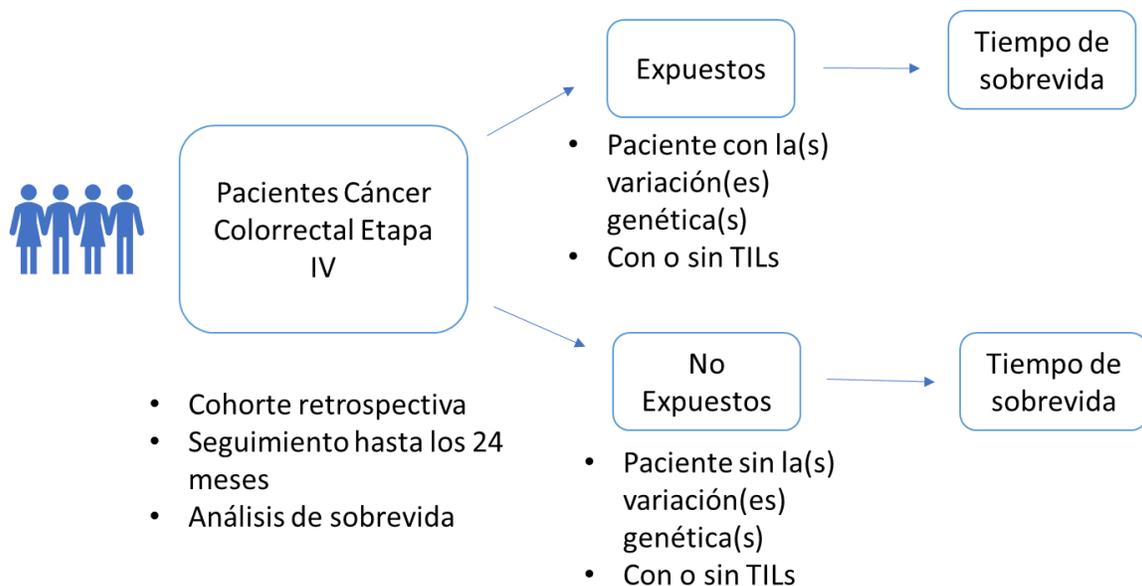


Figura 8. Flujograma del diseño del estudio.

4.1.2 Cálculo tamaño muestral

Para el cálculo de tamaño muestral se realizó la aproximación basada en el estudio de Stoehlmacher J, (2004) en donde se analizó el factor predictivo de algunos polimorfismos en genes, tales como *TYMS* o *GSTP1*, en pacientes con cáncer colorrectal metastásico con tratamiento FOLFOX (Stoehlmacher, J., *et al.*, 2004). Para esto se consideró un *Hazard Ratio* (HR) de 2,0 obtenido en dicho estudio para el genotipo AA del rs1695 de *GSTP1*, el cual tiene una frecuencia de 65%, un intervalo de confianza del 95%, un poder estadístico del 80% y una tasa de censura del 1%. El cálculo fue realizado a través de la página *Sample-Size.net* (www.sample-size.net) basados en la fórmula Schoenfeld arrojando un tamaño muestral de 84 pacientes, en donde 55 son el grupo expuesto y 29 el grupo no expuesto.

4.1.3 Selección de muestras

La selección de pacientes se realizó mediante la revisión de 261 fichas clínicas del Instituto Nacional del Cáncer (INC), de las cuales 109 corresponden a potenciales pacientes que cumplen con los criterios de inclusión descritos más adelante. De estos, a 41 se les realizó el diagnóstico o la cirugía en otros centros no incluidos en este estudio, por lo cual no fue posible recolectar sus muestras de biopsia embebidas en formalina e incluidas en parafina (FFPE). Fueron 68 pacientes los que contaban con diagnóstico y/o cirugía realizada en alguno de los siguientes centros incluidos en este estudio: Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH), Hospital San José (HSJ) y el Instituto Nacional del Cáncer. De estos no se incluyeron a 22 pacientes, ya que no fue posible esclarecer si cumplían o no con los criterios de inclusión/exclusión, principalmente con aquel criterio relacionado con la presencia de muestras de biopsia FFPE en los centros incluidos. Se reclutaron 46 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión descritos más adelante. Por otra parte, se realizó la revisión de 134 fichas clínicas de pacientes incluidos en la colección de Cáncer colorrectal del Biobanco de Tejidos y Fluidos de la Universidad de Chile (BTUCH), de los cuales solo 5 cumplen con los criterios de inclusión (Figura 9). Finalmente se logró reclutar 51 pacientes para el estudio de esta tesis, de los 84 propuestos en el punto 4.1.

Las muestras seleccionadas de los 51 pacientes incluidos corresponden a biopsias FFPE de tejido tumoral y/o normal de colonoscopia o de cirugía primaria. Estas fueron obtenidas de los respectivos servicios de anatomía patológica y del BTUCH. La obtención de todas las muestras se realizó siguiendo las normativas éticas-legales vigentes para investigación biomédica acorde a estándares internacionales de biobanco para la gestión de las muestras y datos.

Criterios de inclusión

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

Criterios de exclusión

- Con histología diferente a adenocarcinoma
- Con patologías del sistema inmune previo al diagnóstico de mCRC
- Sin muestra de biopsia disponible en el hospital de cirugía o centro donde se hizo el diagnóstico.
- Incluidos en estudio clínico intervencional como parte del tratamiento de mCRC

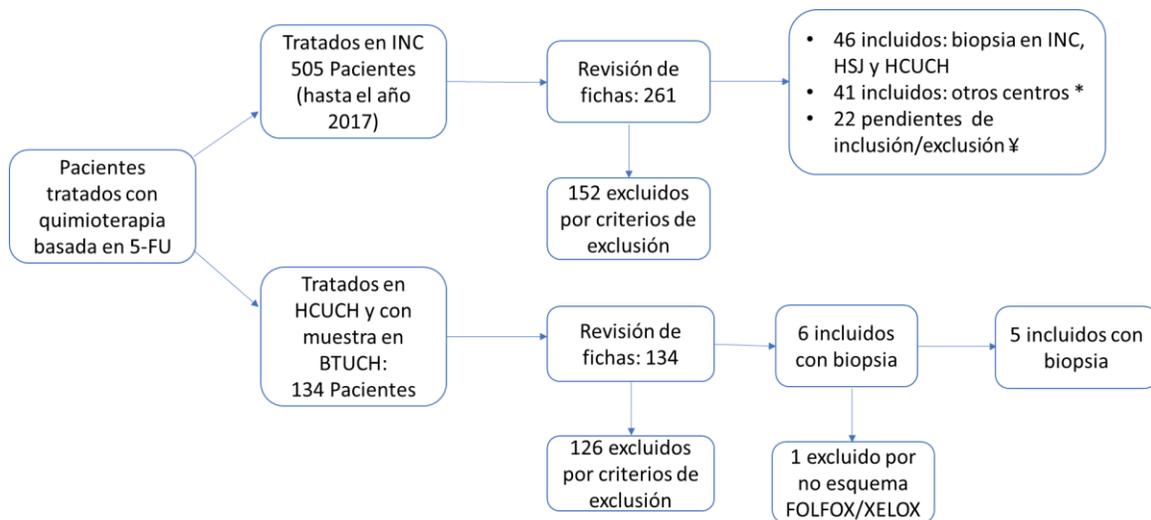


Figura 9. Flujograma de selección de pacientes mediante la revisión previa de fichas clínicas. Los que presentan el símbolo * no se incluyeron en esta tesis, los pacientes que presentan el símbolo ¥ quedaron pendientes de inclusión o exclusión por inconsistencias en sus fichas clínicas, falta de datos relevantes para inclusión o por no ubicación de la biopsia en los centros incluidos. Número de pacientes incluidos finalmente: 51.

4.1.4 Consideraciones éticas

El proyecto fue presentado al comité ético científico del servicio de salud metropolitano norte (SSMN) y el comité ético científico de la facultad de medicina de la Universidad de Chile, de acuerdo con las normas sugeridas en la Declaración de Helsinki (Helsinki, 1964) y considerando el uso de las buenas prácticas clínicas (GCP). Los procedimientos realizados en este estudio se realizaron contemplando las

leyes nacionales N° 20.120 (sobre la investigación científica en el ser humano, su genoma prohíbe la clonación humana), N° 19.628 (sobre la protección de la vida privada) y N° 20.584 (Regula los derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención de salud). Debido a que corresponde a un cáncer de alta mortalidad en sus etapas avanzadas y las complicaciones que puede causar el recontacto con los familiares, se ha aprobado la dispensa al consentimiento informado (ANEXO I).

4.2 Etapas experimentales y metodología

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

Una vez recolectadas las muestras desde los servicios de anatomía patológica de los centros respectivos, se procedió enviar a revisión los cortes histológicos con tinción de eosina y hematoxilina al médico anatomopatólogo del BTUCH para reconfirmar el diagnóstico, demarcar las zonas tumorales y no tumorales, indicar porcentaje de células e infiltración linfocitaria.

Una vez identificadas, se determinó el tipo de corte a realizar. Si la muestra procedía de cirugía primaria, dependiendo del tamaño de la zona demarcada, se realizaron cortes en “rollo” o microdisecciones. Si la zona demarcada por el médico anatomopatólogo superó al 80% del tejido, se procedió a realizar dos cortes de 10 µm los cuales fueron depositados en un tubo de 2,0 ml estéril para las técnicas moleculares posteriores. En cambio, si la zona demarcada fue menor al 80% se procedió a realizar de 6 a 8 cortes (dependiendo del tamaño de la zona marcada) de 10 µm depositados en portaobjetos para realizar la microdisección de la zona de interés y depositarla en tubos de 2,0 ml estéril. Si la muestra provenía de una colonoscopia, se realizaron 8 cortes de 10 µm y se depositaron de a dos cortes en 4 tubos de 2,0 ml estériles. Estos criterios fueron determinados previamente mediante una estandarización de la técnica (ANEXO II)

Luego de obtener los cortes se realizó la extracción de ADN con el kit *AllPrep DNA/RNA FFPE Kit* (Qiagen). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante.

4.2.2 Cuantificación y controles de calidad del ADN

El ADN se cuantificó y se determinó su relación 260/280 nm mediante espectrofotometría con el equipo Denovix DS-11 (*nanodrop*). La integridad del ADN fue evaluada en un gel de agarosa al 0,8% en buffer TBE 1x (Figura 10). Para complementar el resultado de la integridad y determinar la fragmentación de las muestras, se realizó un PCR múltiplex de punto final para genes constitutivos tales como GAPDH, β -actina y β -globulina. Se utilizó la enzima *MyTaqTM DNA Polymerase* para la amplificación con el protocolo recomendado por el fabricante. Los tamaños de los amplicones obtenidos representan el tamaño de los fragmentos de ADN presente en la muestra. Se evaluó la amplificación de los cuatro tamaños de amplicones mediante un gel de agarosa al 2% en un buffer TBE 1x (Figura 11). Aquellas muestras que presentaban los cuatro la amplificación de los cuatro amplicones fueron consideradas como muestras de buena calidad, en cambio aquellos que solo presentaban la amplificación de uno solo se consideraron muestras de baja calidad. Esto tiene como función determinar el tiempo de almacenamiento del ADN para sus análisis posteriores.

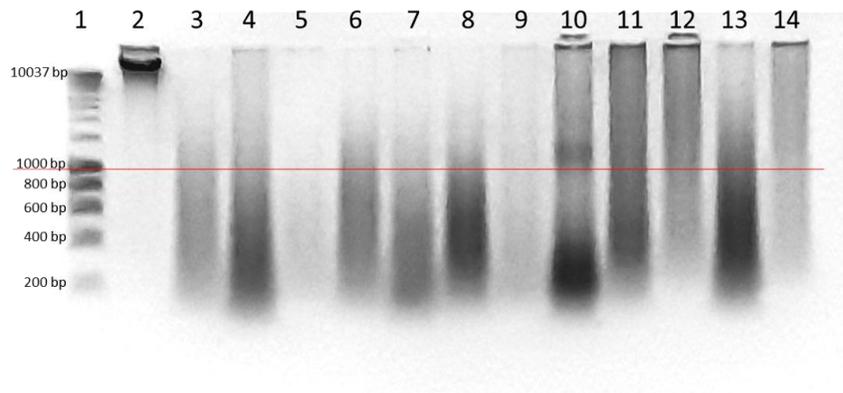


Figura 10. Patrón electroforético de las muestras de ADN extraído desde FFPE. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%: carril N°1: estándar de peso de 1 kb, carril N°2: patrón del ADN genómico extraído desde sangre, carriles N° 4, 10, 11, 12 y 14: patrones de ADN FFPE de calidad óptima (*Smear* entre 1000bp y 800bp) y carriles 5 y 9: patrones de ADN de calidad deficiente (*Smear* entre 800bp y 200bp), ver a) ANEXO III.

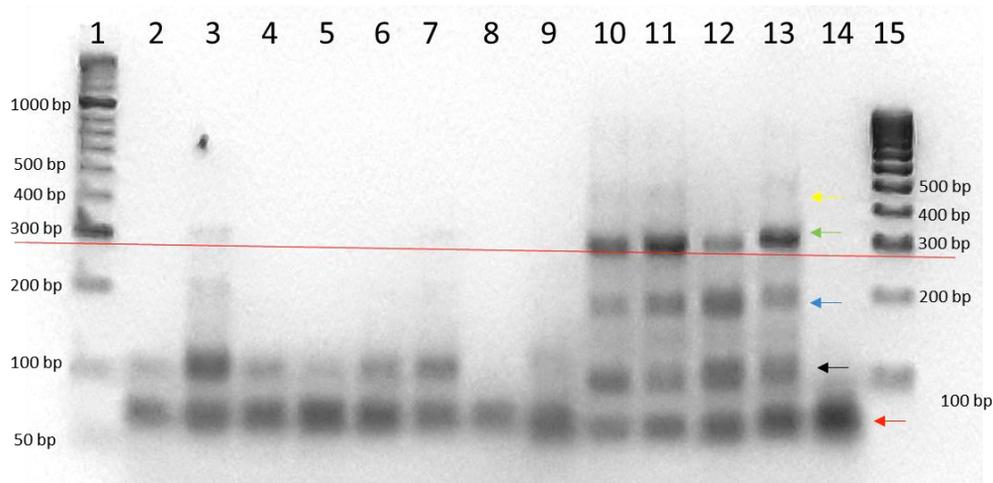


Figura 11. Control de calidad mediante PCR múltiplex. Electroforesis en gel de agarosa al 2%: carril N°1: estándar de peso molecular de 50 pb, carril N°15: estándar de peso molecular de 100 pb, carriles N°10, 11 y 13: 4 amplicones (flecha amarilla GAPDH 6/7, flecha verde β -actina, flecha azul β -globina y flecha negra GAPDH AS), carriles 3 y 12: 3 amplicones, carriles 2, 4, 5, 6, 7, 9: 1 amplicón, y carriles 8 y 14: exceso de primers, ver b) de ANEXO III.

4.2.3 Análisis de variabilidad genética en ADN germinal y tumoral

La determinación de las mutaciones germinales se realizó mediante PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*®. La concentración usada de ADN usada fue de 10 ng/ μ L, la cual determinada en una estandarización previa (ANEXO IV). Se utilizó el programa de PCR recomendado por el fabricante. Las determinaciones se realizaron en el equipo Stratagene 3000p marca Agilent. De manera paralela, se genotipificaron las muestras germinales y las tumorales las sondas correspondientes para *DPYD*, *TYMS* y *GSTP1*. El fin de esta comparación es ver si la presencia se encuentra tanto a nivel germinal como tumoral, ya que es a nivel tumoral donde el fármaco ejercerá su acción por lo que para realizar una asociación deben ser equiparables las variantes determinadas.

Tabla 1. SNPs correspondientes a *DPYD*, *TYMS* y *GSTP1* con la secuencia de contexto de la sonda *TaqMan*® correspondiente utilizada para sus análisis.

Gen	SNP	ID	Secuencia de contexto sonda <i>TaqMan</i> ®
<i>DPYD</i>	IVS14+1G >A (<i>DPYD</i> *2)	rs3918290	TGTTTTAGATGTTAAATCACACTTA[C/T]GTTGTCTGGAAAGT CAGCCTTTAGT
	c.2846A>T	rs67376798	ACCACAGTTGATACACATTTCTTCA[A/T]CAATCATAGCCAC AACTTGCTCTAC
	c.1679T>G (<i>DPYD</i> *13) c.1679T>A	rs55886062	CCATCCAGCTTCAAAGCTCTTCGA[A/C]TCATTGATGTGCTG GTGGCTGGAGT
	c.85T>C (<i>DPYD</i> *9)	rs1801265	TCTAATTTCTTGGCCGAAGTGGAAAC[A/G]CAGAGTTGCATGA GTTTGTGTTTCGA
<i>TYMS</i>	<i>TYMS</i> 3'UTR 6bp <i>ins-del</i>	rs151264360	ATGTAGAGTGTGGTTATGAACT[TTAAAG/~]TTATAGTTGTTT TATATGTTGCT
<i>GSTP1</i>	c.313A>G	rs1695	CGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATAC[A/G]TCTCCCTCATCTA CACCAACTATGT

~ = Genotipo delección

ID = código universal para identificar variante.

En paréntesis cuadrado y en rojo se indica el cambio nucleotídico que da lugar al polimorfismo

4.2.4 Recolección de datos clínicos

Se realizó la revisión de las fichas clínicas de los pacientes seleccionados y se recopilieron los siguientes datos: Sexo, edad, fecha del diagnóstico, fecha de fallecimiento, fecha de tratamiento quimioterapéutico de primera línea y esquema utilizado, fecha de tratamiento quimioterapéutico de segunda línea y el esquema utilizado, diagnóstico del médico anatomopatólogo, TNM, ubicación tumor primario, diagnóstico oncología médica, cáncer secundario, grado del tumor y co-morbilidades asociadas. Todos estos datos clínicos se recopilieron en un *Case Report Form* (CRF) adecuado al estudio (ANEXO V).

4.2.5 Análisis de infiltración de linfocitos T

Para determinar el porcentaje de infiltración de linfocitos T, se realizó un *Tissue Microarray* (TMA) en donde se incorporaron tres *spots* por muestra de 1 mm, si esta provenía de cirugía, o un *spot* por muestra, si esta corresponde a colonoscopia. Posterior a la realización del TMA con las muestras, se

procedió a realizar una HE para determinar el porcentaje de infiltración tumoral de linfocitos T (Figura 12). Este procedimiento fue realizado por el médico anatomopatólogo del BTUCH.

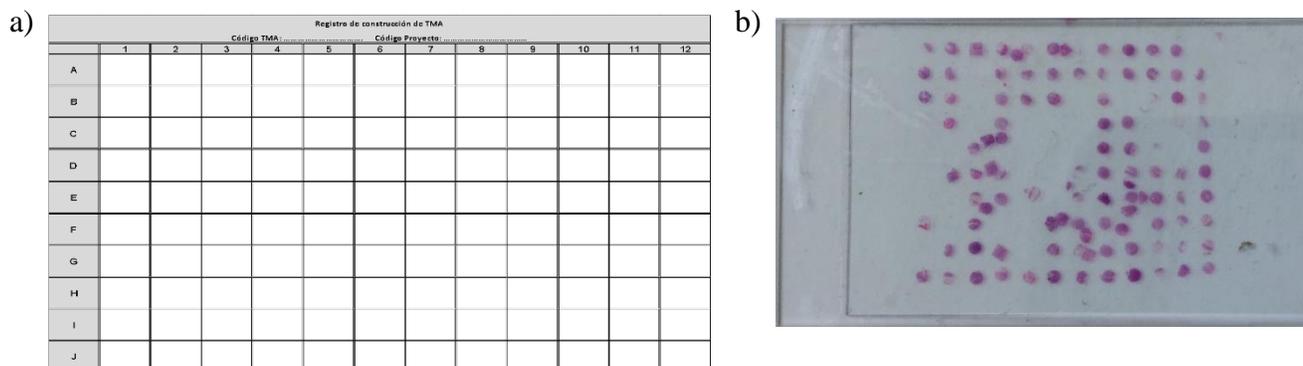


Figura 12. Esquema de la distribución de las muestras del TMA (a) y fotografía de una de las HE realizadas en este estudio (b).

4.2.6 Análisis estadísticos

Para caracterizar al grupo de estudio se realizó un análisis de estadística descriptiva utilizando las medidas de tendencia central promedio, mediana y desviación estándar. Los análisis estadísticos de asociación de la respuesta terapéutica, en términos de sobrevida, se realizaron mediante curvas de *Kaplan-Meier*. Para determinar las diferencias significativas entre las curvas utilizó el test de log-rank. Posterior a eso, se analizó la implicancia de cada variable y su asociación con la sobrevida global de los pacientes. Esto se realizó mediante el análisis de regresión de Cox, en donde se determinaron los datos de *Hazard Ratio* (HR) de cada una de las variables. Las variables genéticas se analizaron mediante modelos de herencia codominante, recesiva, dominante y multiplicativa. Estos análisis se realizaron de manera univariada y se determinaron aquellos con *p-value* significativo. Las variables que presentaron un *p-value* menor a 0,2 fueron consideradas para analizarlas de manera multivariada (Dupont, W. 2009). Se realizó el análisis de regresión de Cox multivarido mediante el método “*step-by-step*” y se consideró como mejor modelo aquel que presentó un mejor pseudo R^2 con más variables significativas. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico *Survival* en el software R 3.5.3, mediante RStudio. Se consideró para todos los análisis un poder estadístico de 80% y una significancia del 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización clínica de los pacientes

Del total de pacientes incluidos en el estudio, el 39,2% corresponde a hombres y el 60,8% a mujeres, los cuales tienen una edad promedio, al momento del diagnóstico cáncer colorrectal metastásico, de $61,8 \pm 12,9$ años. La localización tumoral más frecuente identificada en este grupo de pacientes fue en el lado izquierdo con un 59,6%, seguido por el lado derecho con un 25,0% y, finalmente, el recto con un 9,6%. El esquema quimioterapéutico administrado de forma más frecuencia fue CapeOX (Capecitabina con Oxaliplatino) con un 42,3%, seguido por esquema FOLFOX con un 38,5%. Del total de pacientes, solo dos (3,8%) recibieron terapia monoclonal anti-EGFR en conjunto con esquema FOLFOX como primera línea de tratamiento. Un 52,9% de los pacientes recibió esquema quimioterapéutico de segunda línea, de los cuales un 77,8% recibió FOLFIRI (Tabla 2A).

Respecto a la clasificación histopatológicas el 25,5% es clasificado como adenocarcinoma, el 43,1% como adenocarcinoma tubular, el 7,8% como adenocarcinoma tubular y mucinoso y el 5,9% como adenocarcinoma tubulopapilar. A su vez, según el grado de diferenciación: 19,6% corresponde a tumores bien definidos, un 51,0% corresponde a tumores moderadamente diferenciados y un 7,8% corresponde a tumores poco diferenciados. Finalmente, basado en la clasificación TNM: en relación al tamaño tumoral (T) el 60,8% corresponde a T3, según el número de ganglios infiltrados (N) el 35,3% corresponde a N1, y según la metástasis (M) el 60,8% tiene un foco metastásico identificado según anatomía patológica u oncología médica. Los principales sitios de metástasis a distancia corresponden a hígado, con un 51%, a pulmón, con un 37,3%. Un menor porcentaje de pacientes presentaron otro tipo de metástasis (19,6%), las cuales incluyen principalmente a metástasis en vejiga, ovario, epiplón, glándula suprarrenal y riñón. Un 50% de los pacientes que presentaron hepática, manifestaron otro tipo de foco metastásico, principalmente en pulmón (Tabla 2B)

Tabla 2A. Características generales de los pacientes mCRC incluidos en este estudio.

Centro Clínico	Porcentaje (n)
Hospital Clínico Universidad de Chile (HCUCH)	25,5% (13)
Hospital San José (HSJ)	52,9% (27)
Instituto Nacional del Cáncer (INC)	21,6% (11)
Sexo	Porcentaje (n)
Hombre	39,2% (20)
Mujer	60,8% (31)
Edad Diagnóstico	Porcentaje (n)
Promedio \pm D.E. (años)	61,8 \pm 12,9
Mediana (años)	64,5
ND	9,6% (5)
Localización de tumor primario	Porcentaje (n)
Derecho	25,5% (13)
Izquierdo	58,8% (30)
Recto	9,8% (5)
ND	5,9% (3)
Quimioterapia 1° Línea	Porcentaje (n)
CapeOX	43,1% (22)
FOLFOX	39,2% (20)
FOLFOX-anti-EGFR	3,9% (2)
ND	13,8% (7)
Quimioterapia 2° Línea	Porcentaje (n)
Con QMT 2° Línea	52,9% (27)
Sin QMT 2° Línea	33,3% (17)
ND	13,8% (7)
Esquema QMT 2° Línea	Porcentaje (n)
5-FU-anti-EGFR	3,7% (1)
Capecitabina	7,4% (2)
FOLFIRI	77,8% (21)
FOLFIRI-anti-EGFR	3,7% (1)
FOLFOX	7,4% (2)
<i>ND = Datos no disponibles</i>	
<i>D.E. = Desviación estándar</i>	

Tabla 2B. Características generales de las muestras de los pacientes mCRC incluidos en este estudio.

Tipo de muestra	Porcentaje (n)	Clasificación TNM	
Cirugía	82,4% (42)	T	Porcentaje (n)
Colonoscopia	13,7% (7)	T2	2% (1)
ND	3,9% (2)	T3	60,8% (31)
Tipo Histológico	Porcentaje (n)	T4	15,7% (8)
Adenocarcinoma	25,5% (13)	Tx	2% (1)
Adenocarcinoma tubular	43,1% (22)	ND	19,6% (10)
Adenocarcinoma tubulopapilar	5,9% (3)	N	Porcentaje (n)
Adenocarcinoma mucinoso	7,8% (4)	Nx	2% (1)
Adenocarcinoma tubular y mucinoso	2% (1)	N0	21,6% (11)
Adenocarcinoma con células en anillo de sello	2% (1)	N1	35,3% (18)
Adenocarcinoma cribiforme	2% (1)	N2	23,5% (12)
ND	11,8% (6)	ND	17,6% (9)
Grado de diferenciación	Porcentaje (n)	M	Porcentaje (n)
Bien	19,6% (10)	Mx	5,9% (3)
Moderado	51,0% (26)	M0	3,8% (2)
Poco	7,8% (4)	M1	60,8% (31)
ND	21,6% (11)	ND	29,4% (15)
Tipo de Metástasis			
Metástasis Hepática	Porcentaje (n)	Otras Metástasis	Porcentaje (n)
Presente	51% (26)	Presente	19,6% (10)
Ausente	19,6% (10)	Ausente	51% (26)
ND	29,4% (15)	ND	29,4% (15)
Metástasis Pulmonar	Porcentaje (n)	Más de un foco metastásico en distintos órganos	Porcentaje (n)
Presente	37,3% (19)	Metástasis Hepática más otro foco MTT	50% (13)
Ausente	33,3% (17)		
ND	29,4% (15)		
<i>ND = Datos no disponibles</i>			

5.2 Determinación de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes genéticas *TYMS*, *DPYD* y *GSTP1* en pacientes con cáncer colorrectal metastásico

La determinación de las variantes genéticas de *TYMS*, *DPYD* y *GSTP1* se realizó mediante PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*®. La figura 13, de manera representativa, muestra los resultados obtenidos en cada determinación genotípica.

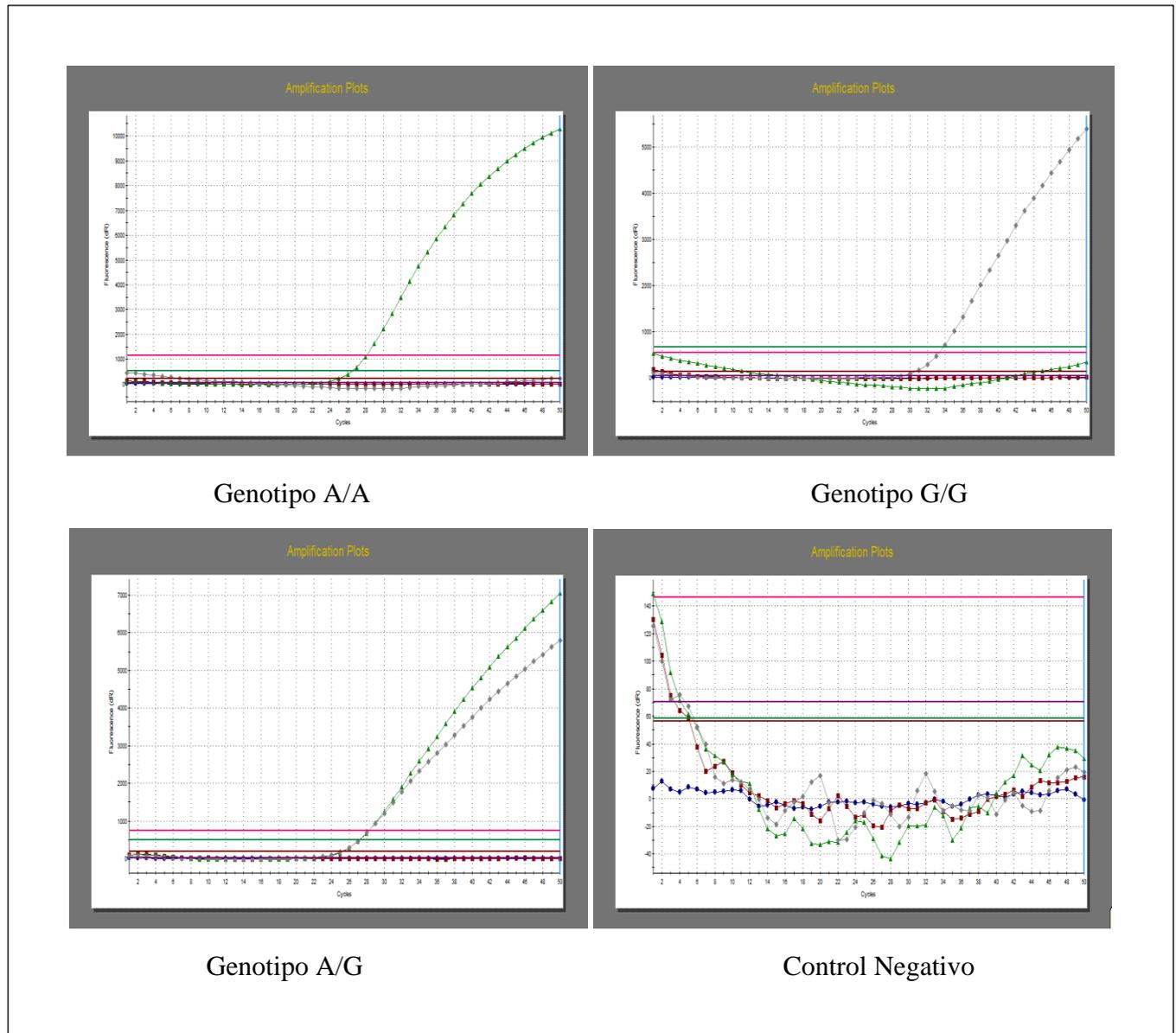


Figura 13. Representación de la presencia de los genotipos mediante análisis de PCR en tiempo real asociado a sondas *TaqMan*®. Ejemplo realizado con la variante de *GSTP1* c.313A>G (rs1695).

Las frecuencias alélicas y genotípicas determinadas en el estudio se observan en la tabla 3. Estas variantes obtenidas tanto a nivel germinal como tumoral son idénticas. Se observa que para la variante genética *TYMS 3'UTR 6bp ins-del* en nuestra cohorte de estudio no se determinó ningún paciente con el genotipo INS/INS, el cual corresponde al fenotipo relacionado con la expresión normal de la enzima Timilidato Sintasa. Según la base de datos *Ensembl* la frecuencia del genotipo INS/INS en población amerindia es de 0,48 (tabla 4). Para la variante genética *GSTP1 c.313A>G (rs1695)* se observó que un 45% de los pacientes son heterocigotos (tabla 3). En relación con la distribución alélica se observa que nuestra población se asemeja a la amerindia y a la africana (tabla 4).

En relación con las variantes para DPD se observó que para las variantes genéticas de baja frecuencia *DPYD*2* y *DPYD*13* se encontraron pacientes con solo el genotipo *wt* o sin riesgo (tabla 3). Interesantemente, para la otra variante de baja frecuencia, *DPYD c.2846A>T (rs67376798)*, se encontró un paciente con el genotipo heterocigoto A/T y uno con el genotipo homocigoto T/T. Se observaron de forma independiente a estos pacientes y se observó que el paciente con el genotipo A/T presentó una sobrevida de más de 5 años posterior a su diagnóstico. En cambio, el paciente con el genotipo T/T falleció a los 5 meses posterior a su diagnóstico. Como en esta cohorte de estudio no se encontró a más pacientes con dichos genotipos, no se puede determinar la implicancia de estos de manera estadística.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas para las variantes analizadas de *TYMS*, *DPYD* y *GSTP1* (n=51).

TYMS 3'UTR 6bp ins-del (rs151264360)					
Frecuencia (n)	Genotipo			Alelo	
	INS/INS	INS/DEL	DEL/DEL	INS	DEL
	0	0,47 (24)	0,53 (27)	0,24	0,76
GSTP1 c.313A>G (rs1695)					
Frecuencia (n)	Genotipo			Alelo	
	A/A	A/G	G/G	A	G
	0,29 (15)	0,45 (23)	0,25 (13)	0,52	0,48
DPYD IVS14+1G>A (DPYD*2) (rs3918290)					
Frecuencia (n)	Genotipo			Alelo	
	G/G	G/A	A/A	G	A
	1 (51)	0	0	1	0
DPYD c.2846A>T (rs67376798)					
Frecuencia (n)	Genotipo			Alelo	
	A/A	A/T	T/T	A	T
	0,96 (49)	0,02 (1)	0,02 (1)	0,97	0,03
DPYD c.1679T>G (DPYD*13) (rs55886062)					
Frecuencia (n)	Genotipo			Alelo	
	T/T	T/G	G/G	T	G
	1 (51)	0	0	1	0
DPYD c.85T>C (DPYD*9) (rs1801265)					
Frecuencia (n)	Genotipo			Alelo	
	T/T	T/C	C/C	T	C
	0,53 (27)	0,33 (17)	0,12 (6)	0,7	0,28

Tabla 4. Frecuencias alélicas de diferentes poblaciones obtenidas de la base de datos pública *Ensembl* y de la cohorte de este estudio.

Población	TYMS 3'UTR 6bp ins-del		GSTP1 c.313A>G		DPYD c.85T>C	
	Alelo		Alelo		Alelo	
	INS	DEL	A	G	T	C
Cohorte estudio	0,24	0,76	0,52	0,48	0,7	0,28
Africana	0,43	0,57	0,52	0,48	0,56	0,44
Caucásica	0,67	0,33	0,67	0,33	0,79	0,21
Asiática	0,31	0,69	0,82	0,18	0,91	0,09
Amerindia	0,68	0,32	0,52	0,48	0,78	0,23

5.3 Análisis estadísticos univariados de asociación entre las variables genéticas y no genéticas con la sobrevida de pacientes mCRC

5.3.1 Variables no genéticas

Se compararon de manera univariada las variables no genéticas obtenidas de las fichas clínicas. En cada uno de los análisis se determinó las medianas de sobrevida asociada a cada curva. Las variables Sexo y Edad de diagnóstico no mostraron diferencias significativas en su asociación con la sobrevida. De la misma manera, la localización del tumor primario no mostró asociación con la sobrevida, tanto cuando se agruparon como derecho, izquierdo y recto, como cuando se reagruparon en derecho e izquierdo (incluyendo a los tumores primarios ubicados en el recto).

En relación con la ubicación de las metástasis a distancia, se observó que la metástasis hepática se asocia de manera negativa significativamente con la sobrevida de los pacientes mCRC (Figura 14). Los pacientes que presentan metástasis hepática tienen una mediana de sobrevida de 32,1 meses, en cambio aquellos que no presentan esta metástasis tienen una mediana de sobrevida de 107,2 meses (Tabla 5).

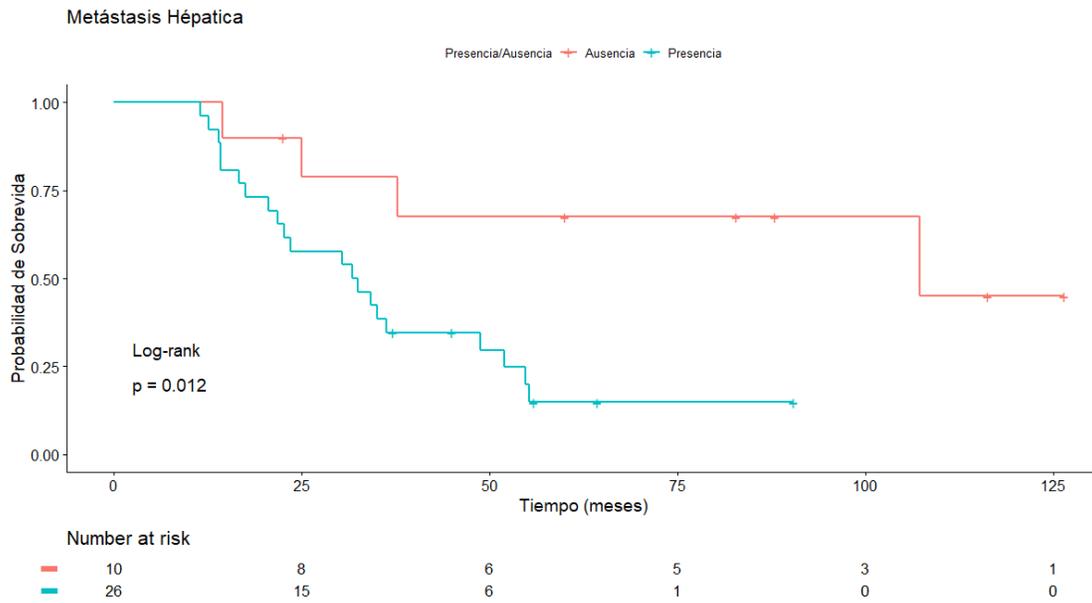


Figura 14. Curvas Kaplan-Meier para metástasis hepática. Línea roja representa la ausencia y la azul la presencia de metástasis hepática.

Cuando se analizó la presencia de presentar otro tipo de metástasis, excluyendo las pulmonares, se observó una tendencia a la asociación con supervivencia (Figura 15). Los pacientes que presentaron otro tipo de metástasis tienen una mediana de supervivencia de 48,8 meses y aquellos que no presentan otro tipo de metástasis tienen una mediana de supervivencia de 30,5 meses (Tabla 5). En cambio, al analizar la presencia de metástasis pulmonar no se observó una asociación con la supervivencia. Como varios pacientes no presentaban un solo tipo de metástasis, se realizó un modelo de agrupación de metástasis. Los grupos analizados fueron: presentar metástasis hepática, presentar otro tipo de metástasis que no sea hepática y presentar metástasis hepática más otro foco metastásico. Se observó que al agrupar de esta manera a los pacientes existe una asociación significativa con la supervivencia (Figura 16), en donde los pacientes que presentan otro tipo de metástasis tienen una mediana de supervivencia de 107,2 meses, los pacientes que presentan metástasis hepática más otro foco metastásico tienen una mediana de supervivencia de 35,5 meses y aquellos que presentan solo metástasis hepática tienen una mediana de supervivencia de 22,7 meses (Tabla 5).

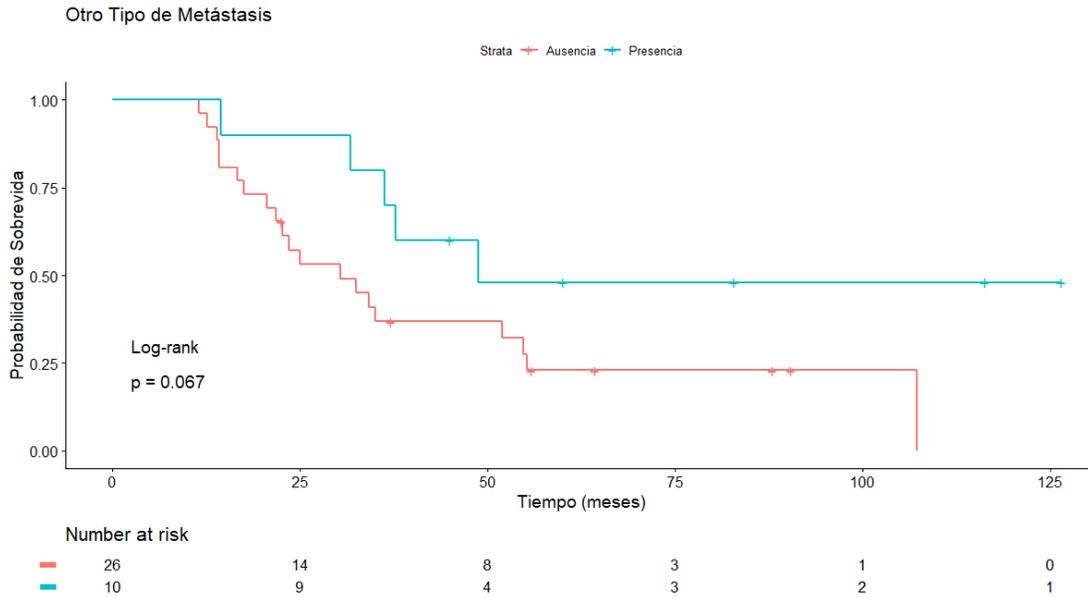


Figura 15. Curvas Kaplan-Meier para metástasis, excluyendo hepática y pulmonar. Línea roja representa la ausencia y la azul la presencia de metástasis.

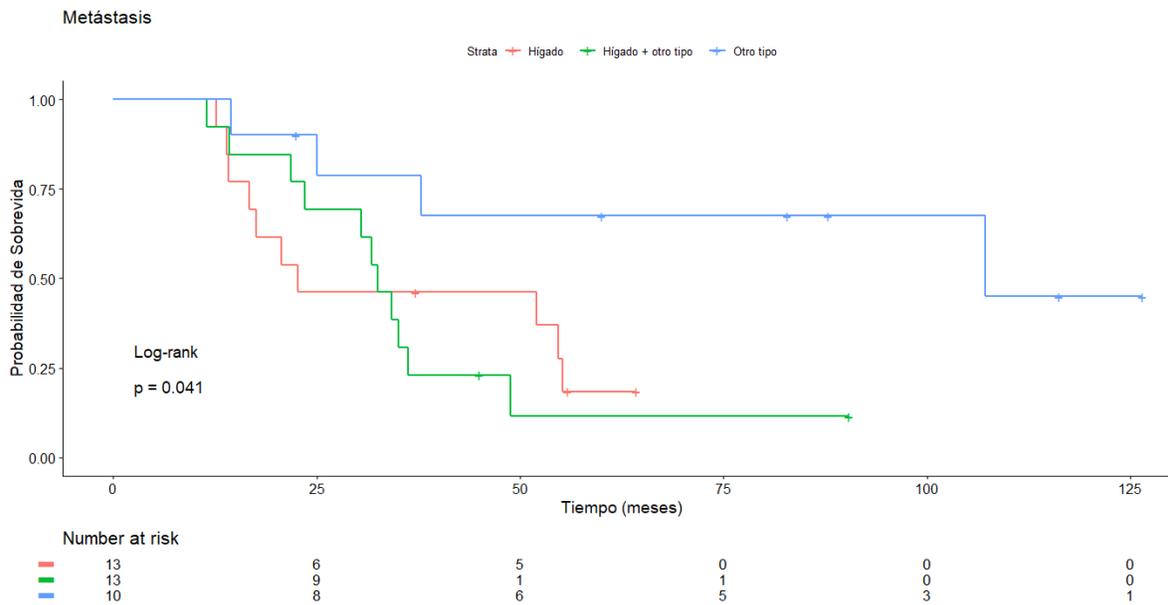


Figura 16. Curvas Kaplan-Meier para modelo de agrupación de metástasis. Línea roja representa la presencia de solo metástasis hepática, la línea verde la presencia de metástasis hepática en conjunto con otro tipo de metástasis y la azul la presencia de otro tipo metástasis que no sea hepática.

Para saber la implicancia de la infiltración de linfocitos T (TILs) con la sobrevida de los pacientes, se observaron tres porcentajes de infiltración; 10%, 20% y 30% (Figura 17). El grupo de pacientes con 30% de TILs se observa como una línea continua, debido a lo limitado del tamaño muestral de este grupo (n=3). No se encontró asociación significativa con la sobrevida, pero si se consideró para entrar en el análisis multivariado, *p-value* menor a 0,2.

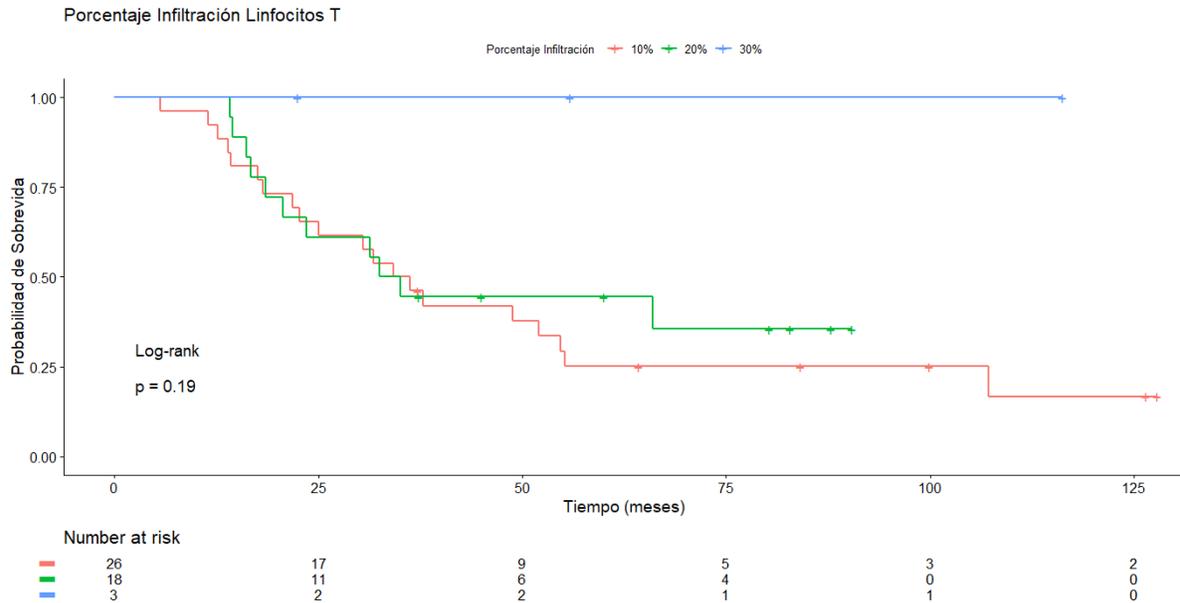


Figura 17. Curvas Kaplan-Meier de los distintos porcentajes de infiltración de linfocitos T (TILs). Línea roja representa a los pacientes con 10% de TILs, la línea verde a los pacientes con 20% de TILs y la línea azul a los pacientes con 30% de TILs.

En relación con el tratamiento de los pacientes, se analizaron dos parámetros principalmente. El primero se relaciona con completar el tratamiento FOLFOX/XELOX, es decir se agruparon a los pacientes en dos grupos: Aquellos que completaron los doce ciclos y aquellos que tuvieron menos de doce ciclos. Este análisis no mostró asociación significativa con la sobrevida de los pacientes (Figura 18), pero como el *p-value* es menor a 0,2, se considerará para análisis posteriores. Adicionalmente, se realizó el análisis de los grupos de pacientes por números de ciclos completados. A pesar de mostrar un *p-value* significativo indicando que las curvas son distintas, no se consideró para más análisis ya que cada grupo de pacientes por ciclos tiene un n muestral muy pequeño, por ende, el análisis no presenta el poder estadístico suficiente (Figura 19)

El otro parámetro que se consideró en este estudio fue tener o no segunda línea de tratamiento. Los pacientes que tuvieron una segunda línea de tratamiento muestran una tendencia negativa con la sobrevida, con una mediana de sobrevida de 32,4 meses (Figura 20 y Tabla 5). No se analizó por tipo de quimioterapia de segunda línea, ya que el n muestral de cada grupo es muy pequeño, por ende, por poder estadístico no se puede lograr un análisis correcto.

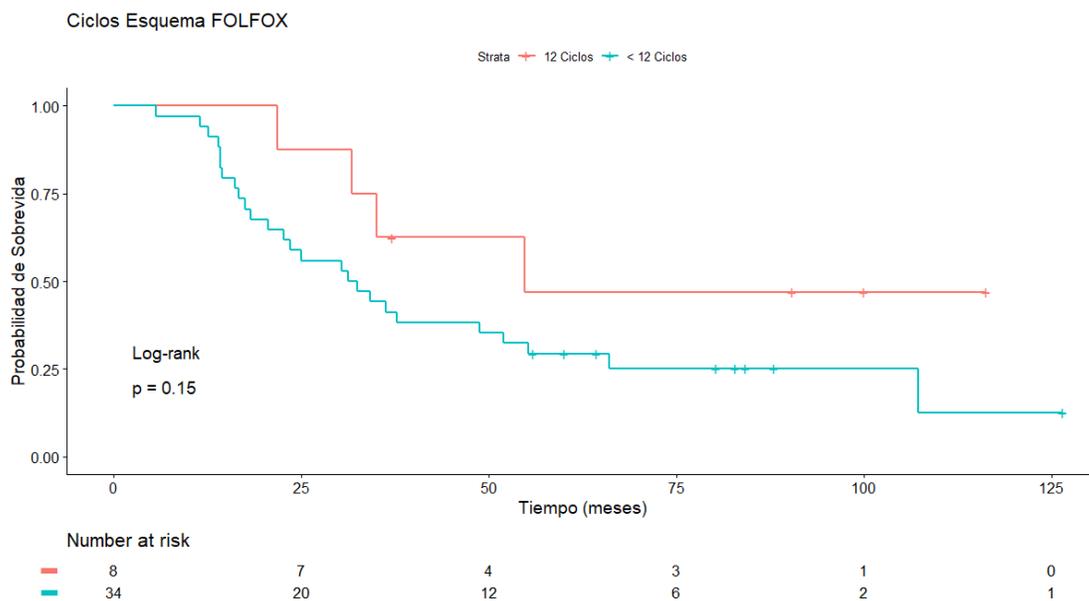


Figura 18. Curvas Kaplan-Meier del cumplimiento del tratamiento FOLFOX/XELOX. Línea roja representa a los pacientes que completaron los 12 ciclos FOLFOX/XELOX y la azul a los pacientes que tuvieron menos de 12 ciclos FOLFOX/XELOX.

Número de Ciclos Esquema FOLFOX

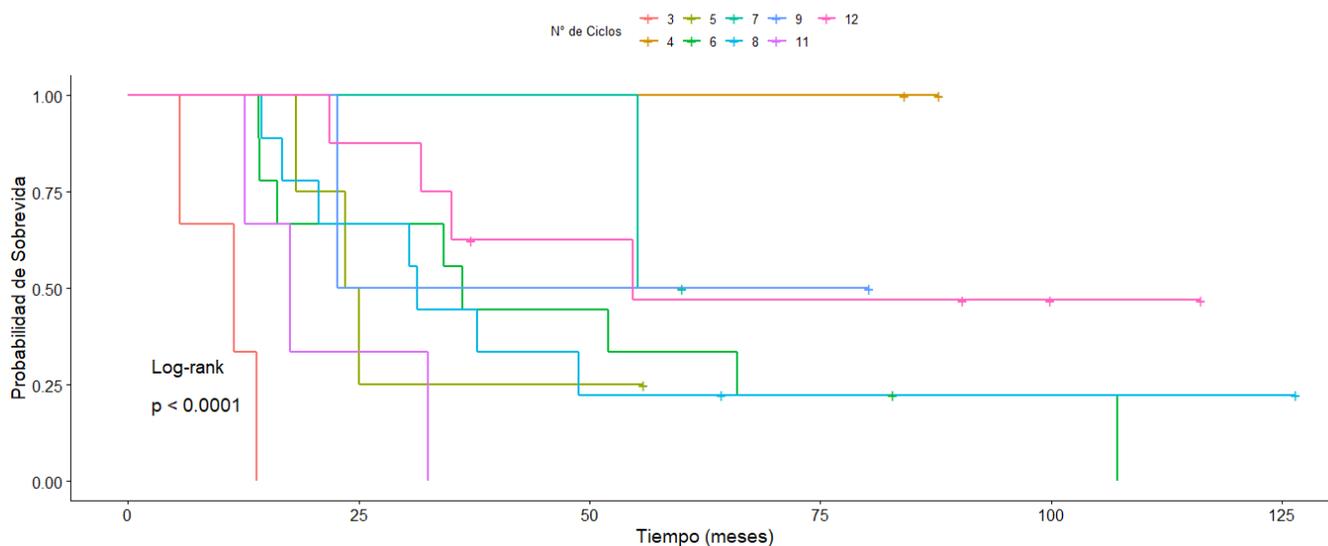


Figura 19. Curvas Kaplan-Meier para número de ciclos del tratamiento FOLFOX/XELOX. Cada curva representa a los grupos con los distintos números de ciclos completados.

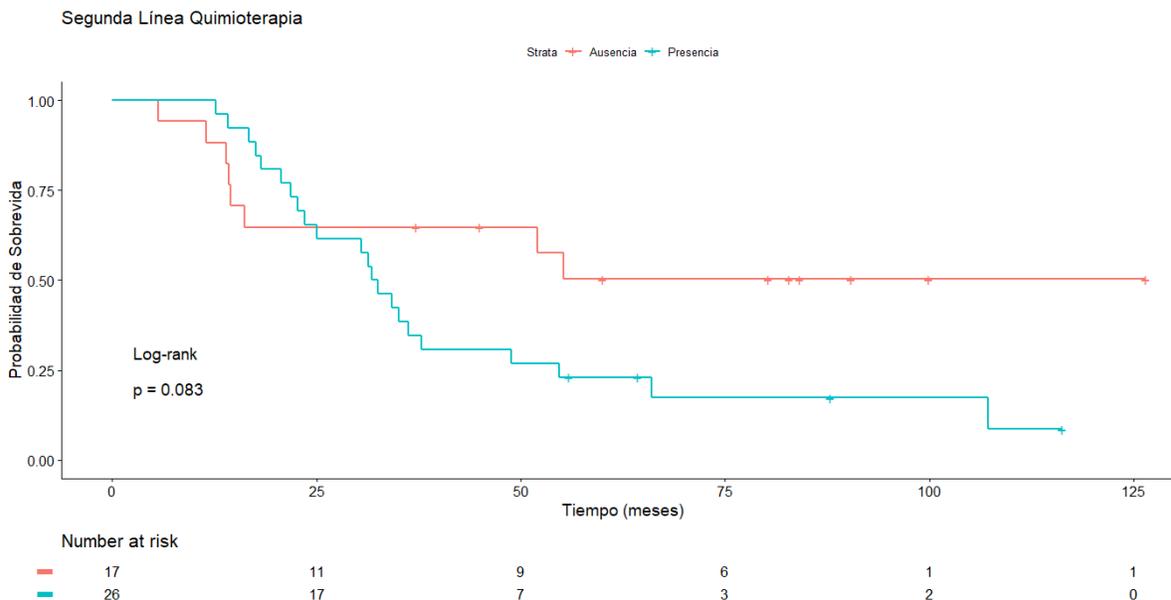


Figura 20. Curvas Kaplan-Meier para segunda línea de quimioterapia. Línea roja representa a los pacientes que no tuvieron una segunda línea de quimioterapia y la azul a los pacientes que si tuvieron una segunda línea de quimioterapia.

Tabla 5. Medianas de sobrevida de variables no genéticas.

Variable no genética	Mediana sobrevida (meses)
Metástasis hepática*	
Ausencia	107,2 meses
Presencia	32,1 meses
Otras metástasis	
Ausencia	30,5 meses
Presencia	48,8 meses
Modelo metástasis*	
Metástasis hepática	22,7 meses
Metástasis hepática más otro tipo de metástasis	35,5 meses
Otro tipo de metástasis	107,2 meses
Infiltración linfocitos distintos porcentajes	
10%	35,2 meses
20%	33,2 meses
30%	--
Ciclos completos esquema FOLFOX/CapeOX	
12 ciclos	54,7 meses
< 12 ciclos	31,9 meses
Segunda línea quimioterapia	
Ausencia	--
Presencia	32,4 meses

*Variables con *p-value* <0,05

-- = Grupo sin mediana de sobrevida

5.3.2 Variables genéticas

Se compararon de manera univariada las variables genéticas de *TYMS*, *DPYD* y *GSTP1*, mediante el uso de 4 modelos de herencia: dominante, recesivo, codominante y multiplicativo. En cada uno de los análisis se determinó las medianas de sobrevida asociada a cada curva.

Para la variante *TYMS 3'UTR 6bp ins-del* (rs151264360) como no se encontró el genotipo INS/INS, se compararon los genotipos INS/DEL y DEL/DEL con la sobrevida de los pacientes. Se observó que la presencia del genotipo DEL/DEL tiene una tendencia negativa con la sobrevida de los pacientes (Figura 21). Los pacientes con el genotipo DEL/DEL muestran una mediana de sobrevida de 31,1 meses, en cambio los que presentan el genotipo INS/DEL muestran una mediana de sobrevida de 66 meses (Tabla 6).

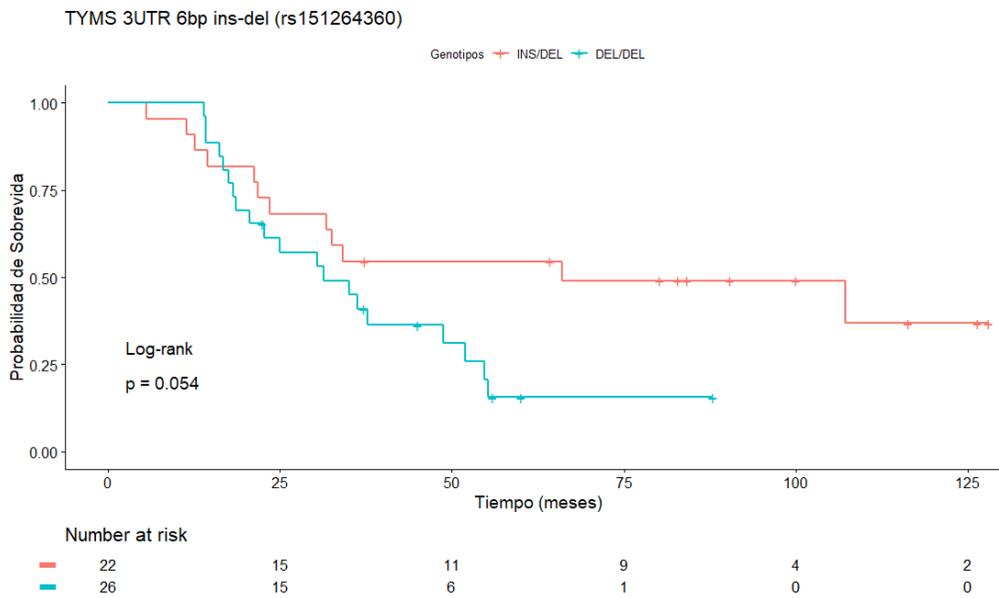


Figura 21. Curvas Kaplan-Meier para los genotipos de la variante *TYMS 3'UTR 6bp ins-del* (rs151264360). Línea roja corresponde a los pacientes con el genotipo INS/DEL y la línea azul a los pacientes con el genotipo DEL/DEL.

Para la variante *DPYD* c.85T>C (rs1801265), en nuestra cohorte de estudio se encontraron los tres genotipos (T/T, T/C, C/C), los cuales se analizaron usando los cuatro modelos de herencia con la sobrevida. Al analizar con la sobrevida se observó que la variante rs1801265 se ajusta de manera significativa al modelo de herencia dominante, en donde al presentar al menos un alelo C la sobrevida disminuye en comparación con aquellos que no tienen el alelo (Figura 22). Los pacientes con al menos un alelo C presentan una mediana de sobrevida de 25 meses, en cambio aquellos que presentan que no lo presentan tienen una mediana de sobrevida de 55,2 meses (Tabla 6)

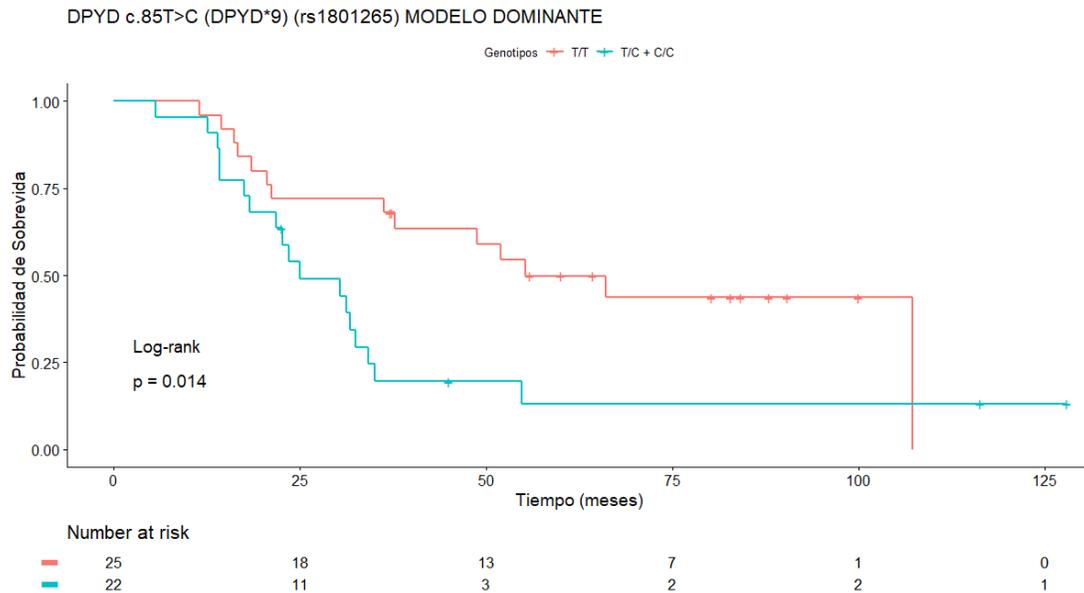


Figura 22. Curvas Kaplan-Meier para el modelo dominante de la variable *DPYD* c.85T>C (rs1801265). Línea roja corresponde a los pacientes que presentan el genotipo T/T y la línea azul a los pacientes con al menos un alelo C (genotipo T/C + C/C).

Finalmente, para la variante *GSTP1* c.313A>G (rs1695), en nuestra cohorte de estudio, se encontraron los tres genotipos (A/A, A/G, G/G), los cuales se analizaron usando los cuatro modelos de herencia con la sobrevida. Se observó que la variante rs1695 se ajusta de manera significativa con la sobrevida mediante el modelo multiplicativo, en donde el genotipo heterocigoto muestra una asociación negativa con la sobrevida (Figura 23) con una mediana de 27,7 meses, en cambio los genotipos A/A y G/G presentan una mediana de sobrevida de 66 meses (Tabla 6).

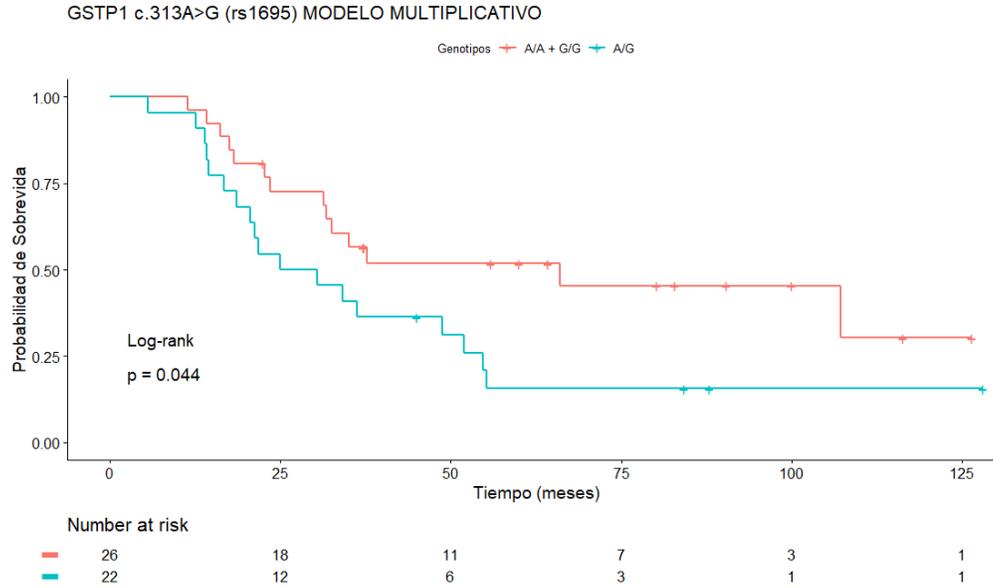


Figura 23. Curvas Kaplan-Meier para el modelo multiplicativo de la variante *GSTP1* c.313A>G (rs1695). Línea roja corresponde a los pacientes con los genotipos homocigotos A/A y G/G y la línea azul corresponde a los pacientes con genotipo A/G.

Tabla 6. Medianas de sobrevida de variables genéticas

Variable genética	Mediana (meses)
<i>TYMS</i> 3'UTR 6bp ins-del (rs151264360)	
INS/DEL	66 meses
DEL/DEL	31,1 meses
<i>GSTP1</i> rs1695 Modelo multiplicativo *	
A/A + G/G	66 meses
A/G	27,7 meses
<i>DPYD</i> c.85T>C Modelo dominante *	
T/T	55,2 meses
T/C + C/C	25 meses

*Variables con *p*-value <0,05

5.4 Análisis univariado para determinar la implicancia de cada variable con la sobrevida global mediante Regresión de Cox

Los análisis univariados de las variables anteriormente descritas, genéticas y no genéticas, se describen en la tabla 7. En relación con las variables no genéticas se observa que la metástasis hepática presenta un HR de 4,21, por lo que los pacientes que presentan metástasis hepática tienen una probabilidad de 4,21 veces de fallecer dentro de los 2 años de diagnosticar mCRC. Cuando se agrupan las metástasis se observa que los pacientes que tienen solo metástasis hepática tienen un HR de 3,90, el cual aumenta cuando el paciente tiene, además de metástasis hepática, otro foco metastásico a 4,6 veces. Por otra parte, en relación con las variables genéticas, se observa que la presencia del genotipo heterocigoto para la variable *GSTP1* c.313A>G (rs1695) presenta un HR de 2,03. De manera similar, el presentar el alelo C de la variable *DPYD* c.85T>C (rs1801265) aumenta la probabilidad de fallecer dentro de los 2 años de diagnosticar mCRC en 2,43 veces.

Tabla 7. Análisis univariado por Regresión de Cox

Variable	HR	IC 95%	p-value
TYMS 3'UTR 6bp INS-DEL			
INS/DEL	1,00	--	Ref
DEL/DEL	2,076	0,97 - 4,42	0,058
GSTP1 c.313A>G (rs1695) Modelo multiplicativo			
A/A + G/G	1,00	--	Ref
A/G	2,03	1,00 - 4,10	0,048
DPYD c.85T>C (rs1801265) Modelo dominante			
T/T	1,00	--	Ref
T/C + C/C	2,43	1,18 - 5,02	0,016
Porcentaje infiltración linfocitos			
10%	1,00	--	Ref
20%	0,59	0,31 - 1,12	0,108
30%	--	--	--
Metástasis hígado			
Ausencia	1,00	--	Ref
Presencia	4,21	1,24 - 14,28	0,021
Otra metástasis			
Ausencia	1,00	--	Ref
Presencia	0,41	0,15 - 1,09	0,075
Modelo metástasis			
Otro tipo de metástasis	1,00	--	Ref
Metástasis hepática	3,90	1,07 - 14,22	0,039
Metástasis hepática más otro tipo de metástasis	4,60	1,25 - 16,98	0,022
Ciclos completos esquema FOLFOX/CapeOX			
12 ciclos	1,00	--	Ref
<12 ciclos	2,14	0,74 - 6,14	0,158
Segunda línea quimioterapia			
Ausencia	1,00	--	Ref
Presencia	2,04	0,89 - 4,62	0,089

HR = Hazard Ratio

IC 95% = Intervalo de Confianza

Ref = Referencia para análisis estadístico

En negrita se destacan las variables con p-value < 0,05

5.5 Análisis multivariado para determinar la implicancia del conjunto de variables con la sobrevida global mediante un modelo de Regresión de Cox multivariado

Posterior a los análisis independientes de cada variable y su asociación con la sobrevida en esta cohorte de estudio, se procedió a analizar el conjunto de ellas y su asociación con la sobrevida global. Para esto se consideraron todas las variables que en el análisis univariado obtuvieron un *p-value* menor a 0,2. Se realizó, en primera instancia, el modelo de Regresión de Cox multivariado para variables genéticas (Tabla 8) y otro para variables no genéticas (Tabla 9). El modelo obtenido para variables genética nos muestra que la presencia del alelo C, ajustado por los genotipos DEL/DEL (rs151264360) y el genotipo A/G (rs1695), se asocia significativamente con la sobrevida global con un HR de 2,32. Este modelo muestra un R² de 0,19, es decir al analizar solo estas variables se puede explicar en un 19% la sobrevida global de los pacientes mCRC. De la misma manera, se analizó el modelo obtenido para variables no genéticas. Se observa que la metástasis, ajustada por las variables TILs 20%, por completar el esquema FOLFOX/CapeOX y por presentar segunda línea de quimioterapia, se asocia significativamente cuando se tiene metástasis hepática más otro tipo de metástasis. La metástasis hepática solo muestra una tendencia a la significancia. Este modelo muestra un R² de 0,32, es decir al analizar solamente estas variables se puede explicar en un 32% la sobrevida global de los pacientes mCRC.

Tabla 8. Análisis multivariado de Regresión de Cox para variables genéticas

Variable	HR	IC 95%	<i>p-value</i>	R ² Modelo
<i>TYMS</i> DEL/DEL	1,74	0,79 - 3,80	0,167	0,19 n=47, eventos= 32
<i>GSTP1</i> rs1695 A/G	1,48	0,71 - 3,06	0,293	
<i>DPYD</i> rs1801265 T/C + C/C	2,32	1,12 - 4,81	0,024	

HR = Hazard Ratio

IC 95% = Intervalo de Confianza

n = número de pacientes analizados

eventos = número de personas fallecidas dentro de los 2 años de seguimiento

*En negrita se destacan las variantes que presentan un *p-value* < 0,05*

Tabla 9. Análisis multivariado de Regresión de Cox para variables no genéticas

Variable	HR	IC 95%	p-value	R ² Modelo
Infiltración linfocitos 20%	0,64	0,31 - 1,32	0,223	0,32 n=34, eventos=32
Metástasis solo hígado	3,65	0,99 - 13,51	0,052 *	
Metástasis hígado + otra metástasis	4,98	1,27 - 19,53	0,021	
<12 ciclos esquema FOLFOX/XELOX	2,07	0,67 - 6,19	0,195	
Segunda línea quimioterapia	1,49	0,56 - 3,98	0,426	

HR = Hazard Ratio

IC 95% = Intervalo de Confianza

n = número de pacientes analizados

eventos = número de personas fallecidas dentro de los 2 años de seguimiento

En negrita se destacan las variantes que presentan un p-value < 0,05

*p-value < 0,1

Posterior a esto, se procedió a realizar un análisis multivariado “step by step”, en donde se probaron todas las posibles combinaciones de variables para determinar cuáles son las que explican mejor el modelo y con p-value significativo. Al realizar este análisis, no se logró obtener un modelo que incluyera solo variables significativas, por lo que se procedió a dejar el modelo con mejor R² y más variables significativas (Tabla 10), ya que sería el que mejor explicaría la sobrevida global de esta cohorte. Se observa que el presentar el alelo C de la variante rs1801265 tiene un HR de 6,97 y una asociación significativa con la sobrevida global. De la misma manera, se observa que tener menos de 12 ciclos de esquema FOLFOX/XELOX tiene un HR de 4,69 y una asociación significativa con la sobrevida global. Estos resultados se ajustan por las otras variables presentes en el modelo. El R² del modelo es de 0,51 lo que indicaría que al analizar este conjunto de variables se puede explicar en un 51% la sobrevida global de los pacientes mCRC.

Tabla 10. Análisis multivariado de Regresión de Cox con todas las variables con *p-value* < 0,2.

Variable	HR	IC 95%	<i>p-value</i>	R ² Modelo
TYMS DEL/DEL	1,25	0,44 - 3,60	0,673	0,51
GSTP1 rs1695 A/G	1,17	0,38 - 3,60	0,777	n= 33, eventos= 25
DPYD rs1801265 T/C + C/C	6,97	2,07 - 23,51	0,002	
Infiltración linfocitos 20%	0,66	0,27 - 1,65	0,378	
Mtt hígado	2,44	0,61 - 9,69	0,205	
Mtt hígado + otra	2,68	0,63 - 11,40	0,182	
<12 ciclos esquema FOLFOX/XELOX	4,69	1,32 - 16,68	0,017	
Segunda línea quimioterapia	0,71	0,22 - 2,25	0,559	

HR = Hazard Ratio

IC 95% = Intervalo de Confianza

n = número de pacientes analizados

eventos = número de personas fallecidas dentro de los 2 años de seguimiento

*En negrita se destacan las variantes que presentan un *p-value* < 0,05*

5.6 Recálculo de tamaño muestral con datos obtenidos en este estudio

De manera adicional, se realizó un recálculo del tamaño muestral con los datos obtenidos en el análisis multivariado con mejor R². Se usó en este recálculo la frecuencia del alelo C de la variante *DPYD* rs1801265 (0,28), el HR obtenido en el análisis multivariado (6,97) y la mediana de sobrevida de 25 meses. Todo esto con un poder estadístico de 80%, una significancia del 95% y una tasa de censura de 0,3. Como se observó en este estudio, muchos casos tenían datos faltantes, por lo que se debe mantener esa tasa de censura para el cálculo. Con estos datos se obtuvo el siguiente n muestral:

- Grupo expuesto (con la variante genética): 17
- Grupo no expuesto (sin la variante genética): 42
- Tamaño muestral total: 59

En nuestro estudio se logró reclutar a 51 pacientes, con los cuales se pudieron asociar algunas variables al *outcome* sobrevida. Posiblemente con el tamaño muestral correspondiente otras variables podrían haber sido incorporadas en el modelo multivariado.

5.7 Resultados adicionales: Análisis de pacientes mCRC de base de datos TCGA

De manera adicional, y como una forma de comparar la cohorte estudiada con otra cohorte con características similares, se analizó a pacientes con mCRC de la base de datos TCGA. En este estudio se seleccionaron 115 pacientes con CRC etapa III y IV. Se realizó un análisis univariado y multivariado de regresión de Cox para sobrevida a 5 años considerando la expresión génica de *TYMS*, *GSTP1*, *DPYD*, *KRAS* y *BRAF*, y la de marcadores pronósticos inmunes: *FOXP3*, *PTPRC*, *MAL*, *CD3E*, *CD3D*, *CD3G*, *PDCD1* y *CD274*, e incorporando variables clínicas. Todos los datos de expresión se obtuvieron por RNAseq.

El análisis multivariado indicó que una baja expresión de *TYMS* y *GSTP1* (HR=2,5, 95%IC=1.0–5.9, $p<0,042$ y HR=4,3, 95%IC=1,7–10,9, $p<0,002$, respectivamente), en conjunto con una alta expresión de *KRAS* y *CD274* (HR=2,9, 95% IC=1,3–6,5, $p<0,008$ y HR=4,5, 95%IC=1,3–15,4, $p<0,16$, respectivamente) se asocian a una menor sobrevida. Adicionalmente, etapa IV de la enfermedad y la adición de quimioterapia post-operatoria (HR=2,5, 95%IC=1,4–5,6, $p<0,21$ y HR=0,3, 95%IC=0,1-0,6, $p<0,001$, respectivamente), muestran ser factores de riesgo y protección, respectivamente. Como conclusión de este análisis *in silico* se observó que la disminución de la expresión en *TYMS* y *GSTP1*, el aumento de la expresión de *KRAS* y *CD274*, la ausencia de quimioterapia post-operatoria y la presencia de etapa IV se asocian con una disminución de la sobrevida en pacientes con CRC.

Este estudio se realizó de manera previa al estudio con la cohorte estudiada en esta tesis, para determinar que las enzimas propuestas pueden estar involucradas en otras cohortes similares. Se observó la expresión génica de estas enzimas, ya que es una manera de asimilar el efecto de las variables polimórficas en ellas.

6. DISCUSIÓN

En la presente tesis, a diferencia de otros estudios de asociación, se buscó demostrar la implicancia de múltiples variables, tanto genéticas como no genéticas, en la sobrevida global de pacientes mCRC para visualizar de manera más completa la respuesta clínica que pueden presentar estos pacientes al tratamiento con esquema FOLFOX/CapeOX, para finalmente lograr un modelo predictivo que permita, a futuro, personalizar el tratamiento mejorando la calidad de vida de los pacientes.

6.1 Asociación univariada de variables genéticas y no genéticas con la sobrevida.

En este estudio, se buscó la asociación de diferentes variables, genéticas y no genéticas, con la sobrevida global. Dentro de las no genéticas, se analizaron distintas variables clínicas, tales como localización del tumor primario, edad de diagnóstico, sexo, tipo de metástasis, TILs, completar el esquema de primera línea y presentar segunda línea de quimioterapia. Por otra parte, el estudio de variables genéticas se enfocó en el blanco terapéutico de 5-FU y las principales enzimas biotransformadoras de 5-FU y Oxaliplatino.

Para determinar la asociación del tumor primario con la sobrevida global se realizaron dos análisis. En el primero se realizaron tres grupos: RCC (Colon ascendente y transversal), LCC (Colon descendente y sigmoide) y Recto. El segundo que se realizó fue con dos grupos, en donde los tumores de recto se incluyeron a los LCC. En estos análisis de la localización del tumor primario no se observó ninguna asociación significativa con la sobrevida de los pacientes (ANEXO VI). Se esperaba encontrar una asociación similar a la observada en otros estudios, en donde se ha determinado que los pacientes RCC tienen una asociación significativamente negativa con la sobrevida global, con distinto HR dependiendo de la población estudiada (HR = 1,22 - 6,20) (Buisman, F., *et al.*, 2019). El estudio que ha determinado el HR de 6,20 se realizó con un tamaño muestral de 102 pacientes, en donde la relación de RCC con LCC fue de 1:1, por lo que posiblemente la asociación buscada en esta tesis no se logró por tamaño muestral. La otra asociación que se logró realizar fue con el tamaño del tumor, en donde se observó que tumores RCC mayores de 3 cm se asocian negativamente con la sobrevida global con un HR de 3,9 (Gu, Y., *et al.*, 2018), por lo que es interesante a futuro incorporar esta variable para ver su implicancia con la sobrevida en pacientes chilenos.

El análisis de asociación de las variables edad de diagnóstico y sexo tampoco mostró asociación significativa en la cohorte mCRC estudiada. Se ha observado en diferentes estudios que existen diferencias entre los tumores de los hombres y de las mujeres. En estadios tempranos de CRC los hombres presentan menos tumores con mutación en KRAS que las mujeres y que mientras aumenta el estadio, el número de mutaciones KRAS en hombres aumenta (Breivik, J., *et al.*, 1994), esto nos lleva a pensar que los tumores esporádicos tienen vías distintas de mutaciones dependiendo del sexo del paciente. Por otra parte, se ha observado que las mujeres con tumores en RCC muestran un subtipo distinto de la enfermedad (Shin, J., *et al.*, 2019). También se ha observado que mujeres con tumores en estadio III ubicados en RCC se asocian a una mayor recurrencia, por lo que se sugiere que se debe vigilar de manera más cercana y tratar más agresivamente este tipo de cáncer (Park, J., *et al.*, 2018). Adicional a esto, se ha determinado que este tipo de tumores presentan una expresión diferencial de genes a los LCC de mujeres y que esta expresión diferencial no se observa entre hombres RCC con LCC (Sun, Y., *et al.*, 2019). Al no encontrar asociación en nuestra cohorte de estudio, creemos que el aumentar el número de mujeres con RCC podría conducir a una asociación significativa con la sobrevida.

En relación con la metástasis solo se observó que la metástasis hepática se asocia significativamente con la sobrevida de los pacientes mCRC (ANEXO VI). La presencia de metástasis hepática tiene una asociación negativa con HR = 4,21 y una mediana de sobrevida de 32,1 meses a diferencia de la ausencia de metástasis que presenta una mediana de sobrevida de 107,2 meses. Diversos estudios han mostrado que tanto la metástasis hepática como la pulmonar podrían estar asociadas negativamente con la progresión del CRC. El año 2019 se propuso la construcción de un modelo predictivo de sobrevida en donde se incluyeron 13 variables relacionadas, dentro de esas variables se determinó que la metástasis hepática en conjunto con la pulmonar se asocia negativamente con la sobrevida cuando están presentes. Esta cohorte incluyó a 20.000 pacientes aproximadamente y generó un nomograma predictor de sobrevida global (Ge, H., *et al.*, 2019). En nuestra cohorte, se observó una tendencia a la asociación positiva con la sobrevida la presencia de otro tipo de metástasis. Como la mayoría de los pacientes no presentan un solo tipo de metástasis se planteó generar un modelo de asociación de metástasis, en donde se observó que presentar sólo metástasis hepática se asocia negativamente con la sobrevida (HR = 3,9), y que aumenta el HR cuando se incorpora otro foco metastásico, tal como el pulmón, hasta un HR de 4,6. Esto nos sugiere que cuando un paciente presenta metástasis, se le debe considerar la cantidad de órganos con metástasis, ya que mientras más órganos afectados peor es la progresión del paciente.

De la misma manera se analizó el tratamiento, en primera y segunda línea, y su asociación la sobrevida de los pacientes mCRC. No se pudo analizar el número de ciclos de esquema FOLFOX/CapeOX administrados a los pacientes y su asociación con la sobrevida, ya que el número de pacientes por ciclos fue bastante pequeño, lo que nos disminuye el poder estadístico de análisis. Frente a esto se analizó el concepto de completar o no el tratamiento en primera línea. El esquema FOLFOX/CapeOX se administra durante 12 ciclos, por lo que se agrupó en aquellos pacientes que cumplieron con los 12 ciclos y en aquellos que no. Este análisis no mostró una asociación significativa con la sobrevida de manera univariada pero si se incorporó a los análisis multivariados, ya que obtuvo un *p-value* menor a 0,2. Adicionalmente, se analizó a los pacientes que tuvieron o no segunda línea de quimioterapia. Este análisis mostró una tendencia negativa a la asociación cuando a los pacientes se les administraba una segunda línea de quimioterapia. Un meta-análisis mostró que en pacientes mCRC no se otorga mayor beneficio, en relación con sobrevida global, en mantener una quimioterapia citotóxica comparado con solo observación de los pacientes, en cambio sí muestra un beneficio en relación a la progresión libre de enfermedad. Esta última muestra un mayor aumento cuando se otorga un tratamiento con 5-FU más bevacizumab (Sonbol, M., *et al.*, 2019). Por otra parte, un estudio clínico analizó si el régimen de 12 ciclos, que se entrega durante 6 meses, puede ser disminuido para aminorar los efectos adversos sin afectar la eficacia del tratamiento. En este estudio se determinó que tres meses de FOLFOX/CapeOX genera el mismo efecto que 6 meses. Este hallazgo puede mejorar la calidad de vida del paciente y disminuir costos de tratamiento (Ivesson, T., *et al.*, 2019). Por otra parte, la principal segunda línea de quimioterapia es FOLFIRI, la cual conlleva una gran cantidad de efectos adversos, que conduce a cambio de tratamiento (MINSAL, 2013). Otros estudios han incorporado otro tipo de moléculas tales como anticuerpos monoclonales como otra opción de tratamiento de segunda línea. Se ha observado que al incorporar aflibercept aumenta la sobrevida global y la progresión libre de enfermedad frente a aquellos que recibieron FOLFIRI con o sin bevacizumab. Con estos resultados, los autores sugieren que aflibercept podría ser una alternativa para pacientes con enfermedad quimiorrefractaria (Auray, M., *et al.*, 2019). Estos estudios nos otorgan nuevas herramientas frente al tratamiento de los pacientes y como mejorar la calidad de vida. Ya se sabe que FOLFOX/CapeOX o FOLFIRI son efectivos en cierto porcentaje, pero conllevan una gran cantidad de efectos adversos, por lo que disminuir el tiempo de administración o incorporar tratamientos con anticuerpos monoclonales, tales como bevacizumab o aflibercept, cuando corresponda, podrían mejorar la eficacia y la seguridad del tratamiento del cáncer CRC.

En relación con los porcentajes de infiltración de linfocitos T no se observó influencia en la sobrevida global de los pacientes mCRC. Este grupo de estudio al ser metastásico posee un bajo porcentaje de infiltración de linfocitos T. Se han realizado estudios de TILs en pacientes CRC con estadio II y III, en donde se asoció de manera significativa el efecto de ellas. Los grupos con una alta infiltración (más de un 70% muestran una mejor prognosis de la enfermedad, a diferencia de aquellos con baja infiltración (Iseki, Y., et al., 2018). Esto es un factor importante para considerar, ya que nuestro grupo de estudio presentaba un porcentaje de infiltración de un 30% como máximo, por lo que posiblemente por esto no se logró determinar una asociación. Es por esto por lo que se debe incorporar el análisis de las subpoblaciones presentes de linfocitos T. Al respecto, variados estudios han demostrado que pacientes con mayor cantidad de subpoblaciones de CD8+, Treg y CD45RO se asocian positivamente con la sobrevida de pacientes CRC (Kong, J., et al., 2019). Otros estudios han determinado que presentar Treg se asocia con CRC dependiendo del estadio estudiado (Mahalingam, J., et al., 2014; Sun, X., et al., 2017). Estos estudios, indican que no sólo se debe estimar el porcentaje de TILs, sino que también que subpoblaciones se asocian están infiltrando.

En relación con las variables genéticas, éstas se analizaron mediante distintos modelos de herencia (ANEXO VI) con la sobrevida global. Para la variable *TYMS 3'UTR 6bp ins-del* (rs151264360) como no se encontraron pacientes con el genotipo INS/INS se analizó solamente la implicancia de presentar un alelo con la delección 6bp (INS/DEL) o presentar ambos alelos con la delección (DEL/DEL). Este análisis muestra una tendencia a una asociación negativa del genotipo DEL/DEL (HR = 2,076, *p-value* = 0,058). Posiblemente si aumentamos el tamaño muestral de la cohorte podremos encontrar una asociación significativa. Estudios describen que los niveles de expresión de la proteína TS pueden ser un marcador pronóstico de tratamiento, por lo que analizar la variante rs151264360 puede ser una manera indirecta de determinar la expresión de TS. Cuando la inserción de 6bp se encuentra presente se observa un aumento en la estabilidad del ARNm de *TYMS*, por contrario cuando se encuentran delecionados los 6bp el ARNm de *TYMS* baja su estabilidad, por ende, se degrada más fácil (Panczyk, M., 2014). Leichman y asociados, en el año 1995 determinaron que en pacientes CRC existe una relación inversamente proporcional entre la expresión intratumoral de TS con el grado de respuesta a la terapia con 5-FU. Se observó que pacientes con baja expresión de TS tienen un alto rango de respuesta al tratamiento con 5-FU y una mayor mediana de sobrevida (Leichman, L., et al., 1995). En este mismo sentido, se realizó un meta-análisis de 13 estudios clínicos con pacientes mCRC, en donde se observó el mismo fenómeno descrito por Leichman (Popat, S., et al., 2004). Un meta-análisis reciente mostró que los pacientes con baja expresión de *TYMS* muestran

una mejor respuesta a tratamiento con 5-FU (Qiu, L., *et al.*, 2008). Frente a estos resultados, podemos pensar que si nuestra cohorte mCRC aumenta en tamaño será posible encontrar la asociación de la variante con la sobrevida global. Sin embargo, se debe considerar a futuro analizar otras variantes descritas para *TYMS* relacionadas con su estabilidad, tales como el VNTR TSER*3G>C (rs45445694, rs34743033) (Panczyk, M., 2014). Finalmente, en los últimos años se ha analizado la implicancia de la variante *TYMS* con otras tales BRAF y KRAS (Ntavatzikos, A., *et al.*, 2019) o con enzimas relacionadas con la reparación del ADN, tales como *ERCC1* (Jiang, H., *et al.*, 2019). En estos estudios se han mostrado una nueva perspectiva, ya que podría ser posible predecir la respuesta terapéutica, en relación con la sobrevida global, con más de una variable genética, quizás no relacionadas entre sí.

Dentro de las variables analizadas de *DPYD* sólo se pudo analizar la variante *DPYD* c.85T>C (rs1801265) por las frecuencias determinadas en esta población. Esta variable se analizó mediante 4 modelos de herencia: Codominante, dominante, recesivo y multiplicativo. Los modelos que no dieron asociación significativa fueron el recesivo y el multiplicativo, en cambio los modelos codominante y dominante mostraron una asociación con la sobrevida global. Se observó que el modelo con una mejor asociación es el dominante, esto quiere decir que los pacientes mCRC que presenten el alelo C, como homocigoto C/C o heterocigoto T/C, presentan una peor prognosis (HR = 2,43 - IC 95% = 1,176-5,016 - *p-value* = 0,016), es decir los pacientes presentan un decrecimiento de la expresión de la enzima DPD y esto se asocia, posiblemente, a una peor respuesta al tratamiento. La deficiencia de la enzima DPD se describió por primera vez en una enfermedad autosómica recesiva, en donde se observaba una acumulación de uracilo y timina en la orina (Bakkeren, J., *et al.*, 1984). Existen hasta la fecha más de 1500 polimorfismos de DPD relacionados con la actividad y transcripción de esta proteína. Frente a tratamientos con 5-FU o capecitabina, los pacientes con baja actividad de DPD incrementan el riesgo de presentar eventos fatales en relación con efectos tóxicos al usar la dosis estándar de 5-FU (Ciccolini, J., *et al.*, 2006). Muchos estudios han relacionado las variantes de DPD con los efectos adversos de 5-FU, pero los últimos años esta enzima ha sido foco en relación con la eficacia del tratamiento y a la sobrevida de los pacientes. En un estudio se observó que el genotipo C/C de la variante *DPYD* c.85T>C podría ser asociado con la sobrevida libre de enfermedad de los pacientes CRC tratados con esquemas basados en 5-FU (Yousef, A., *et al.*, 2018). Un estudio realizado en pacientes CRC de la India, mostró que una baja expresión de DPD en el tumor puede relacionarse con una baja sobrevida (Gajjar, K., *et al.*, 2018). Interesantemente, en este estudio se observó la asociación de las enzimas DPD y TS como un posible modelo predictivo de la sobrevida de los pacientes CRC. De manera similar, otro estudio asoció el efecto combinatorio del análisis

de la expresión de TS y DPD con la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global en pacientes CRC con tratamiento basado en 5-FU (Afzal, S., *et al.*, 2011). Por otra parte, estudios de las variantes genéticas de *DPYD*, específicamente de las *DPYD* IVS14+1G>A y c.2846A>T, han asociado dichas variantes con la seguridad del tratamiento con 5-FU, en donde se observa que si están presentes los alelos de riesgo se debe disminuir la dosis para bajar el riesgo de toxicidad (Deenen, M., *et al.*, 2011). Estas variantes, se asocian a una baja expresión de DPD, al igual que c.85T>C, por lo que la determinación de ellas podría ser usada como una asociación indirecta de la expresión en el tumor, por ende, su efecto tanto en la eficacia como en la seguridad del tratamiento, así como en la sobrevida global del paciente.

Finalmente, la variante *GSTP1* c.313A>G se analizó de igual manera por los cuatro modelos de herencia. Se determinó que mediante el modelo multiplicativo el heterocigoto A/G se asocia negativamente con la sobrevida global de los pacientes. Según literatura, la sustitución Ile105Val, generada por el cambio de A por C, en la posición 313, disminuye la activación electrofílica del sitio activo de la enzima, causando un impedimento estérico que cambia el sitio de unión del sustrato, lo que finalmente disminuye la actividad enzimática de *GSTP1* (Panczyk, M., 2014). Es importante aclarar que la enzima *GSTP* posee dos sitios, el sitio G y H. El sitio G (del aminoácido 1 al 81) es el encargado de la acción catalítica sobre el glutatión y el sitio H (81 al 210) es el que promueve la acción catalítica de G, por ende, el polimorfismo Ile105Val no afecta directamente al sitio activo de la enzima (Dong, S., *et al.*, 2018). Frente a esto, se esperaba que el genotipo G/G se asociará directamente con la sobrevida de los pacientes. Se han mostrado en algunos estudios clínicos la influencia del polimorfismo en reacciones adversas a tratamientos con Oxaliplatino en pacientes con mCRC (McLeod, H., *et al.*, 2010; Ruzzo, A., *et al.*, 2007). Como el genotipo G/G se relaciona con una disminución de la actividad catabólica de *GSTP1* a diferencia del A/A, puede asociarse a una mayor acumulación de Oxaliplatino en la célula, lo cual se puede asociar a mayor neurotoxicidad (Ruzzo, A., *et al.*, 2007). Esta asociación nos lleva a pensar qué si hay más fármaco acumulado, debería observarse mayor efecto citotóxico, por ende, aumentar la sobrevida. Se ha descrito que este polimorfismo puede aumentar la quimiosensibilidad de las células tumorales (Panczyk, M., 2014). Interesantemente, algunos estudios han mostrado una asociación entre los polimorfismos de distintas GST. Se determinó que la asociación entre *GSTT1* no nulo/*GSTM1* nulo/*GSTP1* Ile/Val se asocian con un aumento en el riesgo de CRC esporádico y en la progresión tumoral (Wang, J., *et al.*, 2011; Rodrigues-Fleming, G., *et al.*, 2018). Todos estos estudios han determinado la presencia de una de las variantes con efecto en la función activa de *GSTP1*, pero se ha descrito que existen al menos dos y se comportan como haplotipo, es decir dependiendo de la combinación es el efecto que se

observa (Dong, S., *et al.*, 2018). La otra variable que se ha incluido en los haplotipos es el cambio de alanina por valina en la posición 114 (Ala114Val). Con estas dos variables se han descrito los siguientes haplotipos: GSTP1*A (Ile105 + Ala114), GSTP1*B (Val105 + Ala114), GSTP1*C (Val105 + Val114), and GSTP1*D (Ile105 + Val114) (Harris, M., *et al.*, 1998). Por lo que como en este estudio sólo se determinó una de las variantes, sin saber realmente cual es el haplotipo relacionado con la sobrevida global de los pacientes.

Por otra parte, como bien se ha descrito, las enzimas GST es una gran familia de enzimas con un rol fundamental en la desintoxicación celular. Mantienen una homeostasis redox global, determinando el balance entre reacciones de reducción y oxidación y participando de numerosas cascadas de señalización, tales como proliferación, respuesta inflamatoria, apoptosis, senescencia, entre otras (Tew, K. y D. Townsend, 2012). Frente a esto, es de esperar que sean abundantes en todas las células. El factor de transcripción nuclear Nrf2 es el encargado de regular la transcripción de las GST. En los últimos años, se ha observado una implicancia de este factor en la tumorigénesis. Se ha observado que pacientes con mutaciones en KRAS y BRAF muestran un aumento del estado basal de Nrf2. Esto se puede asociar de manera indirecta con la cantidad de GSTs en la célula (DeNicola, G., *et al.*, 2011). Por otra parte, GSTP puede interactuar con las proteínas JNK, las cuales están relacionadas con apoptosis/proliferación (Tew, K. y D. Townsend, 2012). El C-terminal de GSTP1 (residuos 194 hasta 201) es el dominio de unión, por ende, inactivación, de JNK (Okumura, T., *et al.*, 2015). La baja actividad de JNK es mantenida como una consecuencia del secuestro que realiza GSTP1 de la proteína. Posterior a un aumento de ROS o de una droga, tal como Oxaliplatino, el complejo es disociado y JNK puede ejercer su acción (Tew, K. y D. Townsend, 2012). Se han estudiado los distintos haplotipos de GSTP1 con la función de JNK y su efecto en apoptosis o proliferación. Se determinó que el haplotipo GSTP1*A reduce la proliferación celular y protege contra la apoptosis a través de un mecanismo independiente de JNK. En contraste, el haplotipo GSTP1*C no influye en la proliferación, pero protege a las células de la apoptosis mediante el mecanismo de JNK (Holley, S., *et al.*, 2007). Esto es relevante para futuros estudios, ya que como se ha descrito, posiblemente la relación con la eficacia y sobrevida de los pacientes con cáncer tratados con derivados de platinos se vea mejor descrito por el análisis de los haplotipos que por una variante sola.

6.2 Asociación multivariada de variables genéticas y no genéticas con la sobrevida.

Se realizaron diferentes combinaciones de las variables analizadas con un *p-value* menor a 0,2 para determinar la mejor asociación de las variables. Los parámetros considerados para esto es la significancia estadística y el R^2 de los modelos. Por la falta de datos de los pacientes el tamaño final de este análisis fue de 35 pacientes, en donde sólo 25 presentaban el *outcome* muerte. No se logró un modelo con todas las variantes con *p-value* significativo, sino que sólo dos de las variables tienen significancia: el alelo C de la variante *DPYD* c.85T>C y completar los 12 ciclos del esquema FOLFOX/CapeOX. El alelo C de la variante *DPYD* c.85T>C en todos los modelos propuestos mantuvo su significancia, en cambio el completar los 12 ciclos del esquema FOLFOX/CapeOX sólo presentó significancia cuando se incorporaron el resto de las variables. Estos resultados nos indican que la sobrevida global se puede predecir mediante un conjunto de variables, tanto genéticas como no genética. Varios estudios multivariados han mostrado distintas asociaciones entre variables no genéticas como el estudio de Ge, H., *et al.* (2019) en donde se diseñó un normograma predictivo de la sobrevida global de pacientes CRC. Se incluyeron distintas variables, tales como sexo, edad, tipo de metástasis, tamaño tumor primario, entre otros. Otros estudios, asocian solo variables genéticas, como el estudio de Stoehlmacher, J., *et al.* (2004), en donde se asocian ciertas variables genéticas de enzimas GST, TS, XPD, entre otras. Mediante esta asociación, el grupo generó un modelo de predicción de la sobrevida global.

Finalmente, en este estudio se buscó determinar la implicancia de variantes genéticas y no genéticas, tanto individualmente como agrupadas, como factores predictores de la sobrevida global de pacientes mCRC. Se logró reclutar a 52 pacientes, en donde se observó una asociación significativa con la sobrevida de los pacientes la presencia de metástasis hepática, el alelo C de la variante *DPYD* c.85T>C y el genotipo heterocigoto A/G de la variante *GSTP1* c.313A>G. Estas variantes, de manera individual, muestran una implicancia con la eficacia del tratamiento FOLFOX/CapeOX a través de su asociación con la sobrevida. Por otra parte, se observó que, al agrupar ciertas variables genéticas y no genética, se puede explicar en un 51% la respuesta al esquema terapéutico. Este análisis solo mostró dos variables significativas, por lo que se espera que al tener una cohorte más grande será posible lograr una significancia estadística de las variables correspondientes. Las principales limitaciones que se observaron en este estudio fueron el bajo número de centros incluidos, el reclutamiento de pacientes, la recuperación de las muestras FFPE desde los servicios de anatomía patológica, la falta de datos desde fichas clínicas y la falta de información con relación a la causa de muerte de los pacientes. Como proyección del proyecto

se espera lograr un modelo predictivo de supervivencia global de pacientes mCRC al aumentar el número de pacientes y al incorporar otras variables, tales como el haplotipo de *GSTP1* o las subpoblaciones de TILs. Por otra parte, se espera que este estudio tenga un acercamiento a un posible uso clínico, posterior a una validación de los modelos obtenidos, en donde nos permita elegir de mejor tratamiento para cada paciente.

En Chile, el diagnóstico de CRC se realiza únicamente mediante anatomía patológica e imagenología, con lo cual se puede llegar a etapificar este cáncer y determinar el mejor tratamiento, según los protocolos establecidos por el Ministerio de Salud. Este diagnóstico es realizado de manera observacional, por lo que depende mucho del clínico que realice el diagnóstico. En etapa metastásica el tratamiento a seguir es quimioterapia basada en 5-FU en conjunto con otro citotóxico que permite una mejora en la respuesta terapéutica del paciente. Estos esquemas se evalúan a través de criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*), analizando el tamaño del tumor y los sitios metastásicos mediante imágenes. Esta determinación, al igual que la anterior depende del clínico que realice la determinación. Los biomarcadores moleculares evaluados en esta tesis, en un futuro y posterior a un estudio de validación, podrían ser utilizados en conjunto con la determinación por anatomía patológica e imagenología, permitiendo tener una predicción de la respuesta clínica antes o durante el tratamiento de quimioterapia FOLFOX/CapeOX, incluso se podría modificar los algoritmos terapéuticos permitiendo la selección de pacientes a medicamentos de alto costo, como anticuerpos monoclonales o inmunoterapia.

Sin duda, este tipo de estudios pueden mejorar el tratamiento de los pacientes mediante la predicción de una respuesta clínica, relacionada con la eficacia terapéutica o con la supervivencia global, en pacientes con tratamientos farmacológicos. A futuro, nos pueden otorgar una visión más personalizada de cada paciente, permitiéndonos mejorar su calidad de vida mediante un tratamiento adecuado para él y no para la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

1. Respecto a las variables no genéticas, se estableció una asociación de manera univariada entre la metástasis hepática con una menor sobrevida en pacientes mCRC. Al realizar un modelo con todos los focos metastásicos se determinó que el presentar otro foco metastásico en conjunto con la metástasis hepática disminuye aún más la sobrevida de pacientes mCR
2. El alelo C de la variante *DPYD* c.85T>C (rs1801265) y el genotipo heterocigoto A/G de la variante *GSTP1* c.313A>G (rs1695), se asocian con la disminución de la sobrevida de los pacientes mCRC.
3. En relación con el modelo multivariado, se observó que las variantes DEL/DEL de *TYMS*, *GSTP1* rs1695 A/G, el alelo C de la variante *DPYD* c.85T>C (rs1801265) en conjunto con infiltración TILs 20%, Metástasis hepática más otro foco metastásico, no completar los 12 ciclos esquema FOLFOX/CapeOX y tener segunda línea de quimioterapia, pueden explicar la sobrevida de los pacientes mCRC en un 51%. En este estudio sólo se logró la significancia con las variantes alelo C de la variante *DPYD* c.85T>C y no completar los 12 ciclos esquema FOLFOX/CapeOX.
4. Finalmente, este estudio logró asociar variables genéticas y no genéticas con la sobrevida de los pacientes mCRC, mostrando la implicancia de estas de manera independiente y asociadas entre sí, lo que constituye una primera aproximación a modelos predictivos de sobrevida en mCRC.

8. REFERENCIAS

- Afzal S, Gusella M, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Andersen JT, Brødbæk K, Petersen M, Jimenez-Solem E, Adleff V, Budai B, Hitre E, Láng I, Orosz E, Bertolaso L, Barile C, Padrini R, Kralovánszky J, Pasini F, Poulsen HE. The association of polymorphisms in 5-fluorouracil metabolism genes with outcome in adjuvant treatment of colorectal cancer. *Pharmacogenomics*. 2011 Sep;12(9):1257-67. doi: 10.2217/pgs.11.83.
- Aghagolzadeh P, Radpour R. New Trends in Molecular and Cellular Biomarker Discovery for Colorectal Cancer. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(25): 5678-5693.
- American cancer society. What Are the Survival Rates for Colorectal Cancer, by Stage? January 21, 2018. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html#references>. Accessed December 03, 2019
- An N, Yang X, Cheng S, Wang G, Zhang K. Developmental genes significantly afflicted by aberrant promoter methylation and somatic mutation predict overall survival of late-stage colorectal cancer. *Sci Rep*. 2015; 5: 18616
- Arvelo F, Sojo F and Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalsecience*. 2015; 9: 520. doi: 10.3332/ecancer.2015.520
- Bakkeren JA, De Abreu RA, Sengers RC, Gabreëls FJ, Maas JM, Renier WO. Elevated urine, blood and cerebrospinal fluid levels of uracil and thymine in a child with dihydrothymine dehydrogenase deficiency. *Clin Chim Acta*. 1984 Jul 31;140(3):247-56.
- Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO, Gaudernack G. K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br J Cancer*. 1994;69:367–371. doi: 10.1038/bjc.1994.67
- Buisman FE, Galjart B, Buettner S, Groot Koerkamp B, Grünhagen DJ, Verhoef C. Primary tumor location and the prognosis of patients after local treatment of colorectal liver metastases: a systematic review and meta-analysis. *HPB (Oxford)*. 2019 Oct 24. pii: S1365-182X (19)30734-8. doi: 10.1016/j.hpb.2019.10.003. [Epub ahead of print]
- Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):119-30. doi: 10.1038/nri2916.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-337.
- Ciccolini J, Mercier C, Evrard A, Dahan L, Boyer JC, Duffaud F, Richard K, Blanquicett C, Milano G, Blesius A, Durand A, Seitz JF, Favre R, Lacarelle B. A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. *Ther Drug Monit*. 2006 Oct; 28(5):678-85.
- Claudle K, Thorn C, Klein T, McLeod H, Diasio R, Schwab M. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2013; 94(6): 640-5.

- Correale P, Rotundo MS, Del Vecchio MT, Remondo C, Migali C, Ginanneschi C, Tsang KY, Licchetta A, Mannucci S, Loiacono L, Tassone P, Francini G, Tagliaferri P. Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *J Immunother.* 2010 May;33(4):435-41. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181d32f01.
- Deenen MJ, Tol J, Burylo AM, Doodeman VD, de Boer A, Vincent A, Guchelaar HJ, Smits PH, Beijnen JH, Punt CJ, Schellens JH, Cats A. Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in DPYD and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 May 15;17(10):3455-68. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2209. Epub 2011 Apr 15.
- DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, Yu KH, Yeo CJ, Calhoun ES, Scrimieri F, Winter JM, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Kern SE, Blair IA, Tuveson DA. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature.* 2011 Jul 6;475(7354):106-9. doi: 10.1038/nature10189.
- Deschoolmeester V, Baay M, Lardon F, Pauwels P, and Peeters M. Immune Cells in Colorectal Cancer: Prognostic Relevance and Role of MSI. *Cancer Microenviron.* 2011 Dec; 4(3): 377–392 (PARA DISCUSIÓN)
- Deschoolmeester V, Baay M, Lardon F, Pauwels P, Peeter M. Immune cells in colorectal cancer: Prognostic relevance and role of MSI. *Cancer Microenviron.* 2011; 4(3): 377-92.
- Di Caro G, Marchesi F, Laghi L, Grizzi F. Immune cells: Plastic players along colorectal cancer progression. *J Cell Mol Med.* 2013; 17(9): 1088-95.
- Dong S, Sha H, Xu X, Hu T, Lou R, Li H, Wu J, Chen Dan C, and Feng J. Glutathione S-transferase π : a potential role in antitumor therapy. *Drug Des Devel Ther.* 2018; 12: 3535–3547.
- Dotor E, Cuatrecasas M, Martinez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guinó E, Pareja L, Figueras A, Mollevi D, Serrano T, de Oca J, Peinado M, Moreno V, Germá J, Capella G, Villanueva A. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2006; 24(10): 1603-1611.
- Dupont WWD. *Statistical Modeling for Biomedical Researchers: A Simple Introduction to the Analysis of Complex Data.* 2009;522p
- Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer.* 2010; 116:544-573
- Funke S, Brenner H, Chang-Claude J. Pharmacogenetics in colorectal cancer: a systematic review. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(8): 1079-99.
- Gajjar KK, Vora HH, Kobawala TP, Trivedi TI, Ghosh NR. Deciphering the potential value of 5-fluorouracil metabolic enzymes in predicting prognosis and treatment response of colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers.* 2018 May;33(2):180-188. doi: 10.1177/1724600817748539.

- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960-4.
- Ge H, Yan Y, Xie M, Guo L, Tang D. Construction of a nomogram to predict overall survival for patients with M1 stage of colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Int J Surg*. 2019 Dec;72:96-101. doi: 10.1016/j.ijssu.2019.10.021.
- Grady W, Pritchard C. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathol*. 2014; 42(1): 124-39.
- Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat rev Drug Discov*. 3: 11-12.
- Halvorsen TB and Seim E. Degree of differentiation in colorectal adenocarcinomas: a multivariate analysis of the influence on survival. *J Clin Pathol*. 1988 May; 41(5): 532–537. doi: 10.1136/jcp.41.5.532
- Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 2010:134-46
- Hammond W, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol*. 2016; 8(1): 57-84.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harris MJ, Coggan M, Langton L, Wilson SR, Board PG. Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics*. 1998 Feb; 8(1):27-31.
- Hidetsugu Yamagishi, Hajime Kuroda, Yasuo Imai, corresponding author and Hideyuki Hiraishi. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer*. 2016; 35: 4.
- Hitre E, Budai B, Adfleff V, Czeglédi F, Horváth Z, Gyergyay F, Lövey J, Kovács T, Orosz Z, Láng I, Kásler M, Kralovánszky J. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15(10): 723-730.
- Holley SL, Fryer HA, Haycock JW, Grubb SE, Strange RC, Hoban PR. Differential effects of glutathione S-transferase pi (GSTP1) haplotypes on cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis*, Volume 28, Issue 11, November 2007, Pages 2268–2273, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm135>
- Iseki Y, Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Matsutani S, Kashiwagi S, Tanaka H, Hirakawa K, Ohira M. A new method for evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer using hematoxylin and eosin (H-E)-stained tumor sections *PLoS One*. 2018; 13(4): e0192744

- Itriago LG, Silva NI, Cortes GF. Cancer en Chile y el mundo: Una mirada epidemiologica, presente y futuro. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2013;24(4):531-552. doi:10.1016/S0716-8640(13)70195-0.
- Iveson T, Boyd KA, Kerr RS, Robles-Zurita J, Saunders MP, Briggs AH, Cassidy J, Hollander NH, Tabernero J, Haydon A, Glimelius B, Harkin A, Allan K, McQueen J, Pearson S, Waterston A, Medley L, Wilson C, Ellis R, Essapen S, Dhadda AS, Harrison M, Falk S, Raouf S, Rees C, Olesen RK, Propper D, Bridgewater J, Azzabi A, Farrugia D, Webb A, Cunningham D, Hickish T, Weaver A, Gollins S, Wasan H, Paul J. 3-month versus 6-month adjuvant chemotherapy for patients with high-risk stage II and III colorectal cancer: 3-year follow-up of the SCOT non-inferiority RCT. *Health Technol Assess*. 2019 Dec;23(64):1-88. doi: 10.3310/hta23640.
- Jiang H, Li B, Wang F, Ma C, Hao T. Expression of ERCC1 and TYMS in colorectal cancer patients and the predictive value of chemotherapy efficacy. *Oncol Lett*. 2019 Aug;18(2):1157-1162. doi: 10.3892/ol.2019.10395. Epub 2019 May 23.
- Joyce T, Reardon, Alexandra Vaisman, Stephen G. Chaney and Aziz Sancar. Efficient Nucleotide Excision Repair of Cisplatin, Oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum (IV) (JM216) PlatinumIntrastrand DNA Diadducts. *Cancer Research*. 1999. August
- Kanthan R, Senger J, Kanthan S. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: A review. *Patholog Res Int*. 2012; 597497.
- Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res*. 2003; 63: 6004-6007.
- Kenneth D and Danyelle M. Glutathione-S-Transferases As Determinants of Cell Survival and Death. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Dec 15; 17(12): 1728–1737.
- Kline CL, E-Deiry WS. Personalizing colon cancer therapeutics: targeting old and new mechanisms of action. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013 Aug 21;6(8):988-1038. doi: 10.3390/ph6080988.
- Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, Bosman FT, Delorenzi M, Tejpar S. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. *Ann Oncol*. 2015 Jan;26(1):126-32.
- Kong JC, Guerra GR, Pham T, Mitchell C, Lynch AC, Warriar SK3, Ramsay RG, Heriot AG. Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary and Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2019 Apr;62(4):498-508. doi: 10.1097/DCR.0000000000001332.
- Kudryavtseva A, Lipatova A, Zaretsky A, Moskalev A, Fedorova M, Rasskazova A, Shibukhova G, Snezhkina A, Kaprin A, Alekseev B, Dmitriev A, Krasnov G. Important Molecular Genetic Markers of Colorectal Cancer. *Oncotarg*. 2016; 7(33): 53959–53983.
- Kumamoto K, Ishibashi K, Okada N, Tajima Y, Kuwabara K, Kumagai Y, Baba H, Haga N, Ishida H. Polymorphisms of GST1, ERCC2 and TS-3'UTR are associated with the clinical outcome of mFOLFOX6 in colorectal cancer patients. *Oncol Lett*. 2013; 6: 648-654.

- Leichman L, Lenz HJ, Leichman CG, Groshen S, Danenberg K, Baranda J, Spears CP, Boswell W, Silberman H, Ortega A. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for resistance to protracted infusion of 5-fluorouracil and weekly leucovorin in disseminated colorectal cancers: preliminary report from an ongoing trial. *Eur J Cancer*. 1995 Jul-Aug; 31A(7-8):1306-10.
- M.Ponz de Leon, C.Di Gregorio. Pathology of colorectal cancer. Clinical review Elsevier 2001. Volume 33, Issue 4 May, Pages 372-388
- Mahalingam J, Lin C, Chiang J, Su P, Chu Y, Lai H, Fang J, Huang C, and Lin Y. CD4+ T Cells Expressing Latency-Associated Peptide and Foxp3 Are an Activated Subgroup of Regulatory T Cells Enriched in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2014; 9(9): e108554.
- Mamenta E, Poma E, Kaufmann W, Delmastro D, Grady H, Chaney S. 1994. Enhanced replicative bypass of platinum-DNA adducts in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res*. 2004; 58: 3500-3505.
- Mandola M, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu M, Lenz H, Ladner R. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res*. 2003; 63: 2898-2904.
- Mandola M, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu M, Iqbal S, Lenz H, Ladner R. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene cause message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics*. 2004; 14(5): 319-27.
- Masugi Y, Nishihara R, Yang J, Mima K, da Silva A, Shi Y, Inamura K, Cao Y, Song M, Nowak J, Liao X, Noshio K, Chan A, Giannakis M, Bass A, Hodi F, Freeman G, Rodig S, Fuchs C, Qian Z, Ogino S. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cell in colorectal cancer. *Gut*. 2016; 0:1-11.
- Matthew Fleming, Sreelakshmi Ravula, Sergei F. Tatishchev and Hanlin L. Wang Colorectal carcinoma: Pathologic aspects *J Gastrointest Oncol*. 2012 Sep; 3(3): 153–173. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
- McLeod HL, Sargent DJ, Marsh S, Green EM, King CR, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Thibodeau SN, Grothey A, Morton RF, Goldberg RM. Pharmacogenetic predictors of adverse events and response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer: results from North American Gastrointestinal Intergroup Trial N9741. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10; 28(20):3227-33.
- Milano G, Chamorey AL. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *Chronobiol Int*. 2002 Jan;19(1):177-89.
- Ministerio de Salud C. Guía Clínica AUGÉ Cáncer Colorrectal.; 2013.
- Minsal (https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/01/2019.01.23_PLAN-NACIONAL-DE-CANCER_web.pdf)
- Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(30): 10316-10330.

- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Aug 15;58(16):3491-4.
- Natasja L. de Vries, Marloes Swets, Alexander L. Vahrmeijer, Marianne Hokland and Peter J. K. Kuppen. The Immunogenicity of Colorectal Cancer in Relation to Tumor Development and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul; 17(7): 1030.
- Nelleke P. M. BrouwerEmail authorDave E. W. van der KruijssenNiek HugenIgnace H. J. T. de HinghIris D. NagtegaalRob H. A. VerhoevenMiriam KoopmanJohannes H. W. de Wilt. The Impact of Primary Tumor Location in Synchronous Metastatic Colorectal Cancer: Differences in Metastatic Sites and Survival. *Annals of Surgical Oncology.* 2019
- Nöpel-Dünnebacke S, Schulmann K, Reinacher-Schick A, Porschen R, Schmiegel W, Tannapfel A, Graeven U. Prognostic value of microsatellite instability and p53 expression in metastatic colorectal cancer treated with oxaliplatin and fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Z Gastroenterol.* 2014; 52(12): 1394-401.
- Ntavatzikos A, Spathis A, Patapis P, Machairas N, Vourli G, Peros G, Papadopoulos I, Panayiotides I, Koumariou A. TYMS/KRAS/BRAF molecular profiling predicts survival following adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2019 Jul 15;11(7):551-566. doi: 10.4251/wjgo.v11.i7.551.
- Oberg A, Samii S, Stenling R, Lindmark G. Different occurrence of CD8+, CD45R0+, and CD68+ immune cells in regional lymph node metastases from colorectal cancer as potential prognostic predictors. *Int J Colorectal Dis.* 2002 Jan;17(1):25-9.
- Okamura T, Antoun G, Keir S, Friedman H, Bigner D, and Ali-Osman F. Phosphorylation of Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) by Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Promotes Formation of the GSTP1-c-Jun N-terminal kinase (JNK) Complex and Suppresses JNK Downstream Signaling and Apoptosis in Brain Tumor Cells. *J Biol Chem.* 2015 Dec 25; 290(52): 30866–30878.
- Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman W. Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010; 29(8): 1093-102.
- Panczyk M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 7; 20(29): 9775–9827.
- Parisa Aghagolzadeh and Ramin Radpour. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016 Jul 7; 22(25): 5678–5693 doi: 10.3748/wjg.v22.i25.5678
- Park JH, Park HC, Park SC, Oh JH, Kim DW, Kang SB, Heo SC, Kim MJ, Park JW, Jeong SY, Park KJ. Female Sex and Right-Sided Tumor Location Are Poor Prognostic Factors for Patients With Stage III Colon Cancer After a Curative Resection. *Ann Coloproctol.* 2018 Dec;34(6):286-291. doi: 10.3393/ac.2018.10.29. Epub 2018 Dec 31.

- Peng Z, Wang Q, Gao J, Ji Z, Yuan J, Tian Y, Shen L. Association between GSTP1 Ile105Val polymorphism and oxaliplatin-induced neuropathy: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013; 72: 305-314.
- Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, Passalacqua R, Sgroi G, Barni S. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017 Feb 1;3(2):211-219. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.4227
- Phillips SM, Banerjea A, Feakins R, Li SR, Bustin SA, Dorudi S. Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *Br J Surg*. 2004 Apr;91(4):469-75.
- Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 1; 22(3):529-36.
- Qiu LX, Tang QY, Bai JL, Qian XP, Li RT, Liu BR, Zheng MH. Predictive value of thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer patients receiving fluoropyrimidine-based chemotherapy: evidence from 24 studies. *Int J Cancer*. 2008 Nov 15; 123(10):2384-9.
- Rocco A, Staibano S, Ottini L, Mezza E, Somma P, Mariani-Costantini R, Budillon G, Nardone G. Is there a link between environmental factors and a genetic predisposition to cancer? A lesson from a familial cluster of gastric cancers. *Eur J Cancer*. 2003. Jul;39(11):1619-24
- Rodrigues-Fleming GH, Mendonça GM, Russo A, Biselli-Chicote PM, Netinho JG, Pavarino EC and Goloni-Bertollo EM. Molecular evaluation of glutathione S transferase family genes in patients with sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2018 Oct 21; 24(39): 4462–4471.
- Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015 Jan 15;160(1-2):48-61. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.033.
- Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Canestrari E, Santini D, Catalano V, Ficarelli R, Maltese P, Bisonni R, Masi G, Schiavon G, Giordani P, Giustini L, Falcone A, Tonini G, Silva R, Mattioli R, Floriani I, Magnani M. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007; 25(10): 1247-1254.
- Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, Catalano V, Ficarelli R, Maltese P, Bisonni R, Masi G, Schiavon G, Giordani P, Giustini L, Falcone A, Tonini G, Silva R, Mattioli R, Floriani I, Magnani M. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007 Apr 1; 25(10):1247-54.
- Saidi HS, Karuri D, Nyaim EO. Correlation of clinical data, anatomical site and disease stage in colorectal cancer. *East Afr Med J*. 2008 Jun;85(6):259-62.
- Salgado J, Zabalegui N, Gil C, Monreal I, Rodriguez J, Garcia-Foncillas J. Polymorphisms in the thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes predict response and toxicity to capecitabine-raltitrexed in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2007; 17(2):3 325-328.

- Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB. Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol Pharmacol*. 1999 Sep;56(3):633-43.
- Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, Nordlinger B, van de Velde CJ, Balmana J, Regula J, Nagtegaal ID, Beets-Tan RG, Arnold D, Ciardiello F, Hoff P, Kerr D, Köhne CH, Labianca R, Price T, Scheithauer W, Sobrero A, Tabernero J, Aderka D, Barroso S, Bodoky G, Douillard JY, El Ghazaly H, Gallardo J, Garin A, Glynne-Jones R, Jordan K, Meshcheryakov A, Papamichail D, Pfeiffer P, Souglakos I, Turhal S, Cervantes A. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012 Oct;23(10):2479-516.
- Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):69-74. doi: 10.1126/science.aaa4971.
- Shin JY, Jung HJ, Moon A. Molecular Markers in Sex Differences in Cancer. *Toxicol Res*. 2019 Oct;35(4):331-341. doi: 10.5487/TR.2019.35.4.331. Epub 2019 Oct 15.
- Sonbol MB, Mountjoy LJ, Firwana B, Liu AJ, Almader-Douglas D, Mody K, Hubbard J, Borad M, Ahn DH, Murad MH, Bekaii-Saab T. The Role of Maintenance Strategies in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Network Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol*. 2019 Dec 19:e194489. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.4489.
- Stoehlmacher J, Park D, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S, Lenz H. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: Prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004; 91(2): 344-54.
- Strimpakos A, Syringos K, Saif M. Pharmacogenetics and biomarkers in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*. 2009; 9(3): 147-60.
- Sun X, Feng Z, Wang Y, Qu Y, and Gai Y. Expression of Foxp3 and its prognostic significance in colorectal cancer. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2017 Jun; 30(2): 201–206.
- Sun Y, Mironova V, Chen Y, Lundh EPF, Zhang Q, Cai Y, Vasiliou V, Zhang Y, Garcia-Milian R, Khan SA, Johnson CH. Molecular Pathway Analysis Indicates a Distinct Metabolic Phenotype in Women With Right-Sided Colon Cancer. *Transl Oncol*. 2020 Jan;13(1):42-56. doi: 10.1016/j.tranon.2019.09.004. Epub 2019 Nov 21.
- Sun Y, Mironova V, Chen Y, Lundh EPF, Zhang Q, Cai Y, Vasiliou V, Zhang Y, Garcia-Milian R, Khan SA and Johnson CH. Molecular Pathway Analysis Indicates a Distinct Metabolic Phenotype in Women With Right-Sided Colon Cancer. *Transl Oncol*. 2020 Jan; 13(1): 42–56.
- Thorn Caroline F, Marsh Sharon, Carrillo Michelle Whirl, McLeod Howard L, Klein Teri E, and Altman Russ B. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011.
- Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg C, Creemers G, Schrama J, Erdkamp F, Vos A, van Groenigen C, Sinnige H, Richel D, Voest E, Dijkstra J, Vink-Börger M, Antonini N, Mol L, van Krieken J,

- Dalesio O, Punt C. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 360(6):563-72.
- Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016 Aug;27(8):1386-422.
- Venderbosch S, Natgtegaal I, Maughan T, Smith C, Cheadle J, Fisher D, Kaplan R, Quirke P, Seymour M, Richman S, Meijer G, Ylstra B, Heideman D, de Haan A, Punt C, Koopman M. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(20): 5322-30
- Wagner P, Koch M, Nummer D, Palm S, Galindo L, Autenrieth D, Rahbari N, Schmitz-Winnenthal FH, Schirrmacher V, Büchler MW, Beckhove P, Weitz J. Detection and functional analysis of tumor infiltrating T-lymphocytes (TIL) in liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008 Aug;15(8):2310-7. doi: 10.1245/s10434-008-9971-5. Epub 2008 Jun 3.
- Wang Gang, Jun-Jie Wang, Rui Guan, Sun Yan, Feng Shi, Jia-Yan Zhang, Zi-Meng Li, Jing Gao and Xing-Li Fu. Strategy to targeting the immune resistance and novel therapy in colorectal cancer. *Cancer Med*. 2018 May; 7(5): 1578–1603.
- Wang J, Jiang J, Zhao Y, Gajalakshmi V, Kuriki K, Suzuki S, Nagaya T, Nakamura S, Akasaka S, Ishikawa H, Tokudome S. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: a case-control study in an Indian population. *Cancer Epidemiol*. 2011 Feb;35(1):66-72. doi: 10.1016/j.canep.2010.07.003
- Watson AJ, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis*. 2011;29(2):222-8. doi: 10.1159/000323926. Epub 2011 Jul 5.
- Weiser MR AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018 Jun;25(6):1454-1455. doi: 10.1245/s10434-018-6462-1. Epub 2018 Apr 3.
- West NR, McCuaig S, Franchini F, Powrie F. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*. 2015 Oct;15(10):615-29. doi: 10.1038/nri3896. Epub 2015 Sep 11.
- William M. Grady, MD and Sanford D. Markowitz, MD, PhD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci*. Author manuscript; available in PMC 2016 Mar 7
- World Health Organization. Cancer, Key facts. Diciembre 2019 (<https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>)
- Yangkui Gu, Zhimei Huang, Haifeng Gu, Fei Gao, Tianqi Zhang, Senmiao Huang & Jinhua Huang. Does the Site of the Primary Affect Outcomes When Ablating Colorectal Liver Metastases with Radiofrequency Ablation? *Clinical Investigation*. 2018. March 26
- Yim D, Kim O, An H, Kang H, Ahn D, Hwang S, Oh D, Kim N. Polymorphism of thymidylate synthase gene 5'-and 3'-untranslated region and risk of gastric cancer in Koreans. *Anticancer Res*. 2010; 30(6): 2325-30.

- Yousef AM, Zawiah M, A-Yacoub S, Kadi T, Tantawi DA, A-Ramadhani H. The association of polymorphisms in folate-metabolizing genes with response to adjuvant chemotherapy of colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018 Aug;82(2):237-243. doi: 10.1007/s00280-018-3608-6. Epub 2018 May 29.
- Zhu A, Puchalski T, Stanton V, Ryan D, Clarck J, Nesbitt S, Charlat O, Kelly P, Kreconus E, Chabner B, Supko J. Dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase polymorphisms and their association with 5-fluorouracil/leucovorin chemotherapy in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2004; 3(4): 225-234.

9. ANEXOS

ANEXO I: Dispensa al consentimiento informado

PROTOCOLO CQF-EC-001-17

SOLICITUD DE DISPENSA AL CONSENTIMIENTO INFORMADO DE INVESTIGACIÓN

I.- IDENTIFICACION DEL ESTUDIO:

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

I.- JUSTIFICACIÓN DE LA DISPENSA

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

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

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

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

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

Investigador Principal:

Dr. B.Q. Luis Quiñones S. PhD

Profesor Titular. U. DE CHILE

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

Investigador Clínico:

Dr. José Luis Leal.

Oncólogo Médico. INC

36

CELSAMINORTE
Supercentro de
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte
06 OCT 2017

ANEXO II: Estandarización de extracción de ADN desde muestras FFPE

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

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

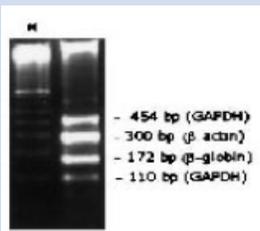
- Tipo de corte: será rollo si el área tumoral marcada por el anatomopatólogo es mayor a un 80%, si es menor a esta área debe ser microdissección. Si es rollo es mejor 2 cortes de 10 μ m o 3 cortes de 8 μ m que un corte de 20 μ m, ya que con más cortes de menor grosor es mejor la desparafinación del tejido.
- Estabilidad de los cortes a corto plazo: se observa una mínima disminución en la cantidad de ADN inicial, posterior a 4 semanas del almacenamiento a 4°C. Esto solo se notó en los 2 cortes de 10 μ m.
- Rendimiento del kit: para cáncer de colon se observó un rendimiento promedio de 56,7ng/ μ L/cm², usando xileno como desparafinante y con las condiciones indicadas en el kit.

ANEXO III: Parámetros considerados para determinar calidad de ADN extraído desde muestras FFPE

Tabla 11. Criterios de integridad del ADN extraído desde muestras FFPE mediante análisis electroforético

Integridad ADN desde FFPE: análisis electroforético		
Patrón migratorio en el gel de agarosa.	Score	Interpretación
Banda tipo “smear” > 1000 pb	3	Óptima
Banda “smear” menos definida alrededor de 1000 pb a 800 pb	2	Aceptable
Banda “smear” menos definida alrededor de 800 pb a 200 pb	1	Deficiente, definir con análisis de PCR housekeeping
Desaparición de “smear” en pesos moleculares medios-altos y/o aparición de “smear” bajo los 200 pb	0,5	Integridad no aceptable, definir con análisis de PCR housekeeping

Tabla 12. PCR múltiplex para control de ADN extraído desde muestras FFPE

Banda de amplicon	Peso molecular	Gen de amplicon	
	I	454 pb	GAPDH
	II	300 pb	β-actina
	III	172 pb	β-globina
	IV	110 pb	GAPDH

ANEXO IV: Estandarización de concentración mínima de ADN para genotipificación mediante PCR en Tiempo Real.

Para determinar la concentración mínima necesaria para detectar los SNPs, se realizó una curva de calibración con concentraciones desde 5 ng hasta 30 ng por pocillos con 3 muestras distintas para ver trazabilidad de los resultados.

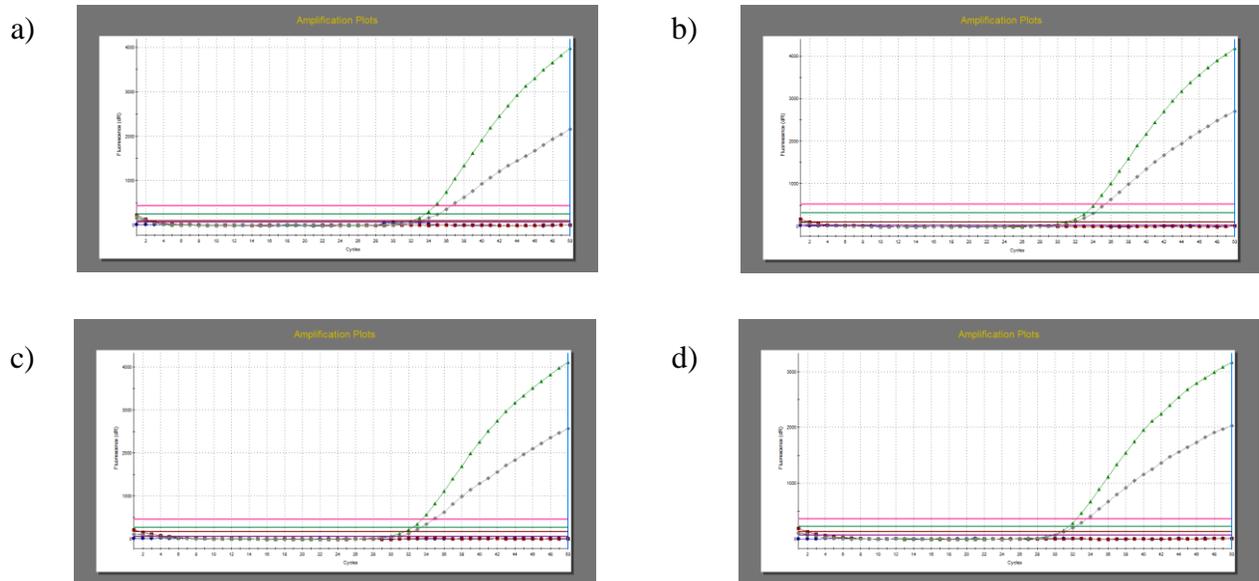


Figura 24. Ejemplo de las curvas de amplificación realizadas. a) 5 ng de ADN (ct 32), b) 10 ng de ADN (ct 30), c) 15 ng (ct 30) de ADN y d) 30 ng de ADN (ct 28) para el SNP rs72728438 del gen *DPYD*.

ANEXO V: Ficha de reclutamiento de los pacientes

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

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

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

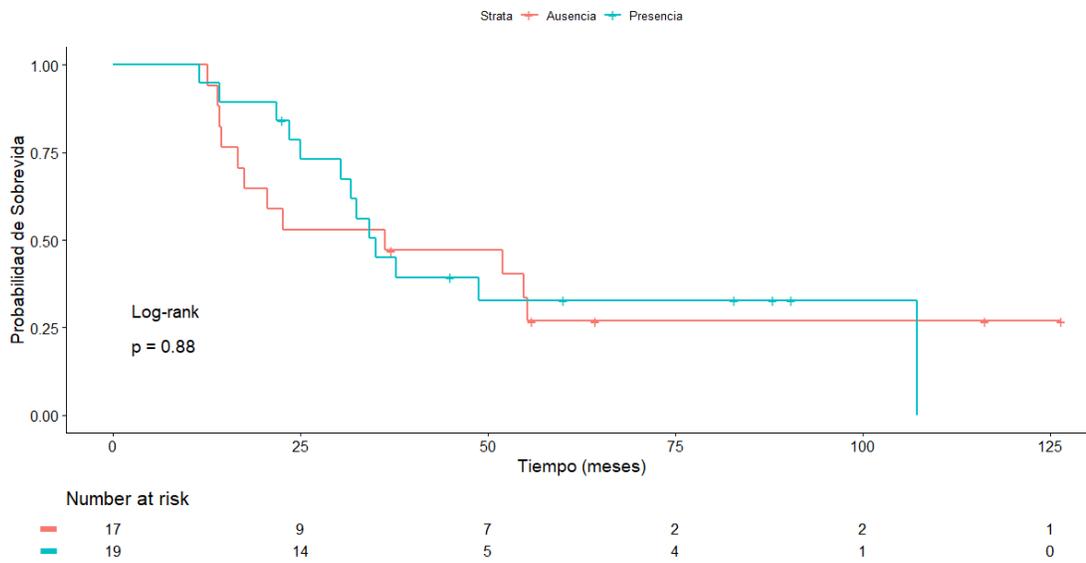
	BASE DE DATOS	Cód.: REG-001
	Ficha de reclutamiento:	Revisión: 02
	Protocolo CQF-EC-001-17	Fecha: 09/10/2018
		Página 2 de 2

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

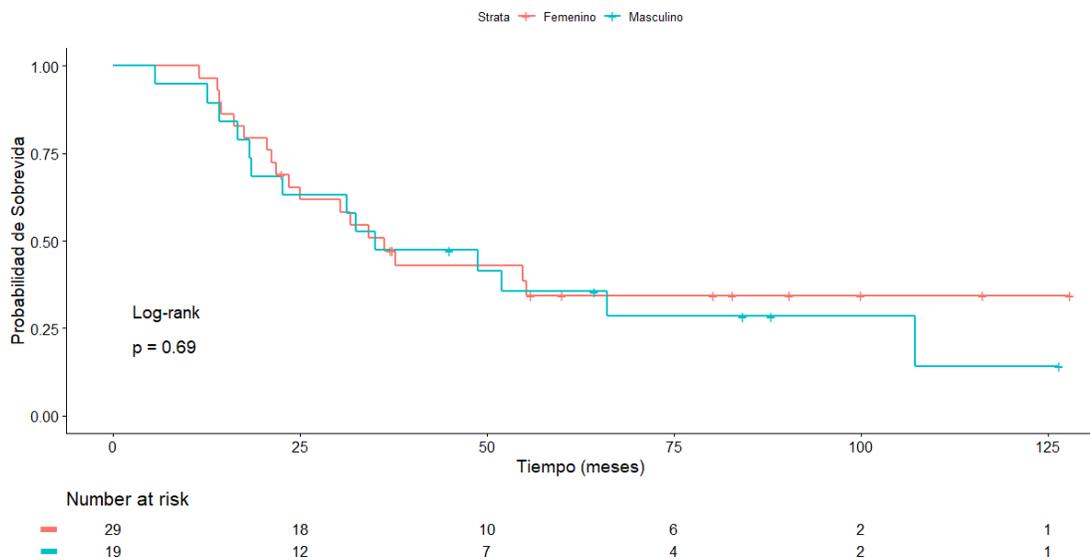
ANEXO VI: Análisis estadísticos no significativos

Variables clínicas

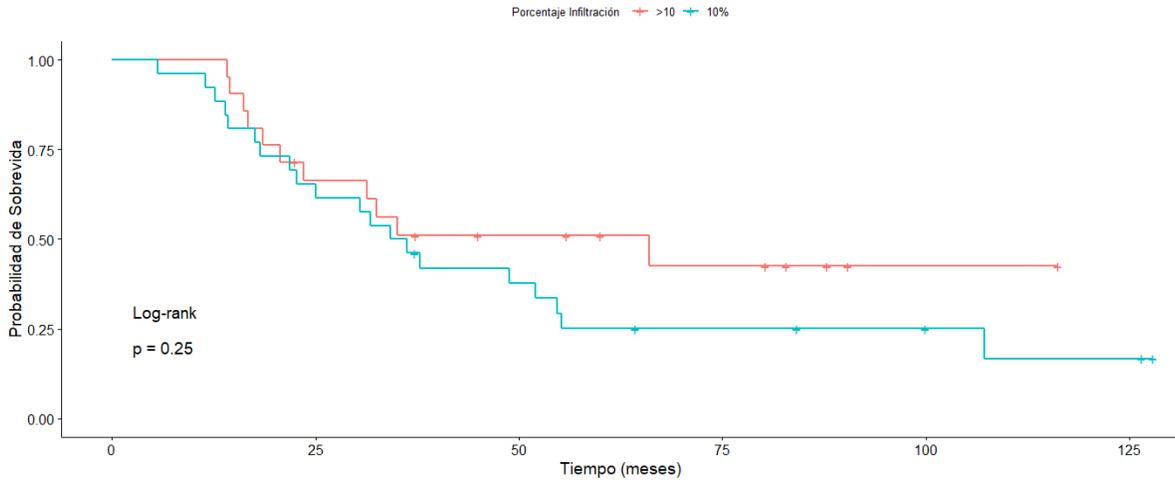
Metástasis Pulmonar



Sexo



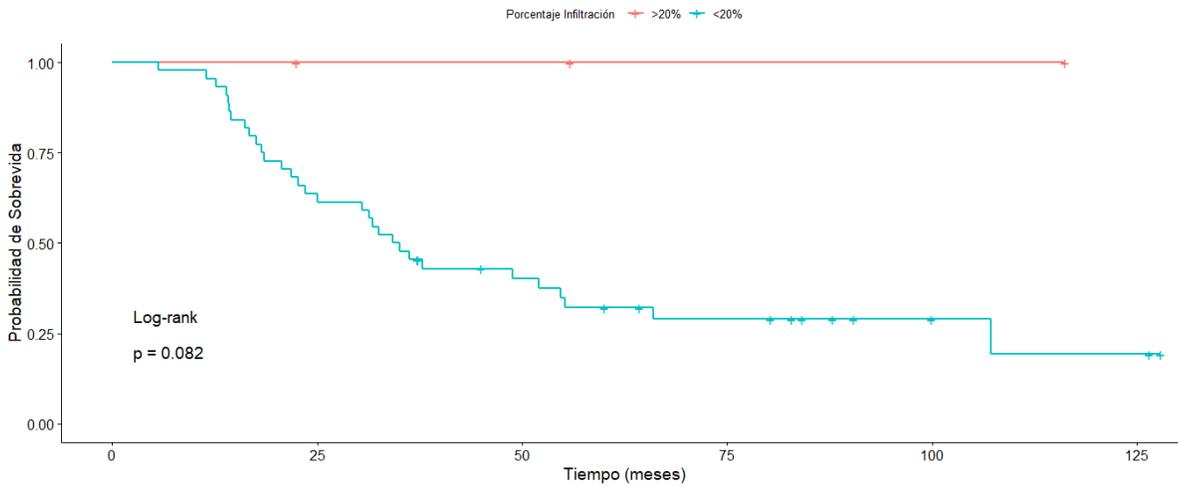
Porcentaje Infiltración Linfocitos T



Number at risk

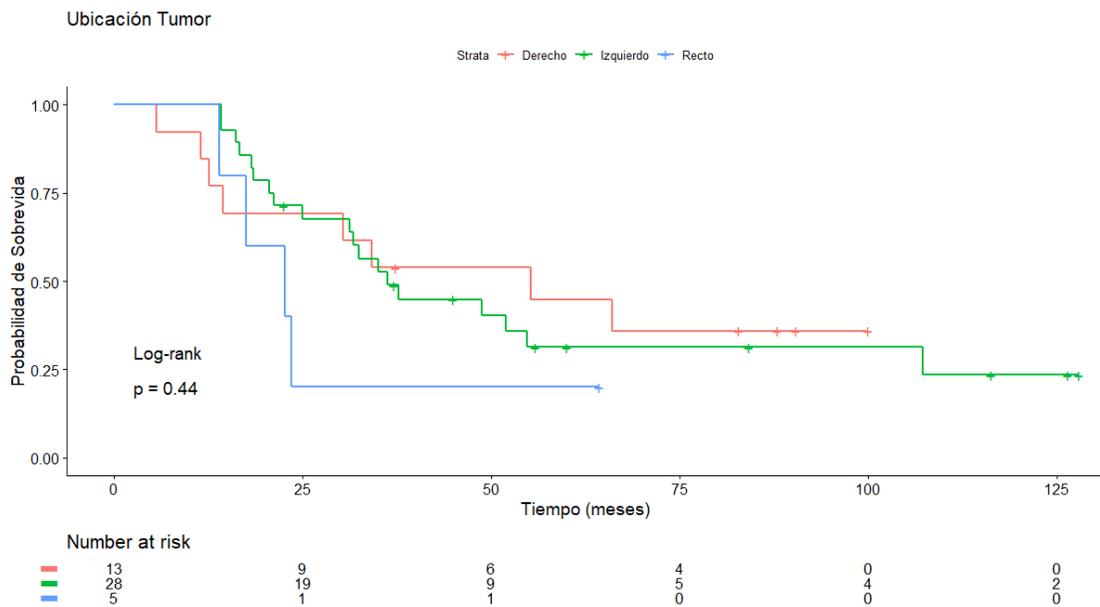
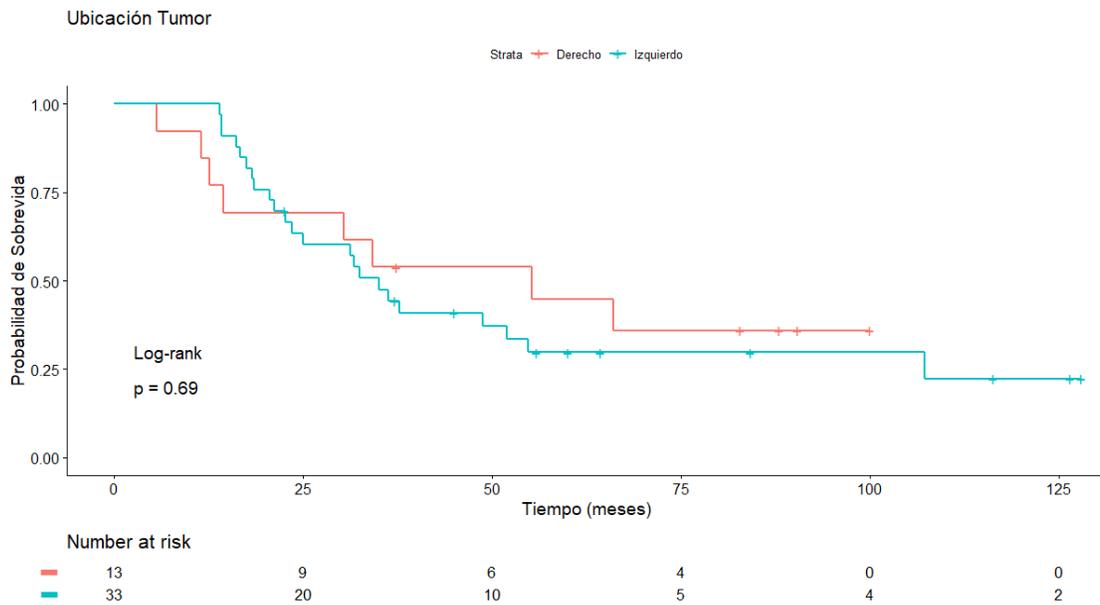
	0	25	50	75	100	125
+	21	13	8	5	1	0
-	26	17	9	5	3	2

Porcentaje Infiltración Linfocitos T



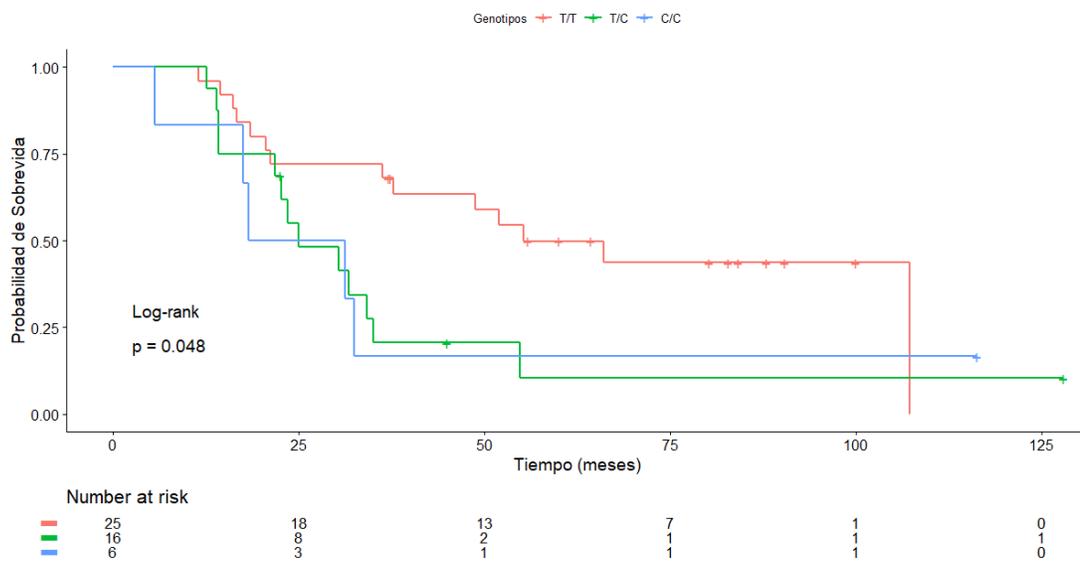
Number at risk

	0	25	50	75	100	125
+	3	2	2	1	1	0
-	44	28	15	9	3	2

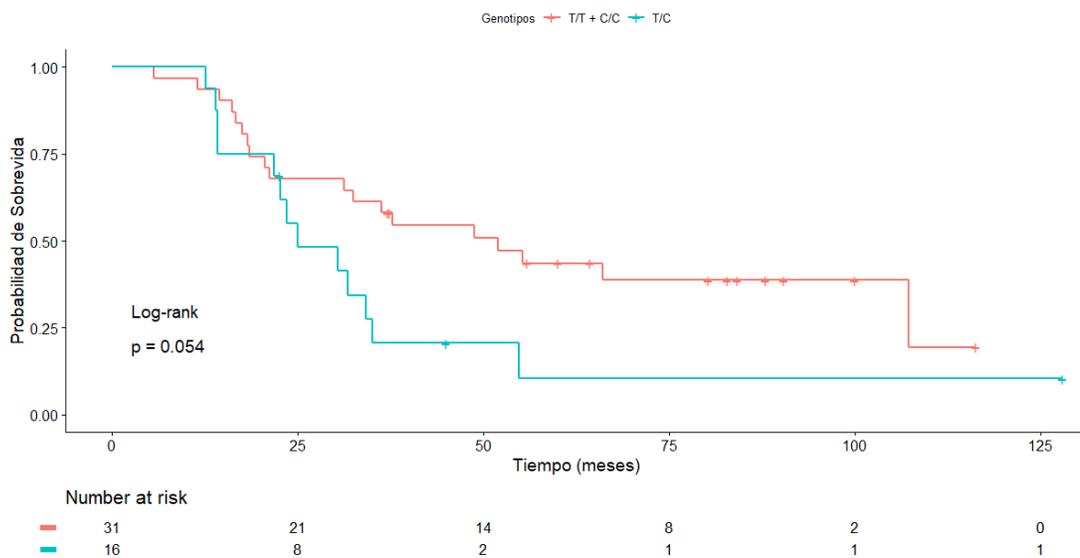


Variables genéticas:

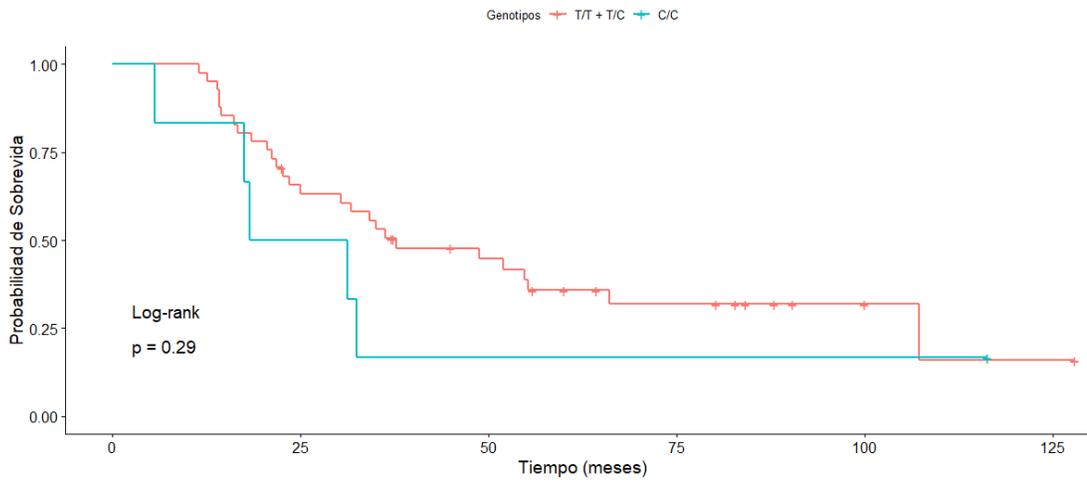
DPYD c.85T>C (DPYD*9) (rs1801265) MODELO CODOMINANTE



DPYD c.85T>C (DPYD*9) (rs1801265) MODELO MULTIPLICATIVO



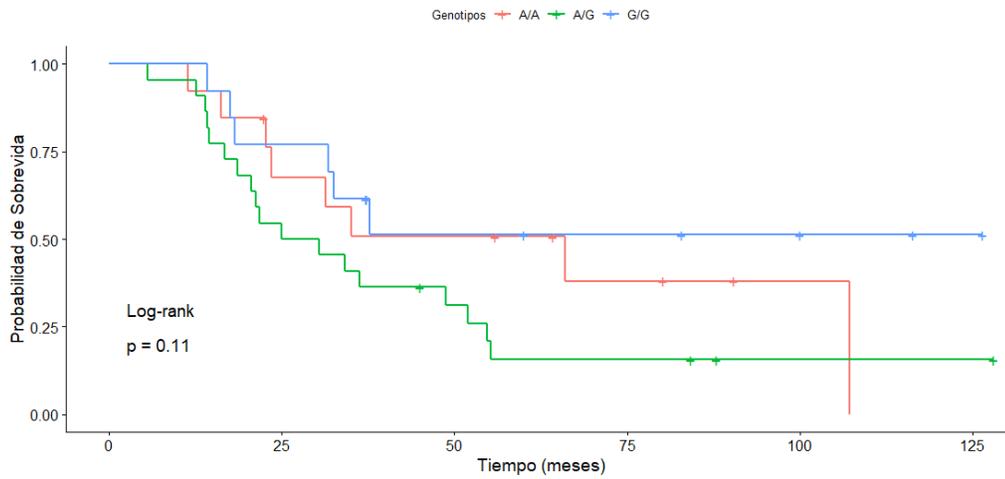
DPYD c.85T>C (DPYD*9) (rs1801265) MODELO RECESIVO



Number at risk

—	41	26	15	8	2	1
—	6	3	1	1	1	0

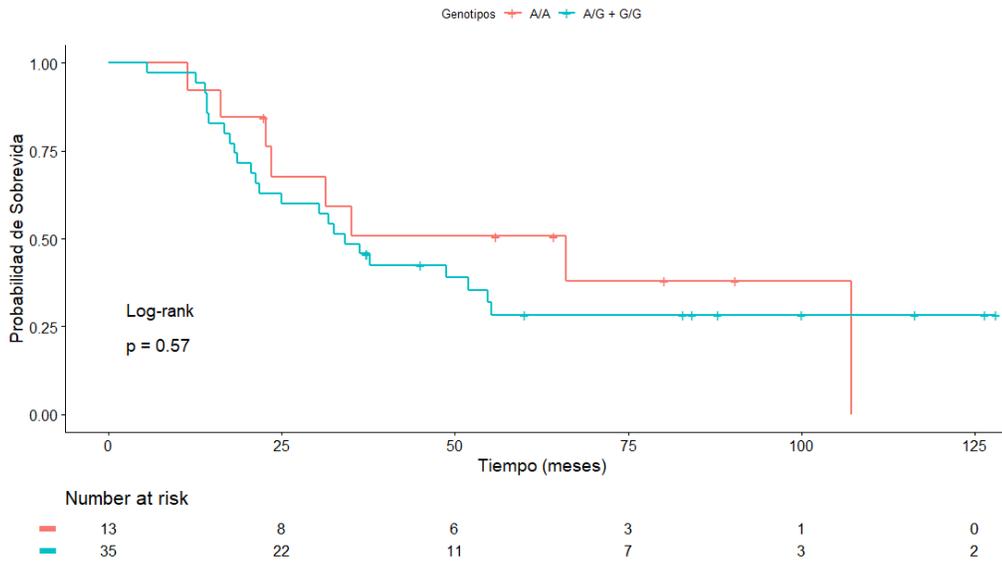
GSTP1 c.313A>G (rs1695) MODELO CODOMINANTE



Number at risk

—	13	8	6	3	1	0
—	22	12	6	3	1	1
—	13	10	5	4	2	1

GSTP1 c.313A>G (rs1695) MODELO DOMINANTE



GSTP1 c.313A>G (rs1695) MODELO RECESIVO

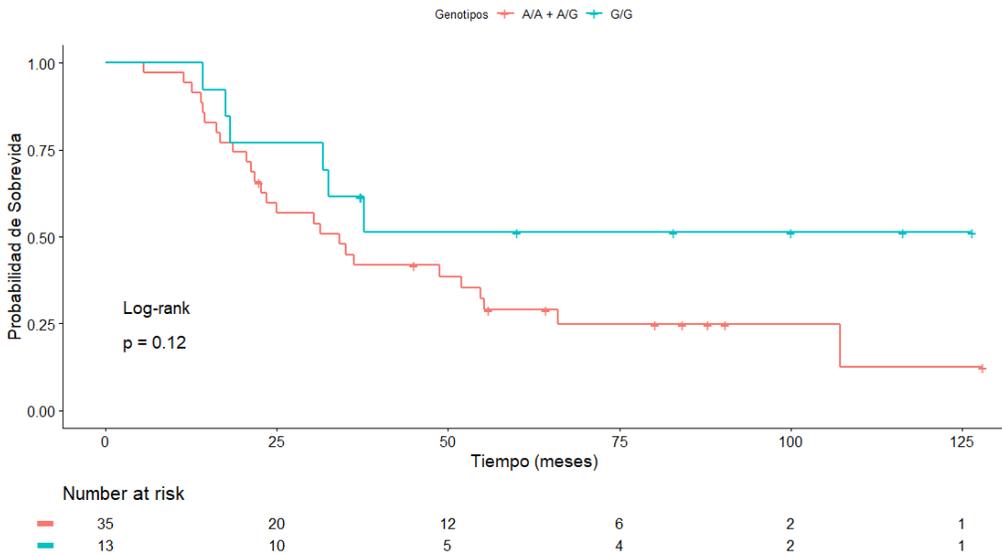


Tabla 13. Medianas de sobrevida de variables genéticas y no genéticas no significativas.

VARIABLES	MEDIANA DE SOBREVIDA (MESES)
INFILTRACIÓN LINFOCITOS CORTE 10%	
10%	35,2 meses
>10%	66,0 meses
INFILTRACIÓN LINFOCITOS CORTE 20%	
<20%	34,6 meses
>20%	--
SEXO	
FEMENINO	36,3 meses
MASCULINO	35,1 meses
UBICACIÓN TUMOR	
DERECHO	55,2 meses
IZQUIERDO	36,3 meses
RECTO	22,7 meses
UBICACIÓN TUMOR	
DERECHO	55,2 meses
IZQUIERDO	35,1 meses
METÁSTASIS PULMONAR	
AUSENCIA	36,3 meses
PRESENCIA	35,1 meses
DPYD c.85T>C MODELO CODOMINANTE	
T/T	55,2 meses
T/C	25,0 meses
C/C	24,8 meses
DPYD MODELO REC	
T/T + T/C	37,8 meses
C/C	24,8 meses
DPYD MODELO MULTIPLICATIVO	
T/T + C/C	52,0 meses
T/C	25,0 meses
GSTP1 MODELO CODOM	
A/A	66 meses
A/G	27,7 meses
G/G	--
GSTP1 MODELO DOM	
A/A	66 meses
A/G + G/G	34,2 meses
GSTP1 MODELO REC	
A/A + A/G	34,2 meses
G/G	--