

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BUENOS AIRES – ITBA  
ESCUELA DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

# Diseño integral de un test basado en secuenciación dirigida para guiar el manejo terapéutico del cáncer colorrectal

AUTOR/ES: Ganiewich, Daiana (Leg. 54901)

PROFESOR RESPONSABLE O TUTOR/ES: Dra. Llera, Andrea y Dr. Podhajcer, Osvaldo

TRABAJO FINAL PRESENTADO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOINGENIERO

BUENOS AIRES  
SEGUNDO CUATRIMESTRE, 2017



## RESUMEN / ABSTRACT

**E**l advenimiento de la secuenciación masiva (NGS) ha hecho posible interrogar el genoma en búsqueda de variantes que afecten el desarrollo y el tratamiento del cáncer. El cáncer es una enfermedad que se origina en la acumulación de mutaciones en células, de las cuales algunas son responsables del cambio fenotípico que permite al tumor crecer desmedidamente. En este proyecto nos propusimos diseñar un panel de secuenciación dirigido para detectar mutaciones que son fundamentales para establecer la conducta terapéutica más adecuada en cáncer colorrectal. Para ello integramos en un mismo test las mutaciones de tipo SNP o indels que son más informativas para clasificar al paciente en función de su probable evolución (mutaciones clasificatorias); las mutaciones de ADN de tipo SNP o indels más informativas para determinar qué fármacos serían los de elección para una terapia dirigida en cáncer colorrectal; y los polimorfismos de DPYD de línea germinal que afectan el metabolismo del 5-FU, principal quimioterápico utilizado en cáncer colorrectal. Se analizan todos los pasos requeridos para un servicio de estas características, desde la mejor combinación de marcadores genómicos buscados, hasta su análisis e interpretación así como también un estudio preliminar de costo-efectividad para verificar su factibilidad económica *a priori*.

**S**ince the advent of Next Generation Sequencing (NGS), the analysis of the genome in search of variants affecting the development and treatment of cancer has been possible. Cancer is a pathology originated by the accumulation of mutations in the cell, some of which are responsible for the phenotypic change that enables the tumor to grow inordinately. In this project, we aimed to design a targeted sequencing panel in order to detect mutations that may help selecting the best treatment available for colorectal cancer. To that end, we integrated into one panel the mutations (SNPs or indels) that classify the patients regarding its most likely evolution (classifying mutations); the DNA most informative mutations (SNPs or indels) to determine which drug is more suitable for a targeted therapy in colorectal cancer; and the DPYD germline polymorphisms affecting the metabolism of 5-FU, the main chemotherapy drug used in colorectal cancer. All steps required for a service of this characteristics are addressed, from the best combination of genomic markers to its analysis and interpretation, as well as a preliminary cost-effectiveness study to verify its economic feasibility.



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy sinceramente a todos los que me apoyaron en este largo y hermoso proyecto. En particular a mi tutora y guía en todo este recorrido, la Dra. Andrea Llera. A todo el grupo del laboratorio, Juan S., Marcela M., Eliana C. y Cecilia R. que me acompañaron en todo. Al Dr. Osvaldo Podhajcer por incorporarme a este hermoso grupo. A mis amigos y familia que me apoyaron y confiaron en mí siempre, a mi novio por su cariño y ayuda incondicional. A mi mamá, papá y hermana por ser mi sostén siempre. Muchas gracias a todos.



## PRÓLOGO

La actual tesina es presentada como Proyecto Final de Grado de la carrera de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Se realizó en el marco de la materia Proyecto Final a cargo del MEE. Ing. Norberto Lerendegui y fue presentada su versión final el 20 de Diciembre del 2017.

Esta tesina está enmarcada en un proyecto mayor denominado "Diseño y validación de un panel de biomarcadores genómicos para guiar el manejo terapéutico del cáncer colorrectal" por el cual se recibió una beca del Instituto Nacional del Cáncer. Éste, a su vez, es un subproyecto del protocolo "Desarrollo de Herramientas Genómicas para el Seguimiento y Manejo Terapéutico de Pacientes con Cáncer de Recto en Argentina." en ejecución en el Hospital de Gastroenterología "Dr. Carlos Bonorino Udaondo" desde 2015 y con 62 pacientes reclutados hasta el momento.

Para la realización de esta tesina, se contó con ayuda adicional de diversos profesionales.

Agradecemos a la Dra. Soledad Iseas y al grupo del sector de oncología del Hospital de Gastroenterología C. B. Udaondo por toda la información médica provista, incluyendo protocolos y líneas de tratamientos con sus respectivas drogas, y consideraciones a tomar frente a mutaciones.

Al Dr. Martín Abba del Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata por su colaboración en un ordenamiento metodológico para la realización de un Polygenic Risk Score. A su vez por su ayuda en utilización de R y sus respectivos paquetes.

Agradecemos también a la Dra. Carolina, Jefa de Investigación Clínica del Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, quien brindó el curso de Bioestadística, sumamente relevante para este proyecto, así como la tutoría en la realización del meta-análisis.

Por último, agradecemos al Dr. Santiago Pesci, economista y consultor del Instituto Nacional del Cáncer en el área de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Banco de Drogas Oncológicas por su colaboración en el análisis de costo-beneficio y determinación de estados a considerar para su procesamiento.



## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>XI</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>XIII</b>
<b>I Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1 Cáncer Colorrectal</b>	<b>3</b>
1.1. Características de la patología . . . . .	4
1.2. Inicio y desarrollo del CCR . . . . .	5
1.3. Genética del CCR . . . . .	6
1.3.1. CCR de origen hereditario . . . . .	7
1.3.2. CCR de origen no hereditario . . . . .	8
1.4. Tratamiento del CCR . . . . .	8
1.4.1. Polipectomía . . . . .	10
1.4.2. Cirugía . . . . .	10
1.4.3. Radioterapia . . . . .	10
1.4.4. Quimioterapia . . . . .	10
<b>2 Medicina de Precisión</b>	<b>15</b>
2.1. ¿Qué es la Medicina de Precisión? . . . . .	15
2.2. Tests Genéticos . . . . .	16
2.3. Farmacogenética . . . . .	17
<b>3 Objetivo del trabajo</b>	<b>21</b>
<b>II Genes involucrados en CCR y definición de panel genético</b>	<b>23</b>
<b>4 Selección de Genes y Regiones Genómicas a considerar</b>	<b>25</b>
4.1. Criterios de selección . . . . .	25
4.2. Genes caracterizadores, reporteros de carga y relacionados a estadio del tumor . . . . .	26

## TABLA DE CONTENIDOS

---

4.3. Genes accionables . . . . .	26
4.4. Revisión y categorización . . . . .	28
4.5. Diseño del panel en Ampliseq Designer . . . . .	30
<b>III Polimorfismos de línea germinal asociados a susceptibilidad a 5-FU</b>	<b>31</b>
<b>5 Meta-análisis de SNPs asociados a Farmacogenética</b>	<b>33</b>
5.1. Introducción Teórica de Estadística . . . . .	34
5.2. Meta-análisis . . . . .	35
5.2.1. ¿Qué es un meta-análisis? . . . . .	35
5.2.2. Búsqueda bibliográfica . . . . .	36
5.2.3. Criterios de inclusión y exclusión . . . . .	36
5.2.4. Análisis estadístico . . . . .	37
5.3. Resultados . . . . .	38
5.4. Conclusiones . . . . .	41
<b>IV Análisis de Costo-Efectividad</b>	<b>43</b>
<b>6 Costo-efectividad</b>	<b>45</b>
6.1. Datos requeridos para el cálculo de dosis . . . . .	45
6.2. Regímenes de tratamiento . . . . .	46
6.3. Costos de tratamientos actuales . . . . .	47
6.4. Costos del panel . . . . .	48
6.5. Comparación de costos . . . . .	49
6.5.1. Panel vs No Panel . . . . .	49
6.5.2. Panel vs Gen KRAS y NRAS solos . . . . .	50
6.6. Conclusiones . . . . .	51
<b>V Conclusiones</b>	<b>53</b>
<b>7 Conclusiones finales</b>	<b>55</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>57</b>
<b>A Apéndice del Meta-Análisis</b>	<b>63</b>
A.1. Operador Booleano utilizado en la búsqueda en PubMed . . . . .	63
<b>B Precios de drogas mediante el Método del Banco de Drogas</b>	<b>65</b>

<b>C Costos por Tratamiento</b>	<b>67</b>
C.1. FOLFOX . . . . .	67
C.2. FOLFIRI . . . . .	68
C.3. FOLFOXIRI . . . . .	68



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
1.1. Mortalidad por cáncer en hombres y mujeres según principales sitios tumorales. tasas estandarizadas por edad según población mundial estándar por 100000 habitantes. Argentina, 2014 [2] . . . . .	3
1.2. Anatomía del sistema gastrointestinal[3] . . . . .	4
1.3. Crecimiento del cáncer colorrectal . . . . .	5
1.4. Resumen de las terapias comúnmente utilizadas según la línea de tratamiento . . . . .	9
1.5. Mecanismos de acción de drogas de terapia dirigida [16] . . . . .	11
2.1. Analogía de la evolución de la medicina tradicional a la medicina de precisión. [11] . . . .	15
2.2. Vía de señalización de EGFR [29] . . . . .	18
3.1. Flujo simple del análisis y variables a considerar [3] . . . . .	22
4.1. Frecuencia de mutaciones y sus tratamientos asociados. Adaptado de [50], conferencia ESMO 2017. TBD=A determinar ( <i>to be determined</i> en inglés) . . . . .	28
5.1. Diagrama de flujo de la selección de estudios . . . . .	37
5.2. Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre rs1801158 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza. . . . .	38
5.3. Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre rs3918290 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza. . . . .	38

5.4. Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre rs55886062 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza. . . . .	39
5.5. Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre rs67376798 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza. . . . .	39
5.6. Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre Hap3 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza. . . . .	40
6.1. Costos asociados al escenario de tratamiento sin panel vs con panel . . . . .	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>Página</b>
4.1. Genes analizados para el panel, ordenados según funcionalidad. En celeste genes repetidos en distintas columnas . . . . .	29
C.1. Cantidades requeridas de drogas del tratamiento FOLFOX para hombre y mujer promedio	68
C.2. Cantidades requeridas de drogas del tratamiento FOLFIRI para hombre y mujer promedio	68
C.3. Cantidades requeridas de drogas del tratamiento FOLFOXIRI para hombre y mujer promedio . . . . .	69



## GLOSARIO

**accionable** se refiere a que una acción puede ser tomada por el individuo y/o su médico (por ejemplo, suministrar un fármaco), para prevenir o alterar la progresión de un desorden de origen genético. 25

**BER** La reparación de escisión de base o *base excision repair* (BER) es un sistema reparador del ADN que reconoce cambios químicos específicos a partir del agregado de grupos químicos pequeños generalmente mediante hidrólisis u oxidación por parte de glicosilasas. 6

**clasificación TNM** Sistema de estadificación de cáncer de mayor uso. Se asignan valores numéricos luego de la T según el tamaño y extensión del tumor principal, de la N según si el cáncer alcanzó los ganglios linfáticos cercanos y de la M si es o no metastásico. 6

**cáncer colorrectal** Crecimiento tumoral maligno en el colon o recto. 3

**desequilibrio de ligamento** se refiere a la asociación no aleatoria entre alelos en diferentes ubicaciones genéticas, dentro de una población determinada. 40

**FAP** Síndrome caracterizado por múltiples pólipos (>100) en el colon y recto, desarrollados luego de la primera década de vida, llegando a un 90% la probabilidad de convertirse en CRC a los 45 años. Se origina por mutaciones heterocigotas dominantes en el gen APC. 7

**FOLFIRI** abreviatura de un tipo de quimioterapia combinada que se usa en el tratamiento de cáncer colorrectal. Contiene los medicamento leucovorina cálcica (ácido folínico), fluorouracilo e irinotecan. 46

**FOLFOX** abreviatura de un tipo de quimioterapia combinada que se usa en el tratamiento de cáncer colorrectal. Contiene los medicamento leucovorina cálcica (ácido folínico), fluorouracilo y oxaliplatino. 46

**FOLFOXIRI** abreviatura de un tipo de quimioterapia combinada que se usa en el tratamiento de cáncer colorrectal. Contiene los medicamento leucovorina cálcica (ácido folínico), fluorouracilo, oxaliplatino e irinotecan. 46

**haplotipo** conjunto de variantes del ADN que tienden a ser heredados juntos. 40

**indel** es una contracción de "inserción o deleción" y se refiere a mutaciones genéticas caracterizadas por la inserción o deleción de una cantidad baja de nucleótidos (de 1 a 10 000 pares de bases) en la secuencia de ADN. 18

**línea germinal** Línea celular precursora de los gametos: óvulos y espermatozoides en los organismos que se reproducen sexualmente. Estas células contienen el material genético que se va a pasar a la siguiente generación. Se le llama mutaciones de línea germinal a aquellas presentes en todas las células del organismo, por haber sido heredada de el/los progenitor/es. 7

**Medicina de Precisión** estrategia emergente para el tratamiento y la prevención médica, que tiene en cuenta la variabilidad individual en genes, ambiente y forma de vida. 15

**meta-análisis** se refiere al uso de técnicas estadísticas en una revisión sistemática para integrar los resultados de los estudios incluidos. 35

**MMR** La reparación de desajuste o *mismatch repair* (MMR) es un sistema reparador del ADN que reconoce los errores durante la replicación y recombinación. Reconoce el error comparando la hebra molde con la copia y eliminando la base erróneamente incorporada. 6

**NER** La reparación de excisión de nucleótidos o *nucleotide excision repair* (NER) es un sistema reparador del ADN que reconoce cambios voluminosos en su estructura y de origen diverso. Según el tipo de daño, generalmente ocurren las mutaciones por radiación UV. 6

**NGS** secuenciación masiva en paralelo o *next generation sequencing* (NGS) consiste en obtener la secuencia de ADN deseada a través de tecnologías de alto rendimiento. 16

**OR** la razón de momios u *Odds Ratio* (OR) se define como la probabilidad observarse el *outcome* estando presente el factor de riesgo dividido la probabilidad de no observarse el *outcome* estando presente el factor de riesgo. 35

**PRS** puntaje basado en múltiples variaciones genéticas, con una ponderación adecuada para cada una. Sirve como predictor para la caracterización del individuo, teniendo en cuenta sus variantes genéticas. Para su confección son necesarios los puntajes individuales de cada variante. 35

**RR** el riesgo relativo o *Relative Risk* (RR) se define como el riesgo de observarse el *outcome* estando presente el factor de riesgo dividido el riesgo de no observarse el *outcome* estando presente el factor de riesgo. 35

**tasas estandarizadas por edad** El número total de eventos ocurridos (por ejemplo, muertes) estimados en una población total o de determinado edad, dividido por el total de esa población, luego de haber estratificado los grupos según edad. 3

**WES** Secuenciación del exoma completo o *whole exome sequencing* (WES). 17

**WGS** Secuenciación del genoma completo o *whole genome sequencing* (WGS). 17

**wild type** se refiere al genotipo en el cual el alelo en determinada ubicación genética es el estándar o "normal", en contraste al no estándar o "mutado". 46



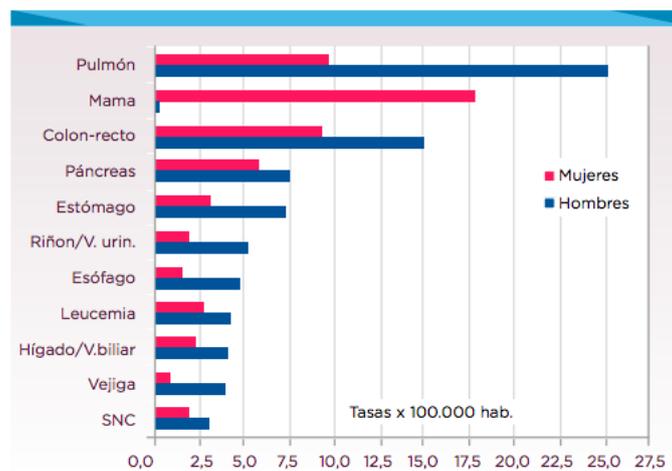
## **Parte I**

# **Introducción**



## CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal es uno de los tipos de tumores malignos más frecuentes, lo que lo convierte en un problema de salud pública a nivel mundial [1]. Según datos epidemiológicos, en Argentina es el segundo cáncer con mayor mortalidad en hombres y el cuarto en mujeres (luego del de mama, útero y pulmón respectivamente).



Fuente: SIVER / INC en base a datos de la DEIS. Ministerio de Salud de la Nación. Argentina, 2016.

Figura 1.1: Mortalidad por cáncer en hombres y mujeres según principales sitios tumorales. tasas estandarizadas por edad según población mundial estándar por 100000 habitantes. Argentina, 2014 [2]

En el país se producen alrededor de 13.500 nuevos casos y aproximadamente 7.300 muertes por año, y esto representa el 12% del total de muertes por tumores malignos. Aunque existen acciones concretas de prevención y detección temprana para este tipo de tumor, la muerte por cáncer colorrectal aún no ha descendido y por lo tanto, se requiere de diagnósticos cada vez más certeros y tratamientos de mayor eficacia.

### 1.1. Características de la patología

El cáncer es una patología definida por la división y crecimiento descontrolado de células anormales. La forma más común de clasificar el cáncer es la que toma en cuenta el lugar en el que se da este crecimiento. En particular, el cáncer colorrectal (CCR o CRC en inglés) se caracteriza por un crecimiento tumoral en el colon o el recto.

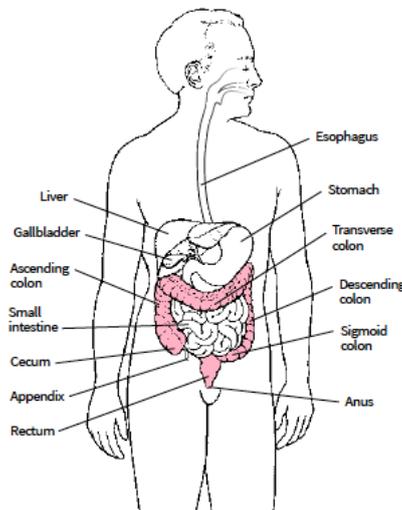


Figura 1.2: Anatomía del sistema gastrointestinal[3]

El colon y recto combinados conforman el denominado intestino grueso. Aunque en su forma de desarrollo el cáncer de colon y recto son similares, existen algunas diferencias en el patrón de mutaciones según la ubicación anatómica del tumor. Esto permite establecer la hipótesis de que dichas diferencias afectan las características de la enfermedad: por ejemplo, los tumores en el colon proximal son mucho más comunes en personas mayores que en pacientes jóvenes y en mujeres más que en hombres. Estos pacientes tienen tasas de supervivencia más bajas que pacientes con tumores en el colon distal o recto [3]. Sin embargo, dado que a fines de análisis genético, diagnóstico y tratamiento las similitudes son innegables, se suelen tratar como un tipo de cáncer único, el cáncer colorrectal.

## 1.2. Inicio y desarrollo del CCR

Generalmente, el cáncer colorrectal comienza con el crecimiento no canceroso de células denominado pólipo, el cual se desarrolla en la capa interna del colon o recto y crece lentamente, a lo largo de un período de entre 10 y 20 años. El pólipo (pediculado o sésil) puede definirse por sus características histológicas. Aunque la mayoría de los pólipos no progresan a cáncer, un 10% lo hacen y son considerados pre-cancerosos [4]. Se consideran pólipos adenomatosos o adenomas cuando resultan de masas similares a glándulas que se desarrollan en la membrana mucosa.

Como se puede observar en la figura 1.3, en el estadio 0, benigno, el pólipo adenomatoso está apoyado en la mucosa, sin penetración. Con el paso del tiempo y la acumulación de mutaciones somáticas, el adenoma comienza a infiltrar la pared de la mucosa (estadio 1) y se convierte en adenocarcinoma. En el contexto del CCR se entiende al pólipo maligno como aquel que tiene células tumorales que invaden la submucosa (pT1) [5]. Los adenocarcinomas comprenden el 96% de los CCRs.

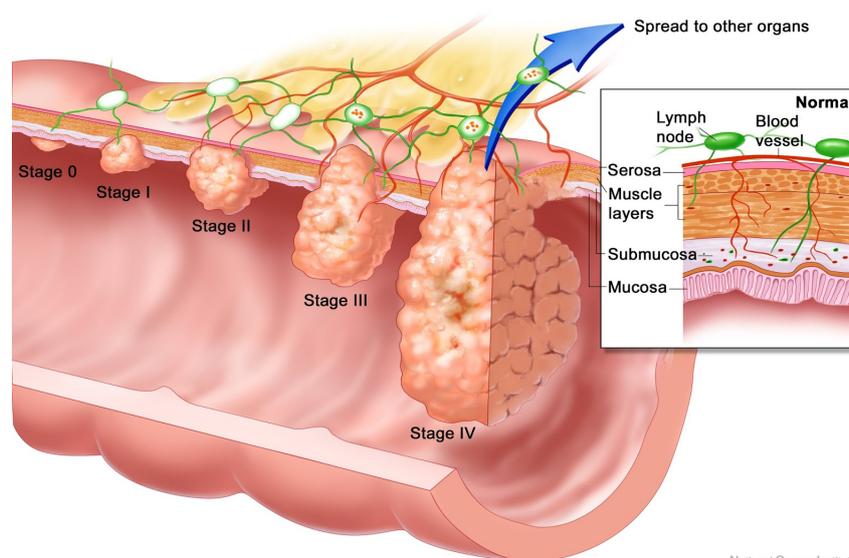


Figura 1.3: Crecimiento del cáncer colorrectal

Éste puede seguir creciendo, penetrar aún más en la pared y alcanzar los vasos sanguíneos y nodos linfáticos. Si continúa su desarrollo a través del torrente sanguíneo podrá extenderse a otros órganos, generando lo que se conoce como cáncer metastásico o metástasis.

El grado de extensión del cáncer al momento del diagnóstico se define como el estadio. La clasificación TNM de estadios considera tres factores a tener en cuenta [5]:

- T: Extensión del tumor primario:
  - T0: Sin evidencia de tumor primario
  - Tis: Tumor *in situ*
  - T1: Tumor invade la submucosa
  - T2: Tumor invade la capa muscular
  - T3: Tumor invade los tejidos pericólicas
  - T4: Tumor invade otros órganos
- N: La ausencia o presencia y la extensión de metástasis regional en los nodos linfáticos. Se le asignan los valores de N0 (sin metástasis en ganglios), N1 (metástasis en 1-3 ganglios regionales), N2 (metástasis en 4 o más ganglios regionales)
- M: La ausencia o presencia de metástasis distante. Tiene dos categorías distintas, M0 (ausencia de metástasis a distancia) y M1 (presencia de metástasis a distancia).

Tradicionalmente esta clasificación es la principal guía que permite a los médicos determinar el tratamiento, considerando que según el estadio, la estrategia terapéutica a encarar será distinta.

### 1.3. Genética del CCR

En los últimos años los proyectos de caracterización genómica de los tumores han demostrado que aún dentro de un mismo tipo tumoral, el cáncer es molecularmente heterogéneo. Un tumor se genera por una acumulación de mutaciones, que se originan como consecuencia de factores genéticos predisponentes sumados a la acción del ambiente y la calidad de vida. Por esta razón, es claro que un tumor va a tener características particulares en cada individuo enfermo en función de su historia de vida [6]. En consecuencia, la aparición de adenomas y su transición a carcinomas está condicionado por factores genéticos y efectos del medioambiente.

A grandes rasgos, los principales afectados por mutaciones carcinogénicas son los **oncogenes** y los **genes supresores de tumores**. Los oncogenes son aquellos que promueven el crecimiento, la división y la supervivencia de las células. Los genes supresores de tumores, en cambio, son los que controlan la división celular y la muerte celular programada[7].

A partir del tipo de aberraciones genéticas que portan los tumores colorrectales, se pueden establecer dos grandes grupos de tumores: los que presentan **inestabilidad cromosómica**, que se caracteriza por grandes rearrreglos cromosómicos (deleciones o inserciones) y los que se caracterizan por **mutaciones en genes del sistema reparador del ADN** (como los *base excision repair* (BER), *nucleotide excision repair* (NER) y *mismatch repair* (MMR)) [5].

Es importante también destacar que hay mutaciones que pueden ser hereditarias y predisponer al cáncer familiar. En estos casos, las mismas provienen de los progenitores y se transmiten a través de las células sexuales (germinales) en el momento de la formación del cigoto; por ello las mutaciones se afirma que se encuentran en **línea germinal** y estarán presentes en todas las células del organismo de un individuo, incluso las sexuales, por lo que serán a su vez transmitidas a la descendencia. Las demás mutaciones oncogénicas son adquiridas, no son heredables por no estar presentes en línea germinal y se denominan **glsmutsom**. Ambos tipos de mutaciones definen dos grandes grupos dentro del CCR.

### 1.3.1. CCR de origen hereditario

El 25% de los CCR son del tipo hereditario[5]. Éste se genera a partir de mutaciones germinales que el paciente posee desde su nacimiento. Existen hasta el momento dos grandes tipos de CCR hereditario:

**Poliposo:** Incluye el FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), glsafap (*Atenuated Familial Adenomatous Polyposis*), MAP (*MYH-Associated Polyposis*) y glspjs (*Peutz-Jeghers Syndrome*).

- FAP y AFAP: El FAP es un síndrome caracterizado por múltiples pólipos (>100) en el colon y recto, desarrollados luego de la primera década de vida, llegando a un 90% la probabilidad de convertirse en CRC a los 45 años. El AFAP se caracteriza por una menor cantidad de pólipos que el FAP y una probabilidad del 69% de convertirse en canceroso a los 80 años. Su origen es el mismo, y se debe a mutaciones heterocigotas dominantes en el gen APC, que es un gen supresor de tumores. Dichas mutaciones representan el primero de los eventos de inestabilidad cromosomal de la vía del tumor colorrectal(generatora, por ejemplo, de las mutaciones somáticas de la familia RAS) [8].
- MAP: El MAP es un síndrome fenotípicamente similar al AFAP. Los pacientes con MAP suelen desarrollar menos adenomas que los FAP a mayor edad y con un menor riesgo de CRC (35%-63%). Este síndrome se debe a una mutación en el gen MYH (o MUTYH), una glicosilasa involucrada en el mecanismo de control y reparación de cortes de bases (al momento de la división celular), que repara uno de los daños oxidativos (daños químicos) más comunes. Si bien hay efectos poco claros en mutaciones heterocigotas, es fundamentalmente un síndrome de carácter recesivo, por lo que en su mayoría se observan mutaciones en forma bialélica.[8]
- PJS: El síndrome de PJS es un desorden hereditario dominante, caracterizado por la formación de máculas melanocíticas en los labios, región perioral y bucal y múltiples pólipos gastrointestinales (adenomatosos y no adenomatosos). Posee entre un 38% y 66% de desarrollar CCR, aunque también está relacionado a otros cánceres, llegando a tener una probabilidad del 93% de generar cualquier tipo de cáncer. Mutaciones en

el gen supresor de tumores STK11 son las responsables de este síndrome, y genera inestabilidad cromosomal.[8]

**No Poliposo:** El principal síndrome asociado a este tipo de CCR es el Síndrome de Lynch. Es causado por variantes patogénicas germinales en los genes involucrados en la reparación del ADN que corrigen errores de replicación de la polimerasa, llamados MMR (*mismatch repair*). Entre los más comunes se encuentran el MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 y EPCAM. Al tener la capacidad de reparar el ADN disminuída, se acumulan mutaciones durante las sucesivas replications celulares; éstas generalmente se dan en los microsatélites (repeticiones cortas de nucleótidos que se repiten de decenas a cientos de veces en el genoma de modo estable)[5]. A este tipo de anomalías se las llama inestabilidad de microsatélites (IMS) y existe en la mayoría de los pacientes con CCR no poliposo.

### 1.3.2. CCR de origen no hereditario

Como ya se explicó, el cáncer no hereditario se debe a mutaciones que aparecen espontáneamente en un grupo de células adultas (denominadas comúnmente somáticas para diferenciarlas de las germinales). Al igual que en el caso de las poliposis, el gen APC está comúnmente mutado en este tipo de CCR (80% de los casos) y es responsable de la inestabilidad cromosómica que genera la activación de la familia RAS de oncogenes. Existen tres genes de la familia RAS en humanos: KRAS, NRAS y HRAS. El gen KRAS es el más frecuentemente mutado, y existen mutaciones en hasta un 50% de los cánceres colorrectales esporádicos. Este gen también tiene una gran importancia terapéutica ya que condiciona la respuesta a fármacos que inhiben el EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico).

Existen casos de CCR esporádico con fenotipo de inestabilidad de microsatélites, aunque solo corresponde a un 15% de los casos[5].

También existen mutaciones que son comunes a cualquier tipo de cáncer, como el del gen supresor de tumores p53, que está mutado en aproximadamente el 60% de los CCR.[9].

## 1.4. Tratamiento del CCR

El tratamiento a realizar en los pacientes depende del estadio en el que se encuentre tal como fue mencionado en la sección 1.2, y pueden diferenciarse entre sí según el momento en el que se recibe. Llamaremos primera línea al tratamiento recibido por primera vez, segunda línea al recibido luego de recurrencias sucesivas se pasa a tercera línea, cuarta línea, etc. Los tratamientos a utilizar en cada línea pueden ser distintos y la decisión de cuál suministrar queda a criterio del médico. En la Figura 1.4 se detalla el análisis de estados posibles durante la toma de decisión del tratamiento de CCR metastático.

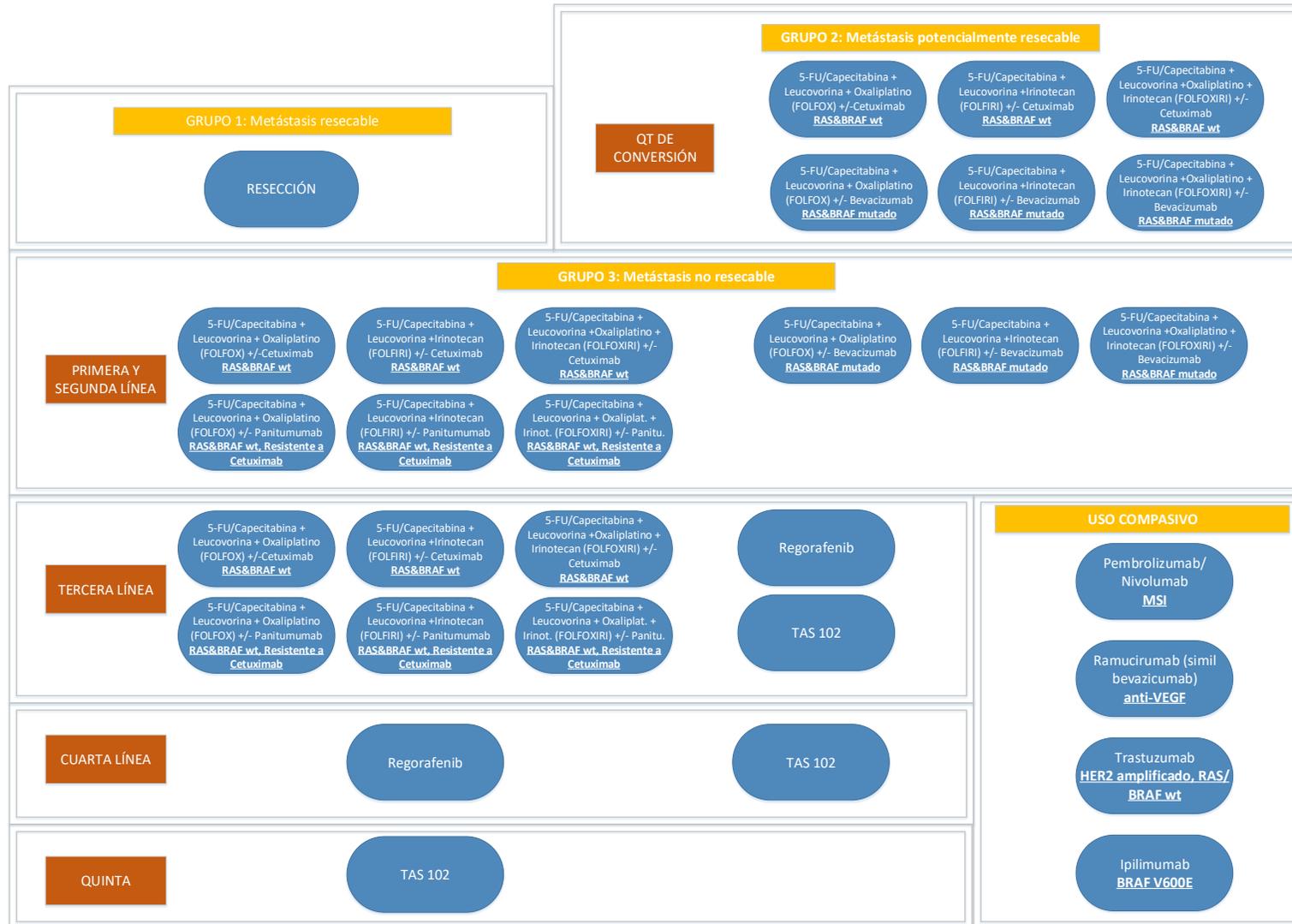


Figura 1.4: Resumen de las terapias comúnmente utilizadas según la línea de tratamiento

Sin embargo, suelen establecerse prioridades en función de los costos y efectos de cada una de las combinaciones de fármacos y, en los últimos años, en función de marcadores genómicos asociados al éxito del tratamiento.

### **1.4.1. Polipectomía**

Se define como pólipo maligno a aquel que alcanzó la extensión T1, sin compromiso ganglionar [5]. En estos casos el tratamiento es una polipectomía, que consiste en una endoscopia en la que se remueven los pólipos que se observan.[10]. Luego de esta intervención, todos los pacientes deben chequearse por videocolonoscopia.

### **1.4.2. Cirugía**

Aquellos cánceres con una extensión mayor a T1, con o sin compromiso ganglionar y sin metástasis a distancia deben someterse a una colectomía. Éste consiste en la resección en bloque del tumor y de sus zonas cercanas, a fin de extraer todo tejido sospechoso de estar invadido [5].

### **1.4.3. Radioterapia**

La radioterapia suele darse en combinación con la quimioterapia en el caso de que el tumor sea potencialmente resecable. La radioterapia consiste en la irradiación del paciente en la zona tumoral, a fin de remover o reducir el tumor. Se utiliza en combinación con la quimioterapia adyuvante que es concurrente y ayuda y potencia la acción de la radioterapia [5].

### **1.4.4. Quimioterapia**

La quimioterapia es el tratamiento con agentes citotóxicos o biológicos y dependiendo del estadio del CCR, puede tener distintas funciones.

La primera consiste en reducir el tamaño del tumor en aquellos cánceres en principio no resecables, pero que potencialmente podrían serlo si alcanzan un menor tamaño.

Una segunda función es prevenir la reaparición del cáncer luego de la cirugía.

Una tercera función consiste en prolongar la expectativa y calidad de vida en pacientes con cánceres no resecables y/o metastásicos, en cuyo caso se trata de un cuidado paliativo.

Hasta 1990 aproximadamente, la única terapia con drogas para tratar cáncer era la quimioterapia con agentes citotóxicos [11].

Sin embargo, con el aumento en la información y comprensión de las vías de señalización involucradas en la carcinogénesis es que surgen nuevas alternativas cuyo objetivo es atacar específicamente estas vías, con la esperanza de obtener una mejor respuesta y mayor afinidad por las células cancerígenas que las drogas citotóxicas tradicionales [12]. A estos tratamientos se los conoce como “terapia dirigida”. Otra alternativa a la quimioterapia tradicional, es la conocida como “inmunoterapia”, que nace en paralelo con la anterior. Esta terapia busca ayudar al sistema inmune

del paciente a reconocer y destruir las células cancerígenas de manera más efectiva, a través de promover la generación de neoantígenos.

Las drogas citotóxicas más utilizadas en CCR son:

**5-Fluorouracilo (5-FU):** Es un análogo del uracilo, que bloquea a la enzima timidina sintasa, encargada de sintetizar la timidina trifosfato, una de los cuatro nucleótidos necesarios para la síntesis de ADN. Por lo tanto, en ausencia de este compuesto, se interrumpe la formación de ADN en la célula, generando su muerte [13].

**Oxaliplatino:** Como todos los compuestos platinos puede insertarse en el ADN y generan *cross-linking* intra hebra y entre hebras de ADN, lo cual imposibilita la reparación y/o síntesis del ADN [14].

**Irinotecan:** Su metabolito activo, el SN-38 es un inhibidor de la Topoisomerasa I, lo que genera una interrupción de la replicación y transcripción del ADN [15].

Los agentes de terapia dirigida se pueden observar en la figura 1.4, y son explicados en mayor detalle a continuación.

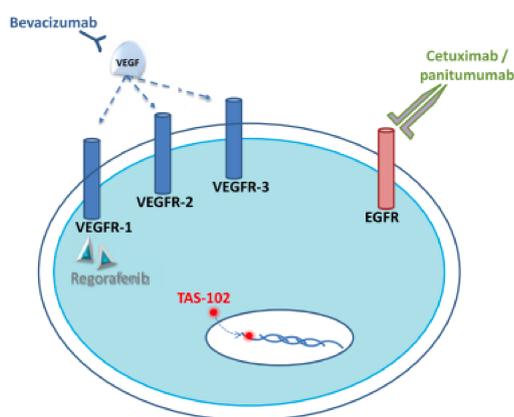


Figura 1.5: Mecanismos de acción de drogas de terapia dirigida [16]

**Cetuximab:** es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al dominio extracelular del EGFR. El EGFR tiene un rol clave en la vía que regula la proliferación celular, la apoptosis y la angiogénesis y está íntimamente implicado en el crecimiento y progresión de tumores. Al unirse el cetuximab, se bloquea el sitio de unión de su ligando natural, evitando así la transducción de la señal aguas abajo [12].

Este agente es uno de los más efectivos en pacientes con CCR, observándose una supervivencia libre de enfermedad de entre 8.4 y 9.9 meses para primera línea cuando se lo suma a quimioterapia tradicional [16]. Sin embargo, este tratamiento no surte efecto frente a mutaciones en los genes RAS (KRAS, NRAS, HRAS) y frente a algunas mutaciones del gen BRAF (ver sección 2.3).

Panitumumab: el mecanismo de acción y sus limitaciones son iguales a las del cetuximab y se suele utilizar en los casos de resistencia al cetuximab con genes RAS no mutados [17].

Bevacizumab/Ramucirumab: son anticuerpos monoclonales que inhiben las funciones del VEGF, un factor de crecimiento vascular involucrado en la angiogénesis. Al no poder desarrollarse nuevos vasos sanguíneos, las células tumorales no reciben los nutrientes suficientes para su crecimiento y desarrollo, y eventualmente mueren [18]. El más comúnmente utilizado es el bevacizumab, mientras que el ramucirumab fue recientemente aprobado para cáncer metastásico [19].

Regorafenib: es una pequeña molécula inhibidora de multi-quinasas, y puede bloquear la actividad de varias proteínas quinasa distintas relacionadas a la angiogénesis (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, entre otros). A su vez, se une a la proteína BRAF, interrumpiendo la señalización aguas abajo de la vía de MAPK, responsable de estimular el crecimiento celular [16].

TAS 102: Es una combinación de trifluridina y tipiracilo, indicada para pacientes con CCR metastásico que ya recibieron tratamiento con drogas citotóxicas, cetuximab/panitumumab y/o bevacizumab. La trifluridina es un análogo de nucleósido que es incorporado al ADN durante la síntesis. Seguidamente se une covalentemente al sitio activo de la timidilato quinasa, inhibiéndola. El tipiracilo previene la degradación de la trifluridina [16].

Trastuzumab: Es un anticuerpo monoclonal que se une al HER-2, el cual se sobre expresa en algunas células cancerosas y estimula su proliferación. Esta sobre expresión se da únicamente en los casos en que el gen HER-2 está amplificado, es decir que hay más de una copia del gen en el genoma, generando un aumento de la expresión de HER-2. Por lo tanto esta droga se da a pacientes que muestren esta mutación [20]. Este tratamiento no está aprobado todavía en Argentina para CCR, pero se permite su uso compasivo, es decir, con un permiso.

A diferencia de otros países, en Argentina no hay drogas de inmunoterapia para CCR aprobadas. Sin embargo, sí se permite su uso compasivo. Dentro de éstas se encuentran:

Pembrolizumab/nivolumab: Son anticuerpos monoclonales capaces de bloquear el receptor PD-1 (receptor de muerte programada) de las células T. Al unirse al PD-1 sus ligandos naturales, PD-L1 y PD-L2, se promueve la muerte celular y la liberación de citoquinas generando una inhibición del control del tumor por parte de las células T. Estos anticuerpos al unirse al PD-1, buscan restaurar el funcionamiento normal de la vía [21]. Se utiliza este tratamiento en pacientes con inestabilidad de microsatélites (MSI), en quienes se observó su beneficio.

Ipilimumab: Es un anticuerpo monoclonal que se une al antígeno CTLA-4, que se encuentra en la superficie de las células T y regula negativamente la activación de estos linfocitos. Al unirse el ipilimumab, esta regulación negativa no se da, permitiendo la activación del linfocito [22].

La mutación del gen BRAF V600E condiciona su rendimiento, siendo positivo cuando la mutación está presente. Por lo tanto, este tratamiento está indicado para pacientes con BRAF V600E [23].



## MEDICINA DE PRECISIÓN

## 2.1. ¿Qué es la Medicina de Precisión?

La medicina tradicional se basa en tratamientos que, se espera, beneficien a la mayoría de la población, y se fundamenta en la respuesta del paciente “tipo”. Si bien el beneficio neto de dicho paciente tipo es real, no puede negarse la existencia de variabilidad de factores que llevan a diversas respuestas frente a terapias administradas. Estas respuestas pueden ser positivas, pueden no tener efecto o pueden ser perjudiciales para los pacientes. Entre los motivos de esta variabilidad se encuentran diferencias entre la patofisiología de la enfermedad, exposiciones ambientales, factores sociales y de comportamiento y factores genéticos.[24]

Según la Iniciativa de Medicina de Precisión del NIH, la medicina de precisión puede entenderse como *“una estrategia emergente para el tratamiento y la prevención, que tiene en cuenta la variabilidad individual en genes, ambiente y forma de vida”*[25]. Se opone al paradigma tradicional de que un tratamiento sirve para todos y desafía el concepto de "paciente promedio", considerando la variabilidad entre individuos.

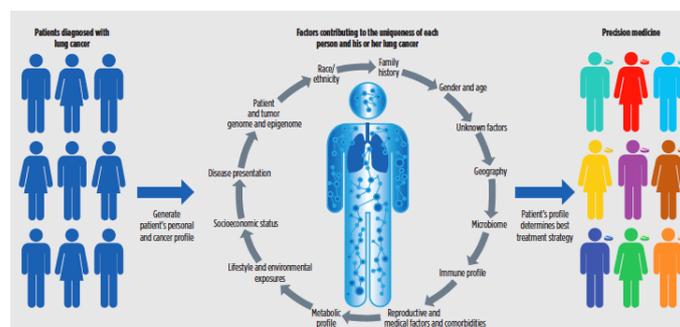


Figura 2.1: Analogía de la evolución de la medicina tradicional a la medicina de precisión. [11]

Según esta iniciativa, la medicina de precisión busca redefinir nuestro entendimiento actual sobre la aparición y progresión de enfermedades, la respuesta a tratamientos y los resultados finales. A partir de la medición de factores contribuyentes, como los moleculares, ambientales y de comportamiento, se logran diagnósticos más certeros, estrategias de prevención más útiles y tratamientos más eficientes. La combinación del conocimiento de estos factores con una población altamente comprometida con la individualización de su tratamiento es el comienzo de una nueva era en el cuidado de la salud. [24]

Desde ya hace muchos años existe el concepto conocido como “medicina personalizada”, el cual es comúnmente confundido con el de “medicina de precisión”. Sin embargo, no son sinónimos ya que esta última no desarrolla un tratamiento específico y único para cada individuo, sino que busca estratificar según ciertos factores determinados (como los mencionados anteriormente).

Si bien el término “medicina de precisión” es relativamente nuevo, es una estrategia utilizada hace muchos años. Por ejemplo, en las transfusiones sanguíneas, los pacientes no reciben sangre de un donante aleatorio, sino según el grupo sanguíneo. Esto no es más que considerar factores moleculares del paciente para realizar un tratamiento determinado, distinto del que otro podría recibir.

De igual modo, la farmacogenética, es decir, el análisis de la respuesta a fármacos según la genética individual, es una estrategia de la medicina de precisión. Sin embargo, hoy en día los tratamientos en los que se utiliza esta estrategia aún son limitados y por lo tanto serían necesarias investigaciones que promuevan la estratificación entre pacientes en pos de diagnósticos cada vez más certeros y de mejores resultados.

## 2.2. Tests Genéticos

A partir de la iniciativa del Proyecto de Genoma Humano, la necesidad de mejores tecnologías para el análisis de datos genéticos se hizo visible. Sin embargo, no fue hasta mediados de los años 2000 que se pudo encontrar una alternativa eficiente (en tiempos y costos) para la secuenciación del genoma humano: la secuenciación masiva en paralelo (*next-generation sequencing* o NGS en inglés).

Estas tecnologías fueron evolucionando hasta el día de hoy, haciendo posible la secuenciación del genoma completo y la incorporación de estas tecnologías en los análisis de la práctica clínica [26].

Este último aspecto es de suma importancia ya que, de la mano de la medicina de precisión, el diagnóstico y tratamiento de patologías como el cáncer ha mejorado significativamente. Hoy en día en ciertos casos es posible realizar el análisis genético de un tumor y en base a sus características, determinar el tratamiento idóneo.

Sin embargo, no todas las tecnologías pueden resultar costo-efectivas para la práctica clínica. Las secuenciaciones de genoma completo (WGS) o del exoma completo (WES) siguen siendo muy costosas y el análisis bioinformático posterior hace que sea muy compleja su implementación en los laboratorios de diagnóstico molecular.

Los paneles de secuenciación dirigida son una alternativa viable frente a esta problemática. Éstos consisten en una selección de genes diseñada con un fin específico (en este caso, el manejo terapéutico del CCR), y sólo esas regiones del genoma son secuenciadas. Al tratarse de una cantidad considerablemente más baja de genes comparada con un WES o WGS, los costos se reducen y el procesamiento posterior es mucho más simple. De esta manera, los laboratorios de diagnóstico molecular sí pueden valerse de los beneficios de la secuenciación masiva [27].

Para llevar a cabo un análisis clínico mediante NGS se siguen los siguientes pasos:

1. Preparación de la muestra: se purifican, amplifican y marcan las muestras para poder identificarlas en los pasos posteriores (*barcodes* moleculares).
2. Amplificación clonal: se busca obtener miles de copias idénticas de los fragmentos de ADN en una superficie definida, con el fin de que la señal sea lo suficientemente fuerte y pueda diferenciarse del ruido de fondo. Entre las técnicas más comunes se encuentran la PCR de emulsión y la amplificación de estado sólido.
3. Secuenciación: en esta etapa se obtiene finalmente la secuencia de ADN de la muestra. El método más utilizado hoy en día es la secuenciación por síntesis, en la que una señal (lumínica o el cambio de pH) es característica de cada nucleótido. Por lo tanto, se cuenta con el fragmento de ADN y en presencia de la polimerasa, se unen uno a uno los nucleótidos y se mide la señal característica.
4. Procesamiento y análisis de variantes: Se entiende como variante a una alteración de un nucleótido de la secuencia más común de ADN. Este término puede usarse para describir alteraciones benignas, patogénicas o de efecto desconocido. Por lo tanto, los resultados brutos obtenidos del secuenciador son procesados y deben ser analizadas las variantes encontradas que sean relevantes para el diagnóstico.

### 2.3. Farmacogenética

El advenimiento de la secuenciación masiva [26] ha hecho posible interrogar al genoma en búsqueda de variantes que afecten el desarrollo y el tratamiento del cáncer. Valiéndose de estas estrategias, se han logrado avances respecto a diferenciar entre pacientes con CCR según las alteraciones genéticas presentes y, a la vez, seleccionar el tratamiento disponible más adecuado según cada perfil.

Estamos entonces en el ámbito de la glsfarmacogenética que es justamente la ciencia que estudia la respuesta a drogas según el perfil genético, a fin de desarrollar drogas y dosis efectivas y seguras [28].

También en este ámbito podemos distinguir entre efectos debidos a mutaciones presentes en línea germinal y efectos propios del linaje somático (tumor).

Un ejemplo de mutación somática que afecta al tratamiento es la que aparece en la familia de genes RAS. Como producto de las múltiples alteraciones genéticas, los tumores suelen tener activada constitutivamente la vía del EGFR para sostener su crecimiento descontrolado. El cetuximab es un anticuerpo capaz de bloquear la vía del EGFR y por ello es efectivo como tratamiento antitumoral.

Sin embargo, mutaciones en la familia de genes RAS (los cuales están aguas abajo del EGFR) generan una activación constitutiva de los mismos e invalidan el efecto del cetuximab como tratamiento.

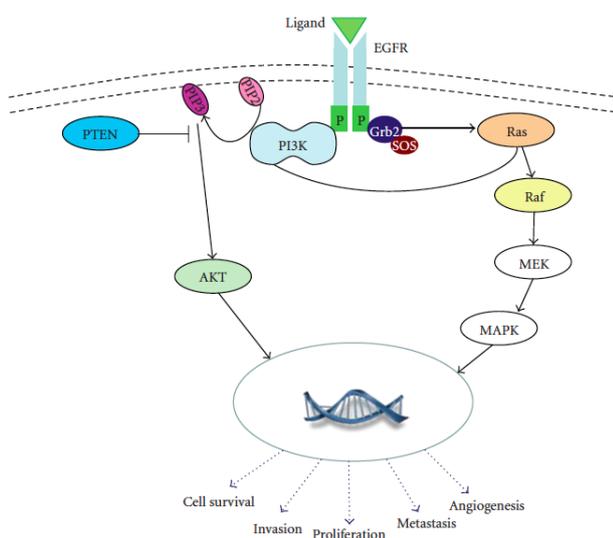


Figura 2.2: Vía de señalización de EGFR [29]

Por otro lado, existen variantes en línea germinal que a nivel del hígado generan una deficiente metabolización de drogas, lo que se ve reflejado con efectos adversos a dicha droga. Este tipo de mutaciones son en su mayoría polimorfismos de nucleótido único o Single Nucleotide Polimorphisms (SNPs) en inglés, que se caracterizan por tener un solo nucleótido alterado. Estos SNPs no necesariamente tienen un efecto patogénico, sino que se observa la problemática del paciente (una metabolización deficiente) recién cuando se le administra la droga. También pueden presentarse mutaciones del tipo indel con el mismo efecto, aunque éstas son menos comunes.

Por ejemplo, la proteína DPYD está encargada del metabolismo del 5-FU. El SNP rs55886062 genera una DPYD deficiente, por lo que el paciente no puede metabolizar correctamente la droga y sufre efectos adversos como diarrea, náuseas y neutropenia, entre otros. [30]. Se puede observar

que claramente la toxicidad a 5-FU no se va a percibir hasta tanto el paciente no se exponga a esta droga.



## OBJETIVO DEL TRABAJO

En los capítulos anteriores hemos dejado en evidencia que hoy en día la toma de decisión terapéutica en el cáncer colorrectal es todavía poco efectiva, en el sentido de que muchos pacientes no son beneficiados por una terapia en particular, especialmente en el estadio metastático. En particular, la asignación de tratamientos quimioterápicos tradicionales se realiza sin biomarcadores que puedan señalar cuáles pacientes se beneficiarán más y cuáles, por el contrario, sufrirán efectos adversos de importancia.

En el contexto del nuevo paradigma de medicina de precisión, es necesario contar con biomarcadores moleculares, los cuales en muchos casos se basan en la detección de mutaciones que determinan si un tumor será susceptible o no a determinados fármacos de tipo dirigido. Sin embargo, en muchos casos lo que está disponible en la clínica son las mutaciones más frecuentemente asociadas al éxito del tratamiento, aún cuando todavía hay muchas variantes de significado incierto que pueden ser descubiertas mediante la secuenciación de genes completos.

Recientemente se ha incorporado también el concepto de que las mutaciones que afectan genes asociados a la reparación de ADN pueden afectar no sólo a los tratamientos dirigidos sino también a las quimioterapias tradicionales e incluso a las inmunoterapias.

Toda esta evidencia apunta a que un panel de secuenciación de genes puede dar múltiples informaciones que ayuden al médico a tomar una decisión terapéutica más precisa. Sin embargo, es imprescindible evaluar cuáles genes serían los más informativos en el contexto del equipamiento disponible en laboratorios clínicos, y que sea suficientemente económico como para ser de aceptación rápida por los sistemas de salud.

Por todo ello, el objetivo general de este proyecto es diseñar un panel de biomarcadores costo-efectivo basado en herramientas genómicas, para su aplicación en la determinación de conducta terapéutica en cáncer colorrectal. El paradigma en el que nos basamos es el resumido en la Figura

### 3.1.

Por lo tanto, nos proponemos diseñar un panel de secuenciación dirigida con validez clínica con el fin de relevar las siguientes características genómicas relacionadas con el manejo terapéutico del cáncer colorrectal:

1. Las mutaciones somáticas de tipo SNP o indels que son más informativas para clasificar al paciente en función de su probable evolución (mutaciones clasificatorias).
2. Las mutaciones de ADN de tipo SNP o indels más informativas para determinar qué fármacos serían los de elección para los distintos tipos de líneas que se aplican en cáncer colorrectal metastático.
3. Los polimorfismos de línea germinal que afectan el metabolismo del 5-FU (la droga quimioterápica más frecuentemente utilizada en el tratamiento del cáncer colorrectal) y están asociados con mayor o menor susceptibilidad a dicho tratamiento. Para este trabajo de tesis, nos enfocaremos en calcular las medidas de efecto de cada uno de los polimorfismos asociados a susceptibilidad para más adelante incorporarlas a un puntaje de riesgo poligénico que indique cuál es la probabilidad combinada y ponderada de que este tratamiento tenga efectos secundarios en el paciente.

En función del diseño combinado generado de este panel, realizaremos un análisis de costo-efectividad para corroborar si es aplicable a un escenario clínico local, tanto público como privado. Para esta tesis nos limitaremos a realizar una prueba de concepto que nos indique la conveniencia o no de realizar un análisis más detallado del costo efectividad del producto combinado.



Figura 3.1: Flujo simple del análisis y variables a considerar [3]

## **Parte II**

# **Genes involucrados en CCR y definición de panel genético**



## SELECCIÓN DE GENES Y REGIONES GENÓMICAS A CONSIDERAR

La lista de genes iniciales para el análisis descrito en esta sección fue obtenida a partir de trabajo previo del laboratorio basado en el análisis de los paneles comerciales disponibles (QIAGEN Panel, GeneDx Colorrectal Cancer Panel, Mayo Clinic Hereditary Colon Cancer Multigene Panel), genes comúnmente mutados en la base de datos del TGCA, base de datos PharmGKB para SNPs asociados a farmacogenómica [31] y bibliografía en general.

### 4.1. Criterios de selección

Cada uno de los genes de la lista inicial fue estudiado en profundidad a partir de la evidencia en la literatura y las bases de datos que asocian las mutaciones con su utilidad clínica. Luego los genes fueron ponderados según una escala *ad hoc*, a fin de obtener aquellos realmente relevantes para diagnóstico del tipo de CCR y/o relevancia farmacogénica. El criterio positivo de selección e inclusión en el panel adoptado considera únicamente a los genes con ponderación 4 y 5.

- Ponderación 5: genes que caracterizan al CRC (i.e. FAP, JPS, Lynch, etc) o genes reporteros de carga tumoral o relacionados a estadio del tumor.
- Ponderación 4: genes accionables (es decir, que se asocian con un tratamiento específico de CCR) y que no caen en ponderación 5 o genes de mutaciones menos probables. Se subdividieron en 4A y 4B:
  - 4A: Genes más comúnmente mutados en cáncer colorrectal
  - 4B: Genes con menor probabilidad de encontrarse mutados
- Ponderación 3: Genes sobre los que hay poca información o se desconocen sus mecanismos de acción pero están investigados específicamente para CRC.

- Ponderación 2: Genes sobre los que hay poca información o se desconocen sus mecanismos de acción y no están investigados específicamente para CRC (aunque pueden guardar relación).
- Ponderación 1: Genes no informativos para el panel en cuestión (se incluyen aquí los genes regulados por epigenética)

#### 4.2. Genes caracterizadores, reporteros de carga y relacionados a estadio del tumor

Gen	Ponderación	Información
APC	5	Diagnóstico de AFAP (Atenuated Familial Adenomatous Polyposis), accionable, Supresor de tumores [32]
BAX	5	Baja expresión asociado a cánceres tardíos y a localización en recto [33] [34]
BLM	5	Diagnóstico de Síndrome de Bloom [35] [36] [37]
BMPR1A	5	Diagnóstico de Síndrome de Poliposis Juvenil [38]
EPCAM	5	Diagnóstico de Síndrome de Lynch [39]
MLH1	5	Diagnóstico de Síndrome de Lynch [38] [39]
MSH2	5	Diagnóstico de Síndrome de Lynch [38] [39]
MSH3	5	Diagnóstico de Síndrome de Lynch [38] [39]
MSH6	5	Diagnóstico de Síndrome de Lynch [38] [39]
MUTYH	5	Diagnóstico de AFAP asociado a MUTYH [38]
NTHL1	5	Gen recientemente asociado a CRC, relacionado <i>abase-excision repair</i> (BER) [40]
PMS2	5	Diagnóstico de Síndrome de Lynch [38] [39]
PMS2	5	Diagnóstico de Síndrome de Lynch [38] [39]
POLE	5	Oligopoliposis asociada a <i>proofreading</i> de la polimerasa [38]
POLD1	5	Oligopoliposis asociada a <i>proofreading</i> de la polimerasa [38]
SMAD4	5	Síndrome de Poliposis Juvenil. Bajas expresión se relacionan a menor supervivencia [38] [41].
STK11	5	Síndrome de Poliposis Juvenil, Baja expresión se relaciona con menor supervivencia [38] [41]

#### 4.3. Genes accionables

A continuación, se listan todos los genes frecuentemente mutados en cánceres (no únicamente CCR), que promueven su desarrollo y para los cuales existe una terapia específica.

#### 4.3. GENES ACCIONABLES

Gen	Información
AKT, PIK3CA, PTEN	Forman parte de la vía PI3K/AKT involucrada en los mecanismos de supervivencia de la célula. Esta vía que se encuentra aguas abajo en la vía del EGFR, con lo cual mutaciones en esa vía pueden generar que el bloqueo del EGFR por agentes biológicos no inhiba el crecimiento tumoral [42].
ATM, BRCA1, BRCA2, PALB2	Sus mutaciones no permiten la reparación de los <i>double-strand breaks</i> del ADN y a su vez desestabilizan las enzimas PARP, involucradas en la reparación de <i>single-strand breaks</i> . Dado que los compuestos de tratamiento con platinos promueven la generación de errores, en pacientes BRCA y/o PALB2 mutado, actúa sinérgicamente, obteniéndose mejores resultados. Para cáncer de ovario, la terapia con olaparib, agente dirigido inhibidor de PARP, ya fue aprobada[43].
BRAF	Se encuentran aguas abajo en la vía del EGFR, y dependiendo de la mutación puede no surtir efecto los agentes biológicos bloqueadores de EGFR. La mutación BRAF V600E posee un quimioterápico específico, el vemurafenib. A su vez, esta mutación condiciona la eficiencia del ipilimumab [22].
CDK4	Regulador de la progresión del ciclo celular. Existe un inhibidor específico, el palbociclib que bloquea dicha progresión llevando a la muerte celular [44].
ERBB1	Es un gen codificante para un receptor de proteínas tirosinas quinasas, el EGFR, que es el <i>target</i> molecular de drogas de terapia dirigidas comúnmente utilizadas en CCR, cetuximab y panitumumab [12].
ERBB2	es gen codificante para un receptor de proteínas tirosinas quinasas, el HER-2, que suele hallarse amplificado. Existen terapias dirigidas anti-HER2, entre ellas el trastuzumab.
KRAS, NRAS, HRAS	Se encuentran aguas abajo en la vía del EGFR, y al estar mutados se expresan constitutivamente, generando un <i>by-pass</i> en la vía. Por lo tanto el bloqueo del EGFR por agentes biológicos (cetuximab) no inhibe el crecimiento tumoral [45].
MET	Es un oncogen que codifica para un receptor de tirosina-quinasa que al unirse a u ligando, resulta en la fosforilación del receptor y la activación aguas abajo de distintas vías de señalización entre ellas PI3K, AKT y RAS. La alteración más común de este gen es su amplificación y para ello existe la terapia dirigida con crizotinib, aunque no está aún determinado su beneficio en CCR [46].
POLE y genes de MSI	Las mutaciones de POLE y la MSI generan una mayor tasa de error duante la replicación del ADN y por ente aumenta la cantidad de neoantígenos presentes en el tumor. Esto hace propicia la activación de la respuesta inmune y actúa sinérgicamente con inhibidores de PD-1/PD-L1. La terapia dirigida con pembrolizumab/nivolumab buscan potenciar la función del sistema inmune (ver sección 1.4.4).
RET	Es una proteína tirosina-quinasa, con función de oncogen. Si bien no existe actualmente un inhibidor específico, hay inhibidores en fases de estudio, así como inhibidores de tirosinas-quinasas con resultados modestos [47].
SRC	Oncogen codificante para una proteína tirosina-quinasa, encargada de fosforilar otras proteínas. Su activación actúa en distintas vías, promoviendo la supervivencia, angiogénesis, proliferación e invasión celular. Existe un <i>target</i> específico, el dasatinib, actualmente aprobado para leucemia mieloide crónica [48].
ROS1	El oncogen ROS1 codifica para un receptor de tirosina-quinasa, que se activa por rearrreglo cromosomal en distintos cánceres (más estudiado para cáncer de pulmón). Los rearrreglos generan una fusión entre el dominio de tirosina-quinasa con uno de los doce ligandos, resultando en una activación constitutiva que conduce a la transformación celular. Existen inhibidores específicos de ROS1, entre ellos el crizotinib [49]

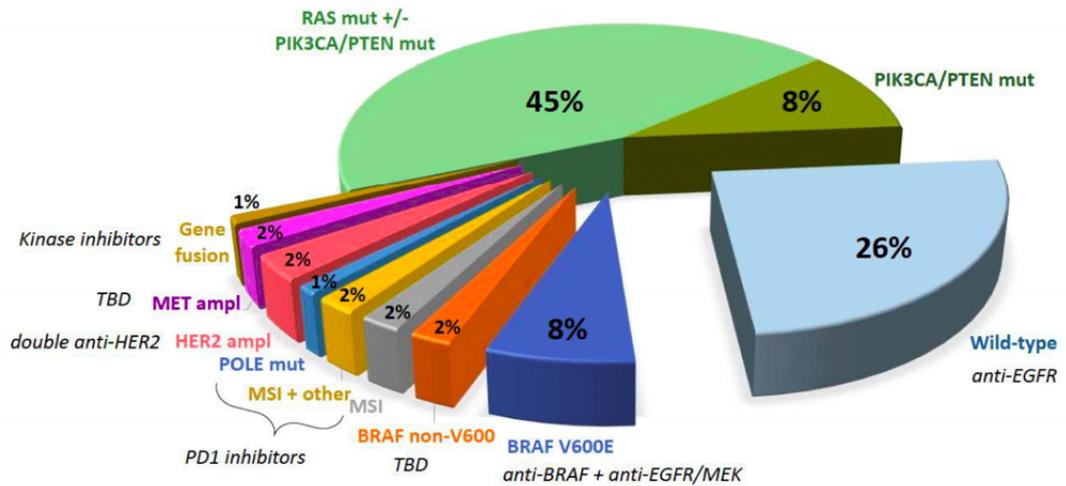


Figura 4.1: Frecuencia de mutaciones y sus tratamientos asociados. Adaptado de [50], conferencia ESMO 2017. TBD=A determinar (*to be determined* en inglés)

#### 4.4. Revisión y categorización

El siguiente paso consistió en la revisión de la información obtenida previamente con todo el grupo de investigación. Dada la experiencia en el área y el complemento de análisis de bibliografía específica adicional se logró obtener la tabla final que se presenta a continuación [43, 50–55].

Es de suma importancia realizar correctamente la separación de los genes implicados según su influencia. A su vez, dado que hay genes que caen dentro de varias categorías, se ven repetidos en varias columnas. La visualización de todos los genes, nos permite tener una mejor perspectiva cualitativa y considerar su inclusión a la hora de armar el panel. El segundo aspecto a considerar sería la frecuencia de mutación normal en CCR.

Genes marcadores de tumor	Genes diagnósticos	Genes relacionados a sensibilidad a quimioterapia	Genes de déficit de reparación	Genes accionables (radioterapia)	Genes accionables (terapia dirigida)	Genes accionables (inmunoterapia)
APC	APC	DPYD	BRCA1	XRCC1	EGFR	MSH2
TGFBR2	MSH2	TYMS	BRCA2	LIG3	BRAF	POLE
TP53	MSH3	ERCC1	PALB2	ATM	KRAS	PRKDC
BRAF	MSH6	UGT1A1	ATM	ATM	PIK3CA	POLD1
KRAS	MLH1		RAD51C	RAD51 (varios)	NRAS	RAD51C
PIK3CA	MLH3		BLM	PARP	ERBB2	LIG3
	PMS2		RAD51C	ATR		RAD17
BAX	EPCAM		GSTP1	WEE	MTOR	
FBXW7	POLE		RAD51B	LIG4	AKT1	
SMAD4	SMAD4		RAD51D	FGFR4	ATM	
	BLM		ATR		CDK4	
	NTHL1		BAP1		CDK4	
	MUTYH		CDK11		CDK4	
	POLD1		CHEK1		CDK4	
	POLQ		CHEK2		CDK4	
	BMPR1A		FANCA		CDK4	
	GREM1		FANCC			
	PTEN		FANCD2			
	PMS1		FANCE			
	STK11		FANCF			
			MRE11A			
			WRN			
			BRIP1			
			NBN			
			CDH1			
			SMARCA4			
			TP53			

Cuadro 4.1: Genes analizados para el panel, ordenados según funcionalidad. En celeste genes repetidos en distintas columnas

## 4.5. Diseño del panel en Ampliseq Designer

A partir de los datos anteriores (función de los genes y frecuencia de mutación) es que se pudo llegar al siguiente panel de 56 genes.

AKT1	APC	ATM	BAX	BLM	BMPR1A	BRAF
BRCA1	BRCA2	CDK4	CYP2D6	DPYD	EGFR	EPCAM
ERBB2	ERCC1	ERCC2	FCGR2A	FGFR4	GSTP1	IL13
KIT	KRAS	MET	MLH1	MLH3	MSH2	MSH3
MSH6	MTHFR	MTOR	MUTYH	NFKB1	NOS2	NRAS
NTHL1	PALB2	PIK3CA	PIK3R1	PMS1	PMS2	POLD1
POLE	PTEN	PTGS2	RET	ROS1	SMAD4	SOD2
SRC	STK11	TGFBR2	TP53	TYMS	UGT1A1	XRCC1

La empresa Thermo Fisher Scientific, a través de su plataforma Ion Ampliseq Designer permite el diseño de paneles genéticos de forma *online*. Mediante este servicio se puede obtener información variada como el largo del gen, porcentaje de cobertura teórica del gen (qué porcentaje del gen efectivamente es leído), el largo del panel en kb (kilo bases), cantidad de amplicones, porcentaje de cobertura del gen al ser probado en laboratorio, genes disponibles para armado directo del panel y genes que requieren ser hechos a medida, entre otros.

A partir de esta información se obtienen los datos siguientes:

- Genes no disponibles para panel directo: IL13, TMYS, NTHL1, BAX
- Largo del panel: 263.65 kb
- Amplicones: 1400

En conclusión, los genes anteriormente mencionados son los propuestos para el panel genético para el manejo terapéutico del cáncer colorrectal y cubren las condiciones requeridas para los objetivos a), b) y c).

A éstos se les suma los SNPs de DPYD asociados a farmacogenética (ver capítulo 4) , conformando el panel completo.

Asimismo éstos fueron los considerados para el análisis de costo-efectividad explicado más adelante.

## **Parte III**

# **Polimorfismos de línea germinal asociados a susceptibilidad a 5-FU**



## META-ANÁLISIS DE SNPs ASOCIADOS A FARMACOGENÉTICA

Los efectos adversos asociados a farmacogenética están relacionados en su mayoría a SNPs, y sus consecuencias comprometen el funcionamiento normal del organismo en la detoxificación de drogas, en mayor o menor medida.

En los estudios de análisis de dichos efectos adversos se busca encontrar si existe correlación entre la aparición de una variante SNP y un efecto deletéreo. En general, a partir de un grupo de pacientes, se les realiza una genotipación para determinar si poseen o no el SNP (factor de riesgo) y se observa la aparición de efectos adversos (*outcome* de interés). De esta manera, se distinguen cuatro grupos:

- Pacientes con el SNP de interés y efectos adversos
- Pacientes sin el SNP de interés y efectos adversos
- Pacientes con el SNP de interés y sin efectos adversos
- Pacientes sin el SNP de interés y sin efectos adversos

A partir de la información anterior, se logra construir la siguiente tabla de contingencia:

		Outcome		
		Con Efectos Adversos	Sin Efectos Adversos	Total
Factor de Riesgo	Con SNP	a	b	a+b
	Sin SNP	c	d	c+d
	Total	a+b	b+d	N

Se definió para este trabajo el factor de riesgo como la presencia de SNPs de DPYD y el *outcome* como los efectos adversos al 5-FU.

La tabla de contingencia es luego analizada para ver si existe una correlación estadísticamente significativa entre la aparición de efectos adversos y la presencia o ausencia de una o más variantes SNP.

Hoy en día es numerosa la evidencia a favor y en contra del efecto de determinados SNPs en la aparición de efectos adversos de drogas, y es conveniente entonces realizar un meta análisis de la información publicada para dirimir la información contradictoria. Existe una metodología específica a seguir para realizar de forma objetiva este meta análisis, el cual constituye una parte fundamental de esta tesis. En el presente capítulo se explicarán los métodos utilizados para dicho meta análisis, junto con la tabla final obtenida.

## 5.1. Introducción Teórica de Estadística

Al aplicar estadística inferencial y tests estadísticos para determinar un *p-value* lo que concluimos es la probabilidad de obtener los datos recolectados en este estudio dado que la hipótesis de igualdad (hipótesis nula) sea cierta, estableciendo generalmente el valor de corte en 0.05.

Es decir, si el *p-value* es menor a 0.05 podemos decir que se rechaza la hipótesis de igualdad y se acepta que el grupo con cierto factor de riesgo es significativamente diferente del grupo de personas sin éste. Sin embargo, el *p-value* no indica el grado de diferencia, simplemente aporta una probabilidad de que lo sean.

Por ejemplo, personas que posean el SNP rs3918290 del gen DPYD tienen mayor probabilidad de desarrollar efectos adversos al 5-FU, con un *p-value* que asegura que esto es así. Pero ¿cuánto mayores son los efectos adversos en los pacientes que poseen dicho SNP frente a los que no lo poseen?

Considerando lo anterior, se deben incorporar en el informe también resultados sobre **medidas de efecto**, es decir, asumiendo que el factor de riesgo logra diferenciar significativamente a los distintos grupos, determinar cuánto varía el grado del efecto.

Hay varias medidas de efecto, pero entre las más comunes se encuentran la razón de momios u *Odds Ratio* (OR) en inglés y el riesgo relativo o *Relative Risk* (RR) en inglés. Las ecuaciones que los definen son las siguientes (considerando la tabla de contingencias anterior):

$$OR : \frac{(a/b)}{(c/d)}$$

$$RR : \frac{(a/a + b)}{(c/c + d)}$$

Dado que nuestro objetivo a futuro es poder desarrollar un puntaje de riesgo poligénico (PRS), necesitamos que por cada SNP asociado a efectos adversos haya un puntaje (*score*) individual asociado. Por lo tanto, consideramos que las medidas de efecto son el objeto estadístico que se corresponde con nuestro propósito.

Sin embargo, si bien mucha de la bibliografía sobre el tema en cuestión incluye ya alguna de estas medidas de efecto, otros no lo hacen y muestran solamente la cantidad de pacientes por grupo (a,b,c y d).

A su vez, cabe señalar que la medida de efecto de un estudio puntual no tiene por qué ser la misma que la de otro (aunque no deberían diferir sustancialmente).

Por último, si solo se consideraran los estudios que informan medidas de efecto, la media de todas esas medidas no sería un estimador fiable, ya que no considera ponderación por p-value o tamaño muestral.

Por lo tanto cabe preguntarse, ¿cuál es el método correcto para definir un único valor de medida de efecto para cada SNP? La respuesta es un meta-análisis.

## 5.2. Meta-análisis

### 5.2.1. ¿Qué es un meta-análisis?

El glosario de Cochrane [56] define un meta-análisis como:

*“El uso de técnicas estadísticas en una revisión sistemática para integrar los resultados de los estudios incluidos [...]”*

De esta manera, a partir de la información recolectada de distintos estudios se puede llegar a una conclusión final de interés.

En nuestro caso, el meta-análisis apunta a la búsqueda bibliográfica de las cohortes que refieran efectos adversos asociados a la terapia con 5-FU, la recolección de los datos de incidencia de

variantes en el gen DPYD asociadas a dichos efectos adversos, y su posterior integración en un único valor robusto de OR que nos permita luego incluirlo en un PRS. Éste será incorporado al análisis de datos provenientes del panel de secuenciación de manera de orientar al médico sobre la probabilidad de que los pacientes con uno o más polimorfismos en el gen DPYD puedan sufrir efectos adversos.

### 5.2.2. Búsqueda bibliográfica

La búsqueda de estudios sobre efectos adversos a 5-FU relacionado a SNPs de DPYD se realizó utilizando operadores booleanos en PubMed. Se limitó la búsqueda a estudios en humanos correspondientes a los últimos 10 años. A su vez, dado que nuestro objetivo final es llegar a una medida de efecto general a partir de datos crudos, es necesario que los datos sean de estudios primarios y no estén repetidos. Por lo tanto, se excluyeron *reviews*, meta-análisis y reportes de caso. El booleano de búsqueda utilizado puede observarse en el Anexo A.

### 5.2.3. Criterios de inclusión y exclusión

Como criterios de inclusión, se estableció que se utilizarían aquellos trabajos que:

- Reportan que el *outcome* de interés es efectos adversos a fluoropirimidinas
- Reportan el criterio de clasificación de toxicidad
- Reportan equilibrio de Hardy-Weinberg (para evitar estudios en poblaciones que puedan tener algún sesgo genético)
- Reportan edad y sexo
- Reportan las cantidades por grupo (mutados y no mutados, con *outcome* y sin *outcome*) que permitan el armado de la tabla de contingencia
- Reportan variantes que estuvieran analizadas en más de dos estudios

Si alguna de la información anterior no se podía obtener del *paper*, entonces no se incluía para nuestro meta-análisis. El proceso primario de selección de papers fue según el criterio de si cumplían o no el *outcome* de interés, a partir de la lectura del *abstract*. Luego, con aquellos que lo cumplían, se realizó una lectura del *paper* completo para chequear los restantes criterios de inclusión. En la figura 5.1 se puede observar el proceso de selección de estudios completo.

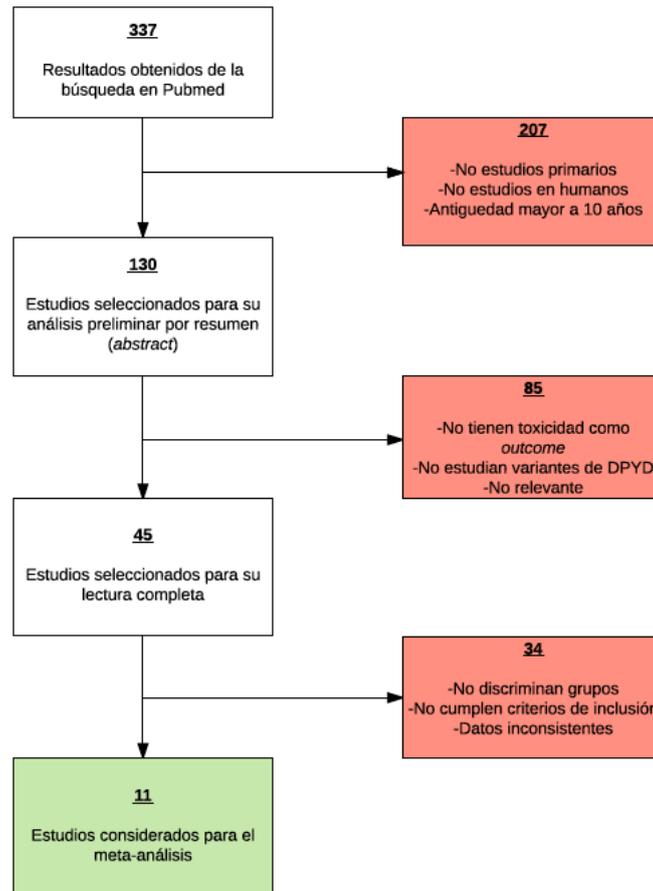


Figura 5.1: Diagrama de flujo de la selección de estudios

#### 5.2.4. Análisis estadístico

Todo el procesamiento estadístico fue realizado en R (version 3.4.2). El meta-análisis estadístico consistió en obtener un OR final a partir de los distintos estudios, a partir del método DerSimonian-Laird de efectos aleatorios [57]. Se aplicó una corrección de continuidad de 0.5 en toda la tabla en aquellos casos en que una celda fuese cero [58]. A su vez se midió el  $I^2$  como una medida de heterogeneidad entre estudios.

### 5.3. Resultados

A continuación se muestran los gráficos para cada uno de ellas:

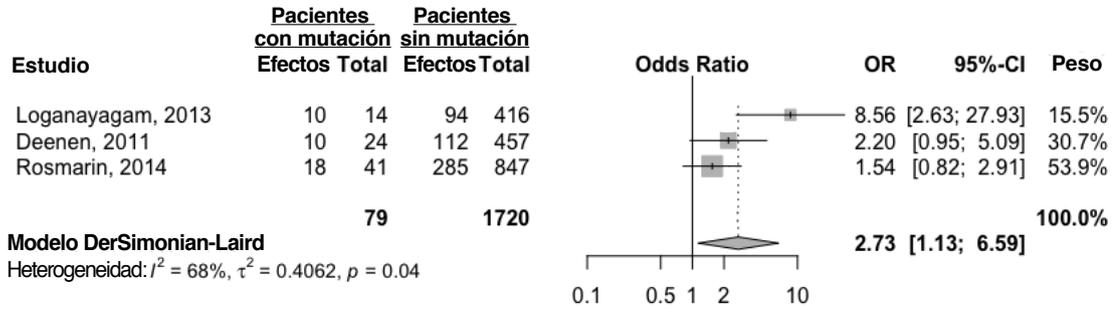


Figura 5.2: Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre rs1801158 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza.

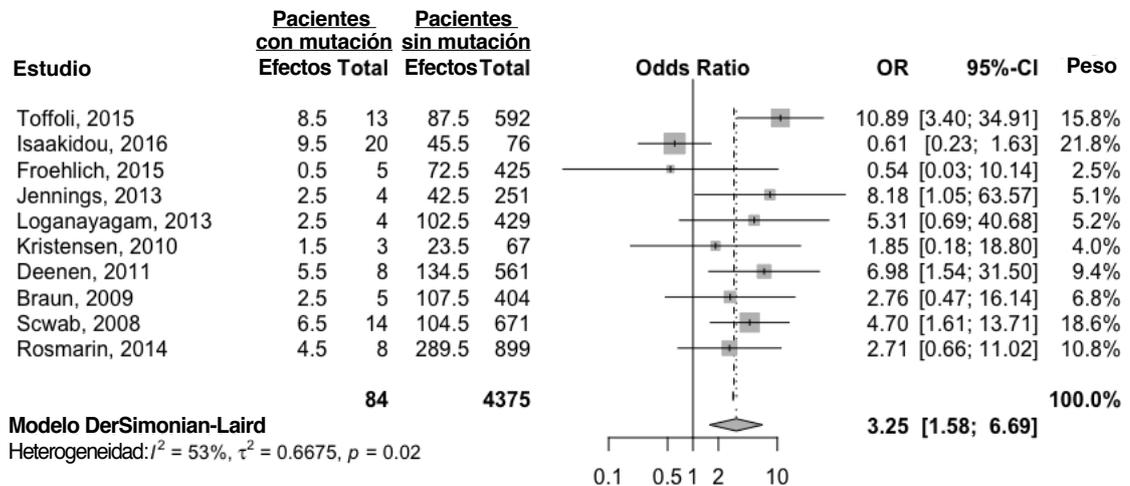


Figura 5.3: Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre rs3918290 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza.

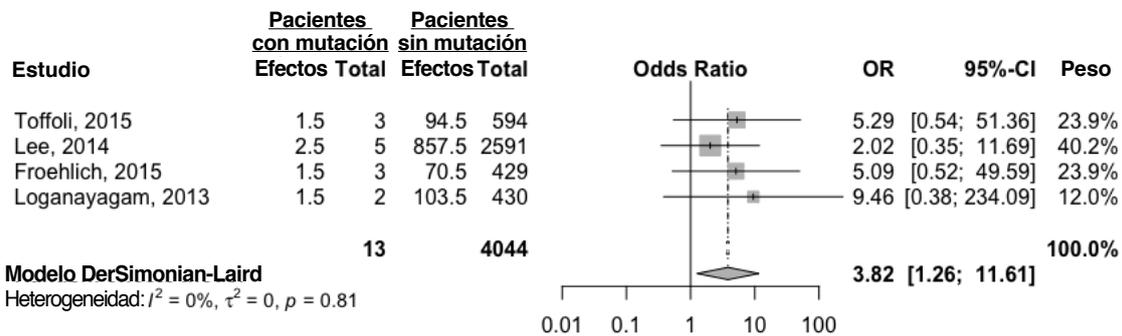


Figura 5.4: Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre rs55886062 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza.

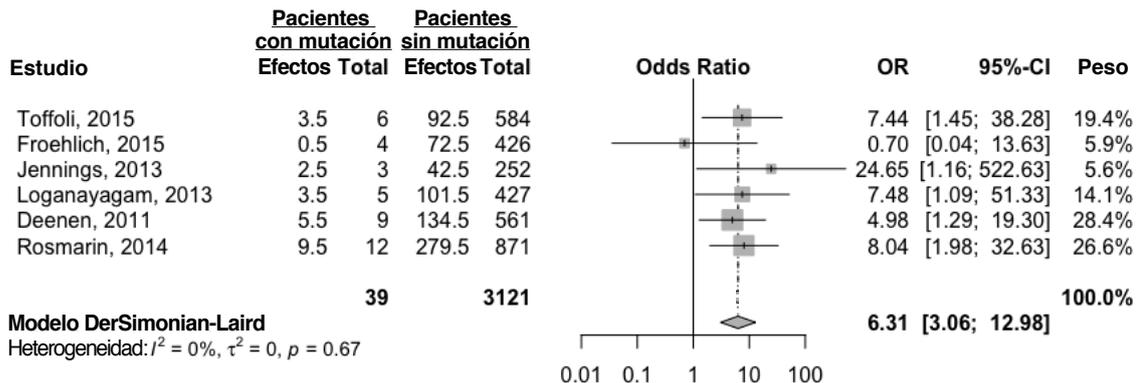


Figura 5.5: Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre rs67376798 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza.

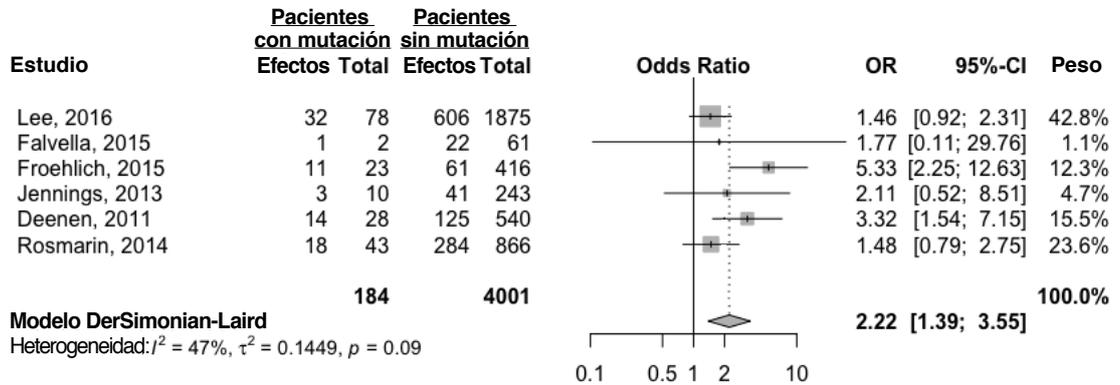


Figura 5.6: Meta-análisis de los estudios investigando la asociación entre Hap3 y efectos adversos a 5-FU. La línea continua vertical indica el 1, por encima del cual hay efectos exacerbados y por debajo efectos mitigantes. La línea punteada vertical indica la media del modelo de DerSimonian-Laird. El tamaño de los cuadrados está relacionado al tamaño del estudio (peso). Las líneas hacia los costados de los cuadrados indican el intervalo de confianza.

Se puede observar que las variantes rs1801158 y rs3918290 están significativamente asociadas a efectos adversos a 5-FU. A pesar de que se obtuvo una heterogeneidad mayor a 50% a partir del test  $I^2$ , este valor puede obviarse dado que el resultado final es significativo.

Entre los casos no significativos, podemos observar el Hap3 (un haplotipo conformado por las variantes rs56038477 y rs75017182 que se encuentran en un 100% de desequilibrio de ligamento [59]). Si bien el p-value es mayor a 0.05, no está muy lejano del umbral de significancia y se puede observar una heterogeneidad plausible (menor a 50%). Por lo tanto el resultado final es aceptable.

Por último, las variantes rs67376798 y rs55886062 no fueron significativamente asociadas a efectos adversos a 5-FU. El principal motivo son los bajos tamaños muestrales, específicamente sobre la cantidad de pacientes con la mutación.

Sin embargo, se observa que existe una tendencia, dado que todos los estudios (exceptuando Froehlich, 2015) y el OR final se encuentran a la derecha del 1 y a su vez, el 1 no se encuentra comprendido en el intervalo de confianza. Para obtener una estadística significativa se requerirá de más estudios sobre estas variantes, por lo tanto, si bien estos resultados son provisionales, podrían considerarse los más pertinentes hasta el momento.

## 5.4. Conclusiones

De este análisis se desprende que los polimorfismos mencionados, analizados en un total de entre 1700 y 4900 pacientes, tienen ORs que justifican un riesgo mayor de sufrir efectos adversos cuando los mismos están presentes en el genoma del individuo. El hecho de que algunos OR no muestren una significancia estadística suficiente no lo consideramos un impedimento para el posterior análisis de PRS dado que el mismo considerará en su ponderación el p-value del meta-análisis para cada variante.

Por ello, las variantes significativamente asociadas, así como el Hap3 formarán parte del PRS que se pretende construir en el futuro. Éstos se combinarán con otros polimorfismos que serán analizados del mismo modo, pero considerando el efecto en el metabolismo del irinotecan y del oxaliplatino.

Las variantes no significativamente asociadas serán evaluadas posteriormente con análisis más exhaustivos, a fin de determinar si resultan o no idóneos para su incorporación al PRS.



## **Parte IV**

# **Análisis de Costo-Efectividad**



## COSTO-EFECTIVIDAD

**E**n este capítulo se expondrá un análisis sobre los costos de tratamiento del CCR metastásico. Se compararán los costos en los que se incurren actualmente con los costos que derivarían con el uso del panel genético propuesto. Los resultados se expresan en pesos argentinos y son en base a precios de la última licitación del Banco de Drogas de la Provincia de Buenos Aires[60] y a cálculos idóneos indicados por el economista especialista Santiago Pesci.

### 6.1. Datos requeridos para el cálculo de dosis

El Área de Superficie Corporal (*Body-Surface Area* o BSA) es un parámetro considerado para determinar la dosis de algunos quimioterápicos. Como primer paso para determinar el costo asociado al tratamiento, es necesario saber la cantidad de medicamento suministrado a los pacientes. Para este análisis se considerarán parámetros normales, asumiendo que dentro de una muestra de pacientes lo suficientemente grande, los valores son cercanos a la media de la distribución normal (por el teorema de los grandes números).

Según la fórmula de Mosteller [61], el BSA puede calcularse como:

$$BSA(m^2) = \sqrt{\frac{Altura(cm)}{Peso(kg)}}$$

Según resultados preliminares del Primer Estudio Antropométrico Nacional en Argentina llevado a cabo por el INTI, los valores promedios de peso y altura son:

- Mujeres: 60,8 kg y 160,6 cm\*
- Hombres: 74,4 kg y 174,0 cm\*

*\*Aclaración: no se informan intervalos de confianza ni errores.*

Por lo tanto, se considera un BSA promedio de  $1.63\text{m}^2$  para mujeres y de  $1.53\text{m}^2$  para hombres. A su vez, es un dato relevante es que la incidencia del CCR en hombres es mayor que en mujeres, 58% y 42% respectivamente.

## 6.2. Regímenes de tratamiento

Dado que el panel está pensado con principal aplicación en poblaciones de pacientes con CCR metastásico, se obtuvieron los datos de regímenes de quimioterapia para este estadio. Estas dosis son, en principio, las mismas para su aplicación en cualquiera de las líneas que se considere adecuada. A continuación se detallan distintas combinaciones factibles, con duración de 3 meses:

- FOLFOX: Oxaliplatino  $85\text{ mg/m}^2$  por IV + leucovorina  $400\text{ mg/m}^2$  por IV, 120 minutos en día 1. 5-FU bolo de  $400\text{ mg/m}^2$  por IV en día 1, luego  $1200\text{ mg/m}^2$  dos veces por día durante dos días de infusión. Repetir cada dos semanas.
- FOLFIRI: Irinotecan  $180\text{ mg/m}^2$  por IV durante 30-90 minutos + leucovorina  $400\text{ mg/m}^2$  por IV (infundida para igualar la duración de la infusión de irinotecan) en día 1. 5-FU bolo de  $400\text{ mg/m}^2$  por IV en día 1, luego  $1200\text{ mg/m}^2$  dos veces por día durante dos días de infusión. Repetir cada dos semanas.
- FOLFOXIRI: Irinotecan  $165\text{ mg/m}^2$  por IV durante 60 minutos, luego oxaliplatino  $85\text{ mg/m}^2$  por IV + leucovorina  $200\text{ mg/m}^2$  por IV 120 minutos (concurrente con el oxaliplatino). Luego 5-FU  $800\text{ mg/m}^2$  dos veces por día durante dos días de infusión. Repetir cada dos semanas.

A su vez, estos tratamientos se realizan en conjunto con agentes biológicos adicionales. Entre ellos, el más eficiente es el cetuximab, y el ideal para complementar con los anteriores aunque es efectivo únicamente para tumores del tipo KRAS *wild type*. Ninguno de los tratamientos descriptos previamente modifican su dosis por su agregado, y se suministran en todos los casos del siguiente modo:

- Bevacizumab:  $5\text{ mg/kg}$  por IV durante 30-90 minutos en día 1. Repetir cada 14 días.
- Cetuximab:  $400\text{ mg/m}^2$  durante 120 minutos en día 1, luego  $250\text{ mg/m}^2$  semanalmente
- Panitumumab:  $6\text{ mg/kg}$  por IV durante 60 minutos en día 1. Repetir cada 14 días.

### 6.3. COSTOS DE TRATAMIENTOS ACTUALES

Las siguientes drogas suelen suministrarse solas en 3ra o 4ta línea de cuidados paliativos:

- Regorafenib: 160 mg PO (vía oral) por día, durante los primeros 21 días de los ciclos de 28 días.
- TAS 102(trifluridina/tipiracilo): 35 mg/m<sup>2</sup> PO (vía oral) redondeo dos veces por día, en los días 1 a 5 y 8 a 12 de cada ciclo de 28 días. No se debe exceder los 80mg/dosis. Dosis basada en el componente de trifluridina, redondeado al múltiplo de 5 más cercano.

### 6.3. Costos de tratamientos actuales

A partir de la licitación anteriormente mencionada[60], se obtuvieron los valores actuales (para el sector público) de las siguientes drogas involucradas.

Droga	Presentación	Marca Comercial	Costo(Presentación)	Costo Unitario
Oxaliplatino	1 frasco X 100 mg.	PHARM	\$350	3.5 \$/mg
5-FU	5 frasco X 500 mg./10 ml.	GOBBI	\$143	0.0572 \$/mg
Irinotecan	1 frasco X 100 mg. / 5 ml.	ASPEN	\$480	4.8 \$/mg
Cetuximab	1 frasco X 100 ml (5mg/ml)	SERONO	\$58223	116.45 \$/mg
Bevacizumab	1 frasco X 400 mg. /16 ml.	BEVAX	\$20970.98	52.43 \$/mg

Los valores de leucovorina, panitumumab, regorafenib y TAS 102 no estaban disponibles en la licitación. Por lo tanto se implementa un método alternativo, propuesto por el Banco de Drogas, que consiste en obtener el precio de drogas utilizadas en la terapia endocrina y quimioterapia con el siguiente cálculo:

$$\text{Precio de droga} = \frac{\text{Valor Vademecum ANMAT} \times 1,21 \times \text{CA}}{1,7545}$$

CA es la cantidad de oferentes, y el valor a incluir será según dicha cantidad:

Cantidad	Valor
1	0.71
2	0.49
3	0.45
4	0.41
5	0.35
6	0.35
7	0.31
8	0.24
9	0.20
>9	0.15

Por lo tanto, se pudo confeccionar la siguiente tabla, obteniendo la información del Vademecum de ANMAT [62]:

<b>Droga</b>	<b>Presentación</b>	<b>Oferentes</b>	<b>Costo Calculado</b>	<b>Costo Unitario</b>
Leucovorina	1 frasco X 50 mg.	7	\$109.26	2.18 \$/mg
Panitumumab	1 frasco X 100 mg./2 ml.	1	\$22080	220.8 \$/mg
Regorafenib	84 comprimidos de 40mg	1	\$100770.22	30 \$/mg
TAS 102	60 comp. 20mg triflu. + 8.19 tipi.	1	\$98244.63	81.87 \$/mg

Finalmente, podemos calcular el costo de cada tratamiento para un paciente promedio:

<b>Tratamiento</b>	<b>Costo por paciente hombre</b>	<b>Costo por paciente mujer</b>
FOLFOX+cetuximab	\$619239.41	\$665252.94
FOLFIRI+cetuximab	\$624439.88	\$665252.94
FOLFOXIRI+cetuximab	\$621457.30	\$662075.42
FOLFOX+bevacizumab	\$130490.27	\$109978.99
FOLFIRI+bevacizumab	\$135690.74	\$115519.36
FOLFOXIRI+bevacizumab	\$132708.16	\$112341.84
FOLFOX+panitumumab	\$604857.23	\$497633.71
FOLFIRI+panitumumab	\$610057.70	\$503174.08
FOLFOXIRI+panitumumab	\$132708.16	\$112341.84
Regorafenib	\$302400	\$302400
TAS 102	\$270171	\$270171

#### 6.4. Costos del panel

Las tecnologías actuales tienen un rango dinámico variado en términos de profundidad de lectura y número de muestras que pueden ser analizadas simultáneamente. Las capacidades de análisis dependen del tipo y modelo de equipamiento NGS disponible y la demanda del servicio teniendo en cuenta los tiempos de respuesta (*turnaround time*) requerido. a los fines de simplificar el análisis establecemos dos posibles escenarios:

1. Baja escala: para un servicio con bajo requerimiento de análisis, óptimo para 4 muestras como máximo.
2. Alta escala: para un servicio con un mayor requerimiento, óptimo para un mínimo de 10 muestras y un máximo de 20.

Se realizó el estudio de los costos del panel considerando que un análisis completo lleva los siguientes pasos (ver sección 2.2 para más información):

Etapa	Costo asociado por muestra (USD)			
	1 muestra	4 muestras	10 muestras	20 muestras
Pre y pos analítica	100	100	100	100
Preparación de muestra	111.75	111.75	111.75	111.75
PCR de emulsión	200.40	50.10	15.85	11.89
Secuenciación	721.91	180.48	62.77	47.08
Software de análisis	5.00	5.00	5.00	5.00
Gastos indirectos y misceláneos	50	50	50	50
<b>TOTAL</b>	<b>1663</b>	<b>664</b>	<b>445</b>	<b>416</b>

## 6.5. Comparación de costos

### 6.5.1. Panel vs No Panel

El cetuximab es el agente biológico con mayor efectividad de tratamiento y prolongación de la sobrevida del paciente. Sin embargo, éste no es efectivo si el tumor tiene el gen KRAS mutado, ya que esta mutación se da aguas abajo en la vía.

Dado que, en ausencia de análisis genético, es imposible saber si la mutación existe o no, *a priori* todos los pacientes reciben tratamiento con cetuximab.

Para la comparación de costos se asume una muestra de 100 pacientes, y se eligió el escenario más favorable para tratamientos sin panel y el más desfavorable para el tratamiento con panel. De este modo nos aseguramos que si con este planteo el resultado es beneficioso, cualquier escenario intermedio lo será.

- Escenario sin uso del panel: se utiliza el tratamiento menos costoso, que consiste en suministrar FOLFOX+cetuximab en una población de todos hombres
- Escenario con el uso del panel: se utiliza el tratamiento quimioterápico tradicional más costoso, FOLFOXIRI, y los agentes de terapia dirigida serán suministrados adecuadamente según su perfil genético. A su vez, se asume que toda la población es femenina y que las muestras deben secuenciarse de a una.

El primer escenario conlleva un costo de \$61.9 millones.

En el segundo escenario, los costos son los propios del tratamiento más los del panel. El costo de secuenciar asciende a \$2.78 millones, el costo por el tratamiento con cetuximab es de \$9.3 millones y con bevacizumab (para los que no benefician de terapia anti-EGFR, ver secciones 1.4.4 y 4.3) es de \$18.6 millones. A continuación, se puede observar la diferenciación en grupos según el perfil genético y los costos asociados:

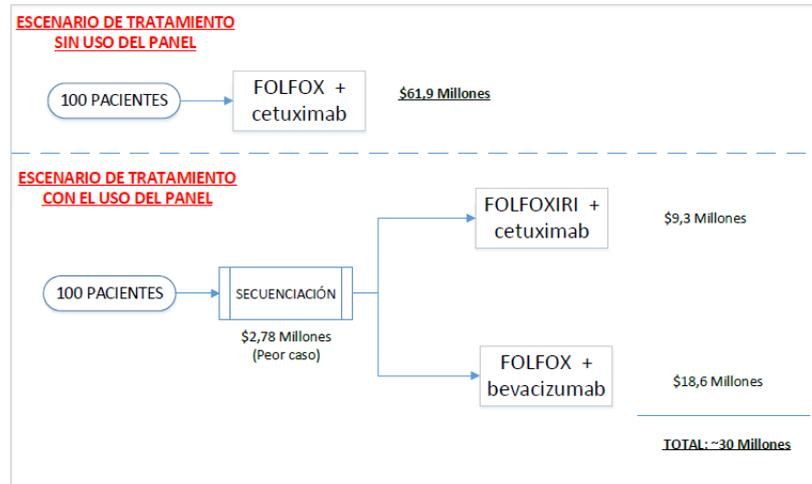


Figura 6.1: Costos asociados al escenario de tratamiento sin panel vs con panel

### 6.5.2. Panel vs Gen KRAS y NRAS solos

A raíz de lo explicado, sería lógico cuestionarse cuál es el costo-beneficio del panel en comparación a la secuenciación sola de los genes que condicionan la eficiencia del cetuximab. Los kits comerciales realizan el análisis de hasta 4 variantes de cada gen y su precio es de aproximadamente \$6000 pesos. Se deduce que el precio de analizar a cada paciente por únicamente estas 8 variantes sería de \$12000 (USD 685.7, considerando conversión al 1/12/17). Por lo tanto, si se secuenciara de a 4 muestras el panel resulta más económico que los genes solos. A su vez, el *wild type* de esas 8 variantes no asegura sensibilidad al cetuximab, ya que hay variantes fuera de esas que pueden generar resistencia, así como mutaciones en PIK3CA, BRAF, AKT y PTEN que no se están considerando. El panel cuenta con otros 54 genes aparte de los anteriores, con lo cual se puede obtener variedad de información de relevancia clínica y terapéutica como la caracterización del tumor y la resistencia o sensibilidad a varios tratamientos distintos, no solo cetuximab (ver sección 4 para más información). Por lo tanto, se observa que es superior en cuanto a costos y en cuanto a beneficios en comparación al análisis de las variantes de KRAS y NRAS solos.

## 6.6. Conclusiones

Se concluye que el panel es costo-efectivo. Genera un ahorro enorme frente a la no utilización de análisis genéticos y un ahorro considerable frente al análisis de únicamente dos genes. Cabe aclarar que en este análisis no contempla ciertos costos de insumos o personal asociados a los tratamientos como la solución salina para aplicación, personal del hospital y otros costos asociados a la utilización del hospital de día, ni costos de amortizaciones o costos fijos prorrateados según el volumen total de servicios. Tampoco se consideran factores subjetivos como la mejora en la calidad de vida. Sin embargo, estos factores difieren levemente entre ambos escenarios pudiendo incluso ser mejores en el caso de la utilización del panel. Por lo tanto, si se les asociara un costo, se vería aún más el beneficio ya que la calidad de vida mejora por evitar efectos adversos, tratamientos ineficientes y procedimientos innecesarios, así como una reducción en la utilización del hospital de día por contar con tratamientos que funcionan. Por lo tanto, con las limitaciones impuestas por la simplificación del análisis, podemos concluir que en el escenario argentino la utilización de este panel es viable y una alternativa beneficiosa al tratamiento actual.



## **Parte V**

# **Conclusiones**



## CONCLUSIONES FINALES

En este proyecto se logró el diseño de un panel genético para guiar el manejo terapéutico del CCR.

Los genes considerados fueron analizados a partir de bibliografía confiable y en debates con expertos en el área, diferenciando entre mutaciones somáticas clasificatorias y mutaciones informativas para terapia. Se constató la viabilidad de su construcción con el programa Ampliseq Designer y se obtuvieron los parámetros relevantes. El diseño final consiste en 53 genes, con un largo de 263.65kb y 1400 amplicones.

En una segunda etapa, se analizaron los polimorfismos de línea germinal de DPYD que afectan al metabolismo del 5-FU. Para poder utilizar la información presente en la literatura como indicativa de la magnitud y dirección del efecto de los polimorfismos sobre los efectos adversos, se optó por la realización de un meta-análisis, y se obtuvieron variantes significativamente asociadas a efectos adversos a 5-FU, una variante no significativa pero aceptable y dos que requieren de análisis posteriores. Estos resultados serán utilizados en el futuro para el desarrollo de un PRS.

Por último, se realizó un análisis básico de costo-efectividad en el cual se comparó primero la utilización del panel versus su no utilización y después su utilización versus el análisis de genes individuales (KRAS y NRAS). Se llegó a determinar de que en ambos casos el beneficio de la utilización del panel es significativo, a la vez que genera un ahorro importante, con lo cual en líneas generales es costo-efectivo. Queda por realizar un análisis más específico, que incluya un costeo formalizado y la aplicación de un modelo de costo efectividad que incluya un análisis basado en la cadena de Markov para definir más sistemáticamente los estados por los que pasa el paciente promedio a lo largo de su enfermedad y cómo el panel ayudaría a las decisiones en cada uno de esos estados.

En conclusión, el diseño de un panel de biomarcadores costo-efectivo basado en herramientas genómicas fue desarrollado satisfactoriamente. Se espera que este proyecto continúe con la

incorporación del PRS y pueda luego ser validado analíticamente y trasladado a la práctica clínica.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Instituto Nacional del Cáncer, “Guía para la implementación de políticas de prevención y detección temprana del cáncer colorrectal,” tech. rep., Programa de Prevención y Detección Temprana del Cáncer Colorrectal- PNCCR, 2012.
- [2] Instituto Nacional del Cáncer, “Análisis de Situación de Salud por Cáncer. Argentina, 2016,” licitación pública número 56, acta 01/17, expediente 2900-32662/16, Vigilancia Epidemiológica del Cáncer, 02/06/2017.
- [3] American Cancer Society, “Colorectal cancer facts and figures 2017-2019,” Report, American Cancer Society, 2017.
- [4] American Society of Colon and Rectal Surgeons [Internet], “Polyps of the colon and rectum.” <https://www.fascrs.org/patients/disease-condition/polyps-colon-and-rectum>.  
Accedido: 18/11/2017.
- [5] U. A. Gualdrini y L. E. Iummato, “Cáncer colorrectal en la Argentina: Organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control,” informe final de diciembre de 2011: diagnóstico de situación de la argentina, Instituto Nacional del Cáncer (INC), 2011.
- [6] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [7] American Cancer Society [Internet], “¿conocemos qué causa el cáncer colorrectal?” <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/causas-riesgos-prevencion/que-lo-causa.html>.  
Actualizado: 01/03/2017. Acceso: 21/11/2017.
- [8] National Institute of Health (NIH), “Genetics of colorectal cancer (pdq®)—health professional version,” tech. rep., National Institute of Health (NIH), 2017.
- [9] T. C. G. A. Network, “Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer,” *Nature*, vol. 487, p. 330, jul 2012.
- [10] D. G. Hewett, “Cold snare polypectomy: optimizing technique and technology (with videos),” *Gastrointest Endosc*, vol. 82, no. 4, pp. 693–696, 2015.

- [11] M. S. Tessmer and K. T. Flaherty, "AACR cancer progress report 2017: Harnessing research discoveries to save lives.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, no. 18, p. 5325, 2017.
- [12] P. Kirkpatrick, J. Graham, and M. Muhsin, "Cetuximab," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, p. 549, jul 2004.
- [13] D. B. Longley, D. P. Harkin, and P. G. Johnston, "5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, p. 330, may 2003.
- [14] T. C. Johnstone, G. Y. Park, and S. J. Lippard, "Understanding and Improving Platinum Anticancer Drugs – Phenanthriplatin," *Anticancer research*, vol. 34, pp. 471–476, jan 2014.
- [15] Y. Xu and M. A. Villalona-Calero, "Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity," *Annals of Oncology*, vol. 13, pp. 1841–1851, dec 2002.
- [16] A. Moriarity, J. O'Sullivan, J. Kennedy, B. Mehigan, and P. McCormick, "Current targeted therapies in the treatment of advanced colorectal cancer: a review," *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, vol. 8, pp. 276–293, jul 2016.
- [17] T. J. Price, M. Peeters, T. W. Kim, J. Li, S. Cascinu, P. Ruff, A. S. Suresh, A. Thomas, S. Tjulandin, K. Zhang, S. Murugappan, and R. Sidhu, "Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type *KRAS* exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study," *The Lancet Oncology*, vol. 15, pp. 569–579, dec 2017.
- [18] N. Ferrara, K. J. Hillan, H.-P. Gerber, and W. Novotny, "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, p. 391, may 2004.
- [19] Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos - ANMAT, "Adquisición de Medicamentos Oncológicos," disposición 4691/17, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, 11/05/2017.
- [20] K. P. Garnock-Jones, G. M. Keating, and L. J. Scott, "Trastuzumab," *Drugs*, vol. 70, no. 2, pp. 215–239, 2010.
- [21] L. Khoja, M. O. Butler, S. P. Kang, S. Ebbinghaus, and A. M. Joshua, "Pembrolizumab," *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, vol. 3, no. 1, p. 36, 2015.
- [22] V. K. Sondak, K. S. M. Smalley, R. Kudchadkar, S. Gripon, and P. Kirkpatrick, "Ipilimumab," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 10, p. 411, jun 2011.

- [23] V. Shahabi, G. Whitney, O. Hamid, H. Schmidt, S. D. Chasalow, S. Alaparthi, and J. R. Jackson, "Assessment of association between BRAF-V600E mutation status in melanomas and clinical response to ipilimumab," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 61, no. 5, pp. 733–737, 2012.
- [24] Precision Medicine Initiative (PMI) Working Group, "The precision medicine initiative cohort program – building a research foundation for 21st century medicine," Precision Medicine Initiative (PMI) Working Group Report to the Advisory Committee to the Director, National Institute of Health (NIH), 2015.
- [25] P. Garrido, A. Aldaz, R. Vera, M. Calleja, E. Álava, M. Martín, M. X., and J. Palacios, "Proposal for the creation of a national strategy for precision medicine in cancer: a position statement of SEOM, SEAP, and SEFH," *Clin Transl Oncol*, pp. 1–5, 2017.
- [26] S. Goodwin, M. John, and M. W., "Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies," *Nat Rev Genet*, vol. 17, no. 6, pp. 333–351, 2016.
- [27] H. G. Peter Horak, Stefan Fröhling, "Integrating next-generation sequencing into clinical oncology: strategies, promises and pitfalls," *British Medical Journal (BMJ)*, 2016.
- [28] Lister Hill National Center for Biomedical Communications, "Genomic Research," u.s. national library of medicine, National Institute of Health (NIH), 2017.
- [29] A. Krasinskas, "EGFR signaling in colorectal carcinoma," *Pathology Res Int*, vol. 2011, p. 932932, 2011.
- [30] D. Rosmarin, C. Palles, D. Church, E. Domingo, A. Jones, E. Johnstone, H. Wang, S. Love, P. Julier, C. Scudder, G. Nicholson, G. Anna, M. Martin, D. Sargent, E. Green, M. Howard, U. Zanger, M. Schwab, M. Braun, M. Seymour, L. Thompson, B. Lacas, V. Boige, N. Ribelles, S. Afzal, H. Enghusen, S. Jensen, E. Marie-Christine, G. Milano, M. Wadelius, B. Glimelius, H. Garmo, M. Gusella, T. Lecomte, L. Pierre, M. Eva, R. Sharma, G. Jesus, Z. Kleibl, A. Morel, J. Pignon, R. Midgley, D. Kerr, and I. Tomlinson, "Genetic markers of toxicity from capecitabine and other Fluorouracil-Based regimens: Investigation in the QUASAR2 study, systematic review, and Meta-Analysis," *J Clin Oncol*, vol. 32, no. 10, pp. 1031–1039, 2014.
- [31] W. M, M. E, J. Hebert, L. Gong, K. Sangkuhl, C. Thorn, R. Altman, and T. Klein, "Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 92, no. 4, pp. 414–417, 2012.
- [32] R. Fodde, "The APC gene in colorectal cancer," *Eur J Cancer*, vol. 38, no. 7, pp. 867–871, 2002.
- [33] A. Pryczynicz, "Bax protein may influence the invasion of colorectal cancer," *World J Gastroentero*, vol. 20, no. 5, p. 1305, 2014.

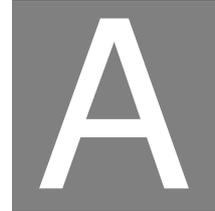
- [34] V. R. Katkooori, S. Catalina, C. Shanmugam, N. C. Jhala, T. Callens, L. Messiaen, J. Posey, H. L. Bumpers, S. Meleth, W. E. Grizzle, and U. Manne, "Bax expression is a candidate prognostic and predictive marker of colorectal cancer.," *J Gastrointest Oncol*, vol. 1, no. 2, pp. 76–89, 2010.
- [35] H. Arora, A. Chacon, S. Choudhary, M. Michael, L. Meshkov, K. Nouri, and J. Izakovic, "Bloom syndrome," *Int J Dermatol*, vol. 53, no. 7, pp. 798–802, 2014.
- [36] M. Sanz, J. German, and C. Cunniff, "Bloom's syndrome," 2007.
- [37] A. Mounira, D. Catherine, A. Laugé, O. Rosine, A. Barakat, E. Chadli, A. A. Bousfiha, M. Benjelloun, E. Flori, B. Doray, V. Laugel, M. T. Lourenço, R. Gonçalves, S. Sousa, J. Couturier, and S. Dominique, "Three new BLM gene mutations associated with bloom syndrome.," *Genet. Test.*, vol. 12, no. 2, pp. 257–61, 2008.
- [38] E. Clara, "New genes emerging for colorectal cancer predisposition," *World J Gastroentero*, vol. 20, no. 8, p. 1961, 2014.
- [39] K. Tutlewska, J. Lubinski, and G. Kurzawski, "Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of lynch syndrome a literature review," *Hered Cancer Clin Pr*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2013.
- [40] R. Weren, M. Ligtenberg, C. Kets, R. Voer, E. Verwiel, L. Spruijt, Z. Wendy, M. Jongmans, C. Gilissen, H. Jayne, A. Hoischen, J. Shendure, E. Boyle, E. Kamping, I. Nagtegaal, B. Tops, F. Nagengast, A. Kessel, J. Krieken, R. Kuiper, and N. Hoogerbrugge, "A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer," *Nat Genet*, vol. 47, no. 6, pp. 668–671, 2015.
- [41] B. Zhang, X. Chen, S. Bae, K. Singh, M. Washington, and P. Datta, "Loss of smad4 in colorectal cancer induces resistance to 5-fluorouracil through activating akt pathway," *Brit J Cancer*, vol. 110, no. 4, pp. 946–957, 2014.
- [42] M. Rebucci, P. Peixoto, A. Dewitte, N. Wattez, M. A. De Nuncques, N. Rezvoy, C. Vautravers-Dewas, M. P. Buisine, E. Guerin, J. P. Peyrat, E. Lartigau, and A. Lansiaux, "Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: Role of AKT inhibition in bypassing this resistance," *International Journal of Oncology*, vol. 38, no. 1, pp. 189–200, 2011.
- [43] C. J. Lord and A. Ashworth, "BRCAness revisited," *Nature Reviews Cancer*, vol. 16, p. 110, jan 2016.
- [44] Q. Pan, A. Sathe, P. C. Black, P. J. Goebell, A. M. Kamat, B. Schmitz-Draeger, and R. Nawroth, "CDK4/6 Inhibitors in Cancer Therapy: ANovel Treatment Strategy for Bladder Cancer," *Bladder Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 3, pp. 79–88, apr 2017.

- [45] S. Misale, R. Yaeger, S. Hobor, E. Scala, M. Janakiraman, D. Liska, E. Valtorta, R. Schiavo, M. Buscarino, G. Siravegna, K. Bencardino, A. Cercek, C.-T. Chen, S. Veronese, C. Zanon, A. Sartore-Bianchi, M. Gambacorta, M. Gallicchio, E. Vakiani, V. Boscaro, E. Medico, M. Weiser, S. Siena, F. Di Nicolantonio, D. Solit, and A. Bardelli, "Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer," *Nature*, vol. 486, p. 532, jun 2012.
- [46] H. Kawakami, I. Okamoto, W. Okamoto, J. Tanizaki, K. Nakagawa, and K. Nishio, "Targeting MET Amplification as a New Oncogenic Driver," *Cancers*, vol. 6, pp. 1540–1552, sep 2014.
- [47] A. Drilon, Z. I. Hu, G. G. Y. Lai, and D. S. W. Tan, "Targeting RET-driven cancers: lessons from evolving preclinical and clinical landscapes," *Nature Reviews Clinical Oncology*, nov 2017.
- [48] P. L. McCormack and S. J. Keam, "Dasatinib," *Drugs*, vol. 71, no. 13, pp. 1771–1795, 2011.
- [49] A. T. Shaw, S.-H. I. Ou, Y.-J. Bang, D. R. Camidge, B. J. Solomon, R. Salgia, G. J. Riely, M. Varella-Garcia, G. I. Shapiro, D. B. Costa, R. C. Doebele, L. P. Le, Z. Zheng, W. Tan, P. Stephenson, S. M. Shreeve, L. M. Tye, J. G. Christensen, K. D. Wilner, J. W. Clark, and A. J. Iafrate, "Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer," *The New England journal of medicine*, vol. 371, pp. 1963–1971, nov 2014.
- [50] R. Dienstmann, L. Vermeulen, J. Guinney, S. Kopetz, S. Tejpar, and J. Tabernero, "Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 17, p. 79, jan 2017.
- [51] D. Hertz and J. Rae, "Pharmacogenetics of cancer drugs," *Annu Rev Med*, vol. 66, no. 1, pp. 1–17, 2015.
- [52] F. Sclafani, "PD-1 inhibition in metastatic dMMR/MSI-H colorectal cancer," 2017.
- [53] S. L. Kerns, S. Kundu, J. H. Oh, S. K. Singhal, M. Janelins, L. B. Travis, J. O. Deasy, A. C. J. E. Janssens, H. Ostrer, M. Parliament, N. Usmani, and B. S. Rosenstein, "The Prediction of Radiotherapy Toxicity Using Single Nucleotide Polymorphism-Based Models: A Step Toward Prevention," *Seminars in Radiation Oncology*, vol. 25, pp. 281–291, dec 2017.
- [54] E. Becht, A. De Reyniès, N. A. Giraldo, C. Pilati, B. Buttard, L. Lacroix, J. Selves, C. Sautès-Fridman, P. Laurent-Puig, and W. H. Fridman, "Immune and stromal classification of Colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy," *Clinical Cancer Research*, vol. 22, no. 16, pp. 4057–4066, 2016.
- [55] R. Mandal and T. A. Chan, "Personalized oncology meets immunology: The path toward precision immunotherapy," 2016.
- [56] Cochrane, "Cochrane Glossary." <http://community.cochrane.org/glossary>, 2017.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [57] R. DerSimonian and N. Laird, "Meta-analysis in clinical trials," *Controlled Clinical Trials*, vol. 7, no. 3, pp. 177–188, 1986.
- [58] R. L. Plackett, "The continuity correction in 2×2 tables," *Biometrika*, vol. 51, pp. 327–337, dec 1964.
- [59] D. Meulendijks, L. Henricks, G. Sonke, M. Deenen, T. Froehlich, U. Amstutz, C. Largiadèr, B. Jennings, A. Marinaki, J. Sanderson, Z. Kleibl, P. Kleiblova, M. Schwab, U. Zanger, C. Palles, I. Tomlinson, E. Gross, A. Kuilenburg, C. Punt, M. Koopman, J. Beijnen, A. Cats, and J. Schellens, "Clinical relevance of DPYD variants c.1679T{>}G, c.1236G{>}A/HapB3, and c.1601G{>}A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data," *Lancet Oncol*, vol. 16, no. 16, pp. 1639–1650, 2015.
- [60] Comisión Asesora de Preadjudicaciones, "Adquisición de Medicamentos Oncológicos," licitación pública número 56, acta 01/17, expediente 2900-32662/16, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, 02/06/2017.
- [61] R. Mosteller, "Simplified calculation of body-surface area," *New England Journal of Medicine*, 1987, 317(17):1098.
- [62] Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) [Internet], "Vademecum nacional de medicamentos." <http://anmatvademecum.servicios.pami.org.ar/index.html>.  
Accedido: 28/11/2017.



## APÉNDICE DEL META-ANÁLISIS

### A.1. Operador Booleano utilizado en la búsqueda en PubMed

(DPYD[All Fields] OR DPD[All Fields] OR ("dihydrouracil dehydrogenase (nadp)"[MeSH Terms] OR ("dihydrouracil"[All Fields] AND "dehydrogenase"[All Fields] AND "(nadp)"[All Fields]) OR "dihydrouracil dehydrogenase (nadp)"[All Fields] OR ("dihydropyrimidine"[All Fields] AND "dehydrogenase"[All Fields]) OR "dihydropyrimidine dehydrogenase"[All Fields])) AND (("polymorphism, genetic"[MeSH Terms] OR ("polymorphism"[All Fields] AND "genetic"[All Fields]) OR "genetic polymorphism"[All Fields] OR "polymorphism"[All Fields]) OR ("polymorphism, single nucleotide"[MeSH Terms] OR ("polymorphism"[All Fields] AND "single"[All Fields] AND "nucleotide"[All Fields]) OR "single nucleotide polymorphism"[All Fields] OR ("polymorphism"[All Fields] AND "single"[All Fields] AND "nucleotide"[All Fields]) OR "polymorphism, single nucleotide"[All Fields]) OR ("polymorphism, genetic"[MeSH Terms] OR ("polymorphism"[All Fields] AND "genetic"[All Fields]) OR "genetic polymorphism"[All Fields] OR ("polymorphism"[All Fields] AND "genetic"[All Fields]) OR "polymorphism, genetic"[All Fields]) OR (pharmacogenet[tiab] OR pharmacogenetic[tiab] OR pharmacogenetic'[tiab] OR pharmacogenetic's[tiab] OR pharmacogenetical[tiab] OR pharmacogenetically[tiab] OR pharmacogenetically[tiab] OR pharmacogeneticist[tiab] OR pharmacogeneticist's[tiab] OR pharmacogeneticists[tiab] OR pharmacogeneticmarkers[tiab] OR pharmacogenetics[tiab] OR pharmacogenetics'[tiab] OR pharmacogeneticsinfo[tiab] OR pharmacogenetique[tiab] OR pharmacogenetis[tiab]) OR ("pharmacogenetics"[MeSH Terms] OR "pharmacogenetics"[All Fields]) OR "mutation/genetics"[Mesh Terms] OR ("genotype"[MeSH Terms] OR "genotype"[All Fields]) OR ("polymorphism, genetic"[MeSH Terms] OR ("polymorphism"[All Fields] AND "genetic"[All Fields]) OR "genetic polymorphism"[All Fields] OR "polymorphisms"[All Fields]) OR variant[All Fields] OR variants[All Fields] OR ("Socioaffect Neurosci Psychol"[Journal] OR "snp"[All Fields]) OR DPYD\*2A[All Fields] OR \*2A[All Fields] OR 2A[All Fields] OR IVS14+1G>A[All Fields] OR c.1905+1G>A[All Fields]

APÉNDICE A. APÉNDICE DEL META-ANÁLISIS

---

OR rs3918290[All Fields] OR rs67376798[All Fields] OR c.2846A>T[All Fields] OR D949V[All Fields]  
OR rs55886062[All Fields] OR c.1679T>G[All Fields] OR I560S[All Fields] OR DPYD\*13[All Fields]  
and ("5-FU" or "fluorouracil" or "fluoropyrimidine" or "5-fluorouracil" or "capecitabine") AND (toxicity or  
adverse or side-effects or Antineoplastic Combined Chemotherapy Protocols/adverse effects[mesh])  
NOT review NOT meta analysis NOT letters NOT congresses



## PRECIOS DE DROGAS MEDIANTE EL MÉTODO DEL BANCO DE DROGAS

Leucovorina: Frasco ampolla 50mg

Empresa	Precio
SIDUS SOCIEDAD ANONIMA	319.48
LABORATORIO LKM S.A.	320.00
G P PHARM SA(KABI)	341.28
G P PHARM SA(FILAXIS)	455.60
MICROSULES ARGENTINA S A	568.00
GOBBI NOVAG S.A.	575.06
TUTEUR S A C I F I A	997.16

A partir de los datos anteriores se obtiene que CA=0.31 (7 oferentes) y se calcula el promedio:  
(B.1)

$$\text{Promedio Vademecum ANMAT} = \frac{319,98 + 320 + 341,28 + 455,6 + 568 + 575,06 + 997,16}{7} = 510,94$$

Finalmente, se calcula el precio de la leucovorina:

$$\text{Precio de leucovorina} = \frac{510,94 \times 1,21 \times 0,31}{1,7545} = 109,26$$

Para las drogas restantes, hay un único oferente, con lo cual el precio es único. A continuación se detallan los cálculos utilizados:

$$\text{Precio de panitumumab} = \frac{45093 \times 1,21 \times 0,71}{1,7545} = 22080$$

$$\text{Precio de regorafenib} = \frac{45093 \times 1,21 \times 0,71}{1,7545} = 100770,22$$

APÉNDICE B. PRECIOS DE DROGAS MEDIANTE EL MÉTODO DEL BANCO DE DROGAS

---

$$\text{Precio de TAS102} = \frac{200640,44 \times 1,21 \times 0,71}{1,7545} = 98244,63$$



## COSTOS POR TRATAMIENTO

### C.1. FOLFOX

Dado que el tratamiento dura 3 meses y se repite cada dos semanas, se multiplica por dos (dos veces por mes) por 3 (tres meses).

$$(C.1) \quad \text{Cantidad de oxaliplatino (hombres)} = 85 \text{ mg/m}^2 \times 1,53 \text{ m}^2 \times 2 \times 3 = 780,3 \text{ mg}$$

$$(C.2) \quad \text{Cantidad de leucovorina (hombres)} = 400 \text{ mg/m}^2 \times 1,53 \text{ m}^2 \times 2 \times 3 = 3672 \text{ mg}$$

(C.3)

$$\text{Cantidad de 5 – FU (hombres)} = (400 \text{ mg/m}^2 \times 1,53 \text{ m}^2 + 1200 \text{ mg/m}^2 \times 1,53 \times 2 \times 2) \times 2 \times 3 = 47736 \text{ mg}$$

$$(C.4) \quad \text{Cantidad de oxaliplatino (mujeres)} = 85 \text{ mg/m}^2 \times 1,63 \text{ m}^2 \times 2 \times 3 = 831,3 \text{ mg}$$

$$(C.5) \quad \text{Cantidad de leucovorina (mujeres)} = 400 \text{ mg/m}^2 \times 1,63 \text{ m}^2 \times 2 \times 3 = 3912 \text{ mg}$$

(C.6)

$$\text{Cantidad de 5 – FU (mujeres)} = (400 \text{ mg/m}^2 \times 1,63 \text{ m}^2 + 1200 \text{ mg/m}^2 \times 1,63 \text{ m}^2 \times 2 \times 2) \times 2 \times 3 = 50856 \text{ mg}$$

APÉNDICE C. COSTOS POR TRATAMIENTO

Droga	Cant. hombre	Cant. mujer	Costo Unit.	CT Hombre	CT Mujer
Oxaliplatino	780.3	831.3mg	3.5/mg	\$2731.05	\$2909.55
Leucovorina	3672mg	3912mg	2.18/mg	\$8004.96	\$8528.16
5-FU	47736mg	50856mg	0.0572/mg	\$2730.5	\$2908.96
TOTAL				\$13466.51	\$14346.67

Cuadro C.1: Cantidades requeridas de drogas del tratamiento FOLFOX para hombre y mujer promedio

CT=Costo total

## C.2. FOLFIRI

(C.7) Cantidad de irinotecan (hombres) =  $180m/m^2 \times 1,53m^2 \times 2 \times 3 = 1652,4mg$

(C.8) Cantidad de irinotecan (mujeres) =  $180m/m^2 \times 1,63m^2 \times 2 \times 3 = 1760,4mg$

5-FU y leucovorina idem C.3 C.6 y C.2 C.5 respectivamente.

Droga	Cant. hombre	Cant. mujer	Costo Unit.	CT Hombre	CT Mujer
Irinotecan	1652.4mg	1760.4mg	4.8/mg	\$7931.52	\$8449.92
Leucovorina	3672mg	3912mg	2.18/mg	\$8004.96	\$8528.16
5-FU	47736mg	50856mg	0.0572/mg	\$2730.5	\$2908.96
TOTAL				\$18666.98	\$19887.04

Cuadro C.2: Cantidades requeridas de drogas del tratamiento FOLFIRI para hombre y mujer promedio

## C.3. FOLFOXIRI

(C.9) Cantidad de irinotecan (hombres) =  $165m/m^2 \times 1,53m^2 \times 2 \times 3 = 1514,7mg$

(C.10) Cantidad de 5 – FU (hombres) =  $800mg/m^2 \times 1,53m^2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 3 = 29376mg$

(C.11) Cantidad de irinotecan (mujeres) =  $165m/m^2 \times 1,63m^2 \times 2 \times 3 = 1613,7mg$

$$(C.12) \quad \text{Cantidad de 5-FU (mujeres)} = 800 \text{ mg/m}^2 \times 1,63 \text{ m}^2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 3 = 31296 \text{ mg}$$

Las cantidades de oxaliplatino son las mismas que las calculadas en las ecuaciones C.1 y C.4. Los valores de leucovorina son la mitad de los calculados en las ecuaciones C.2 y C.5.

<b>Droga</b>	<b>Cant. hombre</b>	<b>Cant. mujer</b>	<b>Costo Unit.</b>	<b>CT Hombre</b>	<b>CT Mujer</b>
Oxaliplatino	780.3	831.3mg	3.5/mg	\$2731.05	\$2909.55
Irinotecan	1514.7mg	1613.7mg	4.8/mg	\$7270.56	\$7745.76
Leucovorina	1836mg	1956mg	2.18/mg	\$4002.48	\$4264.08
5-FU	29376mg	31296mg	0.0572/mg	\$1680.3	\$1790.1
<b>TOTAL</b>				<u>\$15684.4</u>	<u>\$16709.52</u>

Cuadro C.3: Cantidades requeridas de drogas del tratamiento FOLFOXIRI para hombre y mujer promedio

