

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y**  
**AGROPECUARIAS**



**“ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO c.53T>A DEL GEN *RUNX3***  
**CON CÁNCER COLORRECTAL EN PACIENTES DEL HOSPITAL**  
**CIVIL JUAN I. MENCHACA”**

**PRESENTA**

Elia Cristina Alonso Díaz

**DIRECTOR**

Dra. Melva Gutiérrez Angulo

**ASESORES**

Dr. Jorge Peregrina Sandoval

Dra. María de la Luz Ayala Madrigal

Colaboradores:

M. en C. Alexis Sayuri Suárez Villanueva, estudiante de séptimo semestre del Doctorado en Genética Humana.

Sede:

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Genética y Cáncer del Instituto de Genética Humana “Dr. Enrique Corona Rivera”, Departamento de Biología Molecular y Genómica Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis padres Ramiro y Elia por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación.

A mis hermanos Ramiro y Fabio por ser parte importante en mi vida y aguantar mis malos ratos.

Fabián, la persona más importante en mi vida, por apoyarme en las buenas y en las malas, por darme siempre ánimos para seguir adelante y echarle todas las ganas a lo que hago, sobre todo gracias por tu paciencia y amor incondicional.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mi directora de tesis, Dra. Melva Gutiérrez, quien con su conocimiento, experiencia, paciencia y motivación ha logrado que pueda terminar mis estudios con éxito.

También me gustará agradecer a mis asesores, la Dra. María de la Luz Ayala, por su visión crítica, consejos y ayuda constante durante mi estancia en el laboratorio; y al Dr. Jorge Peregrina por creer en mi y brindarme la oportunidad de formar parte de este gran equipo de trabajo.

A Sayuri, Ruth y Rodo por haber sido excelentes compañeros de laboratorio y por brindarme su amistad, especialmente a Sayuri por permitirme ayudar en tu trabajo, por siempre responder a mis dudas, por siempre estar dispuesta, por darme consejos, por tenerme paciencia y motivarme a seguir adelante en los momentos difíciles, fuiste mi guía para poder realizar esta tesis, ¡GRACIAS!

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
ÍNDICE DE CUADROS .....	6
ABREVIATURAS .....	7
ANTECEDENTES .....	8
ESTRUCTURA E HISTOLOGÍA DE COLON Y RECTO .....	8
CÁNCER COLORRECTAL.....	8
Grados y estadios.....	8
Etiología .....	9
Vías moleculares que conducen al desarrollo de cáncer .....	10
Vía de inestabilidad cromosómica.....	10
Vía de inestabilidad de microsatélites .....	10
Vía Fenotipo Metilador de Islas CpG.....	11
RUNX3.....	11
Variantes en <i>RUNX3</i> .....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	15
JUSTIFICACIÓN.....	16
OBJETIVO GENERAL .....	16
OBJETIVOS PARTICULARES .....	16
MATERIAL Y MÉTODOS .....	17
Tipo de estudio .....	17
Tamaño de la muestra.....	17
Criterios de selección del grupo de estudio.....	17
Criterios de inclusión.....	17
Criterios de exclusión .....	18
Estrategia metodológica .....	18
<i>Extracción de DNA</i> .....	18
<i>Cuantificación del DNA</i> .....	18
<i>Amplificación por PCR</i> .....	18
<i>Digestión enzimática</i> .....	19
<i>Electroforesis</i> .....	20
<i>Análisis estadístico</i> .....	20
<i>Consideraciones éticas.</i> .....	20
RESULTADOS .....	21

GRUPO DE REFERENCIA.....	21
POLIMORFISMO c.53T>A.....	23
COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ENTRE DIFERENTES POBLACIONES ..	24
PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.....	25
POLIMORFISMO c.53T>A.....	28
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXOS.....	34
CONSENTIMIENTO INFORMADO GRUPO DE REFERENCIA.....	34
CUESTIONARIO PARA INDIVIDUOS DEL GRUPO DE REFERENCIA.....	35
CONSENTIMIENTO INFORMADO INDIVIDUOS CON CÁNCER COLORRECTAL .....	39
CUESTIONARIO PARA INDIVIDUOS CON CÁNCER COLORRECTAL.....	40
TÉCNICAS DE LABORATORIO.....	45
EXTRACCIÓN DE DNA .....	45
CUANTIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO.....	48
AMPLIFICACIÓN POR PCR .....	49
DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN .....	50
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	51
TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIA CON NITRATO DE PLATA.....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
<b>Fig. 1</b>	Localización y estructura de <i>RUNX3</i> . P1 y P2: Promotor 1 y 2	12
<b>Fig. 2</b>	Relación de <i>RUNX3</i> con las vías de señalización Wnt y TGF $\beta$	13
<b>Fig. 3</b>	Localización del polimorfismo c.53T>A	14
<b>Fig. 4</b>	Secuencia parcial del gen <i>RUNX3</i> donde se localizan los iniciadores para la PCR (amarillo) y el sitio de reconocimiento de la enzima <i>BtsCI</i>	20
<b>Fig. 5</b>	Porcentaje de individuos que presentan diabetes mellitus tipo 2	21
<b>Fig. 6</b>	Porcentaje de individuos que consumen alcohol	21
<b>Fig. 7</b>	Porcentaje de individuos que consumen tabaco	22
<b>Fig. 8</b>	Porcentaje de individuos que realizan actividad física	22
<b>Fig. 9</b>	Ejemplo de genotipos obtenidos para el polimorfismo c.53T>A en el grupo de referencia	23
<b>Fig. 10</b>	Relación por género de pacientes con CCR	25
<b>Fig. 11</b>	Número de pacientes con CCR de acuerdo a la edad	25
<b>Fig. 12</b>	Porcentaje de pacientes de acuerdo a la localización anatómica del tumor	26
<b>Fig. 13</b>	Porcentaje de pacientes que presentan diabetes mellitus tipo 2	26
<b>Fig. 14</b>	Porcentaje de pacientes que consumen alcohol	26
<b>Fig. 15</b>	Porcentaje de pacientes que consumen tabaco	27
<b>Fig. 16</b>	Porcentaje de pacientes que realizan actividad física	27

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
<b>Cuadro 1</b>	Clasificación Tumor-Ganglio-Metástasis (TNM)	9
<b>Cuadro 2</b>	Estudios de asociación del polimorfismo c.53T>A en distintos tipos de cáncer	14
<b>Cuadro 3</b>	Secuencia de los iniciadores para <i>RUNX3</i> y tamaño de producto amplificado	19
<b>Cuadro 4</b>	Productos obtenidos una vez que se realizó la digestión enzimática con la enzima de restricción <i>BtsCI</i> para el polimorfismo c.53T>A	19
<b>Cuadro 5</b>	Genotipos observados y esperados del polimorfismo c.53T>A en 121 individuos del grupo de referencia y resultado del EHW	23
<b>Cuadro 6</b>	Comparación de la distribución de genotipos del polimorfismo c.53T>A del grupo de referencia con otras poblaciones	24
<b>Cuadro 7</b>	Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo c.53T>A entre pacientes con CCR y el grupo de referencia	28

## ABREVIATURAS

<b>AJCC</b>	<i>American Joint Comission on Cancer</i>
<b>APC</b>	Adenomatous polyposis coli (gen)
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CCR</b>	Cáncer colorrectal
<b>CIMP</b>	Vía fenotipo metilador de islas CpG
<b>CIN</b>	La vía de inestabilidad cromosómica
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadecil trimetil amonio
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>dCTP</b>	Citidina trifosfato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfato
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos Trifosfatados
<b>dTTP</b>	Timidina trifosfato
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DTAB</b>	Bromuro de duodecil trimetil amonio
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EHW</b>	Equilibrio de Hardy-Weinberg
<b>g</b>	Gramo
<b>HCL</b>	Ácido clorhídrico
<b>h</b>	Hora
<b>IC</b>	Intervalo de Confianza
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Metástasis
<b>M</b>	Molar
<b>M0</b>	Metástasis distante no aparente
<b>M1</b>	Metástasis distante aparente
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>µl</b>	Microlitros
<b>MMR</b>	(del ingles, <i>Mismatch Repair System</i> )
<b>MSI</b>	Vía de inestabilidad de microsatélites
<b>N</b>	Ganglios
<b>n</b>	Tamaño de la muestra
<b>N0</b>	Sin relación a ganglios linfáticos examinados
<b>N1</b>	Metástasis a uno o tres ganglios linfáticos regionales
<b>N2</b>	Tumores con más de tres ganglios afectados
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio

<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloruro de amonio
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de amonio
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OR</b>	Cociente de probabilidades (Odds ratio)
<b>P</b>	Estimado de la proporción a ser medida (alelos)
<b>*p</b>	Exacta de Fisher
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>pg</b>	Picogramo
<b>pH</b>	Potencial hidrógeno
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>P1</b>	Promotor 1
<b>P2</b>	Promotor 2
<b>RFLP's</b>	(del inglés, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RD</b>	Runtdomain
<b>s</b>	Segundos
<b>T</b>	Tumor
<b>T1</b>	Tumores de la submucosa
<b>T2</b>	Tumores de la muscularis propia
<b>T3</b>	Tumores que infiltran capa subserosa o tejido perirrectal o pericolon sin ser peritoneo
<b>T4</b>	Tumores que invaden otros órganos
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante beta (Vía de señalización)
<b>TNM</b>	Clasificación Tumor-Ganglio-Metástasis
<b>U</b>	Unidades
<b>UV</b>	Radiación ultravioleta
<b>Wnt</b>	<i>Wingless type</i> MMTV (Vía de señalización)

---



## **ANTECEDENTES**

### **ESTRUCTURA E HISTOLOGÍA DE COLON Y RECTO**

El colon o intestino grueso es la porción del tubo digestivo encargado de absorber agua y la flora bacteriana que allí habita fermenta los polisacáridos. Éste se divide en colon ascendente, transverso, descendente y sigmoideo. La última parte del tubo digestivo es el recto cuya función es almacenar temporalmente las heces fecales. Histológicamente, el colon y el recto están formados por mucosa, submucosa, muscular propia y/o serosa (Szereszowski, 2009).

### **CÁNCER COLORRECTAL**

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad que se origina por la acumulación de mutaciones en las células epiteliales del colon y recto. Dichas mutaciones promueven un crecimiento descontrolado y transforman el epitelio normal en carcinoma (Tirado-Gómez y Mohar, 2008). La secuencia adenoma carcinoma describe las alteraciones genéticas involucradas al inicio y progresión del CCR (Armaghany *et al.*, 2012).

#### **Epidemiología**

El CCR, a nivel mundial, es la tercera causa de cáncer en hombres (746,298 casos, 10% del total) y la segunda en mujeres (614,304 casos, 9.2% del total) (Ferlay *et al.*, 2012). En México es el tercer cáncer más común en hombres y mujeres (4,656 casos, 7.1% del total y 3,995 casos, 4.8% del total, respectivamente) (Ferlay *et al.*, 2012). En 2010, de acuerdo al Registro Estatal de Cáncer de Jalisco, el CCR se ubicó en el quinto lugar de mortalidad por tumor maligno según localización (Registro Estatal de Cáncer, 2010).

#### **Grados y estadios**

El CCR se clasifica según el sistema TNM (TNM, del inglés *Tumor-Nodule-Metastasis*), el cual describe el grado de extensión del tumor (T), si están afectados o no los ganglios (N) y la ausencia o presencia de metástasis (M) (Cuadro 1) (Libutti *et al.*, 2005; Obrocea *et al.*, 2011).

**Cuadro 1.** Clasificación Tumor-Ganglio-Metástasis (TNM) de la *American Joint Commission on Cancer (AJCC)*. Modificado de Libutti *et al.*, 2005 y Obrocea *et al.*, 2011.

ESTADIOS	CLASIFICACIÓN TNM		
	TUMOR (T)	GANGLIO LINFÁTICO (N)	METÁSTASIS (M)
<b>IA</b>	T1a –T1b	N0	M0
<b>IB</b>	T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T1a-T1b	N1	M0
	T2b	N0	M0
<b>IIB</b>	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T3	N1	M0
	T1a-T3	N2	M0
	T4	N0-N1	M0
<b>IIIB</b>	T4	N2	M0
	T1a-T4	N3	M0
<b>IV</b>	CUALQUIER T	CUALQUIER N	M1a-M1b

T1, tumores de la submucosa; T2, tumores de la *muscularis propia*; T3, tumores que infiltran capa subserosa o tejido perirrectal o pericolon sin ser peritoneo; T4, tumores que invaden otros órganos; N0, sin relación a ganglios linfáticos examinados; N1, metástasis a uno o tres ganglios linfáticos regionales; N2, tumores con más de tres ganglios afectados; M0, metástasis distante no aparente; M1, metástasis distante aparente.

### **Etiología**

El CCR es una enfermedad multifactorial compleja, la interacción de factores ambientales y genéticos conduce a la iniciación y progresión del cáncer (Derry *et al.*, 2013). Los factores ambientales mejor estudiados considerados como factores de riesgo para CCR son: obesidad, disminución en la actividad física, un incremento en el consumo de carnes rojas, grasas, alcohol y tabaco, además de un bajo consumo de fibra. Dentro de los factores genéticos se han visto relacionadas mutaciones génicas y polimorfismos en genes que regulan el ciclo celular y reparan el DNA (Derry *et al.*, 2013).

### **Vías moleculares que conducen al desarrollo de cáncer**

Los mecanismos que conducen al desarrollo del CCR son complejos, sin embargo, se han descrito las siguientes vías moleculares:

#### **Vía de inestabilidad cromosómica**

La vía de inestabilidad cromosómica (CIN) representa el 80-85% de los casos de CCR (Migheli y Migliore, 2012). Ésta se caracteriza por alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas e incluyen inserciones, deleciones, translocaciones, inversiones, entre otros. Aún no se conoce el mecanismo que causa CIN, sin embargo, los genes que se alteran en esta vía son los proto-oncogenes y genes supresores de tumor, implicados en la regulación del crecimiento celular, reparación del DNA, apoptosis, estabilidad cromosómica, adhesión celular y la transcripción, entre otras (Armaghany *et al.*, 2012; Hagland *et al.*, 2013). El cáncer de colon muestra cariotipos complejos y los estudios citogenéticos revelan pérdidas y ganancias de segmentos cromosómicos específicos tales como 5, 8, 16 y 18 (Hagland *et al.*, 2013). A la vía CIN también se le conoce como secuencia adenoma-carcinoma y se caracteriza por la activación de proto-oncogenes (K-ras) e inactivación de los genes supresores de tumor APC (5q21) y p53 (17p13) (Armaghany *et al.*, 2012).

#### **Vía de inestabilidad de microsatélites**

Los microsatélites son secuencias repetitivas de 2-6 pares de bases de DNA susceptibles a errores causados por la DNA polimerasa durante la replicación, dichos errores son reparados por el sistema MMR (del inglés, *Mismatch Repair System*). La vía de inestabilidad de microsatélites (MSI) se caracteriza por una alteración en los genes del sistema MMR (*MLH1*, *MSH2*, *PMS1* y *PMS2*); las células con defectos en los genes del sistema MMR son incapaces de corregir los errores de replicación producidos por la DNA polimerasa, lo que lleva a la acumulación masiva de mutaciones en las regiones que contienen microsatélites (Armaghany *et al.*, 2012). Las mutaciones en línea germinal de los genes del sistema MMR ocasionan el síndrome Lynch, un tipo de cáncer colorrectal con herencia autosómica dominante (Worthley y Leggett, 2010)

### **Vía Fenotipo Metilador de Islas CpG**

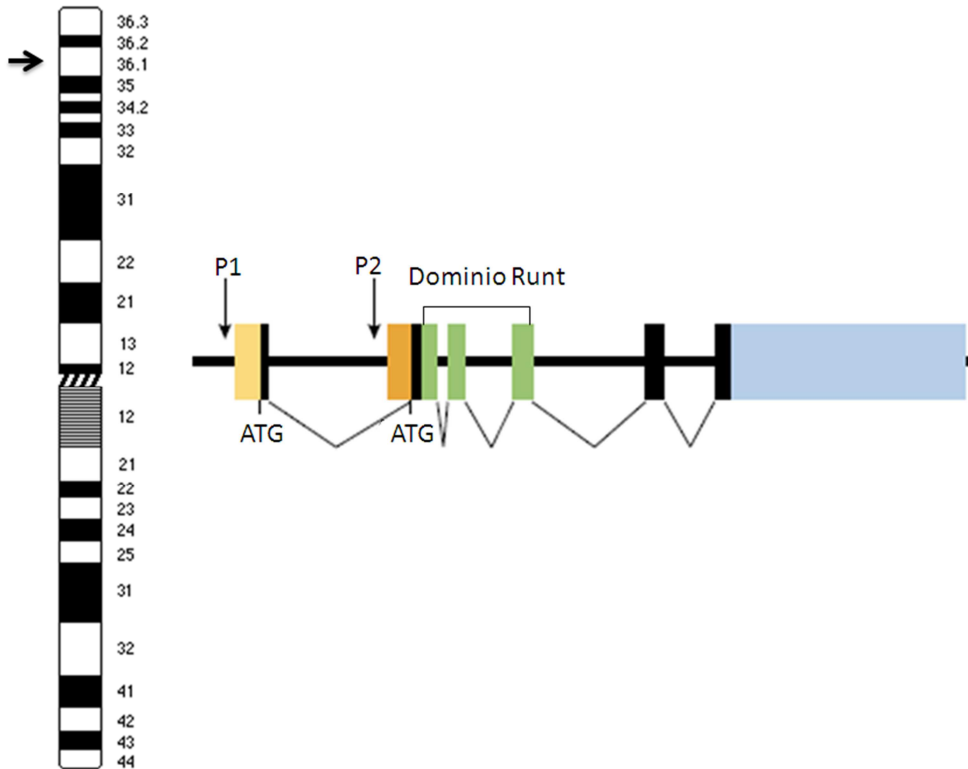
La vía fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) es la segunda vía más común en CCR esporádico, representa aproximadamente el 15% de los casos. Las islas CpG son secuencias ricas en Guaninas y Citosinas y normalmente se localizan en regiones promotoras de aproximadamente 50% de los genes humanos. Estas islas son susceptibles a metilación y están asociadas con regulación de la expresión génica. Los cambios en los patrones de metilación están relacionados con el desarrollo de cáncer debido a que resultan en silenciamiento o expresión inapropiada de genes involucrados en el control del ciclo celular, reparación del DNA, apoptosis y metástasis (Armaghany *et al.*, 2012; Hagland *et al.*, 2013).

El diagnóstico de CCR positivo para la vía CIMP se establece con el análisis de 5 marcadores *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *SOCS1*, y *RUNX3* (Worthley y Leggett, 2010).

### **RUNX3**

El gen *RUNX3* pertenece a la familia de genes *RUNX*, cuya característica común es una región conservada llamada “runt domain” (RD) que se encuentra en el gen *Runt* de *Drosophila* (Bangsow *et al.*, 2001). La familia está integrada por *RUNX1* (21q22.12), esencial para la hematopoyesis, *RUNX2* (6p21) involucrado en osteogénesis y *RUNX3* (1p36.1) relacionado con el desarrollo neuronal y la diferenciación de células T (Lee, 2011).

El gen *RUNX3* contiene 6 exones, tiene un peso de 48 kb y la transcripción está regulada por dos promotores. El promotor P1 se utiliza cuando se expresa en células hematopoyéticas mientras que el promotor P2 se utiliza en otros tipos celulares (Bangsow *et al.*, 2001) (Fig. 1).

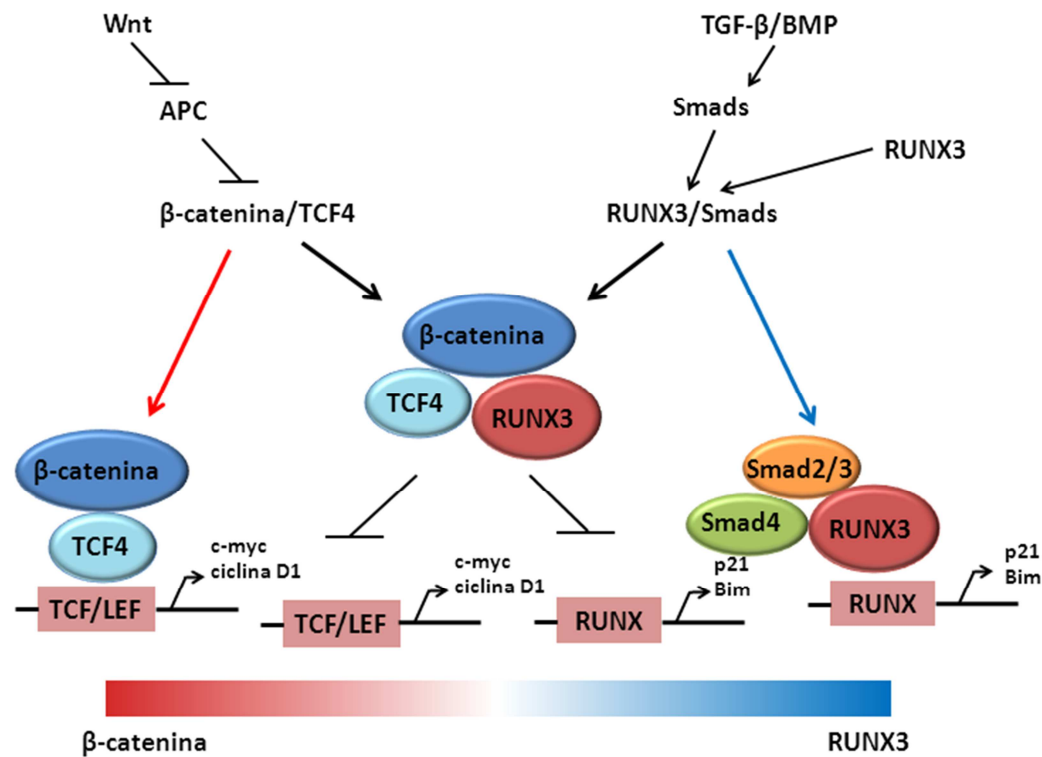


## Cromosoma 1

**Fig. 1.** Localización y estructura de *RUNX3*. P1 y P2: Promotor 1 y 2 (Modificada Levanon *et al.*, 2003).

La función de *RUNX3* es atenuar la vía de señalización Wnt. Esta vía juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular. La vía activa conduce a una acumulación de  $\beta$ -catenina en citoplasma y la posterior translocación al núcleo donde actúa como un factor de transcripción al incrementar la expresión de genes blanco tales como *CCND1* (ciclina D1) y *MYC*, las proteínas producidas por estos genes aumentan la proliferación celular. La participación de *RUNX3* consiste en disminuir la actividad de esta vía y en consecuencia disminuir la proliferación celular (Subramaniam *et al.*, 2009). Además, *RUNX3* coopera con SMAD3 y 4 para activar la vía TGF $\beta$ . Esta vía induce la transcripción de *CDKN1A* (p21) y *BCL2L11* (bim), genes asociados con inhibición del crecimiento celular e inducción de apoptosis, respectivamente (Chuang y Ito, 2010).

En CCR se ha demostrado la activación constitutiva de la vía Wnt y la inactivación de la vía TGF $\beta$  y de la proteína RUNX3, éstos son eventos importantes en el desarrollo del CCR (Subramaniam *et al.*, 2009; Chuang y Ito, 2010) (Fig. 2).



**Fig. 2.** Relación de *RUNX3* con las vías de señalización Wnt y TGF $\beta$ . Figura traducida de: <http://www.mdp.nagasaki-u.ac.jp/skeletal/research/itou/research/index.html>

### Variantes en *RUNX3*

Se han descrito aproximadamente 250 variantes para *RUNX3* en distintas regiones del gen. El polimorfismo c.53T>A (rs6672420), se localiza en el exón 1 (Fig. 3), este polimorfismo provoca un cambio del aminoácido isoleucina por asparagina en la posición 18 (I18N) (Byungho *et al.*, 2011). Hishida *et al.*, (2009) y referencias incluidas señalan que el polimorfismo está supuestamente localizado en una región reguladora negativa para unión al DNA, por lo tanto, la regulación génica realizada por *RUNX3* podría verse alterada en presencia de este polimorfismo y asociarse con el desarrollo de cáncer. Los resultados de los estudios de asociación del polimorfismo c.53T>A con cáncer que se han reportado se describen en el cuadro 2.



**Fig. 3.** Localización del polimorfismo c.53T>A.

**Cuadro 2.** Estudios de asociación del polimorfismo c.53T>A en distintos tipos de cáncer.

Población	Tipo de cáncer	n control	n Casos	P	OR (IC 95%)	Referencia
Coreana	Gástrico intestinal	431	179	0.0028	1.49 (1.15-1.93)	(Byungho L., <i>et al.</i> , 2011)
Coreana	Gástrico difuso	431	255	0.95	0.99 (0.78-1.27)	(Byungho L., <i>et al.</i> , 2011)
China	Gástrico	329	312	0.29	1.64 (0.91–2.93)	(Dongmei W., <i>et al.</i> , 2009)
Hispana de EUA	CCR	495	457	-----	1.24 (1.07-1.45)	(Slattery M. L., <i>et al.</i> , 2011)

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

*RUNX3* es un gen supresor de tumor que frecuentemente se inactiva en CCR por mutaciones o mecanismos epigenéticos. Algunas variantes localizadas en este gen pueden afectar la capacidad de unión al DNA y alterar la expresión de genes blanco. El polimorfismo c.53T>A se ha asociado con el desarrollo de CCR en población hispana que reside en EUA, sin embargo, en México aún no se han reportado datos de asociación de esta variante con CCR. Por lo tanto, se plantea la siguiente pregunta:

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe asociación del polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* con cáncer colorrectal en pacientes del Hospital Civil Juan I. Menchaca?



## **JUSTIFICACIÓN**

El CCR es un problema de salud pública mundial, en 2010, en el estado de Jalisco, el CCR fue el quinto lugar de mortalidad por tumor maligno según localización. La identificación de variantes en genes que regulan el crecimiento tumoral permitirá conocer cuales factores genéticos contribuyen al desarrollo de una enfermedad tan compleja como el CCR. Particularmente, en este trabajo se establecerá si el polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* se asocia con el desarrollo de CCR en pacientes del Hospital Civil Juan I. Menchaca.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la asociación del polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* con cáncer colorrectal en pacientes del Hospital Civil Juan I. Menchaca.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la frecuencia genotípica y alélica, así como el equilibrio de Hardy-Weinberg del polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* en un grupo de referencia.
2. Determinar la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* en pacientes con CCR del Hospital Civil Juan I. Menchaca.
3. Determinar la asociación del polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* con cáncer colorrectal en pacientes del Hospital Civil Juan I. Menchaca.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## Tipo de estudio

Transversal analítico

## Tamaño de la muestra

El tamaño de muestra se calculó utilizando la siguiente fórmula (Celis, 2004). El valor estimado de p se consideró de acuerdo a lo reportado por Slattery *et al.*, (2011) en población hispana residente en EUA. Ellos reportan una frecuencia del alelo A de 0.37.

$$n = \frac{Z^2 p(1-p)}{D^2}$$

Zcrit= Valor de Z (Corresponde al 95%).

p= Estimado de la proporción a ser medida (alelos).

D= Amplitud total del intervalo de confianza.

$$n = (1.95)^2 0.37(1-0.37) / 0.10^2 = 88.6 = 89$$

La n corresponde a 89 individuos para el grupo de CCR y también se incluyó un grupo de referencia con 121 individuos. Ambos grupos de estudio provienen del Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca”.

## Criterios de selección del grupo de estudio.

### Criterios de inclusión

Grupo de referencia:

- Individuos que acuden al banco de sangre del Hospital Civil Juan I. Menchaca y que no tuvieron antecedentes familiares de cáncer.

Grupo de pacientes:

- Muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de cáncer colorrectal esporádico que acudieron al servicio de colon y recto del Hospital Civil Juan I. Menchaca.

### **Criterios de exclusión**

**En ambos grupos se excluirán de este estudio a los individuos que presenten las siguientes características**

- Individuos que fueron recientemente transfundidos
- Individuos que no firmen una carta de consentimiento informado

### **Criterios de eliminación**

- Muestras de DNA degradadas o insuficientes para establecer el genotipo

### **Estrategia metodológica**

#### ***Extracción de DNA***

Para la extracción de DNA de sangre periférica se utilizó el método de Miller *et al.* (1988) combinado con un micrométodo (Gustincich *et al.* 1991). El procedimiento general fue el siguiente: primero se destruyeron las células con amortiguador de lisis para eritrocitos y leucocitos, después se utilizó cloroformo para desnaturalizar las proteínas. El DNA se precipitó con la sal CTAB y agua, una vez que se obtuvo el DNA se lavó con etanol. Finalmente se disolvió el DNA en buffer TE (Anexo).

#### ***Cuantificación del DNA***

El DNA se cuantificó por espectrofotometría a 260nm para determinar su cantidad. La presencia de proteínas se evaluó a 280nm, y la relación 260/280 determinó la pureza de la muestra (Anexo).

#### ***Amplificación por PCR***

Una vez realizada la extracción de DNA se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) el fragmento de *RUNX3* seleccionado en el estudio. La secuencia de los iniciadores así como el tamaño del producto amplificado se describen en el cuadro 3 (Anexo).

**Cuadro 3.** Secuencia de los iniciadores para *RUNX3* y tamaño de producto amplificado (Zhang *et al.*, 2008)

Gen	Polimorfismo	Iniciadores	Producto amplificado
<i>RUNX3</i>	c.53T>A	F: 5'..GGGCTATTGTTACTCACCGCG..3' R: 3'..AACCCCCTGAAGGGCTGAAAAT..5'	120 pb

#### *Digestión enzimática*

Para la identificación del polimorfismo se realizó digestión enzimática utilizando la técnica de RFLP's (del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) con la enzima de restricción *BtsCI*. La digestión enzimática se realizó a 50°C durante 16 h. El cuadro 4 muestra la enzima de restricción que se empleó y el tamaño de los fragmentos que se obtuvieron (Anexo).

**Cuadro 4.** Productos obtenidos una vez que se realizó la digestión enzimática con la enzima de restricción *BtsCI* para el polimorfismo c.53T>A.

Gen	Polimorfismo	Enzima de restricción	Fragmentos esperados
<i>RUNX3</i>	c.53T>A	<i>BtsCI</i>	Homocigoto T/T 120pb Heterocigoto A/T 120, 93, 27pb Homocigoto A/A 93, 27pb

Secuencia de reconocimiento y corte de la enzima de restricción *BtsCI*



5'-GGGCTATTGTTACTCACCGCGGATGAAAGGTCGGCGAGTAGGTCGGGAAGGAGTCGAAG  
ATGCTGTTCGATGCCATGCCCGCTCTGAAGAAGGCGAGAATTTTCAGCCCTCAGGGGGTT-3'

**Fig. 4.** Secuencia parcial del gen *RUNX3* donde se localizan los iniciadores para la PCR (amarillo) y el sitio de reconocimiento de la enzima *BtsCI* (letra color rojo). El sitio polimórfico se muestra en azul.

### *Electroforesis*

Los fragmentos obtenidos se analizaron en geles de poliacrilamida al 6% con una proporción acrilamida-bisacrilamida 29:1. La tinción se realizó con nitrato de plata (Anexo).

### *Análisis estadístico*

Las frecuencias alélicas y genotípicas se estimaron por el método de conteo y el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) con el programa Arlequín v11.0. El análisis de asociación se estimó por *Odds Ratio* (OR). Una  $p < 0.05$  se consideró como significativa (Anexo).

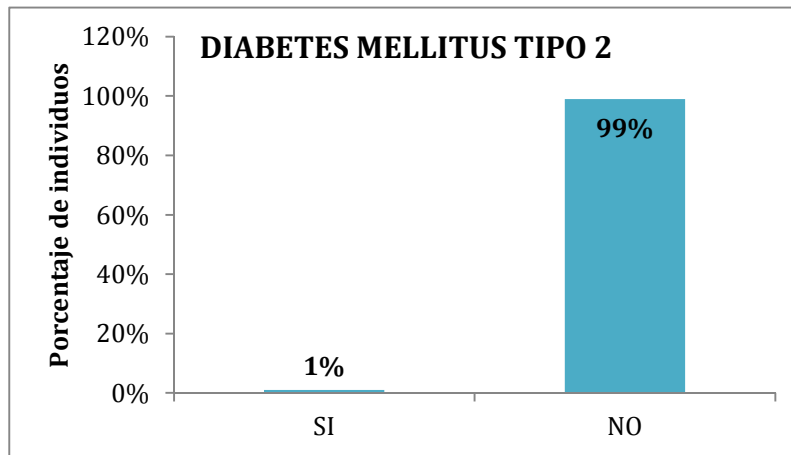
### *Consideraciones éticas.*

De acuerdo al título quinto, capítulo único, artículo 100 de la ley general de salud (Últimas Reformas DOF 24-04-2013) en lo que se refiere a “Investigación para la Salud”. Todos los individuos fueron informados sobre los objetivos del estudio así como del riesgo mínimo que implicó la toma de sangre periférica. Una vez que aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo). En todo momento se mantuvo la confidencialidad de los datos personales así como de los resultados producto de este proyecto.

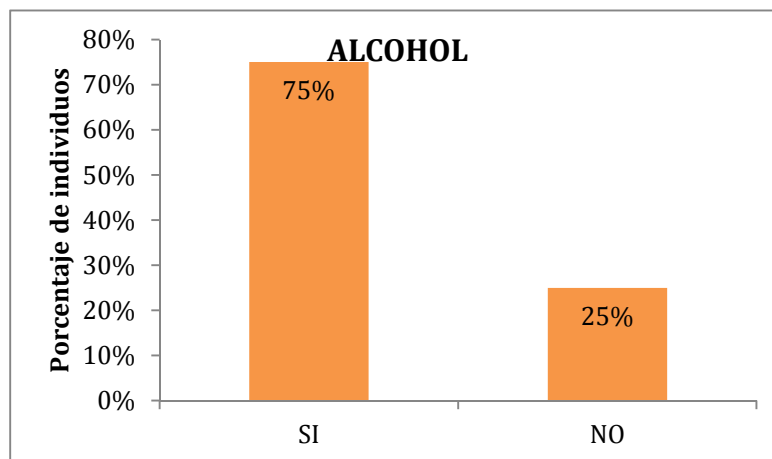
## RESULTADOS

### GRUPO DE REFERENCIA

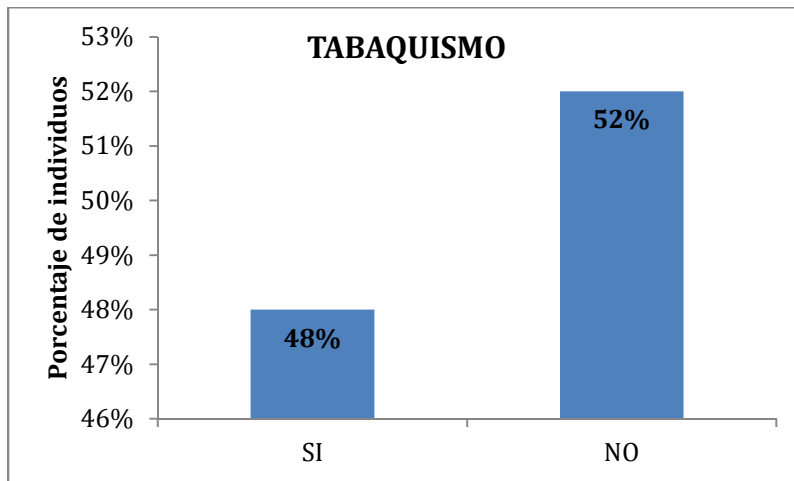
El grupo de referencia estuvo integrado por 121 individuos con una edad promedio de 35 años (rango de edad 19-61 años) y el 60% fue del género masculino. Adicionalmente, se obtuvieron datos de consumo de alcohol, tabaco, presencia de diabetes y si realizaban o no actividad física. Las figuras 5-8 muestran la proporción de individuos para cada una de las variables.



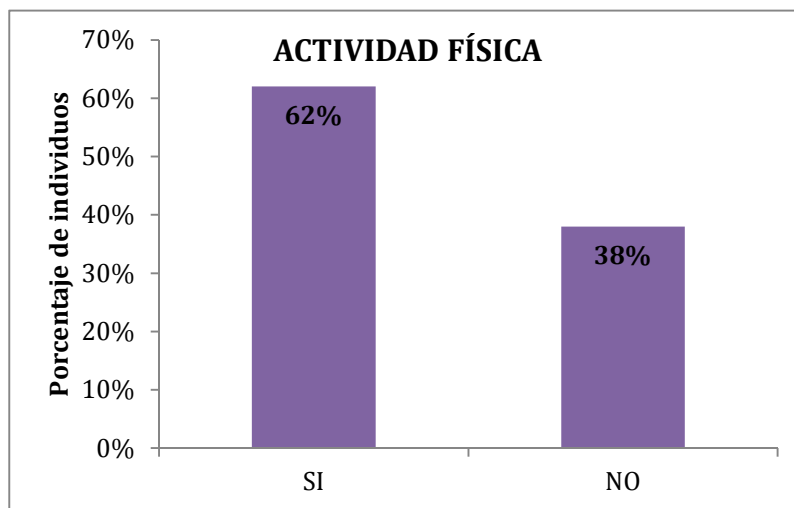
**Fig. 5.** Porcentaje de individuos que presentan diabetes mellitus tipo 2.



**Fig. 6.** Porcentaje de individuos que consumen alcohol.



**Fig. 7.** Porcentaje de individuos que consumen tabaco.



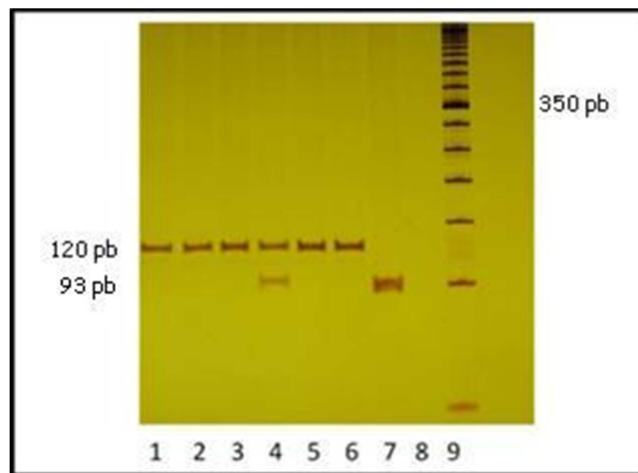
**Fig. 8.** Porcentaje de individuos que realizan actividad física.

### POLIMORFISMO c.53T>A

Se realizó PCR-RFLP para el polimorfismo c.53T>A en 121 individuos del grupo de referencia. Los resultados obtenidos determinan que la población se encuentra en EHW como se muestra en el cuadro 5. Las frecuencias alélicas corresponden a 0.22 para el alelo A y a 0.78 para el alelo T. Los resultados de los genotipos se muestran en la figura 9.

**Cuadro 5.** Genotipos observados y esperados del polimorfismo c.53T>A en 121 individuos del grupo de referencia y resultado del EHW.

	OBSERVADO		ESPERADO	
	n= 121	%	n= 121	%
T/T	73	60.3	74	61.2
A/T	43	35.5	41	33.9
A/A	5	4.2	6	4.9
<b>EHW</b>	<b>p=0.79</b>			



**Fig. 9.** Ejemplo de genotipos obtenidos para el polimorfismo c.53T>A en el grupo de referencia. Carriles 1-3, 5 y 6 homocigotos T/T, carril 4 heterocigoto A/T, carril 7 homocigoto A/A y carril 9 marcador de peso molecular de 50 pb (el fragmento de 27pb no se alcanza a observar en el gel).



## COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ENTRE DIFERENTES POBLACIONES

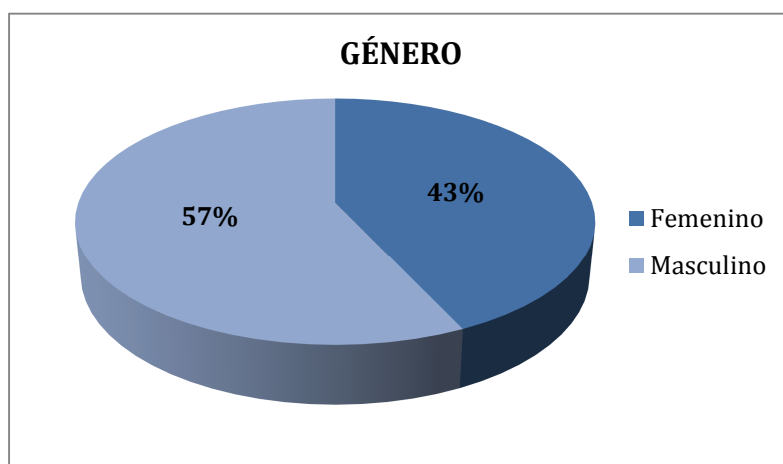
Las frecuencias genóticas del grupo de referencia fueron comparadas con las frecuencias descritas por la población china y coreana, a la fecha éstas son las dos únicas poblaciones que han reportado dichos datos. Los resultados de la comparación muestran similitud con ambas poblaciones (cuadro 6).

**Cuadro 6.** Comparación de la distribución de genotipos del polimorfismo c.53T>A del grupo de referencia con otras poblaciones.

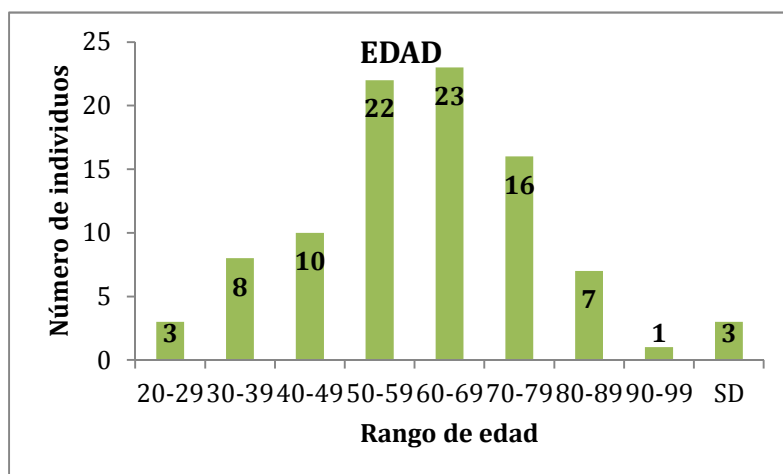
AUTOR/AÑO	N	POBLACIÓN	T/T	A/T	A/A	p
Byungho L., <i>et al.</i> , 2011	431	Coreana	214	185	32	0.097
Dongmei W., <i>et al.</i> , 2009	326	China	161	142	23	0.105
Este estudio	121	Mexicana	73	43	5	0.79

## PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

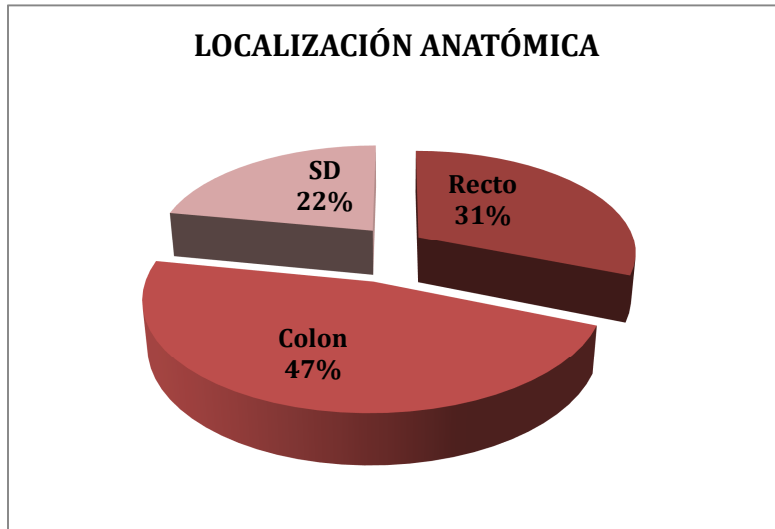
Se analizaron 93 pacientes con CCR, con una edad promedio de 60 años (rango de edad 20-96 años) también se obtuvo información de género, edad, localización anatómica del tumor, consumo de alcohol, tabaco, presencia o ausencia de diabetes mellitus tipo 2 y si realizaban o no actividad física. Las frecuencias de estas variables se observan en las figuras 10-16.



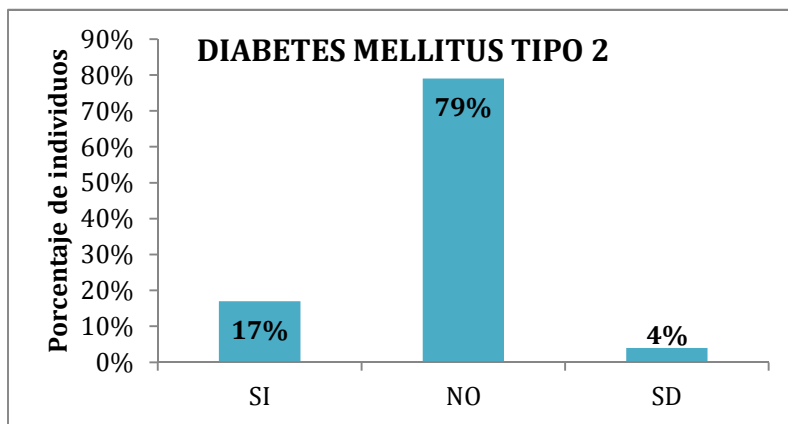
**Fig. 10.** Relación por género de pacientes con CCR.



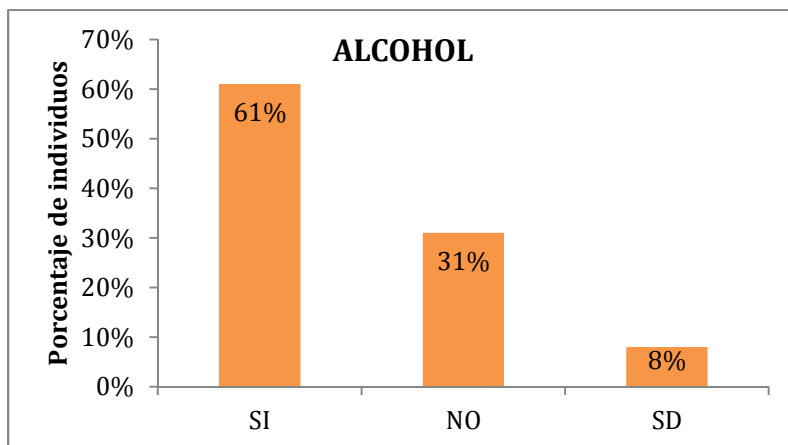
**Fig. 11.** Número de pacientes con CCR de acuerdo a la edad.



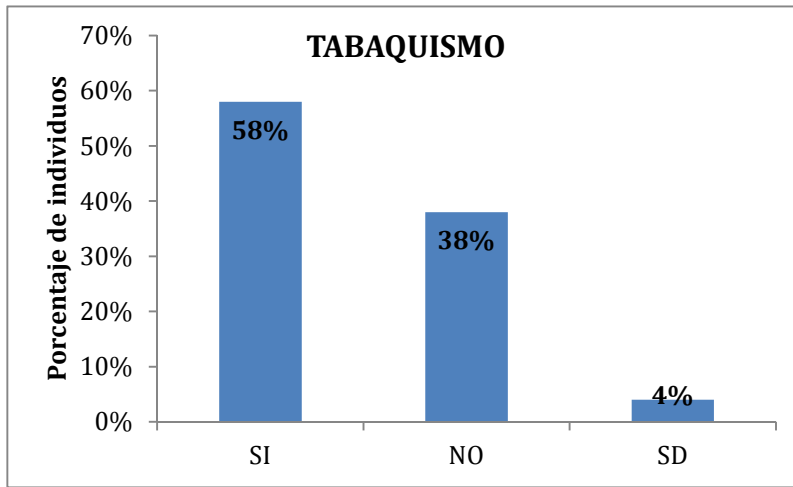
**Fig. 12.** Porcentaje de pacientes de acuerdo a la localización anatómica del tumor.



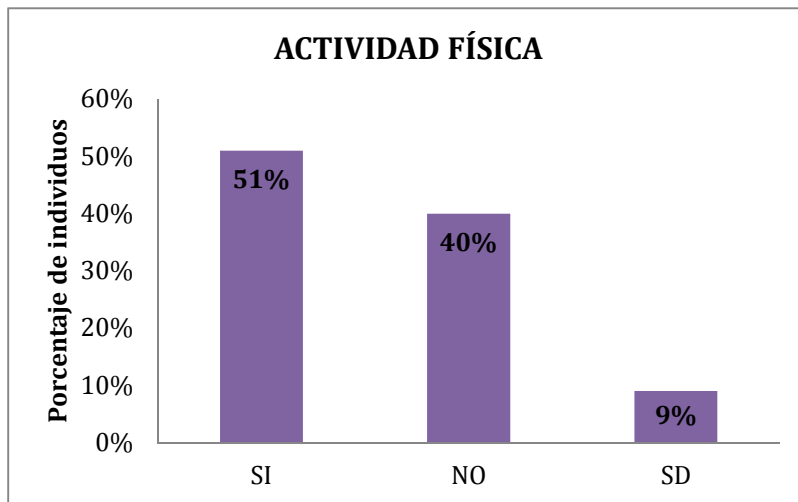
**Fig. 13.** Porcentaje de pacientes que presentan diabetes mellitus tipo 2.



**Fig. 14.** Porcentaje de pacientes que consumen alcohol.



**Fig. 15.** Porcentaje de pacientes que consumen tabaco.



**Fig. 16.** Porcentaje de pacientes que realizan actividad física.

### POLIMORFISMO c.53T>A

Se realizó la estimación de la distribución genotípica y alélica para c.53T>A en 93 muestras de sangre periférica de pacientes con CCR. Se observaron diferencias significativas en las frecuencias del genotipo A/A (OR=3.56 e IC=1.139-11.130; p=0.02) y el alelo A (OR=1.78 e IC=1.159-2.744; p=0.008). Las frecuencias alélicas y genotípicas para c.53T>A en los pacientes con CCR y en el grupo de referencia se describen en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo c.53T>A entre pacientes con CCR y el grupo de referencia.

<b>c.53T&gt;A</b>	<b>GRUPO DE REFERENCIA</b>	<b>PACIENTES CCR</b>	<b>OR (95% IC)</b>	<b>P*</b>
<b>Genotipo</b>	n= 121 (%)	n=93 (%)		
T/T	73 (60)	41 (44)	1.0 (Referencia)	
A/T	43 (36)	42 (45)	1.73 (0.982-3.081)	0.05
A/A	5 (4)	10 (11)	3.56 (1.139-11.130)	<b>0.02</b>
<b>Alelo</b>				
T	189 (78)	124 (67)	1.0 (Referencia)	
A	53 (22)	62 (33)	1.78 (1.159-2.744)	<b>0.008</b>

\*Chi-cuadrada o exacta de Fisher

## DISCUSIÓN

El CCR es una enfermedad compleja con interacción de múltiples factores ambientales y genéticos. Dentro de los factores genéticos, se ha reportado que el gen *RUNX3* participa en proliferación celular y la apoptosis a través de las vías de señalización Wnt y TGF $\beta$ . Estos procesos se ven afectados durante el desarrollo del CCR. En este estudio se analizó la asociación del polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* en CCR. Los resultados mostraron que los individuos portadores de genotipo A/A tienen tres veces más riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (OR=3.56), mientras que los individuos portadores del alelo A tienen casi dos veces más riesgo (OR=1.78). Esto es similar a lo reportado por Slattery *et al.* (2011), este grupo de investigadores reportan que individuos portadores del genotipo A/A tienen más riesgo de desarrollar CCR (OR=1.24 e IC=1.07-1.45), esto en población de Utah. Sin embargo, para cáncer gástrico se han reportado resultados contradictorios; en el estudio realizado por Byungho *et al.* (2011), en pacientes de origen coreano, el análisis de este polimorfismo con cáncer gástrico mostró asociación con el tipo intestinal pero no con difuso, sin embargo, en otro estudio realizado en población china no se observó asociación (Dongmei, *et al.*, 2009).

Las frecuencias genotípicas del polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* que se observaron en esta población fueron comparadas con las reportadas en población china (Dongmei, *et al.*, 2009) y coreana (Byungho *et al.*, 2011) y no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). La comparación con la población de Utah (Slattery *et al.*, 2011) no pudo ser analizada porque no se reportaron datos de frecuencias genotípicas solo de asociación.

El efecto del polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* no se conoce, aunque se ha propuesto que afecta la unión al DNA (Hishida *et al.*, 2009). Además, en la base de datos de *Ensembl* se reportan efectos contradictorios para esta variante, es decir, efecto deletéreo establecido con el programa SIFT (0.02), el cual predice si la sustitución de un aminoácido afecta la función de la proteína, y benigno por PolyPhen (0.007), el cual predice el impacto de la sustitución de un aminoácido sobre la estructura y función de la proteína. Sin embargo, el cambio del aminoácido isoleucina (polar) por asparagina (no polar) pudiera afectar la interacción con las proteínas de las vías Wnt y TGF $\beta$ , y en consecuencia, favorecer el desarrollo del CCR.

## CONCLUSIONES

1. El polimorfismo c.53T>A del gen *RUNX3* se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población del grupo de referencia.
2. El genotipo A/A del gen *RUNX3* se asoció con CCR en pacientes del hospital civil “Juan I. Menchaca”.
3. El alelo A del gen *RUNX3* se asoció con CCR en pacientes del hospital civil “Juan I. Menchaca”.

## BIBLIOGRAFÍA

- Armaghany T., Wilson D., Chu Q., Mills G. 2012. *Genetics Alterations in Colorectal Cancer*. *Gastrointest Cancer Res*, 5:19-27.
- Bangsow C., Rubins N., Glusman G., Bernstein Y., Negreanu V., Goldenberg D., Lotem J., Ben-Asher E., Lancet D., Levanon D., Groner Y. 2001. *The RUNX3 gene-sequence, structure and regulated expression*. *Gene*, 279:221-232.
- Byungho L., Hyoungeok J., Minjin K., Changwon K. 2011. *Increased Genetic Susceptibility to Intestinal Type Gastric Cancer Is Associated With Increased Activity of the RUNX3 Distal Promoter*. *Cancer*, 117:5161-5171.
- Celis A. 2004. *Bioestadística*. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México.
- Chuang, LSH., Ito Y. 2010. *RUNX3 Is multifunctional in carcinogenesis of multiple solid tumors*. *Oncogene*, 29:2605-2615.
- Derry M., Raina K., Agarwal Ch., Argarwal R. 2013. *Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention*. *Front Oncol*, 119:1-20.
- Dongmei W., Yuanyuan T., Weida G., Haixia Z., Zhizhong Z., Meilin W., Shizhi., Ming T., Haorong W., Zhengdong Z. 2009. *Genetic variants in the Runt-related transcription factor 3 gene contribute to gastric cancer risk in a Chinese population*. *Cancer Sci*, 100:1688-1694.
- Ferlay J., Shin H., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: *International Agency for Reserch on Cancer; 2013*. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, accesado el 14/01/2014.
- García Pérez H. 2000. *Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia*. *Universo Diagnostico*, 1:31-41.
- Giouleme O., Diamantidis D. M., Katsaros G. M. 2011. *Is diabetes a causal agent for colorectal cáncer? Pathophysiological and molecular mechanisms*. *World J. Gastroenterol*, 17(4): 444-448.
- Gustincich S., Manfioletti G., Del Sal G., Schneider C., Caminci P. 1991. *A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood*. *Biotechniques*, 11:298-302.



- Hagland H., Berg M., Jolma I., Carlsen A., Søreide K. 2013. *Molecular Pathways and Cellular Metabolism in Colorectal Cancer*. DigSurg, 30:12–25.
- Hishida A., Matsuo K., Goto Y., Mitsuda Y., Naito M., Wakai K., Tajima K., Hamajima N. 2009. *Significant association of RUNX3 T/A polymorphism at intron 3 (rs760805) with the risk of gastric atrophy in Helicobacter pylori seropositive Japanese*. J Gastroenterol, 44:1165–1171.
- Jeon J., Hyoun D., Geun M., Lee j., Hui S., Park J., Lee M., Santo K., Ligibel J., Meyerhardt J., Kim N. 2013. *Impact of Diabetes on Oncologic Outcome of Colorectal Cancer Patients: Colon vs. Rectal Cancer*. PLoS ONE, 8(2): e55196.
- Lee Y. 2011. *Control of RUNX3 by histone methyl transferases*. Cell Biochem, 112:394–400.
- Levanon D., Brenner O., Otto F., Groner Y. 2003. *Runx3 knockouts and stomach cancer*. EMBO Rep., 6:560-564.
- Libutti S., Saltz L., Rustgi A., Tepper J. 2005. *Cancer of the colon en Cancer, Principles and Practice of Oncology*. De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. pp. 2897.
- Migheli F., Migliore L. 2012. *Epigenetics of colorectal cancer*. ClinGenet, 81: 312–318.
- Miller S., Dykes D., Polesky H. 1998. *A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells*. Nucleic Acids Res., 16:1215.
- Morgan V., Silva U., Sat M. 2008. *Factores de riesgo para cáncer colorrectal*. Gaceta Mexicana de Oncología, Suplemento, 4(7):12-15.
- Nakashima H., Akahoshi M., Tanaka Y. 2003. *Capítulo 46, mutation detection using RT-PCR-RFLP Methods in molecular biology*. Barlett-John MS y Stirling D. PCR protocols, segunda edición, Editorial Humana Press, 319-322.
- Obrocea F., Sajin M., Marinescu E., Stoica D. 2011. *Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting*. Rom J Morphol Embryol, 52:537–544.
- Registro Estatal de Cáncer en Jalisco, Boletín 2010. Disponible en:  
[http://visita.jalisco.gob.mx/wps/wcm/connect/7d4bb7004e2507f9832d876f6fa8dd9c/RegistroCancer\\_2010.pdf?MOD=AJPERES](http://visita.jalisco.gob.mx/wps/wcm/connect/7d4bb7004e2507f9832d876f6fa8dd9c/RegistroCancer_2010.pdf?MOD=AJPERES)

- Sambrock J., Russel D. 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tercera edición.
- Slattery M., Lundgreen A., Herrick J., Caan B., Potter J., Wolff R. 2011. *Associations between genetic variation in RUNX1, RUNX2, RUNX3, MAPK1 and eIF4E and risk of colon and rectal cancer: additional support for a TGF- $\beta$ -signaling pathway*. *Carcinogenesis*. 32:318-326.
- Subramaniam M., Chan J., Yeoh K. 2009. *Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 1796:315-331.
- Szereszewski J. 2009. *Anatomía quirúrgica del colon*. *Cirugía Digestiva*, 301:1-6.
- Tirado-Gómez L., Mohar B. 2008. *Epidemiología del cáncer de colon y recto*. *Gaceta Mexicana de Oncología, Suplemento*, 4:3-11.
- Worthley D., Leggett B. 2010. *Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities*. *Clin Biochem Rev*, 31(2):31-38.
- Zhang Z., Wang S., Wang M., Tong N., Fu G. Zhang Z. 2008. *Genetic variants in RUNX3 and risk of bladder cancer: a haplotype-based analysis*. *Carcinogenesis*, 29:1973-1978.

# ANEXOS

## CONSENTIMIENTO INFORMADO GRUPO DE REFERENCIA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA “DR. ENRIQUE CORONA RIVERA”

### CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Por medio de la presente doy mi autorización a la Dra. en C. María de la Luz Ayala Madrigal, a la Dra. en C. Melva Gutiérrez Angulo o al M. en C. José Miguel Moreno Ortiz extraerme 5ml de sangre periférica. La toma de muestra es para la realización de la investigación sobre:

“ANÁLISIS DE VARIANTES GÉNICAS EN INDIVIDUOS DE POBLACIÓN GENERAL”

1. He sido informado (a) acerca del proyecto y he sido invitado (a) a participar en el mismo, aportando información y muestra de sangre de mi persona.
2. Entiendo que el procedimiento para la toma de muestra representa molestias y que exige un riesgo mínimo de daño físico para mi persona.
3. Acepto que no recibiré compensación alguna por lo cual libero a los investigadores y las instituciones participantes de toda obligación económica para conmigo.
4. Autorizo a los investigadores mencionados a realizar los procedimientos de laboratorio convenientes al proyecto, incluidos estudios de ADN así como otros relacionados con el mismo y a hacer uso de las muestras y la información con fines científicos, docentes y estadísticos, siempre y cuando se haga en el marco de la ética profesional y se guarde la confidencialidad de los mismos.
5. Mi participación en este proyecto es voluntaria y puede terminar en el momento que yo así lo decida y lo exprese a los investigadores responsables.
6. Yo puedo localizarlos en el teléfono (01-33) 10585200, extensión 34003.

Nombre y firma del donador

---

Nombre del testigo

Nombre del testigo

---

Fecha

Fecha

---



## CUESTIONARIO PARA INDIVIDUOS DEL GRUPO DE REFERENCIA



### DATOS GENERALES

Nombre \_\_\_\_\_

Género \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Estatura \_\_\_\_\_ Peso \_\_\_\_\_

**Originario de:**

Población \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_

Estado \_\_\_\_\_

Lugar de residencia \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Ocupación \_\_\_\_\_

**Abuelos y Padres:**

Originarios de \_\_\_\_\_

Lugar de residencia \_\_\_\_\_

Nombre de quien realiza la encuesta \_\_\_\_\_

Fecha de realización de la encuesta \_\_\_\_\_

## DATOS SOBRE EL ESTILO DE VIDA

<i>Consumo de alcohol</i>		<i>Negativo ( )</i>	<i>Positivo ( )</i>
Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	< 500ml (Ej. Una cerveza)	( )
Por semana	( )	500ml – 3L (Ej. 6 – 7 cervezas)	( )
Por mes	( )	4L – 10L (Ej. >20 cervezas)	( )
Por año	( )	Otro _____	
Otro	_____		
Observaciones _____			

<i>Consumo de tabaco</i>		<i>Negativo ( )</i>	<i>Positivo ( )</i>
Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	< 5 cigarros	( )
Por semana	( )	6 cigarros – 1 cajetilla	( )
Por mes	( )	2 cajetillas – 3 cajetillas	( )
Por año	( )	Otro _____	
Otro	_____		
Observaciones _____			

<i>Alimentación: Consumo de carnes</i>		<i>Negativo ( )</i>	<i>Positivo ( )</i>
Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	< 200gr (Ej. Un bistec, una pechuga)	( )
Por semana	( )	250 – 500gr	( )
Por mes	( )	500gr – 1kg	( )
Por año	( )	Otro _____	
Otro	_____		
Observaciones _____			

**Alimentación: Consumo de lácteos con lactobacillus**      **Negativo ( )**      **Positivo ( )**

Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	250ml (Ej. Un vaso de leche)	( )
Por semana	( )	+251 – 500ml	( )
Por mes	( )		
Por año	( )		
Otro	_____		

Observaciones \_\_\_\_\_

**Alimentación: Consumo de frutas**      **Negativo ( )**      **Positivo ( )**

Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	1	( )
Por semana	( )	2 – 3	( )
Por mes	( )	4 o más	( )
Por año	( )	Otro	_____
Otro	_____		

Observaciones \_\_\_\_\_

**Alimentación: Consumo de verduras**      **Negativo ( )**      **Positivo ( )**

Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	1	( )
Por semana	( )	2 – 3	( )
Por mes	( )	4 o más	( )
Por año	( )	Otro	_____
Otro	_____		

Observaciones \_\_\_\_\_

**Alimentación: Consumo de pan y cereales**      **Negativo ( )**      **Positivo ( )**

Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	< 100gr (Ej. Una pieza de pan, un bolillo)	( )
Por semana	( )	100 – 500gr	( )
Por mes	( )	501gr– 1kg	( )
Por año	( )	Otro _____	
Otro	_____		

Observaciones \_\_\_\_\_

**Actividad física**      **Negativo ( )**      **Positivo ( )**

Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	< 1 hora	( )
Por semana	( )	1 hora – 3 horas	( )
Por mes	( )	4 horas – 5 horas	( )
Por año	( )	Otro _____	
Otro	_____		

Observaciones \_\_\_\_\_

**Diabetes Mellitus**      **Negativo ( )**      **Positivo ( )**

Tiempo de diagnóstico:	
Hace menos de 1 año	( )
De 1 – 5 años	( )
De 6 – 10 años	( )
Otro	_____

Observaciones \_\_\_\_\_

## CONSENTIMIENTO INFORMADO INDIVIDUOS CON CÁNCER COLORRECTAL

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO  
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA “DR. ENRIQUE CORONA RIVERA”  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

### CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Por medio de la presente doy mi autorización para que me sea extraída una muestra de sangre de aproximadamente 5ml para participar en el protocolo:

“ANÁLISIS DE VARIANTES GÉNICAS EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL”

Cuyos investigadores responsables son las Doctoras María de la Luz Ayala Madrigal y Melva Gutiérrez Angulo.

1. He sido informado (a) acerca del proyecto y he sido invitado (a) a participar en el mismo, aportando información y muestra de sangre de mi persona.
2. Entiendo que el procedimiento para la toma de muestra representa molestias y que exige un riesgo mínimo de daño físico para mi persona.
3. Acepto que no recibiré compensación alguna por lo cual libero a los investigadores y las instituciones participantes de toda obligación económica para conmigo.
4. Autorizo a los investigadores mencionados a realizar los procedimientos de laboratorio convenientes al proyecto, incluidos estudios de ADN así como otros relacionados con el mismo y a hacer uso de las muestras y la información con fines científicos, docentes y estadísticos, siempre y cuando se haga en el marco de la ética profesional y se guarde la confidencialidad de los mismos.
5. Mi participación en este proyecto es voluntaria y puede terminar en el momento que yo así lo decida y lo exprese a los investigadores responsables.
6. Yo puedo localizarlos en el teléfono (01-33) 10585200, extensión 34003.

Nombre y firma del paciente

---

Nombre del testigo

Nombre del testigo

---

Fecha

---

Fecha

---





# CUESTIONARIO PARA INDIVIDUOS CON CÁNCER COLORRECTAL



## DATOS GENERALES

Nombre \_\_\_\_\_

Registro (Hospital) \_\_\_\_\_ Registro (Histopatología) \_\_\_\_\_

Género \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Estatura \_\_\_\_\_ Peso \_\_\_\_\_

Población \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_

Estado \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

Nombre de quien realiza la encuesta \_\_\_\_\_

Fecha de realización de la encuesta \_\_\_\_\_

## DATOS SOBRE EL ESTILO DE VIDA

<i>Consumo de alcohol</i>	<i>Negativo ( )</i>	<i>Positivo ( )</i>
Frecuencia:	Cantidad:	
Por día ( )	< 500ml (Ej. Una cerveza)	( )
Por semana ( )	500ml – 3L (Ej. 6 – 7 cervezas)	( )
Por mes ( )	4L – 10L (Ej. >20 cervezas)	( )
Por año ( )	Otro _____	
Otro _____		
Observaciones _____		

<i>Consumo de tabaco</i>	<i>Negativo ( )</i>	<i>Positivo ( )</i>
Frecuencia:	Cantidad:	
Por día ( )	< 5 cigarros	( )
Por semana ( )	6 cigarros – 1 cajetilla	( )
Por mes ( )	2 cajetillas – 3 cajetillas	( )
Por año ( )	Otro _____	
Otro _____		
Observaciones _____		

**Alimentación: Consumo de carnes****Negativo ( ) Positivo ( )**

Frecuencia:

Por día ( )

Por semana ( )

Por mes ( )

Por año ( )

Otro \_\_\_\_\_

Cantidad:

&lt; 200gr (Ej. Un bistec, una pechuga) ( )

250 – 500gr ( )

500gr – 1kg ( )

Otro \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_

**Alimentación: Consumo de lácteos****Negativo ( ) Positivo ( )**

Frecuencia:

Por día ( )

Por semana ( )

Por mes ( )

Por año ( )

Otro \_\_\_\_\_

Cantidad:

&lt;250ml (Ej. Un vaso de leche) ( )

250 – 500ml ( )

501ml – 1L ( )

Otro \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_

**Consumo de frutas y verduras****Negativo ( ) Positivo ( )**

Frecuencia:

Por día ( )

Por semana ( )

Por mes ( )

Por año ( )

Otro \_\_\_\_\_

Cantidad:

&lt; 250gr (Ej. manzana, naranja) ( )

200 – 500gr (Ej. Biónico) ( )

501gr – 1kg ( )

Otro \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_

**Alimentación: Consumo de pan y cereales**    *Negativo ( )    Positivo ( )*

Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	< 100gr (Ej. Una pieza de pan, un bolillo)	( )
Por semana	( )	100 – 500gr	( )
Por mes	( )	501gr– 1kg	( )
Por año	( )	Otro _____	
Otro	_____		

Observaciones \_\_\_\_\_

**Actividad física**    *Negativo ( )    Positivo ( )*

Frecuencia:		Cantidad:	
Por día	( )	< 1 hora	( )
Por semana	( )	1 hora – 3 horas	( )
Por mes	( )	4 horas – 5 horas	( )
Por año	( )	Otro _____	
Otro	_____		

Observaciones \_\_\_\_\_

*Diabetes Mellitus* Negativo ( ) Positivo ( )

Tiempo de diagnóstico:

Hace menos de 1 año ( )

De 1 – 5 años ( )

De 6 – 10 años ( )

Otro \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_

*Diabetes* Negativo ( ) Positivo ( )

*Sobrepeso* Negativo ( ) Positivo ( )

Nota: se considera **sobrepeso** si se supera el 10% del peso corporal ideal y de **obesidad** si se supera en más de un 15%.

Observaciones \_\_\_\_\_

## DATOS SOBRE LA ENFERMEDAD

Diagnóstico	_____
Etapa	_____
Localización del tumor	_____
Presencia de pólipos	_____
Presencia y localización de metástasis	_____
¿Ha padecido colitis ulcerativa?	_____
¿Ha padecido enfermedad de CROHN?	_____
Antecedentes oncológicos	_____
Observaciones generales	_____
	_____
	_____
	_____
	_____
	_____
	_____
	_____
	_____
	_____

# TÉCNICAS DE LABORATORIO

## EXTRACCIÓN DE DNA

**Fundamento:** Existen diferentes protocolos para la extracción de ácidos nucleicos. La mayoría se caracterizan por el empleo de detergentes y solventes orgánicos que lisan los núcleos de las células y remueven las proteínas adheridas al DNA, seguidos por la precipitación de este con etanol. En el presente estudio se utilizó el método de Miller combinado con un micrométodo (Gustincich *et al.* 1991; Miller *et al.* 1998).

### **Equipo:**

- Refrigerador
- Centrifuga
- Termoblock
- Microcentrífuga

### **Material:**

- Guantes desechables
- Cubrebocas
- Gasas
- Tubos de 15ml
- Tubos Eppendorf de 2.0 y 1.5 ml
- Pipeta graduable de 100 y 1000  $\mu$ l
- Puntillas de 100 y 1000  $\mu$ l

### **Reactivos:**

- Solución de lisis de eritrocitos
- Solución DTAB 8%
- Solución CTAB 5%
- Cloroformo 100%
- NaCl 1.2 M.
- Etanol 100%
- Etanol 70%
- Agua inyectable

***Procedimiento:***

1. Tomar 5-10 ml de sangre periférica por punción venosa en un tubo con EDTA.
2. Vaciar la sangre total a un tubo de 15 mL, agregar 10 ml de Solución de Lisis de Eritrocitos y se lleva a refrigeración durante 20 min; se centrifuga a 4,000 rpm durante 25 min.
3. Se descarta el sobrenadante y se obtiene el botón celular.
4. El botón celular se transfiere a un tubo Eppendorf de 2 ml.
5. Al tubo con el botón celular se le agregan 600 µl de solución DTAB y se lleva a 65-68 °C durante 5 min.
6. Al tubo se le adiciona 900µl de cloroformo al 100%, se agita vigorosamente. Se centrifuga a 12,000 rpm durante 7 min.
7. Se obtiene el sobrenadante y se transfiere a otro tubo. (Se desecha el botón celular y el cloroformo precipitados).
8. Al sobrenadante se le agrega 100 µl de CTAB al 5% y se agitan suavemente (8-10 veces), posteriormente se agrega 900 µl de agua de solución inyectable y se agita suavemente. (Se precipita el DNA).
9. Se centrifuga a 10,000 rpm durante 5 min.
10. Se descarta el sobrenadante y se agrega 150 µl de NaCl 1.2 M y 750 µl de etanol 100% frío y se mezcla suavemente.  
Se centrifuga a 10,000rpm durante 5 min.
11. Se descarta el sobrenadante y se agrega 1 ml de etanol al 70% y se centrifuga a 10,000 rpm durante 5 min (este paso se realiza dos veces).
12. Se descarta el sobrenadante y se deja evaporar el exceso de etanol a temperatura ambiente hasta que el botón de DNA quede completamente seco.
13. Se resuspende el DNA en 100µl de TE y se incuba a 65°C durante 1 h.
14. Se determina la concentración y la calidad del DNA por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa 1%.
15. Se almacena el DNA a -20°C.

**Preparación de reactivos:**

**Solución para la obtención de leucocitos (lisis de eritrocitos):**

---

NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	PM 79.06 g	0.01 M	0.7906 g/1L
NH <sub>4</sub> Cl	PM 53.49 g	0.144 M	7.70256 g/1L

---

Disolver en agua desmineralizada estéril y aforar a 1,000 ml.

**Amortiguador de lisis DTAB:**

---

DTAB		8%	8 g/0.1L
Tris	PM 121.1 g	0.1M, pH 8.6	1.21 g/0.1L
NaCl	PM 58.44 g	1.2 M	7 g/0.1L
EDTA	PM 372.2 g	0.5 M	1.86/0.1L

---

Disolver el tris y ajustar el pH de 8.6 con HCl en  $\frac{3}{4}$  del volumen final, adicionar el DTAB, el NaCl, el EDTA y aforara a 1,000 ml.

**Amortiguador CTAB:**

---

CTAB		5%	5 g/0.1L
NaCl	PM 58.44 g	0.4 M	2.34 g/0.1L

---

Disolver ambas sales en agua desmineralizada estéril y aforar a 1,000 ml.

**Solución NaCl 1.2 M:**

---

NaCl	PM 58.44 g	1.2 M	7 g/0.1L
------	------------	-------	----------

---

Disolver la sal en agua desmineralizada estéril y aforar a 100 ml.

**Amortiguador TE:**

---

Tris	PM 121.1 g	0.01 M, pH 8	0.121 g/0.1L
EDTA	PM 372.2 g	0.001 M	0.01286 g/0.1L

---

Disolver el Tris y ajustar el pH a 8 con HCl en  $\frac{3}{4}$  del volumen final, adicionar el EDTA, aforar a 1,000 ml.



## CUANTIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO

**Fundamento:** Para cuantificar la cantidad de DNA genómico y verificar su pureza se determina la densidad óptica (DO) a 260 nm y 280 nm. Si la relación de DO 260/280 nm es mayor de 2.0 el DNA tiene una pureza adecuada, mientras que si esta relación es menor de 2.0 se debe considerar contaminación de la muestra, principalmente por proteínas (Sambrook y Russell, 2001).

En la determinación de la concentración de DNA se debe considerar la siguiente fórmula:

$$\text{DNA ng/mL} = \text{DO 260 nm} \times \text{dilución (1005/5}\mu\text{L)} \times 50 \text{ (factor constante)}$$

Notas.

- 50 es el valor del coeficiente de extinción molar de 50 ng/mL que tiene la máxima absorbancia de 1.0 unidad de DO a 260 nm.
- El factor de dilución se refiere al volumen total de la celdilla entre el volumen de muestra.

### **Equipo:**

- Espectrofotómetro

### **Material:**

- Celdilla de cuarzo de 1ml
- Pipeta graduable (2μl y 1000μl)
- Puntas desechables (10μl y 10000μl)
- Gasas
- Parafilm

### **Reactivos:**

- Agua inyectable
- DNA

### **Procedimiento:**

1. Encender el espectrofotómetro con 20 minutos de anticipación por tener una lámpara de UV, utilizar programa para ácidos nucleicos de doble cadena.
2. Ajustar a cero el espectro con el blanco de reacción, midiendo 1000 μl de agua inyectable en la celdilla de cuarzo.
3. Colocar 5μl de la muestra de DNA en la celdilla donde es leído el blanco de agua, tapar la celdilla con parafilm e invertir la solución alrededor de 30 veces procurando que se homogeneice la solución. Leer la muestra a 260 nm y 280 nm.

4. Si hay más de 1 muestra se repiten los pasos 2 y 3 para leer cada muestra, cuidando de enjuagar y secar perfectamente bien la celdilla de cuarzo después de leer cada muestra.
5. Se utilizan las lecturas de densidad óptica a 260 nm para calcular la cantidad de DNA y a 280 nm para determinar su pureza.

### AMPLIFICACIÓN POR PCR

**Fundamento:** La técnica utilizada para la síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos conocida como PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es un proceso iterativo que consiste en tres elementos:

- ❖ Desnaturalización de la cadena molde por calor
- ❖ Hibridación de los iniciadores oligonucleotídicos a una secuencia diana de cadena sencilla.
- ❖ Extensión del alineamiento de los iniciadores por una DNA polimerasa termoestable. (Sambrook y Russell, 2001).

Las condiciones para la reacción del polimorfismo c.53T>A se describen en el siguiente cuadro. El volumen final de la reacción es 25µl por muestra.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	µl por reacción
Amortiguador	10X	1X	2.5
Iniciador F	47.4 nmoles	5 pmoles	0.4
Iniciador R	39 nmoles	5 pmoles	0.4
Coctel dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	100 mM c/u	200 Mm	0.5
Cloruro de magnesio	50 Mm	1.5 mM	0.75
Taqpolimerasa	5 U/µl	2 U/µl	0.4
DNAg	300 ng/µl	100 ng/µl	0.5

---

Condiciones de la reacción para la PCR.

## CONDICIONES DE LA REACCIÓN

<b>Pre calentamiento</b>		
	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
Desnaturalización	10 min	95°C
Ciclos	35	
Desnaturalización	30s	95°C
Alineación	30s	65.5°C
Extensión	30 s	72°C
Extensión final	5 min	72°C

### DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

**Fundamento:** La detección de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (traducción más común en español) o RFLP (por sus siglas en inglés *restriction fragment length polymorphism*) es el método más comúnmente utilizado para analizar la presencia de variantes con secuencias conocidas. Un segmento de DNA en el cual se busca una mutación es amplificado mediante PCR y posteriormente es digerido con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción reconocen una secuencia específica, al unirse cortan la secuencia de DNA cambiando el patrón (peso molecular) de los fragmentos de DNA que posteriormente se observan con electroforesis en un gel de poliacrilamida (Nakashima *et al.*, 2003)

Las condiciones de reacción para el polimorfismo se describen a continuación. La enzima trabaja con una temperatura de 37°C durante 16h para su incubación.

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>µl por reacción</b>
Amortiguador	10X	1X	1
Enzima <i>BtsCI</i>	20 U/µl	20 U/µl	0.5
Agua			6.5
Producto amplificado			2

## **ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA**

**Fundamento:** La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en la electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y permite buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro que se utilizará en la preparación del gel, la cual es determinada por el tamaño de los fragmentos esperados (García Pérez H., 2000).

Los geles de poliacrilamida poseen las siguientes ventajas importantes sobre los geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001):

- ❖ Su poder de resolución es tan grande que puede separar moléculas de DNA, cuya longitud se diferencia por lo menos en 0.1% (es decir 1pb en 1000pb)
- ❖ Pueden albergar cantidades mucho mayores de DNA que los geles de agarosa. Hasta 10µg de DNA se puede aplicar en una sola ranura (1cm x 1mm) de un gel típico de poliacrilamida sin una pérdida significativa de resolución
- ❖ El DNA recuperado de los geles de poliacrilamida es extremadamente puro y puede ser usado en la mayoría de los propósitos exigentes

### **Equipo:**

- Cámara de electroforesis vertical
- Fuente de poder

### **Material:**

- Para el molde del gel se necesita: 2 placas de cristal, 1 liga, 2 separadores de plástico de 6mm y pinzas
- 1peine de plástico de 6 mm, para hacer los pozos del gel
- Guantes desechables
- Gasas
- Pipetas de volumen variable 100 y 1000µl

**Reactivos:**

- TBE 1X
- TBE 10X
- Acrilamida 29:1
- Persulfato de amonio
- TEMED
- Amortiguador de carga

**Procedimiento:**

1. Montar gel:
  - Limpiar las placas de cristal con etanol y una gasa.
  - En la placa de cristal con las esquinas redondas se coloca la liga con el borde hacia arriba del cristal, dejando descubiertas las esquinas
  - Se coloca encima el cristal que contiene el corte donde embona el peine
  - Se colocan los separadores a los lados entre los cristales tratando de no dejar espacio entre los separadores y la liga
  - Se colocan pinzas en los extremos de los cristales excepto donde está el corte para que embone el peine, esto para sujetar el molde.
  
2. Preparar una solución de poliacrilamida 29:1 al 6% para 30 ml. En un tubo de 50 ml colocar:
  - Agua            22.5 ml
  - Acrilamida      4.5 ml
  - TBE 10X        3 ml
  - Persulfato de amonio      375  $\mu$ l
  - TEMED          37.5  $\mu$ l
  
3. Mezcla bien la preparación anterior, vaciar de forma rápida al molde teniendo cuidado de no formar burbujas, colocar el peine teniendo de igual manera, la precaución de no formar burbujas, esperar a que polimerice.
  
4. Una vez que el gel ha polimerizado, se retiran las pinzas, la liga y el peine, teniendo cuidado de romper los pozos, con la ayuda de una jeringa y amortiguador 1X se retira el exceso de poliacrilamida.

5. Añadir solución de amortiguador TBE 1X en la parte de baja de la cámara de electroforesis, colocar el gel en forma vertical teniendo cuidado de que no se formen burbujas entre el gel y el amortiguador, el gel se sostiene a la parte superior de la cámara con un par de pinzas
6. Se agrega amortiguador TBE 1X en la parte superior de la cámara de manera que los pozos que se formaron con el peine queden completamente cubiertos con este.
7. En papel parafilm se colocan gotitas de amortiguador cargador de 1  $\mu$ l aproximadamente que se mezclan con 10  $\mu$ l de la muestra de DNA, y la mezcla se coloca en un pozo.
8. Colocar las tapas y los cables de corriente. Conectar la fuente de poder, el corrimiento se realiza a 200 volts 1 h.

**Preparación de reactivos:**

**Acrilamida 29:1**

Acrilamida	38.7g
Bis-Acrilamida	1.3g

En un vaso de precipitado colocar aproximadamente 30 ml de agua desmineralizada y este colocarlo en la plancha, se prende la plancha y se le agrega una barra magnética de agitación al vaso, se agrega poco a poco la acrilamida, posteriormente se le agrega la bis-acrilamida y finalmente se afora 100 ml

**Persulfato de amonio**

Persulfato de amonio	10%	10g/0.1L
----------------------	-----	----------

Disolver la sal en agua desmineralizada y aforar a 10 ml

**Amortiguador TBE 10X**

EDTA	PM 372.2g	0.02 M	40ml de sol. 5 M/1L
NaCl	PM 121.1g	0.89 M	108.8g/1L
EDTA	PM 61.844g	0.89 M	55.04g/1L

Disolver las sales en agua desmineralizada y aforar a 1L.

**Amortiguador cargador**

Azul de bromofenol	0.25%	25mg/10ml
Xilencianol	0.25%	25mg/10ml
Glicerol	30%	3ml/10ml

Mezclar ambos colorantes con el glicerol y aforar a 10 ml con agua desionizada.

## TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIA CON NITRATO DE PLATA

**Fundamento:** Existen diferentes tipos de tinción, entre ellos la de plata la cual es una técnica muy sensible, que detecta desde 15pg por banda. El gel es tratado con sales de plata que por su carga positiva son atraídas por la carga negativa de los fragmentos de DNA y posee la característica de producir coloración negra o marrón, esto debido a la reducción de los iones de plata (Sambrook y Russell, 2001).

### **Material:**

- Charola de plástico
- Bolsa de plástico

### **Reactivos:**

- Solución fijadora
- Solución de tinción
- Solución reveladora

### **Procedimiento:**

1. Retirar el gel de la cámara de electroforesis
2. Colocar el gel en la charola de plástico, agregar solución fijadora suficiente para cubrir el gel, y agitar por 10 min (pasado el tiempo decantar)
3. Adicionar la solución de tinción, agitar 5 min (decantar)
4. Realizar 1 lavado con agua bidestilada y decantar
5. Agregar un poco de solución reveladora para eliminar el exceso de solución de tinción y decantar
6. Agregar solución reveladora y agitar hasta que las bandas sean visibles, decantar la solución y realizar un lavado con agua bidestilada
7. Guardar el gel en una bolsa de plástico.

### **Preparación de reactivos:**

#### **Solución fijadora**

Etanol	10%	100ml/1L
Ácido acético	0.5%	5ml/1L

En un matraz colocar agua desmineralizada, agregar el etanol y el ácido acético, aforar a 1L.

### **Solución de tinción**

---

Nitrato de plata	0.2%	2g/1L
------------------	------	-------

---

Preparar 1L de solución fijadora, agregar el nitrato de plata, mezclar bien y colocar en un frasco obscuro.

### **Solución reveladora**

---

NaOH	3%	30g/1L
Formaldehído	0.5%	5ml/1L

---

Colocar agua desmineralizada en un matraz de 1L agregar las lentejas de NaOH, agitar hasta que se disuelvan, posteriormente agregar el formaldehído y finalmente aforar a 1L.