



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

Asociación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa con la efectividad del tratamiento con quimioterapia en una cohorte de pacientes costarricenses con cáncer colorrectal metastásico

Autor: Allan Ramos Esquivel

Directora: Marta Valle Cano

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Farmacologia, Terapèutica y Toxicologia

Octubre 2021



TESIS DOCTORAL

Asociación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa con la efectividad del tratamiento con quimioterapia en una cohorte de pacientes costarricenses con cáncer colorrectal metastásico

Memoria presentada por Allan Ramos Esquivel

Para optar por el grado de Doctor en Farmacología de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Departamento de Farmacología, Terapéutica y Toxicología

Trabajo realizado bajo la dirección de
Dra. Marta Valle Cano

Barcelona
Octubre de 2021

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia

La Dra. Marta Valle, Directora Científica del Departamento de Farmacología Clínica, Modelado y Simulación de Parexel, y miembro del Doctorado de Farmacología,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo científico y la memoria de la tesis doctoral, presentada por Allan Ramos Esquivel con el título: “Asociación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa con la efectividad del tratamiento con quimioterapia en una cohorte de pacientes costarricenses con cáncer colorrectal metastásico”, ha sido realizada bajo mi supervisión. La memoria reúne las condiciones para ser defendida delante de un tribunal para optar por el grado de Doctor en Farmacología.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Barcelona, España, el 13 de octubre de 2021.

Dra. Marta Valle Cano
Directora

Allan Ramos Esquivel
Doctorando

Barcelona
Octubre de 2021

A mis padres.

Por inculcarme desde niño el valor del esfuerzo y la constancia.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora Marta Valle por su abnegado trabajo en la revisión de este trabajo y su apoyo desde antes del ingreso a este Programa Académico. Agradezco su amable disposición y las valiosas recomendaciones brindadas a pesar de la distancia y en medio de una pandemia. Gracias por los ánimos y sugerencias que me han hecho crecer como profesional.

A mis amigos, en especial a Cristina Fernández, Álvaro Víquez y Carlos Álvarez por haberme acompañado en este proceso desde sus comienzos: muchas gracias por sus consejos, paciencia y apoyo.

A Ricardo Chinchilla y Jad Abbas por su colaboración profesional en el trabajo analítico que implicó este proyecto. A ellos y al personal del Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines de la Universidad de Costa Rica les agradezco las atenciones recibidas durante el desarrollo de esta investigación.

A mi familia, por enseñarme el valor del empeño constante y decidido.

A mis amigos y colegas del Hospital San Juan de Dios, por su colaboración en este trabajo y su compañía fraterna.

De último, pero no menos importante, un profundo agradecimiento a los pacientes con cáncer y sus familias, por su desinteresada participación en este estudio.

“Los grandes espíritus siempre han encontrado la violenta oposición de los mediocres. Estos últimos no pueden entender cuando un hombre no sucumbe impensadamente a prejuicios heredados, sino que, honestamente y con coraje, usa su inteligencia.”

Albert Einstein

Listado de abreviaturas

5-FU	5-Fluorouracilo
5,10-MTHF	5,10-Metilentetrahidrofolato
ACE	Antígeno carcinoembrionario
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ARN	Ácido ribonucleico
CpG	Islas de citosina guanina
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FdUMP	5-Fluorodesoxiuridina monofosfato
FOLFIRI	5-Fluorouracilo, leucovorina e irinotecan
FOLFOX	5-Fluorouracilo, leucovorina e irinotecan
FOLFOXIRI	5-Fluorouracilo, leucovorina, oxaliplatino e irinotecan
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%
KDa	Kilodalton
MSI	Inestabilidad microsatelital
MSS	Estabilidad de microsatélites
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
OR	<i>Odds ratio</i>
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PD-L1	Ligando del receptor de muerte programada 1
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión

SNPs	Polimorfismos de nucleótido único
TP	Timidina fosforilasa
TS	Timidilato sintasa

Resumen

Objetivo: Las fluoropirimidinas son el pilar del tratamiento citotóxico para los pacientes con cáncer colorrectal. Sin embargo, la respuesta farmacológica a estos agentes es variable entre individuos. El presente estudio tiene como objetivo determinar si los polimorfismos C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131) del gen de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) afectan la toxicidad y la efectividad de los esquemas basados en fluoropirimidinas para el manejo del cáncer colorrectal metastásico.

Pacientes y métodos: Se reclutaron 68 pacientes con cáncer colorrectal metastásico que fueron tratados con capecitabina o 5-fluorouracilo en combinación con oxaliplatino o irinotecan como terapia de primera línea. Los pacientes se evaluaron de forma prospectiva desde Enero de 2019 hasta Noviembre de 2020 en el Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. Se extrajo el ADN de línea somática y de línea germinal a partir de tejido parafinado y sangre periférica respectivamente. Durante el seguimiento se valoró tanto la toxicidad como la respuesta objetiva inducida por el tratamiento citotóxico. Para cada genotipo estudiado se calculó, mediante un análisis de regresión logística, la probabilidad de toxicidad y de respuesta objetiva, definida como el porcentaje de individuos que alcanzaron una respuesta parcial o completa con el uso del tratamiento citotóxico. Se empleó un análisis de regresión de Cox para identificar los efectos de los genotipos de los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* sobre la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG). Se correlacionaron las variantes genéticas identificadas con la presencia de inestabilidad microsatelital y la presencia de mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF*. Se empleó un modelo de correlación de Spearman para asociar los polimorfismos del gen *MTHFR* encontrados en línea germinal y somática.

Resultados: Los individuos con al menos un alelo mutante del polimorfismo *MTHFR* C677T tuvieron mayor riesgo de anemia (*Odds Ratio* OR=1,69; IC95%=1,13-2,53; p=0,005), neutropenia (OR=2,27; IC95%=1,47-3,42; p<0,001) trombocitopenia (OR=1,91; IC95%=1,30-2,70; p<0,001), neuropatía periférica (OR=1,77; IC95%=1,16-2,70; p=0,02),

diarrea (OR=1,69; IC95%=1,13-2,53; p=0,005) y síndrome mano-pie (OR=1,56; IC95%=1,08-2,27; p=0,013), en comparación con los pacientes homocigotos para la variante normal. La presencia del alelo mutante C del polimorfismo *MTHFR* A1298C se asoció a mayor riesgo de anemia (OR=2,75; IC95%=1,01-7,48; p=0,02) y trombocitopenia (OR=3,14; IC95%=1,01-9,78; p=0,03). Ningún polimorfismo se asoció con el riesgo de mortalidad. Los pacientes con el alelo T del polimorfismo *MTHFR* C677T tuvieron mejores respuestas objetivas que los individuos con la variante no mutada (OR= 3,21; IC95%=1,05-9,81; p=0,03), al igual que mayor SLP (*Hazard ratio* HR=0,53; IC95%=0,28-0,98; p=0,045), aún después del ajuste por posibles variables confusoras (HR=0,50; IC95%=0,25-0,98; p=0,04). No hubo asociación entre el polimorfismo *MTHFR* A1298C y la respuesta objetiva ni SLP. Ninguno de las variantes analizadas se asoció con cambios en la SG (HR=0,86; IC95%=0,38-1,94; p=0,71 para el polimorfismo *MTHFR* C677T y HR=1,24; IC95%=0,58-2,67; p=0,58 para el polimorfismo *MTHFR* A1298C).

Conclusiones: Los polimorfismos *MTHFR* C677T y A1298C son biomarcadores farmacogenéticos que predicen la toxicidad en un grupo de pacientes mestizos tratados con quimioterapia basada en fluoropirimidinas como tratamiento del cáncer colorrectal metastásico. Además, la presencia del alelo mutado T del polimorfismo *MTHFR* C677T se asoció a mejor respuesta objetiva y mayor SLP que la variante homocigota no mutada. Ninguno de los polimorfismos estudiados se asoció con SG.

Tabla de contenidos

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 CÁNCER COLORRECTAL	16
1.1.1 Epidemiología	16
1.1.2 Factores de Riesgo	17
1.1.3 Presentación clínica	18
1.1.4 Patogénesis molecular	20
1.1.4.1 Inestabilidad cromosómica	20
1.1.4.2 Inestabilidad microsatelital	21
1.1.4.3 Hipermetilación del ADN	21
1.1.5 Clasificación molecular	22
1.1.5.1 Subtipo molecular 1 (CMS 1) o inmune con inestabilidad microsatelital	22
1.1.5.2 Subtipo molecular 2 (CMS 2) o canónico	23
1.1.5.3 Subtipo molecular 3 (CMS 3) o metabólico	23
1.1.5.4 Subtipo molecular 4 (CMS 4) o mesenquimatoso	23
1.1.6 Factores pronósticos	24
1.1.6.1 Estadificación	24
1.1.6.2 Enfermedad residual post quirúrgica	28
1.1.6.3 Invasión linfovascular y perineural	28
1.1.6.4 Localización del tumor primario	29
1.1.6.5 Sexo	29
1.1.6.7 Edad	29
1.1.6.8 Estado funcional	30
1.1.6.9 Inestabilidad microsatelital	30
1.1.6.10 Mutaciones de los genes KRAS, NRAS y BRAF	30
1.2 TRATAMIENTO DEL CÁNCER COLORRECTAL	31
1.2.1 Tratamiento no farmacológico	31
1.2.2 Tratamiento farmacológico	32
1.2.1 Biomarcadores predictivos de la eficacia del tratamiento farmacológico	33
1.2.1.1 Mutación de KRAS, NRAS o BRAF	33
1.2.1.2 Inestabilidad microsatelital	34
1.2.2 Vía metabólica de las fluoropirimidinas	35
1.2.2 Metilentetrahidrofolato reductasa	39
1.2.2.1 Polimorfismos del MTHFR y su asociación con la eficacia y toxicidad de las fluoropirimidinas	40
1.2.2.2 Relación entre MTHFR, cáncer colorrectal e inestabilidad microsatelital	42
2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO	45
3. OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	48
3.2 OBJETIVOS CONCRETOS	48
4. PUBLICACIONES	49
ARTÍCULO 1: ASSOCIATION OF C677T AND A1298C MTHFR POLYMORPHISMS AND FLUOROPYRIMIDINE-INDUCED TOXICITY IN MESTIZO PATIENTS WITH METASTATIC COLORECTAL CANCER	50
ARTÍCULO 2: C677T AND A1298C MTHFR GENE POLYMORPHISMS AND RESPONSE TO FLUOROPYRIMIDINE-BASED CHEMOTHERAPY IN MESTIZO PATIENTS WITH METASTATIC COLORECTAL CANCER	51
5. DISCUSIÓN	52
6. CONCLUSIONES	62
7. REFERENCIAS	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer colorrectal

1.1.1 Epidemiología

El cáncer colorrectal constituye globalmente una de las principales causas de mortalidad por cáncer. Datos de la Organización Mundial de la Salud¹ indican que esta malignidad ocupa la tercera posición en incidencia de cáncer en hombres y la segunda posición en mujeres. Esta neoplasia afecta particularmente a individuos de países desarrollados de Europa y Norteamérica. Sin embargo, el impacto de la mortalidad es proporcionalmente más alto en regiones en vías de desarrollo de Sudamérica, el Caribe, Asia y el Sur de África. Los datos actuales pronostican un descenso del 3% anual en la tasa de mortalidad por este tipo de cáncer en los países desarrollados, en tanto que los países en vías de desarrollo de Asia y Latinoamérica presentarán un crecimiento sostenido en las tendencias de mortalidad.²

La Red Española de Registros de Cáncer estimó que las neoplasias de origen colorrectal serían el diagnóstico más frecuente de etiología neoplásica durante el año 2021 para ambos sexos. En concreto, se estima que el cáncer colorrectal ocupe la segunda posición de incidencia tanto en hombres como mujeres, con una tasa bruta estimada de incidencia de 110,7 y 74,1 casos por cien mil habitantes para el sexo masculino y femenino respectivamente.³

En Costa Rica, el cáncer colorrectal se constituye en una de las principales causas de incidencia y mortalidad por cáncer. Durante el año 2015 el Ministerio de Salud de este país informó una tasa de incidencia de 17,8 casos por cien mil hombres y de 17,9 casos por cien mil mujeres. En lo referente a mortalidad, el Ministerio de Salud de Costa Rica divulgó para el año 2019 una tasa de mortalidad de 11,1 decesos por cien mil varones y de 11,9 fallecimientos por cien mil mujeres.⁴ Estas cifras, situadas en el contexto mundial, ubican a Costa Rica en el tercer quintil de distribución de incidencia por cáncer colorrectal para ambos sexos y en el tercer y segundo quintil de distribución de mortalidad para hombres y mujeres respectivamente.¹

La incidencia del cáncer colorrectal es baja en sujetos por debajo de los 50 años y se incrementa conforme aumenta la edad, con una edad media de diagnóstico de 70 años.⁵ No obstante, en la última década se ha descrito una creciente tendencia al aumento de los casos de cáncer de colon en individuos menores de 50 años, quienes suelen presentarse con tumores de predominio distal, de comportamiento biológico más agresivo y diagnosticados en estadios avanzados.⁶

Con el envejecimiento de la población y la exposición a factores de riesgo se espera que para el año 2030 aumente la incidencia de esta malignidad en un 60%, para un total aproximado de casos nuevos de 2,2 millones y cerca de 1,1 millones de muertes a nivel global.⁷ No obstante, el patrón de incremento de las tasas de incidencia y mortalidad es variable según la región geográfica estudiada. Se espera que el incremento de casos y decesos por esta patología sea mayor en los países de Latinoamérica y el Caribe y menor en los países de Europa occidental y Norteamérica, algunos de los cuales evidencian incluso tasas de incidencia y mortalidad estables o decrecientes.⁷ Al respecto, la adopción de estilos de vida saludable, los programas de cribado aplicados a la población general y la identificación de pacientes con mayor riesgo de esta malignidad parecen ser los principales factores que han disminuido esta creciente tendencia en los países desarrollados.⁸

1.1.2 Factores de Riesgo

Los factores de riesgo descritos para el desarrollo de esta malignidad se han agrupado en factores ambientales y hereditarios. En la primera categoría se encuentran los hábitos alimenticios caracterizados por un alto consumo de carnes rojas^{9,10}, así como las dietas bajas en fibra y con escasas raciones de frutas y vegetales.^{11,12} Otros factores ambientales involucrados con el desarrollo del cáncer colorrectal incluyen el tabaquismo, el consumo de alcohol, un bajo consumo de frutas, vegetales y fibra, la obesidad y el sedentarismo^{13,14}. Por otra parte, dentro de los factores de riesgo hereditarios destacan la historia familiar de cáncer colorrectal¹⁵, así como algunos raros síndromes genéticos.¹⁶

Por ejemplo, un 1% del total de casos de cáncer colorrectal se asocian al síndrome de poliposis colónica familiar, un trastorno autosómico dominante con casi 100% de penetrancia, cuya alteración cromosómica consiste en una delección del gen *APC* ubicado en el brazo largo del cromosoma 5.¹⁷ Similarmente, un 3% de las neoplasias colónicas son consecuencia de otra condición hereditaria conocida como cáncer colorrectal hereditario no polipósico o síndrome de Lynch, el cual es heredado con un patrón autosómico dominante y un 80% de penetrancia.¹⁶ El análisis genético de este síndrome reveló la presencia de alteraciones en los genes encargados de la reparación del apareamiento erróneo del ADN, específicamente los genes *MLH1*, *MLH2*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2*. El efecto final de estos fallos en la reparación del ADN es la presencia de una alta frecuencia de secuencias repetidas de nucleótidos a lo largo del genoma, cuyo patrón recibe el nombre de inestabilidad microsatelital (MSI).¹⁸ No obstante, aún en ausencia de síndromes genéticos de claro patrón hereditario, los familiares en primer grado de individuos afectados con cáncer colorrectal presentan un mayor riesgo que la población general, el cual puede ser tan alto como un 35%.¹⁹ Se cree que la historia familiar puede explicar de un 10 a 20% de todos los pacientes con cáncer colorrectal, dependiendo del número de familiares afectados y de la edad de presentación.^{20,21}

1.1.3 Presentación clínica

La mayoría de pacientes no presentan síntomas al diagnóstico y son captados en procesos de cribado usual.¹⁹ No obstante, otros pacientes se presentan con síntomas inespecíficos y algo sugestivos de algún proceso intrabdominal (cambios del hábito defecatorio, anorexia, pérdida de peso, hematoquecia, melena o dolor abdominal crónico), mientras que otros individuos se presentan con un cuadro abrupto de síntomas oclusivos intestinales (dolor abdominal, vómitos, estreñimiento y distensión) o de sangrado digestivo bajo.²² Típicamente, las manifestaciones clínicas son variables de acuerdo al sitio de origen del tumor. Los tumores del colon descendente o izquierdo se manifiestan típicamente por hematoquecia y cambios del patrón defecatorio (diarrea y/o

estreñimiento), en tanto que los tumores del colon ascendente o derecho se caracterizan por pérdidas crónicas de sangre que generan anemia ferropénica.²³ Finalmente, los tumores rectales suelen acompañarse de síntomas de tenesmo rectal, dolor al defecar y disminución del calibre de las heces.²⁴

Aproximadamente una cuarta parte de los pacientes se presentan con enfermedad metastásica al momento del diagnóstico y cerca de un 40% de los individuos operados con intención curativa presentan recurrencias de la enfermedad.²⁵ La presentación metastásica al diagnóstico (metástasis sincrónica) se ha correlacionado con una peor supervivencia y menores tasas de respuesta a la quimioterapia en comparación con aquellos pacientes diagnosticados mediante las políticas recomendadas de cribado, o bien, en etapas tempranas de la enfermedad.²⁶

La exploración física del enfermo con cáncer colorrectal puede hallar una masa palpable abdominal o transrectal, adenopatías supraclaviculares o inguinales, hepatomegalia, ictericia, palidez, o signos pulmonares por un compromiso metastásico. La obstrucción intestinal suele presentarse con un abdomen doloroso asociado a distensión y signos inespecíficos de respuesta inflamatoria sistémica, en un cuadro clínico que puede asemejar la perforación visceral.¹⁹

El hemograma y los analitos sanguíneos pueden mostrar anemia microcítica e hipocrómica secundaria a ferropenia o a la enfermedad crónica subyacente, alteraciones electrolíticas ocasionados por diarrea crónica o alteraciones de la función hepática en caso de compromiso de este órgano. La elevación del antígeno carcinoembrionario (ACE) no es específica de este tipo de neoplasias, pero se correlaciona con la enfermedad avanzada y permite, en algunos casos, el seguimiento de algunos pacientes.¹⁹

La evaluación inicial del paciente con cáncer colorrectal debe incluir, además de la historia clínica y del examen físico, una colonoscopia completa y una tomografía computarizada del tórax, el abdomen y la pelvis. En casos de cáncer rectal se recomienda una resonancia magnética para valorar la profundidad del tumor y su relación con estructuras adyacentes, lo cual también puede lograrse mediante el estudio sonográfico endoscópico.^{27,28} La resonancia magnética también puede ser útil para distinguir masas

hepáticas o adenopatías sospechosas de metástasis.²⁹ Estos estudios permiten al clínico caracterizar la extensión del tumor primario y estadificar la enfermedad neoplásica.¹⁹

1.1.4 Patogénesis molecular

La mayoría de los adenocarcinomas del colon y recto se originan de pólipos que eventualmente adquieren cambios displásicos y progresan a una neoplasia invasiva en un período de 10 a 15 años.¹⁹ El origen celular de la mayoría de los adenocarcinomas colorrectales es una célula madre que reside en las criptas intestinales y que acumula una serie de alteraciones epigenéticas y genéticas en genes supresores de tumores y proto-oncogenes.³⁰ Los pólipos colónicos tienen distintas categorías de clasificación, y pueden agruparse en tubulares o vellosos, sésiles o pedunculados y adenomatosos o hiperplásicos. Los pólipos sésiles, así como las variantes adenomatosas se han relacionado al desarrollo de cáncer, sobre todo cuando son múltiples, su tamaño es mayor de un centímetro, o si se acompañan de una morfología aserrada o de cambios displásicos.³¹

Los fenómenos etiopatogénicos moleculares que subyacen en la transformación maligna de los pólipos se agrupan en tres vías de alteración: la vía de inestabilidad cromosómica, la vía de inestabilidad microsatelital y la hipermetilación de regiones del ADN. Estas vías no son mutuamente excluyentes y, por ende, un tumor específico puede tener distintos orígenes provenientes de diferentes vías patogénicas.³²

1.1.4.1 Inestabilidad cromosómica

Esta vía patogénica caracteriza aproximadamente al 80% de los tumores malignos del colon y se distingue por la ganancia, pérdida y/o traslocación de cromosomas que conducen hacia amplificaciones, reordenamientos y deleciones de regiones específicas de varios genes. Estas alteraciones generan con frecuencia células tumorales aneuploides.³³ Es frecuente la pérdida de alelos en regiones de genes supresores de tumores (pérdida de la heterocigocidad), o la ganancia de copias de proto-oncogenes.³⁴ Dentro de los genes más frecuentemente alterados se encuentran el gen de la

adenomatosis colónica familiar (*APC*), el oncogén *RAS* y el gen supresor de tumores *p53*. La secuencia de alteraciones genéticas que ocurre en esta vía patogénica involucra la inactivación temprana del gen *APC* ubicado en el cromosoma 5q, seguida por la mutación de los oncogenes *RAS* y *BRAF*. Más adelante en la evolución de la neoplasia se presentan otros eventos moleculares como la pérdida de regiones del cromosoma 18q y la pérdida de la función del gen *p53*.³⁵

1.1.4.2 Inestabilidad microsatelital

Los microsatélites son repeticiones de secuencias cortas de nucleótidos en tándem localizadas a lo largo del ADN.¹⁸ El número de repeticiones de estas secuencias son característicos de cada individuo e identifican con frecuencia regiones no codificantes del genoma. Sin embargo, ante defectos de la reparación del apareamiento erróneo del ADN, estas secuencias pueden contraerse o expandirse y dar origen a MSI.³⁶ Aproximadamente un 15% de las neoplasias de colon se caracterizan por estos hallazgos moleculares que condicionan la presencia de múltiples mutaciones puntuales o pequeñas deleciones o inserciones de bases de nucleótidos en regiones específicas del ADN, lo cual genera un fenotipo hipermutador.³⁷ La alteración de la reparación del apareamiento erróneo del ADN es consecuencia de mutaciones somáticas o adquirida, o del silenciamiento de los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, o *PMS2*.³⁸ La inestabilidad microsatelital caracteriza un grupo distintivo de tumores malignos del colon que responden mejor a la inmunoterapia y son relativamente resistentes al uso de fluoropirimidinas en el contexto adyuvante.¹⁸

1.1.4.3 Hipermetilación del ADN

Entre un 15 y un 20% de los adenocarcinomas de colon esporádicos se caracterizan por el silenciamiento epigenético de las regiones promotoras de varios genes a consecuencia de la metilación aberrante de las islas de citosina guanina (CpG).^{19,38} Dentro de los genes silenciados se encuentra el gen *MLH1*. Este gen está asociado con la reparación de las bases erróneamente apareadas del ADN que genera como consecuencia

MSI.³⁸ Varias características patológicas y moleculares se han asociado a esta vía oncogénica, dentro de las cuales destacan la diferenciación mucinosa, un abundante infiltrado linfocitario, la pobre diferenciación tumoral y la mutación V600E del gen *BRAF*, así como la ausencia de mutaciones en los genes *APC* y *KRAS*.³⁹ La expresión fenotípica de estos hallazgos se manifiesta por la presencia de pólipos serrados con abundante infiltrado inflamatorio y de localización proximal.¹⁹

1.1.5 Clasificación molecular

Las alteraciones a nivel molecular descritas en el apartado anterior han permitido categorizar los tumores malignos de origen colorrectal en distintas entidades, las cuales comparten entre sí varias características genotípicas y pronósticas. En el año 2015, Guinney y colaboradores⁴⁰ publicaron un consenso de clasificación de esta malignidad, en la que se establecen cuatro subtipos moleculares de cáncer colorrectal. Ninguna de estas categorías se caracteriza por aberraciones genómicas exclusivas, ya que la agrupación se basó en una serie de alteraciones de diferentes genes.

1.1.5.1 Subtipo molecular 1 (CMS 1) o inmune con inestabilidad microsatelital

Esta categoría agrupa la gran mayoría de los tumores que presentan MSI. Estos tumores se caracterizan por una elevada respuesta inmunológica del huésped, específicamente de células T citotóxicas y células T colaboradoras tipo 1. Corresponde aproximadamente a un 15% de los tumores colorrectales, tienden a presentarse con mayor frecuencia en el colon derecho y suelen exhibir un grado histológico alto. Este subgrupo está asociado a una alta tasa de mutaciones en el gen *BRAF*, alto patrón de metilaciones en islas CpG y poseen un mal pronóstico después de la recurrencia tumoral.^{40,41}

1.1.5.2 Subtipo molecular 2 (CMS 2) o canónico

Este subgrupo engloba aproximadamente a un 40% de los tumores malignos del colon y recto, los cuales se caracterizan molecularmente por la sobreexpresión de genes de diferenciación epitelial y de los protooncogenes de las señales mitógenas *WNT* y *MYC*. Presentan una alta tasa de alteraciones en la disposición de la cromatina y tienden a presentar aneuploidía, lo cual les confiere inestabilidad cromosómica. Tienden a presentar pérdida de genes supresores tumorales y clínicamente suelen presentarse en el colon descendente.^{40,41}

1.1.5.3 Subtipo molecular 3 (CMS 3) o metabólico

Comprende cerca del 15% de los tumores malignos del colon y recto. Es frecuente la alteración de genes reguladores de vías metabólicas, así como del gen *KRAS*. Estos tumores tienden a presentar poca inestabilidad cromosómica y escasa metilación en islas CpG. El estatus de inestabilidad microsatelital es variable y tienden a presentarse en el colon derecho.^{40,41}

1.1.5.4 Subtipo molecular 4 (CMS 4) o mesenquimatoso

Este grupo se caracteriza por la alta expresión de la señal mediada por el factor de crecimiento tisular tipo beta ($TGF-\beta$) así como por la alta capacidad de inducir genes relacionados con la angiogénesis e invasión del estroma. Hay sobreexpresión de genes implicados en la transición epitelio – mesénquima, así como de aquellos genes asociados con la remodelación de la matriz extracelular. La mayoría de los tumores de este subgrupo presentan inestabilidad cromosómica y suelen presentar una pobre supervivencia global (SG) y una alta proporción de recurrencias. En general, esta categoría agrupa aproximadamente al 25% de los tumores colorrectales.^{40,41}

1.1.6 Factores pronósticos

Distintas variables clínicas, histológicas y moleculares se han relacionado con el pronóstico de los pacientes afectados con esta neoplasia. Estas variables permiten predecir el curso clínico de la enfermedad y categorizar a los pacientes de acuerdo con su probabilidad de tener un mejor o peor desenlace vital. Muchas de las variables se han asociado de forma independiente a la mortalidad o a la probabilidad de recurrencia, o bien, a la progresión de la enfermedad metastásica. Estas determinantes confieren en conjunto una pauta de seguimiento distintivo para cada paciente según el riesgo particular de supervivencia de cada individuo. De todas estas variables, la estadificación clínica o patológica es trascendental para brindar además una estrategia terapéutica según el estadio clínico particular.⁴² La mayoría de los modelos pronósticos incluyen además otras variables clínicas, patológicas y moleculares que se detallan a continuación.

1.1.6.1 Estadificación

Una vez determinado el diagnóstico histopatológico del cáncer de colon o recto es fundamental la estadificación de la enfermedad neoplásica con el objetivo de establecer el pronóstico y el manejo de cada paciente. El *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* ha establecido las definiciones mostradas en la tabla 1 con las que se logra consensuar el estadio TNM de estas neoplasias (tabla 2).⁴²

La designación del prefijo T hace referencia a la penetración del tumor a lo largo de las capas del intestino o estructuras anatómicas adyacentes. El prefijo N determina el número de ganglios afectados, para lo cual son necesarios al menos doce ganglios disecados durante el procedimiento quirúrgico. La invasión tumoral de al menos un ganglio linfático define al estadio clínico III e implica la indicación de tratamiento postoperatorio (adyuvante) en los casos de cáncer de colon, o bien, del tratamiento prequirúrgico (neoadyuvante) en los pacientes con cáncer de recto. Para ambas localizaciones, la probabilidad de compromiso ganglionar es mayor conforme aumenta la penetración tumoral a través del espesor mural del intestino. Finalmente, el prefijo M

denota la presencia de metástasis viscerales o a distancia, en cuyo caso se definirá el estadio clínico IV. En la octava edición de la AJCC se hace énfasis particular en los pacientes con enfermedad metastásica peritoneal (M1c) quienes tienen un pronóstico vital peor que aquellos individuos sin extensión a esta serosa.⁴²

Tabla 1. Definiciones del TNM para cáncer colorectal

<p>T (Tumor primario)</p> <p>Tx: el tumor no puede ser estadificado</p> <p>T0: Sin evidencia de tumor primario</p> <p>T1s: carcinoma in situ o invasión de la lámina propia (sin extensión a través de la muscular de la mucosa)</p> <p>T1: tumor invade la submucosa</p> <p>T2: tumor invade la muscular propia</p> <p>T3: tumor invade a través de la muscular propia a tejidos peri-colorrectales</p> <p>T4: tumor invade al peritoneo visceral o invade o se adhiere a un órgano adyacente</p> <p>T4a: tumor invade a través de la superficie del peritoneo visceral</p> <p>T4b: tumor invade directamente o está adherido a otros órganos o estructuras Adyacentes</p>
<p>N (número de ganglios afectados)</p> <p>Nx: no se puede determinar la extensión ganglionar</p> <p>N0: ningún ganglio linfático regional con tumor</p> <p>N1a: metástasis en un ganglio linfático</p> <p>N1b: metástasis en dos o tres ganglios linfáticos</p> <p>N1c: depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio, o en tejido sin peritoneo pericólico o perirrectal/mesorrecto sin invasión a ganglios linfáticos</p> <p>N2a: metástasis en 4-6 ganglios linfáticos</p> <p>N2b: metástasis en 7 o más ganglios linfáticos</p>
<p>M (evidencia de metástasis a distancia)</p> <p>M0: sin evidencia de enfermedad metastásica por imágenes</p> <p>pM1a: metástasis a distancia en un único sitio sin metástasis peritoneal confirmada de forma microscópica</p> <p>pM1b: metástasis en dos o más órganos o sitios sin metástasis peritoneales confirmada de forma microscópica</p> <p>pM1c: metástasis a las superficies peritoneales</p>

Tabla 2. Grupos pronósticos de la clasificación TNM

Estadio	Tumor primario (T)	Ganglios linfáticos (N)	Metástasis a distancia (M)
0	Tis	N0	M0
I	T1 - T2	N0	M0
II			
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III			
IIIA	T1 - T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3 - T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3 - T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IV			
IVA	Cualquiera	Cualquiera	M1a
IVB	Cualquiera	Cualquiera	M1b
IVC	Cualquiera	Cualquiera	M1c

1.1.6.2 Enfermedad residual post quirúrgica

Los tumores que son resecados completamente sin evidencia de enfermedad neoplásica en los márgenes de resección presentan la mayor probabilidad de supervivencia libre de recurrencia, en comparación con aquellos tumores cuya resección fue incompleta.^{43,44} El uso de la siguiente nomenclatura resume los hallazgos posibles después de una resección tumoral:⁴⁵

R0: Tumores cuya resección fue completa, sin evidencia histológica de compromiso de los márgenes de resección.

R1: Corresponde a tumores con resección incompleta según la determinación del margen microscópico, el cual muestra enfermedad neoplásica en contacto con dicho margen.

R2: Tumores con resección incompleta y evidencia macroscópica de tumor residual no resecado.

Dentro de la categoría de enfermedad residual posquirúrgica, algunos autores distinguen el margen circunferencial o radial. Este margen corresponde a la superficie sin peritoneo producto de la disección quirúrgica. El término también aplica a los tumores rectales que son completamente subperitoneales, o a los tumores colónicos que están en contacto con el retroperitoneo. En los tumores rectales el margen circunferencial es de crucial relevancia dada su asociación con recurrencia local y a distancia.⁴⁴

1.1.6.3 Invasión linfovascular y perineural

La presencia de células tumorales en las estructuras vasculares venosas o linfáticas se ha relacionado con un pronóstico adverso.⁴⁶ De forma similar, la invasión perineural se ha asociado de forma independiente a un mal pronóstico en términos de mayores recurrencias o mayor mortalidad. De hecho, la presencia de alguno de estos dos patrones de invasión se relaciona con mayor riesgo de recaída en pacientes operados aún en ausencia de enfermedad ganglionar metastásica (estadio patológico II).⁴⁶

1.1.6.4 Localización del tumor primario

Varios estudios han señalado que la localización del tumor primario es un marcador pronóstico independiente de mortalidad.⁴⁷ De esta forma, los individuos con tumores del colon izquierdo (distales a la flexura hepatoesplénica) poseen una mejor supervivencia en comparación con los tumores del colon derecho o ascendente. Esta relación pronóstica es independiente del estadio patológico, del tratamiento recibido y de la presencia de alteraciones moleculares como la mutación del gen *RAS*.⁴⁸

1.1.6.5 Sexo

Los estudios dirigidos a determinar la relación del sexo del paciente con el pronóstico de la enfermedad neoplásica han generado resultados contradictorios, con una tendencia a peores resultados en el sexo masculino. Este efecto pronóstico del sexo se ha descrito en diversas poblaciones cuyos resultados concuerdan en un riesgo relativo de mortalidad de hasta 16% mayor en individuos del sexo masculino.^{49,50} Se ha propuesto que estas eventuales diferencias pueden ser secundarias a factores hormonales o inmunológicos que confieren cierto efecto protector de los estrógenos a las pacientes de sexo femenino.⁵⁰

1.1.6.7 Edad

Varios estudios han generado resultados controvertidos para relacionar la edad avanzada con la mortalidad y progresión o recurrencia en pacientes con cáncer colorrectal. Al respecto, van Leeuwen y colaboradores⁵¹, así como Siegel y colaboradores⁵² publicaron una peor supervivencia de los individuos añosos. Varios factores confusores pueden explicar estos resultados divergentes, como por ejemplo la presencia de comorbilidades, las complicaciones quirúrgicas y el acceso a quimioterapia sistémica.

1.1.6.8 Estado funcional

Uno de los principales factores de riesgo clínicos asociados a un peor pronóstico es el deterioro de la funcionalidad del paciente. Se ha comprobado que los individuos con un deterioro de sus capacidades físicas de acuerdo con los criterios de la escala *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG)⁵³ poseen una peor respuesta al tratamiento y mayor toxicidad al mismo.⁵⁴

1.1.6.9 Inestabilidad microsatelital

Los pacientes cuyos tumores poseen esta característica molecular presentan mejores tasas de supervivencia en estadios tempranos y localmente avanzados, pero peores desenlaces clínicos en caso de enfermedad metastásica o recurrente.¹⁸ Se ha descrito que la incidencia de este patrón molecular es variable según el estadio clínico, siendo más frecuente en los pacientes que presentan un estadio II y III, y menos frecuente en el estadio IV.³⁸ Varios estudios han señalado que el estado de MSI se asocia con mejores resultados de los pacientes con cáncer de colon tratados con quimioterapia.⁵⁵ Se ha demostrado que la presencia de MSI es un marcador pronóstico positivo e independiente del estadio tumoral asociado a menor riesgo de metástasis. Tal relación se verificó en una revisión sistemática de varios estudios de cohorte, la cual evidenció que los sujetos con cáncer colorrectal y con MSI presentaban una disminución del 35% del riesgo de muerte.⁵⁶

1.1.6.10 Mutaciones de los genes KRAS, NRAS y BRAF

Las mutaciones del gen *KRAS* que suelen afectar los codones 12 o 13 se asocian a un peor pronóstico de la enfermedad neoplásica. De forma análoga, las mutaciones del gen *NRAS* se relacionan a mal pronóstico vital en comparación con los individuos que presentan la versión no mutada de tal gen.⁵⁷ Las mutaciones del gen *BRAF*, que suelen ocurrir en el codón 600 (V600E), se relacionan con el patrón fenotípico de hipermetilación de las islas de CpG del ADN. Esta alteración molecular caracteriza aproximadamente al

10% de los casos esporádicos de cáncer colorrectal y también está relacionada con un pronóstico adverso.^{19, 57}

1.2 Tratamiento del cáncer colorrectal

1.2.1 Tratamiento no farmacológico

Algunos tumores detectados por endoscopia pueden ser tributarios a tratamiento local endoscópico. En este caso, las polipeptomías en bloque permiten conocer el estatus de los márgenes de resección y otras características histológicas de relevancia para el manejo, como por ejemplo el grado tumoral, el compromiso de vasos linfáticos y la profundidad de la invasión en la submucosa.⁵⁸

El tratamiento quirúrgico constituye en la actualidad el pilar de tratamiento curativo para los pacientes que se presentan en estadios tempranos de esta neoplasia. Una resección completa del tumor se asocia a mejores tasas de supervivencia y menores recurrencias.¹⁹ Sin embargo, para que la resección sea completa es necesario optimizar la resección a través de una adecuada disección de la interfase mesofascial y un adecuado muestreo de los ganglios linfáticos regionales. En los casos de cáncer de recto la escisión mesorrectal constituye el estándar de tratamiento quirúrgico, cuya resección puede incluir los músculos del esfínter anal y las estructuras vecinas afectas.⁵⁹

La radioterapia preoperatoria (neoadyuvante) en el recto es una opción de tratamiento que ha demostrado reducir las recurrencias locales en pacientes con tumores de riesgo intermedio y alto según el compromiso de la pared rectal, la invasión ganglionar o la invasión de estructuras vecinas. La radioterapia suele administrarse en 25-28 fracciones hasta alcanzar una dosis total de 45-50 Gray, a la vez que se emplea una fluoropirimidina como radiosensibilizante.⁶⁰ Esta modalidad terapéutica logra reducir el tamaño tumoral en la mayoría de los pacientes, aunque solo una quinta parte del total logra obtener respuestas patológicas completas.⁶¹ Dado que algunos pacientes pueden lograr un control duradero de la enfermedad neoplásica y de los síntomas asociados, se

han propuesto esquemas de radiación y quimioterapia que eviten el procedimiento quirúrgico.⁶⁰

1.2.2 Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico del cáncer colorrectal posee como elemento basal el uso de fluoropirimidinas, de las cuales el 5-fluorouracilo (5-FU) y la capecitabina son los agentes más empleados en esta condición clínica. Cualquiera de estos fármacos se puede emplear como monoterapia o en combinación con el oxaliplatino para el tratamiento adyuvante del cáncer de colon y recto.⁶²⁻⁶⁴ A su vez, el 5-FU o la capecitabina se asocian a la radioterapia preoperatoria (neoadyuvante) en los pacientes con cáncer de recto localmente avanzado, lo que reduce la probabilidad de recurrencia local y sistémica en comparación con radioterapia sola.^{65,66}

En el tratamiento adyuvante del cáncer colorrectal varios estudios clínicos han demostrado la eficacia de las fluoropirimidinas en la reducción de recurrencias y muertes en sujetos con estadios II, a la vez que, en asociación con oxaliplatino, constituyen el estándar de manejo de los pacientes con compromiso ganglionar (estadio patológico III).^{62,63} En tales condiciones, el esquema de tratamiento citotóxico se debe iniciar tan pronto como el paciente se recupere del procedimiento quirúrgico para no comprometer la eficacia del tratamiento⁶⁷, y se debe continuar por un plazo de tres o seis meses.⁶⁸

El uso de las fluoropirimidinas constituye también el pilar de tratamiento en el manejo de los pacientes con enfermedad metastásica. Sin embargo, en el contexto metastásico, la respuesta tumoral de una fluoropirimidina en monoterapia es tan solo cercana a un 15%.⁶⁹ Por ello, este tipo de fármacos se suele administrar junto con otro citotóxico como el irinotecan en el esquema conocido como FOLFIRI⁷⁰, o en asociación con oxaliplatino en el esquema FOLFOX⁷¹, en tanto que el esquema denominado FOLFOXIRI⁷² emplea ambos citotóxicos junto con el 5-FU y la leucovorina. Además, es posible añadir a alguno de los esquemas mencionados un agente biológico que inhiba la angiogénesis (bevacizumab⁷³, ramucirumab⁷⁴ o aflibercept⁷⁵) o un inhibidor del receptor

del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (panitumumab⁷⁶ y cetuximab⁷⁷). Se ha descrito que la exposición a la mayor cantidad de agentes antineoplásicos a lo largo del curso de la enfermedad se correlaciona con mejor supervivencia.⁷⁸

1.2.1 Biomarcadores predictivos de la eficacia del tratamiento farmacológico

En la actualidad solo se recomienda la identificación de mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* para seleccionar a los pacientes con potencial beneficio del uso de fármacos anti-EGFR, ya que la ausencia de mutaciones en estos genes predice la eficacia de tales medicamentos.^{76,77} Es decir, estas mutaciones sirven como factores predictivos negativos para la selección de los agentes biológicos cetuximab y panitumumab. De forma análoga, la mutación del gen *BRAF* sirve como biomarcador predictivo para la eficacia del encorafenib, un fármaco inhibidor de la proteínquinasa codificada por dicho gen.⁷⁹

La presencia de MSI es otro biomarcador predictivo de eficacia farmacológica ya que se relaciona directamente con la actividad terapéutica del pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal contra el receptor PD-1 (receptor de muerte programada 1).⁸⁰ Este receptor, expresado en los linfocitos T CD8+, conduce a anergia e inmunosupresión cuando se une su ligando, el PD-L1, el cual suele estar sobreexpresado tanto en las células neoplásicas como en el estroma de los tumores de colon con alta inestabilidad microsatelital.⁸¹ De manera análoga, el nivolumab, otro anticuerpo monoclonal contra el PD-1 ha mostrado eficacia en tumores con MSI.⁸²

1.2.1.1 Mutación de *KRAS*, *NRAS* o *BRAF*

Las proteínas RAS son enzimas con actividad GTPasa relacionadas con el crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Estas enzimas están codificadas por la familia de genes *RAS*, dentro de los que destacan *KRAS* y *NRAS*.⁸⁷ Las mutaciones somáticas en estos genes conduce a la posterior transcripción de proteínas con actividad GTPasa constitutiva y una subsecuente hiperactivación de los efectores como la proteína

RAF y las MAP quinasas. Las mutaciones del gen *KRAS* suelen afectar aproximadamente al 40% de los tumores colorrectales y se suelen ubicar en los codones 12 y 13, en tanto que las mutaciones del gen *NRAS* se contabilizan en cerca del 5% de los casos de cáncer colorrectal y la mayoría se localizan en el codón 61.⁸⁸ Las mutaciones de ambos genes se han relacionado con la falta de respuesta a la terapia basada en anticuerpos contra el EGFR, como el cetuximab⁷⁷ y el panitumumab.⁷⁶

De forma análoga, las mutaciones en el gen *BRAF* codifican por una quinasa de residuos de serina y treonina que conduce a la proliferación y supervivencia tumoral.⁸⁷ Aproximadamente el 96% de las mutaciones del gen *BRAF* producen una proteína con una sustitución de la valina por el glutamato en el codón 600 (V600E).⁸⁷ Esta modificación de la estructura proteica genera un incremento de la actividad catalítica de la enzima, la cual caracteriza a cerca del 10% de los pacientes con cáncer colorrectal.⁸⁸ Se ha descrito que esta mutación predice la falta de respuesta al uso de los anticuerpos monoclonales anti EGFR.⁸⁹ Sin embargo, la presencia de esta mutación selecciona a un grupo de pacientes en quienes es eficaz el uso del inhibidor RAF encorafenib.⁷⁹

1.2.1.2 Inestabilidad microsatelital

Se ha relacionado la MSI con la eficacia de la terapia con fluoropirimidinas e inmunoterapia. Esta relación surgió con la observación de la mejor supervivencia libre de recurrencia de los pacientes cuyos tumores expresaban esta característica molecular.⁸³ En concreto, se describió que los sujetos con cáncer de colon estadio II y con MSI no derivaban beneficio del uso del 5-FU adyuvante, ya que presentaban una mejor tasa de SG que sus contrapares, aún en ausencia del tratamiento citotóxico.⁸⁴ Incluso estudios posteriores han señalado un efecto deletéreo del 5-FU adyuvante en el subgrupo de pacientes con MSI.⁸⁵

Además del valor predictivo de la MSI en pacientes con estadio II tratados con 5-FU adyuvante, estudios recientes han demostrado el beneficio de la terapia moduladora de la respuesta inmune en sujetos con cáncer colorrectal metastásico. Al respecto, Le y colaboradores publicaron un estudio fase II en el cual el uso del pembrolizumab redujo la

tasa de progresión y generó un elevado porcentaje de respuesta tumoral únicamente en los pacientes con MSI.⁸⁶ Un ensayo clínico fase III publicado en el año 2020 confirmó los hallazgos previos al demostrar que los pacientes con MSI sometidos a terapia de primera línea con pembrolizumab presentaban mejor supervivencia libre de progresión (SLP) en comparación con la terapia citotóxica usual.⁸⁰

Pese a que la mayoría de los biomarcadores se han descrito para determinar la eficacia de medicamentos biológicos, varios estudios han demostrado que la actividad terapéutica de la quimioterapia puede depender también de alteraciones genéticas menos estudiadas, las cuales suelen afectar los genes implicados en su metabolismo, o bien, en el sitio de acción del agente citotóxico.⁹⁰

1.2.2 Vía metabólica de las fluoropirimidinas

Las fluoropirimidinas son antimetabolitos que se incorporan a las macromoléculas de ADN y ARN, e inhiben la timidilato sintasa (TS). Dentro de este grupo farmacológico se encuentran el tegafur y la capecitabina, los cuales son profármacos orales del fármaco más representativo de este grupo: el 5-FU.⁹¹

El tegafur se administra en una formulación denominada S-1 con dos moduladores llamados oteracilo, un inhibidor de la fosforilación del 5-FU en el tracto digestivo que reduce la toxicidad gastrointestinal, y el gimeracilo, un inhibidor de la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD).⁹² Otra formulación disponible del tegafur añade el uracilo como biomodulador e inhibidor de la DPD.⁹³ El tegafur se absorbe en el intestino y una vez en el hígado es convertido por la actividad oxidativa del citocromo P450 2A6 e hidroxilación del producto subsecuente en 5-FU.⁹⁴ Ambas formulaciones (S-1 y tegafur) son más empleadas en países asiáticos, en tanto que la capecitabina es la fluoropirimidina oral más usada en occidente.⁹³ La capecitabina se absorbe a nivel intestinal y es convertida en el hígado en 5-desoxi-fluorocitidina por acción de una carboxilesterasa y posteriormente en 5'-desoxi-S-fluorouridina en una reacción catalizada por una citidina deaminasa.⁹⁵ La molécula resultante se transforma en las células normales y tumorales a

5-FU por acción de la timidina fosforilasa (TP).⁹⁵ Dado que esta enzima tiene una mayor expresión en células neoplásicas en comparación con células normales, el perfil de toxicidad es diferente al uso del 5-FU intravenoso.⁹¹

El 5-FU es un análogo del uracilo, una base nitrogenada requerida para la síntesis de ácidos nucleicos.^{91,96} Como se resume en la figura 1, el 5-FU en la circulación sanguínea se metaboliza en el hígado mediante la acción de la DPD hacia el metabolito inactivo 5-fluorodihidrouracilo, siendo éste el paso limitante del metabolismo de detoxificación del 5-FU.⁹⁶ Un déficit de la función catabólica de esta enzima se asocia a un incremento de la toxicidad, en tanto que un incremento de la actividad enzimática se relaciona con resistencia al 5-FU.^{97,98} Las deficiencias en la función de la enzima DPD pueden obedecer a alguno de los más de 160 polimorfismos de nucleótido único (SNPs) descritos a la fecha, aunque en su mayoría se deben al polimorfismo conocido como DPYD*2A, presente en cerca de un 1% de la población caucásica.⁹⁹ Los individuos homocigotos para esta variante del gen *DPD* presentan una actividad casi nula de la enzima y un riesgo elevado de toxicidad letal con el uso de fluoropirimidinas.¹⁰⁰

La actividad citotóxica del 5-FU se resume de forma ilustrada en la figura 1. Por la alta hidrosolubilidad de este fármaco, el 5-FU es transportado a través de la doble capa lipídica de la membrana plasmática por medio del transportador de nucleósidos denominado hENT (*human equilibrative nucleoside transporter*).^{96,101} Una vez en el interior celular el 5-FU se transforma en 5-fluoro-2-desoxiuridina a través de la acción de la enzima TP.⁹⁶ Posteriormente, la timidina quinasa se encarga de la fosforilación de 5-fluoro-2-desoxiuridina en 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP). Este último agente se incorpora en su forma trifosfato al ADN, lo cual altera su estructura y función normal.^{91,102} De manera análoga, el 5-FU puede convertirse en fluorouridina monofosfato tras la acción enzimática de la orotato fosforribosil transferasa.^{91,96} La molécula resultante es fosforilada mediante la acción de varias quinatas, como la quinasa de uridina, la quinasa de uridina monofosfato y la quinasa de nucleósido difosfato, hasta formar el trifosfato de fluorouridina e incorporarse al ARN, lo cual afecta el funcionamiento de las moléculas de ARN.⁹⁶ Se ha señalado que este mecanismo de incorporación al ARN y ADN

es el dominante cuando se emplea el 5-FU en infusiones rápidas. Empero, el mecanismo principal de acción del 5-FU con el esquema de infusión continua consiste en la inhibición de la enzima TS, a través de la conformación de un complejo ternario formado por la enzima, el FdUMP y el 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF).^{103,104} Con esta inhibición enzimática la desoxiuridina monofosfato (dUMP) no puede transformarse en desoxitimidina monofosfato (dTMP) y se disminuye la disponibilidad de este nucleótido para la síntesis y reparación del ADN.⁹¹ Más aún, el incremento resultante de dUMP conduce a la incorporación errónea del uracilo en la molécula de ADN.¹⁰⁶ Esta alteración del material genético no logra ser corregida por la enzima reparadora uracil-ADN-glicosilasa, lo cual genera cortes de la doble cadena de ADN y aberraciones cromosómicas que conducen a apoptosis.⁹⁶ Además, a través de mecanismos de retroalimentación, el déficit de dTMP induce alteraciones en la disponibilidad de otros desoxinucleótidos también fundamentales para la síntesis del material genético.¹⁰⁶ La enzima TS es codificada a partir del gen *TYMS* el cual es ampliamente polimórfico, con repeticiones en tándem dobles (2R) o triples (3R) de secuencias de 28 pares de bases cercanos a la región reguladora 5'.¹⁰⁷ Los pacientes con el genotipo 3R/3R presentan menor toxicidad a las dosis convencionales de fluoropirimidinas y mayor actividad enzimática, en tanto que la expresión reducida del gen *TYMS* (2R/2R) se asocia a mayor respuesta tumoral a las fluoropirimidinas.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ La TS se encuentra sobreexpresada en la mayoría de las neoplasias sólidas, razón por la cual el 5-FU no se emplea únicamente en las neoplasias colorrectales, sino también en varios tipos distintos de cáncer.¹⁰⁷ Esta enzima emplea como cofactor el 5,10-MTHF, cuyas concentraciones se encuentran reguladas por la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Esta enzima, al convertir el 5,10-MTHF en 5-metiltetrahidrofolato, produce el sustrato necesario para la conversión de la homocisteína en metionina.⁹¹ La metionina sufrirá transformaciones subsecuentes para convertirse en S-adenosil-L-metionina, la cual es la molécula más relevante para los procesos de metilación y transferencia de carbonos a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.⁹⁶

1.2.2 Metilentetrahidrofolato reductasa

La MTHFR es una flavoproteína dimérica con un peso molecular de cerca de 70 KDa, la cual cataliza la conversión del 5,10-MTHF a 5-metiltetrahidrofolato. Cada subunidad está unida de forma no covalente con el dinucleótido de flavina y adenina que actúa como cofactor. Posee un dominio catalítico en la región N-terminal y un sitio regulatorio C-terminal. La estructura proteica es la de un dímero cuyos monómeros poseen un dominio de regulación mediado por la S-adenosil-L-metionina y un dominio catalítico con capacidad de unión tanto para el sustrato como para el cofactor.¹¹⁰ Esta enzima desempeña un papel relevante en la síntesis *de novo* de purinas, la cual es necesaria para la reparación y duplicación del ADN. Además, a través de su función catalítica se regulan las concentraciones de intermediarios metabólicos en la vía de utilización de los folatos intracelulares. El gen que codifica por esta enzima está localizado en el cromosoma 1p36.3 y posee 11 exones.¹¹¹ La relevancia de esta proteína es patente en la amplia serie de condiciones en las cuales se ha intentado relacionar la función enzimática con patologías tan variadas como la enfermedad cardiovascular, el cáncer, los defectos del tubo neural y la demencia.^{112,113}

Para el gen *MTHFR* se han descrito varios SNPs que alteran la estructura proteica y conducen a una actividad enzimática disminuida. En específico, el polimorfismo C677T (rs1801133) ubicado en el exón 4 genera una proteína termolábil con una sustitución del aminoácido alanina por valina en el codón 222.¹¹⁴ Esta variante se ha asociado con una reducción del 70% de la actividad enzimática normal en individuos homocigotos (TT) y en menor grado en sujetos heterocigotos (CT) en comparación con los individuos sin la mutación puntual (homocigotos CC).¹¹⁵ Otro polimorfismo ampliamente estudiado ha sido el A1298C (rs1801131) el cual se encuentra localizado en el exón 7 y produce una proteína termoestable con una sustitución del aminoácido glutamato por alanina en el codón 428 de la secuencia proteica, lo que también conlleva a una reducida actividad enzimática de hasta el 60% en individuos homocigotos para el alelo mutado (CC).¹¹⁶ Los individuos heterocigotos para ambos polimorfismos poseen una actividad enzimática

reducida del 50% de la actividad catalítica normal y ambos polimorfismos se han asociado a bajas concentraciones séricas de folatos y altas concentración de homocisteína.¹¹⁷⁻¹¹⁹

La frecuencia de los polimorfismos *MTHFR* C677T y A1298C es variable según la población en estudio, siendo más frecuente en mestizos hispanos y asiáticos, intermedio en caucásicos, y menos prevalente en regiones del África subsahariana.¹²⁰ Los análisis de haplotipos han señalado que los dos sitios polimórficos se encuentran en desequilibrio de ligamiento, siendo muy infrecuente hallar individuos homocigotos para ambas variantes (677TT y 1298CC).¹²⁰ No obstante, si es relativamente frecuente encontrar sujetos heterocigotos para ambas variantes con una reducida actividad enzimática de la *MTHFR*, lo cual implica un efecto sinérgico de tales SNPs sobre la función catalítica.¹²¹

1.2.2.1 Polimorfismos del MTHFR y su asociación con la eficacia y toxicidad de las fluoropirimidinas

Datos preclínicos han identificado líneas celulares tumorales que son más sensibles a las fluoropirimidinas en presencia de las variantes del gen *MTHFR*. La hipótesis subyace en que la disminuida actividad enzimática conduce a un incremento del 5,10-MTHF y, por ende, una mayor inhibición de la TS en presencia del FdUMP.^{113,123,124}

Los estudios clínicos llevados a cabo en sujetos con cáncer colorrectal metastásico han generado resultados controvertidos en lo referente a la asociación de la eficacia de las fluoropirimidinas y los polimorfismos del gen *MTHFR*. Un meta-análisis de estudios observacionales, en su mayoría retrospectivos, concluyó la ausencia de asociación entre los polimorfismos *MTHFR* C677T y A1298C y la respuesta a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas, independientemente de la etnia de los individuos incluidos.¹²⁵ Estos resultados contrastan con un reciente meta-análisis, el cual sí demostró una asociación significativa entre el polimorfismo A1298C y la SG de pacientes con cáncer colorrectal.¹²⁶ Debido a la heterogeneidad presente en ambos meta-análisis es preferible detallar en los estudios particulares que sí evidenciaron una relación entre alguno o ambos SNPs y los resultados clínicos de sujetos tratados con fluoropirimidinas por cáncer colorrectal. Por ejemplo, el análisis de Yeh y colaboradores¹²⁷ demostró la eficacia de ambos

polimorfismos en pronosticar un mejor resultado a largo plazo en pacientes con cáncer colorrectal no metastásico. Otros análisis similares concluyeron mayores tasas de respuesta en individuos con al menos un alelo mutado del polimorfismo C677T, tanto en pacientes tratados con 5-FU en monoterapia¹²⁸ como con el uso del esquema FOLFOX.^{129,130} Algunos estudios han señalado, por su parte, que el impacto de los polimorfismos es dependiente del sexo, tal es el caso de Zhang y colaboradores, quienes publicaron una asociación significativa del polimorfismo *MTHFR* A1298C y la supervivencia solo en las pacientes del sexo femenino.¹³¹

La divergencia de resultados entre varios autores puede explicarse por varios factores que afectan tanto la selección y el seguimiento de los pacientes, así como el diseño y el análisis genético. Por ejemplo, Etienne-Grimaldi y colaboradores postularon que la variabilidad de las concentraciones de folato entre individuos podría explicar los controvertidos resultados de la literatura, así como la inclusión de diversos esquemas de fluoropirimidinas con distinta eficacia entre sí.¹³²

Otra fuente de discrepancia puede surgir de la determinación de los polimorfismos del gen *MTHFR* según sean identificados a partir de ADN de línea germinal, o bien, a partir del ADN tumoral (línea somática). Al respecto, algunos autores han descrito que puede existir cierto grado de discordancia entre las determinaciones genéticas de varios polimorfismos dependiendo del sitio de extracción del ADN para el análisis.^{133,134} Sin embargo, otros estudios no han encontrado tales discrepancias¹³⁵ y más bien recomiendan la valoración de SNPs a partir del ADN de línea germinal por la facilidad de acceso y análisis.¹³⁶ Una última fuente que podría explicar la heterogeneidad de los hallazgos descritos en la literatura médica surge de la población en estudio, ya que las frecuencias alélicas del alelo mutado son muy variables entre etnias.^{90,121} Al respecto, la mayoría de las investigaciones que documentan una relación entre los polimorfismos del gen *MTHFR* y la eficacia del tratamiento citotóxico se caracterizan por estudiar poblaciones con frecuencias del alelo mutado superiores al 30%¹²⁷⁻¹³¹ para ambos polimorfismos, lo cual es un hallazgo frecuente cuando se incluyen poblaciones asiáticas e hispanas.^{127,137}

De manera análoga a lo descrito para las variables de respuesta y efectividad de la quimioterapia basada en fluoropirimidinas, existen datos controvertidos sobre la asociación entre los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* y la toxicidad inducida por esta terapia citotóxica. Al respecto, Chua y colaboradores publicaron una mayor incidencia de diarrea inducida por el esquema FOLFOX en pacientes homocigotos para el alelo mutante (genotipo 677TT).¹³⁸ Otros estudios han señalada la misma relación incluso en portadores heterocigotos para el polimorfismo *MTHFR* C677T (genotipo CT).¹³⁹ Igualmente se ha publicado que los individuos con la variante no mutada de dicho polimorfismo (genotipo CC) presentan menos náuseas, neuropatía y reducciones de dosis del agente citotóxico.¹⁴⁰ No obstante, esta asociación no ha sido detectada por otros autores¹⁴¹ o bien, se han publicado hallazgos opuestos, con mayor toxicidad en sujetos homocigotos para las variantes no mutadas de tales polimorfismos.¹⁴² Nuevamente, la diversidad étnica de las poblaciones de estudio, la frecuencia de las reacciones adversas descritas y los diferentes regímenes empleados por cada estudio pueden explicar los resultados controvertidos publicados en la literatura médica.

1.2.2.2 Relación entre MTHFR, cáncer colorrectal e inestabilidad microsatelital

La asociación entre la actividad de la *MTHFR* y cáncer soslaya principalmente en el proceso de metilación del ADN, el cual constituye un proceso epigenético transcendental para la regulación de la expresión genética.¹⁰¹ En este proceso las enzimas metil-transferasas utilizan como donador de grupos carbono a la S-adenosil-L-metionina. Esta molécula es un derivado del 5-metiltetrahidrofolato, cuyas concentraciones dependen de la actividad catalítica de la *MTHFR*. Ante una actividad reducida de esta enzima, se espera una disminución del sustrato fundamental para la transferencia de carbonos.¹⁴³ La consecuencia del déficit del donador universal de carbonos es una hipometilación global del genoma, la cual es una característica temprana de muchas neoplasias.¹⁴⁴

En concordancia con este fundamento teórico, se ha demostrado que los portadores del polimorfismo *MTHFR* C677T, y en menor grado del *MTHFR* A1298C¹⁴⁵, poseen una hipometilación global del ADN.¹⁴⁶ Empero, también se han demostrado que los individuos con tales polimorfismos poseen un mayor grado de metilación del promotor del gen *MLH1*, que da como resultado una alta MSI.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ El patrón de metilación aberrante que ocurre en los individuos con estos polimorfismos se caracteriza por la hipermetilación y silenciamiento de la expresión de genes supresores tumorales (como *p53* y *MLH1*) y la hipometilación de regiones promotoras de varios proto-oncogenes (como *KRAS*, *NRAS* o *BRAF*).^{150,151}

En contraposición con lo esperado desde el punto de vista teórico, varios autores han señalado una disminución del riesgo de cáncer colorrectal en los portadores del genotipo *MTHFR* 677 TT, ante todo en adecuadas concentraciones de folato.^{152,153} De forma contrastante, otros estudios han descrito un aumento del riesgo de cáncer en los portadores de la variante mutada del polimorfismo *MTHFR* C677T.¹⁵⁴ Estos hallazgos paradójicos encuentran explicación al considerar el efecto del folato exógeno.¹⁵⁵ Se postula que en presencia de un adecuado aporte de folato en la dieta, el genotipo *MTHFR* 677 TT conduce a una suficiente reserva de 5,10-MTHF disponible para la síntesis de pirimidinas y reparación del ADN. En cambio, un déficit de folato exógeno en dichos individuos conduce a una reducción crítica de los folatos intracelulares que conduce a metilación aberrante del genoma la cual se asocia inestabilidad microsatelital.¹⁵⁶ De hecho, varios estudios han mostrado de forma consistente una relación entre la presencia del genotipo *MTHFR* 677 TT y el cáncer colorrectal con inestabilidad microsatelital en sujetos con déficit de folato.¹⁵⁷ De forma complementaria con esta asociación, también se ha encontrado que los individuos con este polimorfismo pero con adecuado aporte de folato exógeno presentan un menor riesgo de cáncer de colon con estabilidad de microsatélites (MSS).^{149,157-159} Si se considera el cáncer colorrectal con MSI y MSS como una sola entidad, la mayoría de estudios concuerdan en que el genotipo *MTHFR* 677 TT se asocia a un menor riesgo de esta malignidad, a pesar del incremento del riesgo de cáncer de colon con MSI.¹⁶⁰

En resumen, la relación entre los polimorfismos estudiados y el riesgo de cáncer colorrectal se ve confundida por el consumo exógeno de folato. En individuos con adecuado aporte de folatos en la dieta y concentraciones séricas de ácido fólico normales, los polimorfismos *MTHFR* C677T y A1298C han mostrado reducir en tres veces el riesgo de cáncer colorrectal.¹⁵² Sin embargo, en individuos con déficit de ácido fólico desaparece el efecto protector de tales polimorfismos y predomina el efecto procancerígeno manifestado por una metilación aberrante del genoma y presencia de MSI.

2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Las hipótesis planteadas son las siguientes:

1. Los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* en línea somática serán marcadores genéticos independientes del efecto terapéutico del tratamiento con fluoropirimidinas en una cohorte de pacientes costarricenses con cáncer colorrectal metastásico.
2. Los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* en línea germinal serán marcadores genéticos independientes de la toxicidad del tratamiento con fluoropirimidinas en una cohorte de pacientes costarricenses con cáncer colorrectal metastásico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Determinar la influencia de los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* en la efectividad del tratamiento con fluoropirimidinas en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.

3.2 Objetivos concretos

1. Cuantificar la prevalencia de los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* en la población de estudio.
2. Correlacionar la tasa de respuesta, supervivencia global y supervivencia libre de progresión de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico con la presencia del polimorfismo C677T del gen *MTHFR*.
3. Correlacionar la tasa de respuesta, supervivencia global y supervivencia libre de progresión de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico con la presencia del polimorfismo A1298C del gen *MTHFR*.
4. Asociar la presencia de polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* con la presencia de mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y la presencia de inestabilidad microsatelital.
5. Determinar la concordancia de los polimorfismos C677T y A1298C del gen de *MTHFR* entre las células somáticas y las células germinales.
6. Relacionar los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* con la toxicidad del tratamiento recibido.
7. Comparar la toxicidad presentada por el tratamiento citotóxico entre los individuos con al menos un alelo mutante del polimorfismo *MTHFR* C677T y los sujetos con la variante normal.
8. Comparar la toxicidad presentada por el tratamiento citotóxico entre los individuos con al menos un alelo mutante del polimorfismo *MTHFR* A1298C y los sujetos con la variante normal.

4. PUBLICACIONES

Artículo 1: Association of C677T and A1298C MTHFR Polymorphisms and Fluoropyrimidine-induced Toxicity in Mestizo Patients With Metastatic Colorectal Cancer

Autores: Allan Ramos-Esquivel, Ricardo Chinchilla, Marta Valle.

Publicado en: *Anticancer Research* 2020; 40:4263-4270.

doi: 10.21873/anticanres.14428



Volume 40, Number 8, August 2020

Contents

Clinical Studies

Detection and Oncologic Outcomes of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma of Unknown Primary Origin. M.Y. LEE, N. FOWLER, D. ADELSTEIN, S. KOYFMAN, B. PRENDES, B.B. BURKEY (Cleveland, South Carolina, USA).....	4207
Secretin-induced Duodenal Aspirate of Pancreatic Juice (SIDA): Utility of Commercial Genetic Analysis. R.E. SIMPSON, M. YIP-SCHNEIDER, K.F. FLICK, M. SOUFI, E.J. CLIPPA, M.A. AL-HADDAD, J.J. EARLE, S. SHIRMAN, J.M. DEWITT, C.M. SCHMIDT (Indianapolis, IN, USA).....	4215
Is Low Inferior Mesenteric Artery Ligation Worthwhile to Prevent Urinary and Sexual Dysfunction After Total Mesorectal Excision for Rectal Cancer? E. FIORI, D. CROCETTI, A. LAMAZZA, F. DE FELICE, A. STERFETTI, L. BOCCI, A. MINIGOLI, F. SARDENZA, G. DI TOMA (Rome, Italy).....	4223
A Multivariable Regression Model-based Nomogram for Estimating the Overall Survival of Patients Previously Treated With Nivolumab for Advanced Non-small-cell Lung Cancer. A. TAMAYA, M. TAMAYA, H. GO, T. INUI, K. KINOSHITA, K. NAKAHAMA, Y. TANIGUCHI, T. SHIROYAMA, S.-I. ISA, K. NISHINO, T. KUMAGAI, H. SUZUKI, T. HIRASHIMA, S. ATAGI, A. SHINTANI, F. IMAMURA (Osaka, Japan).....	4229
Adaptive Radiotherapy for Glioblastoma Multiforme – The Impact on Disease Outcome. Z. VEGOVÁRY, B. DARÁZS, V. PACZSONA, Á. DOBI, Z. REZSI, Z. VARGA, E. FODOR, A. CSERHÁTI, J. OLÁH, D. KIS, P. BARZÓ, K. HIDEGHÉTY (Szeged, Hungary).....	4237
Variants of <i>SLC22A16</i> Predict the Efficacy of Platinum Combination Chemotherapy in Advanced Non-small-cell Lung Cancer. A. TAKEICHI, T. OGURI, S. FUKUDA, K. SONE, Y. KAGAWA, T. UEMURA, O. TAKAKUWA, K. MAENO, K. FUKUMITSU, Y. KANEMITSU, T. TAJIRI, H. OHKUBO, M. TAKEMURA, Y. ITO, A. NIIMI (Nagoya, Japan).....	4245

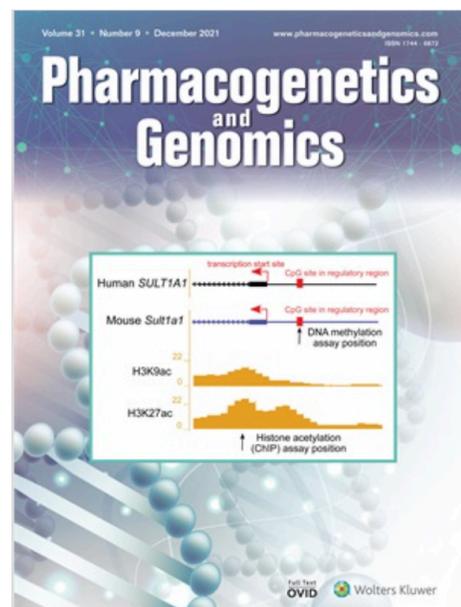
Continued on the back cover

Artículo 2: *C677T and A1298C MTHFR gene polymorphisms and response to Fluoropyrimidine-based chemotherapy in Mestizo Patients with Metastatic Colorectal Cancer.*

Autores: Allan Ramos-Esquivel, Ricardo Chinchilla-Monge, Jad Abbas, Marta Valle.

Publicado en: *Pharmacogenetics and Genomics* 2021; 31:191-199.

doi: 10.1097/FPC.0000000000000440.



5. DISCUSIÓN

Los hallazgos descritos en el presente trabajo confirman la relación existente entre los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* y la toxicidad y efectividad de la quimioterapia basada en fluoropirimidinas en la población costarricense estudiada. En concreto, los individuos portadores de al menos un alelo mutante para ambos polimorfismos presentaron mayor toxicidad al tratamiento citotóxico, en tanto que los pacientes con el alelo mutado T del polimorfismo *MTHFR* C677T presentaron mayores tasas de respuesta y mejor SLP al tratamiento citotóxico, en comparación con los individuos homocigotos para la versión no mutada de tal polimorfismo.

Los resultados de esta tesis son relevantes por cuanto demuestran la influencia de los marcadores genéticos analizados sobre la respuesta individual a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas. A pesar de que este grupo farmacológico constituye el pilar de tratamiento médico del cáncer colorrectal metastásico¹⁶¹ se ha descrito una alta variabilidad en las tasas de respuesta y tolerancia a dichos agentes¹⁶², la cual puede explicarse, al menos en parte, por la diversa expresión de las enzimas relacionadas con su metabolismo o sitio de acción.^{101,162} En particular, este trabajo hizo énfasis en los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* en una población costarricense, por cuanto se ha descrito una alta prevalencia de los alelos mutados (T y C respectivamente) en poblaciones de similar origen étnico.^{137, 164-166}

La frecuencia de los alelos mutados para los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* fue del 49% y 24% respectivamente, concordante con estudios previos llevados a cabo en población mestiza latinoamericana.¹³⁷ Para el polimorfismo C677T se han descrito prevalencias del alelo mutado que van desde el 10% en sujetos de ascendencia india y afroamericanos, hasta el 57% en mestizos, con valores intermedios para poblaciones caucásicas y asiáticas.⁹⁰ Para el polimorfismo A1298C las frecuencias del alelo mutado C son menores del 20% en la mayoría de las poblaciones estudiadas, con excepción de los individuos de origen caucásico, en quienes tal frecuencia alcanza hasta un 37%.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶

La tolerancia a las fluoropirimidinas varía según los individuos. Se ha descrito que cerca de un 20% de los pacientes tratados con este grupo de fármacos presenta reacciones adversas serias que incluyen los síntomas gastrointestinales, mucositis o estomatitis, síndrome palmo-plantar (eritrodisestesia palmo-plantar), neuropatía periférica, toxicidad hematológica y deterioro de la función hepática.^{62,71,167} La ocurrencia de reacciones adversas representa no solo un riesgo para la salud de cada paciente, sino que también constituye un desafío para el oncólogo tratante, ya que suponen una reducción o retraso del tratamiento subsecuente y el eventual compromiso de la eficacia de la terapia sistémica.¹⁶⁸ La mayoría de los estudios han identificado a diversas enzimas encargadas del metabolismo del 5-FU como las responsables de esta variabilidad, dentro de las que destacan las enzimas DPD, TS y MTHFR. Sin embargo, las guías clínicas actuales solo recomiendan la evaluación del gen *DPD* previo al inicio de fluoropirimidinas orales o intravenosas, excluyendo la valoración de otros genes cuyos polimorfismos pueden asociarse de forma más variable a toxicidad severa.¹⁶⁹

Desde el punto de vista teórico, un decremento de la actividad enzimática de la MTHFR conduce a una elevación del 5,10-MTHF y una mayor actividad inhibitoria del 5-FU sobre la enzima TS.¹²¹ Este mecanismo sería el responsable del incremento de los efectos secundarios de este fármaco en los sujetos con una reducción de la actividad enzimática de la MTHFR a consecuencia de los polimorfismos objeto de este estudio.

Si bien los resultados de la presente cohorte apoyan la teoría de mayor severidad de las reacciones adversas en los pacientes con al menos un alelo mutado de los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR*, no todos los estudios disponibles en la literatura médica concuerdan con estos resultados¹⁷⁰⁻¹⁷³ Varias hipótesis podrían explicar el origen de tales discrepancias. Una de éstas puede obedecer a la escasa información brindada por algunos estudios sobre el seguimiento de los pacientes incluidos y el diagnóstico de las reacciones adversas, así como una omisión del grado de severidad de las mismas.¹⁷³ Otra posible explicación de los resultados divergentes entre éste y otros trabajos soslaya en la frecuencia de los genotipos descritos por diferentes autores. Por ejemplo, en el estudio de Marcuello y colaboradores¹⁷³, llevado a cabo en pacientes de

etnia caucásica, se encontró una relativa baja frecuencia del alelo T (33%) para el polimorfismo *MTHFR* C677T. Esta incidencia contrasta con la elevada frecuencia de dicho alelo encontrada en el presente estudio, la cual alcanzó el 49%. La menor frecuencia alélica descrita en el estudio de Marcuello y colaboradores, puede haber causado una reducción en el poder estadístico necesario para detectar la asociación entre los genotipos estudiados y la toxicidad inducida por el tratamiento citotóxico. De manera análoga, la baja incidencia de reacciones adversas descrita por otros autores puede explicar la ausencia de asociación entre los polimorfismos del gen *MTHFR* y la toxicidad inducida por fluoropirimidinas. Por ejemplo, Schwab y colaboradores¹⁴¹, al igual que Sharma y colaboradores¹⁷⁴, describieron solo un 15% de reacciones adversas en dos cohortes de pacientes tratados con fluoropirimidinas en monoterapia, un porcentaje mucho menor al 50% encontrado en nuestro estudio. De hecho, los autores de ambas publicaciones reconocen que esta baja incidencia de reacciones adversas pudo haber limitado el poder estadístico de estos estudios, con el consecuente aumento de falsos negativos en la evaluación estadística para la asociación entre polimorfismos y toxicidad. En cambio, tanto el presente estudio, como aquellos que sí demostraron una asociación entre los polimorfismos analizados y toxicidad, presentan elevados porcentajes de reacciones adversas.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Otra fuente de variabilidad puede surgir de la inclusión de poblaciones disímiles, con diversa cantidad de pacientes en lo referente a su edad, sexo y estado funcional. Todas estas variables también se han relacionado con la tolerancia a las fluoropirimidinas¹⁷⁵, por lo que la ausencia de características similares en todos los estudios dificulta una apropiada comparación.

Son varios los estudios disponibles que coinciden con los hallazgos de este trabajo. Por ejemplo, el estudio publicado por Capitain y colaboradores encontró una asociación estadísticamente significativa entre la variante mutada del polimorfismo A1298C y mayor riesgo de toxicidad inducida por el 5-FU.¹⁷⁶ Un análisis similar, publicado por Kristensen y colaboradores, asoció las variantes de ambos polimorfismos con mayor riesgo de toxicidad.¹⁷⁷ La relación entre toxicidad y polimorfismos del gen *MTHFR* ha sido también descrita por otros autores que incluyeron pacientes tratados con quimioterapia basada

en fluoropirimidinas tanto en el escenario adyuvante^{140,141,178,179} como metastásico^{180,181}, así como en pacientes con otras malignidades distintas al cáncer colorrectal y que son tratados con esquemas basados en fluoropirimidinas.¹⁸²⁻¹⁸⁵

En lo referente a la eficacia de los esquemas basados en fluoropirimidinas según la presencia de los polimorfismos *MTHFR* 6677T y A1298C, el presente estudio evidenció mayores tasas de respuesta y mejor SLP en los individuos portadores de los genotipos CT y TT del polimorfismo *MTHFR* C677T. Estos hallazgos concuerdan con lo expuesto por otros autores que también analizaron la influencia de tal polimorfismo en la respuesta tumoral, SLP e incluso SG.^{127,130,131,165,186-192} Estos hallazgos concuerdan además con la evidencia teórica y preclínica que demuestra una mayor sensibilidad al 5-FU en líneas celulares con una reducida actividad enzimática de la *MTHFR*.^{129,113}

Pese a que el presente y los citados estudios confirman la relación entre polimorfismos y efectividad terapéutica, también es posible encontrar en la literatura científica hallazgos controvertidos sobre esta asociación.¹²⁶

Las discrepancias entre los hallazgos de este trabajo y los estudios previos pueden deberse a varias causas. En primer lugar, la frecuencia del alelo *MTHFR* 677T en esta cohorte fue mayor a la descrita en otros estudios que no evidenciaron relación entre polimorfismos y respuesta tumoral (49.5% – en el presente estudio – vs. 21%¹⁹³, 28%¹⁹⁴ y 33%¹⁹⁵). Al igual que se señaló con la evaluación de la toxicidad del tratamiento citotóxico, es posible que la baja prevalencia del gen mutado en ciertas poblaciones impida una adecuada correlación de tal polimorfismo con las variables de interés.

Otra hipótesis sobre la discrepancia de los resultados obtenidos en nuestro estudio y otros autores puede deberse a los diversos regímenes de quimioterapia empleados. Si bien todos los pacientes fueron tratados con fluoropirimidinas, mayoritariamente 5-FU o capecitabina, el esquema de aplicación fue muy variable. En particular, el estudio de Ruzzo y colaboradores¹⁷¹ empleó una dosis de 5-FU infusional menor a la empleada en este estudio (1200 mg/m² vs 2400 mg/m² por ciclo de tratamiento), en tanto que el estudio publicado por Afzal y colaboradores empleó únicamente 5-FU en bolos semanales.¹⁴² Estas diferencias en la administración del 5-FU

cobran relevancia al revisar la farmacocinética y farmacodinamia del 5-FU. Se ha descrito que regímenes de administración rápidas (en bolo) de este fármaco generan concentraciones pico altas (entre 0,1 a 1 mmol/L) que rápidamente descienden debido a la corta vida media del fármaco (menor a 30 minutos).^{104,196} Se ha postulado que es poco probable que estas concentraciones altas y transitorias de 5-FU ejerzan una inhibición continua de la enzima TS, cuya actividad es variable a lo largo del ciclo celular. Por tal motivo se ha propuesto que la incorporación del 5-FU al ADN es el efecto citotóxico más compatible cuando se emplea este fármaco en bolos intravenosos de rápida infusión. En contraparte, la inhibición de la enzima TS mediante la conformación del complejo ternario (enzima, 5,10-MTHF y FdUMP) parece ser el mecanismo de acción dominante al emplear dosis continuas de 5-FU.⁹¹ Por lo tanto, se postula que el impacto de los polimorfismos del gen *MTHFR* es dependiente del modo de aplicación de la fluoropirimidina, siendo más relevante cuando se emplean dosis altas de 5-FU en infusión continua y prolongada en comparación con las dosis rápidas en forma de bolo intravenoso. En el presente estudio se empleó el esquema FOLFOX-6 modificado, cuya dosis de 5-FU en infusión es mayor a la de los estudios que no evidenciaron relación entre polimorfismos y respuesta tumoral.^{142,171} La poca uniformidad en los esquemas de tratamiento se hace evidente en el estudio de Marcuello y colaboradores, quienes omitieron el uso de leucovorina en casi el 50% de los pacientes incluidos.¹⁷³

Una hipótesis adicional que puede explicar los resultados divergentes entre el presente y otros estudios recae en el modelo de análisis de los genotipos. Al respecto, cabe señalar que tanto el modelo recesivo, dominante y aditivo han sido indistintamente empleados por varios autores para el análisis de la relación entre polimorfismos, toxicidad y supervivencia.¹⁹⁷ No obstante, esta falta de uniformidad puede originar resultados divergentes. Al respecto, un meta-análisis demostró que la asociación entre el polimorfismo *MTHFR* C677T y el beneficio clínico es solo evidente cuando se emplea un modelo de análisis genotípico dominante, como el empleado en el presente trabajo.¹⁹⁸ Más aún, el análisis estadístico múltiple que evalúa cada modelo genotípico dentro de

cada estudio específico puede incrementar la tasa de errores aleatorios y generar conclusiones erróneas.¹⁹⁹

Una causa adicional de discrepancia puede originarse de una eventual interdependencia entre los polimorfismos estudiados del gen *MTHFR* y otras variantes de genes encargados del metabolismo del 5-FU, como el gen que codifica por la enzima TS. Al respecto Capitain y colaboradores¹⁷⁶ documentaron que el efecto sobre la supervivencia que ejerce el alelo T del polimorfismo *MTHFR* C677T era evidente únicamente en presencia del genotipo 3R/3R del gen *TS*, el cual está asociado a una menor sensibilidad a las fluoropirimidinas.¹⁰⁷ Debido a que el presente estudio no evaluó los polimorfismos de otros genes relevantes en el metabolismo del 5-FU no es posible conocer esta eventual interacción recíproca.

Otra fuente de discordancia puede soslayar en el hecho de que las variantes alélicas estudiadas tengan un efecto modesto sobre la respuesta clínica a las fluoropirimidinas, por lo que no todos los estudios son capaces de detectar tales efectos. Como ha sido descrito previamente, el metabolismo y mecanismo de acción de este grupo de medicamentos involucra una intrincada red de proteínas cuya variabilidad también puede afectar la efectividad terapéutica. Más aún, la baja frecuencia alélica encontrada en algunos estudios, cuyo efecto de los polimorfismos fue nulo o no significativo, pudo originar un decremento del poder estadístico necesario para detectar marginales efectos de los polimorfismos sobre la respuesta al agente citotóxico.

Si bien el presente estudio no evidenció relación entre el polimorfismo *MTHFR* A1298C y respuesta tumoral, esta asociación también ha sido descrita por otros autores.¹²⁶ No obstante, deben considerarse preliminares los resultados del presente análisis en lo referente a la evaluación de la asociación de efectividad y toxicidad con el polimorfismo *MTHFR* A1298C. Lo anterior con base en la baja incidencia del alelo mutado C en la población de estudio.

Los hallazgos del presente estudio no documentaron ningún efecto de las variantes estudiadas del gen *MTHFR* y la SG, como si lo han señalado estudios previos.¹²⁷ Sin embargo, conviene señalar que la variable de SLP es particularmente útil para la

descripción de la eficacia de los fármacos de estudio ya que no se ve afectada por la influencia que las terapias subsecuentes genera sobre la valoración de la mortalidad. Sin embargo, se recomienda un seguimiento más prolongado de esta cohorte para determinar el efecto final entre los polimorfismos del gen *MTHFR* y la supervivencia.

Otro de los objetivos del presente estudio fue determinar la correlación de los polimorfismos del gen *MTHFR* con la presencia de inestabilidad microsatelital. Esta teoría se basa en los estudios previos disponibles que coinciden en el papel protagónico de la enzima MTHFR sobre las reacciones de metilación del ADN.¹⁴³ Se ha propuesto que un déficit funcional de la enzima MTHFR conduce a patrones aberrantes de metilación del material genético que conducen a inestabilidad microsatelital.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ No obstante, pese a esta evidencia^{149,157,158} los hallazgos de nuestro estudio no apoyan la asociación entre tales variables. Una posible hipótesis para conciliar estos resultados estriba en la baja prevalencia de tumores con MSI detectados en la presente cohorte que solo alcanzó el 11.7% (n=8) de la muestra.

Algunos autores han señalado que la valoración de polimorfismos genéticos puede generar resultados contradictorios cuando se analiza el ADN somático (tumoral) en lugar del ADN germinal. Este último método es el preferido en la mayoría de análisis farmacogenéticos ya que provee altas concentraciones de ADN de calidad, derivado en su mayoría de leucocitos circulantes fácilmente obtenidos a través de la recolección de sangre periférica.¹³⁶ En contraste, el ADN tumoral suele extraerse de tejido parafinado, cuya calidad depende del tiempo de isquemia, las condiciones de almacenamiento, los procesos de fijación con formaldehído, entre otros factores.^{200,201} Además, el formaldehído genera daños directos al ADN somático con lo que se generan artefactos de mutaciones que dificultan la interpretación de los resultados.²⁰² No obstante, la valoración del ADN tumoral es relevante en patologías neoplásicas debido a que las variantes detectadas en línea somática pueden ser exclusivas del tejido neoplásico y no corresponder con el ADN extraído de línea germinal.¹³⁶ El presente estudio evidenció una alta concordancia entre los genotipos obtenidos de los mismos individuos en muestras germinales y somáticas. Este hallazgo confirma la validez de ambos métodos para el

análisis particular de los polimorfismos *MTHFR* C677T y A1298C, lo cual ha sido corroborado por estudios previos.^{107,135}

Un argumento en contra de la validez de los hallazgos del presente trabajo puede surgir de la inclusión de pacientes con distintos esquemas de quimioterapia (FOLFOX y FOLFIRI), los cuales, a pesar de presentar una eficacia comparable, poseen un perfil de toxicidad distinto, como consecuencia del agente acompañante de la fluoropirimidina (oxaliplatino o irinotecan).^{203,204} No obstante, la asociación entre los genotipos *MTHFR* 677 TT y CT y la severidad de reacciones adversas ha sido descrita para esquemas de quimioterapia que emplean tanto irinotecan como oxaliplatino. Más aún, debido a la mayor eficacia de las combinaciones de fluoropirimidina y otro agente citotóxico sobre el uso de una fluoropirimidina en monoterapia⁶², los resultados de este estudio son más aplicables a la práctica clínica usual, en la que la mayoría de pacientes son tratados con esquemas combinados.

El presente estudio no está exento de posibles limitaciones. Una de ellas es el bajo número de individuos incluidos, provenientes de un único centro de referencia, lo cual limita la validez externa de los resultados. No obstante, las frecuencias genotípicas estuvieron en equilibrio con el modelo de Hardy-Weinberg, lo cual permite asegurar la constancia de las frecuencias alélicas en la población. Además, se pudo detectar un porcentaje adecuado de individuos con al menos uno de los alelos mutados para el genotipo *MTHFR* C677T. No obstante, los resultados de este estudio referentes a la influencia del polimorfismo *MTHFR* A1298C sobre toxicidad y eficacia al tratamiento empleado deben interpretarse con cautela por cuanto la prevalencia del alelo mutado C fue considerablemente baja. Por lo tanto, se sugiere que en futuros estudios se emplee con un número muestral mayor para confirmar o descartar las relaciones descritas en nuestro estudio. Otra potencial limitante de los resultados de este estudio es la ausencia de información sobre mutaciones y polimorfismos de otros genes relevantes en el metabolismo de la fluoropirimidinas, tales como *TYMS* y *DPD*¹⁰¹, los cuales podrían modificar las variables de seguridad y efectividad descritos.

Una limitante adicional del presente estudio obedece a la ausencia de información sobre las concentraciones de folato sérico e intracelular de los participantes incluidos, ya que algunos estudios señalan que el déficit de la actividad catalítica de la enzima MTHFR es dependiente del estado basal de folatos de cada individuo. Desde el punto de vista teórico, altas concentraciones de folato intracelular parecen estabilizar la estructura proteica y atenuar la disfunción catalítica de la enzima.¹²⁰ No obstante, el aporte exógeno de leucovorina en los esquemas de quimioterapia empleados hacen suponer que la concentración de folato intracelular fue adecuadamente corregida en todos los pacientes analizados.

Pese a la limitantes mencionadas, el presente análisis posee como fortaleza su diseño prospectivo, no solo en lo referente al seguimiento de los pacientes, sino también en la determinación genética de la inestabilidad microsatelital, los polimorfismos genéticos y las demás mutaciones analizadas. Este diseño contrasta con trabajos similares sobre esta temática, cuyo diseño retrospectivo limita la interpretación de sus resultados.^{142,171}

Otra fortaleza del presente estudio es la inclusión de un análisis multivariante que ajustó la relación entre el polimorfismo C677T y la SLP. En este modelo de regresión se confirmó el impacto independiente del alelo mutado T (genotipos CT y TT del polimorfismo *MTHFR* C677T) sobre la probabilidad de progresión, aún a pesar de la influencia de otras variables pronósticas, tales como el estado funcional, la resección del tumor primario y el antecedente de metastasectomía.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones alcanzadas en los trabajos que conforman la presente Tesis Doctoral se enumeran a continuación.

C677T and A1298C MTHFR gene polymorphisms and response to Fluoropyrimidine-based chemotherapy in Mestizo Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Pharmacogenetics and Genomics 2021; In press. Doi: 10.1097/FPC.0000000000000440.

1. La prevalencia del alelo mutado T en la población de estudio para el polimorfismo *MTHFR* C677T fue del 49.5%, en tanto que la frecuencia del alelo mutado C del polimorfismo *MTHFR* A1298C fue del 24%.
2. Los pacientes con uno o dos alelos T del polimorfismo *MTHFR* C677T presentaron mayor tasa de respuesta tumoral y una supervivencia libre de progresión más prolongada que los individuos homocigotos para la variante no mutada de tal polimorfismo.
3. No se encontró asociación entre las variantes del polimorfismo *MTHFR* A1298C, respuesta tumoral ni supervivencia libre de progresión. Ninguno de los polimorfismos del gen *MTHFR* estudiados se asoció a supervivencia global.
4. No hubo correlación entre el estatus de inestabilidad microsatelital, las mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS* o *BRAF* y los polimorfismos *MTHFR* C677T y A1298C.
5. Hubo una alta concordancia entre la determinación de los polimorfismos *MTHFR* C677T y A1298C según el análisis de ADN de línea somática y germinal.

Association of C677T and A1298C MTHFR Polymorphisms and Fluoropyrimidine-induced Toxicity in Mestizo Patients With Metastatic Colorectal Cancer. Anticancer Research 2020; 40: 4263-4270.

6. Los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* son biomarcadores farmacogenéticos que predicen la toxicidad al tratamiento basado en fluoropirimidinas para pacientes con cáncer colorrectal metastásico.
7. En comparación con los pacientes portadores de la variante no mutada del polimorfismo *MTHFR* C677T, los individuos con el alelo T (tanto heterocigotos como homocigotos) presentaron más riesgo de anemia, neutropenia, trombocitopenia, neuropatía, diarrea y síndrome mano pie.
8. La presencia del alelo mutante C del polimorfismo *MTHFR* A1298C se asoció a mayor anemia y trombocitopenia en comparación con la variante no mutada de dicho polimorfismo.

Conclusión general:

En pacientes costarricenses con cáncer colorrectal metastásico tratados en primera línea con un esquema basado en fluoropirimidinas, los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* son biomarcadores farmacogenéticos de toxicidad y efectividad.

7. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. GLOBOCAN 2021. Accesado el 31 de Agosto de 2021. En: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
2. Bosetti C, Levi F, Rosato V, Bertuccio P, Lucchini F, Negri E, et al. Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe. *Int J Cancer* 2011; 129: 180–191.
3. Red Española de Registros de Cáncer REDECAN. Accesado el 15 de Septiembre de 2021. En: <https://redecn.org/es/proyectos/incidencia>.
4. Registro Nacional de Tumores. Ministerio de Salud de Costa Rica. Accesado el 8 de enero de 2021. En: <http://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/estadisticas-y-bases-de-datos/estadisticas/estadistica-de-cancer-registro-nacional-tumores>
5. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2014; 64: 252-271.
6. Kasi PM, Shahjehan F, Cochuyt JJ, Li Z, Colibaseanu DT, Merchea A. Rising proportion of young individuals with rectal and colon cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2019; 18: e87-e95
7. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017; 66: 683–691.
8. Fitzpatrick-Lewis D, Ali MU, Warren R, Kenny M, Sherifali D, Raina P. Screening for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer* 2016; 15: 298-313.
9. Egeberg R, Olsen A, Christensen J, Halkjær J, Jakobsen MU, Overvad K, et al. Associations between red meat and risks for colon and rectal cancer depend on the type of red meat consumed. *J Nutr* 2013; 143: 464–472.
10. Parr CL, Hjartaker A, Lund E, Veierød MB. Meat intake, cooking methods and risk of proximal colon, distal colon and rectal cancer: the Norwegian Women and Cancer (NOWAC) cohort study. *Int J Cancer* 2013; 133: 1153–1163.
11. Sansbury LB, Wanke K, Albert PS, Kahle L, Schatzkin A, Lanza E, et al. The effect of strict adherence to a high-fiber, high-fruit and vegetable, and low-fat eating pattern on adenoma recurrence. *Am J Epidemiol* 2009; 170: 576-584.

12. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 1999; 340: 169–176.
13. Gong J, Hutter C, Baron JA, Berndt S, Caan B, Campbell PT, et al. A pooled analysis of smoking and colorectal cancer: timing of exposure and interactions with environmental factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 1974–1985.
14. Renehan AG, Flood A, Adams KF, Olden M, Hollenbeck AR, Cross AJ, et al. Body mass index at different adult ages, weight change, and colorectal cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Cohort. *Am J Epidemiol* 2012; 176: 1130–1140.
15. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 1669–1674.
16. Kidambi TD, Kohli DR, Samadder NJ, Singh A. Hereditary Polyposis Syndromes. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2019; 17: 650-665.
17. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 329: 1982–1987.
18. Cerretelli G, Ager A, Arends MJ, Frayling IM. Molecular pathology of Lynch syndrome. *J Pathol* 2020; 250: 518-531.
19. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JL, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet* 2019; 394: 1467-1480.
20. Henrikson NB, Webber EM, Goddard KA, Scrol A, Piper M, Williams MS, et al. Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. *Genet Med* 2015; 17: 702–712.
21. Schoen RE, Razzak A, Yu KJ, Berndt SI, Firl K, Riley TL, et al. Incidence and mortality of colorectal cancer in individuals with a family history of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2015; 149: 1438–45.e1.
22. Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. *Br J Cancer*. 2005; 93: 399-405.

23. Goodman D, Irvin TT. Delay in the diagnosis and prognosis of carcinoma of the right colon. *Br J Surg* 1993; 80: 1327-1329.
24. Saidi HS, Karuri D, Nyaim EO. Correlation of clinical data, anatomical site and disease stage in colorectal cancer. *East Afr Med J* 2008; 85: 259-62.
25. Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. *Br J Cancer* 2005; 93: 399-405.
26. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Preoperative carcinoembryonic antigen as an outcome predictor in colon cancer. *J Surg Oncol* 2013; 108: 14-18.
27. Harewood GC, Wiersma MJ, Nelson H, Maccarty RL, Olson JE, Clain JE, et al. A prospective, blinded assessment of the impact of preoperative staging on the management of rectal cancer. *Gastroenterology* 2002; 123: 24–32.
28. Tamerisa R, Irisawa A, Bhutani MS. Endoscopic ultrasound in the diagnosis, staging, and management of gastrointestinal and adjacent malignancies. *Med Clin North Am* 2005; 89: 139–158.
29. Kinkel K, Lu Y, Both M, Warren RS, Thoeni RF. Detection of hepatic metastases from cancers of the gastrointestinal tract by using noninvasive imaging methods (US, CT, MR imaging, PET): a metaanalysis. *Radiology* 2002; 224: 748–756.
30. de Sousa e Melo F, Kurtova AV, Harnoss JM, Kljavin N, Hoeck JD, Hung J, et al. A distinct role for Lgr5(+) stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* 2017; 543: 676–680.
31. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CVA, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004; 53: 1137–1144.
32. Cheng YW, Pincas H, Bacolod MD, Schemmann G, Giardina SF, Huang J, et al. CpG island methylator phenotype associates with low-degree chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6005-6013.
33. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2059–2072.
34. Bardi G, Fenger C, Johansson B, Mitelman F, Heim S. Tumor karyotype predicts clinical

- outcome in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2623–2634.
35. Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759–767.
 36. Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology* 2010; 56: 167–179.
 37. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558–561.
 38. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993, 260: 816–819.
 39. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007, 50: 113–130.
 40. Guinney J, Dientsmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015; 21: 1350-1356.
 41. Menter DG, Davis JS, Broom BM, Overman MJ, Morris J, Kopetz S. Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype Future. *Curr Gastroenterol Rep* 2019; 21: 5.
 42. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. *AJCC Cancer Staging Manual (8th edition)*. Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017.
 43. Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol* 2008; 26: 303-312.
 44. Tang X, Huang M, Han S, Chang Y, Li Z, Kao X, et al. The Circumferential Resection Margin Is a Prognostic Predictor in Colon Cancer. *Front Oncol* 2020; 10: 927.
 45. Compton CC. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig Dis* 1999; 17: 67-79.
 46. Agayi Y, Adachi Y, Ohchi T, Kinugasa T, Shirouzu K. Prognostic Impact of Lymphatic Invasion of Colorectal Cancer: A Single-center Analysis of 1,616 Patients Over 24 Years. *Anticancer Res* 2013; 33: 2965-2970.
 47. Karim S, Brennan K, Nanji S, Berry SR, Booth CM. Association Between Prognosis and

- Tumor Laterality in Early-Stage Colon Cancer. *JAMA Oncol* 2017; 3: 1386-1392.
48. Lee MS, Menter DG, Kopetz S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; 15: 411-419.
 49. Majek O, Gondos A, Jansen L, Emrich K, Holleczer B, Katalinik A, et al. Sex differences in colorectal cancer survival: population-based analysis of 164,996 colorectal cancer patients in Germany. *PLoS One* 2013; 8: e68077.
 50. Quirt JS, Nanji S, Wei X, Flemming JA, Booth CM. Is there a sex effect in colon cancer? Disease characteristics, management, and outcomes in routine clinical practice. *Curr Oncol* 2017; 24: e15-e23.
 51. Van Leeuwen BL, Pålman L, Gunnarsson U, Sjövall A, Martling A. The effect of age and gender on outcome after treatment for colon carcinoma. A population-based study in the Uppsala and Stockholm region. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 67: 229-236.
 52. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 7-33.
 53. Oken NM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 649-655.
 54. Lavin P, Mittelman A, Douglass H, Engstrom P, Klaassen D. Survival and response to chemotherapy for advanced colorectal adenocarcinoma. An eastern cooperative oncology group report. *Cancer* 1980; 46: 1536-1543.
 55. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer* 2008; 46: 2788-2798.
 56. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 609-618.
 57. Foltran L, De Maglio G, Pella N, Ermacora P, Aprile G, Masiero E, et al. Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer. *Future Oncol* 2015; 11: 629-640.
 58. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey

- BF, et al. Colonoscopic Polypectomy and Long-Term Prevention of Colorectal-Cancer Deaths. *N Engl J Med* 2012; 366: 687-696.
59. Emmanuel A, Haji A. Complete mesocolic excision and extended (D3) lymphadenectomy for colonic cancer: is it worth that extra effort? A review of the literature. *Int J Colorectal Dis* 2016; 31: 797–804.
60. Roeder F, Meldolesi E, Valentini V, Rödel C. Recent advances in (chemo-) radiation therapy for rectal cancer: a comprehensive review. *Radiation Oncol* 2020; 15: 262.
61. Hoendervangers S, Burbach JPM, Lacle MM, Koopman M, van Grevenstein WMU, MD, PhD, Intven MPW, et al. Pathological Complete Response Following Different Neoadjuvant Treatment Strategies for Locally Advanced Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2020; 27: 4319-4336.
62. André T, de Gramont A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, et al. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol* 2015; 33: 4176-4187.
63. Haller DG, Taberero J, Maroun J, de Braud F, Price T, van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1465-1471.
64. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero R, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO Consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016; 27: 1386-1422.
65. Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouché O, Chapet O, Closon-Dejardin M, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4620-4625.
66. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 1114-1123.

67. Turner MC, Farrow NE, Rhodin KE, Sun Z, Adam MA, Mantyh CR, et al. Delay in Adjuvant Chemotherapy and Survival Advantage in Stage III Colon Cancer. *J Am Coll Surg* 2018; 226: 670-678.
68. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med* 2018; 378: 1177-1188.
69. Bleiberg H. Role of chemotherapy for advanced colorectal cancer: new opportunities. *Semin Oncol* 1996; 23: 42-50.
70. Köhne CH, van Cutsem E, Wils J, Bokemeyer C, El-Serafi M, Lutz MP, et al. Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4856-4865.
71. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938–2947.
72. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1670-1676.
73. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1539-1544.
74. Tabernero J, Yoshino T, Cohn AL, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2015; 16: 499-508.

75. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based régime. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3499-3506.
76. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4697-4705.
77. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalberg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2040-2048.
78. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3677-3683.
79. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E–Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381: 1632-1643.
80. André T, Shiu K, TW Kim, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite–Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2020; 383: 2207-2218.
81. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest* 2015; 125: 3335-3337.
82. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability–high colorectal cancer (CheckMate 142): results of an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2017; 18: 1182-1191.
83. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000; 342: 69-77.

84. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247–257.
85. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3219–3226.
86. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch repair deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372: 2509-2520.
87. Kasi A, Handa S, Bhatti S, Umar S, Bansal A, Sun W. Molecular Pathogenesis and Classification of Colorectal Carcinoma. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2020; 16: 97-106.
88. Saeed O, Lopez-Beltran A, Fisher KW, Scarpelli M, Montironi R, Cimadamore A, et al. RAS genes in colorectal carcinoma: pathogenesis, testing guidelines and treatment implications. *J Clin Pathol* 2019; 72: 135-139.
89. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2015; 136: 83-90.
90. De Mattia E, Cecchin E, Toffoli G. Pharmacogenomics of intrinsic and acquired pharmacoresistance in colorectal cancer: Toward targeted personalized therapy. *Drug Resist Updat* 2015; 20: 39-70.
91. Sobrero AF, Aschele C, Bertino JR. Fluorouracil in colorectal cancer--a tale of two drugs: implications for biochemical modulation. *J Clin Oncol* 1997; 15: 368-381.
92. Satoh T, Sakata Y. S-1 for the treatment of gastrointestinal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2012; 13: 1943-1959.
93. Hernando-Cubero J, Matos-Garcia I, Alonso-Urdaña V, Capdevilla J. *J Gastrointest Canc* 2017; 48: 135-147.
94. Takiuchi H, Ajani JA. Uracil-tegafur in gastric carcinoma: a comprehensive review. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2877–2885.
95. Budman DR, Meropol NJ, Reigner B, Creaven PJ, Lichtman SM, Berghorn E, et al. Preliminary studies of a novel oral fluoropyrimidine carbamate: Capecitabine. *J Clin*

- Oncol 1998; 16: 1795-1802.
96. Longley DB, Harkin P, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 330-338.
 97. Reti A, Pap E, Adleff V, Jeney A, Kralovanszky J, Budai B. Enhanced 5-fluorouracil cytotoxicity in high cyclooxygenase-2 expressing colorectal cancer cells and xenografts induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs via downregulation of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 219–227.
 98. Harris BE, Carpenter JT, Diasio RB. Severe 5-fluorouracil toxicity secondary to dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. A potentially more common pharmacogenetic syndrome. *Cancer* 1991; 68: 499-501.
 99. Saif MW, Ezzeldin H, Vance K, Sellers S, Diasio RB. DPYD*2A mutation: the most common mutation associated with DPD deficiency. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 60: 503–507.
 100. Deenen MJ, Meulendijks D, Cats A, Sechterberger MK, Severens JL, et al. Upfront Genotyping of DPYD*2A to individualize fluoropyrimidine therapy: a safety and cost analysis. *J Clin Oncol* 2016; 34: 227-234.
 101. Xie P, Mo J, Liu J, Li X, Tan L, Zhang W, et al. Pharmacogenomics of 5-fluorouracil in colorectal cancer: review and update. *Cell Oncol* 2020; 43: 989-1001.
 102. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther* 2020; 206: 107447.
 103. Sobrero AF, Aschele C, Bertino JR. Fluorouracil in colorectal cancer – a tale of two drugs: implications for biochemical modulation. *J Clin Oncol* 1997; 15: 368-381.
 104. Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-Fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 1989; 16: 215-237.
 105. Blount BC, Mack MM, Wehr CM et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3290-3295.
 106. Yoshioka A, Hiraoka O, Koyama Y, Hirota Y, Ayusawa D, et al. Deoxyribonucleoside

- triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J Biol Chem* 1987; 262: 8235-8241.
107. Marsh S, McLeod HL. Thymidilate synthase pharmacogenetics in colorrectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2001; 1: 175-178.
 108. Aschele C, Debernardis D, Casazza D, Antonelli G, Tunesi G, Baldo et al. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1760–1770.
 109. 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: 65–70.
 110. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 14853-14858.
 111. Goyette P, Sumner JS, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification paper. *Nat Genet* 1994; 7: 195-200.
 112. Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet.* 1996; 58: 35–41.
 113. Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, Lucock M, Kim YI. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5- fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 134–144.
 114. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet.* 1995; 345: 149–151.
 115. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;

43: 414–421.

116. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995; 10: 111-113.
117. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044–1051.
118. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7–9.
119. Weisberg I, Tran P, Christensen S, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-172.
120. Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen A, Meyer K, Vollset SE, Hoff G, et al. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. *Hum Genet* 2007; 121: 57–64.
121. Toffoli G, De Mattia E. Pharmacogenetic relevance of MTHFR polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 1195-1206.
122. Ogino S, Wilson RB. Genotype and haplotype distributions of MTHFR 677C>T and 1209A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2003; 48: 1-7.
123. Sohn KJ, Jang H, Campan M, Weisenberg DJ, Dickhout J, Wang Y, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation induces cell-specific changes in genomic DNA methylation and uracil misincorporation: a possible molecular basis for the site-specific cancer risk modification. *Int J Cancer* 2009; 124: 1999-2005.
124. Etienne MC, Ilk K, Formento JL, Laurent-Puig P, Formento P, Cheradame S, et al. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer* 2004; 90: 526-534.
125. Zhong L, He X, Zhang Y, Chuan JL, Chen M, Zhu SM, et al. Relevance of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C with response to

- fluoropyrimidine-based chemotherapy in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2018; 9: a31291-31301.
126. Chen CL, Wang YM, Zhao F, Chen Z, Yang X, Sun C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and colorectal cancer prognosis: A meta-analysis. *J Gene Med* 2019; 21: aae3114.
 127. Yeh CC, Lai CY, Chang SN, Hsieh LL, Tang R, Sung FC, et al. Polymorphisms of MTHFR C677T and A1298C associated with survival in patients with colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Int J Clin Oncol* 2017; 22: 484-493
 128. Etienne MC, Formento JL, Chazal M, Francoual M, Magné N, Formento P, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 785-792.
 129. Etienne-Grimaldi M, Milano G, Maindrault-Goebel F, Chibaudel B, Formento J, Francoual M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69: 58-66.
 130. Cecchin E, Perrone G, Nobili S, Polesel J, De Mattia E, Zanusso C, et al. MTHFR-1298 A>C (rs1801131) is a predictor of survival in two cohorts of stage II/III colorectal cancer patients treated with adjuvant fluoropyrimidine chemotherapy with or without oxaliplatin. *Pharmacogenomics J* 2015; 15: 219-225.
 131. Zhang W, Press OA, Haiman CA, Yang DY, Gordon MA, Fazzone W, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and sex-specific survival in patients with metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3726–3731.
 132. Etienne-Grimaldi MC, Francoual M, Formento JL, Milano G. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) variants and fluorouracil-based treatments in colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 1561-1566.
 133. Rai PS, Pai GC, Alvares JF, Bellampalli R, Gopinath PM, Satyamoorthy K. Intraindividual somatic variations in MTHFR gene polymorphisms in relation to colon cancer. *Pharmacogenomics* 2014; 15: 349-359.
 134. Balboa E, Duran G, Lamas MJ, Gomez-Caamaño A, Celeiro-Muñoz C, Lopez R, et al.

- Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relationship with response. *Pharmacogenomics* 2020; 11: 747-761.
135. van Huis-Tanja L, Kweekel D, Gelderblom H, Koopman M, Punt K, Guchelaar HJ, et al. Concordance of genotype for polymorphisms in DNA isolated from peripheral blood and colorectal cancer tumor samples. *Pharmacogenomics* 2013; 14: 2005-2012.
 136. McWhinney SR, McLeod HL. Using germline genotype in cancer pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 489-493.
 137. Castillo-Fernández O, Santibáñez M, Bauza A, Calderillo G, Castro C, Herrera R, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (677 C>T) predicts long time to progression in metastatic colon cancer treated with 5-fluorouracil and folinic acid. *Arch Med Res* 2010; 41: 430-435.
 138. Chua W, Goldstein D, Lee C, Dhillon H, Michael M, Mitchell P, et al. Molecular markers of response and toxicity to FOLFOX chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 998-1004.
 139. Derwinger K, Wettergreen Y, Odin E, Carlsson G, Gustavsson B. A study of the MTHFR gene polymorphism C677T in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2009; 8: 43-48.
 140. Taflin H, Wettergreen Y, Odin E, Carlsson G, Derwinger K. Gene polymorphisms MTHFR C677T and MTR A2756G as predictive factors in adjuvant chemotherapy for stage III colorectal cancer. *Anticancer Res* 2011; 31: 3057-3062.
 141. 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. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2131-2138.
 142. Afzal S, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Matsen JP, Sorensen JB, et al. MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009; 20: 1660-1666.
 143. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:

- 5606–5611.
144. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutrition* 2000; 130: 129-132.
 145. de Vogel S, Wouters K, Gottschalk R, FJ van Schooten, de Goeij A, Bruïne Ap, et al. Genetic variants of methyl metabolizing enzymes and epigenetic regulators: associations with promoter CpG island hypermethylation in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 3086-3096.
 146. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2000; 9: 849-853.
 147. Plaschke J, Schwanebeck U, Pistorius S, Saeger HD, Schackert HK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of sporadic and hereditary colorectal cancer with or without microsatellite instability. *Cancer Lett* 2003; 191: 179–185.
 148. Kawakami K, Ruskiewicz A, Bennett G, Moore J, Watanabe G, Iacopetta B. The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase, *Clin. Cancer Res* 2003; 9: 5860-5865.
 149. Oyama K, Kawakami K, Maeda K, Ishiguro K, Watanabe G. The association between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and promoter methylation in proximal colon cancer, *Anticancer Res* 2004; 24: 649-654.
 150. Tse JW, Jenkins LJ, Chionh F, Mariadason JM. Aberrant DNA Methylation in Colorectal Cancer: What Should We Target? *Trends Cancer* 2017; 3: 698-712.
 151. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 423–43.
 152. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1098–1102.

153. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 4862–4864.
154. Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, Diep A, Lee ER, Frankl HD, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 657–663.
155. Marugame T, Tsuji E, Kiyohara C, Eguchi H, Oda T, Shinchi K, et al. Relation of plasma folate and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism to colorectal cancer. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 64–66.
156. Hubner HA, Lubbe S, Chandler I, Houlston RS. MTHFR C677T has differential influence on risk of MSI and MSS colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 1072-1077.
157. Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J, Iacopetta B. A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut* 2002; 50: 520-524.
158. Naghibalhossaini F, Mokarram P, Khalili I, Vasei M, Hosseini SV, Ashtorab H, et al. MTHFR C677T and A1298C variant genotypes and the risk of microsatellite instability among Iranian colorectal cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 197: 142-151.
159. Eaton AM, Sandler R, Caretheres JM, Millikan RC, Galanko J, Keku TO. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 and 1298 Polymorphisms, Folate Intake, and Microsatellite Instability in Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2023-2029.
160. Zhao M, Li X, Xing C, Zhou B. Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms with colorectal cancer risk: A meta-analysis. *Biomed Rep* 2013; 1: 781-791.
161. Scartozzi, M., E. Maccaroni, R. Giampieri, M. Pistelli, A. Bittoni, M. Del Prete, et al. 5-Fluorouracil pharmacogenomics: still rocking after all these years? *Pharmacogenomics* 2011; 12: 251–265.
162. Gamelin EC, Danquechin-Dorval EM, Dumesnil YF, Maillart PJ, Goudier MJ, Burtin PC, et al. Relationship between 5-fluorouracil (5-FU) dose intensity and therapeutic response

- in patients with advanced colorectal cancer receiving infusional therapy containing 5-FU. *Cancer* 1996; 77: 441-451.
163. Kidd EA, Yu J, Li X, Shannon WD, Watson MA, McLeod HL. Variance in the Expression of 5-Fluorouracil Pathway Genes in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2612-2619.
 164. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Redlund M, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet* 2003; 40: 619-625.
 165. López-Cortés A, Paz-y-Niño C, Guerrero S, Jaramillo-Koupermann G, León A, Intriago-Baldeón DP, et al. Pharmacogenomics, biomarker network, and allele frequencies in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2020; 20: 136-158.
 166. Le Merchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE. The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1198-1203.
 167. de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouché O, Etienne PL, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol* 1997; 15: 808-815.
 168. De Mattia E, Roncato R, Dalle Fratte C, Ecça F, Toffoli G, Cecchin E. The use of pharmacogenetics to increase the safety of colorectal cancer patients treated with fluoropyrimidines. *Cancer Drug Resist* 2019; 2: 116-130.
 169. European Medicine Agency: Fluorouracil and fluorouracil related substances (capecitabine, tegafur and flucytosine) containing medicinal products. 2020. Document no. 367286/2020. Accesado el 3 de abril de 2021. En: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/fluorouracil-fluorouracil-related-substances-article-31-referral-ema-recommendations-dpd-testing_en.pdf.
 170. Braun MS, Richman SD, Thompson L, Daly CL, Meade AM, Adlard JW, et al. Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy for advanced colorectal cancer: the FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5519-5528.

171. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini, et al. Pharmacogenomic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1247-1254.
172. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Santini D, Catalano V, Bissoni R, et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFIRI chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2008; 8: 278-288.
173. Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Del Río E, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57: 835-840.
174. Sharma R, Hoskins JM, Rivory LP, Zucknick M, London R, Liddle C, et al. Thymidylate Synthase and Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Toxicity to Capecitabine in Advanced Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 817-825.
175. Meta-Analysis Group in Cancer, Lévy E, Piedbois P, Buyse M, Pignon JP, Rougier P, et al. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3537-3541.
176. Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A, Gamelin E. The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2008; 8: 256-267.
177. 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. *J Int Med Res* 2010; 38: 870-883.
178. Lee K, Chang HJ, Han S, Oh D, Im S, Bang Y, et al. Pharmacogenetic analysis of adjuvant FOLFOX for Korean patients with colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71: 843-851.

179. Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C, Marinelli R, Barile C, Bononi A, et al. Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 1549-1557.
180. Puerta-García E, Urbano-Pérez D, Carrasco-Campos MI, Pérez-Ramírez C, Segura-Pérez A, Calleja-Hernández, et al. Effect of DPYD, MTHFR, ABCB1, XRCC1, ERCC1 and GSTP1 on chemotherapy related toxicity in colorectal carcinoma. *Surg Oncol* 2020; 35: 388-398.
181. Nahid NA, Apu MNH, Islam MR, Shabnaz S, Chowdhury SM, Ahmed MU, et al. DPYD*2A and MTHFR C677T predict toxicity and efficacy, respectively, in patients on chemotherapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017; 81: 119-129.
182. Loganayagam A, Hernández MA, Corrigan A, Fairbanks L, Lewis CM, Harper P, et al. Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. *Br J Cancer* 2013; 108: 2505-2515.
183. Largillier R, Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Ciccolini J, Nebbia JF, Ginot A, et al. Pharmacogenetics of capecitabine in advanced breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5496-5502.
184. Amirfallah A, Kocal GC, Unal OU, Ellidokuz H, Oztop I, Basbinar Y. DPYD, TYMS and MTHFR Genes Polymorphism Frequencies in a Series of Turkish Colorectal Cancer Patients. *J Pers Med* 2018; 8: 45.
185. Tang C, Yu S, Jiang H, Li W, Xu X, Cheng X, et al. A Meta-Analysis: Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism in Gastric Cancer Patients Treated with 5-Fu Based Chemotherapy Predicts Serious Hematologic Toxicity but Not Prognosis. *J Cancer* 2018; 9: 1057-1066.
186. Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1365-1369.
187. Zhao Y, Li X, Kong X. MTHFR C677T Polymorphism is Associated with Tumor Response to Preoperative Chemoradiotherapy: A Result Based on Previous Reports. *Med Sci Monit* 2015; 21: 3068-3076.

188. Suh KW, Kim JH, Kim DY, Kim YB, Lee C, Choi S. Which Gene is a Dominant Predictor of Response During FOLFOX Chemotherapy for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer, the MTHFR or XRCC1 Gene? *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1379-1385.
189. Ose J, Botma A, Balavarca Y, Buck K, Scherer D, Habermann N, et al. Pathway analysis of genetic variants in folate-mediated one-carbon metabolism-related genes and survival in a prospectively followed cohort of colorectal cancer patients. *Cancer Med* 2018; 7: 2797-2807.
190. Delgado-Plasencia L, Medina-Arana V, Bravo-Gutiérrez A, Pérez-Palma J, Álvarez-Argüelles H, Salido-Ruiz E, et al. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on colorectal cancer in a population with low genetic variability. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28: 1187-1193.
191. Sarbia M, Stahl M, von Weyhern C, Weirich G, Pühringer Oppermann F. The prognostic significance of genetic polymorphisms (methylenetetrahydrofolate reductase C677T, methionine synthase A2756G, thymidilate synthase tandem repeat polymorphism) in multimodally treated oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94: 203-207.
192. Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 1611-1615.
193. Huang M, Fang W, Lee S, Cheng T, Wang J, Lin S. 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.
194. Wisotzkey JD, Toman J, Bell T, Monk JS, Jones D. MTHFR (C677T) Polymorphism and stage III colon cancer: response to therapy. *Molecular Diagnosis* 1999; 4: 95-99.
195. Boige V, Mendiboure J, Pignon JP, Lorient MA, Castaing M, Barrois M, et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2556-2564.

196. Fraile RJ, Baker LH, Buroker TR, Horwitz J, Vaitkevicius VK. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil administered orally, by rapid intravenous and by slow infusion. *Cancer Res* 1980; 40: 2223-2228.
197. Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform* 2002; 3: 146-153.
198. Jennings BA, Kwok CS, Willis G, Matthews V, Wawruch P, Loke YK. Functional polymorphisms of folate metabolism and response to chemotherapy for colorectal cancer, a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22: 290-304.
199. Pereira TV, Patsopoulos NA, Pereira AC, Krieger JE. Strategies for genetic model specification in the screening of genome-wide meta-analysis signals for further replication, *Int J Epidemiol* 2011; 40: 457-469.
200. Yun H, Lee H, Kim B, Lee J, Lee J, Lee M, et al. Factors affecting KRAS mutation detection in colorectal cancer tissue. *Pathol Res Pract* 2019; 215: 1071-1075.
201. Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 2005; 58: 894-895.
202. Williams C, Pontén F, Moberg C, Söderkvist P, Uhlén M, Pontén J, Sitbon G, Lundeberg J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999; 155: 1467-1471.
203. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229-237.
204. Chionh F, Lau D, Yeung Y, Price T, Tebbutt N. Oral versus intravenous fluoropyrimidines for colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 7: CD008398.