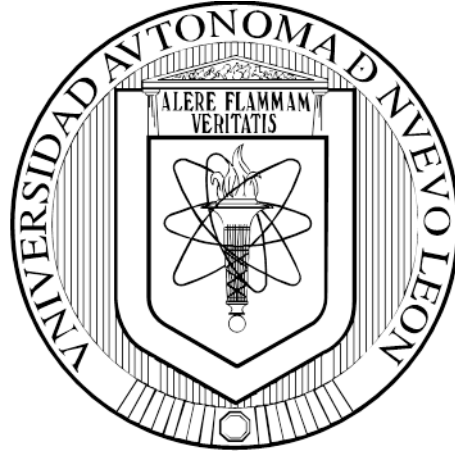


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**FARMACOGENÉTICA DE LA QUIMIOTERAPIA DE LOS  
TUMORES GASTROINTESTINALES**

**POR**

**M.C. CARLOS ANDRÉS CASTRO ROJAS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**DICIEMBRE, 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**FARMACOGENÉTICA DE LA QUIMIOTERAPIA DE LOS  
TUMORES GASTROINTESTINALES**

**POR**

**M.C. CARLOS ANDRÉS CASTRO ROJAS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**DICIEMBRE, 2017**

**FARMACOGENÉTICA DE LA QUIMIOTERAPIA DE LOS TUMORES  
GASTROINTESTINALES**

**Aprobación de la Tesis:**



**Dr. C. Augusto Rojas Martínez**

**Director de Tesis**



**Dr. C. Alberto Camacho Morales**

**Co-director de Tesis**



**Dra. C. Rocío Ortiz López**

**Miembro de la Comisión de Tesis**



**Dra. med. Oralia Barboza Quintana**

**Miembro de la Comisión de Tesis**



**Dr. med. Héctor Jesús Maldonado Garza**

**Miembro de la Comisión de Tesis**



**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

**Subdirector de Estudios de Posgrado**

### **Lugar de Realización**

El reclutamiento y el seguimiento clínico-terapéutico de los pacientes se llevaron a cabo en los servicios de Gastroenterología y Cirugía y en el Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario José Eleuterio González y en los servicios de Oncología y Cirugía Oncológica de la UMAE-25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), ambas instituciones de la ciudad de Monterrey y en el Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS en la ciudad de Guadalajara. Los experimentos de índole molecular del presente trabajo se desarrollaron en el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Terapias Experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS).

### **Aprobación de los Protocolos Clínico por los Respectivos Comités de Ética Institucionales**

Los protocolos clínicos asociados al presente trabajo contaron con la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y del Hospital Universitario con el código de registro BI13-002 y con la aprobación de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con el número de registro R-2015-785-024.

### **Recursos Económicos**

Este trabajo fue desarrollado gracias a recursos económicos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social con la clave de registro SALUD-2013-01-202661.

El candidato a Dr. C. Carlos Andrés Castro Rojas fue financiado con recursos del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS, Bogotá D.C., Colombia), otorgados a través de la convocatoria N° 568 del año 2012 para estudios de doctorado en el exterior.

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a los Drs. Augusto Rojas Martínez y Rocío Ortiz López por darme toda su confianza en primera instancia, por permitirme hacer parte de su equipo de trabajo, por su gran apoyo y comprensión, por compartir conmigo su experiencia y conocimientos, pero por sobre todo por su ejemplo de integridad, dinamismo, eficiencia y pasión por la investigación científica. Ha sido para mí una experiencia enriquecedora desde varios puntos de vista y que ha superado mis expectativas gracias en gran parte a ustedes.

Al Dr. Alberto Camacho Morales por su valiosa colaboración para la culminación de este trabajo y por sus aportes académicos y científicos.

A los demás miembros de mi comisión de tesis, los Drs. Oralia Barbosa Quintana y Héctor Maldonado Garza, quienes desde sus respectivos servicios en el Hospital Universitario me brindaron todo su apoyo incondicional para el desarrollo de este trabajo.

A los Drs. Sergio Buenaventura Cisneros e Irma Sandra García González de la UMAE N°25 del IMSS, por su indispensable colaboración para el reclutamiento y el seguimiento clínico de los pacientes.

A la Dra. Josefina Yoali Sánchez López del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS en Guadalajara, por su apoyo al integrar y hacer parte de un equipo multidisciplinario y multicéntrico desde el cual en gran medida se ha soportado este trabajo y que ha abierto la puerta a futuras colaboraciones.

Al maestro en ciencias Víktor Javier Romero Díaz del departamento de Histología de la Facultad de Medicina (UANL) y la Unidad de Bioimagen del CIDICS por su colaboración en los análisis histológicos y en la preparación de los cortes para el procesamiento de las muestras de tejido.

A la maestra en ciencias y candidata a Dr. C. Geovanna Calvo Anguiano, por su apoyo para la preparación de las muestras para los experimentos de secuenciación capilar.

Al Med. Cir. José Antonio Ruiz Esparza por su ayuda en el reclutamiento de los pacientes y en el procesamiento de las muestras biológicas.

A mis compañeros y colegas de la Unidad de biología Molecular y Secuenciación y de la Unidad de Terapias Experimentales, quienes han sido parte importante de esta experiencia personal y profesional para mí.

A los miembros del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular y la Unidad de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Medicina, docentes y personal administrativo, en especial a Ariadna y a Sanjuana, quienes han estado presentes en todo momento prestándome una ayuda invaluable, incluso desde antes de mi llegada a esta Universidad.

A Colciencias (Bogotá D.C., Colombia) por su apoyo financiero en la modalidad de crédito condonable que me fue otorgado y el cual me permitió realizar y concluir mis estudios de doctorado.

## **Dedicatoria**

A mi familia, en especial a mis padres, a quienes espero poder honrar con cada una mis acciones, porque soy quien soy gracias a ustedes.

A Juliana, por aceptar ser mi compañera en esta vida, por brindarme su amor y comprensión y valorarme por ser quien soy.

A Samuel, por llenarme de alegría y motivación para ser el hombre del que pueda sentirse orgulloso hoy y siempre.

*Age quod agis et bene Agis !*

## Tabla de Contenido

<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
Lista de Tablas	iv
Lista de Figuras	vii
Nomenclatura	ix
Resumen	1
Abstract	2
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Tumores gastrointestinales.	3
1.2. Tratamiento quimioterapéutico de los tumores gastrointestinales.	4
1.3. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos de las fluoropirimidinas: 5-FU.	6
1.4. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos de las fluoropirimidinas: Capecitabina.	8
1.5. Biomarcadores genómicos de la respuesta y la toxicidad a Fluoropirimidinas.	10
Justificación	14
Objetivos	
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
Capítulo 2. Materiales y Métodos	
2.1. Tipo de estudio.	16
2.2. Reclutamiento de pacientes.	16
2.3. Tratamiento quimioterapéutico de los pacientes.	18
2.4. Recolección de las muestras de sangre periférica y de tejido tumoral.	19
2.5. Información sociodemográfica, seguimiento clínico y farmacoterapéutico de los pacientes.	20
2.6. Aislamiento de gADN de sangre periférica.	20
2.7. Aislamiento de gADN a partir de tejido.	21
2.8. Extracción de ARN a partir de las muestras de tejido y	



generación del cDNA mediante transcripción inversa.	21
2.9. Análisis de expresión (mARN) mediante qPCR.	22
2.10. Genotipificación de las variantes en el gen <i>TYMS</i> mediante PCR-RFLP	23
2.11. Secuenciación y análisis por electroforesis capilar de las variantes en la región promotora del gen <i>TYMS</i> .	25
2.12. Análisis estadístico de los resultados.	25
Capítulo 3. Resultados.	
3.1. Resultados del diseño y la validación del método para la genotipificación de las variantes en las regiones no codificantes del gen <i>TYMS</i>	27
3.2. Resultados del análisis retrospectivo de asociación entre los genotipos para las variantes en las regiones no codificantes del gen <i>TYMS</i> y la respuesta clínica y la toxicidad a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas en pacientes con CCR.	32
3.3. Resultados de la evaluación de los genotipos y de las frecuencias alélicas para las variantes en las regiones no traducidas del gen <i>TYMS</i> en la población adulta normal del noreste de México.	35
3.4. Resultados de la validación de los genotipos hallados en la población adulta normal, mediante secuenciación por electroforesis capilar.	38
3.5. Resultados del análisis prospectivo de asociación entre los genotipos para las variantes en regiones no codificantes del gen <i>TYMS</i> y la respuesta clínica y la toxicidad a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas en pacientes con tumores gastrointestinales.	40
3.6. Resultados del análisis de expresión de los genes <i>TYMS</i> y <i>ERCC1</i> en muestras de tejido tumoral y de tejido sano.	46
3.7. Resultados del análisis de expresión del gen <i>TYMS</i> en muestras de tejido en función del genotipo para las variantes en las regiones no codificantes del gen.	50
Capítulo 4. Discusión de resultados.	54
Capítulo 5. Conclusiones.	66
Capítulo 6. Perspectivas.	67
Bibliografía	68

## Anexos

- Anexo 1. Evaluación de la estabilidad de la expresión de los genes de interés (*TYMS* y *ERCC1*) relativa a los genes normalizadores (*B2M*, *GAPDH* y *URM1*) en las muestras de tejido tumoral y sano. 77
- Anexo 2. Evaluación de la eficiencia de la amplificación por qPCR de los genes de interés (*TYMS* y *ERCC1*) y de los genes normalizadores (*B2M* y *URM1*). 79

## Lista de Tablas

<b>Tabla</b> .....	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Esquemas de tratamiento quimioterapéutico para el CG.....	4
Tabla 2. Esquemas de tratamiento quimioterapéutico para el CCR.....	5
Tabla 3. Pares de oligos utilizados para la amplificación (qPCR) de los genes de interés y normalizadores.....	22
Tabla 4. Oligos usados para la genotipificación de las variantes en la regiones promotora 5'UTR y 3'UTR del gen <i>TYMS</i> .....	23
Tabla 5. Patrones de restricción con la enzima Hae III para los productos de amplificación del VNTR en la región promotora del gen <i>TYMS</i> .....	24
Tabla 6. Nomenclatura usada para identificar a las variantes seleccionadas y sus respectivas coordenadas cromosómicas.....	28
Tabla 7. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del VNTR en la muestra de pacientes con CCR (n=152) en análisis retrospectivo.....	30
Tabla 8. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs2853542 en la muestra de pacientes con CCR (n=152) en análisis retrospectivo.....	30
Tabla 9. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de la variante rs151264360 en la muestra de pacientes con CCR (n=152) en análisis retrospectivo.....	31
Tabla 10. Características de los pacientes con CCR (n=152) en análisis retrospectivo.....	32
Tabla 11. Categorización de la respuesta clínica según la guía RECIST v1.1 para el subgrupo de pacientes con CCR con información clínica disponible (n=96) en análisis retrospectivo.....	33
Tabla 12. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del VNTR en la muestra de sujetos sanos (n=99).....	36
Tabla 13. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs183205964 en la muestra de sujetos sanos (n=99).....	36
Tabla 14. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs2853542 en la muestra de sujetos sanos (n=99).....	36
Tabla 15. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de la variante rs151264360 en la muestra de sujetos sanos (n=99).....	36
Tabla 16. Comparación entre los genotipos y las frecuencias alélicas para la variante VNTR entre diferentes poblaciones.....	37
Tabla 17. Distribución de la cohorte de pacientes (n=91) por estado de origen.....	40
Tabla 18. Características demográficas y clínicas de la cohorte de pacientes (n=91) vinculados al estudio.....	41

Tabla 19. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del VNTR en la cohorte de pacientes (n=91).....	42
Tabla 20. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs183205964 en la cohorte de pacientes (n=91).....	42
Tabla 21. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs2853542 en la cohorte de pacientes (n=91).....	42
Tabla 22. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de la variante rs151264360 en la cohorte de pacientes (n=91).....	43
Tabla 23. Categorización de la respuesta clínica según la guía RECIST v1.1 para la cohorte de pacientes (n=91).....	43
Tabla 24. Expresión relativa de los genes de interés ( <i>TYMS</i> =T, y <i>ERCC1</i> =E) frente a los genes normalizadores ( <i>B2M</i> =B y <i>URM1</i> =U) entre los grupos de muestras de tejido sano y tumoral.....	47
Tabla 25. Identificación del origen anatómico de las muestras pareadas de tejido por paciente.....	49
Tabla 26. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del VNTR en las muestras de tejido.....	51
Tabla 27. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs2853542 en las muestra de tejido.....	51
Tabla 28. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de la variante rs151264360 en las muestras de tejido.....	51

## Lista de Figuras

<b>Figura</b> .....	<b>Pág.</b>
Figura 1. Metabolismo y mecanismo de acción del 5-FU.....	7
Figura 2. Vías de activación y metabolismo de la capecitabina.....	9
Figura 3. Esquema de tratamiento FOLFOX6 para pacientes con CCR.....	18
Figura 4. Esquema de tratamiento de Gramont para pacientes con CCR.....	18
Figura 5. Esquema de tratamiento CF para pacientes con CG y CGE.....	19
Figura 6. Esquema de tratamiento McDonald para CG.....	19
Figura 7. Sitio de corte de la enzima HaeIII en la secuencia blanco del dsADN.....	23
Figura 8. Imágenes de las electroforesis de los productos de amplificación para el VNTR y de digestión de los amplicones.....	29
Figura 9. Imágenes de las electroforesis de los productos de amplificación para la variante tipo delección de 6pb y de digestión de los amplicones.....	31
Figura 10. Distribución de la toxicidad reportada a fluoropirimidinas según las categorías leve/moderada o grave en el subgrupo de pacientes con CCR (n=42).....	34
Figura 11. Conteo de casos de toxicidad vs genotipos del VNTR para pacientes con CCR.....	34
Figura 12. Conteo de casos de toxicidad vs el modelo genético recesivo común para el alelo 2R.....	35
Figura 13. Electroferograma con la secuencia para el VNTR de un individuo heterocigoto para el SNV rs2853542.....	39
Figura 14. Electroferograma con la secuencia para el VNTR de un individuo heterocigoto para el SNV rs183205964.....	39
Figura 15. Distribución de casos asociados a la respuesta clínica por genotipos de alta o baja expresión de <i>TYMS</i> .....	44
Figura 16. Respuesta objetiva en relación con el diplotipo 3RG.....	44
Figura 17. Distribución de casos asociados a la respuesta clínica por genotipos de la variante en la región 3'UTR.....	45
Figura 18. Toxicidad reportada para la cohorte (n=91) de pacientes bajo estudio.....	46
Figura 19. Expresión relativa ( $\Delta Ct$ ) de <i>TYMS</i> frente a <i>B2M</i> (cuadro A) y frente a <i>URMI</i> (cuadro B) en los grupos de tejido sano y tumoral.....	48
Figura 20. Expresión relativa ( $\Delta Ct$ ) de <i>ERCC1</i> frente a <i>B2M</i> (cuadro A) y frente a <i>URMI</i> (cuadro B) en los grupos de tejido sano y tumoral.....	48

Figura 21. Cambio (Log) en la expresión diferencial de <i>TYMS</i> entre el tejido tumoral y sano por paciente.....	49
Figura 22. Cambio (Log) en la expresión diferencial de <i>ERCCI</i> entre el tejido tumoral y sano por paciente.....	50
Figura 23. Resultado de la genotipificación del VNTR y los SNVs en la región TSER del promotor del gen <i>TYMS</i> en tejido tumoral y sano pareados.....	52
Figura 24. Expresión de <i>TYMS</i> en el tejido tumoral en función de los genotipos de baja y alta expresión.....	53
Figura 25. Representación gráfica de la posición de los alelos del VNTR en la región 5'UTR del gen <i>TYMS</i> y la secuencia de unión al factor USF-1.....	59
Figura 26. Distribución de las frecuencias alélicas para los alelos 6bp+ y 6bp- de la variante en la región 3'UTR del gen <i>TYMS</i> , entre las diferentes superpoblaciones del proyecto 1000Genomes.....	63

## Nomenclatura

3'UTR=Región 3' no traducida del gen.

5'DFUR=5'-deoxi 5-fluorouridina.

5-FU=5-fluorouracilo.

5'UTR=Región 5' no traducida del gen.

gADN=Ácido desoxirribonucleico genómico.

cADN= Ácido desoxirribonucleico complementario.

dsADN= Ácido desoxirribonucleico de doble cadena.

ARN=Ácido ribonucleico.

CCR=Cáncer colorrectal.

mCCR=Cáncer colorrectal metastásico.

CDA=Citidina desaminasa.

CE= Cáncer esofágico.

CG= Cáncer gástrico.

CGE=Cáncer de la unión gastroesofágica.

CTCAE= Criterio para la terminología común de eventos adversos.

DPD= Dihidropirimidina deshidrogenasa (enzima).

DPYS=Dihidropirimidinasa.

*DYPD*=Dihidropirimidina deshidrogenasa (gen).

Escala ECOG=Escala de evaluación del estado físico de pacientes oncológicos (Grupo Oncológico Cooperativo del Este).

EGFR=Receptor del factor de crecimiento epidermal.

ERCC1= Proteína del grupo 1 de complementación cruzada para la reparación por escisión

del ADN.

FGFR2=Receptor tipo 2 del factor de crecimiento de fibroblastos.

GSTP1= Glutación-S-transferasa tipo 1

HER2/NEU=Receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidermal humano.

LRG=Referencia genómica de locus.

MAF=Frecuencia alélica menor.

MET=Receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos.

MTHFR=Metilentetrahidrofolato reductasa.

NER=Reparación de nucleótidos por escisión.

NGS=Secuenciación de nueva generación.

PD-ECGF/TP=Factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas/Timidina fosforilasa.

qPCR=Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR en tiempo real).

PCR-RFLP=Reacción en cadena de la polimerasa-análisis de restricción de fragmentos de longitud polimórfica.

RECIST=Criterios de evaluación de respuesta para tumores sólidos.

SNP/SNV=Polimorfismo/variante de un único nucleótido.

TS=Timidilato sintasa (enzima).

TSER=Región de amplicación del promotor de timidilato sintasa.

TYMS=Timidilato sintasa (gen).

USF-1=Factor 1 de estimulación corriente arriba.

VEGF=Factor de crecimiento vascular endotelial.

VNTR=Repeticiones en tándem de número variable.



## RESUMEN

---

**M.C. Carlos Andrés Castro Rojas**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Número de páginas: 87

Título del estudio: **FARMACOGENÉTICA DE LA QUIMIOTERAPIA DE LOS TUMORES GASTROINTESTINALES**

**Introducción:** Las fluoropirimidinas son agentes citotóxicos utilizados en el esquema de primera línea para el tratamiento de las neoplasias de origen gastrointestinal. Aunque su empleo ha significado un incremento en los tiempos de supervivencia para los pacientes con tumores avanzados, aún persiste una elevada incidencia (>20%) de reacciones tóxicas graves, así como fracasos en la respuesta para un número importante de pacientes. La enzima timidilato sintasa (TS) es el blanco farmacológico de las fluoropirimidinas y como tal se ha propuesto como un potencial marcador de pronóstico para la quimioterapia basada en fluoropirimidinas. **Objetivo:** En el presente trabajo se abordó el problema de validar a TS como biomarcador de respuesta a quimioterapia en tumores de origen gastrointestinal desde un punto de vista farmacogenético. **Métodos:** Para ello se evaluó la presencia de algunas variantes de línea germinal en las regiones no codificantes del gen *TYMS* y su asociación con la respuesta clínica y la toxicidad a fluoropirimidinas, así como su relación con la expresión tisular de la enzima TS. **Resultados:** Se estableció que los pacientes con cáncer colorrectal (CCR) con el genotipo 2R/2R (rs45445694), tienen un mayor riesgo (OR=10.000,  $p=0.021$ ) de presentar toxicidad grave. En un análisis prospectivo en pacientes con tumores gastrointestinales que recibieron quimioterapia basada en fluoropirimidinas, se asoció la presencia conjunta del alelo 3R(rs45445694) y del alelo G (rs2853542) con un fracaso en la respuesta al tratamiento (OR=4.684,  $p=0.004$ ), mientras que la presencia del genotipo 6bp+/6bp+ para la variante en la región 3'UTR del gen (rs151264360) se asoció con una respuesta positiva al tratamiento (OR=4.176,  $p=0.004$ ). Ninguno de los genotipos analizados se asoció con la expresión (mRNA) de TS en tejido tumoral.

**Conclusiones:** Tomando en conjunto estos resultados se propone que las variantes en regiones no codificantes del gen *TYMS* son biomarcadores genéticos de respuesta y toxicidad a la quimioterapia en pacientes con tumores gastrointestinales.

Este es el primer trabajo que aborda la farmacogenética de la quimioterapia de los tumores gastrointestinales en población mexicana y por primera vez se identifica el diplotipo 3RG como marcador independiente de fracaso en la respuesta clínica a las fluoropirimidinas.

---

**Dr.C. Augusto Rojas Martínez**

Director de Tesis

## ABSTRACT

---

Fluoropyrimidines are a class of cytotoxic drugs used in the treatment of gastrointestinal neoplasms. Even though their use has resulted in longer survivals for patients with advanced tumors, severe toxicity has also been evident (>20%) as well as a failed outcome for some patients. Fluoropyrimidines targets thymidylate synthase (TS) enzyme. The latter has been proposed as a potential predictive response marker for fluoropyrimidine-based treatment. In the present work it was hypothesized if TS is a potential pharmacogenetic biomarker for fluoropyrimidine-based chemotherapy response in patients with gastrointestinal tumors. In behalf of this, it was evaluated the presence of germ-line variants in the untranslated regions of the *TYMS* gene and their association with response and toxicity in a group of patients with gastrointestinal tumors treated with fluoropyrimidine-based chemotherapy. It was also evaluated the expression of TS in tumor samples from these patients. It was established that colorectal cancer patients with the 2R/2R genotype (rs45445694) has a higher risk of severe toxicity (OR=10.000,  $p=0.021$ ). In a prospective analysis of patients with gastrointestinal tumors, we found an association of alleles 3R(rs45445694) and G (rs2853542) with a worse response to chemotherapy (OR=4.684,  $p=0.004$ ). The presence of the 6bp+/6bp+ genotype in the 3'UTR variant (rs151264360) was associated with a better response to chemotherapy (OR=4.176,  $p=0.004$ ). None of the genotypes evaluated was associated with the expression (mRNA) of TS in tumor samples. Taking together these results, it is proposed that germ-line variants in the UTR regions of the *TYMS* gene are genetic biomarkers for response and toxicity in fluoropyrimidine-based chemotherapy treatment of patients with advanced gastrointestinal tumors.

This is the first study related to pharmacogenetics of the chemotherapy of gastrointestinal tumors in Mexican population and for the first time it is proposed the 3RG diplotype as an independent marker for response failure to fluoropyrimidines.

### 1.1. Tumores gastrointestinales

Los tumores malignos del tubo digestivo que incluyen el cáncer gástrico (CG), el cáncer de esófago (CE) y el cáncer colorrectal (CCR) ocupan niveles importantes de incidencia y mortalidad a nivel mundial, siendo el CCR el segundo y tercero en incidencia en mujeres y hombres respectivamente. Solo el CG es responsable por la muerte de más de 700 mil personas/ año, siendo la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo. <sup>1</sup>

En México los tumores gastrointestinales tienen tasas brutas de letalidad elevadas, de entre el 54% para el CCR y el 92% para el CE. Aunque, en las últimas dos décadas el CG ha mostrado una tendencia favorable con una reducción del 1,8%/año en la tasa de defunción/100 mil habitantes, el CCR ha mostrado una tendencia contraria, con aumentos sostenidos del 2%/año (1, 2).

Para el CG se ha reportado una incidencia local importante de esta enfermedad en personas menores de 35 años con diagnóstico en estados avanzados y con prevalencia de CG de tipo difuso, lo que en suma se asocia a un pobre pronóstico. Se ha documentado que el riesgo de CG en México aumenta con la edad, su diagnóstico se hace generalmente en etapas avanzadas y el pronóstico está relacionado principalmente con la estadificación del tumor, siendo la sobrevivida global a 5 años del 10-20% dependiendo de la etapa clínica y en concordancia con lo reportado a escala mundial (3-5).

El CCR en México es predominante en los estados del norte del país en los cuales a pesar de contar con un estrato económico medio-alto, existe una dieta baja en fibra y rica en carnes rojas y grasas que se asocian con un riesgo mayor a desarrollar CCR. A pesar de la existencia de procedimientos no invasivos como la detección de sangre oculta en heces y semi-invasivos como la colonoscopia, que permiten una detección temprana de la enfermedad, en México el CCR se detecta generalmente en estados avanzados (6, 7). No existen datos precisos a nivel nacional acerca de la epidemiología del CCR en México, sin embargo en un estudio local se

---

<sup>1</sup> GLOBOCAN 2012. [http:// globocan.iarc.fr/](http://globocan.iarc.fr/)

estableció una supervivencia global a 5 años del 30-90% dependiendo de la etapa en la que se detecta la enfermedad (8).

## 1.2. Tratamiento quimioterapéutico de los tumores gastrointestinales

Para el CG, La gastrectomía es en la actualidad la mejor alternativa de tratamiento para el CG resecable, presente frecuentemente en los estadios más tempranos de la enfermedad (etapa clínica IA). La resección quirúrgica con fines curativos en estados más avanzados se lleva a cabo en combinación con quimioterapia como estrategia adyuvante peri-operatoria. En el cáncer gástrico metastásico (etapas clínicas IIIB y IV) se recurre a la quimioterapia, bien combinada o no con radioterapia. A este respecto, existe evidencia de que la quimioterapia representa un beneficio en términos de supervivencia para los pacientes en estados avanzados de la enfermedad, cuando se compara con un tratamiento únicamente de soporte (9, 10).

	<b>European Society for Medical Oncology, UK (11)</b>	<b>National Comprehensive Cancer Network, USA (12)</b>	<b>Secretaría de Salud de México (13)</b>	<b>Japanese Gastric Cancer Association (14)</b>
<b>Esquema adyuvante de primera línea</b>	ECF ó cisplatino+5-FU+ trastuzumab para Her2/neu <sup>+</sup>	ECF ó cisplatino+5-FU	ECF ó cisplatino+5-FU+ trastuzumab para Her2/neu <sup>+</sup>	S-1 + cisplatino
<b>Esquema neoadyuvante*</b>	ECF ó EOX	cisplatino+5-FU+ trastuzumab para Her2/neu <sup>+</sup>	ECF ó DCF	En investigación
<b>Esquema de segunda línea</b>	Irinotecan	No hay recomendación	No hay recomendación	No hay recomendación

Tabla 1. Esquemas de tratamiento quimioterapéutico para el CG. ECF=Epirubicina (E), Cisplatino (C), 5-FU (F). EOX=Epirubicina (E), Oxaliplatino (O), Capecitabina (X). S-1= tegafur+gimeracil+oteracilpotásico. DCF=Docetaxel (D), Cisplatino (C), 5-FU (F). \* Esquema neoadyuvante para cáncer metastásico y localmente avanzado.

Aunque varios estudios clínicos justifican el uso de la quimioterapia adyuvante y neoadyuvante en el CG, en general no existe un consenso sobre cuál debería ser el esquema estándar, por lo que varios países han adoptado diferentes esquemas (tabla 1). Aun así, el uso

de fluoropirimidinas como el 5-fluorouracilo (5-FU), se han convertido en los fármacos de referencia para la mayoría de los tratamientos y estudios clínicos actuales (11, 15).

Aunque no existe una guía específica de tratamiento clínico-quirúrgica para el CCR en México, según las recomendaciones de la Secretaría de Salud, la columna vertebral del tratamiento quimioterapéutico del CCR está basado principalmente en el uso de fluoropirimidinas y compuestos análogos a los que se les ha sumado el Oxaliplatino y el Irinotecan (tabla 2).

	<b>European Society for Medical Oncology, UK</b>	<b>National Comprehensive Cancer Network, USA</b>	<b>Secretaría de Salud de México</b>	<b>Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (16)</b>
<b>Esquema adyuvante de primera línea</b>	FOLFOX4 + Panitumumab/ Cetuximab para Kras wt ó CAPEOX	FOLFOX ó 5-FU + LV ó Capecitabina	FOLFOX ó FOLFIRI ó CAPEOX +/- Bevacizumab	5-FU + LV ó Capecitabina ó FOLFOX4
<b>Esquema neoadyuvante*</b>	5-FU+ LV ó CAPEOX ó FOLFOXIRI + Bevacizumab	FOLFIRI+ Panitumumab/Cetuximab para Kras wt ó FOLFIRI+ Bevacizumab	5-FU ó 5-FU + LV	5-FU+LV +/- Bevacizumab ó CAPEOX +/- Bevacizumab ó FOLFOX4 + Panitumumab/Cetuximab para Kras wt ó FOLFIRI+ Panitumumab/Cetuximab para Kras wt
<b>Esquema de segunda línea</b>	FOLFOX + Bevacizumab ó FOLFIRI + Afibercept	FOLFOX + Bevacizumab ó CAPEOX + Bevacizumab ó FOLFIRI + Afibercept		FOLFOX4 + Bevacizumab ó FOLFIRI + Bevacizumab

Tabla 2. Esquemas de tratamiento quimioterapéutico para el CCR. FOLFOX= Ácido Folinico (LV), 5-FU, Oxaliplatino. CAPEOX= Capecitabina, Oxaliplatino. FOLFOXIRI = 5-FU, Oxaliplatino, Irinotecan. FOLFIRI= Ácido Folinico (LV), 5-FU, Irinotecan. \* Esquema neoadyuvante para cáncer metastásico y localmente avanzado

La evidencia clínica sugiere un beneficio superior con el esquema combinado basado en 5-fluorouracilo, Leucovorina y Oxaliplatino (FOLFOX) en términos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global frente a otros esquemas de tratamiento en la quimioterapia adyuvante del CCR, así como un beneficio en términos de supervivencia en

la terapia paliativa del CCR avanzado frente a un tratamiento exclusivamente de soporte (17). La tasa de supervivencia global a tres años de los esquemas basados en 5-FU, alcanza el 86% en pacientes con CCR no metastásico y dentro de los efectos tóxicos del tratamiento, los más comunes son neutropenia (54%), náuseas (37%), neuropatía (38%) y anemia (33%). Más recientemente se han introducido los productos de la terapia molecular dirigida como el Cetuximab, el Bevacizumab y el Panitumumab, sin embargo, debido a su alto costo en México estos agentes están al alcance de unos pocos pacientes generalmente vinculados a estudios clínicos financiados por la industria farmacéutica y aquellos beneficiarios de seguros médicos privados (7).

### **1.3. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos de las fluoropirimidinas: 5-FU**

Como se ha mencionado previamente, las fluoropirimidinas utilizadas en monoterapia o en combinación con otros agentes componen la columna vertebral del tratamiento quimioterapéutico del CG y del CCR, siendo el 5-FU de administración sistémica el fármaco más antiguo de esta familia de agentes citotóxicos y el de más amplio uso en la actualidad.

Los efectos citotóxicos del 5-FU se han relacionado a tres de sus metabolitos: 1) La 5-fluorouridina-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP), el cual se puede incorporar en el ADN y genera la formación de sitios abásicos (AP) por el sistema BER (Reparación por Escisión de Bases), 2) La 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP), que se incorpora al ARN y altera su proceso de maduración a mARN (18) y 3) La 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP). Este último metabolito se ha identificado como el principal responsable del efecto antitumoral del 5-FU. Mediante la formación de un complejo ternario con la enzima timidilato sintasa (TS) y el 5,10-Metilentetrahidrofolato poliglutaminado (5,10-MTHF), el FdUMP ejerce una inhibición no competitiva sobre la enzima TS, siendo esta necesaria para la síntesis de dTMP, lo cual conduce simultáneamente al desabastecimiento de dTTP y a la acumulación de dUTP, con la subsecuente incorporación errónea de este deoxinucleotido en el ADN y a su vez a la denominada apoptosis por deficiencia de timina (19-22) (Figura 1). Estudios recientes han mostrado evidencia de los mecanismos moleculares asociados al daño causado por el 5-FU sobre el ADN mediante la incorporación de dUTP y FdUTP y su reparación mediante el sistema BER, aunque la relevancia y contribución de este efecto en



El rango óptimo de área bajo la curva (AUC) para 5-FU ha sido propuesto en 20-25 mg\*h/L en combinación con Leucovorina (LV) y en 25-30 mg\*h/L en combinación con cisplatino (32, 33). Estos valores de AUC en estado estacionario se corresponden con concentraciones en estado estacionario ( $C_{EE}$ ) de 2500-3000 ng/mL para infusiones de 8h y de 830-1040 ng/mL para infusiones de 24 h. Los estudios farmacocinéticos previos indican que para obtener resultados reproducibles y con el fin de monitorear la concentración plasmática del fármaco, debe tomarse la muestra sanguínea hacia el final de la infusión, durante el estado estacionario, cuidando de no tomar muestras cuando en la bomba de infusión se haya agotado la solución del fármaco, dado que la concentración cae rápidamente 30 minutos después de suspendida la infusión (30). De esta manera en infusión continua solo se requiere de una muestra recolectada en el estado estacionario, esto es, de entre 2 h de iniciada, durante la infusión y hasta el final de la misma (33, 34).

Una vez establecida la concentración del fármaco en el estado estacionario, el AUC se puede calcular usando la siguiente fórmula:

$$AUC_{Tic} = C_{EE} * Tic \quad [\text{fórmula 1}]$$

Dónde:  $AUC_{Tic}$  = área bajo la curva durante el tiempo de infusión continua Tic,  $C_{EE}$  = Concentración plasmática en el estado estacionario, Tic = Intervalo de tiempo de infusión continua. Esta fórmula para un periodo de infusión de 24 horas se convierte en:

$$AUC_{24h} (\text{mg} \cdot \text{h/L}) = C_{EE} (\text{ng/mL}) * 24\text{h} / 1000 \quad [\text{fórmula 2}]$$

Siendo  $C_{EE}$  = Concentración del fármaco en el estado estacionario (30).

#### **1.4. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos de las fluoropirimidinas: Capecitabina**

La capecitabina es un profármaco del 5-FU de administración oral usado en el tratamiento sistémico del cáncer colorrectal, así como en el tratamiento de otros tipos de tumores. Químicamente es un carbamato derivado de la 5'-deoxi-S-fluorouridina (5'dFUR), el cual es absorbido a nivel intestinal para luego ser convertido primero en 5'-deoxi-S-fluorocitidina (5'dFCR) por acción de la carboxilesterasa hepática y luego en 5'dFUR por acción de la citidina desaminasa (CDA), tanto a nivel hepático como en el tejido tumoral. La 5'dFUR es posteriormente convertida en el fármaco activo 5-FU, por acción de la timidina fosforilasa



(TP), aprovechando el hecho de que la actividad de esta enzima es de 3 a 10 veces mayor en los tejidos tumorales que en sus contrapartes normales producto de un mayor nivel de expresión de la enzima en estos tejidos, con la excepción del hígado en el que los niveles de actividad son similares entre el tejido tumoral y el tejido no tumoral (35-41)(figura 2).

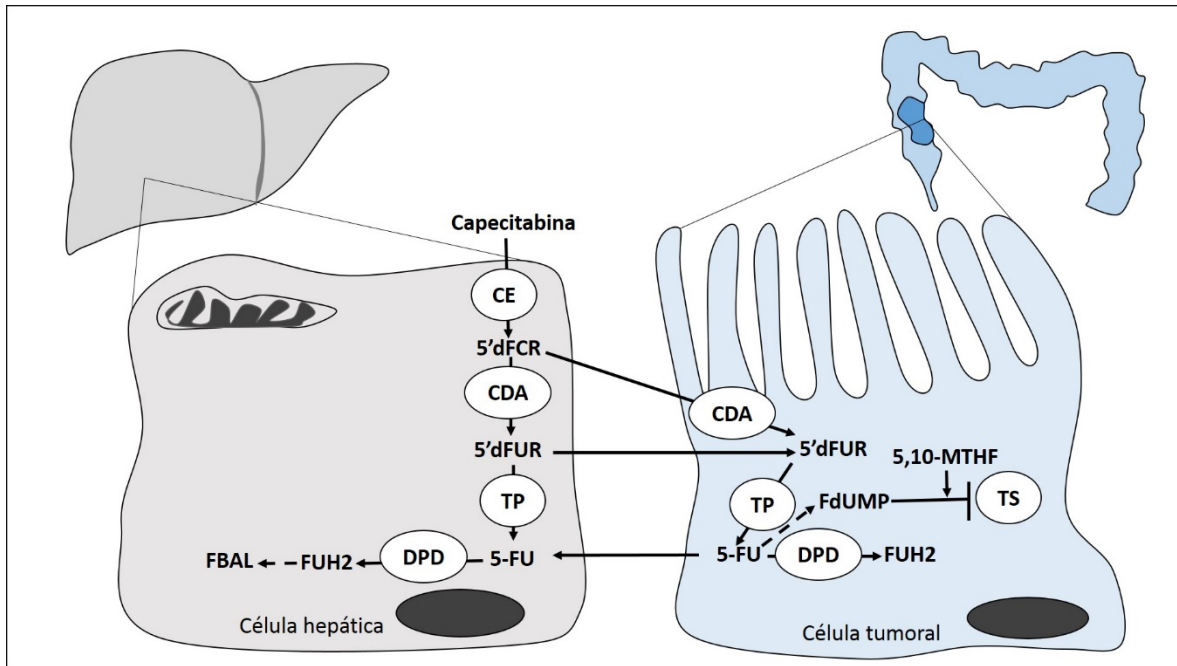


Figura 2. Vías de activación y metabolismo de la capecitabina. CE=carboxil esterasa hepática. CDA=citidina desaminasa. TP=timidina fosforilasa. DPD=dihidropirimidina deshidrogenasa. TS=timidilato sintasa. Los metabolitos se describen en el cuerpo del documento. La flecha truncada indica inhibición. Las flechas discontinuas indican varios pasos enzimáticos sucesivos.

La dosis diaria recomendada de capecitabina es de 2500mg/m<sup>2</sup> dividida en dos dosis, una cada 12h administradas dentro de los 30 minutos después de las comidas por vía peroral, en un régimen de dos semanas, seguidas de un periodo de descanso de una semana. Después de la administración oral de 1250 mg/m<sup>2</sup> de capecitabina, esta es absorbida extensiva y rápidamente en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad del 98%, lo que permite alcanzar una C<sub>max</sub> de 3-4mg/L a un t<sub>max</sub> de 2 horas. La capecitabina se une en un 50% a las proteínas plasmáticas, con predominancia a la albúmina. Su tiempo de vida media (t<sub>1/2</sub>) es de 0,55 – 0,89 h con una excreción principalmente renal, en la que un 51-62% es excretado en la forma de FBAL y un 7-11% en la forma de 5'dFUR. La dosis de capecitabina debe ser ajustada atendiendo al aclaramiento de creatinina y está contraindicada en pacientes con insuficiencia renal grave (42).

La capecitabina y sus metabolitos muestran un incremento lineal en su  $C_{max}$  y en el AUC con la dosis administrada, sin que se haya observado acumulación plasmática de este con la administración repetida. Después de la administración de la capecitabina se observa una concentración plasmática del fármaco activo (5-FU) muy baja, con una  $C_{max}$  del orden de 0,22-0,31 mg/L y una AUC de 0,461-0,698 mg\*h/L. El tiempo de vida media del 5-FU después de la administración de la capecitabina es similar al que se obtiene con la administración del compuesto parental (43, 44). El efecto farmacológico y el metabolismo de la capecitabina esta mediado por su transformación en 5-FU, por lo que un aspecto importante a considerar de este fármaco, es que debido a sus características farmacocinéticas, la sensibilidad al mismo se correlaciona con la razón de actividad *in vitro* de las enzimas timidina fosforilasa/dihidropirimidina deshidrogenasa (TP/DPD), encargadas de su activación y detoxificación respectivamente en el hígado y en las células tumorales (45)(figura 2).

### **1.5. Biomarcadores genómicos de la respuesta y la toxicidad a fluoropirimidinas**

Uno de los primeros reportes en cuanto a toxicidad inducida por 5-FU en un estudio clínico a gran escala, indicó la muerte de 10 % de los pacientes, como consecuencia de la administración del fármaco (46). Desde entonces el número de reportes de toxicidad relacionada con este fármaco se ha incrementado, hecho relacionado con la amplia utilización del 5-FU en la mayoría de los esquemas de tratamiento de los tumores del aparato digestivo. En consecuencia, se ha determinado que aproximadamente 11% -30% de los pacientes a los que se les administra 5-FU, desarrollan algún tipo de respuesta tóxica de grado 3 o 4 (Respuesta tóxica grave según las guías CTCAE) (47, 48). Dentro de estas respuestas tóxicas se han reportado anemia, neutropenia, trombocitopenia, leucopenia, diarrea, síndrome mano-pie y mucositis (49-51).

Se ha descrito la existencia de un defecto congénito asociado a la toxicidad por 5-FU, lo que ha permitido que en individuos con deficiencias en la ruta metabólica de la degradación de las pirimidinas y que no exhiben manifestaciones clínicas pueden desarrollar eventos de toxicidad grave cuando se les administra un análogo citotóxico del uracilo. Los autores de este reporte proponen un defecto en la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) como la causa de la toxicidad desarrollada ante la administración del 5-FU (52).

La enzima DPD presenta una considerable variación entre la población. Se ha estimado que un 3-5% de los sujetos presentan una baja actividad de la misma, por lo que se le ha relacionado con los efectos tóxicos causados por la administración de 5-FU y compuestos análogos en esta población (53, 54). Se ha reportado que hasta un 59 % de los pacientes que reciben 5-FU y experimentan algún efecto tóxico grave, son deficientes en la enzima DPD en relación con alguna variante en el gen. Aunque la sensibilidad de estas variantes para predecir los efectos tóxicos es baja, motivo por el cual aún no se han establecido como marcadores de riesgo a toxicidad por 5-FU en el contexto clínico (55, 56). Aunque la mayoría de las variantes identificadas hasta la fecha no tienen un impacto significativo en la actividad de la enzima, un haplotipo correspondiente a tres variantes polimórficas intrónicas y a un SNV no sinónimo en la región codificante del gen ha sido asociado directamente a eventos de toxicidad grave con resultados fatales en pacientes sometidos a tratamiento con 5-FU, resaltando la importancia de los polimorfismos en regiones no codificantes de este gen en la respuesta clínica y la relativa diferencia de sus frecuencias alélicas entre varias poblaciones europeas (57). A la fecha se han reportado 10 haplotipos basados en SNVs y deleciones e inserciones para el gen *DPYD* en la base de datos PharmGKB, asociados a una deficiencia en la actividad enzimática de DPD (58). Una de estas variantes en el gen *DPYD* y por mucho la más investigada, *DPYD*\*2A (IVS14 +1G>A/ c.1905+1G>A) la cual genera la pérdida del exón 14 y por consiguiente, la anulación de la actividad de la enzima, se ha asociado con efectos tóxicos graves, incluso letales, en pacientes que reciben tratamiento basado en 5-FU (59).

Una de las consecuencias más importantes a nivel clínico de la deficiencia parcial o total de la enzima DPD en pacientes que reciben 5-FU como parte de su tratamiento, es que los efectos tóxicos se pueden presentar también con otras fluoropirimidinas incluyendo las de más reciente desarrollo, lo que limitaría el uso de estos agentes en pacientes homocigotos y heterocigotos para polimorfismos con un impacto funcional negativo en la enzima y justifica su análisis previo a la instauración del tratamiento quimioterapéutico (60).

Se han descrito algunas variantes de línea germinal asociados al gen de la enzima timidilato sintasa (TS) con implicación directa en la eficacia del tratamiento basado en fluoropirimidinas. Como se mencionó anteriormente, la Fluoro deoxiuridina 5'-monofsfato (FdUMP) se une covalentemente a la enzima TS una vez está ha formado un complejo con

el 5,10-metilen tetrahidrofolato, ocasionando de este modo la inhibición de la enzima, paso esencial para el efecto antitumoral del 5-FU (22). Por lo tanto, los cambios en el nivel de expresión de la TS en el tejido tumoral o modificaciones en la estructura de la enzima que alteren su patrón de inhibición por el FdUMP afectarían la respuesta al tratamiento con 5-FU y compuestos análogos (61).

Apoyando esta hipótesis, se ha evidenciado que la amplificación del *TYMS* en las metástasis del tejido hepático de pacientes con CCR tratados pre-quirúrgicamente con 5-FU, parece correlacionarse con menores tiempos de supervivencia y por ende con un peor pronóstico (62).

En un estudio clínico de fase II en el que se evaluó la eficacia y la toxicidad del esquema FOLFOX-6 modificado en pacientes con CG avanzado y su relación con ciertos polimorfismos en genes de respuesta a ambos fármacos (5-FU y Oxaliplatino), se demostró la asociación significativa entre la variante polimórfica del gen *TYMS*, representado en una delección de 6 pb en la región 3'UTR, con un tiempo de progreso de la enfermedad y una supervivencia global significativamente más favorables que en el resto de los pacientes. Teniendo en cuenta que esta variante se ha asociado con reducidos niveles de expresión de la enzima y dado que está es el blanco farmacológico del 5-FU, es posible que la presencia de la delección (6bp-) incremente la sensibilidad del tumor al efecto de este fármaco (63, 64). Esta hipótesis está respaldada por la observación de que las variantes del gen *TYMS* más relevantes en el contexto clínico, son aquellas que modifican el nivel de expresión de la enzima (65). En este mismo sentido, en la expresión del gen *TYMS* tendría relevancia la presencia de una variante de repeticiones variables en tándem (VNTR) con repeticiones dobles (2R) o triples (3R) de 28 pb en la región 5'UTR del gen *TYMS*, en donde la expresión de la enzima se ve favorecida por la presencia de esta última variante (3R) (66). A este respecto, es interesante la observación de que en relación con este VNTR, la frecuencia de la variante 3R, así como del genotipo 3R/3R es significativamente mayor en poblaciones del este asiático que en poblaciones caucásicas (67% China vs 38% UK) (67, 68). De esta manera, cualquier efecto funcional clínicamente válido de esta variante tendría relación con posibles diferencias étnicas en la respuesta a cualquier tratamiento quimioterapéutico dirigido contra la enzima TS como blanco farmacológico.

A pesar de que algunos estudios han mostrado evidencia de la asociación entre la variante VNTR y la respuesta clínica en pacientes con tumores gastrointestinales, otros estudios han fallado en mostrar tal asociación. Estas discrepancias dificultan la utilización de tales variantes como marcadores de pronóstico en el CG y en el CCR y por el contrario instan a la realización de nuevos estudios que permitan su validación definitiva en el contexto clínico (69). Más aún, no existe información acerca de la distribución de genotipos para estas variantes en la población mexicana ni su relación con la respuesta o la toxicidad a la quimioterapia, por lo que en el marco de una medicina de precisión dicha información se convierte en indispensable a la hora de tomar decisiones terapéuticas una vez se incorporen en la práctica clínica.

## JUSTIFICACIÓN

---

Las neoplasias del tracto gastrointestinal son una causa importante de morbilidad y mortalidad en la población mexicana. A pesar de que la quimioterapia representa un beneficio en el tiempo de sobrevida de los pacientes con estas neoplasias, el esquema utilizado actualmente para el CCR y el CG avanzados basado en 5-FU y un compuesto de platino, se asocia con elevados niveles de toxicidad y frecuentemente en fracaso en la respuesta. Existe evidencia que la toxicidad y la respuesta generada por estos compuestos tiene una base genética resultante de variantes en los genes relacionados con el transporte, metabolismo y en los blancos de estos fármacos. En especial la enzima TS, blanco molecular del 5-FU, parece tener implicaciones no solo en la respuesta, si no también en la toxicidad a 5-FU y compuestos análogos, por lo que sería un biomarcador de respuesta y toxicidad idóneo de poder analizarse en sangre y comprobarse su utilidad clínica en pacientes mexicanos.

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL

Establecer el perfil farmacogenético del gen *TYMS* y su relación con la respuesta clínica y la toxicidad del esquema de quimioterapia de primera línea para las neoplasias gastrointestinales.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar y validar una metodología rápida, económica y confiable para la identificación de las variantes presentes en las regiones no codificantes del gen *TYMS*.
2. Evaluar la posible asociación entre las variantes en las regiones no codificantes del gen *TYMS* y la respuesta a la quimioterapia de primera línea en pacientes con neoplasias gastrointestinales.
3. Evaluar la posible asociación entre las variantes en las regiones no codificantes del gen *TYMS* y la toxicidad generada por la quimioterapia de primera línea en pacientes con neoplasias gastrointestinales.
4. Analizar la expresión de los genes de respuesta a la quimioterapia de primera línea en el tejido blanco (*TYMS*, *ERCC1*) y para la enzima TS, la asociación de su expresión con las variantes de línea germinal en las regiones no codificantes del gen.

### **2.1. Tipo de estudio:**

Este trabajo se corresponde con un estudio farmacogenómico longitudinal, de corte prospectivo, basado en gen-candidato, con una población de pacientes clínicamente diagnosticados con Cáncer Gástrico (CG), Cáncer Colorrectal (CCR) o Cáncer Gastro-Esofágico (CGE) en el Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario José Eleuterio González y en la UMAE N°25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), ambos de la ciudad de Monterrey y en el Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS en la ciudad de Guadalajara. Así mismo se reclutó una muestra representativa de individuos clínica e histopatológicamente sanos, en el departamento de Gastroenterología del Hospital Universitario en Monterrey. Tanto pacientes como sujetos sanos, debieron cumplir con los criterios de inclusión del estudio y vincularse al mismo a través de la firma del consentimiento informado respectivo. El protocolo general de investigación de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Hospital Universitario con el número BI13-002 y por la Comisión Nacional de Investigación del IMSS con el número de registro R-2015-785-024.

### **2.2. Reclutamiento de los pacientes**

#### **Pacientes oncológicos**

Se vincularon al estudio los pacientes que acudieron a los servicios de oncología de las instituciones mencionadas en el periodo comprendido entre mayo de 2013 y mayo de 2016 y que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- a. Estar clínicamente diagnosticado(a) con adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de colon o recto o adenocarcinoma esofágico mediante la confirmación por el análisis clínico patológico del tejido tumoral.
- b. Ser mayor de 18 años.



- c. Ser candidato(a) al tratamiento, bien neoadyuvante o bien adyuvante, según el esquema quimioterapéutico basado en fluoropirimidinas (5-FU o Capecitabina) y un compuesto de platino (Cisplatino u Oxaliplano)
- d. Ser mexicano(a) de nacimiento y tener padres mexicanos.
- e. Aceptación voluntaria a vincularse al estudio con la firma del consentimiento informado.

Como criterios de exclusión se incluyen: inexistencia del diagnóstico clínico confirmado de cáncer, historia o presencia de otra neoplasia distinta a las indicadas en los criterios de inclusión, paciente no candidato a tratamiento quimioterapéutico, paciente menor de 18 años, paciente en estado de embarazo y negación a la firma del consentimiento informado. Como criterios de eliminación se incluyen: información clínica incompleta, material biológico insuficiente y/o muestras en mal estado o que no cumplen con los criterios de calidad para la realización de los análisis.

Adicionalmente se reclutó un número determinado a conveniencia de pacientes sometidos a cirugía para la resección del tejido tumoral en el servicio de cirugía del Hospital Universitario, que cumplieron con los criterios de inclusión mencionados anteriormente y que aceptaron vincularse voluntariamente al estudio.

### **Sujetos sanos**

Los individuos sanos se reclutaron a conveniencia en el departamento de Gastroenterología del Hospital Universitario de entre los pacientes que acudieron al servicio en el periodo comprendido entre Mayo de 2013 y Octubre de 2014 para someterse a estudios de colonoscopia o endoscopia con fines de diagnóstico, que aceptaron participar en el estudio y que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- a. Ser mayor de 18 años.
- b. No tener diagnóstico clínico de cáncer, pólipos, metaplasia o displasia con corroboración mediante análisis histopatológico de biopsias de tejido.
- c. Ser mexicano(a) de nacimiento y tener padres mexicanos.
- d. Aceptación voluntaria a vincularse al estudio con la firma del consentimiento informado

### 2.3. Tratamiento quimioterapéutico de los pacientes

Los esquemas quimioterapéuticos para el tratamiento de los pacientes se indican en las figuras 3, 4, 5 y 6. En general todos están basados en el uso de fluoropirimidinas (5-FU o Capecitabina) en combinación o no con un compuesto de platino (Cisplatino u Oxaliplatino).

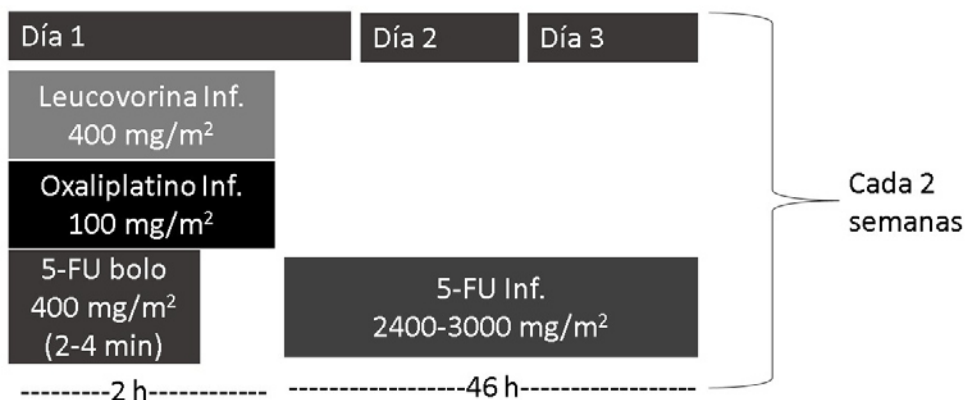


Figura 3. Esquema de tratamiento FOLFOX6 para pacientes con CCR.

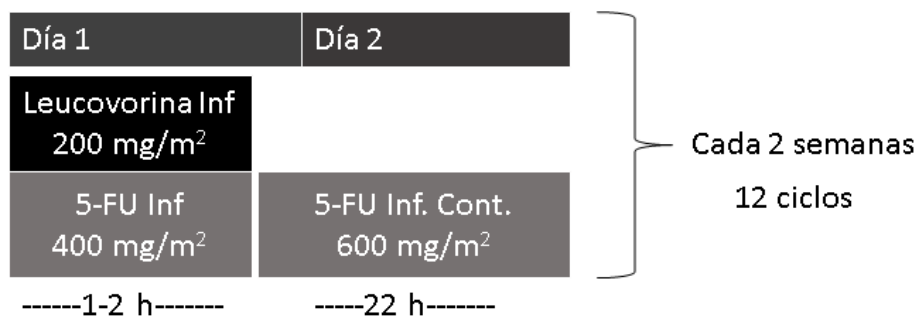


Figura 4. Esquema de tratamiento de Gramont para pacientes con CCR.

La Leucovorina (ácido folínico) es un coadyuvante que sinergiza el efecto de las fluoropirimidinas, pero que no tiene efecto citotóxico propio.

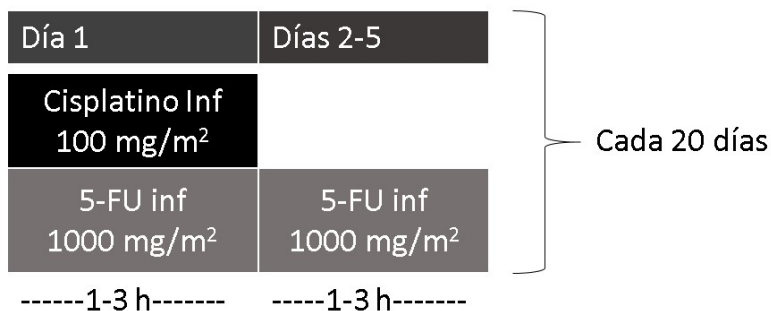


Figura 5. Esquema de tratamiento CF para pacientes con CG y CGE.

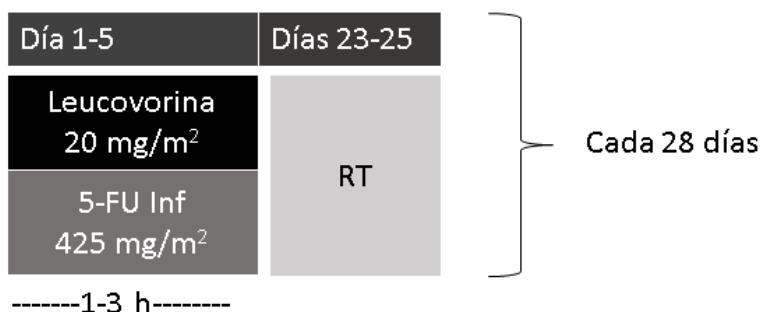


Figura 6. Esquema de tratamiento McDonald para CG

Como alternativa al tratamiento de los pacientes con CCR metastásico, también se dispone del esquema XELOX que corresponde a un tratamiento con ciclos de tres semanas compuesto de una infusión intravenosa de Oxaliplatino 130 mg/m<sup>2</sup> en el día 1, seguido de Capecitabina (Xeloda®) 1000 mg/m<sup>2</sup> vía oral dos veces al día después de las comidas.

Previamente al inicio del tratamiento se determinó el estado del paciente según la escala ECOG y se registraron los resultados de las pruebas de laboratorio clínico (biometría hemática, perfil hepático, química sanguínea) y cualquier otra información clínica que fuese considerada relevante para el estudio.

#### 2.4. Recolección de las muestras de sangre periférica y de tejido tumoral

Las muestras de tejido tumoral se recolectaron de acuerdo con los protocolos establecidos en cada institución para la confirmación del diagnóstico y/o para la clasificación histopatológica del tejido en las respectivas unidades quirúrgicas con la excepción de que no se utilizó paraformadehído para la fijación de las mismas. La selección y los cortes de las muestras fue realizada por patólogos en cada una de los respectivos servicios de patología de las

instituciones. Las muestras de tejido en fresco se lavaron con solución salina y se incubaron con una solución al 30% de sacarosa. Posteriormente se congelaron en medio Tissue-Tek® Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) (Sakura Finetek, USA) secuencialmente a -20°C por 10 minutos y luego a -80°C y se almacenaron a esta última temperatura hasta su análisis. Parte de estas muestras de tejido tumoral se procesaron para el aislamiento y purificación del ARN necesario para los análisis de los perfiles de expresión de los genes *TYMS* y *ERCC1* y otra parte para el aislamiento y purificación del gADN para los análisis de genotipificación.

Las muestras de sangre periférica venosa (aprox. 5 mL) se recolectaron en tubos con EDTA, durante el primer o segundo ciclo de tratamiento quimioterapéutico para el aislamiento del material genético. Esta se mantuvo a 4°C por un periodo no mayor a 30 minutos hasta su procesamiento. La sangre total se centrifugó a 1500 rpm por 12 min. para separar el plasma y el paquete celular, los cuales se almacenaron separadamente a -80°C en tubos criogénicos hasta su uso posterior.

## **2.5. Información sociodemográfica, seguimiento clínico y farmacoterapéutico de los pacientes**

Se recolectó la información sociodemográfica de los pacientes y cualquier otro tipo de información adicional a la historia clínica que se consideró relevante para la realización del estudio. Se recabaron los hallazgos clínicos relacionados con la respuesta clínica objetiva y los eventos tóxicos del tratamiento a partir de los formatos respectivos previamente validados y aprobados por los respectivos comités de ética de las instituciones participantes. Para la clasificación de los eventos tóxicos se siguió una versión traducida al español y validada por médicos oncólogos de la guía CTCAE v4 (Common Terminology Criteria for Adverse Events), para la clasificación de la respuesta clínica se siguió la guía RECIST v1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). Los datos obtenidos se usaron para alimentar una base de datos integrada con toda la información clínica y sociodemográfica de los pacientes.

## **2.6. Aislamiento de gADN de sangre periférica**

Para el aislamiento del material genético para el análisis por PCR-RFLP se utilizó la metodología basada en Fenol:Cloroformo seguido por precipitación con Etanol de acuerdo con un protocolo ya reportado (70). Se analizó la integridad del gADN obtenido mediante

electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se cuantificó y se evaluó su pureza por la relación de absorbancias 260/280 nm, mediante análisis espectrofotométrico en el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

## **2.7. Aislamiento de gADN a partir de tejido**

Las muestras pareadas de tejido (tumoral y no tumoral adyacente) de cada paciente se analizaron mediante tinción con Hematoxilina y Eosina a partir de cortes histológicos para establecer las regiones de concentración de las células tumorales y de las células normales, de estas regiones se realizaron 100 cortes de 10  $\mu\text{m}$  c/u en frío (-20°C) mediante el equipo Cryostat Microm HM550 (Fisher Scientific, USA). A cada muestra se le adicionó 1mL de buffer de lisis (Tris HCl 10 mM pH 8; EDTA 5mM; SDS 0,5%) seguido de 100  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K (Bioline, USA) y se incubó a 65°C toda la noche. Se adicionó 350  $\mu\text{L}$  de Acetato de Amonio 7,5M y se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó un volumen de Isopropanol, se mezcló por inversión y se obtuvo el gADN por centrifugación a 14000 rpm por 8 minutos a 4°C. El gADN se lavó dos veces con Etanol al 75% seguido de centrifugación a 10000 rpm por 5 minutos. Finalmente se resuspendió en buffer TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM), se cuantificó y se evaluó su pureza espectrofotométricamente en el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA). El gADN obtenido finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

## **2.8. Extracción de ARN a partir de las muestras de tejido y generación del cDNA mediante transcripción inversa.**

A partir de las mismas muestras de tejido utilizadas para la extracción del gADN, se realizaron 100 cortes de 10  $\mu\text{m}$  c/u en frío (-20°C) mediante el equipo Cryostat Microm HM550 (Fisher Scientific, USA). A cada muestra se le adicionó 1 mL del reactivo TRizol® (Invitrogen, USA) y se siguió el protocolo del fabricante. Una vez obtenido el ARN celular total, este se resuspendió en agua grado biología molecular libre de DNasa y RNasa (IDT, USA), se cuantificó y se evaluó su pureza espectrofotométricamente en el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA) y posteriormente se incubó con DNase I Amplification Grade (Invitrogen, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente se almacenó a -80°C hasta su uso.

El cADN de cada muestra se obtuvo mediante el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis (Invitrogen, USA) utilizando 400 ng de ARN como material de partida y siguiendo las indicaciones del fabricante. El cADN resultante a un volumen de 20 µL se almacenó a -20°C hasta su uso posterior en los ensayos de expresión.

## 2.9. Análisis de expresión (mARN) mediante qPCR

Se analizó la expresión de los genes de interés *TYMS* y *ERCCI* a partir de las muestras de tejido tumoral y no tumoral adyacente en cada paciente. Se realizó la reacción de amplificación a un volumen de 10 µL utilizando el kit SYBR® Green Master Mix (BIO-RAD, USA) en el equipo CFX96™ Real Time System (BIO-RAD, USA), con 250nM de los oligos diseñados *In house* (tabla 3), específicamente para los genes de interés (Int.) y para los genes normalizadores (Norm.) y con 1 µL del cADN.

Gen	Tipo	Oligo sentido (FW) 5'-3'	Oligo antisentido (RV) 5'-3'
<i>TYMS</i>	Int.	TACCTGGGGCAGATCCAACACATC	ACAGCAACTCCTCCAAAACACCC
<i>ERCCI</i>	Int.	ACAAAACGGACAGTCAGACCC	GGGTACTTTCAAGAAGGGCTCG
<i>URMI</i>	Norm.	AAACATCGAGTCACTTTGCC	TAGTCCAGCTCACCCAGTAG
<i>B2M</i>	Norm.	GAGGCTATCCAGCGTACTCCA	CGGCAGGCATACTCATCTTTT

Tabla 3. Pares de oligos utilizados para la amplificación (qPCR) de los genes de interés y normalizadores.

El programa de amplificación utilizado es el siguiente: 95°C x 3 min., seguido de 40 ciclos de [95°C x 15 s., 64°C x 30 s. y 72°C x 30 s].

Se analizó la eficiencia de amplificación de cada uno de los genes mediante curvas estándar y se evaluó la estabilidad de la expresión de los genes normalizadores a diferentes diluciones de cADN en un rango logarítmico, para muestras de tejido gástrico y colorrectal. Se realizaron replicas técnicas de cada muestra en cada corrida y adicionalmente, todos los análisis se realizaron por duplicado desde la obtención del cADN a partir del ARN.

El análisis de expresión se realizó mediante el método de expresión relativa  $\Delta\Delta C_t$  (71).

## 2.10. Genotipificación de las variantes en el gen *TYMS* mediante PCR-RFLP

Con el fin de evaluar las variantes tipo VNTR y los SNVs en la región 5'UTR y el indel de 6bp en la región 3'UTR del gen *TYMS* se realizó el análisis de estas variantes mediante PCR-RFLP utilizando oligos específicos (tabla 4).

Variantes	Alelos posibles	Oligos	Productos*
rs45445694	1R, 2R, 3R, 4R	Fw 5'-CGGGAAAAGGCGCGCGGAA-3'	3R: 153 pb, 2R: 125 pb.
rs183205964	G, C	Rv 5'-GCAGCTCCGAGCCGGCCA-3'	
rs2853542	G, C		
rs151264360	+6pb (inserción), - 6pb (delección)	Fw 5'-CAAATCTGAGGGAGCTGAGT-3' Rv 5'-CAGATAAGTGGCAGTACAGA-3'	Inserción: 148pb, delección: 142 pb.

Tabla 4. Oligos usados para la genotipificación de las variantes en la regiones promotora 5'UTR y 3'UTR del gen *TYMS*. \*Para la variante rs45445694 se indican solo los alelos más frecuentes en la población general.

Para la amplificación de la región que comprenden las variantes VNTR y los SNVs en la región promotora se utilizó el reactivo GoTaq® Green Master Mix (Invitrogen, USA), junto con 400 nM de cada oligo; 0,5 mM de EDTA y 100 ng de gADN. El programa de amplificación consistió de 94°C x 5min; 30 ciclos de [94°C x 30 s, 65,6°C x 30 s y 72°C x 45 s] seguido de 72°C x 3 min. Del volumen total de producto de amplificación, se sometió 5 µL a electroforesis en gel de agarosa al 3% en buffer TBE 1X teñido con Gel-Red™ 1X (Biotium Inc. USA) para identificar los alelos del VNTR (rs45445694). Posteriormente se realizó la digestión de 7 µL del producto de amplificación, mediante incubación con 5U de la enzima Hae III (New England Biolabs, USA) toda la noche a 37°C. Finalmente los fragmentos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. Teniendo en cuenta el sitio de corte de la enzima Hae III (figura 7) y tomando en consideración los alelos del VNTR más frecuentemente reportados en la población general, fueron establecidos los posibles patrones de restricción esperados con la herramienta en línea NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), los cuales se muestran en la tabla 5.

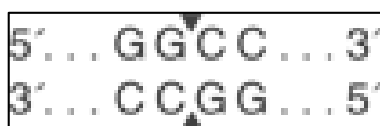


Figura 7. Sitio de corte de la enzima HaeIII en la secuencia blanco del dsADN.

Nº	Genotipo	Patrón de bandas (pb) de restricción esperado por digestión con HaeIII
1	2RG/2RG	<b>15, 44, 66</b>
2	2RG/3RGG	<b>15, 28, 44, 66</b>
3	2RG/3RGC	<b>15, 44, 66, 94</b>
4	2RC/2RC	<b>15, 110</b>
5	2RC/3RGG	<b>15, 28, 44, 66, 110</b>
6	2RC/3RGC	<b>15, 44, 94, 110</b>
7	2RG/2RC	<b>15, 44, 66, 110</b>
8	3RGC/3RGC	<b>15, 44, 94</b>
9	3RGC/3RGG	<b>15, 28, 44, 66, 94</b>
10	3RGG/3RGG	<b>15, 28, 44, 66</b>

Tabla 5. Patrones de restricción con la enzima Hae III para los productos de amplificación del VNTR en la región promotora del gen *TYMS*. Los tamaños indicados en negrilla corresponden a las bandas duplicadas que se visualizan con mayor intensidad por electroforesis.

La secuencia de los oligos para la amplificación de la región que comprenden la variante tipo indel de 6pb en la región 3'UTR se encuentra reportada previamente (72). Se utilizó 100ng de gADN como material de partida, junto con 300 nM de cada oligo y el reactivo GoTaq® Green Master Mix (Invitrogen, USA) en un programa de amplificación que consistió en 94°C x 5 min., 30 ciclos de [94°C x 30 s., 58°C x 45 s., 72°C x 45 s.], seguido de 72°C x 5 min. Del volumen total de producto de amplificación, se sometió 5 µL a electroforesis en gel de agarosa al 3% en buffer TBE 1X teñido con Gel-Red™ 1X (Biotium Inc. USA). Posteriormente del producto de amplificación se sometió 7 µL a digestión con 6 U de la enzima Dra I (New England Biolabs, USA) a 37°C toda la noche y posteriormente se visualizaron los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% en TBE 1X teñido con Gel-Red™ 1X (Biotium Inc. USA). La presencia de la inserción se visualizó con un patrón con dos fragmentos de 60 y 88pb a partir de la digestión del fragmento de 148pb, la ausencia de la inserción se presenta como una banda no digerida de 142pb.

Todos los análisis de genotipificación por PCR-RFLP se realizaron por duplicado para cada muestra. Los cálculos para establecer el LOD score y los valores de  $|D'|$  y  $r^2$  se realizaron con el programa SNP Analyzer™ 2.0.



### **2.11. Secuenciación y análisis por electroforesis capilar de las variantes en la región promotora del gen *TYMS***

Con el fin de validar los resultados obtenidos mediante el análisis por PCR-RFLP se realizó la secuenciación de las variantes en la región promotora del gen *TYMS* en una fracción de las mismas muestras analizadas previamente. Para ello se realizó una nueva amplificación utilizando los siguientes oligos: Sentido (TYMS\_SEC Fw) 5'-CGTGGCTCCTGCGTTTCC-3' y antisentido (TYMS\_SEC Rv) 5'-GAGCCGGCCACAGGCAT-3', en una mezcla de reacción consistente en: 1 unidad de Polimerasa GoTaq® Flexi (Promega, USA); 0,3mM dNTPs; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 nM C/oligo; 20 ng de gADN, con el siguiente programa de amplificación: 96°C x 5 min y 40 ciclos de [96°C x 15 s; 60°C x 30 s; 72°C x 10 s] seguido de 72 °C x 5 min. Los productos de amplificación se purificaron mediante ExoSAP-IT® (GE Healthcare, USA), se marcaron mediante el Kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante y se analizaron en el equipo Genetic Analyzer ABI PRISM® 3130 (Applied Biosystems, USA). El análisis de los electroferogramas se realizó mediante el programa BioEdit v7.2.5. Los experimentos para validar cada una de las secuencias de las regiones amplificadas se realizaron por duplicado a partir de muestras de gADN de diferentes individuos.

### **2.12. Análisis estadístico de los resultados**

A partir de las frecuencias genotípicas de las variantes analizadas en la población bajo estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de  $\chi^2$  de Pearson.

Con la información obtenida del genotipo de los pacientes se construyeron las tablas de contingencia y realizó el análisis de asociación (mediante el cálculo de OR) entre este y la respuesta clínica objetiva (según la guía RECIST v1.1) y los efectos tóxicos derivados del tratamiento (según la guía CTCAE v4.1). El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas  $\chi^2$  o F exacta de Fisher a un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , para definir la asociación entre genotipos y la expresión del gen *TYMS*, o entre los genotipos y las variables de respuesta clínica y toxicidad.

Se utilizó la prueba t de Student, previa comprobación de la condición de normalidad, a un nivel de significancia de  $p < 0.05$  para evaluar la hipótesis nula de no variación en la expresión (mRNA) del gen *TYMS* entre las muestras de tejido sano y de tejido tumoral.

Para las distribuciones de datos de expresión relativa de los genes de interés en tejido, que no cumplieron con la condición de normalidad se utilizaron las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney para dos grupos y Kruskal-Wallis para grupos múltiples a un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

La tabulación y el filtrado de los datos se realizaron mediante el programa Excel 2013 (Microsoft, USA). Para los análisis estadísticos y la presentación gráfica de los resultados se utilizaron los programas SPSSv22 (IBM, USA) y GraphPad Prism v6 (GraphPad Software Inc. USA).

### 3.1. Resultados del diseño y la validación del método para la genotipificación de las variantes en las regiones no codificantes del gen *TYMS*

Con el fin de desarrollar un método para la identificación de las diferentes variantes en la región de amplificación del promotor del gen *TYMS* (TSER) localizado en la región 5'UTR de la secuencia cromosómica del gen y para la genotipificación de los pacientes y sujetos sanos del estudio, se realizó una búsqueda en bases de datos para recopilar la información de todas las variantes presentes en esta región y que pudieran estar implicadas en la expresión del gen. Como resultado se seleccionaron las siguientes variantes:

- rs45445694: Corresponde a una repetición en tándem de número variable (VNTR), del cual se han reportado 1, 2, 3 y hasta 4 repeticiones de 28 pb en la región TSER.
- rs183205964: Corresponde a una transversión G/C en la 12<sup>va</sup> posición del alelo 2R del VNTR.
- rs2853542: Corresponde a una transversión G/C en la 12<sup>va</sup> posición del alelo 3R del VNTR.
- rs538469385: Corresponde a una inserción/delección (indel) de 6 pb presente en el alelo 3R del VNTR.

Adicionalmente se seleccionó la variante rs151264360 que corresponde a una inserción/delección (indel) de 6 pb presente en la región 3'UTR. A partir de información publicada previamente se ha asociado a esta variante con la expresión del gen *TYMS* y cuyo análisis por PCR-RFLP con fines de genotipificación ya se ha reportado.

La nomenclatura usada para identificar las variantes, así como la posición cromosómica de las mismas se presenta en la tabla 6.

rs <sup>1</sup>	LRG <sup>2</sup>	Alelos	Posición cromosómica
rs 45445694	LRG_783t1:c.-97_- 70CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCC GTCCCG [1][2][3][4]	1R/ 2R/ 3R/ 4R	18:657646
rs183205964	LRG_783t1:c.-86G>C	G/C	18:657657
rs2853542	LRG_783t1:c.-58G>C	G/C	18:657685
rs538469385	LRG_783t1:c.-46_-45insCCCCCG	CCCCCG/-	18:657697
rs151264360	LRG_783t1:c.447_452delTTAAAG	TTAAAG/-	18:673443

Tabla 6. Nomenclatura usada para identificar a las variantes seleccionadas y sus respectivas coordenadas cromosómicas. <sup>1</sup> A partir de la base de datos dbSNP (NCBI, USA) build 147. <sup>2</sup> LRG= Referencia genómica de locus, según recomendaciones del Human Genome Variation Society (HGV). <sup>3</sup> Posición cromosómica a partir del ensamblaje GRCh38P2 del genoma humano (NCBI, USA).

A partir de los oligos diseñados *in house*, se pudo desarrollar un método de amplificación por PCR para un fragmento del gen de la enzima timidilato sintasa en la región TSER.

Mediante el análisis por electroforesis de los amplicones resultantes fue posible establecer la presencia de los genotipos 2R/2R, 2R/3R y 3R/3R utilizando un panel de 152 muestras de gADN obtenidas de pacientes diagnosticados con CCR y reclutados en la UMAE N°25 del IMSS (Monterrey) durante el desarrollo del estudio “Genetic Study of Common Hereditary Bowel Cancers in Hispania and the Americas” (CHIBCHA).

Se corroboró la presencia del alelo 2R por la amplificación de un fragmento de 125 pb y la presencia del alelo 3R por la amplificación de un fragmento de 153 pb. Adicionalmente, realizando la digestión de estos amplicones con la enzima Hae III, fue posible identificar los alelos correspondientes a los SNVs rs183205964 y rs2853542 en este mismo grupo de pacientes (figura 8).

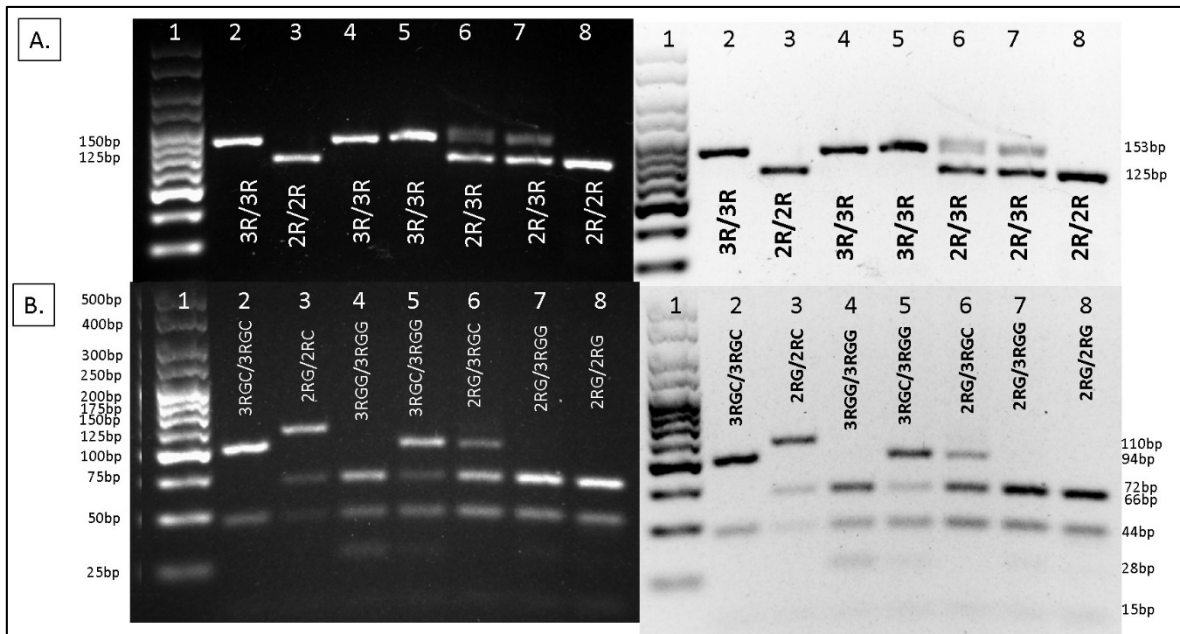


Figura 8. Imágenes de las electroforesis de los productos de amplificación para el VNTR (bloque A, izquierda en exposición UV normal, derecha en negativo) y para los productos de digestión de las muestras amplificadas en el mismo orden (bloque B, izquierda en exposición UV normal, derecha en negativo). Se indican los tamaños de los fragmentos correspondientes a los alelos 2R y 3R en los productos de amplificación. El alelo 2RC (carril 3 bloque B) fue identificado en un solo sujeto sano heterocigoto para el rs183205964.

Como resultado, el método empleado fue adecuado para establecer los diferentes genotipos de entre hasta un total de 10 genotipos posibles en todas las muestras analizadas, mediante el análisis conjunto de los productos de PCR y sus correspondientes productos de digestión, siguiendo el patrón de restricción previamente establecido (tabla 5).

No se identificaron en las muestras analizadas los alelos 1R ni 4R del VNTR, que previamente han sido reportados en otras poblaciones. No se identificó el alelo C de la variante rs183205964 en ninguno de los pacientes, por lo que en la totalidad de pacientes el genotipo resultante para los individuos homocigotos del alelo 2R en el VNTR fue 2RG/2RG. Tampoco se estableció la presencia de la inserción de 6 pb de la variante tipo inserción (rs538469385) en la región TSER del gen *TYMS*. Por este motivo esta variante no se tuvo en cuenta en los análisis de asociación posteriores.

Se determinó que en esta población de pacientes, el alelo 2R es el alelo menor para el VNTR y el alelo G es el alelo menor para la variante rs2853542. De estas dos variantes, solo la última estaba en concordancia con la ley de Hardy-Weinberg (tablas 7 y 8).

<b>VNTR (rs45445694)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
2R/2R	2R/3R	3R/3R	2R	3R
16	62	22	0.47	0.53
<sup>1</sup> H-W $p=0.016$				

Tabla 7. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del VNTR en la muestra de pacientes (n=152). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg..

<b>G/C (rs2853542)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
3RG/3RG	3RG/3RC	3RC/3RC	G	C
10	14	10	0.43	0.57
<sup>1</sup> H-W $p=0.078$				

Tabla 8. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs2853542 en la muestra de pacientes (n=152). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

La presencia de una delección de 6bp en la región 3'UTR (rs151264360) se ha relacionado con la expresión del gen *TYMS*, por lo que se decidió incluir esta variante en el proceso de genotipificación de las muestras de gADN de los pacientes. Como resultado, se pudieron amplificar los fragmentos de 142 pb y 148 pb correspondientes a la delección (6bp-) e inserción (6bp+) respectivamente. Aunque dichos fragmentos son imposibles de resolver mediante electroforesis en gel de agarosa estándar, fue posible identificar a los individuos heterocigotos (6bp+/6bp-) por la presencia de un heteroduplex en los productos de amplificación (carriles 2 y 3, bloque A de la figura 9). La identificación definitiva de los genotipos para el indel se logró mediante la digestión de los amplicones con la enzima Dra I (bloque B, figura 9).

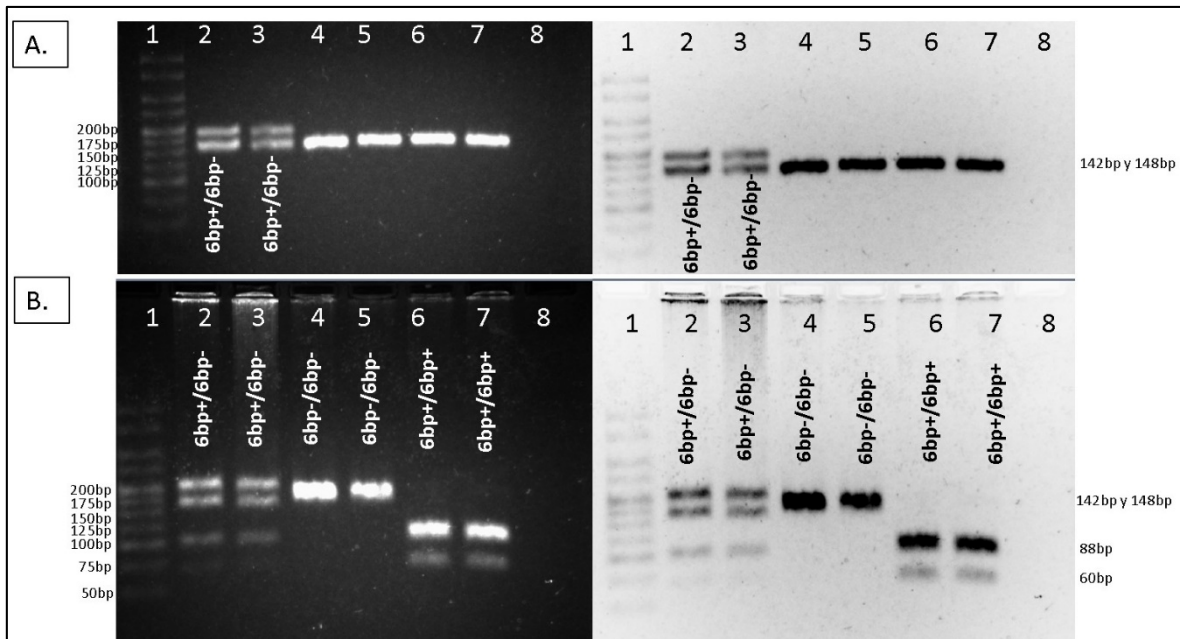


Figura 9. Imágenes de las electroforesis de los productos de amplificación para la variante en la región 3'UTR (bloque A, izquierda en exposición UV normal, derecha en negativo) y para los productos de digestión de las muestras amplificadas en el mismo orden (bloque B, izquierda en exposición UV normal, derecha en negativo). Se indican los tamaños correspondientes a los productos de restricción para la inserción (6bp+) y la delección (6bp-).

Se determinó que en la muestra de pacientes para esta variante, el alelo 6bp- es el alelo menor. Así mismo, se pudo establecer que la distribución de los genotipos está en concordancia con la ley de Hardy-Weinberg (tabla 9).

delección 6bp (rs151264360)				
Genotipos (%)			Frecuencias alélicas	
6bp+/6bp+	6bp+/6bp-	6bp-/6bp-	6bp+	6bp-
44	40	16	0.64	0.36

<sup>1</sup>H-W  $p=0.20$

Tabla 9. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de la variante rs151264360 en la muestra de pacientes con CCR (n=152) en análisis retrospectivo. <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

### 3.2. Resultados del análisis retrospectivo de asociación entre los genotipos para las variantes en las regiones no codificantes del gen *TYMS* y la respuesta clínica y la toxicidad a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas en pacientes con CCR.

A partir de la información clínica y sociodemográfica disponible de los pacientes con CCR incluidos para la validación del método de genotipificación de las variantes del gen *TYMS*, fue posible realizar un análisis de asociación con la respuesta clínica objetiva y la toxicidad desarrollada por los pacientes en relación con el tratamiento quimioterapéutico recibido basado en fluoropirimidinas. En la tabla 10 se resumen las características de los pacientes.

Características	N° de pacientes (n)	%
<b>Sexo</b>		
Hombres	97	64
Mujeres	55	36
Total	152	
<b>Edad (al momento de la vinculación al estudio)</b>		
Mediana (años)	59	
Rango (años)	28-82	
<b>Pacientes que recibieron quimioterapia</b>	101	66
Basada en fluoropirimidinas	99	65

Tabla 10. Características de los pacientes (n=152).

De esta muestra de pacientes, se seleccionó el subgrupo correspondiente a aquellos que recibieron quimioterapia basada en fluoropirimidinas (n=99). De este subgrupo, un total de 96 pacientes tenían la información clínica disponible para su categorización según la guía RECIST v1.1 (tabla 11).



<b>Categoría de respuesta</b>	<b>Respuesta clínica según RECIST v1.1.</b>	<b>n (%)</b>
<b>Respuesta +</b>	Respuesta menor, respuesta parcial, respuesta completa.	62 (65)
<b>Respuesta -</b>	Enfermedad estable, progreso de la enfermedad, muerte.	34 (35)

Tabla 11. Categorización de la respuesta clínica según la guía RECIST v1.1 para el subgrupo de pacientes con información clínica disponible (n=96).

Como resultado del análisis general, se encontró una asociación significativa entre los genotipos de la variante VNTR (2R/2R, 2R/3R, 3R/3R) y la respuesta clínica ( $P=0.021$ ). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico de las respectivas tablas de contingencia solo se encontró una tendencia de asociación no significativa ( $p=0.046$ ) entre el alelo 3R en un modelo genético recesivo común como factor de protección frente una respuesta negativa a la quimioterapia (OR=0.278 IC 95% 0.075-1.036).

En una segunda instancia se procedió a realizar el análisis de asociación entre los genotipos para las variantes analizadas y la toxicidad reportada para los pacientes. En total se obtuvo la información de toxicidad de 42 de los pacientes, información susceptible de ser categorizada según la guía CTCAE v4. Se estableció la categoría de toxicidad leve/moderada para aquellos eventos de toxicidad identificados como de grados 1 y 2 y la categoría de toxicidad grave para aquellos eventos identificados como de grados 3 y 4. No se reportó ningún evento tóxico de grado 5 (muerte) de entre el grupo de pacientes. Del total de los pacientes con reporte de toxicidad (n=42) el 24% desarrollaron algún evento de toxicidad grave siendo prevalentes los de tipo gastrointestinal (figura 10).

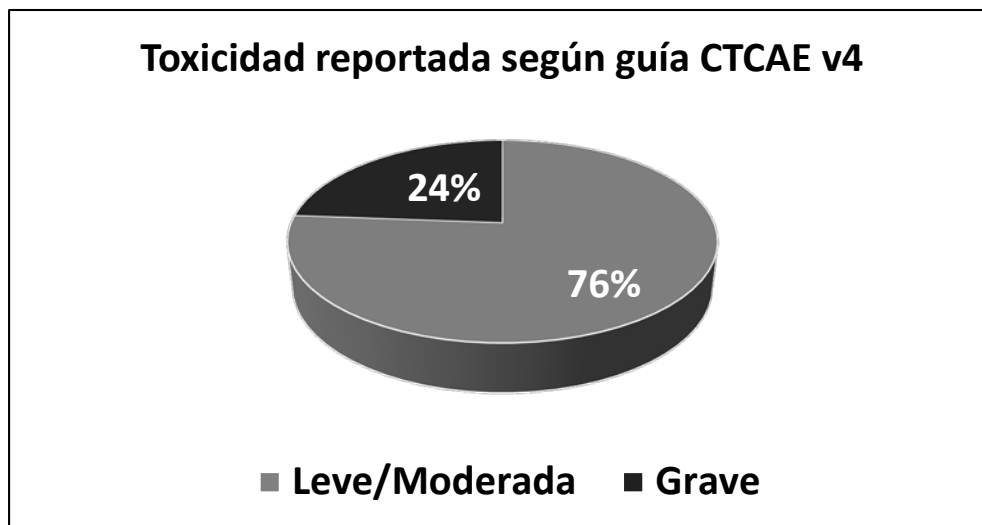


Figura 10. Distribución de la toxicidad reportada a fluoropirimidinas según las categorías leve/moderada o grave en el subgrupo de pacientes con CCR (n=42).

El análisis general de asociación mostró un resultado estadísticamente significativo ( $p=0.017$ ) entre los genotipos de la variante VNTR y la toxicidad a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas en el grupo de pacientes con CCR (figura 11).

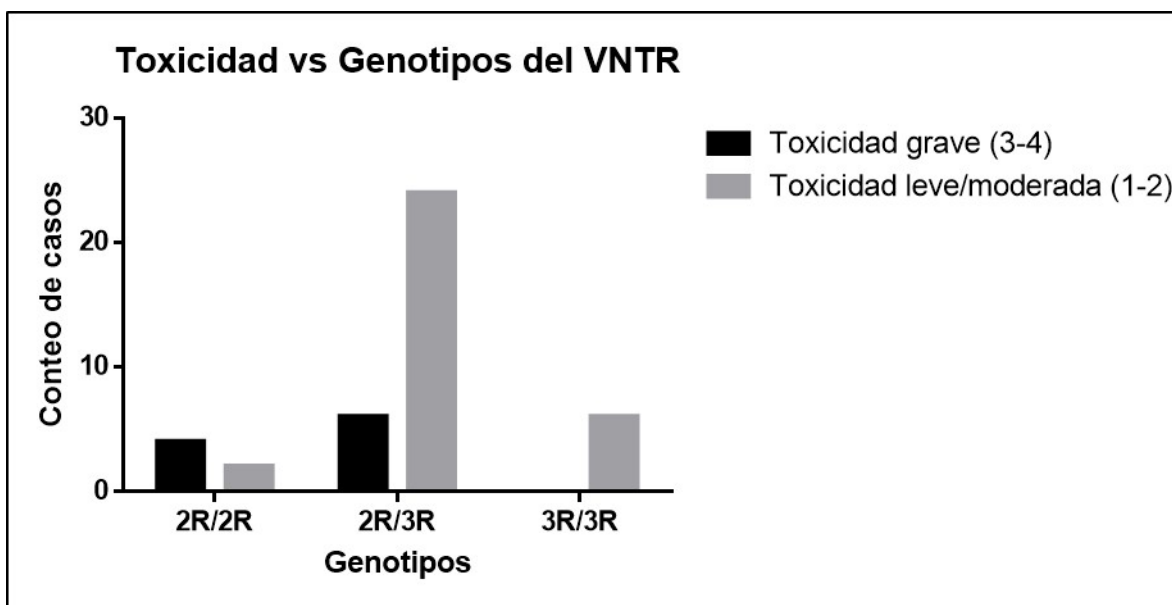


Figura 11. Conteo de casos de toxicidad vs genotipos del VNTR para pacientes con CCR.

El análisis por tablas de contingencia mostró una asociación significativa ( $p=0.021$ , prueba F de Fisher) entre el alelo 2R en un modelo genético recesivo común y un mayor riesgo

(OR=10.000 IC95% 1.480-67.554) de desarrollar un evento tóxico grave en respuesta a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas en el grupo de pacientes (figura 12).

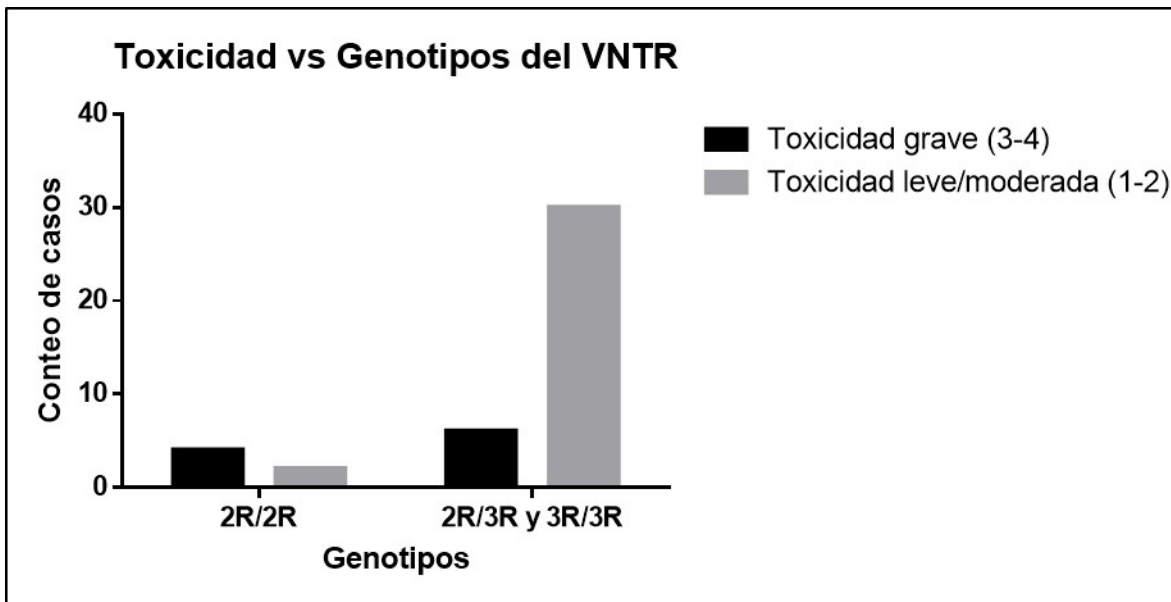


Figura 12. Conteo de casos de toxicidad vs el modelo genético recesivo común para el alelo 2R.

Por consiguiente se estableció que el alelo 3R fue un factor protector (OR=0.100 IC95% 0.015-0.676,  $p=0.021$  prueba F de Fisher) frente al desarrollo de eventos tóxicos graves en el grupo de pacientes analizados.

No se encontró ninguna asociación entre los alelos de la variante en la región 3'UTR del gen *TYMS* (rs151264360) con la toxicidad.

### 3.3. Resultados de la evaluación de los genotipos y de las frecuencias alélicas para las variantes en las regiones no traducidas del gen *TYMS* en la población adulta normal del noreste de México.

Para complementar los hallazgos encontrados durante la validación del método de genotipificación de las variantes del gen *TYMS* y con el fin de establecer las frecuencias alélicas y los genotipos de las distintas variantes en la población del noreste de México se realizó el análisis de genotipificación sobre un grupo de 99 individuos sanos, reclutados en el servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario (Monterrey) durante los procedimientos de endoscopia y colonoscopia. Los resultados se muestran en las tablas (12-15). Como se puede apreciar, todos los genotipos para las distintas variantes estuvieron en

concordancia con la ley de Hardy-Weinberg. Los alelos menores fueron el alelo 2R, el alelo C, el alelo G y el alelo 6bp-, para las variantes VNTR, rs183205964, rs2853542 y el indel en la región 3'UTR (rs151264360) respectivamente.

<b>VNTR (rs45445694)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
2R/2R	2R/3R	3R/3R	2R	3R
18	51	31	0.43	0.57
<sup>1</sup> H-W $p=0.78$				

Tabla 12. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del VNTR en la muestra de sujetos sanos (n=99). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

<b>G/C (rs183205964)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
2RG/2RG	2RG/2RC	2RC/2RC	G	C
94	6	0	0.99	0.01
<sup>1</sup> H-W $p=0.90$				

Tabla 13. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs183205964 en la muestra de sujetos sanos (n=99). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

<b>G/C (rs2853542)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
3RG/3RG	3RG/3RC	3RC/3RC	G	C
26	52	23	0.45	0.55
<sup>1</sup> H-W $p=0.74$				

Tabla 14. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs2853542 en la muestra de sujetos sanos (n=99). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

<b>Delección 6bp (rs151264360)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
6bp+/6bp+	6bp+/6bp-	6bp-/6bp-	6bp+	6bp-
54	34	11	0.72	0.28
<sup>1</sup> H-W $p=0.13$				

Tabla 15. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de la variante rs151264360 en la muestra de sujetos sanos (n=99). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

Al comparar los genotipos para el VNTR en nuestra población de sujetos sanos frente a los reportados para otras poblaciones, se observa una convergencia para los genotipos y las frecuencias de los alelos 2R y 3R entre nuestra población bajo estudio y poblaciones de América del Sur y a su vez entre estas y poblaciones caucásicas europeas y de los Estados Unidos, en donde es prevalente el genotipo 2R/3R. Sin embargo, se observa una diferencia notable en los genotipos y en las frecuencias alélicas entre estas poblaciones y las poblaciones del este asiático, siendo prevalente en estas últimas el genotipo 3R/3R (tabla 16). Es interesante notar las discrepancias en cuanto a los genotipos del VNTR calculado en el presente trabajo y aquellos reportados por Marsh y col. en población residente en los Estados Unidos con ascendencia mexicana.

Población	n	Frecuencias alélicas		Genotipos (%)			Ref.
		2R	3R	2R/2R	2R/3R	3R/3R	
Noreste de México	99	0.43	0.57	18	51	31	*
Mexicanos (Los Angeles) <sup>1</sup>	91	0.35	0.65	15	37	46	(73)
Perú	73	0.34	0.66	11	47	42	(73)
Caucásicos (UK)	96	0.40	0.60	19	43	38	(67)
Chile	368	0.43-0.47	0.53-0.57	22-23	46-48	29-34	(74)
Brasil	364	0.46	0.54	18	56	26	(75)
Turquía	250	0.42	0.58	18	49	34	(76)
Caucásicos (USA)	104	0.46	0.54	19	54	27	(77)
Kenya <sup>2</sup>	98	0.44	0.49	17	44	26	(77)
Afroamericanos (USA)	92	0.46	0.52	20	53	24	(77)
China	96	0.18	0.82	2	31	67	(67)
Japón <sup>3</sup>	252	0.17	0.83	4	27	69	(78)
Taiwan <sup>4</sup>	201	0.18	0.82	4	29	67	(79)
India <sup>5</sup>	350	0.64	0.35	53	20	25	(80)

Tabla 16. Comparación entre los genotipos y las frecuencias alélicas para la variante VNTR entre diferentes poblaciones. Todos los estudios reportaron muestras sanguíneas de sujetos sanos como material de estudio.\*El presente estudio. <sup>1</sup> Alelo 4R (0.005). <sup>2</sup> Alelo 4R (0.07). <sup>3</sup> A partir de muestras de tejido tumoral de CCR. <sup>4</sup> A partir de sangre de pacientes con CCR. <sup>5</sup> Alelo 1R (0.006).

En relación con la variante VNTR y la delección de 6bp en las regiones 5'UTR y 3'UTR respectivamente, se realizó el análisis de desequilibrio de ligamiento mediante el programa SNP Analyzer™ 2.0. Como resultado y como es de esperarse dada la proximidad (16 kb) entre las posiciones cromosómicas de las dos variantes, se obtuvo un LOD score de 28.9

( $p < 0.001$ ), que indica ligamiento de estas dos variantes. Por otro lado, los valores calculados para  $|D'| = 0.80$  y  $r^2 = 0.19$  indican co-heredabilidad de las dos variantes en alto grado, sin embargo dadas las diferencias en las frecuencias alélicas entre estas, no sería recomendable usar cualquiera de las variantes como sustituta de la otra en los estudios de asociación.

#### **3.4. Resultados de la validación de los genotipos hallados en la población adulta normal, mediante secuenciación por electroforesis capilar**

Con el fin de validar los resultados obtenidos en la genotipificación de las variantes tipo VNTR y los dos SNVs en la región TSER analizados mediante PCR-RFLP, se realizó una nueva amplificación de algunas muestras seleccionadas de sujetos sanos utilizando oligos específicamente diseñados para producir amplicones con la extensión adecuada para identificar la presencia de los SNVs mencionados mediante secuenciación capilar: 210 pb para el alelo 2R y 238 pb para el alelo 3R. Mediante el análisis de las secuencias producidas se pudo identificar la presencia de la transversión G/C en el 12<sup>vo</sup> nucleótido de la segunda repetición en el alelo 3R (rs2853542) en dos individuos sanos que previamente habían sido clasificados como heterocigotos para esta variante (3RG/3RC) mediante PCR-RFLP (figura 13).

Bajo el mismo planteamiento se analizó la secuencia del VNTR para el único individuo que resulto heterocigoto para el SNV rs183205964, con la transversión G/C en el 12<sup>vo</sup> nucleótido en la primera repetición del alelo 2R. El análisis de la secuencia corroboró el resultado obtenido mediante PCR-RFLP que indica la presencia del alelo C en esta posición para un individuo con el genotipo 2RG/2RC (figura 14).

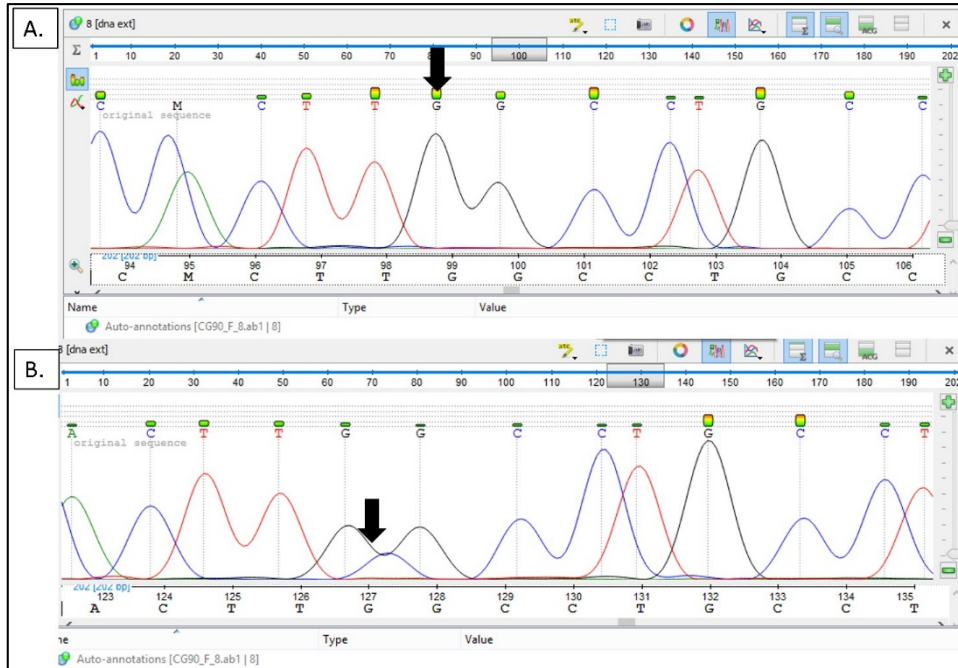


Figura 13. Electroferograma con la secuencia para el VNTR de un individuo heterocigoto para el SNV rs2853542. En A se muestra la secuencia de la segunda repetición, la flecha indica la posición del 12º nucleótido (G). En B se muestra la secuencia de la segunda repetición, la flecha indica la posición del 12º nucleótido con la transversión G/C.

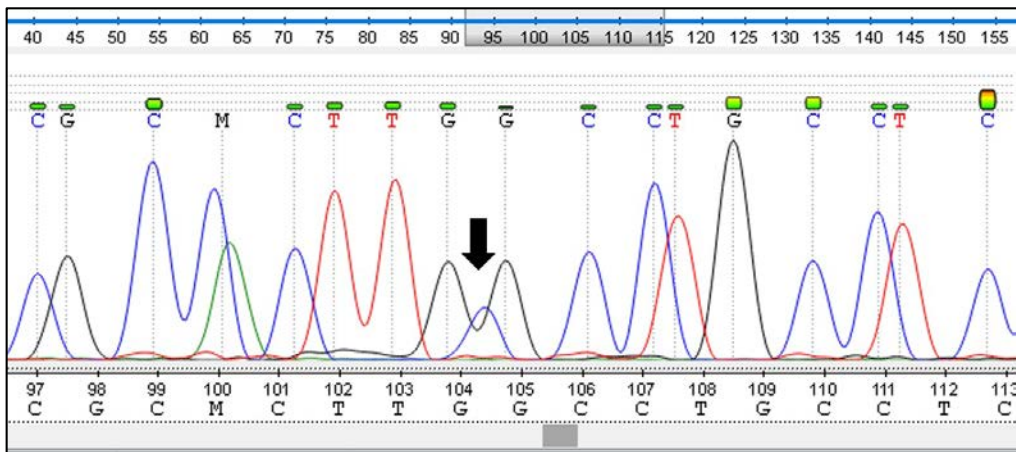


Figura 14. Electroferograma con la secuencia para el VNTR de un individuo heterocigoto para el SNV rs183205964. La flecha indica la transversión G/C en la posición del 12º nucleótido de la primera repetición del alelo 2R.

**3.5. Resultados del análisis prospectivo de asociación entre los genotipos para las variantes en regiones no codificantes del gen *TYMS* y la respuesta clínica y la toxicidad a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas en pacientes con tumores gastrointestinales.**

La metodología validada para la genotipificación de los pacientes en las variantes de las regiones no codificantes del gen *TYMS*, fue utilizada en la realización de un estudio prospectivo multicéntrico con una cohorte de pacientes (n=91) diagnosticados con neoplasias de origen gastrointestinal que recibieron tratamiento quimioterapéutico basado en fluoropirimidinas y que cumplieron los criterios de inclusión del estudio.

Del total de los pacientes vinculados al estudio, el 48% fueron reclutados en la UMAE N°25 del IMSS y el 26% fueron reclutados en el Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario, ambas instituciones de la ciudad de Monterrey.

<b>Estado de origen</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>CHIHUAHA</b>	1	1
<b>COAHUILA</b>	23	25
<b>COLIMA</b>	2	2
<b>ESTADO DE MÉXICO</b>	1	1
<b>GUERRERO</b>	1	1
<b>HIDALGO</b>	1	1
<b>JALISCO</b>	12	13
<b>MICHOACAN</b>	2	2
<b>NUEVO LEON</b>	34	37
<b>SAN LUIS POTOSI</b>	2	2
<b>SINALOA</b>	1	1
<b>TAMAULIPAS</b>	8	9
<b>VERACRUZ</b>	1	1
<b>ZACATECAS</b>	3	3
<b>Total</b>	92	100

Tabla 17. Distribución de la cohorte de pacientes (n=91) por estado de origen.



Por su parte, el 17% de los pacientes restantes fueron reclutados en el Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS en la ciudad de Guadalajara. La distribución de los pacientes por estado de origen se muestra en la tabla 17. Como se puede notar, la mayoría de los pacientes (62%) eran originarios de los estados del noreste del país (Nuevo León y Coahuila). Todos los pacientes fueron reclutados al inicio del tratamiento quimioterapéutico o dentro de los tres primeros ciclos de quimioterapia. Respecto de las características demográficas y de diagnóstico clínico de los pacientes, estas se resumen en la tabla 18. La mayoría de los pacientes fueron hombres (66%). La distribución de sexos y el rango de edad fueron equiparables a los del grupo de pacientes con CCR previamente analizadas retrospectivamente (ver tabla 10). Aunque en comparación, en esta cohorte se amplió la muestra de pacientes a aquellos que presentaron tumores en distintas regiones del tracto gastrointestinal, siendo prevalentes los tumores en el colon y en el recto y en canal anal (84%). La mayoría de los pacientes (86%) fueron diagnosticados en etapas avanzadas (III y IV), lo cual en el ámbito clínico se asocia con un pobre pronóstico.

<b>Características</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>		
Hombres	60	66
Mujeres	31	34
<b>Edad (años)</b>		
Mediana	58	
Rango	28-84	
<b>Origen anatómico del tumor primario</b>		
Estómago	11	12
Esófago y unión gastroesofágica	4	4
Colon	50	55
Recto y canal anal	26	29
<b>Estadío clínico del tumor según TNM</b>		
Etapa I	2	2
Etapa IIa-c	11	12
Etapa IIIa-c	31	34
Etapa IV	47	52

Tabla 18. Características demográficas y clínicas de la cohorte de pacientes (n=91) vinculados al estudio.

Como resultado de la genotipificación de los pacientes se obtuvieron los genotipos y las frecuencias alélicas presentadas en las tablas 19-22.

De acuerdo con las frecuencias alélicas calculadas, se identificaron los alelos menores para cada variante. Notablemente y a diferencia de lo hallado para la población sana, en esta

cohorte de pacientes los alelos 3R y G correspondientes a las variantes VNTR (rs45445694), y SNV G/C (rs2853542) fueron los alelos menores, lo que se tradujo en un incremento en los individuos homocigotos para el alelo 2R. De la misma manera que en el grupo de sujetos sanos, solo pudo identificarse el alelo C de la variante rs183205964 en un individuo heterocigoto 2RG/2RC. Los alelos menores para el SNV G/C (rs183205964) la variante en la región 3'UTR (rs151264360), fueron el alelo C y el alelo 6bp- respectivamente y sus frecuencias alélicas fueron idénticas a las calculadas para la población sana.

Se estableció que la distribución de los genotipos para cada una de las variantes estaba en concordancia con la Ley de Hardy-Weinberg.

<b>VNTR (rs45445694)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
2R/2R	2R/3R	3R/3R	2R	3R
26	49	24	0.51	0.49
<sup>1</sup> H-W $p=0.92$				

Tabla 19. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del VNTR en la cohorte de pacientes (n=91). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

<b>G/C (rs183205964)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
2RG/2RG	2RG/2RC	2RC/2RC	G	C
96	4	0	0.99	0.01
<sup>1</sup> H-W $p=0.83$				

Tabla 20. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs183205964 en la cohorte de pacientes (n=91). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

<b>G/C (rs2853542)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
3RG/3RG	3RG/3RC	3RC/3RC	G	C
26	43	30	0.51	0.49
<sup>1</sup> H-W $p=0.20$				

Tabla 21. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs2853542 en la cohorte de pacientes (n=91). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

<b>Delección 6bp (rs151264360)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
6bp+/6bp+	6bp+/6bp-	6bp-/6bp-	6bp+	6bp-
49	44	6	0.72	0.28
<sup>1</sup> H-W $p=0.34$				

Tabla 22. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de la variante rs151264360 en la cohorte de pacientes (n=91). <sup>1</sup>Análisis estadístico ( $\chi^2$  de Pearson) para la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg.

A partir de la genotipificación de la cohorte de pacientes fue posible realizar la asociación entre los genotipos para las variantes del gen *TYMS* y la respuesta clínica a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas. Para ello se realizó la categorización de la respuesta clínica según la guía RECIST como se indica en la tabla 23.

<b>Categoría de respuesta</b>	<b>Respuesta clínica según RECIST v1.1.</b>	<b>n (%)</b>
<b>Respuesta +</b>	Respuesta menor, respuesta parcial, respuesta completa.	27 (30)
<b>Respuesta -</b>	Enfermedad estable, progreso de la enfermedad, muerte.	64 (70)

Tabla 23. Categorización de la respuesta clínica según la guía RECIST v1.1 para la cohorte de pacientes (n=91).

El análisis mostró una asociación estadísticamente significativa ( $p=0.004$ ) entre los genotipos combinados VNTR y SNVs, relacionados con una baja expresión de *TYMS* y una mejor respuesta clínica (OR=4.684 IC95% 1.578-13.900), esto se traduce en un mayor riesgo de una respuesta negativa en pacientes que portan el alelo 3R en el VNTR y el alelo G en el SNV rs2853542 (figura 15). Aún más, el análisis independiente del diplotipo 3RG indicó una asociación significativa ( $p=0.0032$ ) a un fracaso en la respuesta clínica con cada copia del alelo G, siendo la tasa de respuesta de 0% para los pacientes homocigotos 3RG/3RG (figura 16).

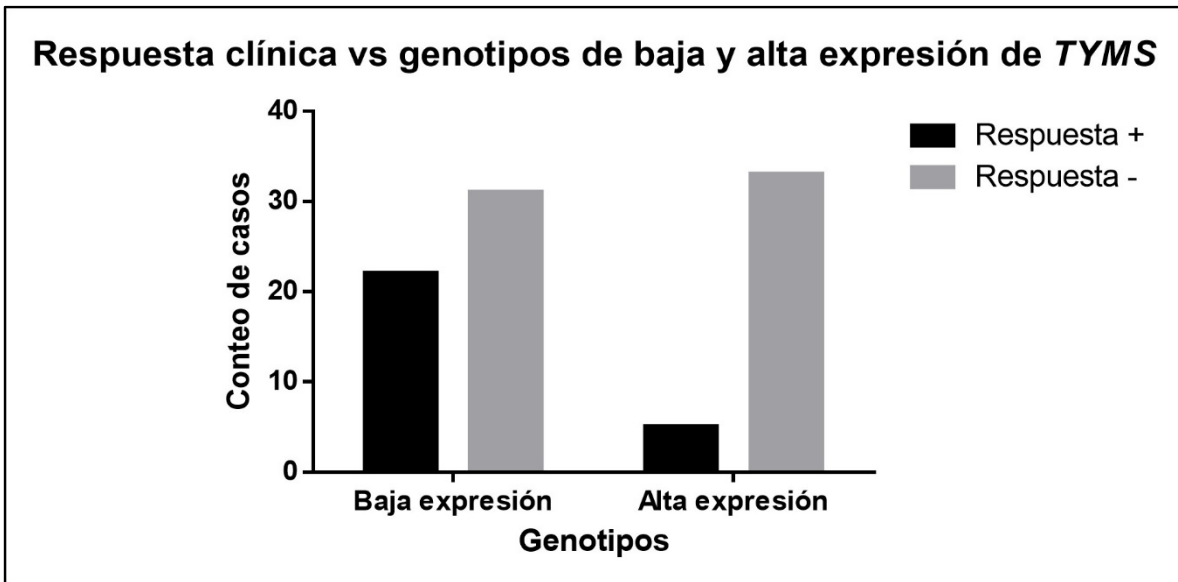


Figura 15. Distribución de casos asociados a la respuesta clínica por genotipos de alta o baja expresión de TYMS.

Por su parte, el análisis general de los genotipos (6bp+/6bp+, 6bp+/6bp-, 6bp-/6bp-) correspondientes la variante en la región 3'UTR mostró una asociación significativa con la respuesta clínica ( $p=0.010$ ).

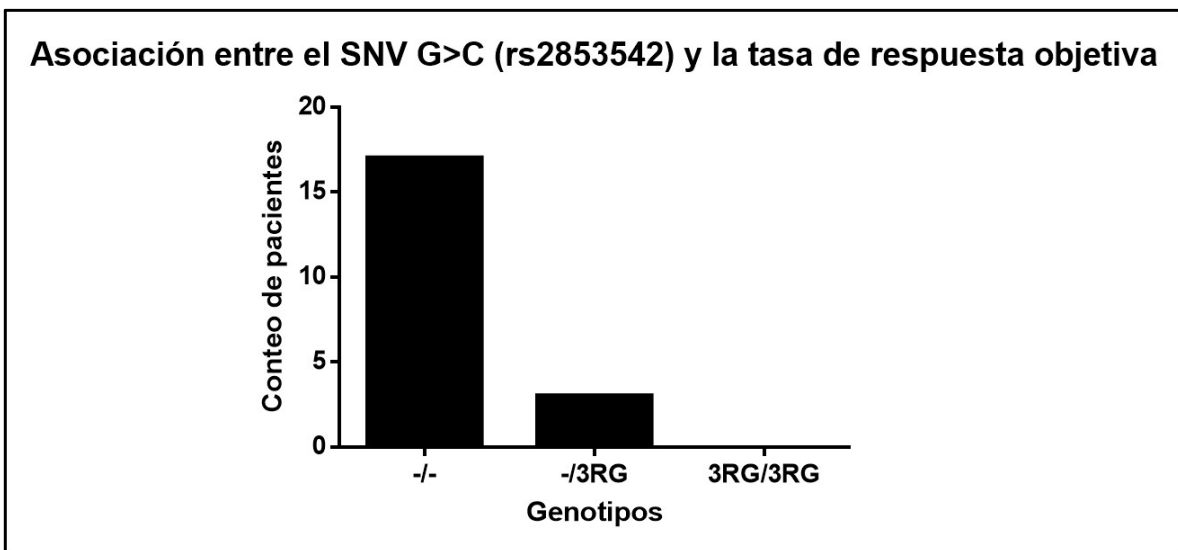


Figura 16. Respuesta objetiva en relación con el diplotipo 3RG.  $P=0.0032$ , Prueba de tendencia de Cochran-Armitage.

En un análisis posterior se determinó que en un modelo genético recesivo común para el alelo mayor (6bp+), este se asoció significativamente ( $p=0.004$ ) con una mejor respuesta clínica

(OR=4.176 IC95% 1.544-11.293). Este resultado indica que la presencia del alelo menor (6bp-) se relaciona significativamente ( $p=0.004$ ) con una menor probabilidad de una respuesta positiva al tratamiento (OR=0.239 IC95% 0.089-0.648). Gráficamente esto se observa en la figura 17.

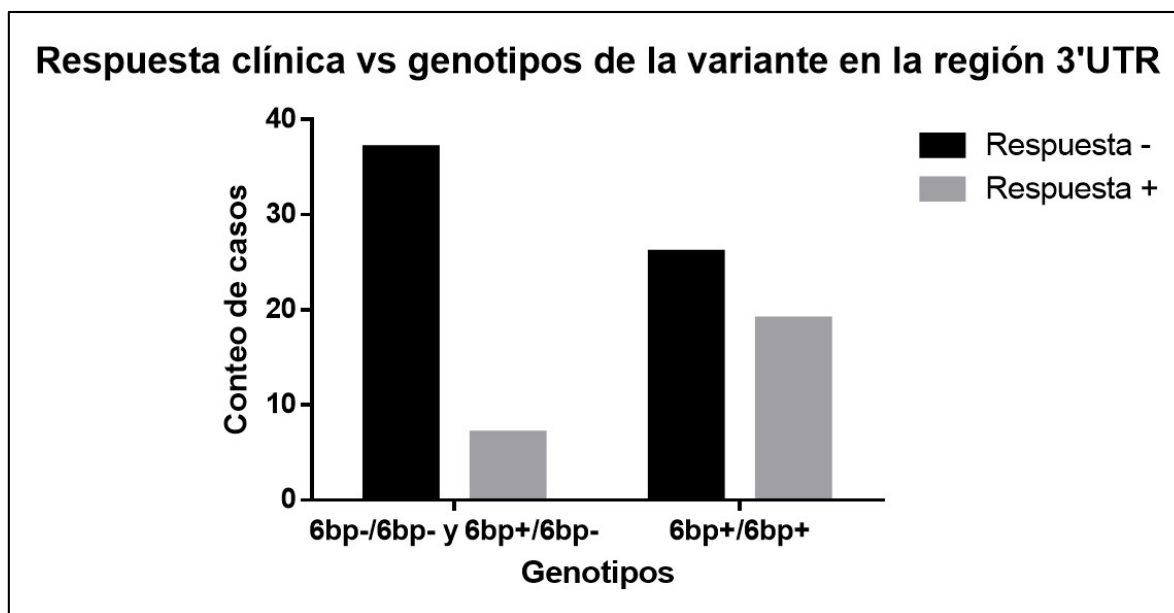


Figura 17. Distribución de casos asociados a la respuesta clínica por genotipos de la variante en la región 3'UTR.

Respecto a la toxicidad reportada para la cohorte de pacientes, el 29% del total de pacientes desarrollo algún evento de toxicidad grave (grados 3 y 4) o requirió de un ajuste de dosis por parte del médico tratante debido a la toxicidad presentada frente al esquema quimioterapéutico de primera línea. La toxicidad gastrointestinal (náuseas, vómito, diarrea) fue prevalente, seguida de eventos de toxicidad hematológica (neutropenia, trombocitopenia) y neurológica (neuropatía) (figura 18).

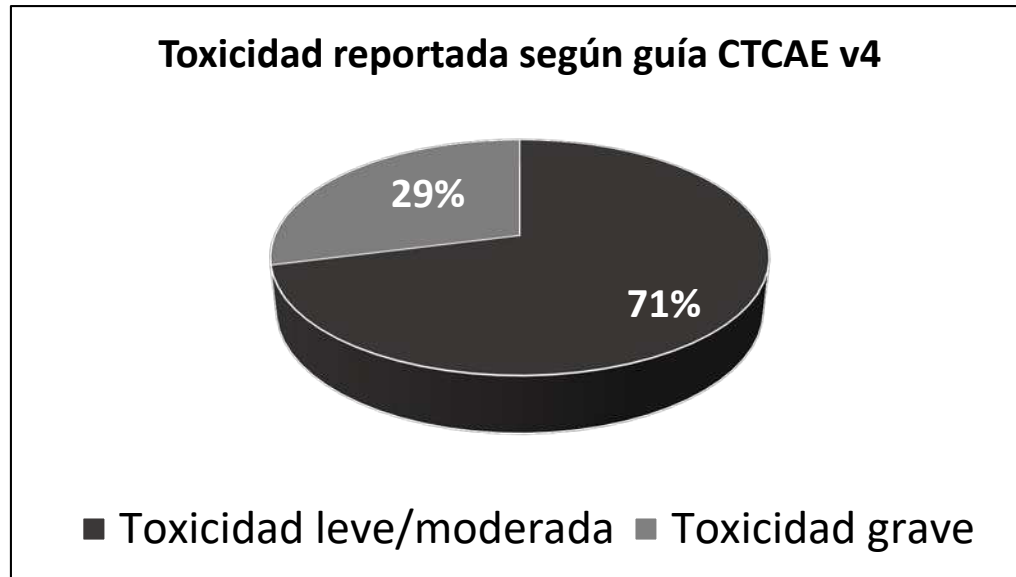


Figura 18. Toxicidad reportada para la cohorte (n=91) de pacientes bajo estudio según las categorías leve/moderada (grados 1 y 2 según guía CTCAE v4) o grave (grados 3 y 4 según guía CTCAE v4.1).

El análisis entre los diferentes genotipos para todas las variantes genotipificadas en la cohorte de pacientes y su relación con la toxicidad no arrojó ninguna asociación significativa. El análisis conjunto de los genotipos del VNTR y los SNVs en la región TSER, categorizados como de baja o alta expresión de *TYMS*, no mostró ninguna asociación significativa con la toxicidad reportada en la cohorte de pacientes.

### **3.5. Resultados del análisis de expresión de los genes *TYMS* y *ERCC1* en muestras de tejido tumoral y de tejido sano.**

Para el análisis de expresión de los genes de interés *TYMS* y *ERCC1* en las muestras de tejido tumoral y sano, se implementó una metodología de expresión relativa basada en transcripción inversa y PCR en tiempo real (RT-qPCR) usando el agente fluorogénico SYBR Green.

La metodología exige el empleo de genes normalizadores para controlar las variaciones propias del ensayo, al evaluar la expresión de los genes de interés en cada una de las muestras bajo estudio. Para ello se realizó en primera instancia, una búsqueda en la literatura y en segunda instancia un análisis bioinformático usando la herramienta Genevestigator® (NEBION, Suiza), la cual permite la selección de genes basados en la información relacionada con su expresión en diferentes tejidos y condiciones biológicas a partir de datos curados de microarreglos de expresión. De este modo y basado en su empleo previo en otros estudios y en sus niveles de expresión en tejidos de origen gastrointestinal y en la ausencia

de relación biológica y funcional con los genes de interés, se pre-seleccionaron los siguientes genes como genes normalizadores para los ensayos de expresión:

- *B2M* (Beta 2 Microglobulina): gen que codifica una proteína de unión al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (ID=567 NCBI).
- *GAPDH* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa): gen que codifica la enzima del mismo nombre que participa en el metabolismo energético de los carbohidratos (ID=2597 NCBI).
- *URMI* (Modificador 1 relacionado a ubiquitina): gen que codifica una proteína que actúa como transportadora de azufre y como proteína de marcaje similar a ubiquitina (ID=81605 NCBI).

Se diseñaron los oligos para los genes de interés y para los genes normalizadores y se estandarizó la metodología para evaluar la eficiencia de la amplificación del cADN de todos los genes bajo estudio y la estabilidad de la expresión de los genes de interés frente a los genes normalizadores a diferentes diluciones del cADN (Ver anexos 1 y 2). Como resultado de la estandarización del método, se seleccionaron los genes *B2M* y *URMI* como los genes normalizadores para los ensayos subsecuentes de expresión.

Para el análisis de expresión relativa de los genes *TYMS* y *ERCC1*, se agruparon todas las muestras de tejidos según su condición en tejidos tumorales (n=17) o tejidos sanos (n=19). La expresión relativa de ambos genes muestra una baja variabilidad intragrupos (tabla 24 y figuras 19 y 20).

Grupos	<i>TYMS</i>		<i>ERCC1</i>	
	$2^{-\Delta Ct (T-B)}$ ( $\pm SD$ )	$2^{-\Delta Ct (T-U)}$ ( $\pm SD$ )	$2^{-\Delta Ct (E-B)}$ ( $\pm SD$ )	$2^{-\Delta Ct (U-E)}$ ( $\pm SD$ )
Sano	$8,0 \times 10^{-4} (2,0 \times 10^{-3})$	$5,8 \times 10^{-2} (7,3 \times 10^{-2})$	$9,6 \times 10^{-2} (2,2 \times 10^{-1})$	$4,9 \times 10^{-1} (3,8 \times 10^{-1})$
Tumor	$7,6 \times 10^{-4} (8,6 \times 10^{-4})$	$7,3 \times 10^{-2} (8,2 \times 10^{-2})$	$2,7 \times 10^{-2} (2,3 \times 10^{-2})$	$7,2 \times 10^{-1} (5,0 \times 10^{-1})$

Tabla 24. Expresión relativa de los genes de interés (*TYMS*=T, y *ERCC1*=E) frente a los genes normalizadores (*B2M*=B y *URMI*=U) entre los grupos de muestras de tejido sano y tumoral. Promedio de los valores de  $2^{-\Delta Ct} \pm$  Desviación Estándar (SD).

Al comparar la expresión de relativa de los genes *TYMS* y *ERCC1* entre los grupos de tejido (tumoral vs sano) no se encontró diferencias estadísticamente significativas

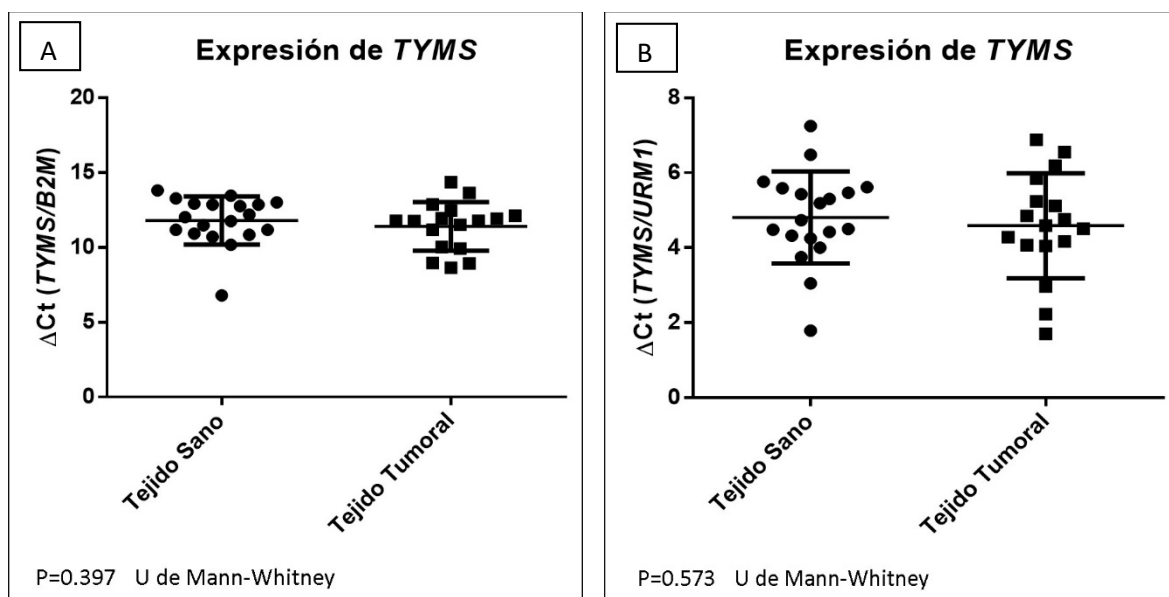


Figura 19. Expresión relativa ( $\Delta Ct$ ) de *TYMS* frente a *B2M* (cuadro A) y frente a *URM1* (cuadro B) en los grupos de tejido sano y tumoral.

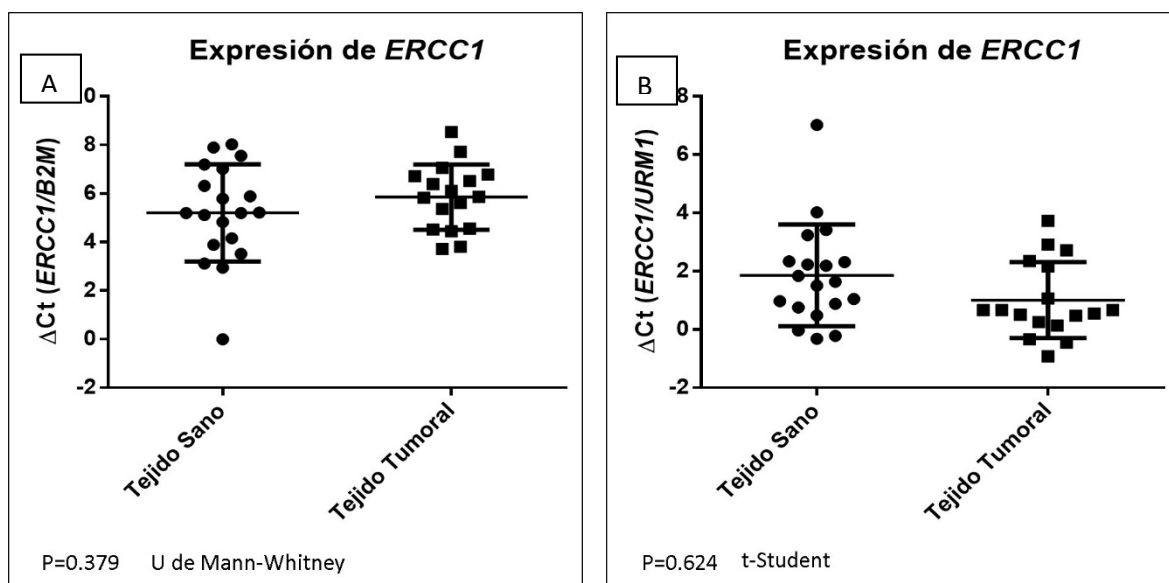


Figura 20. Expresión relativa ( $\Delta Ct$ ) de *ERCC1* frente a *B2M* (cuadro A) y frente a *URM1* (cuadro B) en los grupos de tejido sano y tumoral.

Se procedió posteriormente a analizar el cambio diferencial individual en la expresión relativa ( $\Delta\Delta Ct = \text{Fold Change} = FC$ ) de ambos genes de interés exclusivamente en las muestras pareadas de tejido por paciente (n=16). En la tabla 25 se identifica el origen anatómica de cada par de muestras de tejido (sano y tumoral) utilizados en el análisis. Como



resultado, se observa que en la mayoría de los pacientes (n=9) hay una tendencia hacia una sub-expresión de *TYMS* en el tejido tumoral (FC promedio: T/B = -1.7 y T/U = -0.4). En otro grupo de pacientes (n=5) la tendencia es a la inversa, con una mayor expresión de *TYMS* en el tejido tumoral (FC promedio: T/B = 1.8 y T/U = 1.4).

En dos de los pacientes (CX-06 y CMNO-23) hay una contradicción en el FC al comparar la expresión relativa de *TYMS* frente a los dos genes normalizadores, por lo que no es posible establecer el cambio diferencial de la expresión de *TYMS* en estos pacientes sin una selección definitiva del gen normalizador. No se observó ninguna relación entre el FC y el origen anatómico de las muestras (figura 21).

<b>Código</b>	<b>CX01</b>	<b>CX02</b>	<b>CX03</b>	<b>CX05</b>	<b>CX06</b>	<b>CX07</b>	<b>CX08</b>	<b>CX09</b>
Origen	Recto	Colon	Recto	Recto	Estómago	Colon	Estómago	Colon
<b>Código</b>	<b>CX10</b>	<b>CMNO4</b>	<b>CMNO11</b>	<b>CMNO16</b>	<b>CMNO23</b>	<b>CMNO26</b>	<b>CCR57</b>	<b>CG34</b>
Origen	Colon	Colon	Recto	Colon	Colon	Colon	Colon	Estómago

Tabla 25. Identificación del origen anatómico de las muestras pareadas de tejido por paciente.

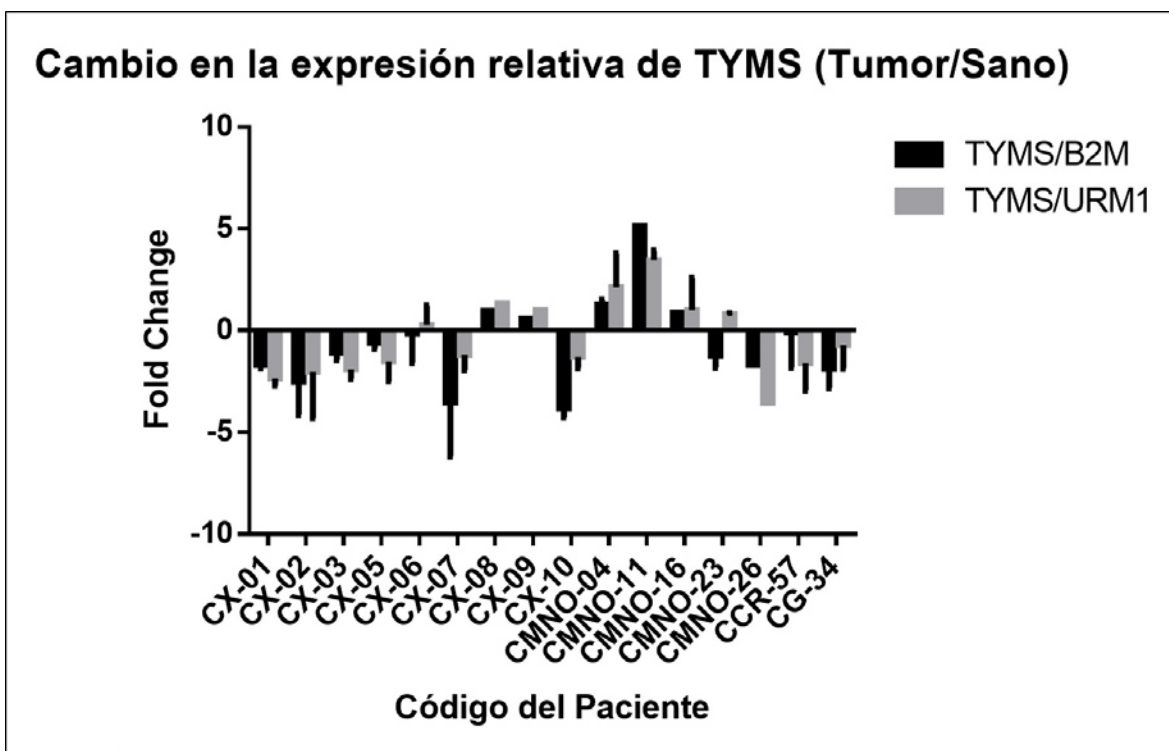


Figura 21. Cambio (Log) en la expresión diferencial de *TYMS* entre el tejido tumoral y sano por paciente.

El análisis de expresión diferencial entre el tejido tumoral y el tejido sano para el gen *ERCC1* mostró resultados contradictorios al comparar su expresión relativa frente a los dos genes normalizadores en la mayoría de los pacientes (n=10). En dos de los pacientes se evidencia una tendencia a una sobre-expresión a un nivel bajo de *ERCC1* en el tejido tumoral (FC promedio: E/B = 1.1 y E/U = 0.4), mientras que en cuatro de los pacientes la tendencia es a una sub-expresión, también a un bajo nivel, de *ERCC1* en el tejido tumoral (FC promedio: E/B = -1.3 y E/U = -0.6). No se observó ninguna relación entre el FC para el gen *ERCC1* y el origen anatómico de las muestras (figura 22).

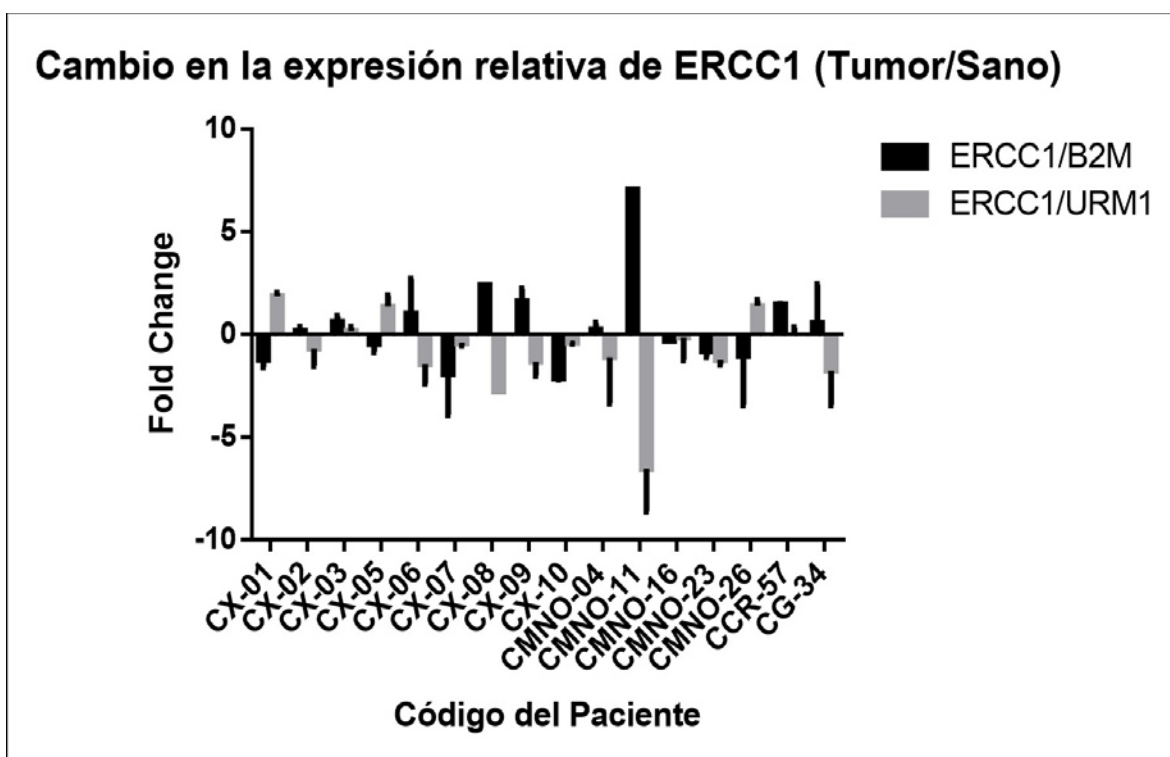


Figura 22. Cambio (Log) en la expresión diferencial de *ERCC1* entre el tejido tumoral y sano por paciente.

### 3.6. Resultados del análisis de expresión del gen *TYMS* en muestras de tejido en función del genotipo para las variantes en las regiones no codificantes del gen

Con el fin de establecer la posible asociación entre las variantes presentes en la región 3'UTR y en la región de amplificación TSER en el promotor del gen *TYMS* y su expresión a nivel de tejido, se realizó la genotipificación de las muestras de tejido siguiendo la misma metodología (PCR-RFLP) descrita previamente para las muestras sanguíneas.

Como resultado se obtuvieron las frecuencias de cada alelo y los genotipos correspondientes para cada variante (tablas 26-28).

<b>VNTR (rs45445694)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
2R/2R	2R/3R	3R/3R	2R	3R
24	59	18	0.53	0.47

Tabla 26. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del VNTR en las muestras de tejido.

<b>G/C (rs2853542)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
3RG/3RG	3RG/3RC	3RC/3RC	G	C
0	23	0	0.38	0.63

Tabla 27. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas del SNV rs2853542 en las muestra de tejido.

<b>Delección 6bp (rs151264360)</b>				
<b>Genotipos (%)</b>			<b>Frecuencias alélicas</b>	
6bp+/6bp+	6bp+/6bp-	6bp-/6bp-	6bp+	6bp-
53	41	6	0.63	0.27

Tabla 28. Distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de la variante rs151264360 en las muestras de tejido.

No se evidenció la presencia del alelo C para el SNV (rs183205964) presente en el alelo 2R del VNTR. Notablemente, todas las muestras analizadas para el SNV rs2853542 fueron heterocigotas. Así mismo, se evidenció que en comparación con la distribución de frecuencias para los alelos del VNTR analizadas a partir de muestras sanguíneas en la población sana, en las muestras de tejido el alelo menor fue 3R y el genotipo 3R/3R estaba sub-representado. Por su parte la distribución de frecuencias alélicas para para la variante del6bp en la región 3'UTR a partir de las muestras de tejido fue muy similar al obtenido a partir de las muestras sanguíneas de los sujetos sanos.

Del total de las muestras analizadas, 32 correspondieron a muestras de tejido pareado (16 sanos y 16 tumorales) del mismo paciente. Una muestra correspondió a tejido tumoral exclusivo y una muestra a tejido sano exclusivo. Adicionalmente se incluyó una muestra de biopsia de un pólipo sésil hiperplásico de estómago pareada a una muestra de tejido sano, el

cuál es considerado una lesión pre-maligna. En esta última muestra de pólipo, se evidenció pérdida de heterocidad (LOH) para el alelo 3R del VNTR, dado que la muestra de tejido sano presentó el genotipo 3RGG/3RGC y la muestra de la lesión presentó el genotipo 2RG/3RGC (figura 23). Para las demás muestra pareadas, la correspondencia entre los genotipos hallados para el VNTR, los SNVs y la variante tipo indel en la región 3'UTR para el tejido tumoral y el tejido sano fue del 100%.

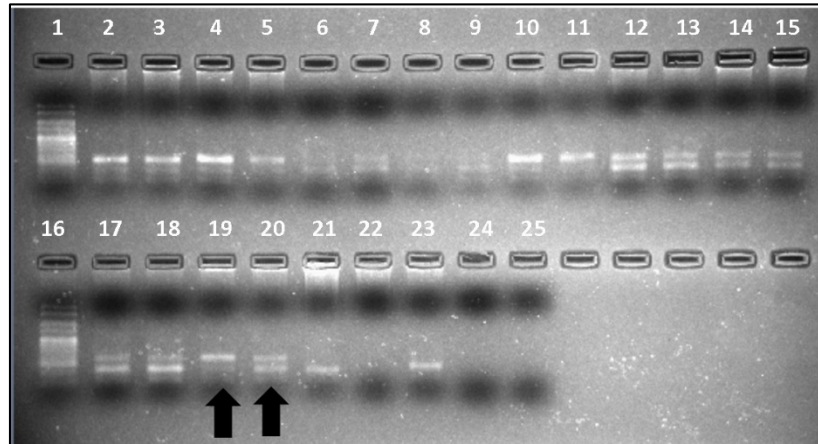


Figura 23. Resultado de la genotipificación del VNTR y los SNVs en la región TSER del promotor del gen *TYMS* en tejido tumoral y sano pareados. La flecha en el carril 20 indica un cambio en el perfil de restricción para la lesión (pólipo séstil) comparado con el tejido sano (carril 19), que se traduce en LOH para el alelo 3R del VNTR.

El análisis entre la distribución de los diferentes genotipos de las variantes y la expresión de *TYMS* no mostró resultados significativos al evaluar los diferentes modelos genéticos posibles.

En un estudio publicado previamente, se asoció la presencia de los genotipos 2R/2R, 2R/3RC y 3RC/3RC con un bajo nivel de expresión y los genotipos 2R/3RG, 3RG/3RC y 3RG/RG con un mayor nivel de expresión del gen *TYMS* (81). Por lo tanto, se decidió agrupar los tejidos de acuerdo con estos genotipos y analizar la expresión de *TYMS* en las muestras de tejido tumoral (n=17) en función de los mismos. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión del gen entre las dos agrupaciones (figura 24).

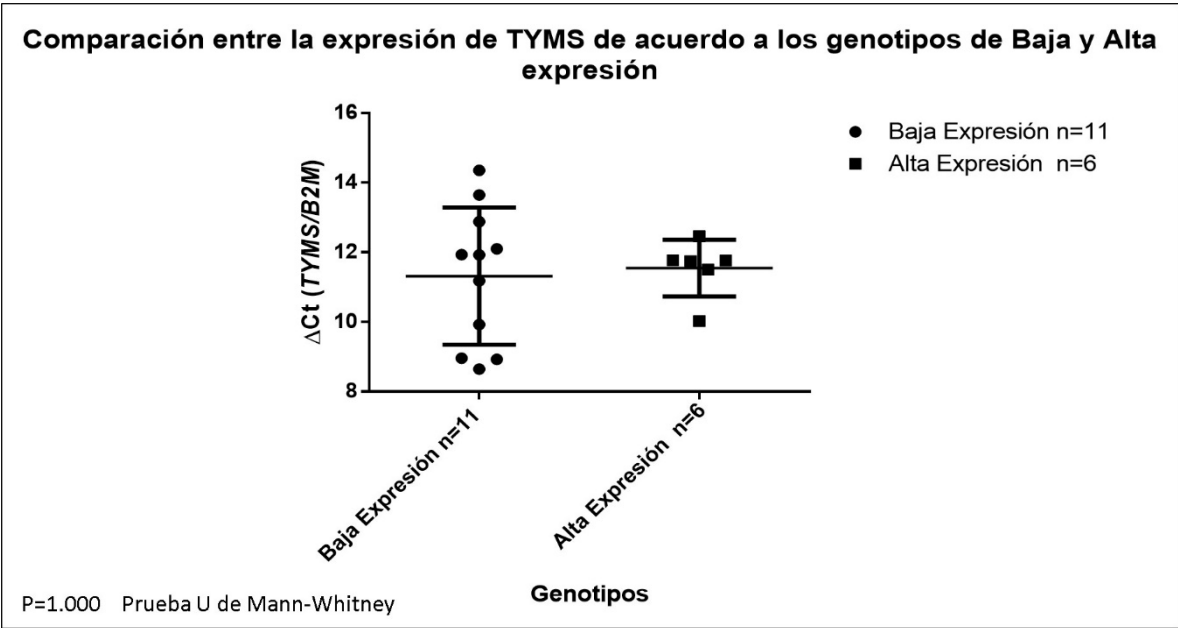


Figura 24. Expresión de TYMS en el tejido tumoral en función de los genotipos de baja y alta expresión según Kawakami y Watanabe (81).

La quimioterapia basada en fluoropirimidinas ha sido utilizada desde su introducción hace casi medio siglo en el tratamiento de diversos tipos de neoplasias incluyendo las de origen gastrointestinal, sin embargo en el ámbito oncológico es bien conocido el hecho de que la respuesta clínica a las fluoropirimidinas varía mucho entre los pacientes. Dentro de los diversos factores que inciden en la variabilidad en la respuesta y que han sido estudiados, se incluyen el sexo, el estado funcional del paciente (según la escala ECOG), el esquema utilizado (administración diaria, semanal o infusión intravenosa continua) e incluso el momento del ciclo circadiano en el que se administra el tratamiento (82).

En lo que se refiere a la tolerabilidad del tratamiento con fluoropirimidinas parece también haber diferencias importantes entre hombres y mujeres, así como con la edad al inicio del tratamiento e incluso con el origen étnico (83). Particularmente se ha evidenciado que con esquemas de tratamiento similar, los pacientes con CCR en los Estados Unidos tienen mayor riesgo de presentar eventos tóxicos graves en comparación con pacientes del este de Asia (84). Aunque pueden existir diversas explicaciones sociodemográficas para estas divergencias, la presencia de determinantes genéticos asociados a la respuesta y a la toxicidad a las fluoropirimidinas ha surgido como un factor clave en la búsqueda de tratamientos más seguros y eficaces. Existe un número cada vez mayor de estudios de reportes de eventos tóxicos y resultados de estudios clínicos de respuesta a quimioterapia en los que se han implicado mutaciones en genes asociados al metabolismo de las fluoropirimidinas (85). Algunas de estas variantes en genes como *DPYD* y *CDA* se han asociado a eventos tóxicos graves y se han propuesto como biomarcadores genéticos para la quimioterapia basada en fluoropirimidinas (86, 87). Específicamente para las variantes del gen *DPYD* con relevancia clínica conocidas hasta la fecha, se han establecido unas guías clínicas que orientan el ajuste de la dosis de 5-FU dependiendo del genotipo del paciente para cada una de ellas (88).

En lo que respecta a la respuesta a la quimioterapia sin embargo, no existe un marcador predictivo que pueda ser usado en el ámbito clínico, más aún, aunque está bien documentada la existencia de las variantes en los genes mencionados relacionadas con eventos tóxicos

graves, incluso con desenlaces fatales, la evidencia sugiere que la información disponible hasta la fecha es insuficiente para predecir con un alto valor predictivo el desarrollo de eventos tóxicos graves a la quimioterapia de primera línea en pacientes con tumores gastrointestinales avanzados, por lo que es importante la búsqueda de otros posibles marcadores de respuesta y de toxicidad aplicables en el contexto clínico (89, 90).

La enzima Timidilato Sintasa (TS) es el blanco farmacológico de las fluoropirimidinas por lo que su estudio como potencial biomarcador de la respuesta a estos agentes está sustentado en una premisa lógica. Décadas atrás, un estudio demostró que los tejidos con mayor nivel de inhibición de TS eran aquellos implicados en los efectos tóxicos limitantes de la dosis del 5-FU, aunque en dicho estudio no se abordó la expresión basal de TS en estos tejidos (91). En otro estudio, se pudo establecer una mayor incidencia de efectos tóxicos en pacientes con CCR sometidos a tratamiento con 5-FU en relación con una menor expresión de TS en el tejido sano (92). Así mismo, los autores de otro estudio encontraron una relación estadísticamente significativa entre la expresión intratumoral de TS y la respuesta clínica y la supervivencia de los pacientes con CCR tratados con 5-FU (93). Usando un modelo murino xenografiado de cáncer gástrico, Fujiwara y col. encontraron una asociación inversa entre la expresión (mRNA) de TS y la respuesta *in vivo* a 5-FU (94). Estos primeros hallazgos han motivado la realización de más estudios enfocados a la búsqueda de una asociación entre la expresión intratumoral de la enzima timidilato sintasa (TS) y la respuesta clínica a fluoropirimidinas en pacientes con tumores de origen gastrointestinal, con la perspectiva de establecer dicha expresión como biomarcador predictivo de respuesta clínica a estos agentes. En consecuencia, existe evidencia de que una alta expresión intratumoral de la enzima TS se asocia con un menor supervivencia global en pacientes con cáncer colorrectal (CCR) y con una menor respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU (95-97).

La regulación de la transcripción del gen *TYMS* es compleja, depende de la etapa del ciclo celular y parece requerir de varios factores actuando de manera coordinada en roles de amplificación y supresión en un modo dependiente de tejido (98-102). Más aún, la evidencia sugiere que la regulación de la expresión de la enzima depende principalmente de eventos post-transcripcionales y post-traduccionales que incluyen, la existencia natural de un transcrito antisentido del mRNA de *TYMS* a partir de la propia región 3'UTR del gen y la

retroalimentación negativa de la traducción que ejerce la apoenzima, actuando sobre secuencias reguladoras en *cis* sobre su propio transcrito (103-106).

La existencia de algunas variantes en la región promotora del gen con implicaciones para la expresión de la enzima ha abierto el camino para varios estudios que tratan de establecer su posible asociación con el riesgo, el pronóstico y la respuesta al tratamiento quimioterapéutico del CCR, ante la perspectiva de poder evaluar dichas variantes a partir de muestras de sangre en un contexto previo al tratamiento con las fluoropirimidinas clásicas y los nuevos agentes en desarrollo y con una orientación clara hacia una medicina de precisión (107). Por otra parte, las mutaciones de línea germinal en la región codificante del gen *TYMS* son raras y hasta la fecha no se han relacionado con algún efecto patológico. Recientemente se informó de un paciente con mCCR quien después de recibir tratamiento quimioterapéutico basado en fluoropirimidinas con varios esquemas distintos por un periodo de 8 años, desarrolló toxicidad grave con cada uno de ellos, pero así mismo superó en más de un 50% el promedio de tiempo de supervivencia para pacientes que han sufrido metastasectomía. La elevada toxicidad y la excelente respuesta presentada por este paciente fue asociada, después de evaluar varios genes y variantes candidatas, a una mutación sin sentido previamente no reportada, en el gen *TYMS* (108). Este caso está muy relacionado con otro reportado en la literatura en el que debido a la toxicidad presentada por un paciente con mCCR, fue necesaria la suspensión del tratamiento a pesar de presentar una excelente respuesta con 5-FU. Habiéndose descartado la presencia de posibles variantes funcionales en el gen *DPYD*, se identificó en el paciente el genotipo 2R/2R para la variante tipo VNTR (rs45445694) del gen *TYMS*, asociado a una baja expresión de la enzima, lo que llevó a los autores a sugerir la presencia de este genotipo como posible causa de la toxicidad y la respuesta evidenciada en el paciente (109).

Tomando en consideración toda la evidencia presentada, es viable plantear la hipótesis de que la presencia de variantes en el gen *TYMS* que tengan implicación funcional en la actividad de la enzima o en su expresión, pueden ser biomarcadores potenciales predictivos de respuesta y toxicidad a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas. Bajo esta hipótesis se llevó a cabo el presente trabajo utilizando un enfoque basado en gen candidato sobre una



población de pacientes diagnosticados con tumores malignos de origen gastrointestinal en tratamiento con el esquema quimioterapéutico basado en fluoropirimidinas.

En el presente trabajo, empleando PCR-RFLP fue posible establecer en un análisis retrospectivo de pacientes con CCR, la presencia de los alelos 2R, 3R y G, C correspondientes a las variantes VNTR (rs45445694) y SNV G/C (rs2853542) respectivamente, presentes en la región de amplificación del promotor (TSER) en la región 5'UTR del gen *TYMS*. No se identificaron los alelos 1R y 4R del VNTR en ninguno de los sujetos, sanos o enfermos, de la población bajo estudio. Estos alelos han sido reportados previamente con una muy baja frecuencia alélica en población africana y en residentes en Los Angeles con ascendencia mexicana (4R) y en población india (1R) (73, 77, 80). Por su parte el alelo C del SNV G/C (rs183205964) presente en la misma región génica, solo se identificó en un sujeto sano y en un paciente con CG, ambos heterocigotos, en un análisis prospectivo posterior.

Para el grupo de pacientes con CCR, se estableció que el 24% desarrollaron algún tipo de evento tóxico grave durante el tratamiento con fluoropirimidinas. Durante el análisis se estableció una asociación entre el genotipo 2R/2R y el riesgo de presentar toxicidad grave al tratamiento con fluoropirimidinas en este grupo de pacientes (OR=10.000 IC95% 1.480-67.554). Este resultado sin embargo está condicionado por el no cumplimiento con el equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución de genotipos de la variante tipo VNTR en esta población de pacientes.

Po su parte durante el análisis prospectivo posterior en pacientes diagnosticados con tumores gastrointestinales se evidenció un porcentaje aún más amplio de pacientes que experimentaron eventos de toxicidad grave (29%). En esta cohorte, no se encontró diferencias en el riesgo de padecer efectos tóxicos por grupos de edad (mayores de 70 vs menores de 70 años) o sexo, aunque en otros estudios previos más amplios, si se hayan reportado tales diferencias en otras poblaciones (83). En esta cohorte no se presentó ninguna asociación entre las variantes analizadas y la toxicidad.

Respecto a la toxicidad generada por las fluoropirimidinas, existe evidencia clínica que sugiere la posible utilidad de la genotipificación de las variantes del gen *TYMS* en sangre

como biomarcadores genéticos predictivos de toxicidad al tratamiento quimioterapéutico del CCR (110). Los resultados obtenidos en el presente estudio están en concordancia con los reportados en la literatura para pacientes con CCR. Un primer estudio demostró una asociación significativa entre el genotipo homocigoto 2R/2R en los tumores de pacientes que recibieron tratamiento con 5-FU y la incidencia de efectos tóxicos graves. Adicionalmente, en este mismo estudio se encontró una asociación entre el haplotipo 2R/6bp+ con el riesgo de toxicidad grave, al igual que la presencia del genotipo 2R/2R (111). Resultados similares fueron obtenidos al genotipificar esta variante en muestras de sangre de pacientes con CCR, en los que se ha reportado una mayor incidencia de eventos adversos graves en individuos homocigotos para el alelo 2R, con un incremento de 2.5 veces en el riesgo de toxicidad representada en el desarrollo del síndrome mano-pie con el uso de 5-FU y de su análogo la capecitabina, (47, 112).

En el presente trabajo se pudo comprobar la asociación significativa entre la presencia de los alelos 3R, G y *del* en las variantes VNTR (rs45445694), SNV G/C (rs2853542) e indel (rs151264360) respectivamente, con un fracaso en la respuesta al tratamiento con fluoropirimidinas en la cohorte de pacientes bajo estudio.

Un estudio realizado en pacientes con CCR que recibieron tratamiento basado en 5-FU mostró que las combinaciones 2R/3R-6bp+/6bp+ y 3R/3R con cualquier genotipo en la región 3'UTR (6bp+/6bp+, 6bp+/6bp-, 6bp-/6bp-) ofrecen un peor pronóstico, con tiempos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global inferiores, comparados a otros genotipos. Los autores aducen las diferencias significativas en la respuesta al tratamiento a que estos genotipos estarían asociados a una mayor expresión de la enzima TS (110). En esta misma línea, en otro estudio se observó una asociación de tipo genotipo 3R/3R-mayor expresión en el tejido tumoral-menor respuesta al 5-FU y genotipo 2R/2R-menor expresión en el tejido tumoral-mayor respuesta al 5-FU (113). En principio se postuló que el mecanismo por el cual el genotipo 3R/3R se asocia con una mayor expresión de la enzima estaría mediado por una mayor actividad traduccional sobre el mRNA, más que por un incremento en el nivel de transcripción del gen (114). Sin embargo, la identificación de un polimorfismo tipo SNV (G>C) presente en la posición 12 de la primera repetición del VNTR con doble repetición (2R), así como de otro polimorfismo presente en el 12<sup>vo</sup> nucleótido de la segunda repetición del VNTR con tres repeticiones (3R) y su particular influencia en la expresión del gen, dio

origen a una nueva hipótesis que permitiera explicar la falta de uniformidad respecto de los resultados obtenidos en los estudios previos que evalúan la relación entre el VNTR y la respuesta clínica al 5-FU en el CG y el CCR (115, 116). La presencia del SNV en la segunda repetición del alelo 3R, produce dos alelos adicionales (3RG y 3RC), de los cuáles el alelo 3RG se ha asociado con una mayor actividad transcripcional y traslacional del mRNA del gen *TYMS* *in vitro* y menor quimiosensibilidad a fluoropirimidinas, hecho posiblemente relacionado con la presencia de un sitio de unión al factor de transcripción USF-1 (81, 117, 118) (figura 25).

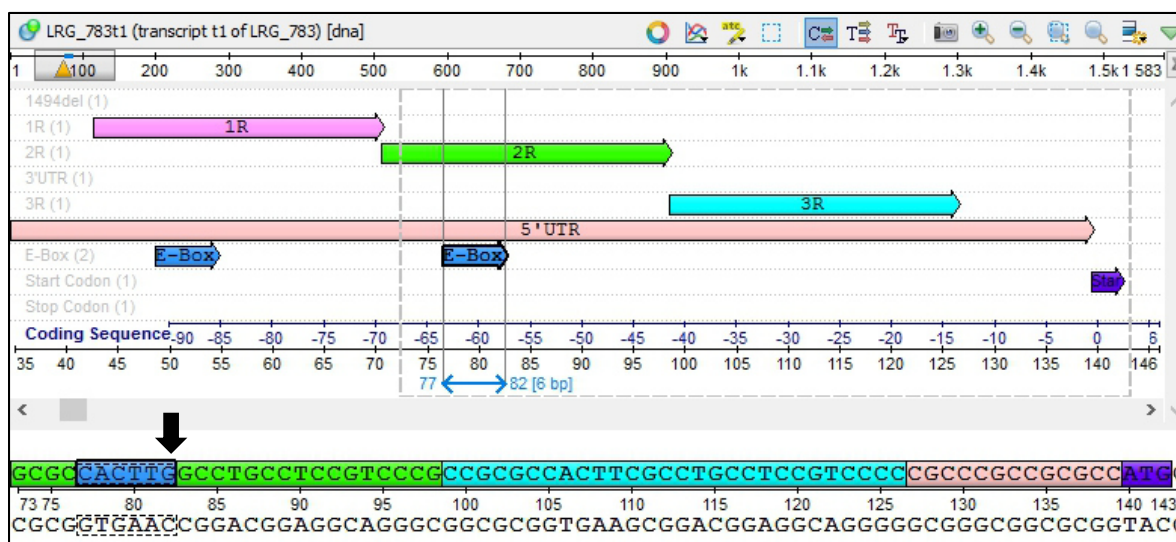


Figura 25. Representación gráfica de la posición de los alelos del VNTR en la región 5'UTR del gen *TYMS* y la secuencia de unión al factor USF-1. Las repeticiones 1R, 2R y 3R del VNTR se indican en su posición relativa respecto de la región 5'UTR del gen. La flecha marcada como start corresponde a la posición de inicio de la transcripción (posición 0 para coordenadas de la secuencia codificante). Las flechas marcadas como E-Box, corresponden a las secuencias de unión al factor de transcripción USF-1. Esta última se identificada en el recuadro izquierdo inferior con la secuencia nucleotídica CACTTG en la cadena positiva. La posición del alelo C de la variante tipo SNV (rs2853542) en la segunda repetición se indica con la flecha negra y corresponde justo al último nucleótido de la secuencia de unión a USF-1. Imagen generada mediante anotación manual de las secuencias respectivas con el programa Unipro UGENE 1.25 a partir de datos obtenidos de Ensembl genome browser 87.

Si bien, se ha observado que la presencia del alelo 3R se relaciona con un mayor nivel de expresión de la enzima TS tanto en el tejido tumoral como en el tejido sano (119), la asociación entre este polimorfismo y la sensibilidad al 5-FU en el CG aún no se ha establecido de manera concluyente (120, 121). Como es de esperarse, la sensibilidad de las células de CCR al 5-FU está en relación directa con el nivel de actividad de la enzima TS, sin embargo su uso como marcador de pronóstico para los pacientes que reciben tratamiento con

fluoropirimidinas aún no está del todo validado (122). Por ejemplo, el nivel de expresión de la enzima TS se ha correlacionado de manera inversa en el contexto clínico con la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon metastásico que reciben infusión intravenosa de 5-FU como tratamiento y se propone en este estudio, como un marcador de pronóstico independiente para el tratamiento del cáncer colorectal metastásico con 5-FU (123). Este resultado contrasta sin embargo con el encontrado por Noda y col., quienes relacionaron una mejor respuesta de los pacientes con CCR metastásico al tratamiento con irinotecan más la combinación Leucovorina y 5-FU, en aquellos en los que la expresión de la enzima TS en el tejido tumoral era mayor (124).

La presencia de las variantes tipo SNV incrustadas en el VNTR podrían ayudar a resolver estas discrepancias. En este contexto, clínicamente se han corroborado los resultados obtenidos mediante ensayos *in vitro* en relación con la presencia de ciertos alelos específicos en las regiones 5'UTR y 3'UTR y la respuesta a 5-FU. De esta manera se ha asociado la presencia de los alelos de bajo nivel de expresión de TS (5'UTR 2R, 3RC) y (3'UTR del6bp) con una mejor repuesta de los pacientes con CG al tratamiento adyuvante con regímenes basados en 5-FU (125). En un estudio de asociación genotipo-fenotipo, agrupando los pacientes con CCR en aquellos con genotipos de baja expresión de TS (2R/2R, 2R/3RC, 3RC/3RC) y aquellos con genotipos de alta expresión de la enzima (2R/3RG, 3RC/3RG, 3RG/3RG), Marcuello y col. lograron establecer una mayor probabilidad de respuesta clínica en los pacientes con genotipos de baja expresión que reciben quimioterapia basada en 5-FU (126). Los resultados presentados en el presente trabajo están en concordancia con estos últimos, dado que en la cohorte de pacientes bajo estudio se estableció una mejor respuesta a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas con la presencia de los genotipos catalogados como de baja expresión (OR=4.684 IC95% 1.578-13.900).

Respecto a la expresión de TS entre el tejido sano y el tejido tumoral, en el presente trabajo no se encontró diferencias, más aún los resultados indican una expresión bastante homogénea intra e inter-sujeto. Resultados similares fueron obtenidos al evaluar la expresión tisular de la enzima ERCC1, enzima responsable de la reparación el daño causado por los compuestos de platino sobre el ADN.

La expresión de TS no pudo correlacionarse con los distintos genotipos de las variantes en las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen. Este resultado está en discrepancia con el desbalance

alélico reportado por otro estudio que indica un cambio de 1.5 veces en el nivel de expresión de la enzima con el cambio alélico de estas variantes (127).

Varios estudios muestran una tendencia a una mejor respuesta, representada en un mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad, cuando la expresión de TS es baja en el tejido tumoral (128). Sin embargo, en el CCR la relación entre los polimorfismos localizados en regiones no codificantes y la expresión de la enzima TS en el tejido tumoral no es del todo clara aún, contrastando con los resultados obtenidos *in vitro*. Se ha encontrado asociación entre la presencia del genotipo 3R/3R y la expresión de la enzima mediante análisis inmunohistoquímico en especímenes de tejido tumoral de pacientes chinos con CCR (129). Sin embargo, en un estudio en el que se evaluaron los diferentes genotipos (VNTR, G>C, del6bp) en las regiones no codificantes del gen *TYMS* y la relación entre estos y el nivel de expresión (mARN) de la enzima, no se encontró asociación entre ninguno de estos factores (genotipos vs expresión) ni entre estos con los parámetros de respuesta clínica (supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global) en pacientes con CCR tratados con 5-FU (130). Interesantemente, en el mismo estudio se reportó una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de la enzima TS presentados por el tejido tumoral y tejido no tumoral en las muestras pareadas de los pacientes, siendo mayor la expresión en el tejido no tumoral. Este resultado ya había sido reportado previamente por otro estudio, en el que adicionalmente se encontró una fuerte asociación entre el diplotipo 3RG (presencia simultánea de tres repeticiones en tándem y del alelo G en la segunda repetición del VNTR) en individuos homocigotos y heterocigotos y el nivel de expresión de TS en el tejido no tumoral. Asociación que no fue observada para el tejido tumoral (131). En el presente trabajo se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el alelo G (rs2853542) en el diplotipo 3RG y el fracaso en la respuesta clínica de los pacientes. La ausencia de este alelo en los genotipos catalogados como de baja expresión (L-E: 2R/2R, 2R/3RC, 3RC/3RC) en contraposición a los genotipos catalogados como de alta expresión (H-E: 2R/3RG, 3RC/3RG, 3RG/3RG) explica la asociación significativa a una mejor respuesta con los genotipos de baja expresión en la cohorte de pacientes; asociación que persiste incluso al analizar el sub-grupo de pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Este resultado ha sido reportado previamente para cáncer esofágico pero no para CCR (132).

Una explicación a la falta de concordancia en los resultados de estos estudios .es que en ellos se utilizaron diferentes estrategias metodológicas respecto a la genotipificación de los tejidos tumorales (genotipificación del VNTR vs genotipificación conjunta del VNTR y el SNV) y el análisis de la expresión y actividad de TS (inmunohistoquímica, RT-qPCR, unión a 3H-FdUMP), por lo que sus resultados no son del todo comparables entre sí. Otro aspecto importante a considerar es que pocos de los estudios citados anteriormente indican las medidas tomadas para asegurar la homogeneidad de los tejidos, previo a la extracción de los ácidos nucleicos. Tanto la genotipificación de las variantes del gen *TYMS*, así como la evaluación de su expresión en el tejido tumoral puede generar resultados conflictivos si no se realiza una adecuada selección del tejido en función del contenido de células cancerosas vs células normales adyacentes, o la presencia de tejido necrótico o de infiltrados leucocitarios, un problema que no se tiene al evaluar las variantes de línea germinal en muestras sanguíneas de los pacientes (133, 134). En el presente trabajo se tomaron las medidas necesarias para asegurar la homogeneidad de los cortes histológicos utilizados como material de partida para los ensayos de expresión evitando la contaminación del tejido tumoral con tejido sano y viceversa. Adicionalmente, se realizó una cuidadosa selección de los genes utilizados como normalizadores para el análisis de expresión relativa de los genes de interés.

Por otro lado se ha reportado que el VNTR en la región 5'UTR tendrían implicación en la traducción de la enzima y no en la transcripción del gen (114, 135). Este hecho podría explicar los resultados del presente trabajo en el que se evidenció una asociación entre esta variante y la respuesta clínica pero no con la expresión (mARN) del gen en el tejido tumoral, por lo que el efecto funcional de los SNVs en la región 5'UTR respecto de la respuesta clínica estaría aun por ser identificada.

Por otro lado los resultados presentados aquí, de no asociación entre la variante indel en la región 3'UTR y la expresión de *TYMS* están en discrepancia con los reportados por Mandola y col. en relación a que los individuos homocigotos para el alelo 6bp+ mostraron mayor expresión (mARN) que los homocigotos para el alelo 6bp-, en tejido metastásico hepático de pacientes con mCCR en dicho estudio (64). Si bien es cierto que las muestras utilizadas en

el presente estudio fueron de diferente origen anatómico y de tumores primarios, lo que podría en parte explicar esta discrepancia.

En relación con las diferencia étnicas en las frecuencias alélicas y los genotipos analizados, a partir de la genotipificación de sujetos sanos se estableció que las frecuencias alélicas de la inserción (72%) y la delección (28%) para la variante en la región 3'UTR del gen *TYMS* son cercanas a lo reportado por Gallegos-Arreola y col. para población sana del occidente de México (136). Así mismo, estas frecuencias alélicas se corroboran con lo reportado para poblaciones mestizas americanas y europeas. Cabe destacar sin embargo, que las frecuencias alélicas para ambos alelos en estas poblaciones son totalmente opuestas a lo reportado para poblaciones de África y del este de Asia (figura 26). Un resultado similar fue obtenido para los alelos 2R y 3R del VNTR en la región 5'UTR del gen.

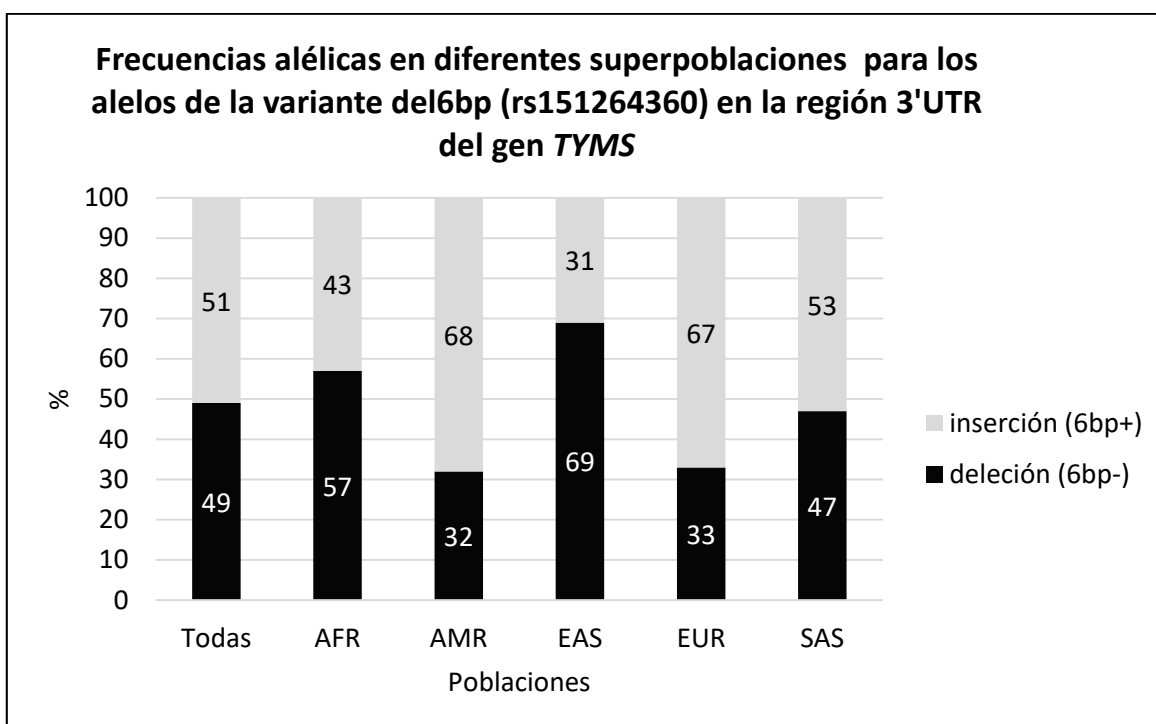


Figura 26. Distribución de las frecuencias alélicas para los alelos 6bp+ y 6bp- de la variante en la región 3'UTR del gen *TYMS*, entre las diferentes superpoblaciones del proyecto 1000Genomes. AFR=Africanos, AMR=Americanos mestizos, EAS=Este de Asia, EUR=Europeos, SAS=Sur de Asia. Datos recopilados del proyecto 1000Genomes fase 3.

Un resultado importante del presente trabajo fue determinar las diferencias genéticas asociadas a las variantes del en *TYMS* entre la población mexicana y otras poblaciones. Teniendo en cuenta que del total de estudios publicados en los últimos 10 años en PubMed

relacionados con la respuesta al tratamiento y su asociación con las variantes del gen *TYMS*, el 22% (24/110) corresponden a estudios realizados en población asiática, resulta importante considerar las diferencias genéticas a la hora de analizar sus resultados, ya que por los resultados presentados en este trabajo los resultados de estos estudios no son extrapolables a la población mexicana.

Las diferencias étnicas en relación con la frecuencia alélica de las variantes en el promotor del gen *TYMS* podrían tener importantes implicaciones en relación con las diferencias observadas en el desarrollo de los eventos tóxicos y en la respuesta a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas entre diferentes poblaciones de pacientes (67, 137-139). Así mismo, no puede descartarse la presencia de otras mutaciones en regiones regulatorias del gen *TYMS* con efectos directos en la inhibición de la enzima o la presencia de variantes en otros genes relacionados con el metabolismo del 5-FU con incidencia en el desarrollo de efectos tóxicos (140).

Urge la necesidad de establecer un panel estandarizado basado en la construcción de bloques de haplotipos que agrupen todas las variantes del promotor del gen *TYMS*, así como otras variantes funcionales y su inclusión en un análisis de asociación genotipo-fenotipo poligénico en diferentes grupos étnicos, el cual podría develar el aporte relativo definitivo de dichas variantes en el desarrollo de la toxicidad sistémica y la respuesta clínica a las fluoropirimidinas (141, 142).

En conclusión, a partir de los resultados de los primeros estudios funcionales y de la caracterización intratumoral de la expresión de la proteína TS y las variantes de línea germinal en el promotor del gen, así como en la región 3'UTR, estos se han propuesto como posibles marcadores de pronóstico y de respuesta y toxicidad a quimioterapia basada en fluoropirimidinas en el CCR. Sin embargo, el establecimiento de biomarcadores predictivos de respuesta y toxicidad en el tratamiento quimioterapéutico, requiere de su validación en ensayos clínicos controlados en poblaciones homogéneas. En esta instancia, en un ensayo clínico exploratorio, efectuado recientemente con un reducido grupo de pacientes con tumores de diferente origen, se ha empleado la genotipificación del VNTR en el promotor del gen *TYMS* como parámetro de evaluación de la dosis máxima tolerada en un esquema basado en Capecitabina, validando el uso de esta variante genética como marcador de



tolerancia al tratamiento quimioterapéutico con este fármaco (143). Si bien los resultados a nivel de expresión intratumoral de TS con respecto a la respuesta clínica han sido conflictivos, en gran parte por la ausencia de un método de análisis estandarizado que pueda catalogarse como *gold standard*, estudios orientados a la medicina de precisión como el presente, están sustentados en la creciente evidencia de la relación de las variantes en el promotor del gen *TYMS* con la eficacia y la tolerancia al tratamiento con fluoropirimidinas en estudios de corte retrospectivo, lo que promueve su potencial uso como biomarcadores respuesta y toxicidad a 5-FU y compuestos análogos (144). Los resultados obtenidos en el presente trabajo están en esta misma línea de evidencia.

Se logró establecer un método para la genotipificación de las variantes en la región de amplificación del promotor del gen *TYMS* en pacientes con tumores gastrointestinales y en sujetos sanos. El método fue empleado con éxito para realizar los análisis de asociación entre los genotipos para estas variantes y la respuesta clínica objetiva y la toxicidad del tratamiento quimioterapéutico basado en fluoropirimidinas.

Se estableció la asociación estadísticamente significativa entre el genotipo 2R/2R y un riesgo elevado de desarrollar toxicidad grave frente al tratamiento con fluoropirimidinas en pacientes con cáncer colorrectal.

En un análisis de tipo prospectivo se estableció la asociación entre la presencia de los alelos 3R, G y 6bp- de las variantes VNTR (rs45445694), SNV G/C (rs2853542) y del6bp (rs151264360) respectivamente, con un fracaso en la respuesta al tratamiento con fluoropirimidinas en pacientes con tumores de origen gastrointestinal. Una aporte importante de este trabajo fue la determinación por primera vez del valor predictivo independiente del diplotipo 3G como marcador de fracaso en la respuesta clínica a fluoropirimidinas en pacientes con tumores gastrointestinales.

No se encontró evidencia de diferencias en la expresión de los genes *TYMS* y *ERCC1* entre los tejidos tumoral y sano de origen gastrointestinal.

No se encontró evidencia de asociación entre las variantes en las regiones no codificantes del gen *TYMS* y su expresión en tejidos tumorales.

Se evidenció que la distribución de genotipos para las variantes en las regiones no codificantes del gen *TYMS* en la población mexicana se aproxima a la de otras poblaciones americanas y caucásicas, pero dista mucho de aquellas presentadas por poblaciones asiáticas.

Este trabajo muestra evidencia por primera vez, el valor predictivo de las variantes en regiones no codificantes del gen *TYMS* como marcadores de respuesta a quimioterapia para pacientes con tumores gastrointestinales en población mexicana.

Ampliar el rango de posibles biomarcadores de respuesta y toxicidad basado en el conocimiento de la farmacodinamia y farmacocinética del 5-FU y compuestos análogos y generar un panel de marcadores secuenciables por NGS para realizar estudios de asociación reproducibles a gran escala.

Evaluar el perfil farmacocinético del 5-FU en los pacientes que reciben tratamiento y establecer la posible asociación entre los parámetros farmacocinéticos y la respuesta clínica y la toxicidad, así como con la presencia de variantes de línea germinal en genes candidatos.

Evaluar la expresión de TS en una muestra más amplia de tejidos utilizando la metodología empleada para analizar la expresión del gen *TYMS* en el presente trabajo, corroborar los resultados con el análisis de expresión a nivel de proteína y analizar la posible asociación entre la expresión de *TYMS* y la respuesta clínica a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas.

## Bibliografía

1. Torres-sánchez LE, Rojas-martínez R, Escamilla-núñez C, Salazar EDIV, Lazcano-ponce E. Tendencias en la mortalidad por cáncer en México de 1980 a 2011. *Salud Pública de México*. 2014;56(5):473-91.
2. Pérez JdJ, Bourlon MT, Loaeza del Castillo A, Villalobos G. Variaciones en la frecuencia de cáncer del aparato digestivo en el transcurso de 35 años en cuatro instituciones de la Ciudad de México de distinto nivel socioeconómico. *Gaceta Medica de Mexico*. 2014;150(1):49-57.
3. Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol*. 2012;4(7):156-69.
4. Adán-Merino L, Gómez-Senent S, Froilán-Torres C, Suárez J, Martín- Arranz E, Larrauri J, et al. Adenocarcinoma gástrico en adultos jóvenes; estudio comparativo con pacientes mayores. *Rev Gastroenterol Méx*. 2010;3(75):253-60.
5. González-Trujillo JL, Vargas-Vorácková F, Torres-Villalobos GM, Milke García M, Villalobos Pérez J. Variaciones en un periodo de 24 años del cáncer colorrectal y gástrico en México. *Rev Gastroenterol Méx*. 2002;68(2):120-5.
6. Arcos MC, Acevedo Tirado MT. Revisión y actualización general en cáncer colorrectal. *Anales de Radiología México*. 2009;1:99-115.
7. Verastegui E, Mohar A. Colorectal cancer in Mexico: should a middle income country invest in screening or in treatment? *The European journal of health economics : HEPAC : health economics in prevention and care*. 2010;10 Suppl 1:S107-14.
8. Durán Ramos Ó, González Ojeda A, Cisneros López FJ, Hermosillo Sandova JM. Experiencia en el manejo del cáncer colorrectal en el Centro Médico Nacional de Occidente. *Cirujano General*. 2000;22(2):153-8.
9. De la Torre Bravo A, Oñate Ocaña LF, Poot Braga JJ, Victoria Flores WN, Maury Cuna CH, Bueno RR. Guía para el diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico. *Tratamiento*. *Rev Gastroenterol Méx*. 2010;2(75):243-6.
10. Cervantes A, Roda D, Tarazona N, Roselló S, Pérez-Fidalgo JA. Current questions for the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(1):60-7.
11. Okines A, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Group ObotEGW. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010;21(suppl 5):v50-v4.

12. Ajani JA, Bentrem DJ, Besh S, D'Amico TA, Das P, Denlinger C, et al. Gastric Cancer, Version 2.2013. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* : JNCCN. 2013;11(5):531-46.
13. Secretaría de Salud. Diagnóstico y Tratamiento del Adenocarcinoma Gástrico en Pacientes Adultos. México D.F, 2009 [03/04/2013]. Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>
14. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 (ver. 3). *Gastric Cancer*. 2011;14(2):113-23.
15. Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W, Kleber G, Grothey A, Haerting J, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database of Syst Rev*. 2010(Issue 3. Art. No.: CD004064):109.
16. Ishiguro M, Watanabe T, Kotake K, Sugihara K. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum Guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer: comparison with western guidelines. *Colorectal Cancer*. 2013;2(2):179-90.
17. Simmonds PC. Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Colorectal Cancer Collaborative Group. BMJ*. 2000;321(7260):531-5.
18. Wu XP, Dolnick BJ. 5-Fluorouracil alters dihydrofolate reductase pre-mRNA splicing as determined by quantitative polymerase chain reaction. *Mol Pharmacol*. 1993;44(1):22-9.
19. Noordhuis P, Holwerda U, Van der Wilt CL, Van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S, et al. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann Oncol*. 2004;15(7):1025-32.
20. Van Triest B, Pinedo HM, Giaccone G, Peters GJ. Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors. *Ann Oncol*. 2000;11(4):385-91.
21. Houghton JA, Tillman DM, Harwood FG. Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death. *Clin Cancer Res*. 1995;1(7):723-30.
22. Santi DV, McHenry CS. 5-Fluoro-2'-deoxyuridylate: covalent complex with thymidylate synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(7):1855-7.
23. Geng L, Huehls AM, Wagner JM, Huntoon CJ, Karnitz LM. Checkpoint signaling, base excision repair, and PARP promote survival of colon cancer cells treated with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil. *PLoS one*. 2011;6(12):e28862.

24. Kunz C, Focke F, Saito Y, Schuermann D, Lettieri T, Selfridge J, et al. Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-fluorouracil. *PLoS Biol.* 2009;7(4):e91.
25. Huehls AM, Huntoon CJ, Joshi PM, Baehr CA, Wagner JM, Wang X, et al. Genomically Incorporated 5-Fluorouracil that Escapes UNG-Initiated Base Excision Repair Blocks DNA Replication and Activates Homologous Recombination. *Molecular pharmacology.* 2016;89(1):53-62.
26. Pettersen HS, Visnes T, Vagbo CB, Svaasand EK, Doseth B, Slupphaug G, et al. UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(19):8430-44.
27. CARADONNA SJ, CHENG Y-C. The Role of Deoxyuridine Triphosphate Nucleotidohydrolase, Uracil-DNA Glycosylase, and DNA Polymerase  $\alpha$  in the Metabolism of FUDr in Human Tumor Cells. *Mol Pharmacol.* 1980;18(3):513-20.
28. Pinedo HM, Peters GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol.* 1988;6(10):1653-64.
29. Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res.* 1987;47(8):2203-6.
30. Blaschke M, Blumberg J, Wegner U, Nischwitz M, Ramadori G, Cameron S. Measurements of 5-FU Plasma Concentrations in Patients with Gastrointestinal Cancer: 5-FU Levels Reflect the 5-FU Dose Applied. *Journal of Cancer Therapy.* 2012;3:28-36.
31. Belliveau JF, Posner MR, Crabtree GW, Weitberg AB, Wiemann MC, Cummings FJ, et al. Clinical pharmacokinetics of 3-day continuous infusion cisplatin and daily bolus 5-Fluorouracil. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;40(1):115-7.
32. Cai X, Fang JM, Xue P, Song WF, Hu J, Gu HL, et al. The role of IVS14+1 G > A genotype detection in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene and pharmacokinetic monitoring of 5-fluorouracil in the individualized adjustment of 5-fluorouracil for patients with local advanced and metastatic colorectal cancer: a preliminary report. *European review for medical and pharmacological sciences.* 2014;18(8):1247-58.
33. Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E. Pharmacokinetically Guided Dose Adjustment of 5-Fluorouracil: A Rational Approach to Improving Therapeutic Outcomes. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(22):1543-52.
34. Gamelin E, Delva R, Jacob J, Merrouche Y, Raoul JL, Pezet D, et al. Individual Fluorouracil Dose Adjustment Based on Pharmacokinetic Follow-Up Compared With Conventional Dosage:

Results of a Multicenter Randomized Trial of Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(13):2099-105.

35. Koukourakis GV, Kouloulis V, Koukourakis MJ, Zacharias GA, Zabatis H, Kouvaris J. Efficacy of the oral fluorouracil pro-drug capecitabine in cancer treatment: a review. *Molecules.* 2008;13(8):1897-922.

36. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 1998;34(8):1274-81.

37. Schuller J, Cassidy J, Dumont E, Roos B, Durston S, Banken L, et al. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;45(4):291-7.

38. Takebayashi Y, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Furukawa T, Kinoshita F, et al. The activity and expression of thymidine phosphorylase in human solid tumours. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 1996;32a(7):1227-32.

39. Yoshimura A, Kuwazuru Y, Furukawa T, Yoshida H, Yamada K, Akiyama S. Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1034(1):107-13.

40. Takebayashi Y, Yamada K, Maruyama I, Fujii R, Akiyama S, Aikou T. The expression of thymidine phosphorylase and thrombomodulin in human colorectal carcinomas. *Cancer letters.* 1995;92(1):1-7.

41. Tsukamoto Y, Kato Y, Ura M, Horii I, Ishitsuka H, Kusuhara H, et al. A physiologically based pharmacokinetic analysis of capecitabine, a triple prodrug of 5-FU, in humans: the mechanism for tumor-selective accumulation of 5-FU. *Pharmaceutical research.* 2001;18(8):1190-202.

42. Carrato A, Gallego-Plazas J, Guillen-Ponce C. Capecitabine plus oxaliplatin for the treatment of colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8(2):161-74.

43. Reigner B, Blesch K, Weidekamm E. Clinical pharmacokinetics of capecitabine. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(2):85-104.

44. Iqbal S, Lenz HJ. Capecitabine: the new generation of fluoropyrimidines in colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2004;4(6):947-55.

45. Yasuno H, Kurasawa M, Yanagisawa M, Sato Y, Harada N, Mori K. Predictive markers of capecitabine sensitivity identified from the expression profile of pyrimidine nucleoside-metabolizing enzymes. *Oncology reports*. 2013;29(2):451-8.
46. Nemoto T, Dao TL. 5-fluorouracil and cyclophosphamide in disseminated breast cancer. Relationship between chemotherapy and hormonal therapy. *New York state journal of medicine*. 1971;71(5):554-8.
47. Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(13):2131-8.
48. Ciccolini J, Gross E, Dahan L, Lacarelle B, Mercier C. Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin Colorectal Cancer*. 2010;9(4):224-8.
49. Grem J, Quinn M, Ismail A, Takimoto C, Lush R, Liewehr D, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of 5-fluorouracil given as a one-hour intravenous infusion. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001;47(2):117-25.
50. Del Re M, Di Paolo A, van Schaik RH, Bocci G, Simi P, Falcone A, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase polymorphisms and fluoropyrimidine toxicity: ready for routine clinical application within personalized medicine? *The EPMA journal*. 2010;1(3):495-502.
51. Meta-Analysis Group In Cancer. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. Meta-Analysis Group In Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(11):3537-41.
52. Tuchman M, Stoeckeler JS, Kiang DT, O'Dea RF, Ramnaraine ML, Mirkin BL. Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *The New England journal of medicine*. 1985;313(4):245-9.
53. Nishiyama M, Eguchi H. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in gastric cancer chemotherapy. *Adv Drug Del Rev*. 2009;61(5):402-7.
54. Lunenburg CA, Henricks LM, Guchelaar HJ, Swen JJ, Deenen MJ, Schellens JH, et al. Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2016;54:40-8.



55. Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Soulie P, Craipeau MC, Traore S, et al. Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(11):2895-904.
56. Van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res.* 2000;6(12):4705-12.
57. Amstutz U, Farese S, Aebi S, Largiader CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene variation and severe 5-fluorouracil toxicity: a haplotype assessment. *Pharmacogenomics.* 2009;10(6):931-44.
58. Hewett M, Oliver DE, Rubin DL, Easton KL, Stuart JM, Altman RB, et al. PharmGKB: the Pharmacogenetics Knowledge Base. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(1):163-5.
59. Van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J, Meinsma R, Zoetekouw L, Waterham HR, et al. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res.* 2001;7(5):1149-53.
60. Deenen MJ, Terpstra WE, Cats A, Boot H, Schellens JH. Standard-dose tegafur combined with uracil is not safe treatment after severe toxicity from 5-fluorouracil or capecitabine. *Annals of internal medicine.* 2010;153(11):767-8.
61. Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, et al. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1587(2-3):194-205.
62. Watson RG, Muhale F, Thorne LB, Yu J, O'Neil BH, Hoskins JM, et al. Amplification of thymidylate synthetase in metastatic colorectal cancer patients pretreated with 5-fluorouracil-based chemotherapy. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 2010;46(18):3358-64.
63. Keam B, Im SA, Han SW, Ham HS, Kim MA, Oh DY, et al. Modified FOLFOX-6 chemotherapy in advanced gastric cancer: Results of phase II study and comprehensive analysis of polymorphisms as a predictive and prognostic marker. *BMC cancer.* 2008;8:148.
64. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics.* 2004;14(5):319-27.
65. Shimoyama S. Pharmacogenetics of fluoropyrimidine and cisplatin. A future application to gastric cancer treatment. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(6):970-81.

66. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct.* 1995;20(3):191-7.
67. Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics.* 1999;58(3):310-2.
68. Giovannetti E, Ugrasena DG, Supriyadi E, Vroling L, Azzarello A, de Lange D, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and thymidylate synthase promoter (TSER) polymorphisms in Indonesian children with and without leukemia. *Leuk Res.* 2008;32(1):19-24.
69. Gusella M, Padriani R. G>C SNP of thymidylate synthase with respect to colorectal cancer. *Pharmacogenomics.* 2007;8(8):985-96.
70. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory; 2001.
71. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
72. Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(12):1381-5.
73. Marsh S, King CR, Van Booven DJ, Revollo JY, Gilman RH, McLeod HL. Pharmacogenomic assessment of Mexican and Peruvian populations. *Pharmacogenomics.* 2015;16(5):441-8.
74. Acuna M, Eaton L, Cifuentes L, Massardo D. Genetic variants in the enhancer region of the thymidylate synthase gene in the Chilean population. *British journal of clinical pharmacology.* 2006;61(6):778-82.
75. Canalle R, da Silva SAV, Scrideli CA, de Paula Queiroz RG, Tone LG. Polymorphisms in the thymidylate synthase promoter and the DNA repair genes XRCC1 and XPD in a Brazilian population. *Environ Mol Mutagen.* 2006;47(9):725-32.
76. Suzen HS, Yuce N, Guvenc G, Duydu Y, Erke T. TYMS and DPYD polymorphisms in a Turkish population. *European journal of clinical pharmacology.* 2005;61(12):881-5.
77. Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Hum Mutat.* 2000;16(6):528.

78. 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(18):6004-7.
79. Huang MY, Fang WY, Lee SC, Cheng TL, Wang JY, Lin SR. ERCC2 2251A>C genetic polymorphism was highly correlated with early relapse in high-risk stage II and stage III colorectal cancer patients: a preliminary study. *BMC cancer.* 2008;8:50.
80. Dhawan D, Padh H. Thymidylate synthase enhancer region: Novel allele in Indians. *Ann Hum Biol.* 2016:1-4.
81. 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(18):6004-7.
82. Rustum Y, editor. *Fluoropyrimidines in Cancer Therapy.* Totowa, NJ (USA): Humana Press; 2003.
83. Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Investigational New Drugs.* 2000;18(4):299-313.
84. Haller DG, Cassidy J, Clarke SJ, Cunningham D, Van Cutsem E, Hoff PM, et al. Potential Regional Differences for the Tolerability Profiles of Fluoropyrimidines. *J Clin Oncol.* 2008;26(13):2118-23.
85. Di Francia R, Cimino L, Berretta M. Genetic variants influencing Fluoropyrimidine based-therapy and available methods to detect them. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16:285-92.
86. Lee AM, Shi Q, Pavey E, Alberts SR, Sargent DJ, Sinicrope FA, et al. DPYD variants as predictors of 5-fluorouracil toxicity in adjuvant colon cancer treatment (NCCTG N0147). *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(12).
87. Caronia D, Martin M, Sastre J, de la Torre J, Garcia-Saenz JA, Alonso MR, et al. A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. *Clin Cancer Res.* 2011;17(7):2006-13.
88. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, Swen JJ, McLeod HL, Diasio RB, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2013;94(6):640-5.
89. Cortejoso L, Lopez-Fernandez LA. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics.* 2012;13(10):1173-91.

90. Matsusaka S, Lenz HJ. Pharmacogenomics of fluorouracil -based chemotherapy toxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2015;11(5):811-21.
91. van der Wilt CL, van Groeningen CJ, Pinedo HM, Smid K, Hoekman K, Meijer S, et al. 5-fluorouracil/leucovorin-induced inhibition of thymidylate synthase in normal tissues of mouse and man. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1997;123(11-12):595-601.
92. Santini D, Vincenzi B, Perrone G, Rabitti C, Borzomati D, Caricato M, et al. Thymidylate synthase expression in normal colonic mucosa: a predictive marker of toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Oncology*. 2004;67(2):135-42.
93. Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol*. 1997;15(10):3223-9.
94. Fujiwara H, Terashima M, Irinoda T, Takagane A, Abe K, Kashiwaba M, et al. Quantitative measurement of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA level in gastric cancer by real-time RT-PCR. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 2002;93(12):1342-50.
95. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate Synthase Expression and Prognosis in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 2004;22(3):529-36.
96. Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Volkenandt M, Shea LC, Aigner K, et al. Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 1992;52(1):108-16.
97. Johnston PG, Lenz H-J, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, et al. Thymidylate Synthase Gene and Protein Expression Correlate and Are Associated with Response to 5-Fluorouracil in Human Colorectal and Gastric Tumors. *Cancer Res*. 1995;55(7):1407-12.
98. Xie W, Duan R, Chen I, Samudio I, Safe S. Transcriptional Activation of Thymidylate Synthase by 17 $\beta$ -Estradiol in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology*. 2000;141(7):2439-49.
99. Horie N, Chimoto M, Nozawa R, Takeishi K. Characterization of regulatory sequences and nuclear factors that function in cooperation with the promoter of the human thymidylate synthase gene. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1216(3):409-16.
100. Horie N, Takeishi K. Identification of functional elements in the promoter region of the human gene for thymidylate synthase and nuclear factors that regulate the expression of the gene. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(29):18375-81.

101. Dong S, Lester L, Johnson LF. Transcriptional control elements and complex initiation pattern of the TATA-less bidirectional human thymidylate synthase promoter. *Journal of cellular biochemistry*. 2000;77(1):50-64.
102. Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, Kaneda S, Takeishi K, Seno T. Cell-cycle-directed regulation of thymidylate synthase messenger RNA in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate. *J Mol Biol*. 1986;190(4):559-67.
103. Ash J, Liao WC, Ke Y, Johnson LF. Regulation of mouse thymidylate synthase gene expression in growth-stimulated cells: upstream S phase control elements are indistinguishable from the essential promoter elements. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(22):4649-56.
104. Johnson LF. Posttranscriptional regulation of thymidylate synthase gene expression. *Journal of cellular biochemistry*. 1994;54(4):387-92.
105. Chu J, Dolnick BJ. Natural antisense (rTSalpha) RNA induces site-specific cleavage of thymidylate synthase mRNA. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1587(2-3):183-93.
106. Lin X, Parsels LA, Voeller DM, Allegra CJ, Maley GF, Maley F, et al. Characterization of a cis-acting regulatory element in the protein coding region of thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(6):1381-9.
107. Marsh S. Thymidylate synthase pharmacogenetics. *Invest New Drugs*. 2005;23(6):533-7.
108. Balboa-Beltran E, Duran G, Lamas MJ, Carracedo A, Barros F. Long Survival and Severe Toxicity Under 5-Fluorouracil-Based Therapy in a Patient With Colorectal Cancer Who Harbors a Germline Codon-Stop Mutation in TYMS. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(9):1298-303.
109. Shahrokni A, Rajebi MR, Saif MW. Toxicity and efficacy of 5-fluorouracil and capecitabine in a patient with TYMS gene polymorphism: A challenge or a dilemma? *Clin Colorectal Cancer*. 2009;8(4):231-4.
110. Hitre E, Budai B, Adleff V, Czeglédi F, Horvath Z, Gyergyay F, et al. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(10):723-30.
111. Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoue F, Lorient MA, Tregouet DA, Landi B, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(17):5880-8.
112. Kristensen MH, Pedersen PL, Melsen GV, Ellehaug J, Mejer J. Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase

genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. The Journal of international medical research. 2010;38(3):870-83.

113. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. Pharmacogenomics J. 2001;1(1):65-70.

114. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, et al. Different Lengths of a Polymorphic Repeat Sequence in the Thymidylate Synthase Gene Affect Translational Efficiency but Not Its Gene Expression. Clin Cancer Res. 2001;7(12):4096-101.

115. Gusella M, Bolzonella C, Crepaldi G, Ferrazzi E, Padrini R. A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. Pharmacogenomics J. 2006;6(6):421-4.

116. Lincz LF, Scorgie FE, Garg MB, Ackland SP. Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the thymidylate synthase 2R allele. International journal of cancer Journal international du cancer. 2007;120(9):1930-4.

117. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, et al. 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(11):2898-904.

118. Yawata A, Kim SR, Miyajima A, Kubo T, Ishida S, Saito Y, et al. Polymorphic tandem repeat sequences of the thymidylate synthase gene correlates with cellular-based sensitivity to fluoropyrimidine antitumor agents. Cancer Chemother Pharmacol. 2005;56(5):465-72.

119. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. Anticancer Res. 1999;19(4B):3249-52.

120. Uchida K, Hayashi K, Kawakami K, Schneider S, Yochim JM, Kuramochi H, et al. Loss of Heterozygosity at the Thymidylate Synthase (TS) Locus on Chromosome 18 Affects Tumor Response and Survival in Individuals Heterozygous for a 28-bp Polymorphism in the TS Gene. Clin Cancer Res. 2004;10(2):433-9.

121. Toriumi F, Kubota T, Saikawa Y, Yoshida M, Otani Y, Watanabe M, et al. Thymidylate Synthetase (TS) Genotype and TS/dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Level as an Indicator in Determining Chemosensitivity to 5-Fluorouracil in Advanced Gastric Carcinoma. Anticancer Res. 2004;24(4):2455-64.

122. van Triest B, Pinedo HM, van Hensbergen Y, Smid K, Telleman F, Schoenmakers PS, et al. Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 1999;5(3):643-54.
123. Hosokawa A, Yamada Y, Shimada Y, Muro K, Hamaguchi T, Morita H, et al. Prognostic significance of thymidylate synthase in patients with metastatic colorectal cancer who receive protracted venous infusions of 5-fluorouracil. *Int J Clin Oncol.* 2004;9(5):388-92.
124. Noda E, Maeda K, Inoue T, Nishihara T, Nishiguchi Y, Ohira M, et al. Expression of genes for 5-FU-metabolizing enzymes and response to irinotecan plus 5-FU-leucovorin in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2006;26(6C):4653-8.
125. Kawakami K, Graziano F, Watanabe G, Ruzzo A, Santini D, Catalano V, et al. Prognostic role of thymidylate synthase polymorphisms in gastric cancer patients treated with surgery and adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3778-83.
126. Marcuello E, Altes A, del Rio E, Cesar A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2004;112(5):733-7.
127. Balboa-Beltran E, Cruz R, Carracedo A, Barros F. Delimiting Allelic Imbalance of TYMS by Allele-Specific Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(27):e1091.
128. Afzal S, Gusella M, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Andersen JT, et al. The association of polymorphisms in 5-fluorouracil metabolism genes with outcome in adjuvant treatment of colorectal cancer. *Pharmacogenomics.* 2011;12(9):1257-67.
129. Yu KH, Wang WX, Ding YM, Li H, Wang ZS. Polymorphism of thymidylate synthase gene associated with its protein expression in human colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2008;14(4):617-21.
130. Vignoli M, Nobili S, Napoli C, Putignano AL, Morganti M, Papi L, et al. Thymidylate synthase expression and genotype have no major impact on the clinical outcome of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Pharmacological Research.* 2011;64(3):242-8.
131. Mauritz R, Giovannetti E, Beumer IJ, Smid K, Van Groeningen CJ, Pinedo HM, et al. Polymorphisms in the enhancer region of the thymidylate synthase gene are associated with thymidylate synthase levels in normal tissues but not in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer.* 2009;8(3):146-54.

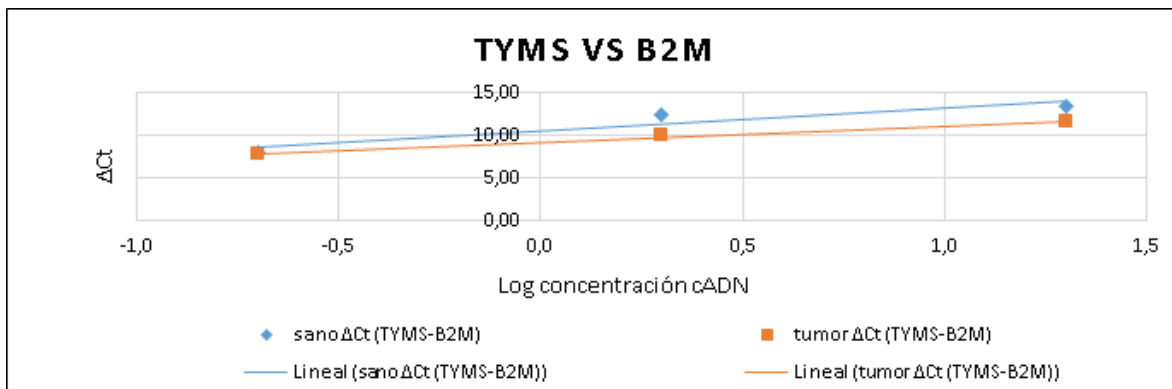
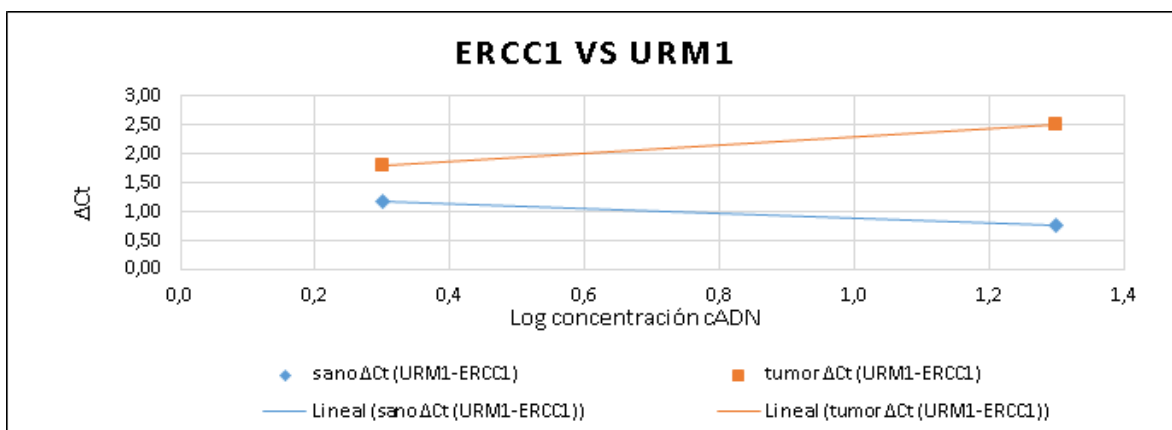
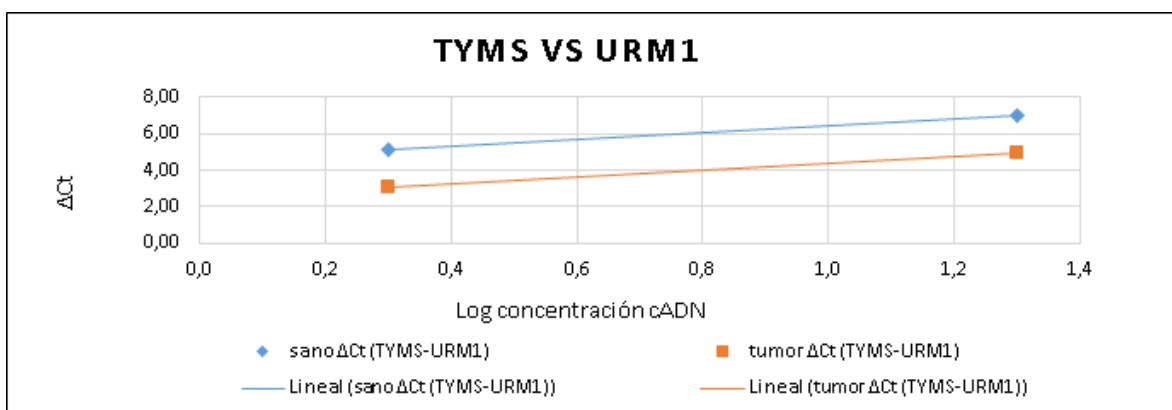
132. Kuramochi H, Tanaka K, Oh D, Lehman BJ, Dunst CM, Yang DY, et al. Thymidylate synthase polymorphisms and mRNA expression are independent chemotherapy predictive markers in esophageal adenocarcinoma patients. *Int J Oncol.* 2008;32(1):201-8.
133. Siegmund K, Shibata D. At least two well-spaced samples are needed to genotype a solid tumor. *BMC cancer.* 2016;16:250.
134. Diaz-Cano SJ. Tumor heterogeneity: mechanisms and bases for a reliable application of molecular marker design. *International journal of molecular sciences.* 2012;13(2):1951-2011.
135. Kaneda S, Takeishi K, Ayusawa D, Shimizu K, Seno T, Altman S. Role in translation of a triple tandemly repeated sequence in the 5'-untranslated region of human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(3):1259-70.
136. Gallegos-arreola MP, Peralta-leal V, Morgan-villela G, Puebla-pérez AM. Frecuencia del polimorfismo TS 1494del6 en pacientes con cáncer colorrectal del Occidente de México. *Rev Invest Clin.* 2008;60(1):21-30.
137. Ma Y, Tang L, Wang HX, Xu YC, Ma Y, Zhang FC. Capecitabine for the treatment for advanced gastric cancer: efficacy, safety and ethnicity. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics.* 2012;37(3):266-75.
138. McCollum AD, Catalano PJ, Haller DG, Mayer RJ, Macdonald JS, Benson AB, 3rd, et al. Outcomes and toxicity in african-american and caucasian patients in a randomized adjuvant chemotherapy trial for colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(15):1160-7.
139. Haller DG, Cassidy J, Clarke SJ, Cunningham D, Van Cutsem E, Hoff PM, et al. Potential regional differences for the tolerability profiles of fluoropyrimidines. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(13):2118-23.
140. Scalvini A, Ferrari V, Bodei S, Arcangeli G, Consoli F, Spano P, et al. Involvement of target gene polymorphisms in 5-Fluorouracil toxicity: a case report. *Pharmacology.* 2012;89(1-2):99-102.
141. Ghosh S, Hossain MZ, Borges M, Goggins MG, Ingersoll RG, Eshleman JR, et al. Analysis of polymorphisms and haplotype structure of the human thymidylate synthase genetic region: a tool for pharmacogenetic studies. *PloS one.* 2012;7(4):e34426.
142. Schwarzenbach H. Predictive diagnostics in colorectal cancer: impact of genetic polymorphisms on individual outcomes and treatment with fluoropyrimidine-based chemotherapy. *EPMA J.* 2010;1(3):485-94.

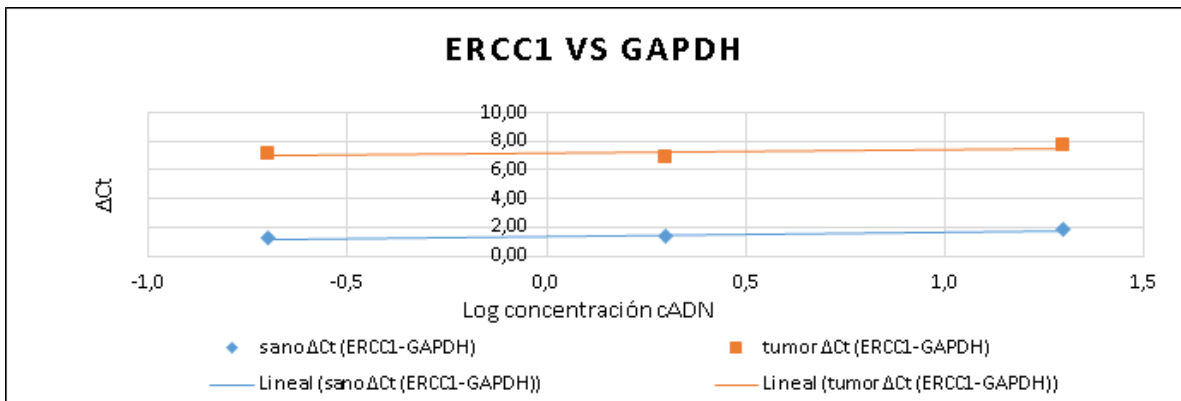
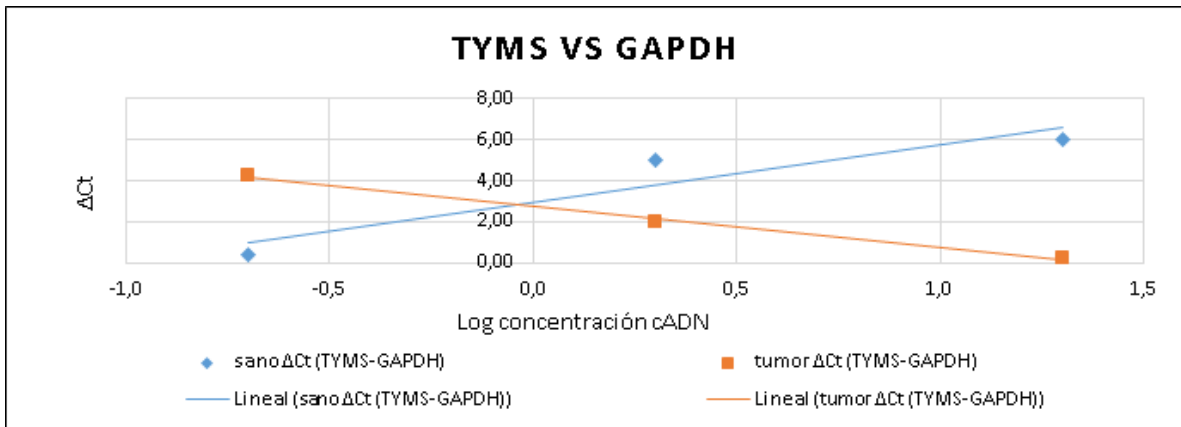
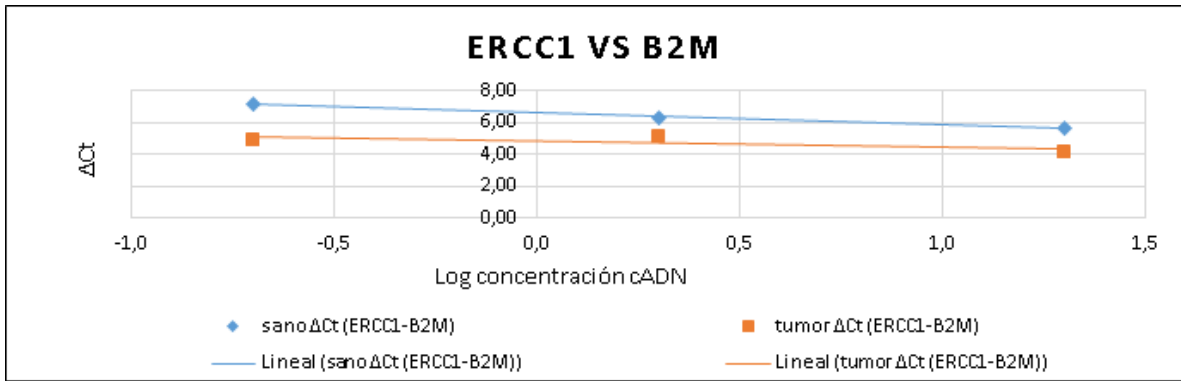


143. Soo RA, Syn N, Lee SC, Wang L, Lim XY, Loh M, et al. Pharmacogenetics-Guided Phase I Study of Capecitabine on an Intermittent Schedule in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumours. *Scientific reports*. 2016;6:27826.
144. Gosens MJ, Moerland E, Lemmens VP, Rutten HT, Tan-Go I, van den Brule AJ. Thymidylate synthase genotyping is more predictive for therapy response than immunohistochemistry in patients with colon cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;123(8):1941-9.

**Anexo 1. Evaluación de la estabilidad de la expresión de los genes de interés (*TYMS* y *ERCC1*) relativa a los genes normalizadores (*B2M*, *GAPDH* y *URM1*) en las muestras de tejido tumoral y sano.**

Para evaluar la estabilidad de la expresión relativa de los genes de interés frente a los genes normalizadores, se generaron curvas dinámicas que representaran diluciones seriadas en factores de 10 de cADN frente a los valores calculados de  $\Delta Ct$  para muestras pareadas de tejido tumoral y sano.





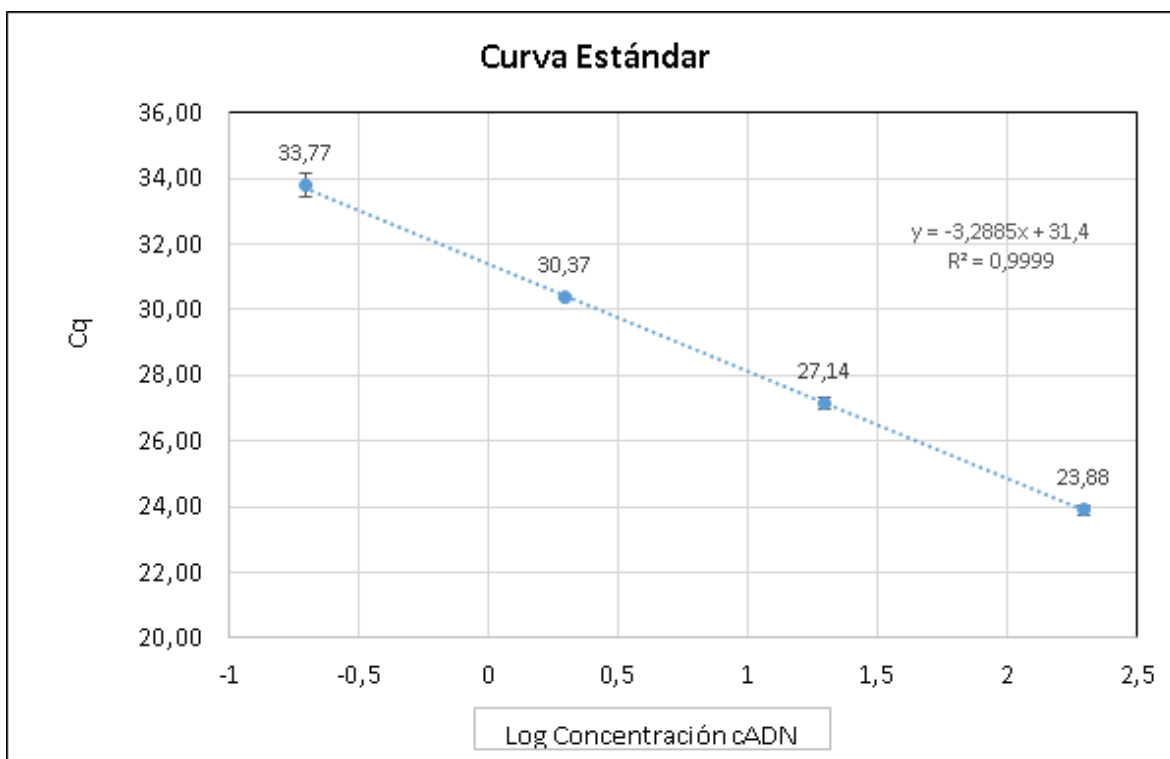
## Anexo 2. Evaluación de la eficiencia de la amplificación por qPCR de los genes de interés (*TYMS* y *ERCCI*) y de los genes normalizadores (*B2M* y *URMI*)

La evaluación de la eficiencia de amplificación para todos los genes se realizó mediante la elaboración de curvas estándar de concentración (diluciones por factor de 10) de cADN vs Cq, utilizando triplicados técnicos para cada dilución. Para el cálculo de la eficiencia de amplificación se utilizó la siguiente fórmula:

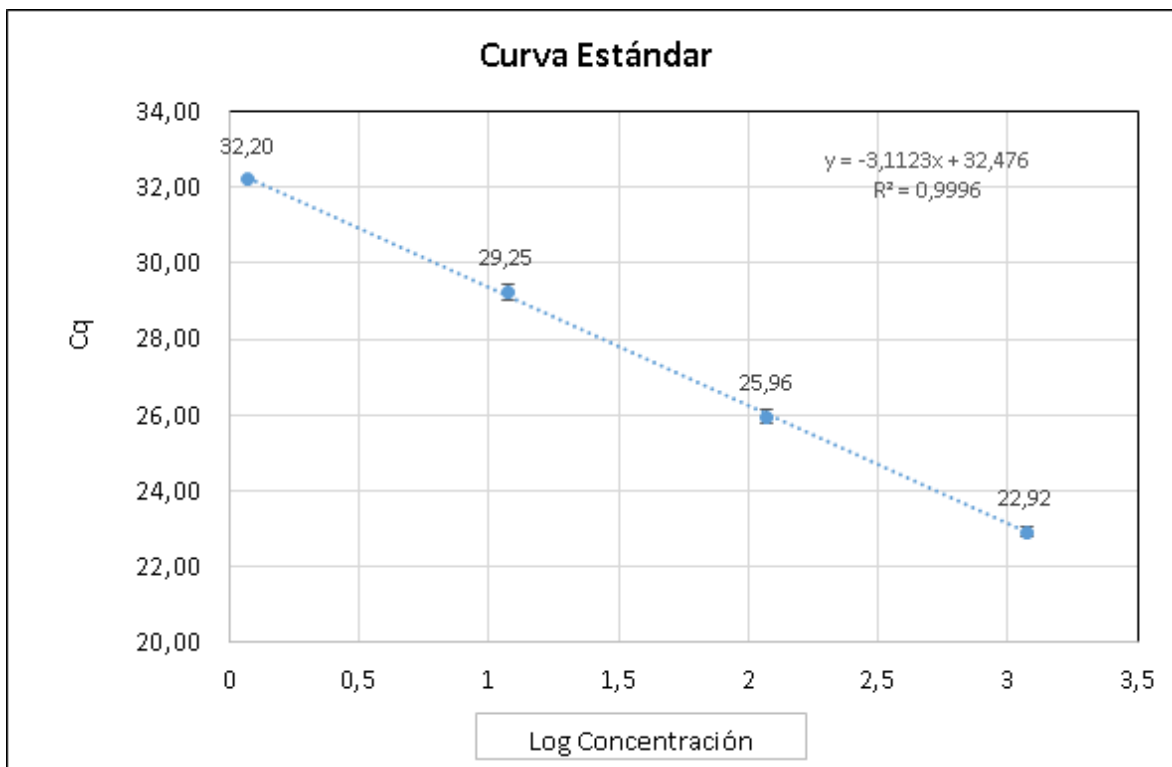
$$E = [10^{(-1/m)}]-1$$

En dónde E=Eficiencia de la reacción de amplificación y m=Pendiente de la gráfica de Log concentración de cADN Vs Cq. Se estableció un rango de eficiencia de amplificación aceptable de 90 -110% (que corresponde a una pendiente de -3,58 a -3,10).

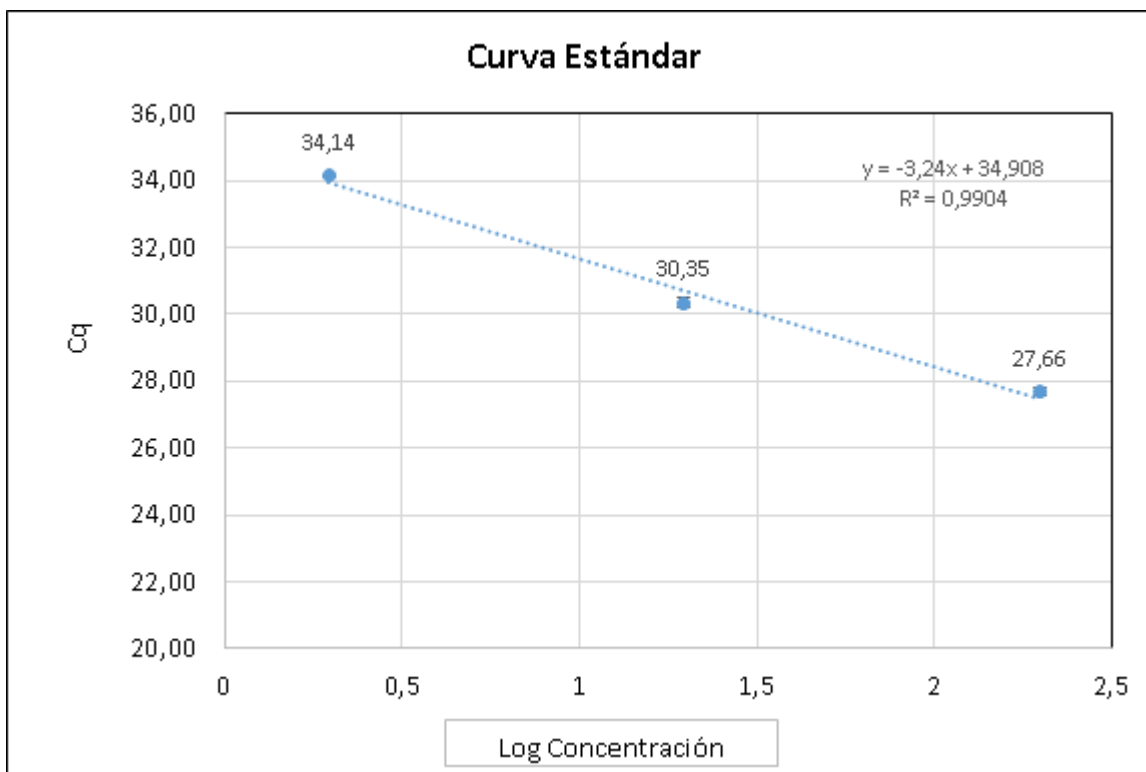
Para *ERCCI* se calculó una eficiencia de 101%:



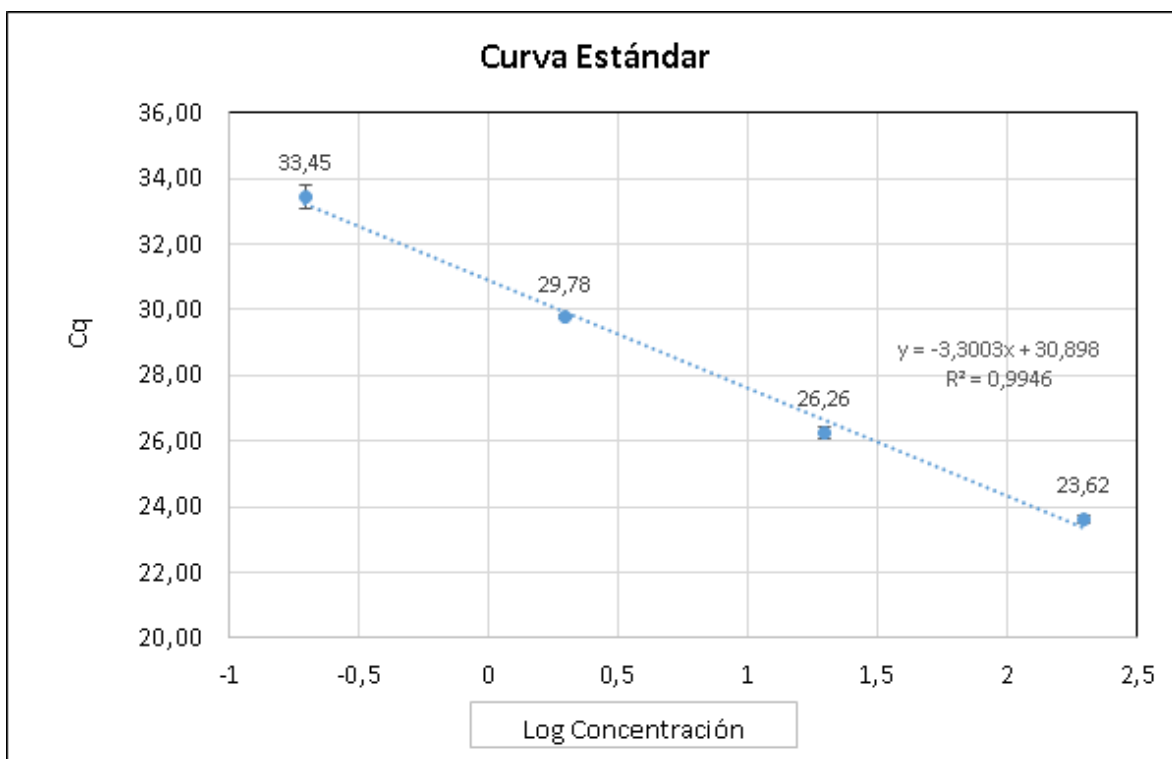
Para *TYMS* se calculó una eficiencia de 107%:



Para *URMI* se calculó una eficiencia de 104%:



Para *B2M* se calculó una eficiencia de 101%:



## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Carlos Andrés Castro Rojas

Candidato al grado de Doctor en Ciencias

Con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: FARMACOGENÉTICA DE LA QUIMIOTERAPIA DE LOS TUMORES  
GASTROINTESTINALES

Campo de estudio: Ciencias Biomédicas

### **Biografía:**

Nacido en Bogotá D.C., Colombia, hijo de Clara Inés Rojas y Lupercio Castro Ortíz. Esposo de Juliana Barrios Guio y padre de Samuel Andrés Castro Barrios.

### **Educación:**

Químico farmacéutico egresado de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá D.C.) con mención meritoria, Magister en Ciencias – Bioquímica de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá D.C.). Especialista en Docencia Universitaria de la Universidad El Bosque (Bogotá D.C.).

### **Experiencia profesional:**

Docente-investigador de tiempo completo con experiencia de más de 5 años a nivel de pregrado y posgrado.