

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



“ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO c.2998A>G DEL GEN A2M CON CÁNCER
COLORRECTAL EN PACIENTES DEL OCCIDENTE DE MÉXICO”

TRABAJO DE TITULACIÓN MODALIDAD

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

HELEN HAYDEE FERNANDA RAMÍREZ PLASCENCIA

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL. OCTUBRE DEL 2015

Este trabajo está dedicado a todas las personas que han luchado o están luchando contra el cáncer y a sus familias.

Espero que encuentren inspiración y fuerza.

Dedicado especialmente a **Estela Tapia Chávez**, por afrontar esta enfermedad con la frente alta y la sonrisa fuerte, por ser un ejemplo para todos nosotros y el pilar más valiente de toda nuestra familia.

Helen Ramírez

Agradecimientos

A Dios, por acompañarme todos los días de mi vida, por darme calma, por tener un plan muy grande para mí.

Ofelia Plascencia, mi mamá divina, ¡GRACIAS! por dedicar tu vida entera al bienestar de tu familia, por levantar todos los días tu frente y alzar una oración por nosotros, eres un ejemplo de fortaleza, superación y temple. Gracias a tus brazos que siempre se abren cuando necesito un abrazo, gracias a tu risa y a tus locuras que llenan nuestras vidas. Este logro es para ti, porque a ti te lo debo todo.

Joel Ramírez, papá gracias por siempre apostar por mí, contra todo y contra todos, por apoyarme en uno de los momentos más difíciles que enfrenté en mi vida y que definitivamente marcó una pauta entre quien solía ser y quien soy ahora.

A mis hermanos, Dany, Juan, Joab les agradezco infinitamente su compañía incondicional, esos abrazos fuertes que siempre necesito y que me recuerdan que están ahí para mí todo el tiempo, gracias por ese sentido del humor que me llena de risas, por su consejo, por apoyarme en las decisiones más arduas, es una bendición y un orgullo tenerlos conmigo. ¡Nadie como ustedes!

Valeria y Oswaldo, que su nobleza los impulse a llegar tan lejos como deseen, gracias por formar parte de mi historia.

Vivi y Ricardo, por regalarme el honor de ser guía en el camino de sus hijos **Jade y Ricardo**, porque de ese modo me inspiraron a siempre seguir avanzando y ser una mejor persona. Gracias por confiarme lo más preciado que poseen, sus hijos.

A todos mis tíos y primos, por enseñarme el valor de la familia, que uno jamás está solo, que la familia es para siempre. Gracias porque sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta tan importante proyecto. Agradecimiento especial a Rodrigo Rodríguez Ramírez por su increíble aportación a mi presentación.

A mis Colegas Biólogos y Grandes amigos, José Berber, Nadia Martínez y Luis López por ser parte de mi familia a pesar de tener diferente apellido, Roberto, Lily, Smith, Carlos, Martín, Ale, gracias por dar ese toque esencial a esta larga travesía, por su aliento y su entusiasmo, por esas largas pláticas que hacían ameno el tan largo camino a la universidad. Gracias por su sencillez humana 😊.

Al Dr. Jorge Peregrina Sandoval, por confiar en mí y darme la bienvenida a tan espectacular equipo de trabajo.

A la Dra. María de la Luz Ayala Madrigal, gracias por moldear en mí los valores y cualidades de un profesional, por siempre darme su consejo sincero y percibir en mí más capacidades de las que yo misma puedo ver en este momento.

Dra. Melva Gutiérrez Angulo y M. en C. Sayuri Suarez Villanueva, Gracias a ambas por brindarme siempre su respaldo, por enseñarme y guiarme con paciencia y calidez, por confiar en mis ideas siempre enmarcadas con su orientación, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación.

A mis sinodales, Dra. Anne Santerre, Dra. Galina Petrovna y Dr. Eduardo Sosa, ¡Infinitas Gracias! por su apoyo y confianza en mi trabajo, por su capacidad para guiar mis ideas, han sido un aporte invaluable. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento conmigo.

A mis compañeros de Laboratorio, gracias por crear un ambiente al cual siempre dan ganas de regresar, un lugar donde más que trabajo es un lugar de desarrollo personal y profesional.

Universidad de Guadalajara, por ser mi casa todo este tiempo y el vehículo que se dirige a mis metas.

DIRECTOR DE TESIS

Dra. en C. María de la Luz Ayala Madrigal, Instituto de Genética Humana “Dr. Enrique Corona Rivera”, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

ASESORES

Dra. en C. Melva Gutiérrez Angulo, Departamento de Clínicas, Centro Universitario de los Altos e Instituto de Genética Humana “Dr. Enrique Corona Rivera”, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Dr. en C. Jorge Peregrina Sandoval, Laboratorio de Inmunobiología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

M. en C. Alexis Sayuri Suárez Villanueva, Instituto de Genética Humana “Dr. Enrique Corona Rivera”, Centro Universitario de Ciencias de la Salud y Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

COLABORADORES

Dr. Víctor Manuel Maciel Gutiérrez, Servicio de Colon y Recto, Hospital Civil “Dr. Juan. I. Menchaca”.

Dr. Manuel W. Centeno Flores, Servicio de Colon y Recto, Hospital Civil “Dr. Juan. I. Menchaca”.

Dr. Jesús Alonso Valenzuela Pérez, Servicio de Colon y Recto, Hospital Civil “Dr. Juan. I. Menchaca” de Guadalajara.

SEDE DEL ESTUDIO

Este trabajo se realizó en:

Laboratorio de Genética y Cáncer, Instituto de Genética Humana “Dr. Enrique Corona Rivera”, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Laboratorio de Inmunobiología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de Guadalajara.

ÍNDICE

SEDE DEL ESTUDIO.....	II
ÍNDICE	III
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE CUADROS	X
LISTA DE GENES.....	XI
ANTECEDENTES	1
Cáncer Colorrectal	1
CCR Hereditario.....	2
CCR familiar.....	2
Cáncer Colorrectal Esporádico	3
Epidemiología	5
Hallazgos clínicos y formas de detección	5
Clasificación del CCR	6
Factores ambientales de riesgo para el desarrollo de CCR.....	8
Factores de riesgo genéticos	9
Vías moleculares en CCR.....	11
Proteasas.....	12
Participación de las proteasas en cáncer.....	13
Inhibidores de Proteasas	13
Superfamilia de las α -macroglobulinas	13
Proteína Alfa 2-macroglobulina	15
Mecanismo de acción de la α -2m	17
Gen <i>A2M</i>	18
Polimorfismo c.2998A>G	19
Frecuencia de c.2998A>G	20
JUSTIFICACIÓN	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22

HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
Objetivo General	23
Objetivos Particulares	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
Tipo de estudio	24
Universo de estudio	24
Análisis estadístico.....	24
Tamaño de muestra.....	25
Aspectos Éticos.....	27
Obtención de muestras de sangre periférica de población de referencia	28
Obtención de muestras de pacientes con CCR	28
Extracción de DNA de sangre periférica	28
Extracción de DNA de tejido tumoral	28
Cuantificación de DNA.....	29
Amplificación génica	29
Digestión enzimática	30
Electroforesis	32
Control de calidad de genotipificación.....	32
DIAGRAMA DE FLUJO.....	33
RESULTADOS.....	33
Población de referencia	34
Pacientes con CCR.....	35
Análisis de asociación.....	36
Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas entre los tejidos analizados de pacientes con CCR	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES.....	45
PERSPECTIVAS.....	46
APORTACIONES.....	47
REFERENCIAS.....	49

ANEXO 1	62
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	62
ANEXO 2	65
Extracción de DNA de sangre periférica.	65
ANEXO 3	70
Extracción de DNA de tejido CCR	70
ANEXO 4	72
Cuantificación del DNA por espectrofotometría.	72
ANEXO 5	75
Amplificación génica mediante PCR	75
ANEXO 6	78
Digestión enzimática	78
Enzima <i>Mbol</i>	78
ANEXO 7	81
Electroforesis	81
ANEXO 8	86
Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS

Abreviaturas, símbolos y siglas

°C	Grados centígrados
µl	Microlitros
10x	Concentrado 10 veces
A	Adenina
APS	Del Inglés: <i>Ammonium persulfate</i>
ATP	Del inglés: <i>adenosine triphosphate</i>
Bco	Blanco de reacción
C	Citosina
^c /u	Cada uno
CCR	Cáncer colorrectal
CI	Del Inglés: <i>confidence interval</i>
CIN	Del inglés: <i>Chromosomal instability</i>
CTAB	Del Inglés: <i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i>
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanocina trifosfato
DNA	Del Inglés: <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
DO	Densidad Óptica
Dr. EN C.	Doctor en ciencias
DTAB	Del Inglés: <i>Dodecyltrimethylammonium bromide</i>
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
FAP	Del Inglés: <i>Familial adenomatous polyposis</i>

G	Guanina
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
HCl	Ácido Clorhídrico
Ile	Isoleucina
KDa	kilodaltones
L	Litro
LOH	Del Inglés: <i>Loss Of Heterozygosity</i>
M	Molar
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
ml	Mililitros
mm	Milímetro
MPM	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloruro de sodio
ng/μl	Nanogramo por microlitro
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amonio
nm	Nanómetro
PAGE	Del inglés: <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Pares de bases
PCR	Del inglés: <i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso Molecular
PZP	Del inglés: <i>Pregnancy-Zone Protein</i>
RFLP	Del inglés: <i>Length polymorphism restriction fragment</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Sin datos
Seg	Segundos
T	Timina
TBE	Tris-borato-EDTA

TE	Buffer Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamino
Val	Valina
α -2m	Proteína Alfa-2-macroglobulina
χ^2	Chi cuadrada

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
Fig. 1	Proceso adenoma-carcinoma.	4
Fig. 2	Dominios de la proteína α -2m	14
Fig. 3	Representación de la estructura de α -2m	16
Fig. 4	Localización del gen <i>A2M</i> .	19
Fig 5	Localización del polimorfismo c.2998A>G.	29
Fig. 6	Región de reconocimiento y corte de la enzima <i>Mbol</i> .	31
Fig. 7	Amplificación génica mediante PCR de una secuencia parcial del gen <i>A2M</i> .	32
Fig. 8	Digestión enzimática con la enzima <i>Mbol</i> para el polimorfismo c.2998A>G en población de referencia.	35
Fig. 9	Variación somática intraindividual en tres pacientes con CCR.	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
Cuadro. 1	Clasificación TNM de cáncer.	7
Cuadro. 2	Principales genes cuyas alteraciones se asocian con el riesgo de presentar CCR.	10
Cuadro. 3	Propiedades y características de la proteína α -2m.	17
Cuadro. 4	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo c.2998A>G del gen <i>A2M</i> en diferentes poblaciones de referencia.	20
Cuadro. 5	Secuencia de los iniciadores para amplificación del polimorfismo c.2998A>G del gen <i>A2M</i> .	30
Cuadro. 6	Genotipos y fragmentos esperados de la digestión enzimática con <i>Mbol</i> .	31
Cuadro. 7	Frecuencias genotípicas y alélicas de la población de referencia.	34
Cuadro. 8	Características clínicas y demográficas de los pacientes con CCR.	36
Cuadro. 9	Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre la población de referencia y pacientes con CCR en sus dos tejidos.	37
Cuadro. 10	Mecanismos posibles de hemicigocidad y/o transición de bases en pacientes con Variación somática intraindividual.	38
Cuadro. 11	Características de los pacientes con CCR y variación somática intraindividual.	39

LISTA DE GENES

Nombre abreviado	Nombre completo del inglés:
<i>A2M</i>	<i>Alpha-2-macroglobulin gene</i>
<i>APC</i>	<i>Adenomatous polyposis coli gene</i>
<i>BMPR1A</i>	<i>Gene bone morphogenetic protein receptor, type IA gene</i>
<i>BRAF</i>	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase gene</i>
<i>EPCAM</i>	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule gene</i>
<i>GREM1</i>	<i>Gremlin 1 gene</i>
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog gene</i>
<i>LRP</i>	<i>Low density lipoprotein receptor gene</i>
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 1 gene</i>
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1 gene</i>
<i>MSH2</i>	<i>mutS homolog 2 gene</i>
<i>MSH6</i>	<i>mutS homolog 6 gene</i>
<i>MUTYH</i>	<i>mutY homolog gene</i>
<i>MYC</i>	<i>V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog gene</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
<i>PMS2</i>	<i>Postmeiotic segregation increased 2 gene</i>
<i>POLD1</i>	<i>Polymerase (DNA directed) delta 1 gene</i>
<i>POLE</i>	<i>Polymerase (DNA directed) epsilon gene</i>
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog gene</i>
<i>SMAD4</i>	<i>SMAD family member 4 gene</i>
<i>STK11</i>	<i>Serine/threonine kinase 11 gene</i>
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>

ANTECEDENTES

El cáncer es una de las enfermedades multifactoriales con mayor incidencia a nivel mundial; en el año 2012 había 14.1 millones de casos nuevos de cáncer, 8.2 millones de muertes por cáncer y 32.6 millones de personas viviendo con cáncer (dentro de los 5 años del diagnóstico) (Ferlay *et al.* 2015).

La definición del cáncer integra las características de las células tumorales que presentan un conjunto de propiedades comunes. La definición consensuada de una célula cancerosa es una célula que posee la capacidad de auto-renovación, se dividen en ausencia de señales de división, es decir, mantienen la señalización proliferativa, no responden ante las señales de paro, teniendo así un número ilimitado de divisiones celulares, también tiene mecanismos de evasión a la muerte celular que permite la inmortalidad replicativa y libera señales que resultan en el crecimiento de los vasos sanguíneos hacia y dentro del tumor (angiogénesis), finalmente la invasión o metástasis a tejidos diferentes al de origen. Estas características ocurren debido a factores genéticos, epigenéticos y ambientales que pueden ocurrir en cualquier célula del cuerpo (Hanahan y Weinberg, 2011; Mundade *et al.* 2014).

Cáncer Colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) se desarrolla a partir de la mucosa normal del colon y recto, que asume cambios a nivel genético y epigenético causando neoplasias intraepiteliales y crecimiento de lesiones adenomatosas que pueden o no progresar hacia un cáncer invasivo (Migliore *et al.* 2011).

CCR familiar

Alrededor del 30 % de los casos de CCR corresponden al tipo familiar, esto es, se presenta CCR en más de un individuo de la misma familia. El riesgo de desarrollar CCR es 2-4 veces mayor en estos casos de predisposición familiar donde se combinan factores hereditarios y ambientales (Jasperson *et al.* 2010). Solo el 5 % de estas ocurrencias se asocian con CCR hereditario, porque se conoce la causa genética, el restante 25 % se desconoce (Siebenhofer *et al.* 2015).

CCR Hereditario

El CCR hereditario corresponde al 5-10 % de todos los casos de CCR (Jasperson *et al.* 2010). Este es conformado por un grupo heterogéneo de enfermedades que surgen a través de diferentes vías moleculares y crean una susceptibilidad genética que conduce hacia el cáncer y que finalmente determina la respuesta o resistencia contra la defensa de agentes antitumorales (Ewing *et al.* 2014). Entre estas patologías se encuentra la poliposis adenomatosa familiar (FAP) en la que el gen *APC* *esta mutado*; su principal característica es la presencia de aproximadamente 1000 pólipos adenomatosos en colon y recto y representa aproximadamente el 1 % de los casos de CCR, el cual inicia alrededor de 10 años después de la presencia de los pólipos; esta enfermedad muestra una variante menos agresiva o “atenuada” que se hace evidente por el menor número de pólipos presentes, este número en promedio va de 20 a 30 pólipos (habitualmente menos de 100) (Ewing *et al.* 2014). Por otra parte el síndrome de Peutz-Jeghers que muestra del mismo modo pólipos hamartomatosos en las vías gastrointestinales, comúnmente menores a los presentados por FAP y se caracteriza por causar hiperpigmentación mucocutánea en boca, manos y pies del afectado. El gen *STK11* presenta una mutación en la mayoría de estos pacientes. Existe también el síndrome de poliposis serrado que mantienen una histología

similar a la de los pólipos hiperplásicos pero con incremento en la concentración de células epiteliales con aspecto dentado (forma de sierra), en este caso la alteración del factor genético sigue siendo desconocida (Andreu *et al.* 2011). Finalmente el cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis, también conocido como síndrome Lynch, el cual es causado principalmente por una mutación de línea germinal en uno de los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* de reparación MMR (reparación de errores de apareamiento) además de la acumulación de inestabilidad en secuencias de microsatélites (Ewing *et al.* 2014).

Cáncer Colorrectal Esporádico

Se estima que aproximadamente el 90 % de los casos de CCR son esporádicos (Bogaert y Prenen, 2014). En 1990, Fearon y Vogelstein describieron en su modelo genético varios pasos donde la acumulación de múltiples mutaciones genéticas conduce a una ventaja selectiva de crecimiento a las células epiteliales en el colon (Fearon y Vogelstein, 1990), además describieron que la acumulación total de alteraciones genéticas, es responsable del comportamiento biológico de las mismas. De acuerdo a Vogelstein se necesitan al menos siete alteraciones genéticas distintas para que se lleve a cabo la tumorigénesis; sin embargo, se conocen vías alternativas que conducen hacia cáncer de colon y recto (Figura 1) (Ewing *et al.* 2014), las cuales se describen más adelante.

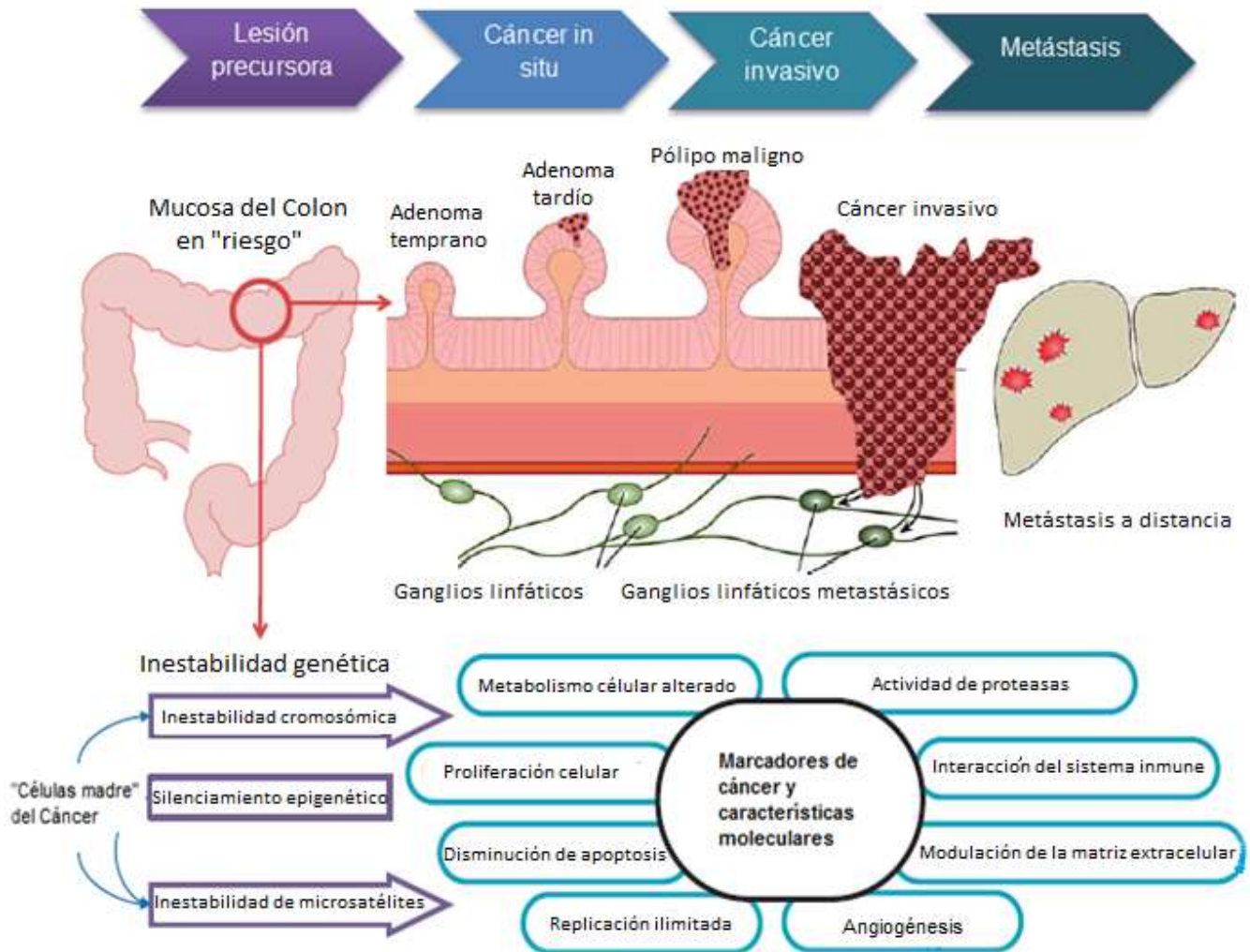


Figura 1. Proceso adenoma-carcinoma. Esquema descriptivo del proceso que se lleva a cabo durante la transición de un adenoma a un carcinoma metastásico, el origen y el desarrollo de las células cancerosas de células madre a metástasis, implica una serie de mecanismos complejos y vías moleculares que generan las características del cáncer (modificado de Hagland *et al.* 2013).

Epidemiología

El CCR es el tercer cáncer más común en todo el mundo con una incidencia de 1.4 millones y 694,000 muertes. En México el CCR es uno de los tipos de cáncer que se presentan con mayor frecuencia, en 2012 se ubicó dentro de las primeras 5 causas de morbilidad por tumores malignos con 3,995 casos nuevos para mujeres y 4,656 casos nuevos en hombres de cada 100,000 (Ferlay *et al.* 2015). Por su parte el Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México (SINAIS, 2011), describe que el Occidente de México (Jalisco, Colima, Nayarit y Michoacán) presentó el 13 % de todos los casos de CCR respecto al resto de México. Por consecuencia este tipo de cáncer se ha convertido en una prioridad a nivel sector salud.

Hallazgos clínicos y formas de detección

El CCR produce síntomas que se presentan en forma de diarrea o cambios en hábitos de evacuación; estreñimiento o reducción del diámetro de las heces fecales por varios días, cólicos o dolor abdominal, debilidad y cansancio, pérdida inexplicable de peso, necesidad de defecar que no desaparece después de hacerlo, sangrado rectal o en las heces fecales provocando que se vean más oscuras, con el tiempo la pérdida de sangre se puede acumular, y provocar anemia; regularmente el primer signo de CCR se hace evidente en un análisis de sangre que muestra un bajo recuento de glóbulos rojos (Levin *et al.* 2008). Cuando se diagnostican pólipos, se realiza una polipectomía para recuperarlos y proceder a su análisis histológico, describir el grado de displasia y evaluar la presencia o no de malignidad. En caso de que exista metástasis definir la profundidad de la invasión de los tejidos, el grado de diferenciación celular, la afectación vascular y linfática y la existencia o no de invasión del margen de resección. La indicación

quirúrgica es necesaria cuando el análisis histológico de un pólipo muestra invasión de la submucosa y además existen criterios de mal pronóstico como son: resección parcial del pólipo, carcinoma pobremente diferenciado, invasión vascular o lesión de menos de 2 mm del margen de resección (Andreu *et al.* 2011).

La mayoría de los adenomas no progresarán al cáncer, sin embargo, las características de un adenoma (número, tamaño, histología y grado de displasia) son actualmente el mejor medio para la estratificación y vigilancia (Lieberman *et al.* 2012).

Históricamente la clasificación del CCR se ha basado en características patológicas clínicas, utilizando así en gran medida el daño tisular y en consecuencia la metástasis como una guía en el mapa de la agresividad, persistencia y permanencia de este tipo de cáncer; las características patológicas con mayor poder pronóstico son la profundidad de la invasión tumoral, la carga de la invasión linfovascular (estimado por el número de ganglios linfáticos infiltrados por el cáncer), y la presencia de metástasis a distancia (Grady *et al.* 2014); a partir de esto se han realizado diversos estudios para determinar las características moleculares y genéticas y hay cada vez más evidencia de que éstas son quienes determinan el pronóstico y la respuesta al tratamiento dirigido en cada paciente (Bogaert y Prenen, 2014).

Clasificación del CCR

El sistema de clasificación TNM por sus siglas en inglés (Tumor, Node, Metastasis) es el método de estadiaje de neoplasias, desarrollado por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) en colaboración con la Union for International Cancer Control (UICC), más utilizado a nivel mundial para la clasificación de neoplasias (Migliore *et al.* 2011). Es un sistema aplicable a tumores de cualquier origen anatómico y al que se le suma información aportada por otros métodos (histología, cirugía) para su enriquecimiento. El sistema TNM de estadificación se

basa en el tamaño y la extensión (alcance) del tumor primario (T); si las células cancerosas se han diseminado a los ganglios linfáticos cercanos (N) y si ha ocurrido metástasis (M), o diseminación del cáncer a otras partes del cuerpo (Cuadro 1). El estadio del cáncer se complementa con la información proporcionada por los exámenes físicos, por los estudios con imágenes, las pruebas de laboratorio, los informes de patología y por los informes de cirugía (Obrocea *et al.* 2011).

Cuadro 1. Clasificación TNM del cáncer (Obrocea *et al.* 2011).

1. Tumor primario (T)	
TX	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (cáncer inicial que no se ha diseminado a tejidos vecinos)
T1, T2, T3, T4	Tamaño y/o extensión del tumor primario
2. Ganglios linfáticos regionales (N)	
NX	No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No existe complicación de ganglios linfáticos regionales (no se encontró cáncer allí)
N1, N2, N3	Complicación de ganglios linfáticos regionales (número y/o extensión de diseminación)
3. Metástasis distante (M)	
MX	No es posible evaluar una metástasis distante
M0	No existe metástasis distante (el cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo).
M1	Metástasis distante (el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo).

Factores ambientales de riesgo para el desarrollo de CCR

El CCR de tipo esporádico presenta una relación fuerte con el estilo de vida y factores ambientales, por ejemplo, el desarrollar malos hábitos en la dieta, la exposición a carcinógenos como las nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos aromáticos encontrados en el tabaco, el consumo de altas cantidades de carne roja (cordero, ternera, cerdo, carne de res y procesada como el consumo de carnes conservadas, embutidos, etc.) influyen en la carcinogénesis de colon (Derry *et al.* 2013); por otra parte, la baja ingesta de fibra y múltiples fitoquímicos protectores que se encuentran en frutas, verduras y granos enteros podrían alterar también la sensibilidad al daño genético y aumentar el metabolismo carcinogénico que contribuye al desarrollo del CCR (Aune *et al.* 2011); por el contrario, la presencia de ellos en la alimentación, favorece la disminución del tiempo de tránsito a través del tracto gastrointestinal y la mejora de fermentación bacteriana (Durko y Malecka, 2014).

Adicionalmente el alto consumo de alcohol aumenta el riesgo de mutaciones, ya que el metabolismo del alcohol se basa principalmente en la catálisis y la oxidación (realizado por acción de las enzimas alcohol deshidrogenasa, catalasa, y citocromo *P450*) lo que resulta en la formación de acetaldehído, que es un carcinógeno de clase uno y genera daño cromosómico, además promueve la actividad cancerígena, a largo plazo el consumo de alcohol disminuye la absorción de vitaminas B, motivos por los cuales se reconoce al alcohol como un producto cancerígeno por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Derry *et al.* 2013).

Con respecto al consumo y la exposición al humo de tabaco, este también es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer; aproximadamente el 20 % de los CCRs están asociados con el tabaquismo. Los principales agentes carcinógenos presentes en el humo del tabaco son aminas aromáticas, nitrosaminas, aminas heterocíclicas, y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, estas sustancias someten el metabolismo a través de los citocromos *P450*, lo que lleva a la

formación de DNA aberrante y además causa la mutación de genes como *KRAS*, *BRAF* y *MYC*. Las nitrosaminas tienen la capacidad de activar y unirse a los receptores nicotínicos de la acetilcolina, que resulta en un aumento en las concentraciones intracelulares. El estrés oxidativo conduce a la activación de vías inflamatorias y también promueve una cascada de señalización proliferativa de *MAPK* (Durko y Malecka, 2014).

Un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer en general es la obesidad, como lo describe el meta-análisis realizado por Roberts *et al.* (2013). En concordancia, la actividad física reduce el riesgo de CCR en un 55 %. El tejido adiposo secreta adipohormonas como la leptina y resistina que contribuyen a inflamación y carcinogénesis, de este modo, las condiciones inflamatorias crónicas que se causan en el intestino debido a la obesidad también aumentan el riesgo de desarrollo de CCR (Booth *et al.* 2002).

Factores de riesgo genéticos

Los antecedentes familiares de CCR confieren un alto riesgo a lo largo de la vida para desarrollar esta enfermedad; si el familiar es de primer grado, el riesgo se duplica y aumenta de forma importante si el familiar es menor de 50 años (Migliore *et al.* 2011).

Gran parte de la predisposición genética a CCR incluye alteraciones en genes de alta penetrancia, es decir, los relacionados con casos hereditarios (Cuadro 2), y alelos de baja penetrancia, asociados a casos esporádicos (Valle, 2014). En estos últimos, la herencia conjunta de múltiples variantes en genes de bajo riesgo puede interactuar con factores ambientales. Estas variantes son principalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) con localización en diferentes regiones genómicas que influyen el riesgo de CCR (Theodoratou *et al.* 2012).

El riesgo genético del CCR asociado con cada una de las variantes genéticas individualmente es bajo, sin embargo, el efecto combinado de alteraciones contribuye significativamente a que se desarrolle esta enfermedad, especialmente teniendo en cuenta la alta prevalencia de estas variantes en la población general. Además, la presencia de SNPs pueden modificar el riesgo de cáncer en las familias con mutaciones en los genes predisponentes (Valle, 2014).

Un resumen de los principales genes cuyas alteraciones se asocian con el riesgo a presentar CCR se muestra en cuadro 2.

Cuadro 2. Principales genes cuyas alteraciones se asocian con el riesgo de presentar CCR, se describe el modo de herencia y nombre de la enfermedad (Valle, 2014).

Gen	Modo de herencia	Enfermedad
<i>MLH1</i>	Autosómica dominante	Síndrome Lynch
<i>MSH2</i>	Autosómica dominante	Síndrome Lynch
<i>MSH6</i>	Autosómica dominante	Síndrome Lynch
<i>PMS2</i>	Autosómica dominante	Síndrome Lynch
<i>APC</i>	Autosómica dominante	Poliposis adenomatosa familiar
<i>EPCAM</i>	Autosómica dominante	Síndrome Lynch
<i>MUTYH</i>	Autosómica Recesiva	Poliposis adenomatosa familiar autosómica recesiva
<i>POLE</i>	Autosómica dominante	Cáncer colorrectal familiar
<i>POLD1</i>	Autosómica dominante	Cáncer colorrectal familiar
<i>GREM1</i>	Autosómica dominante	Adenoma colorrectal
<i>SMAD4</i>	Autosómica dominante	Síndrome de poliposis juvenil
<i>BMPR1A</i>	Autosómica dominante	Síndrome de poliposis juvenil
<i>STK11</i>	Autosómica dominante	Síndrome Peutz-Jeghers
<i>PTEN</i>	Autosómica dominante	Síndrome de poliposis juvenil

Las alteraciones genéticas afectan rutas que derivan en la carcinogénesis y se han descrito tres importantes vías moleculares que conducen al CCR, las cuales se describen a continuación.

Vías moleculares en CCR

La primera vía es inestabilidad de microsatélites; los microsatélites son secuencias de nucleótidos de 2-6 pares de bases de longitud repetidos en el genoma, estas secuencias son propensas a la acumulación de mutaciones, principalmente debido a polimerasas de DNA que no pueden unirse de manera eficiente y provocan errores de replicación. Estos errores deben ser reparados por el sistema MMR (del inglés, mismatch repair que incluye a los genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), cuya disfunción por mutaciones en genes de este sistema conduce a una hipermutabilidad genética. Si los cambios en los microsatélites se acumulan en regiones codificantes, se provoca una alteración en el marco de lectura lo que promueve la aparición de proteínas con terminación prematura. La segunda vía se conoce como fenotipo metilador de islas CpG, que se distingue por la hipermetilación que presenta el DNA, es la vía menos común, sin embargo, inicia una pauta muy importante dentro de la investigación epigenética. Finalmente la tercer y más común (70 %) es la vía de inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés chromosomal instability), caracterizada por la acumulación de aneuploidías o reordenamientos cromosómicos que repercuten en la variabilidad cariotípica de la célula, así como una acumulación de mutaciones en oncogenes específicos y genes supresores de tumor, lo cual a su vez es causa frecuente de pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés, loss of heterozygosity). Estas mutaciones son frecuentes en genes como *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *SMAD4*, *TP53*, etc. activando de ese modo vías críticas para la tumorigénesis del CCR (Bogaert y Prenen, 2014).

Dado que las tres vías no son excluyentes entre sí, es posible que los tumores puedan exhibir características de múltiples vías (Figura 1) (Bogaert y Prenen, 2014). Además de las mutaciones génicas descritas en vías moleculares que llevan al desarrollo del cáncer, se describe un número de SNPs que pueden modificar la expresión de genes diana que regulan los comportamientos celulares. La función de los SNPs es un ejemplo de cómo las partes del genoma que alguna vez se pensó no tenían ninguna función, en realidad si desempeñan un papel fisiológico importante y que asimismo pueden desencadenar la regulación del cáncer (Goel y Boland, 2009).

Además de los genes relacionados con vías moleculares, se reportan otros que se han relacionado con cáncer, entre ellos se encuentran los que codifican para inhibidores de proteasas como la proteína α 2-Macroglobulina (α -2m).

Proteasas

Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas mediante la proteólisis; estas enzimas son de amplia distribución y realizan procesos biológicos que van desde la digestión en el estómago y el intestino hasta la renovación de proteínas; en una situación fisiológica normal se produce un equilibrio entre las proteasas y sus inhibidores y la perturbación del equilibrio de ellos conduce a muchas enfermedades como el cáncer (Rakashanda *et al.* 2012). Estudios recientes muestran que las proteasas también están involucradas en la progresión y el crecimiento de tumores en sitios primarios y metastásicos (Yang *et al.* 2009), los pasos a partir de la iniciación de un tumor, el crecimiento, la metástasis y finalmente la invasión implican la actividad de las cinco clases de proteasas observadas en mamíferos: serina, cisteína, aspartato, treonina y metaloproteasas. Se ha encontrado una correlación positiva entre la agresividad del tumor y la secreción de diversas proteasas, así como indicios de mal pronóstico para el paciente, una de las principales es la tripsina, una serina

proteasa digestiva típica, denominada así por su gran actividad proteolítica la cual se encuentra involucrada en varios tipos de cáncer y promueve la proliferación, invasión y metástasis (Rakashanda *et al.* 2012).

Participación de las proteasas en cáncer

La actividad proteolítica en los tumores es regulada de una manera compleja ya que se ven involucradas células genéticamente inestables y células del estroma tales como fibroblastos, células endoteliales y células inflamatorias. Inicialmente las proteasas se vieron involucradas con el cáncer en procesos como la invasión y metástasis, etapas que se consideraban los últimos eventos de una neoplasia, sin embargo, estudios han demostrado que estos procesos pueden ocurrir también en las primeras etapas y que otros procesos como la regulación de la proliferación celular, apoptosis, la participación de las células blanco. La angiogénesis y la inducción de resistencia a fármacos también son dependientes de proteasas. Para realizar metástasis, las células tumorales deben invadir y cruzar los límites del tejido, para la mayoría de las células cancerosas se piensa que esto requiere dos eventos: el aumento de la movilidad, y la degradación proteolítica de la matriz extracelular (Seals *et al.* 2005; Chang y Werb, 2001).

Inhibidores de Proteasas

Superfamilia de las α -macroglobulinas

A esta superfamilia pertenece la proteína α -2m, la cual forma parte del subgrupo de las α -macroglobulinas. Esta superfamilia tiene en común varios dominios que se muestran en la figura 2, como: el tioréster y el C-terminal, estos dominios tienen una función fisiológica importante, el propósito primario del tioréster parece ser proveer un mecanismo preparado para la creación de un enlace covalente a

proteasas o carbohidratos cercanos para inhibirlos, la región cebadora que es hidrolizada por las proteínas induce cambios conformacionales en la molécula y finalmente, el sitio C-terminal contribuye con la eliminación de los complejos en circulación, uniéndose al receptor LRP/ α -macroglobulinas en la superficie de las células reticuloendoteliales (Barrera y Arbeláez, 2006).

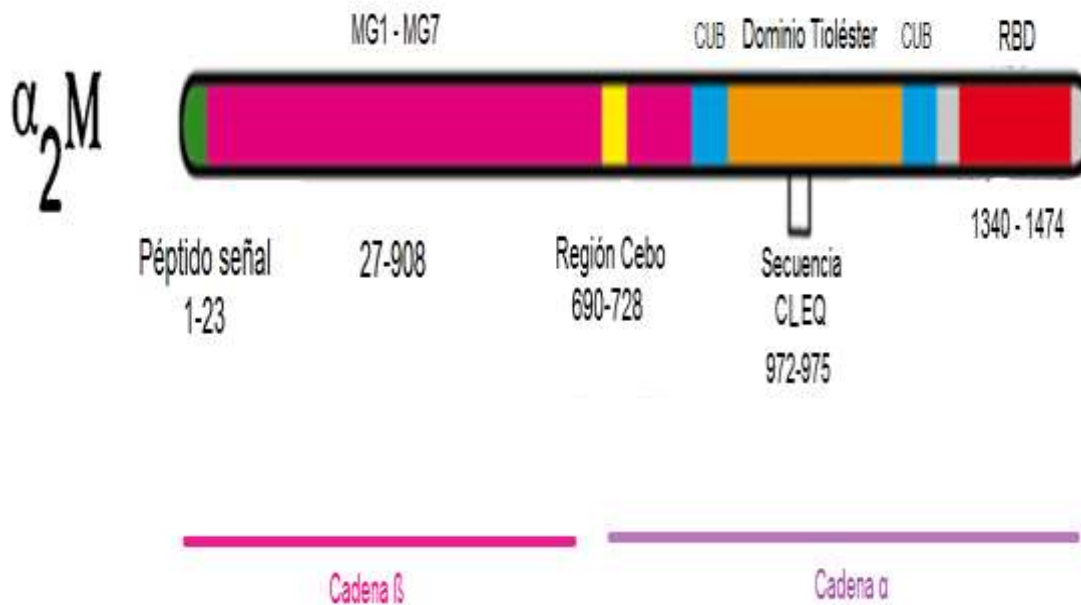


Figura 2. Dominios de la proteína α -2m La secuencia CLEQ forma parte del dominio tioléster; dominio CUB: conservado evolutivamente en proteínas (C1r/C1s, UEGF, BMP1), dominio MG1-MG7: dominio macroglobulina, dominio RBD: dominio de unión a RAS, Región cebo o cebadora y péptido señal. (Modificado de Rehman *et al.* 2013).

Proteína Alfa 2-macroglobulina

La α -2m es una glicoproteína homotetramérica de 718 KD, se sintetiza principalmente en fibroblastos de pulmón, macrófagos-monocitos, hepatocitos, astrocitos y células adrenocorticales (OMIM *103950, 2015), asimismo se ha observado que los tumores y su estroma asociado producen esta proteína (Misra y Pizzo, 2015). La α -2m se encuentra presente en el plasma y espacios extracelulares de vertebrados donde realiza su función inhibitoria, debido a que no puede penetrar en los tejidos por su alto peso molecular (Gassaloglu *et al.* 2014), esta glicoproteína fue reconocida por primera vez como un importante inhibidor de proteasas de amplio espectro, es decir, con amplia especificidad; entre las principales proteasas con las que interactúa se encuentran la tripsina, trombina, y colagenasa (Brown *et al.* 2015).

La α -2m constituye del 7 al 10% del total de proteínas plasmáticas, en conjunto con la alfa-1macroglobulina (α -1m) son reactantes de fase aguda y por lo tanto tienden a aumentar cuando hay daño hístico activo por lo que los niveles de globulinas se presentan en procesos inflamatorios, procesos malignos, traumatismos y enfermedades autoinmunes.

Debido a su gran peso molecular, la α 2-m no atraviesa los glomérulos renales como varias proteínas que se pierden con la orina, por lo tanto, el aumento de hasta diez veces de la α -2m se asocia como característica bioquímica fundamental en el desarrollo de síndrome nefrótico, así también se le ha encontrado involucrada en otras patologías como Alzheimer, Esclerosis Múltiple, problemas de coagulación por la inhibición de la trombina, fibrinólisis mediante la inhibición de la plasmina y la calicreína y artritis reumatoide, donde afecta el nivel de citocinas involucradas en el proceso inflamatorio (Barrera y Arbeláez, 2006). Las características y propiedades de α 2-m se muestran en el cuadro 3.

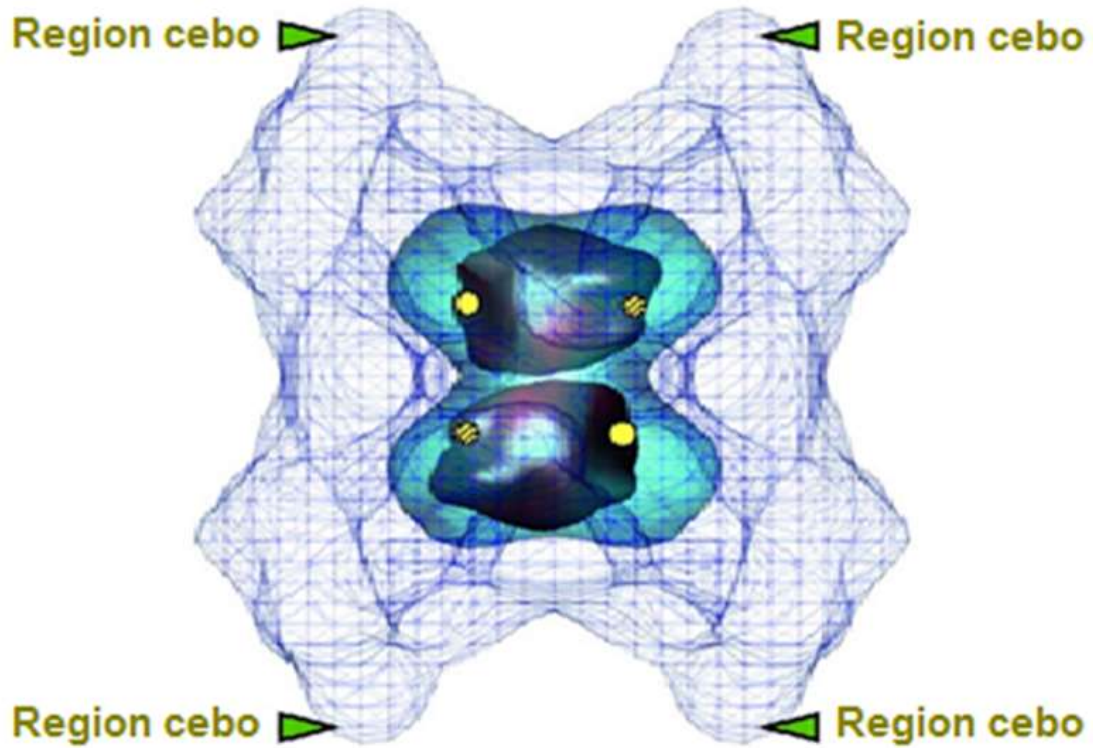


Figura 3. Representación de la estructura de α -2m, donde se aprecia el tetrámero de la proteína en forma de H debido a la exposición de los cuatro dominios de unión al receptor como consecuencia del rompimiento de la región cebadora o cebo y posterior activación del dominio tiorléster por parte de la proteasa. Modificado de Kolodziej *et al.* 2002.

Cuadro 3. Propiedades y características de la proteína α -2m. De acuerdo a Neves *et al.* (2012) y Lin *et al.* (2012).

Propiedades	α -2m
Estructura	Homotetramero
Tamaño (kDa)	718
Origen	Plasma sanguíneo aquí faltan los cambios que se hicieron en la ppt
Aminoácidos	1451 (cada subunidad) 5804 (total)
Enlaces disulfuro	13
Estructura secundaria	
(a) Cadena beta	67
(b) hélice alfa	17
Inhibe	Las cinco clases de proteasas

Mecanismo de acción de la α -2m

La activación proteolítica que realiza α -2m en las proteasas blanco provoca un cambio conformacional conocido como “trampa molecular”. El homotetrámero de α -2m atrapa la proteasa mediante una región que presenta una secuencia de aproximadamente 35 aminoácidos y que funciona como “cebo”, al contener los sitios de escisión específicos para diferentes proteasas (Kolodziej *et al.* 2002). El mecanismo implica un cambio de tal manera que la α -2m se colapsa sobre la proteasa y en el complejo α -2m-proteasa resultante, el sitio activo de la proteasa está protegido estéricamente, por lo tanto disminuye sustancialmente el acceso a sustratos proteicos. La enzima atrapada permanece activa tan solo contra

sustratos de bajo peso molecular, después de la escisión en la región cebo, la proteasa puede llegar a ser enlazada de una forma covalente, como resultado de reacciones de sustitución nucleofílica que involucra el enlace tioléster de la $\alpha 2m$, lo que limita el acceso con sus sustratos (Rehman *et al.* 2013; *The Uniprot consortium*, 2015). Adicionalmente, la activación de $\alpha 2m$ por su contacto con la proteasa permite que este enlace inhiba los receptores celulares *LRP* y *GRP78* para iniciar cascadas de señalización pro-proliferativas y antiapoptóticas (el receptor *GRP78* es enlazado en especial en células cancerosas) (Misra y Pizzo, 2015).

Finalmente el último cambio conformacional como consecuencia de la activación de la $\alpha 2m$ ya sea por proteólisis o por ataque nucleofílico directo al tioléster por parte de la metilamina, es la exposición en la superficie de los dominios de unión al receptor *LRP*/ $\alpha 2m$

Otras funciones descritas para $\alpha 2m$ son el transporte de citocinas, factores de crecimiento y hormonas (Chen *et al.* 2014 y referencias incluidas). Además, Misra y Pizzo (2015) demuestran que funciona como un factor de crecimiento en células de cáncer de próstata al promover respuestas parecidas a insulina.

En la búsqueda de biomarcadores para CCR, Yanlei *et al.* (2012), observó que la proteína $\alpha 2m$ presenta una expresión baja en este tipo de cáncer, sin embargo, la propuso como biomarcador potencial en ayuda al diagnóstico de CCR.

Gen *A2M*

El gen *A2M* se encuentra posicionado en el cromosoma 12p13.31, está codificado en la cadena (-) y mide aproximadamente 48 kb, está constituido por 36 exones que van de 21 a 229 pb de tamaño y su expresión genera la glicoproteína $\alpha 2m$. Se han descrito aproximadamente 1400 variantes de tipo polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) en la región codificadora de *A2M* (Safran *et al.* 2010;

OMIM *103950, 2015). Los SNPs pueden modificar la expresión de genes diana que regulan los comportamientos celulares (Goel y Boland, 2009).

Polimorfismo c.2998A>G

El polimorfismo c.2998A>G presenta el cambio de adenina por guanina en la posición 2998 del cDNA. Esta localización corresponde al exón 24 del gen *A2M*. En la proteína α -2m, este cambio se ubica en el aminoácido número 1000 sustituyendo una isoleucina por valina (Ile1000Val) cerca del sitio tioléster, lo que sugiere que ejerce cambios conformacionales en el sitio de unión de la proteína, impidiendo así la función reguladora de α -2m con las proteasas con las que interactúa (Cunningham *et al.* 2015).

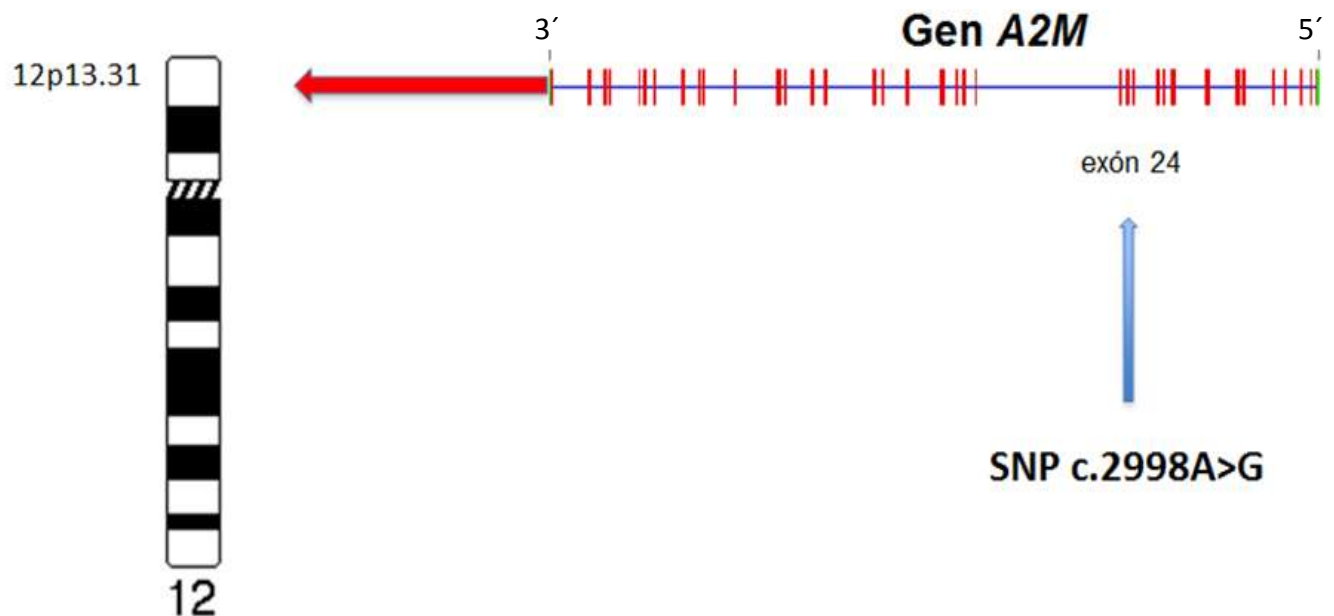


Figura 4. Localización del gen *A2M* en el cromosoma 12p13.31, el cual cuenta con 36 exones; en el exón número 24 marcado con una flecha se encuentra el polimorfismo c.2998A>G (Yanlei *et al.* 2012).

Frecuencia de c.2998A>G

Las frecuencias de este polimorfismo en distintas poblaciones se muestran en el cuadro 4. Hasta el momento no se han descrito reportes relacionados con la variante c.2998A>G del gen *A2M* en pacientes con cáncer.

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M* en individuos control de diferentes poblaciones.

Población	n	Genotipo			Alelo G	Autor
		AA	AG	GG		
EUA	184	0.34	0.51	0.15	0.40	Poduslo <i>et al.</i> 2002
EUA	446	0.40	0.48	0.12	0.36	Wang <i>et al.</i> 2001
EUA	487	0.41	0.46	0.13	0.36	Wavrant-DeVrière <i>et al.</i> 1999
EUA	39	0.41	0.53	0.05	0.32	Romas <i>et al.</i> 2000
Colombia	112	0.35	0.42	0.21	0.43	Benitez <i>et al.</i> 2010
España	89	0.47	0.40	0.12	0.33	Clarimón <i>et al.</i> 2003
Francia	651	0.44	0.43	0.11	0.34	Wavrant-DeVrière <i>et al.</i> 1999
Italia	310	0.56	0.35	0.08	0.26	Bruno <i>et al.</i> 2010
Italia	264	0.62	0.32	0.04	0.21	Colacicco <i>et al.</i> 2009
Italia	136	0.51	0.36	0.12	0.31	Mariani <i>et al.</i> 2006
Italia	98	0.54	0.39	0.06	0.26	Nacmias <i>et al.</i> 2001
Italia	158	0.42	0.46	0.10	0.34	Zappia <i>et al.</i> 2004
Alemania	280	0.30	0.53	0.16	0.43	Depboylu <i>et al.</i> 2006
Alemania	118	0.44	0.47	0.08	0.32	Zill <i>et al.</i> 2000
UK	107	0.36	0.49	0.14	0.39	Gibson <i>et al.</i> 2000
UK	73	0.45	0.42	0.12	0.34	Singleton <i>et al.</i> 1999
Polonia	100	0.40	0.41	0.19	0.40	Styczynska <i>et al.</i> 2003
Japón	65	0.53	0.38	0.07	0.27	Higuchi <i>et al.</i> 2000
Japón	95	0.86	0.12	0.01	0.007	Shibata <i>et al.</i> .2000
Finlandeses	203	0.31	0.51	0.17	0.43	Myllykangas <i>et al.</i> 1999
Hungría	51	0.49	0.45	0.05	0.28	Janka <i>et al.</i> 2002
Holanda	358	0.44	0.44	0.10	0.33	Koster <i>et al.</i> 2000
Irlanda	237	0.49	0.40	0.10	0.30	Mcllroy <i>et al.</i> 2001
Taiwan	111	0.89	0.10	0.01	0.06	Hu <i>et al.</i> 2000
China	200	0.84	0.14	0.01	0.08	Bian <i>et al.</i> 2005
China	195	0.86	0.13	0.005	0.07	Chen <i>et al.</i> 2004
China	190	0.92	0.06	0.5	0.04	Tang <i>et al.</i> 2002

JUSTIFICACIÓN

El CCR con etiología en la combinación de factores genéticos y ambientales, representa una de las primeras causas de morbi-mortalidad en México. La manifestación del 90% de los casos de CCR como esporádicos implica que ocurren alteraciones en pocos genes de alta penetrancia y en cambio, influyen en su desarrollo variantes múltiples entre las que se incluyen los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs localizados en diferentes regiones genómicas.

Definir factores genéticos asociados a CCR es trascendente para conocer las características de este tipo de cáncer frecuente en los mexicanos. No se ha determinado la asociación con cáncer de la variante polimórfica c.2998A>G del gen *A2M*, que codifica para alfa-2-macroglobulina, inhibidor universal de proteasas. La asociación de c.2998A>G con CCR es analizada en este estudio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CCR es el tercer cáncer más común en mexicanos con afectación principal a adultos mayores. La incidencia de CCR en el año 2012 fue reportada en México con 3,995 casos nuevos para mujeres y 4,656 casos nuevos en hombres. En el Occidente de México se presentaron 424 casos, lo que representa un 13 % del total de casos respecto al resto del país en 2011.

La búsqueda de factores genéticos que se asocien a CCR es necesaria para identificar riesgos o factores de protección a este tipo de cáncer. Dado que no se conoce la relación de la variante c.2998A>G del gen *A2M* con CCR se plantea la siguiente pregunta:

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre el polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M* con cáncer colorrectal en pacientes del Occidente de México?

HIPÓTESIS

El polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M* se encuentra asociado con cáncer colorrectal en pacientes del Occidente de México.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la asociación del polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M* con cáncer colorrectal en pacientes del Occidente de México.

Objetivos Particulares

- Examinar las frecuencias genotípicas y alélicas de c.2998A>G del gen *A2M* en la población de referencia.
- Identificar si la población de referencia se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M*.
- Analizar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M* en tejido tumoral y sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal.
- Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre los tejidos analizados de los pacientes con cáncer colorrectal.
- Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre la población de referencia y los tejidos de estudio en los pacientes con cáncer colorrectal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Se realizará un estudio analítico, prospectivo y comparativo.

Universo de estudio

Pacientes diagnosticados con CCR e individuos sanos captados en los Hospitales Civiles de Guadalajara.

Análisis estadístico

La estimación de frecuencias alélicas y genotípicas se realizó por conteo. El Cálculo del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y determinación de asociación fue obtenido mediante la prueba de bondad de ajuste χ^2 (chi cuadrada) y Odds Ratio (OR). Se consideró $p < 0.05$ como nivel de significancia.

Tamaño de muestra

Se calculó el tamaño de la muestra considerando un sistema bialélico que se reporta mediante proporciones, de acuerdo a la fórmula (Aguilar, 2005):

$$n = \frac{Z^2 p q}{d^2}$$

Dónde:

p = Proporción aproximada del fenómeno en estudio en la población de referencia (0.43).

q = Proporción de la población de referencia que no presenta el fenómeno en estudio (1 - p).

Z = Z crítico calculado en las tablas del área de la curva normal. Llamado también nivel de confianza, correspondiente al 90 % (1.645).

n = tamaño de la muestra.

d = Amplitud total del intervalo de confianza correspondiente a 0.1

Sustitución:

$$n = \frac{(1.645)^2 (0.43) (0.57)}{(0.1)^2}$$

n = 66 individuos por grupo de estudio

La frecuencia del alelo G de la variante c.2998A>G correspondiente a p=0.43, se consideró del reporte de Benítez *et al.* (2010) en población normal colombiana, debido a que no se tienen reportes en México.

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de cáncer colorrectal primario que acudieron al Hospital Civil “Dr. Juan I Menchaca”.
- Individuos sanos sin antecedentes familiares de CCR (población de referencia).
- Sexo indistinto.
- Originarios del Occidente de México.
- No consanguíneos.
- Individuos que estén de acuerdo en colaborar en este protocolo de investigación firmando un consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Individuos con transfusión de sangre menor a 3 meses.

Criterios de eliminación

- Muestras de material genético dañado, degradado, contaminado o insuficiente para establecer el genotipo.
- Individuos de los que no se cuente con alguna de sus muestras (sangre o tejido).

Aspectos Éticos

Este trabajo se realizó de acuerdo a la Ley General de Salud en materia de Investigación, última reforma publicada DOF 19-Dic-2014. La investigación en este proyecto se consideró sin riesgo.

Se anexan las hojas de consentimiento informado de investigación para la extracción de sangre periférica de pacientes con CCR y de individuos sanos (Anexo 1).

Para la obtención de las muestras de tejido tumoral no se obtuvo consentimiento informado de acuerdo al artículo 342 en materia de investigación de la misma Ley, que se cita a continuación:

“Artículo 342.- Cualquier órgano o tejido que haya sido extraído, desprendido o seccionado por intervención quirúrgica, accidente o hecho ilícito y que sanitariamente constituya un deshecho, deberá ser manejado en condiciones higiénicas y su destino final se hará conforme a las disposiciones generales aplicables, salvo que se requiera para fines terapéuticos, de docencia o de investigación, en cuyo caso los establecimientos de salud podrán disponer de ellos o remitirlos a instituciones docentes autorizadas por la Secretaría de Salud, en los términos de esta Ley y demás disposiciones generales aplicables”.

Se mantiene absoluta confidencialidad de los datos personales de los individuos.

Obtención de muestras de sangre periférica de población de referencia

Las muestras de la población de referencia se obtuvieron de individuos sanos del Banco de Sangre del Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca” y del Laboratorio General del Hospital civil “Fray Antonio Alcalde”; se captó una muestra de 5 ml de sangre periférica por punción venosa en tubos con EDTA.

Obtención de muestras de pacientes con CCR

Se obtuvieron 5 ml de sangre periférica en tubos con EDTA de los pacientes diagnosticados con CCR en el Servicio de Colon y Recto del Hospital Civil “Dr. Juan I. Menchaca”.

Las muestras de tejido tumoral se obtuvieron posterior a la resección quirúrgica y se colocaron inmediatamente después en un frasco estéril con solución salina.

Extracción de DNA de sangre periférica

Se extrajo el DNA mediante el método combinado Macrométodo (Miller, 1988) y Micrométodo DTAB-CTAB (Gustincich, 1991) (Anexo 2).

Extracción de DNA de tejido tumoral

El DNA de tejido se extrajo con el kit “High Pure PCR Template Preparation” de la marca Roche (Anexo 3).

Cuantificación de DNA

La concentración y pureza del DNA se determinó por medio de espectrofotometría a 260 nm y a 280 nm. Posteriormente se diluyó para realizar alícuotas de 100 ng/μl (Anexo 4).

Amplificación génica

La amplificación del gen *A2M* se realizó mediante la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) con iniciadores reportados por Zappia *et al.* (2004) que flanquean la secuencia donde se encuentra el polimorfismo, la secuencia de los iniciadores así como el tamaño del producto amplificado se describe en figura 5 y cuadro 5, el resto de la técnica se describe en el anexo 5.

```
3'...GGAGACATATTAGGCTCTGCCATGCAAACACACAAAATCTTCTCCAGAT
GCCCTATGGCTGTGGAGAGCAGAATATGGTCCTCTTTGCTCCTAACAT
CTATACTGGATTATCTAAATGAAACACAGCAGCTTACTCCAGAGATCAA
GTCCAAGGCCATTGGCTATCTCAACTGGTGAGTGATTACTTGAGTAA
GGGAAAACCTTGAATGTTATTTCAACTGGATTCCAGTAGGTTTCAG 5'
```

Figura 5. Localización del polimorfismo c.2998A>G. Secuencia parcial del gen *A2M* (>chromosome: GRCh37:12:9219660:9269425:-1, Ensembl Genome Browser, ENSG00000175899, 28 abril 2015 (Cunningham *et al.* 2015) donde se localiza el SNP c.2998A>G (subrayado en naranja), el sitio de hibridación de los iniciadores (línea punteada). Dónde: Letras en azul: secuencia parcial del intrón 24, letras en verde: exón 24 del gen.

Cuadro 5. Secuencia de los iniciadores para el polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M* y tamaño del producto amplificado.

Gen	Polimorfismo	Iniciadores:	Tamaño del producto amplificado
<i>A2M</i>	c.2998A>G	F 5´-GGAGACATATTAGGCTCTGC-3´ R 5´-CTGAAACCTACTGGGAAATCC3´	245 pb

Digestión enzimática

La identificación del polimorfismo se realizó mediante RFLP por sus siglas en inglés *restriction fragment length polymorphism* (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) con la enzima de restricción *Mbol* con una incubación a 37 °C durante 16 horas (anexo 6).

La enzima *Mbol* reconoce el alelo silvestre (Adenina); la secuencia de reconocimiento y corte de la enzima se muestra en la figura 6. Los fragmentos esperados después del corte por reconocimiento de la enzima se ilustran en el cuadro 6.

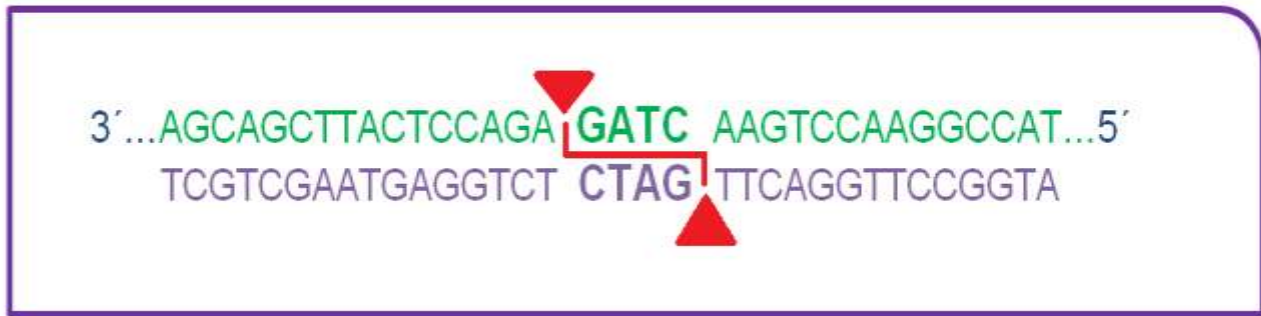


Figura 6. Región de reconocimiento y corte de la enzima *Mbol* (New England BiolabsR^{INC}, 2015) en DNA de doble cadena, donde se muestra la secuencia parcial del gen *A2M* (Verde) hibridado por su cadena complementaria (>chromosome: GRCh37:12:9219660:9269425:-1, Ensembl Genome Browser, ENSG00000175899, 28 abril, 2015 (Cunningham *et al.* 2015).

Cuadro 6. Genotipos y fragmentos esperados de la digestión enzimática.

Gen	Polimorfismo	Enzima de restricción	Genotipo	Alelos	Fragmentos esperados	Tamaño
<i>A2M</i>	c.2998A>G	<i>Mbol</i>	Homocigoto silvestre	AA	2	102, 143pb
			Heterocigoto	AG	3	245, 143, 102 pb
			Homocigoto polimórfico	GG	1	245 pb

Electroforesis

La amplificación de la secuencia de interés del gen *A2M*, así como los productos de la digestión enzimática se separaron y visualizaron en geles de poliacrilamida 29:1 al 6 % teñidos con nitrato de plata (anexo 7).

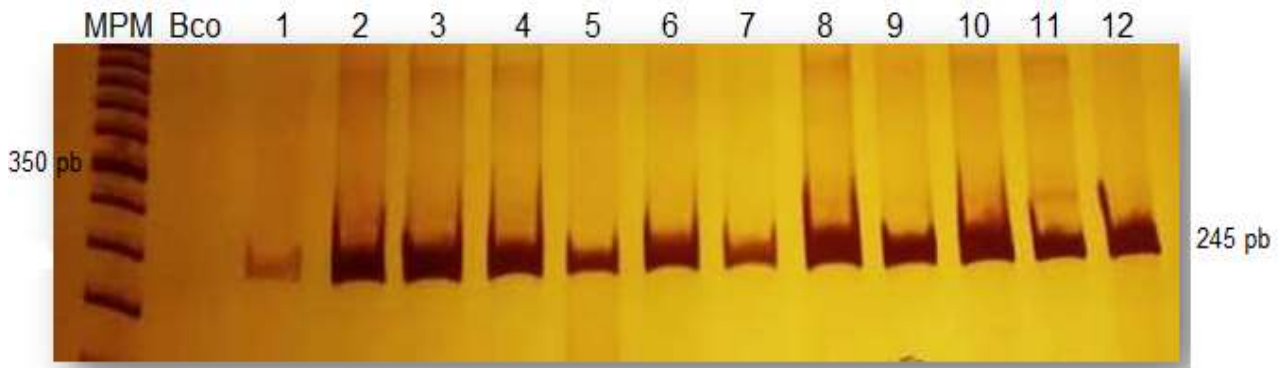
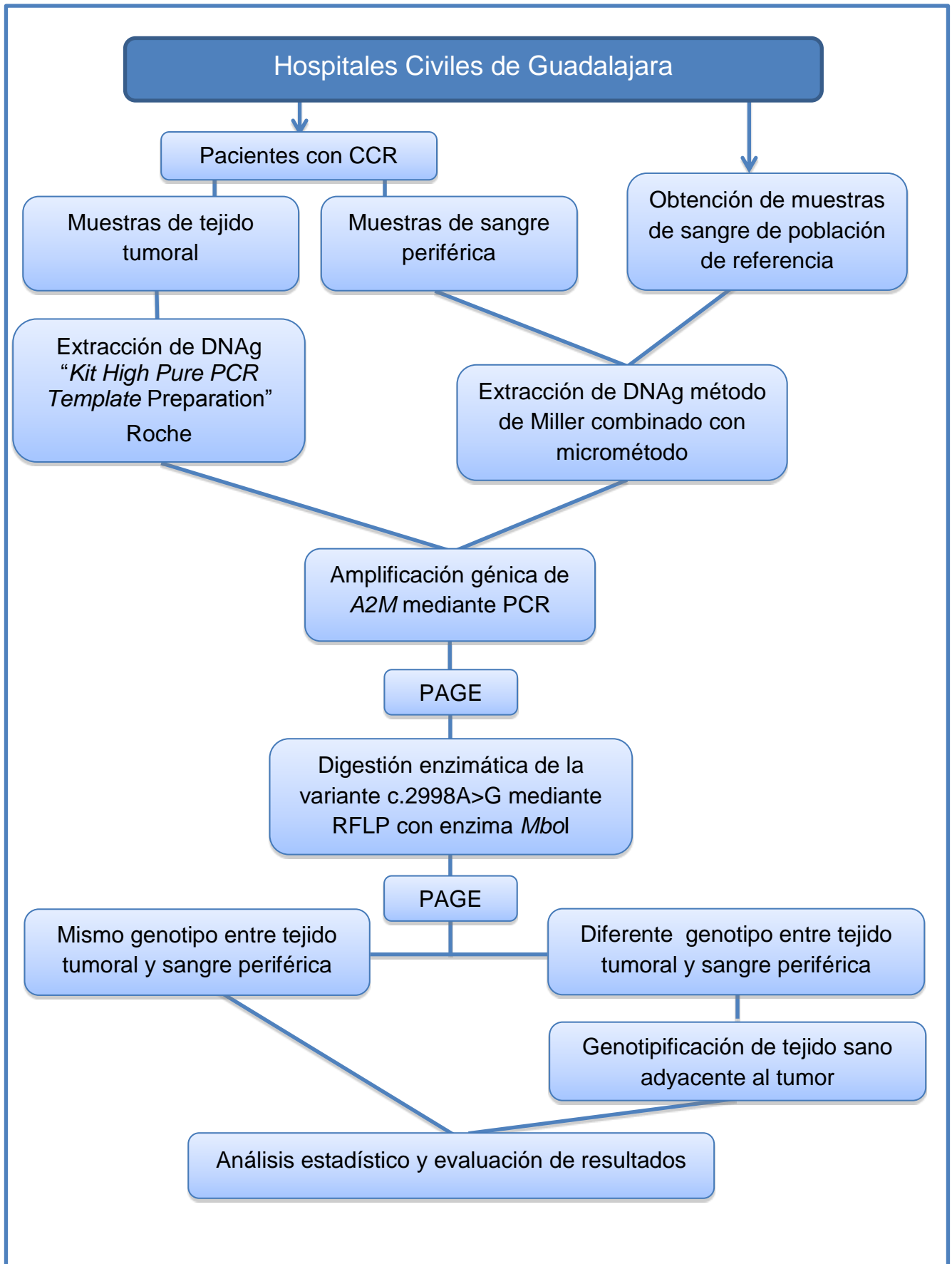


Figura 7. Amplificación génica mediante PCR de una secuencia parcial del gen *A2M* donde se encuentra la variante c.2998A>G, se corrió en un gel de poliacrilamida al 6 % teñido con nitrato de plata; donde: MPM: Marcador de tamaño molecular de 50 pares de bases, Bco: Blanco de reacción, pb: pares de bases, 1-12: muestras representativas de población de referencia.

Control de calidad de genotipificación

El proceso de genotipificación se realizó por duplicado. Con este control se evitaban errores de interpretación, sin embargo, los resultados aún discordantes o confusos fueron confirmados por tercera ocasión utilizando la misma técnica de PCR-RFLP.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Población de referencia

Se analizaron 146 muestras de individuos sanos, captados en el banco de sangre del Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca” y Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde”, con una edad promedio de 42 años dentro de un rango de 19 a 48 años. Noventa de los 146 individuos fueron del género masculino (62 %).

La población se encontró en equilibrio de acuerdo al supuesto de Hardy-Weinberg para el polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M*, como se observa en el cuadro 7, donde se describen las frecuencias genotípicas y alélicas. La figura 8 muestra ejemplos de genotipos obtenidos.

Cuadro 7. Frecuencias genotípicas y alélicas de 146 individuos de población de referencia para el polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M* y el cálculo del EHW.

Genotipo	Observados n=146	%	Esperados n=146	%	EHW
A/A	67	46	62	43	p=0.098
A/G	57	39	66	45	
G/G	22	15	17	12	
Alelo					
A	191	65			
G	101	35			

Prueba estadística: χ^2

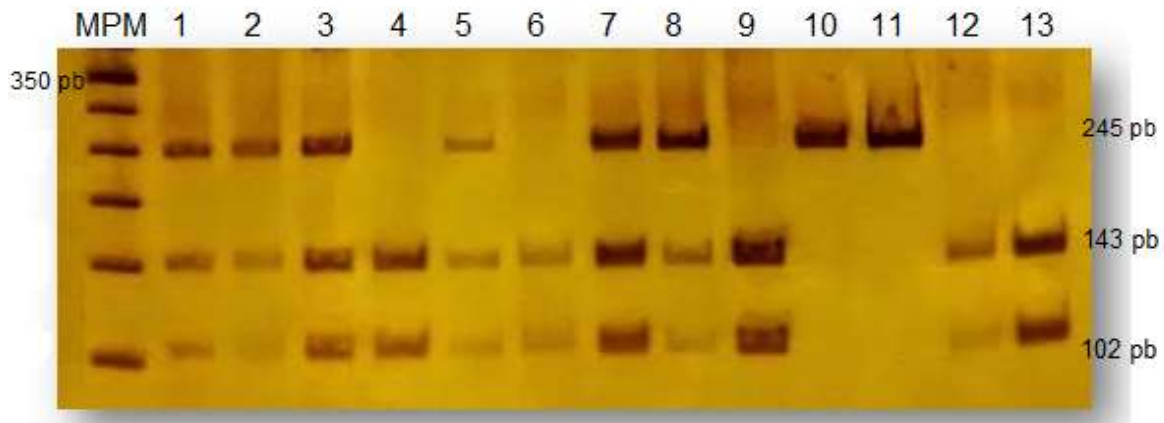


Figura 8. Digestión enzimática con la enzima *Mbol* para el polimorfismo c.2998A>G en población de referencia, es posible apreciar los diferentes genotipos. MPM: marcador de peso molecular de 50 pb, carriles 1, 2, 3, 5, 7 y 8 heterocigoto (AG), carriles 4, 6, 9, 12 y 13 homocigoto silvestre (AA) y carriles 10 y 11 homocigoto polimórfico (GG).

Pacientes con CCR

Se captaron 62 pacientes con CCR del Hospital Civil de Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca”. Se describen las características clínicas y demográficas de 60 pacientes en el cuadro 8. De los dos restantes no fue posible obtener información.

Cuadro 8. Características clínicas y demográficas de los pacientes con CCR.

Variable	n=62 (%)
Edad promedio en años (rango)	63 (34-96)
Género	
Masculino	38 (61)
Femenino	24 (39)
Localización del tumor	
Colon	35 (56)
Recto	25 (40)
Sin dato	2 (4)
Grado de diferenciación	
Bien	2 (3)
Moderado	40 (64)
Poco	7 (11)
Sin dato	13 (20)
Metástasis	
Positiva	24 (38)
Negativa	17 (27)
Sin dato	21 (33)

Análisis de asociación

Posterior a la estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas de la variante, se realizó el análisis de asociación y se determinaron los valores de p y Odds Ratio (cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre la población de referencia y pacientes con CCR en sus dos tejidos.

Tejido	Genotipo	Población de referencia	Pacientes CCR	p*	OR (IC 95%)
Sangre periférica		n=146 (%)	n=62 (%)		
	A/A	67 (46)	25 (40)		1.0 (referencia)
	A/G	57(39)	32 (52)	0.20	1.50 (0.8-2.8)
	G/G	22(15)	5 (8)	0.52	0.61 (0.21-1.78)
	Alelo				
	A	191 (65)	82 (62)		
G	101 (35)	42 (34)	0.88	0.97 (0.62-1.51)	
Tumor		n=146 (%)	n=62 (%)		
	A/A	67 (46)	25 (40)		1.0 (referencia)
	A/G	57(39)	33 (53)	0.17	1.55 (0.83-2.90)
	G/G	22(15)	4 (7)	0.33	0.49 (0.15-1.55)
	Alelo				
	A	191 (65)	83 (67)		
G	101 (35)	41 (33)	0.76	0.93 (0.6-1.4)	

*Prueba estadística: χ^2 o Exacta de Fisher.

El análisis de asociación no mostró diferencias significativas de las frecuencias obtenidas en tumor y sangre periférica de los pacientes con CCR respecto a la población de referencia, con una $p > 0.05$ en todos los casos.

Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas entre los tejidos analizados de pacientes con CCR

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas de los tejidos de sangre periférica y tejido tumoral de los pacientes con CCR se compararon mediante X^2 sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p=0.93$, $OR=1.03$, $CI=95\%$ 0.493-2.156) y ($p=0.89$, $OR=0.96$, $CI=95\%$ 0.569-1.634) respectivamente, sin embargo se identificaron 3 de 62 pacientes con genotipo diferente entre tumor y sangre de los pacientes (5%). Ante este hallazgo, los pacientes 30, 58 y 59 fueron analizados tres veces y de forma adicional se consideró realizar la identificación del genotipo en tejido colorectal sano adyacente al tumor, para determinar si la variación correspondía a alteraciones somáticas propias del tejido tumoral. Se encontró que los genotipos de sangre periférica y tejido sano fueron idénticos a diferencia del encontrado en tejido tumoral, con esto se confirmó la variación somática intraindividual en tres pacientes (figura 9). La posibilidad de que el genotipo se debiera a la presencia de hemicigocidad o transición entre bases nitrogenadas se describe en el cuadro 10. Las características de los pacientes se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 10. Comparación de frecuencias genotípicas de diferentes tejidos de pacientes con CCR.

No de Paciente	Genotipo en sangre periférica	Genotipo en tejido sano	Genotipo en tejido tumoral	Hemicigocidad	Transición
30	GG	GG	AG	-	Posible
58	AA	AA	AG	-	Posible
59	AG	AG	AA	Posible	Posible

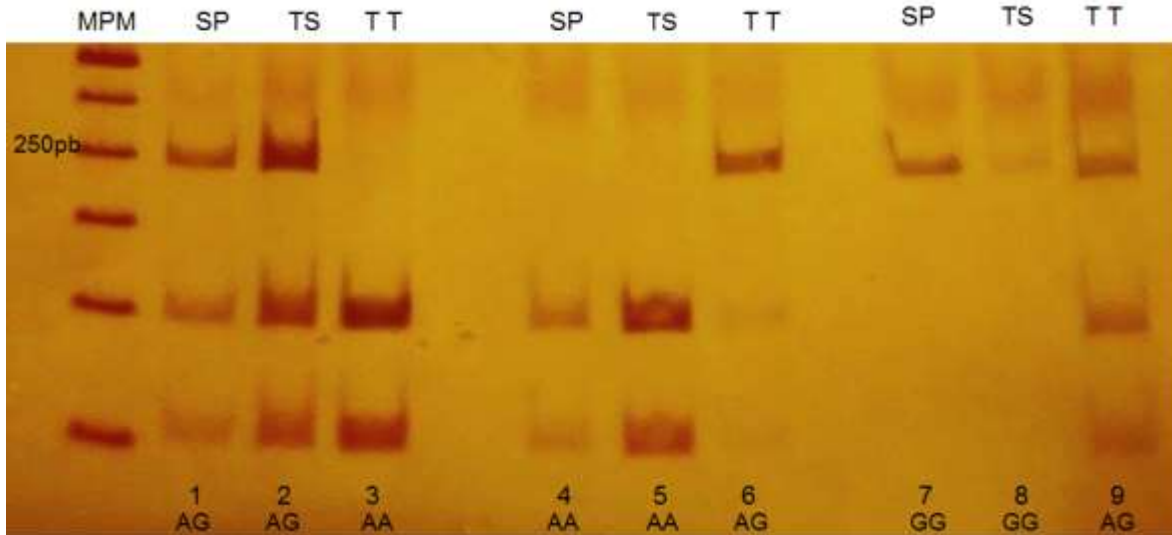


Figura 9. Variación somática intraindividual en tres pacientes con CCR. MPM: marcador de peso molecular de 50pb, SP; sangre periférica, TS; tejido sano, TT; tejido tumoral. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden al paciente No.59, carriles 4, 5 y 6 al paciente No.58 y carril 7, 8 y 9 paciente No. 30. Se observa que para cada paciente el genotipo tumoral difiere con respecto a sangre periférica y tejido sano adyacente al tumor.

Cuadro 11. Características de los pacientes con CCR y variación somática intraindividual.

No. de Paciente	Género	Edad	Localización del tumor	Grado de diferenciación del tumor	Metástasis
30	Masculino	37	Colon	moderado	no
58	Masculino	39	Colon	bien	si
59	Masculino	82	Recto	moderado	SD

SD=sin dato

DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron 146 individuos sanos como población de referencia, de los cuales el 62 % correspondió a hombres y el 38 % a mujeres. Dentro de este grupo de estudio, el alelo polimórfico G se presentó con una frecuencia de 35 %, similar a lo reportado en poblaciones como EUA (36 %), Francia, Italia, UK (34 %) y España (33 %) (Wang *et al.* 2001; Wavrant-DeVrièze, *et al.* 1999, Zappia *et al.* 2004, Singleton *et al.* 1999 y Clarimón *et al.* 2003, respectivamente). Por otra parte, China, Taiwán y Japón resultaron ser las poblaciones más disimiles respecto a la frecuencia de este alelo con menos de 6% en su población de referencia (Tang y Zhang 2002, Hu *et al.* 2000, Shibata *et al.* 2000). Estas similitudes y discrepancias pueden ser explicadas principalmente por la estructura poblacional mexicana, dado que el componente genético de los mestizos de Jalisco, grupo mayoritario en la población de referencia, corresponde a 53 % amerindio, 31 % europeo y 16 % africano, aunque estas ascendencias son las principales, se describe una escasa contribución asiática pero no nula dentro de la población mestiza (Rubi-Castellanos *et al.* 2009).

A pesar de que el tamaño de muestra no fue posible obtenerlo de acuerdo a lo estimado, se analizaron 62 pacientes con CCR, de ellos el 61 % fueron del género masculino. Este resultado concuerda con Tirado-Gómez y Mohar-Betancourt (2008); y Lizarraga *et al.* (2012) quienes describen una frecuencia de 61 % en hombres sinaloenses con CCR. Así también el perfil epidemiológico de los tumores malignos en México (SINAIS, 2011) perteneciente a la Secretaría de Salud de México, hace énfasis en la frecuencia de CCR más alta en hombres que en mujeres. Por el contrario Vilches-Cisneros *et al.* (2010) describen que la frecuencia de CCR afecta por igual a ambos sexos en pacientes mayores de 50 años en el estado de Nuevo León.

La edad avanzada es una característica predominante en los pacientes con CCR, como lo manifiesta Libutti *et al.* (2005), al describir que el 80 % de los casos

corresponden a mayores de 60 años. La edad promedio encontrada en este estudio es de 63 años con un rango de 34 a 96 años.

Respecto a la localización anatómica, en este estudio el cáncer se presentó en un 56 % en colon y un 40 % en recto, semejante a los datos de Lizarraga *et al.* (2012) en el norte del país; sin embargo, según los datos del SINAIS (2011), el cáncer de colon tiene una relación de 2:1 con respecto al cáncer de recto.

El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), notificó que para el año 2004 el 36% del total de casos nuevos de cáncer fueron de colon y el 37 % de recto; por su parte, en ese mismo año, Secretaría de Salud reportó que el 15 % de los casos nuevos fueron en colon y el 18 % en recto, equivalentes a una tercera parte del total de casos registrados en México (Tirado-Gómez y Mohar-Betancourt, 2008).

Labianca *et al.* (2010) refieren que el tipo histológico más común de CCR es el adenocarcinoma, que representa aproximadamente del 90 % - 95 % de todos los tumores de colon, acorde con Lizarraga *et al.* (93.9 %) y con este estudio los cuales presentan la misma proporción. El grado de diferenciación del carcinoma fue moderado en el 64 % de los pacientes de este análisis, discordante respecto a Vilches-Cisneros *et al.* (2010) y Lizarraga *et al.* (2012) quienes reportaron un 81 % de casos con grado moderado. Sin embargo, en la mayoría de estudios incluyendo el presente, el grado menos común de diferenciación, fue el bien diferenciado, lo que implica que los pacientes son diagnosticados cuando el CCR ya tiene un grado considerable de avance y por lo tanto, desdiferenciación del tejido afectado.

Este estudio representa el primer análisis de asociación del polimorfismo *A2M* c.2998 A>G con cáncer. Al realizar la comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas entre la población de referencia y los diferentes tejidos de los pacientes con CCR no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que no se identificó asociación de la variante con este tipo de cáncer. Sin embargo, la proteína α -2m tiene una función amplia en estrecha relación a eventos significativos en la carcinogénesis. Pese a que no hubo asociación, se considera que otras variantes a lo largo del gen *A2M*, localizadas principalmente en región

promotora y/o en región que corresponde al sitio tioléster en la proteína, pudieran afectar la función enzimática de α -2m, que es posible conlleve consecuencias de desequilibrio en la regulación de inhibición de proteasas, proteínas relacionadas con el cáncer, especialmente con procesos metastásicos.

No obstante la falta de asociación de la variante *A2M* c.2998 A>G con CCR, tres de los 62 pacientes (5 %) presentaron diferencias genóticas en muestras de sangre periférica y tejido tumoral. La discrepancia mostrada entre este 5 % de los pacientes, llevó a verificar el resultado, de acuerdo a lo recomendado por Marisi *et al.* (2014). Esto consistió en analizar el tejido sano adyacente al tumor y así se corroboró el hallazgo de variación somática intraindividual, semejante a lo reportado por Van Huis *et al.* (2013) quienes analizaron 149 pacientes holandeses con CCR, de los cuales el 3 % mostró discrepancias genóticas en muestras de sangre y tejido tumoral. Por otra parte Balboa *et al.* (2010) reportaron una tasa de variación somática del 22.3 % entre sangre periférica y tejido tumoral de 65 pacientes españoles con CCR y describieron adicionalmente que el 72 % de los pacientes presentaron diferencias en relación con 8 SNPs. Finalmente, Marsh *et al.* (2005) reportaron que el 1.1 % de 1139 comparaciones de 28 SNPs, entre muestras de tejido tumoral y tejido sano adyacente en 44 pacientes con CCR, presentaron dicha variación somática. Los autores mencionados concuerdan con Lasko *et al.* (1991) al describir que las discrepancias entre los genotipos encontrados en sangre periférica y tumor pueden estar relacionadas con LOH en tumores.

La LOH en un locus que presenta un alelo variante y otro normal, implica la delección o mutación del alelo normal ocasionando que el genotipo quede conformado por un alelo variante y otro delecionado o mutado, otra presentación del genotipo puede ser homocigoto para el alelo variante (NLM, 2015). Sin embargo, en ninguno de los tres pacientes con variación somática, se presentó el genotipo homocigoto polimórfico GG en tejido tumoral, como correspondería al hallazgo de LOH. En los pacientes 30 y 58 el genotipo tumoral fue heterocigoto AG y en el paciente 59, correspondió al homocigoto silvestre AA. Así, una de las

posibles explicaciones para la presencia de AG o AA en tumor puede ser la transición G-A o A-G. El mecanismo que explicaría esta transición púrica corresponde a la presencia de la forma tautomérica enol de la Guanina y Adenina, en vez de la forma ceto normal, que puede generar apareamientos ilegítimos durante la replicación y producir en la segunda generación celular la presencia de una Adenina y Guanina respectivamente (Snustad y Simmons, 2006).

En relación directa con la posibilidad de transiciones, Van Huis *et al.* (2013), en un análisis de la variante *GSTP1* rs1695 G>A entre muestras de tumor parafinado y sangre periférica, reportaron transición del heterocigoto al homocigoto silvestre en 4 (6 %) de 69 tumores de pacientes CCR heterocigotos.

Para el paciente 59, también existe la posibilidad de que el genotipo interpretado como homocigoto AA en tejido tumoral corresponda solo a la presencia del alelo A, esto es, pérdida del alelo G en el tumor, dado que su genotipo en sangre y tejido sano es AG. Esta condición es conocida como hemicigocidad y es establecida por delección de segmento cromosómico o pérdida total del cromosoma. Este tipo de cambios o mutaciones forman parte de la inestabilidad cromosómica, que es una vía principal en el desarrollo del CCR (Bogaert y Prenen, 2014). La búsqueda de alteraciones cromosómicas directamente relacionadas con el cromosoma 12p13.31, donde se localiza el gen *A2M*, se realizó en la base de datos de Mitelman (Mitelman, 2015), de acuerdo a esta base y en relación a adenocarcinomas del sistema digestivo, al colon corresponde el 29% del total de monosomías del cromosoma 12 y 14 % de delecciones de 12p13; lo anterior apoya la factibilidad de encontrar hemicigocidad para el gen *A2M* en pacientes con CCR.

Al analizar los datos clínicos de los tres pacientes, se identificó que los tres son varones y dos de ellos son jóvenes menores de 40 años. Sin embargo, dado el número reducido (5 %) no se pudo establecer relación con edad y género, localización del tumor o grado de avance.

Es de resaltar que en este estudio las muestras tumorales analizadas fueron de tejido fresco, considerado como el tejido idóneo para análisis molecular. Autores como Van Huis *et al.* (2013), Marisi *et al.* (2014) y Rai *et al.* (2014), reportaron sus hallazgos en tejido parafinado y discuten que el tratamiento agresivo de fijación pudo haber provocado alteraciones moleculares y falsos positivos durante la genotipificación.

CONCLUSIONES

1. La frecuencia del alelo polimórfico G de la variante c.2998A>G del gen *A2M* fue de 35 % en población de referencia del Occidente de México, la población se encontró en equilibrio de acuerdo al supuesto de Hardy-Weinberg.
2. La frecuencia del alelo polimórfico G de la variante c.2998A>G del gen *A2M* fue de 33 % en tejido tumoral y de 34 % en sangre periférica en los pacientes con CCR.
3. No se encontró asociación del polimorfismo c.2998A>G del gen *A2M* con cáncer colorrectal en los pacientes analizados del Occidente de México.
4. Tres de los 62 pacientes con CCR presentaron una diferencia genotípica en tejido tumoral con respecto al tejido sano y sangre periférica, hallazgo conocido como variación somática intraindividual.

PERSPECTIVAS

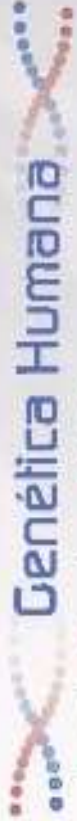
1. Análisis de otros polimorfismos del gen *A2M* que involucren cambios estructurales en la proteína y que pudieran estar relacionados con cáncer colorrectal.
2. Búsqueda de deleciones del cromosoma 12 para asociar hallazgos de genotipos homocigotos en pacientes con cáncer colorrectal.
3. Aumento del tamaño de muestra para el estudio de asociación de la variación somática intraindividual con cáncer colorrectal.

APORTACIONES

Presentación en cartel del trabajo “ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO c.2998A>G DEL GEN *A2M* CON CÁNCER COLORRECTAL EN PACIENTES DEL OCCIDENTE DE MÉXICO” en el marco del XXIX Congreso Nacional de Genética Humana, realizado en Querétaro, Querétaro del 12 al 15 de noviembre de 2014 y en el XVII Congreso Internacional de Avances en Medicina, celebrado en Expo Guadalajara el 26, 27 y 28 de febrero del 2015.



XXXIX Congreso Nacional de



Genética Humana
Juriquilla, Querétaro 12 al 15 de noviembre de 2014

La Asociación Mexicana de Genética Humana A.C.
otorga la presente

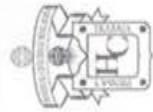
CONSTANCIA

ci:

**Helen Haydee Fernanda Ramírez Plascencia, María de la Luz
Ayala Madrigal, Melva Gutiérrez Angulo, Alexis Sayuri Suárez
Villanueva, Ramón Franco Topete, Felipe de Jesús Cerda
Camacho, Jorge Peregrina Sandoval**

Por la presentación del Cartel "Asociación de Polimorfismo C.2998A>G del Gen A2M con
Cáncer Colorrectal en Pacientes del Occidente de México"
en el **XXXIX Congreso Nacional de Genética Humana**,
celebrado en Juriquilla, Querétaro del 12 al 15 de noviembre de 2014.

Dr. Diego J. Arenas Aranda
Presidente la Asociación Mexicana de
Genética Humana



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias de la Salud
Hospital Civil de Guadalajara



Otorgan la presente

CONSTANCIA

A: Ramírez-Plascencia Helen Haydee F., Ayala-Madrigal María de la Luz, Gutiérrez-Angulo Melva, Suárez-Villanueva Alexis S., Franco-Topete Ramón, Cerdá-Camacho Felipe de Jesús, Peregrina-Sandoval Jorge

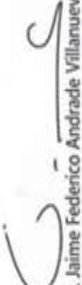
**Por haber participado en el XIV Concurso de Trabajos Libres en Cartel con el trabajo titulado:
Asociación del polimorfismo c.2998A>G del gen A2M con cáncer colorrectal en pacientes del occidente de México**

XVII Congreso Internacional Avances en Medicina Hospital Civil de Guadalajara 2015

CALIDAD DE VIDA. PRIORIDAD EN SALUD

Celebrado en Expo Guadalajara del 26, 27, 28 de Febrero de 2015
Guadalajara, Jal. México


Dr. Héctor Raúl Pérez Gómez
Director General
OPD, Hospital Civil de Guadalajara


Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva
Rector
Centro Universitario de Ciencias de la Salud


Dr. Benjamín Becerra Rodríguez
Director
Antiguo Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"


Dr. Francisco M. Preciado Figueroa
Director
Nuevo Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan L. Menchaca"


Dr. José de Jesús González Jaime
Presidente Ejecutivo
XVII Congreso Internacional Avances en Medicina

REFERENCIAS

- Aguilar-Barojas S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. Salud en Tabasco, Secretaría de Salud, Villahermosa, México. (11)1-2: 333-338.
- Alejos L, Aragón Martínez M, Cornejo Romero A. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Extracción y purificación de DNA. Unidad de Biotecnología y Prototipos. Universidad Nacional Autónoma de México. Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México. 1-25.
- Andreu M, Fernández A, Ponce García J. (2011). Pólipos colorrectales y poliposis intestinal. Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas. Pólipos colorrectales y poliposis intestinal. Tercera edición. Editorial AEG. 317-326.
- Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. (2011). Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. BMJ. 343-617.
- Balboa E, Duran G, Lamas M, Gomez-Caamaño A, Celeiro-Muño C, Lopez R, Carracedo A, Barros F. (2010). Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relation with response. Pharmacogenomics. 11(6):747–761.
- Barrera V D, Arbeláez R L.F. (2006). Alfa2-macroglobulina, inhibidor de proteasas altamente sofisticado. Bistua. 4 (1):56-58.
- Benitez A, Forero A, Arboleda H, Granados A, Yunis J, Fernandez W, Arboleda H. (2010). Exploration of Genetic Susceptibility Factors for Parkinson's disease In A South American Simple. Journal of Genetics. 89(2):229-32.
- Bian L, Yang J, Guo T, Duan Y, Qin W, Sun Y, Feng G, He L. (2005). Association study of the *A2M* and *LRP1* Genes with Alzheimer disease in the Han Chinese. Biol Psychiatry. 58(9):731-327.

- Bogaert J, Prenen J. Molecular genetics of colorectal cancer. (2014). University Hospital Leuven, Belgium. *Annals of Gastroenterology*. 27(1):1-6.
- Booth FW, Chakravarthy MV, Gordon SE, Spangenburg EE. (2002). Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. *J Appl Physiol*. 93:3-30.
- Brown G, Hem V, Katz K, Ovetsky M, Wallin C, Ermolaeva O, Tolstoy I, Tatusova T, Pruitt K, Maglott D, Murphy T. (2015). Nucleic Acids Res. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. 43:36-42.
- Bruno E, Quattrocchi G, Nicoletti A, Le Pira F, Maci T, Mostile G, Andreoli V, Quattrone A, Zappia M. (2010). Lack of interaction between LRP1 and A2M polymorphisms for the risk of Alzheimer disease. *Neuroscience Letters*. 482:112-116.
- Carrillo-Soto J G, Candia Ma C, Lugo R E, Espinoza E, Noriega J A. (2013). Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *INVURNUS*. 8 (1):19-26.
- Chang C and Werb Z. (2001). The many faces of metalloproteases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*. 11:37-43.
- Chen D, Zhang J, Zhang Z, Wu Y, Qu Q. (2004). Association of *alpha 2-macroglobulin polymorphisms* and Alzheimer disease in Mainland Han Chinese. *J Neurol Sci*. 217(1):13-15.
- Chen H, Li Z, Liu N, Zhang W, Zhu G. (2014). Influence of Alpha-2-Macroglobulin 5 bp I/D and Ile1000Val Polymorphisms on the Susceptibility of Alzheimer's disease: A Systematic Review and Meta-analysis of 52 Studies. *Cell Biochem Biophys*. 70(1):511-9.
- Clarimón J, Bertranpetit J, Calafell F, Boada M, Tàrraga L, Comas D. (2003). Joint analysis of candidate genes related to Alzheimer's disease in a Spanish population. *Psychiatr Genet*. 13(2): 85-90.

- Colacicco A, Solfrizzi V, D'Introno A, Capurso C, Kehoe P, Seripa D, Pilotto A, Santamato A, Capurso A, Panza F. (2009). *Alpha-2-macroglobulin* gene, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 locus, and sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 30(9):1518-1520.
- Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S, Gil L, Garcin Girón C, Gordon L, Hourlier T, Hunt SE, Janacek SH, Johnson N, Juettemann T, Kähäri AK, Keenan S, Martin FJ, Maurel T, McLaren W, Murphy DN, Nag R, Overduin B, Parker A, Patricio M, Perry E, Pignatelli M, Singh Riat H, Sheppard D, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Wilder SP, Zadissa A, Aken BL, Birney E, Harrow J, Kinsella R, Muffato M, Ruffier M, Searle SMJ, Spudich G, Trevanion SJ, Yates A, Zerbino DR and Flicek P. (2015). *Ensembl Nucleic Acids Research*. 43 Database. 749-55.
- Depboylu C, Lohmüller F, Du Y, Riemenschneider M, Kurz A, Gasser T, Müller U, Dodel RC. (2006). *Alpha2-macroglobulin*, lipoprotein receptor-related protein and lipoprotein receptor-associated protein and the genetic risk for developing Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 400(3):187-190.
- Derry M, Raina K, Agarwal C, Agarwal R. (2013). Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Front Oncol*. 14. 3:119.
- Dirección General de epidemiología, registro Histopatode Neoplasias Malignas. Secretaría de Salud, (2011): 6-22.
- Durko L, Malecka-Panas E. (2014). Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*.10:45-54.
- Ewing I, Hurley J, Josephides E, Millar A. (2014). The molecular genetics of colorectal cancer. *Front Gastroenterol*. 5:26-30.
- Fearon E, Vogelstein B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. (1990). *Cell*. 61:759-767.

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D, Forman D and Bray F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. 1; 136(5):359-86.
- Gassaloglu M, Karasu I, Ozsoz A, Cakan A, Senol G, Erbaycu A. (2014). Are Serum *Alpha-1-Antitrypsin* and *Alpha-2-Macroglobulin* Levels Related with Tumor Histology or Stage of the Lung Cancer?UHOD. EBSCO. Journal of the Royal Society of Medicine. 83(11):743.
- Gibson A, Singleton A, Smith G, Woodward R, McKeith IG, Perry RH, Ince P, Ballard C, Edwardson J, Morris C. (2000). Lack of association of *the alpha2-macroglobulin* locus on chromosome 12 in DNA. Neurology. 25; 54(2):433-8.
- Goel A, Boland C. (2009). Recent insights into the pathogenesis of colorectal cancer. Curr Opin Gastroenterology. 26(1): 47-52.
- González N, Rodríguez N, Torres W, O'Callaghan J. (2011). Protocolo sencillo para la extracción de DNA genómico de tejido de oreja del ratón y la rata, usando la enzima *bromelina*. Universidad del Zulia Venezuela. Revista Científica, Vol. XXI, (3):233-238.
- Grady W, Pritchard C. (2014). Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. Toxicol Pathol. 42(1):124-139.
- Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal C, Schneider P, Carninci P. (1991). A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. BioTechniques. 11:298-301.
- Hagland H, Berg M., Jolma I, Carlsen A., Søreide K. (2013). Molecular Pathways and Cellular Metabolism in Colorectal Cancer. Dig Surg. 30:12–25.
- Hanahan D, Weinberg R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Leading Edge Review. Cell. 4; 144(5):646-74.

- Higuchi S, Matsushita S, Nakane J, Arai H, Matsui T, Urakami K, Yuzuriha T, Takeda A. (2000). *Alpha2-macroglobulin gene* polymorphisms show racial diversity and are not associated with Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 11(6):1167-71.
- Hu C, Sung S, Liu H, Hsu W, Lee L, Lee C, Tsai CH, Chang J. (2000). Genetic risk factors of sporadic Alzheimer's disease among Chinese in Taiwan. *J Neurol Sci*. 181(1-2):127-31.
- Janka Z, Juhász A, Rimanóczy A, Boda K, Márki-Zay J, Palotás M, Kuk I, Zöllei M, Jakab K, Kálmán J. (2002). *Alpha2-macroglobulin* exon 24 (Val-1000-Ile) polymorphism is not associated with late-onset sporadic Alzheimer's dementia in the Hungarian population. *Psychiatr Genet*. 12(1):49-54.
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterol*. 138(6):2044-2058.
- Kolodziej SJ, Wagenknecht T, Strickland DK, Stoops JK. (2002). The three-dimensional structure of the human alpha 2-macroglobulin dimer reveals its structural organization in the tetrameric native and chymotrypsin alpha 2-macroglobulin complexes. *J Biol Chem*. 277(31):1-7.
- Koster M, Dermaut B, Cruts M, Houwing-Duistermaat J, Roks G, Tol J, Ott A, Hofman A, Munteanu G, Breteler MM, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. (2000). The *alpha2-macroglobulin gene* in AD: a population-based study and meta-analysis. *Neurology*. 55(5):678-84.
- Labianca R, Beretta GD, Kildani B. (2010). Colon Cancer. *Critical reviews in Oncology/Hematology*; 74:106-133.
- Lasko D, Cavenee W, Nordenskjöld M. (1991). Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu. Rev. Genet*. 25:281-314.
- Levin B, Lieberman DA, McFarland. (2008). Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps,: a joint guideline from the

American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin.* 58:130-160.

Ley General De Salud. Nueva Ley Publicada En El Diario Oficial De La Federación. Texto Vigente Última Reforma Publicada 2014. Cámara De Diputados Del H. Congreso De La Unión Secretaría General Secretaría De Servicios Parlamentarios. Cámara de diputados del H. Congreso de la unión. Secretaría General. Secretaría de Servicios Parlamentarios. Últimas Reformas DOF 04-06-2015:1-257.

Libutti SK, Saltz LB, Rustgi AK, Tepper JE. (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. 2897 pp.

Lieberman D, Rex D, Winawer S, Giardiello F, Johnson D, Levin T. (2012). Guidelines for Colonoscopy Surveillance after Screening and Polypectomy: A Consensus Update by the US Multi-Society Task Force On Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 143:844 – 857.

Lin Z, Lo A, Simeone DM, Ruffin MT, Lubman DM. (2012). An N-glycosylation analysis of human alpha-2-macroglobulin using an integrated approach. *J Proteomics Bioinform.* 5:127-134.

Lizárraga J L, Sánchez C J, Peraza Garay F, Irineo A B, Quintero García B, Trujillo Bracamontes S. (2012). Frecuencia de cáncer colorrectal en pacientes con cirugía de colon. *Rev Esp Méd Quir.* 17(1):24-28

Mariani E, Seripa D, Ingegneri T, Nocentini G, Mangialasche F, Ercolani S, Cherubini A, Metastasio A, Pilotto A, Senin U, Mecocci P. (2006). Interaction of CTSD and A2M polymorphisms in the risk for Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 25; 247(2):187-91.

Marisi G, Passardi A, Calistri, Zoli W, Amadori D, Ulivi P. (2014). Discrepancies between VEGF -1154 G>A Polymorphism Analysis Performed in Peripheral Blood Samples and FFPE Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* 15:13333-13343.

- Marsh S, Mallon MA, Goodfellow P, McLeod HL. (2005). Concordance of pharmacogenetics markers in germline and colorectal tumor DNA. *Pharmacogenomics* 6(8):873–877
- McIlroy S, Dynan K, Vahidassr D, Lawson J, Patterson C, Passmore P. (2001). Common polymorphisms in LRP and *A2M* do not affect genetic risk for Alzheimer disease in Northern Ireland. *Am J Med Genet.* 105 (6):502-6.
- Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedé F. (2011). Genetics, Cytogenetic, and Epigenetics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* (2011):1-19.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky SF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 16 (3).
- Misra UK, Pizzo V. (2015). Activated alpha-2 macroglobulin binding to Human Prostate Cancer Cells Triggers Insulin-like Responses. *J Biol Chem.* 290(15):9571-87.
- Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2015).
Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.),
<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Mundade R, Imperiale T, Prabhu L, Loehrer P, Lu T. (2014). Genetic Pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience.* 1(6): 400-406.
- Myllykangas L, Polvikoski T, Sulkava R, Verkkoniemi A, Crook R, Tienari PJ, Pusa A, Niinistö L, O'Brien P, Kontula K, Hardy J, Haltia M, Pérez-Tur J. (1999). Genetic association of *alpha2-macroglobulin* with Alzheimer's disease in a Finnish elderly population. *Ann Neurol.* 46(3):382-90
- Nacmias B, Tedde A, Cellini E, Forleo P, Orlacchio A, Guarnieri BM, Petruzzi C, D'Andrea F, Serio A, Sorbi S. (2001). *Alpha2-macroglobulin* polymorphisms in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 16; 299(1-2):9-12.

- National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; 2015 Sep 16 [cited 2015 Sep 19]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=lossofheterozygosity>
- Neves D, Estrozi LF, Job V, Gabel F, Schoehn G, Dessen A. (2012). Conformational states of a bacterial α -Macroglobulin resemble those of human complement C3. *PLoS ONE*. 7 (2):35-38.
- 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(2):537-44.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {*103950}; {06/09/2011}; World Wide Web URL: <http://omim.org/>
- Online New England BiolabsR INC. Disponible en <https://www.neb.com/products/r0147-Mboi>, revisada el 29 de Marzo2015).
- Poduslo SE, Shook B, Drigalenko E, Yin X. (2002). Lack of association of the two polymorphisms in alpha-2 macroglobulin with Alzheimer disease. *Am J Med Genet*. 1; 110(1):30-5.
- Rai P S, Pai G C, Alvares J, Bellampalli R, Gopinath P M, Satyamoorthy K. (2014). Intraindividual somatic variations in MTHFR gene polymorphisms in relation to colon cancer. *Pharmacogenomics*. 15 (3):349.
- Rakashanda S, Rana F, Rafiq S, Masood A. and Amin S. (2012). Role of proteases in cancer: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 7(4):90-101.
- Rasmussen H. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. Institute of Biological Psychiatry, Mental Health Centre Hans, Copenhagen University Hospitals, Roskilde. *Gel Electrophoresis-Principles and Basics*. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. INTECH. ISBN 978-953-51-0458-2:315-334.

- Registro Estatal De Cáncer. Jalisco. (2011). El Registro Estatal de Cáncer Forma Parte del Registro Histopatológico de Neoplasias en México, Secretaria de Salud Jalisco. 11- 22.
- Rehman AA, Ahsan H, Khan FH. (2013). Alpha-2-Macroglobulin: A Physiological Guardian. *J Cell Physiol.* 228 (8):1665–1675.
- Roberts DL, Dive C, Renehan AG. (2010). Biological Mechanisms Linking Obesity and Cancer Risk: New Perspectives. *Annu Rev Med.* 61:301-316.
- Romas S, Mayeux R, Rabinowitz D, Tang M, Zadroga H, Lantigua R, Medrano M, Tycko B, Knowles J. (2000). The deletion polymorphism and Val1000Ile in *alpha-2-macroglobulin* and Alzheimer disease in Caribbean Hispanics. *Neurosci Lett.* 279(3):133-6.
- Rubi-Castellanos R, Martínez-Cortés G, Muñoz-Valle J F, González-Martín A, Cerda-Flores R M, Anaya-Palafox M, Rangel-Villalobos H. (2009). Pre-Hispanic Mesoamerican Demography Approximates the Present-Day Ancestry of Mestizos Throughout the Territory of Mexico. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY.*139:284-294.
- Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, Nativ N, Bahir I, Doniger T, Krug H, Sirota-Madi A, Olender T, Golan Y, Stelzer G, Harel A and Lancet D. (2010). GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database (Oxford).* 5:20.
- Seals DF, Azucena EF Jr, Pass I, Tesfay L, Gordon R, Woodrow M, Resau JH, Courtneidge SA. (2005). The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell.* 7(2):155-65.
- Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. (2002). Compendio de cáncer. Mortalidad/Morbilidad. Registro histopatológico de neoplasias malignas en México.

- Shibata N, Ohnuma T, Takahashi T, Ohtsuka E, Ueki A, Nagao M, Arai H. (2000). No genetic association between alpha-2 macroglobulin I1000V polymorphism and Japanese sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 290 (2):154-6.
- Siebenhofer A, Plath J, Taubenroth M, Singer S, Hechtner M, Dahlhaus A, Rauck S, Schulz-Rothe S, Koné I, Gerlach F. (2015). Positive family history of colorectal cancer in a general practice setting [FRIDA.Frankfurt]: study protocol of a of a cross sectional study. *BMC Cancer.* 15:605
- SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. 2011.
- Singleton A, Gibson A, McKeith I, Ballard C, Perry R, Ince P, Edwardson J, Morris C. (1999). *Alpha2-macroglobulin* polymorphisms in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Neuroreport.* 10(7):1507-10.
- Snustad P, Simmons JS. (2006). Principles of genetics. Mutation, DNA repair and recombination. John Wiley and Sons Inc. Fourth Edition. 342-356.
- Styczynska M, Religa D, Pfeffer A, Luczywek E, Wasiak B, Styczynski G, Peplonska B, Gabryelewicz T, Golebiowski M, Kobrys M, Barcikowska M. (2003). Simultaneous analysis of five genetic risk factors in Polish patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 344(2):99-102.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* 2 (2):70-78.
- Tang G, Zhang M. (2002). *Alpha-2 macroglobulin* I1000V polymorphism in Chinese sporadic Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 9; 328(2):95-7.
- The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids.* 2015. Res. 43:204-212.

- Theodoratou E, Montazeri Z, Hawken S, Allum G, Gong J, Tait V, Kirac I, Tazari M, Farrington S, Demarsh A, Zgaga L, Landry D, Benson H, Read S, Rudan I, Tenesa S, Dunlop M, Campbell H, Little J. (2012). Systematic Meta-Analyses and Field Synopsis of Genetic Association Studies in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 3; 104(19):1433-57.
- Tirado-Gómez LL, Mohar Betancourt A. (2008). Epidemiología del cáncer de colon y recto. *Gaceta Mexicana de Oncología.* 7(4):3-11.
- Tirado-Gómez LL, Mohar-Betancourt A. (2004). Cáncer en el adulto mayor en la salud del adulto mayor, 1° edición. México: Instituto Mexicano del Seguro Social. 271-80.
- Valle L. (2014). Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. *World J. Gastroenterol.* 20(29):9828-9849.
- Van Huis-Tanja L, Kweeke D, Gelderblom H, Koopman M, Punt K, Henk-Jan, Guchelaar, Vander Straaten T. (2013). Concordance of genotype for polymorphisms in DNA isolated from peripheral blood and colorectal cancer tumor samples. *Pharmacogenomics* 14(16):2005–2012.
- Vilches Cisneros N, Luévano González A, Barboza Quintana O, Garza Guajardo R, Ancer Rodríguez J, Flores Gutiérrez J P. (2010). Carcinoma colorrectal: comparación histopatológica entre pacientes mayores y menores de 51 años. *Patología* 2010; 48(1):12-17
- Wang X, Luedecking E, Minster R, Ganguli M, Dekosky S, KaMboh M. (2001). Lack of association between *alpha2-macroglobulin* polymorphisms and Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 108(2):105-8.
- Wavrant-DeVrière F, Rudrasingham V, Lambert JC, Chakraverty S, Kehoe P, Crook R, Amouyel P, Wu W, Holmans P, Rice F, Pérez-Tur J, Frigard B, Morris JC, Carty S, Cottel D, Tunstall N, Lovestone S, Petersen RC, Chartier-Harlin MC, Goate A, Owen MJ, Williams J, Hardy J. (1999). No association between the *alpha-2 macroglobulin* I1000V polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 262(2):137-9.

- Westermeier R. (2005). Electrophoresis in practice, polyacrylamide gel electrophoresis of nucleic acids. Wiley-VCH. 17-22.
- Yang Y, Hong H, Zhang Y, and Cai W. (2009). Molecular Imaging of Proteases in Cancer. Cancer Growth Metastasis. 17 (2):13–27.
- Yanlei M, Peng Z, Feng W, Weijie L, Jianjun Y, and Huanlong Q. (2012). An Integrated Proteomics and Metabolomics Approach for Defining Oncofetal Biomarkers in the Colorectal Cancer Annals of Surgery. Annals of Surgery. 255 (4):720-730.
- Zappia M, Manna I, Serra P, Cittadella R, Andreoli V, La Russa A, Annesi F, Spadafora P, Romeo N, Nicoletti G, Messina D, Gambardella A, Quattrone A. (2004). Increased risk for Alzheimer disease with the interaction of MPO and A2M polymorphisms. Arch Neurol. (3):341-344.
- Zill P, Bürger K, Behrens S, Hampel H, Padberg F, Boetsch T, Möller H, Ackenheil M. (2000). Bondy B. Polymorphisms in the *alpha-2 macroglobulin* gene in psychogeriatric patients. Neurosci Lett. 17; 294(2):69-72.

ANEXO 1

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 autorizo a la Dra. en C. Melva Gutiérrez Angulo, a la Biol. Miriam Partida Pérez o a la Dra. en C. María de la Luz Ayala Madrigal a extraer 5 ml sangre periférica. La toma de muestra es para la realización del proyecto titulado:

“Frecuencia del polimorfismo C3435T del gen *MDR1* en población del occidente de México”

- 1- He sido informado (a) acerca del proyecto cuyo Investigador responsable es la Dra. Melva Gutiérrez Angulo y he sido invitado (a) a participar en el mismo, aportando información y una 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 a 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 DNA así como otros relacionados con el mismo y a hacer ser 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 en 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

NOTA: En la presente tesis se utilizaron las muestras que se tomaron en el proyecto “**Frecuencia del polimorfismo C3435T del gen *MDR1* en población del occidente de México**” ya que con este proyecto se formó el banco de DNA de población general y de acuerdo al punto #4 se autoriza para utilizar las muestras con fines de investigación.

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 INVESTIGACION

Por medio de la presente doy mi autorización para que me sea extraída una muestra de sangre venosa de aproximadamente 5 ml 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 una 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 y que libero a los investigadores y a 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 DNA 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 en que yo así lo decida y lo exprese a los investigadores responsables

6. Yo puedo localizarlos en el teléfono (01-33) 10585200, extensiones 34003

Nombre y firma del donador

Nombre del testigo

Fecha: _____

Fecha: _____

ANEXO 2

Extracción de DNA de sangre periférica.

Fundamento

Lisis celular

Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen, permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores de enzimas que degradan el DNA. Muchas soluciones incluyen también el EDTA que forma un complejo con los iones de Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las DNAsas. Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del DNA por centrifugación.

Separación de proteínas y lípidos

En esta etapa el DNA se separa de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Los solventes que se usan frecuentemente son el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico; estos reactivos contaminan fácilmente por lo que se debe tener cuidado de no mezclarlos al tomar el DNA.

Precipitación del DNA

Después de eliminar lípidos y proteínas, se recupera el DNA, para ello se adiciona etanol y soluciones concentradas de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el DNA se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. Un pulso de centrifugación permite que el DNA permanezca en el fondo del tubo y el etanol sea desechado. Los restos de etanol se eliminan con un lavado con etanol al 70 % y el remanente se elimina por evaporación. Finalmente se resuspende el DNA en agua con pH de 7 o en una solución de Tris-HCl a 10mM y EDTA a 0.1M a un pH de 8.0 para almacenar el material (Alejos *et al.* 2014).

En el presente estudio se utilizó el método de Miller *et al.* (1988) combinado con un micrométodo (Gustincich *et al.* 1991).

Equipo

- Refrigerador
- Centrifuga
- Placa de calentamiento (Termoblock)
- Microcentrífuga

Material

- Tubos falcon de 15 ml estériles
- Tubos eppendorf de 2.0 y 1.5 ml estériles
- Guantes estériles desechables
- Cubreboca
- Gasa
- Micropipeta graduable de 100 y 1000 μ l
- Puntillas para micropipeta desechables de 100 y 1000 μ l

Reactivos

- Solución de lisis de eritrocitos
- Solución de bromuro de duodeciltrimetil amonio al 8 % (DTAB)
- Solución de bromuro de hexadeciltrimetil amonio al 5 % (CTAB)
- Cloroformo 100 %
- NaCl 1.2 M
- Agua inyectable
- Cloro comercial
- Etanol 100 %
- Etanol 70 %
- Buffer TE

Preparación de reactivos

Solución de lisis de eritrocitos

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

Disolver en agua bidestilada y aforar a 1 L, guardar a -4 °C

Buffer CTAB

CTAB		5 %	50 g
NaCl	PM 58.44	0.4 M	23.74 g

Disolver ambos reactivos en agua bidestilada y aforar a 1 L.

Solución NaCl 1.2 M

NaCl	PM 58.44	70.128 g
------	----------	----------

Disolver en agua bidestilada y aforar a 1 L.

Buffer DTAB

DTAB	PM 79.03	0.001 M	8 g
Tris	PM 121.1	0.144 M	1.21
NaCl	PM 58.44	1.5 M	8.76 g
EDTA	PM 372.2	0.05 M	1.86 g

Disolver el tris en agua bidestilada y ajustar el pH a 8.6 con HCl en $\frac{3}{4}$ partes del volumen final, adicionar el DTAB, NaCl y EDTA. Aforar a 100 ml.

Buffer TE (Tris HCl 10 Mm, EDTA 0.2 mM)

Tris	PM 121.1	0.01 M, Ph 8	1.21 g/L
EDTA	PM 372.2	0.001 M	0.37 g/ L

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

Procedimiento

Técnica combinada Micrométodo-Macroméodo DTAB-CTAB.

1. Vaciar 5 ml de sangre total a un tubo falcón de 15 ml, agregar 10 ml de solución de lisis de eritrocitos y reposar en refrigeración durante 20 min, posteriormente centrifugar a 4,000 rpm durante 25 min.
2. Se descarta el sobrenadante y se obtiene el botón celular; cada vez que se descarte el sobrenadante debe tomarse la precaución de no desechar el botón celular.
3. Transferir el botón celular a un tubo eppendorf de 2 ml rotulado con la clave del individuo.
4. Agregar 600 µl de solución DTAB e incubar a 65°C en termoblock durante 5 min.
5. Agregar 900 µl de cloroformo al 100 % y agitar por inversión vigorosamente.
6. Se centrifuga a 12,000 rpm durante 7 min.
7. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a un tubo eppendorf de 2 ml limpio y rotulado con la clave del individuo; se desecha el tubo con cloroformo y precipitados celulares.
8. Añadir 100 µl de solución CTAB al 5 % y agitar suavemente.
9. Agregar 900 µl de agua inyectable y agitar suavemente; se observa la precipitación de DNA.
10. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
11. Descartar el sobrenadante y agregar 150 µl de NaCl 1.2 M y 750 µl de etanol al 100 % frío y mezclar suavemente.
12. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
13. Descartar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 70 % y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min (realizar este paso 3 veces).
14. Descartar el sobrenadante y dejar evaporar el exceso de etanol a temperatura ambiente hasta que el botón de DNA quede completamente seco.
15. Resuspender en 100-300 µl de buffer TE (dependiendo del tamaño del botón) e incubar a 65°C durante 1 hora o a 37°C toda la noche.
16. Almacenar a -20°C hasta su uso.

ANEXO 3

Extracción de DNA de tejido CCR

Fundamento

La bibliografía reporta distintos métodos de extracción de diferentes tipos de tejidos, algunos basados en la hidrólisis con proteinasas, otros en exposición a ultrasonidos y otros usando detergentes o álcalis. Los métodos que utilizan la hidrólisis con proteinasas tienen como principio básico el uso de la proteinasa K, la cual digiere proteínas y remueve contaminantes a partir de las preparaciones de ácidos nucleicos (González *et al.* 2011) de acuerdo a esto último se efectuó la extracción con el kit *High Pure PCR Template Preparation* de la marca Roche.

Respecto al resto de la extracción de DNA se usó el mismo fundamento del anexo 2 y se cuantificó de acuerdo al anexo 4.

Equipo

- Termoblock
- Vortex
- Microcentrífuga
- Balanza Analítica

Material

- Papel parafilm
- Bisturí
- Estuche de disección
- Micropipetas de volumen variable de 10, 100 y 1000 μ l
- Puntas desechables estériles para Micropipetas de volumen variable de 10, 100 y 1000 μ l
- Tubos eppendorf de 2 ml

Reactivos

Incluidos en el kit High Pure PCR Template Preparation.

Isopropanol

Procedimiento

1. Cortar y pesar 25 a 50 mg de tejido tumoral fresco con un bisturí.
2. Rotular con código del paciente un tubo de 2 ml y agregar 200 µl de buffer de lisis y 40 µl de proteinasa K.
3. Agitar en vortex vigorosamente e incubar a 55°C 1 hora o 37°C toda la noche.
4. Agregar 200 µl de buffer de unión e inmediatamente incubar a 70°C durante 10 min.
5. Agregar 100 µl de isopropanol y mezclar bien.
6. Centrifugar 1 min. a 12,000 rpm.
7. Descartar sobrenadante.
8. Agregar 500 µl de buffer inhibidor y centrifugar 1 min. a 12,000 rpm.
9. Agregar 500 µl de buffer de lavado y centrifugar 1 min. a 12,000 rpm, repetir este paso dos veces.
10. Centrifugar 10 seg. a 12,000 rpm.
11. Descartar residuos.
12. Agregar 200 µl de buffer de elución y centrifugar a 12,000 rpm durante 1 min.
13. Almacenar hasta su uso a -20°C.

ANEXO 4

Cuantificación del DNA por espectrofotometría.

Fundamento

La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del DNA es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el DNA, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de DNA genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 ug/ml. Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en ng/μl.

Considerando que para una reacción de PCR se requiere de 10 a 200 ng debemos obtener al menos, 50 ng/ul de DNA en cada muestra; concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas.

Para estimar la pureza del DNA se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como DNA puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas (Alejos *et al.* 2014).

En la determinación de la concentración de DNA se considerará la siguiente fórmula:

DNA ng/ml=DO 260nm x dilución (1005/5uL) x 50 (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
- Vórtex
- Potenciómetro
- Congelador

Reactivos

- Agua inyectable
- DNA

Material

- Celda de cuarzo de 1 ml
- Pipeta graduable de 2 y 1000 μ l
- Puntas para pipeta desechables de 10 y 1000 μ l
- Gasa
- Papel parafilm

Procedimiento:

1. Encender el espectrofotómetro y cargar el programa para ácidos nucleicos de doble cadena.
2. Calibrar a 0 con el blanco de reacción, midiendo 1 mL de agua inyectable en la celdilla de cuarzo.

3. Diluir 5 μl de la muestra de DNA en 1000 μl de agua inyectable, tapar la celdilla con un parafilm y agitar por inversión.
4. Colocar la celdilla con la mezcla en el espectrofotómetro y obtener la densidad óptica (DO) a 260 nm para calcular la concentración de DNA y a 280 nm para determinar su pureza.

ANEXO 5

Amplificación génica mediante PCR

Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima *DNA-polimerasa* que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células.

Los elementos principales en la reacción son el molde (DNA), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{2+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa o poliacrilamida para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios *et al.* 2013).

Equipo

- Termociclador
- Vortex
- Congelador -20°C
- Microcentrífuga

Material

- Gradilla para microtubos
- Pipetas de volumen variable de 2, 10, 100 y 1000 μl
- Puntas para pipeta de 10, 100 y 1000 μl estériles
- Tubos eppendorf de 0.2 y 0.6 ml estériles

Procedimiento

1. Hacer una mezcla de reacción con los siguientes reactivos de acuerdo a las “n” muestras con que se trabaje en un tubo de 0.6 ml.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	μl por reacción
Buffer	10X	1X	2.5
A2M-F	20.59nM	10 pM	1
A2M-R	22.29nM	10 pM	1
dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	100mM $^{\circ}/_{\mu}$	200 mM	0.5
Cloruro de magnesio	50 mM	1.5 mM	0.75
Taq-polimerasa	5 $^{\text{U}}/_{\mu\text{l}}$	2 $^{\text{U}}/_{\mu\text{l}}$	0.4
Muestra de DNA	300 $^{\text{ng}}/_{\mu\text{l}}$	100 $^{\text{ng}}/_{\mu\text{l}}$	0.5
H ₂ O			18.35

2. Se agita en vortex y se da un pulso de centrifugación.

3. Se distribuye 24.5 μl por muestra en un tubo de 0.2 ml y se agrega 0.5 de DNA. Finalmente se introducen al termociclador con las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	10 min	
94°C	30 s	
65.1°C	30 s	
72°C	30 s	35
70°C	10 min	

4. Se corren las muestras en gel de poliacrilamida o se guardan hasta su uso a -20°C.

Reactivos

Muestra de DNA a una concentración de 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$

Agua inyectable

Buffer de amplificación 10x (Tris-HCl 100 mM, pH 9.0, KCl 500 nM, MgCl 15 mM, Tritón X-100 0.1 %).

Cloruro de magnesio (MgCl_2) 50 mM

Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) 100 mM (dATP, dGTP, dTTP y dCTP)

Oligonucleótidos

Taq-DNA polimerasa

ANEXO 6

Digestión enzimática

Fundamento

La detección del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción o RFLP por sus siglas en inglés (*restriction fragment length polymorphism*) es una técnica que se usa para la genotipificación; es ampliamente utilizada en el análisis de variantes génicas con secuencias conocidas. El primer paso es la amplificación de un fragmento de DNA que contiene la variación de interés, seguido por el tratamiento del fragmento amplificado con una enzima de restricción apropiada.

Las enzimas de restricción reconocen una secuencia de DNA específica, se unen y cortan la secuencia cambiando el patrón (tamaño del segmento) de los fragmentos de DNA. Dado que la presencia o ausencia del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción determinará el corte del fragmento en diferentes tamaños, la identificación de los alelos se puede observar con la resolución de una técnica electroforética (Rasmussen, 2012).

Enzima *Mbol*

Mbol es una endonucleasa de restricción de tipo tipo II, aislada del microorganismo *Moraxella bovis*, su sitio de reconocimiento de corte se muestra en la figura 6. Las enzimas de tipo II sólo tienen actividad de restricción, cortan de manera consistente y predecible dentro de la secuencia que reconocen, sólo requieren Mg^{++} como cofactor y no son ATP dependientes. La escisión de las enzimas de restricción es bloqueado cuando el sustrato de DNA está metilado por *CpG metilasa*.

Se utilizarán 5 unidades de enzima por microlitro; una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir 1 g de DNA con 100 ng/ μ l de concentración en 1 hora a 37°C en un volumen total de reacción de 50 μ l. Esta enzima es capaz de digerir unidad de sustrato de ensayo en 5-15 minutos bajo las condiciones recomendados, también se puede utilizar una digestión segura dejándola actuar durante toda la noche.

Condiciones Óptimas

37 °C - Temperatura óptima de incubación de la enzima.

65 °C - Temperatura de inactivación térmica de la enzima.

-20°C Temperatura De Almacenamiento

Se utilizó el amortiguador CutSmart™ Buffer con el cual se obtiene el 100 % de la actividad enzimática.

Equipo

- Termociclador
- Vortex
- Congelador -20°C
- Microcentrifuga

Material

- Gradilla para microtubos
- Pipetas de volumen variable de 2, 10, 100 y 1000 μ l
- Puntas para pipeta de 10, 100 y 1000 μ l estériles
- Tubos eppendorf de 0.2 y 0.6 ml estériles

Reactivos

- Muestra de producto amplificado
- Agua inyectable
- Amortiguador de amplificación 10x
- Enzima de restricción *Mbol*

Procedimiento:

1. Preparar un mix en un tubo de 0.6 ml con los siguientes reactivos:

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	µl por reacción
Buffer NEBuffer 3	10X	1X	1 µl
<i>Mbol</i>	5,000 U/ml	2 U/µl	0.2 µl
Agua			4 µl
Producto amplificado			4 µl

2. Agitar en vortex y dar un pulso de centrifugación.
3. Se incuba en el termociclador a 37°C durante 16 h y 1hr. A 65°C para inactivar la enzima.
4. Se corre en un gel de poliacrilamida para continuar con la genotipificación.

ANEXO 7

Electroforesis

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas macromoléculas biológicas importantes (por ejemplo, los aminoácidos, los péptidos, las proteínas, los nucleótidos y los ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y, a un pH determinado, existen en solución como especies cargadas eléctricamente, sean cationes (+) o aniones (-). Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en *ambos* extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con que un campo eléctrico puede desplazarla a través de un medio gelatinoso (Carrillo-Soto *et al.* 2013).

Equipo

- Cámara de electroforesis vertical
- Fuente de poder

Material

Cámara de electroforesis Biorad que incluye:

- 2 Placas de cristal
- 1 Liga
- 2 Separadores de plástico de 6 mm

- 7 Pinzas
- 1 Peine de plástico de 6 mm
- Gradilla para tubos
- Guantes desechables
- Pipeta de volumen variable 10 y 1000 μ l
- Puntillas plásticas desechables de 10 y 1000 μ l

Reactivos

- Producto de PCR o producto de digestión enzimática
- TBE 10X
- TBE 1X
- Poliacrilamida 29:1
- APS 10 %
- TEMED
- Buffer cargador
- Agua bidestilada
- Marcador de peso molecular de 50 pb

Procedimiento

1. Montar gel

- Limpiar las placas de cristal con etanol y una gasa.
- Se colocan los separadores entre las placas y se amolda la liga.
- Se colocan pinzas en los extremos de los cristales para fijar.

2. Preparar la solución de poliacrilamida 29:1 al 6 % para un volumen final de 30 ml.

- En un tubo de 50 ml colocar:

Acrilamida	4.5 ml
TBE 10X	3 ml
APS	375 μ l
TEMED	37.5 μ l
Agua	22.5 ml

3. Mezclar bien y vaciar de forma rápida al molde teniendo cuidado de no formar burbujas, colocar el peine, dejar que polimerice.
4. Una vez que el gel ha polimerizado, se retiran las pinzas, la liga y el peine.
5. Añadir solución de buffer TBE 1X en la parte de baja de la cámara de electroforesis, colocar el gel en forma vertical teniendo cuidado de no formar burbujas entre el gel y el buffer, el gel se sostiene a la parte superior de la cámara con un par de pinzas.
6. Se agrega buffer TBE 1X en la parte superior de la cámara.
7. En papel parafilm se colocan gotitas de buffer cargador de 1 μ l aproximadamente que se mezclan con 10 μ l de la muestra de DNA.
8. Cargar muestras en los pozos del gel.
9. Colocar las tapas y los cables de corriente a la fuente de poder, el corrimiento se realiza a 200 volts durante 1 hr.

Ventajas

- 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 1 pb en 1000 pb).
- Pueden albergar cantidades mucho mayores de DNA que los geles de agarosa. Hasta 10 µg de DNA se puede aplicar en una sola ranura (1 cm x 1 mm) 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.

(Westermeier, 2005).

Preparación de Reactivos:

Acrilamida 29:1

Acrilamida 38.7 g

Bisacrilamida 1.3 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a 100 ml.

APS 10 %

Persulfato de amonio 10 g

Agua bidestilada 10 ml

Disolver la sal en agua bidestilada y aforar a 10 ml

Buffer TBE 10X

EDTA	PM 372.2 gr	0.02 M	40 ml de sol 5 M
Tris	PM 121.1 g	0.89 M	108.8 g
Ácido Bórico	PM 61.844 g	0.89 M	55.04 g

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

Buffer cargador

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

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

ANEXO 8

Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

Fundamento

La tinción con plata se utiliza para detectar proteínas y ácidos nucleicos después de la separación electroforética en geles de poliacrilamida. Esta tinción combina una excelente sensibilidad así como una metodología simple y económica. El uso de nitrato de plata tiene la característica de producir una coloración caramelo (café claro) o negro, este efecto cromático se ha demostrado que está dado por la difracción de la luz en la plata.

La tinción con nitrato de plata tiene una detección de concentraciones pequeñas que varía entre 2 a 5 ng, sin embargo, la detección con plata es exclusivamente cualitativa (Carrillo-Soto *et al.* 2013).

Material

- Charola de plástico
- Bolsa de plástico

Procedimiento

- Retirar el gel de la cámara de electroforesis.
- Colocar el gel en la charola de plástico, agregar solución fijadora suficiente para cubrir el gel y agitar por 10 min (pasado el tiempo descartar).
- Adicionar la solución de tinción, agitar 8 min y descartar.
- Realizar 1 lavado con agua bidestilada y desechar el agua.
- Agregar un poco de solución reveladora para eliminar el exceso de solución de tinción y descartar.

- Agregar solución reveladora y agitar hasta que las bandas sean visibles, desechar la solución y realizar un lavado con agua bidestilada.
- Guardar el gel en una bolsa plástica.

Soluciones

Solución fijadora
Solución de tinción
Solución reveladora
Agua Bidestilada

Preparación de reactivos

Solución Fijadora

Etanol	10 %	100 ml
Ácido Acético	0.5 %	5 ml

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

Solución de tinción

Nitrato de plata	0.2 %	2 g
------------------	-------	-----

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

Solución reveladora

NaOH	3 %	30 g
Formaldehido	0.5 %	5 ml

Colocar agua bidestilada en un matraz de 1L agregar hidróxido de sodio, agitar hasta que se disuelva, posteriormente agregar el formaldehido y finalmente aforar a 1 L.
