

**ASOCIACIÓN ENTRE LAS MUTACIONES DE LOS GENES *MSX1* Y *AXIN2* Y
LA PRESENCIA DE CÁNCER DE COLÓN**

RICARDO ANDRÉS HERRERA ROLDÁN

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar por el título de:

BACTERIÓLOGO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.

2013

Artículo 23 de la Resolución No 13 de julio de 1946.

“la Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien sea vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y justicia”

Tabla de contenido

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	11
3. MARCO TEÓRICO.....	13
3.1. MSX1	16
3.1.1. P53 y MSX1.....	16
3.2. AXIN2.....	19
3.2.1. Señalización Wnt y AXIN2	19
3.3. Polimorfismos Genéticos	21
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo General	23
4.2. Objetivos Específicos.....	23
5. METODOLOGÍA.....	23
5.1. Recolección de Muestras:	23
5.2. Extracción de ADN:.....	24
5.2.1. Extracción de ADN de muestras de saliva	24
5.2.2. Extracción de ADN de muestras de sangre	25
5.3. Cuantificación y Pureza del ADN	26
5.4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):.....	26
5.4.1. Condiciones de PCR para MSX1	26
5.4.2. Condiciones de PCR para AXIN2.....	27
5.5. Electroforesis:.....	28
5.6. Digestión Enzimática	28
5.7. Secuenciación:.....	30
5.8. Análisis de Secuencias:.....	30
5.9. Análisis estadístico	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1. Extracción de ADN.....	31
6.2. PCR para MSX1	32

6.3.	Secuenciación MSX1.....	32
6.1.	PCR AXIN2.....	34
6.2.	Digestión enzimática de los productos de PCR de AXIN2	35
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
	BIBLIOGRAFÍA.....	38
	ANEXOS	41

RESUMEN

Introducción: El cáncer es una enfermedad que se presenta debido a un crecimiento celular descontrolado que puede llegar a afectar cualquier parte del organismo. En el cáncer colorrectal, las células van creciendo de manera descontrolada formando pólipos, los cuales deben ser removidos cuanto antes. En Colombia esta reportado para el 2008 una incidencia de 8.3 casos por cada 100.000 habitantes, una cifra que va a aumentando cada año. Una de las causas del cáncer es una mutación en la línea germinal, que puede predisponer a una herencia familiar de cáncer, donde un único cambio genético es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno. Se ha observado que mutaciones en los genes *MSX1* y *AXIN2* pueden estar asociadas al desarrollo de cáncer de colon, debido a que cada uno de estos genes tiene una función específica en las vías de señalización p53 y Wnt respectivamente. Con esta investigación se busca identificar el polimorfismo (microsatelite) CA en el gen *MSX1* y el SNP rs2240308 para el gen *AXIN2*.

Objetivo: Identificar la asociación entre las mutaciones de los genes *MSX1* y *AXIN2* y la presencia de cáncer de colon.

Materiales y métodos: Se realizó la extracción de ADN de pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal, e individuos sanos. Posteriormente, se realizó la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de los genes *MSX1* y *AXIN2*. Para *MSX1*, los productos amplificados fueron secuenciados, con el fin de determinar el polimorfismo CA. Mientras que para *AXIN2*, los productos amplificados fueron sometidos a digestión enzimática para determinar la presencia del SNP rs2240308. Mediante el test exacto de Fisher se realizó el análisis estadístico para el resultado de cada gen.

Resultados: Para el gen *MSX1* no se observa una diferencia estadísticamente significativa al comparar los casos experimentales versus los individuos control.

Para el gen *AXIN2*, mediante el test exacto de Fisher, no se observa una asociación entre la presencia del SNP rs2240308 y la presencia de cáncer de colon.

Como conclusión al no encontrarse ninguna asociación entre la presencia de estas mutaciones y el cáncer de colon se sugiere que la metilación de estos genes es una posible causa asociada al cáncer colorrectal, por lo cual se recomienda evaluar patrones epigenéticos, como los patrones de metilación en los genes estudiados.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se caracteriza por un crecimiento y división celular descontrolados. Las células cancerígenas tienen una tasa de proliferación celular mayor que el tejido normal, y pierden la capacidad de llevar a cabo una muerte celular programada (apoptosis)(1). Una de las causas del cáncer es una mutación en la línea germinal, que puede predisponer a una herencia familiar de cáncer, donde un único cambio genético es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno(2).

Dentro de las causas más comunes en el desarrollo del cáncer colorrectal, se encuentra la inestabilidad genómica. Esta hace referencia a un gran número de mutaciones raras que alteran diferentes genes, como: mutaciones, polimorfismos y SNPs, donde se ve alterada la función de mantener la estabilidad cromosómica durante la replicación(3).

En el cáncer colorrectal, las células van creciendo de manera descontrolada formando pólipos, pudiendo ser estos benignos o malignos, los cuales deben ser removidos cuanto antes para evitar complicaciones en los pacientes. En Colombia esta reportado para el 2008 una incidencia de 8.3 casos por cada 100.000 habitantes, de esta forma ocupando el tercer puesto en causas de muerte en este país, y un aumento cada año(4, 5).

Los genes *MSX1* y *AXIN2*, podrían tener asociación en el desarrollo de cáncer de colon en la vida adulta, pues estos tienen un papel importante en la inhibición del crecimiento tumoral. *MSX1* por su parte codifica una proteína que funciona como un represor transcripcional, expresada en los sitios donde ocurre proliferación celular y apoptosis durante la embriogénesis, de esta forma e interactuando con p53 inhibe el crecimiento tumoral mediante la inducción de apoptosis. Y la vez

AXIN2 regula negativamente la señalización Wnt retroalimentándola, en algunos carcinomas celulares, indicando que es un gen supresor de tumores(6, 7).

De esta manera, con esta investigación se busca identificar el polimorfismo CA en el gen *MSX1* y el SNP rs2240308 para el gen *AXIN2*, y su asociación con la presencia de cáncer colorrectal.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer ocurre como consecuencia de cambios inesperados en el material genético por diferentes razones, sea por exposición a agentes tóxicos, virus, o herencia familiar, también se presentan cambios cromosómicos que suceden a causa de infecciones, consumo de tabaco, exposición a agentes químicos, drogas entre otros(1).

En el cáncer colorrectal, las células van creciendo de manera descontrolada formando pólipos que pueden o no ser benignos, por lo cual deben ser removidos cuanto antes con el fin de evitar el desarrollo de cáncer en una etapa mucho más avanzada, que pueda afectar al individuo. Si no son removidos a tiempo, y estos pólipos son de origen canceroso o maligno, la enfermedad se puede diseminar a otras partes de intestino o del cuerpo, poniendo en peligro la vida del paciente(1, 4). La Organización mundial de la salud, afirma que el cáncer es la primera causa de muerte a escala mundial, y que dentro de los tipos de cáncer con mayor prevalencia, el cáncer colorrectal ocupa el cuarto lugar. Por lo anterior, es necesario identificar factores de riesgo genéticos que permitan prevenir lesiones antes de su aparición(4, 8).

Los genes *MSX1* y *AXIN2*, podrían tener asociación en el desarrollo de cáncer de colon en la vida adulta, pues estos tienen un papel importante en la inhibición del crecimiento tumoral. *MSX1* codifica para una proteína que funciona como un represor transcripcional expresado en los sitios donde ocurre proliferación celular y apoptosis durante la embriogénesis, de esta forma e interactuando con p53 inhibe el crecimiento tumoral mediante la inducción de apoptosis(6). Y a la vez los productos del gen *AXIN2* son esenciales para la degradación de β -catenina (componente de la señalización de la vía Wnt) que esta desregulado con frecuencia en las células cancerosas(9, 10).

La vía de señalización Wnt juega un papel importante en el desarrollo embrionario para la especificación del destino celular en los patrones tisulares y el control de la división celular. En el ser humano se conocen 19 proteínas codificadas por los genes Wnt, y estas se dividen en 2 clases: las que realizan señalización por la vía de β -catenina y las que utilizan otras vías. Durante la vida adulta, esta vía de señalización Wnt también tiene un papel muy importante, manteniendo la homeostasis en diferentes tejidos: mama, piel, sangre, cerebro e intestino de esta forma manteniendo los nichos de células madre somáticas. Si esta vía es regulada de forma inadecuada se puede dar lugar a una proliferación neoplásica de estos tejidos(11).

Se ha reportado que *AXIN2* como componente de la vía de señalización Wnt desempeña un papel fundamental en tumorigénesis y la disregularidad en las células cancerosas, donde se encuentra presente el SNP rs2240308. Con el fin de averiguar si este polimorfismo está asociado al cáncer de colon.

Debido a que se ha encontrado una relación funcional entre el gen *MSX1* y p53, y entre el gen *AXIN2* y la vía de señalización Wnt, ¿es posible que los polimorfismos CA en *MSX1* y el SNP rs2240308 en *AXIN2*, se encuentren relacionados con el desarrollo de cáncer colorrectal?

De esta manera se propone este proyecto de investigación, donde se espera encontrar e identificar el polimorfismo (microsatelite) CA en el gen *MSX1* y el SNP rs2240308 para el gen *AXIN2*, en pacientes diagnosticados con cáncer de colon. Realizando un estudio piloto para el exon 1 del gen *AXIN2* en 15 pacientes con cáncer de colon y comparándolos con los resultados de los individuos controles, se espera de esta forma establecer una posible asociación entre estas mutaciones y la enfermedad.

3. MARCO TEÓRICO

El cáncer se caracteriza por una división celular maligna excesiva, cada una de estas células cancerígenas posee una tasa proliferativa mucho mayor que cualquiera en un tejido normal, esto debido a la pérdida de la capacidad de someterse a una muerte programada (apoptosis)(1), en donde, si no se recibe un tratamiento adecuado y a tiempo, estas células puede adquirir la capacidad de separarse de su propio tejido y desarrollar una metástasis en otros sitios del cuerpo. Esta metástasis ocurre como producto de la interacción entre las células cancerosas y el microentorno, de esta forma las células tumorales invaden y crecen en tejidos nuevos provocando disfunción de los órganos y posteriormente la muerte(2).

Las cifras de cáncer colorrectal en Colombia son realmente alarmantes, pues el último dato que brinda el Instituto Nacional de Cancerología (INC), afirma que en 2008 hubo una incidencia de 8.3 casos por cada 100.000 habitantes, y una mortalidad de 5 casos por cada 100.000 habitantes, ocupando el tercer puesto de muertes por cáncer en el país(5). El inicio de la patología está ligado al crecimiento de unos pólipos adenomatosos que inicialmente son benignos(4, 12), esto va a convertirse en un adenoma con un alto grado de displasia, que posteriormente avanzara a un cáncer invasivo y se propagara por la mucosa del colon. Estas fases se clasificaran en cuatro estadios según su propagación, lo que también va evidenciar la gravedad del paciente y la probabilidad de recuperación. (I: tumor; II: tumor y metástasis; III: propagación a ganglios linfáticos; IV: Metástasis en sitios distantes)(3). En las primeras etapas que aún son curables (I y II) con solo una cirugía el cáncer puede ser desecado, pero en el estadio III se necesita de una cirugía más tratamientos con quimioterapias, y si la enfermedad se deja avanzar a un estadio IV es prácticamente incurable(3, 13).

Los cambios genéticos en el cáncer colorrectal ocurren por algunas vías de señalización, y son factores claves para la formación de tumores. Uno de estos

cambios ocurre en la vía de señalización Wnt, cuando la β -catenina (oncoproteína) se une a la proteína axin2 que actúa de la misma forma que APC (Polipos adenomatosos del colon), su homóloga en ratones, y va a crear un factor de transcripción que regula los genes en la activación celular. Cuando ocurre una mutación en esta proteína axin2, la β -catenina se degrada, derivando a una inadecuada señalización, lo cual provoca una predisposición al cáncer hereditario. De igual forma la inactivación de la vía p53 causada por una mutación en TP53, o un daño en las proteínas que interactúan con p53 como msx1, va a conducir a una interrupción en la reparación del DNA y dar origen a cambios displásicos y desarrollo de la enfermedad(3) (Figura 1).

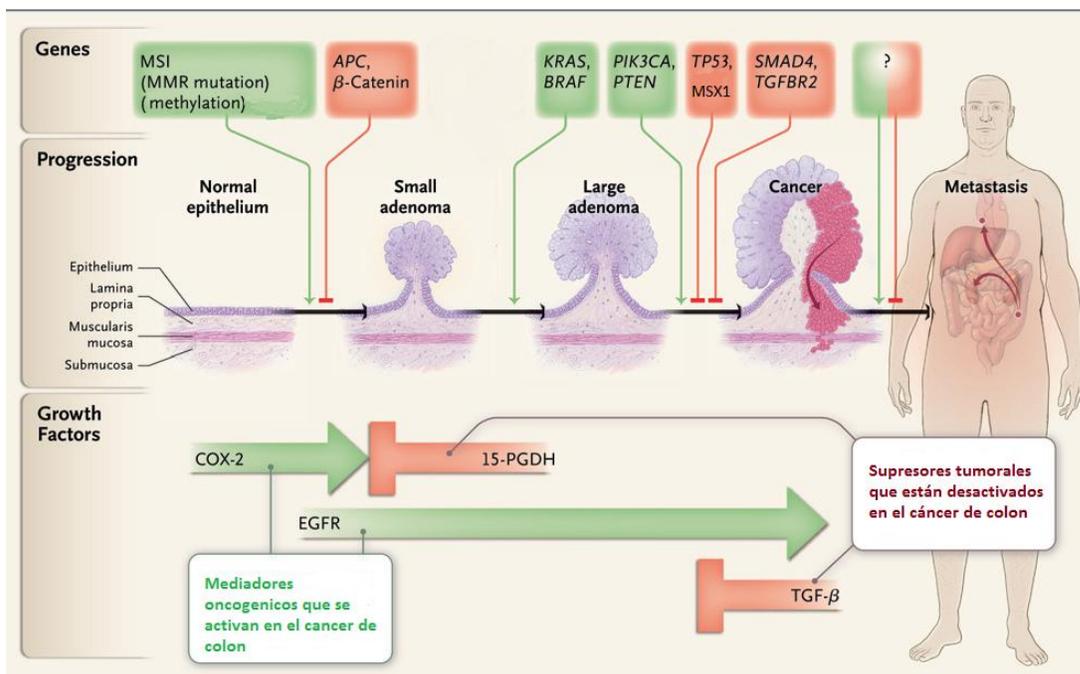


Figura 1: imagen tomada y modificada Markowitz SD, Bertagnolli MM. *Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer 2009.*(3)

Un tercio de los cánceres colorrectales inactivan TGFBR2 que es una proteína transmembranal que regula la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular, afectado por mutaciones que inactivan la ruta TGF- β y sus factores transcripcionales como SMAD4, predisponiendo a una formación de un

alto grado de displasia. Los oncogenes KRAS y BRAF producen aproximadamente el 37% de los cánceres colorrectales debido a mutaciones que actúan en la señalización MAPK y detectadas en pequeños pólipos, igualmente ocurre con mutaciones en PI3KCA donde se pierde la inhibición PI3K por desaparición del PTEN(3).

Existen muchos factores de riesgo asociados al cáncer como el cigarrillo, el alcohol, la dieta, herencia, etc. Estos factores van aumentando a medida que va pasando el tiempo, la herencia es uno de los factores que más afecta a la sociedad pues se estima que si se posee un familiar con historia médica de pólipos adenomatosos, el riesgo de contraer cáncer colorrectal después de los 40 años es del 90%(13, 14).

El cáncer también es causado por alteraciones en oncogenes, genes supresores de tumores y genes de micro ARN. Estas alteraciones suelen ser a causa de fenómenos somáticos; sin embargo, una mutación en la línea germinal puede predisponer a una herencia familiar de cáncer, donde un único cambio genético es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno(13, 15). Cuando estos cambios genéticos ocurren en el cromosoma de una célula, estas se convierten en anormales, y de esta forma pierden la capacidad de controlar su propio crecimiento(13).

Los genes *MSX1* y *AXIN2*, podrían tener asociación en el desarrollo de cáncer de colon en la vida adulta, pues estos tienen un papel importante en la inhibición del crecimiento tumoral, *MSX1* codifica una proteína que funciona como un represor transcripcional expresada en los sitios donde ocurre proliferación celular y apoptosis durante la embriogénesis, de esta forma e interactuando con p53 inhibe el crecimiento tumoral mediante la inducción de apoptosis(6, 7). Y a la vez los productos del gen *AXIN2* son esenciales para la degradación de β -catenina

(componente de la señalización de la vía Wnt) que esta desregulado con frecuencia en las células cancerosas(9, 10).

3.1. MSX1

MSX1 es un gen homeobox inductor de apoptosis ,que codifica para una secuencia 60 aminoácidos conservada evolutivamente, los genes homeobox funcionan como reguladores esenciales de procesos transcripcionales en una variedad de procesos de desarrollo. *MSX1* codifica una homeoproteína que funciona como un represor transcripcional por medio de las interacciones con componentes del complejo transcripcional nuclear. Así *MSX1* es expresado en sitios donde se producen la proliferación celular y la apoptosis durante la formación de patrones en la embriogénesis(7).

Estas homeoproteínas poseen unas propiedades bioquímicas fundamentales en el papel de *MSX1* como un regulador transcripcional embrionario, lo que se relaciona con su capacidad regenerativa, así como el crecimiento de pelo y los dientes que han sido bien documentado. Sin embargo, su papel como regulador de supresor de tumores en los tejidos adultos sigue siendo desconocido(16).

3.1.1. P53 y MSX1

El gen P53 es esencial en la prevención de una inadecuada proliferación celular y en el mantenimiento de la integridad del genoma. Este se activa después de daños en el ADN causados por: radiación ionizante, radiación UV, fármacos citotóxicos, algunos virus infecciosos entre otros; la activación de este gen implica un aumento en la proteína p53, que se va a acumular en el núcleo cuando el DNA sufre daños, y así ser capaz de detener el ciclo celular antes que este se replique,

y de esta misma forma iniciar su reparación, lo cual provoca diversas respuestas biológicas a nivel celular y en el organismo completo(17).

Cuando existe una sobreexpresión de p53 se induce la síntesis de proteínas inhibidoras de los complejos ciclina-CDKs, bloqueando el ciclo celular en las fases G1, G2 y S, y agregado una pausa en el ciclo celular a la célula para reparar los daños antes de entrar en síntesis y mitosis. Si el daño en el ADN se repara el ciclo celular puede continuar y replicar la célula normalmente, pero si no se repara debido a múltiples errores, p53 va a inducir la apoptosis de la célula(18).

Cuando la función o estructura de p53 es alterada se va a producir una inestabilidad genómica, siendo las células incapaces de evitar la proliferación o activar la apoptosis, y de esta forma cuando está comprometida la integridad del ADN, son capaces de acumular las mutaciones y llevar a cabo replicaciones múltiples y sin control para completar la carcinogénesis(19, 20).

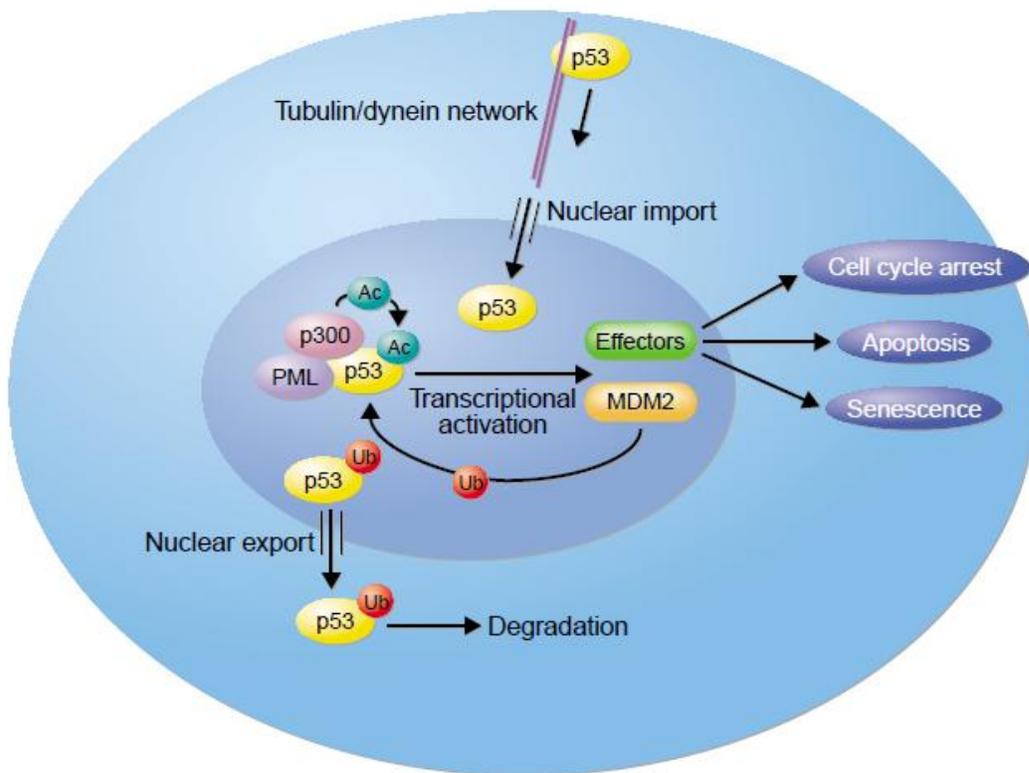


Figura 2: via p53 tomado de *Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein*(19)

El homeodominio de MSX1 funciona como una zona de interacción proteína-proteína con p53, por lo cual, cumple un papel importante en la regulación de p53 y así mismo en la estabilización nuclear y la función apoptótica(16, 21).

En algunos tipos de cáncer la interacción de p53 se ve afectada con la interacción de proteínas virales lo cual inactiva todo tipo de funciones de esta, en recientes estudios se ha encontrado que una expresión desregulada de los genes

homeobox como *MSX1* está involucrada en la oncogénesis humana, pues estos genes homeobox que son regulados en cáncer comparten algunas características como: especificidad de tejido y pérdida de la función por factores epigenéticos(22).

Se demuestra que *MSX1* interactúa con p53 inhibiendo el crecimiento tumoral mediante la inducción de la apoptosis tanto in vitro como in vivo. La identificación de la función de *MSX1* como un regulador de p53 puede abrir nuevas vías para el desarrollo en la mejora de terapias moleculares para tumores con una inactivación de p53 con un mecanismo no mutacional, y lo cual propone que una reactivación en la actividad de p53 podría tener un gran potencial terapéutico(6).

3.2. AXIN2

Se ha demostrado que *AXIN2* regula negativamente la señalización Wnt retroalimentándola, en algunos carcinomas hepato celulares, indicando que es un gen supresor de tumores, y hasta hoy este gen está implicado en tres vías de señalización diferentes: en la vía SAPK (stress activated protein kinase, por sus siglas en inglés), en la vía del factor de crecimiento transformante β (TGF β), y la vía de señalización Wnt(23). La señalización de Wnt se ha comprometido en la regulación de diversos eventos de desarrollo, así como en las aberraciones de la homeostasis celular que puede conducir al cáncer(24).

3.2.1. Señalización Wnt y AXIN2

La activación de la vía de señalización Wnt comienza con la secreción de proteínas Wnt y su unión a los receptores celulares Frizzled (Fzd), esta unión involucran proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas LRP5 o LRP6. “Los receptores Fzd son una familia de proteínas transmembranales, con un dominio extracelular rico en cisteína que se acopla a las moléculas Wnt”. Una

vez lograda la activación del receptor Fzd, este recluta a la proteína Dishevelled (Dvl) que luego es fosforilada, así activándose y bloqueando el complejo proteico citoplasmático (APC/Axina/GSK-3) encargado de la degradación de la proteína β -catenina, estas se acumulan y desplazan la proteína Groucho y forman el complejo LEF-1/TCF que inician la transcripción de los genes diana c-MYC, CCND1 y FOSL1, entre otros. Cuando este ligando Wnt está ausente el complejo proteico APC/Axina/GSK-3 estas β -cateninas son degradadas en los proteosomas y no hay expresión de genes(11).

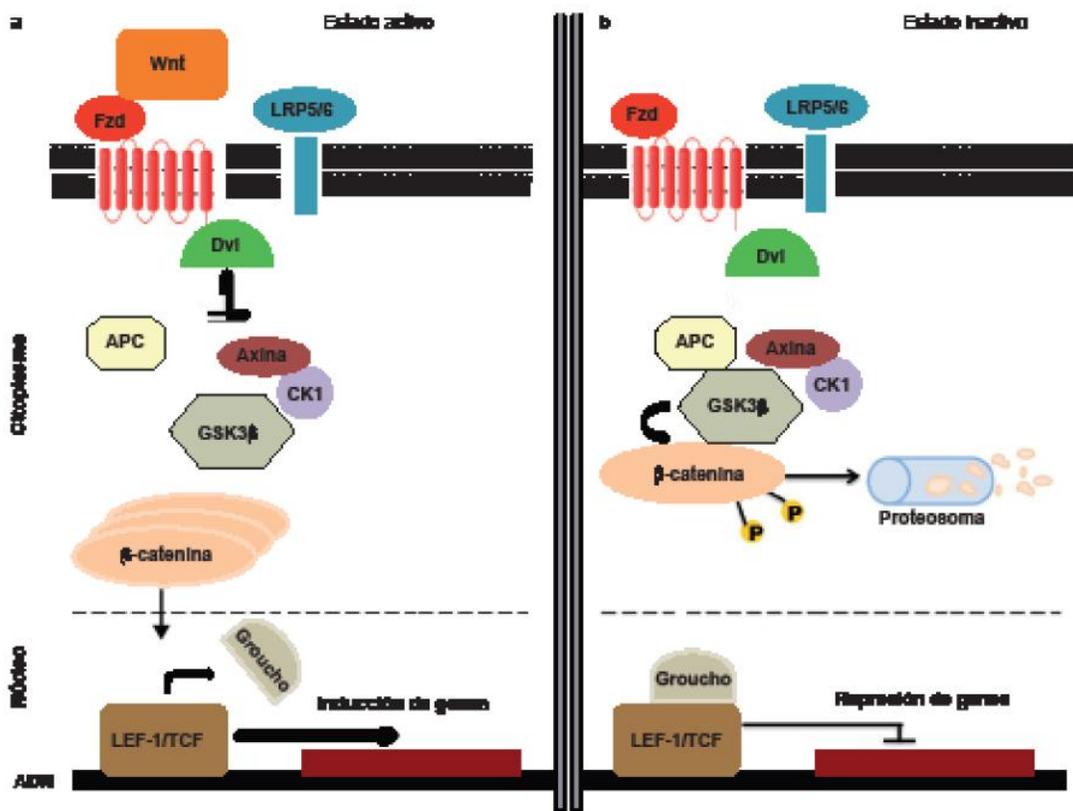


Figura 3: Representación esquemática de la vía Wnt tomada de: La vía de señalización Wnt-β-catenina y su relación con cáncer. (11)

En una porción menor de los tumores colorrectales, puede ocurrir una activación de Wnt a través de mutaciones que afectan a los sitios de fosforilación dentro del

exón 3 de la β -catenina. En las mutaciones en los componentes de Wnt de *AXIN2* se han encontrado microsatélites inestables en cánceres de colon, pero no está claro en todos los caso si estos cambios podrían ser funcionales. La modulación terapéutica de la vía de Wnt sigue siendo todavía una posibilidad terapéutica para los carcinomas colorrectales con un gran atractivo(25).

La vía señalización de Wnt controla la homeostasis intestinal que esta desregulada con frecuencia en el cáncer colorrectal, manteniendo los niveles de fuerza y localización subcelular de la β -catenina, las mutaciones más frecuentes en los componentes de esta vía ocurren en la porción APC (poliposis adenomatosa coli) que está en el 90% de los canceres colorrectales que surgen espontáneamente y caracterizado por una aparición temprana de poliposis adenomatosa familiar. En la ausencia de β -catenina y asociados a los complejos de destrucción (GSK3) y (CK1) que también actúan como inhibidores de las proteínas axin1 y axin2(26).

3.3. Polimorfismos Genéticos

Los polimorfismos genéticos están definidos como variaciones que ocurren en un sitio específico del ADN, las cuales están presentes por lo menos en el 1% de la población(27).

Estas variaciones son ocasionadas por mutaciones que pueden ocurrir aleatoriamente o por un proceso de evolución, considerándose algunas de estas mutaciones silenciosas y otras con una importancia significativa teniendo la posibilidad de evidenciar ambas en el laboratorio(28).

Los polimorfismos pueden afectar una secuencia codificante o reguladora, ocasionando cambios importantes en la estructura de las proteínas o en el

mecanismo de regulación, produciendo cambios fenotípicos(27). Dentro de los tipos de polimorfismos más comunes se encuentran los SNPs y los microsatélites.

Los SNPs (polimorfismos de nucleótido sencillo) corresponden a una sustitución simple de una base nitrogenada (ejemplo: cambio de una citosina (C) por una adenina (A)). Estos, pueden estar presentes en regiones codificantes o no codificantes, teniendo de más importancia los que se encuentran en las regiones codificantes, y siendo las mutaciones más comunes que ocurren en el genoma, pues estas se encuentran generalmente en relación con enfermedad y puede ser heredable(29).

Los microsatélites son repeticiones de un fragmento de la secuencia que pueden ser de dos hasta seis pares bases, y se repite de forma consecutiva (ejemplo: CACACACA), creando así diferencias entre los alelos. Se encuentran en las zonas no codificantes del ADN, y pueden ser utilizados como marcadores moleculares en diferentes estudios genéticos(30).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Identificar la asociación entre las mutaciones de los genes *MSX1* y *AXIN2* y la presencia de cáncer de colon.

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar el polimorfismo CA en el gen *MSX1* y el SNP rs2240308 para el gen *AXIN2* en pacientes diagnosticados con cáncer de colon.
- Establecer la relación de los polimorfismos estudiados con la presencia de cáncer de colon.

5. METODOLOGÍA

5.1. Recolección de Muestras:

Las muestras fueron obtenidas en el centro médico Dalí, en el área de enfermedades digestivas en la ciudad de Bogotá D.C. Se obtuvieron 15 muestras de saliva de pacientes diagnosticados con cáncer de colon, recogidas en un kit de la casa comercial DNAgenotek (oragene-DNA OG 500) y almacenadas con las especificaciones del fabricante. Y se obtuvieron 15 muestras de individuos sanos, que fueron tomadas por venopunción y obtenidas en un tubo con anticoagulante (EDTA) y consideradas como control en pacientes del centro odontológico de la Pontificia Universidad Javeriana que no presenten antecedentes familiares de algún tipo de cáncer. Todas las muestras se obtuvieron con un consentimiento informado previamente aceptado y firmado por cada persona, y que anteriormente también fue aprobado por el comité ético del Centro de Investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana.

5.2. Extracción de ADN:

En este paso se realizó una extracción de ADN utilizando el kit prepIT•L2P, de la casa comercial DNAgenotek y el ADN resultante fue almacenado a -20°C . La extracción de DNA a partir de muestras de sangre se hizo por medio del kit Ultraclean Blood DNA Isolation kit de la casa comercial MO BIO Laboratories, Inc. En ambos casos, se siguieron las instrucciones del fabricante como se describe a continuación:

5.2.1. Extracción de ADN de muestras de saliva

Luego de la recolección de las muestras estas fueron puestas en un baño con agua durante 1 hora a 50°C y se siguieron los siguientes pasos:

1. Tomar $500\ \mu\text{L}$ de muestra y $20\ \mu\text{L}$ del reactivo del kit prepIT•L2P y se pondrán en un tubo eppendorf.
2. Incubar en hielo 10min.
3. Centrifugar 5min a 13.000rpm.
4. Transferir el sobrenadante resultante a otro tubo eppendorf y descartar el anterior tubo.
5. A este sobrenadante agregarle $600\ \mu\text{L}$ de etanol al 100%, dejar reposar 10min.
6. Centrifugar 2min a 13.000rpm
7. Remover el sobrenadante resultante sin tocar el pellet. Y agregar $250\ \mu\text{L}$ de etanol al 70%
8. Centrifugar 2min a 13.000rpm
9. Remover el etanol y dejar secar.
10. Suspender en $50\ \mu\text{L}$ de TE y almacenar

5.2.2. Extracción de ADN de muestras de sangre

La extracción de DNA a partir de muestras de sangre se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

1. En un tubo eppendorf poner 300 μ L de sangre total y 900 μ L de la solución G1.
2. Incubar a temperatura ambiente invirtiéndolo 2 veces durante 5 min.
3. Centrifugar 30seg a 13.000rpm
4. Remover y descartar el sobrenadante resultante sin dañar el pellet.
5. Resuspender el pellet.
6. Agregar 300 μ L de la solución G2 y mezclar para lisar células.
7. Agregar 1.5 μ L de RNasa A, y mezclar en vortex lento.
8. Agregar 100 μ L de solución G3 y realizar inmediatamente un vortex por 15seg.
9. Centrifugar 3min a 13.000rpm
10. Tranferir sobrenadante a otro tubo eppendorf y descartar le tubo anterior.
11. Agregar 300 μ L de isopropanol al 100%, invertir 15 veces e incubar 3min a temperatura ambiente.
12. Centrifugar 1min a 13.000rpm
13. Descartar sobrenadante resultante sin dañar el pellet.
14. Agregar 300 μ L de etanol al 70% invertir 5 veces para lavar el pellet.
15. Centrifugar 30seg a 13.000rpm
16. Descartar sobrenadante sin dañar el pellet
17. Centrifugar 30 seg a 13.000rpm y remover sobrenadante restante.
18. Agregar 50 μ L de solución G4 y poner en agua a 65°C para resuspender ADN.

5.3. Cuantificación y Pureza del ADN

Una vez se tienen los productos de cada extracción de ADN, tanto para las muestras de saliva, como para las muestras de sangre, el siguiente paso es verificar la calidad y concentración de la extracción. Este proceso se llevó a cabo mediante el uso del nanodrop-1000.

El proceso de lectura en este equipo es el siguiente: Para realizar la lectura de cada muestra primero se tiene que ajustar con un blanco y calibrar el equipo, por esto para las extracciones de muestras de saliva el blanco es TE, donde se resuspende ADN obtenido al final de la extracción, y para la lectura de las extracciones de muestras de sangre el blanco es la solución G4 del kit de extracción, donde igualmente se resuspende el ADN obtenido en la extracción.

Una vez ajustado el blanco y calibrado el equipo se pone 1µL de la muestra a analizar y se lee, e inmediatamente el software nos proporciona la concentración de ADN obtenida en cada muestra.

5.4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):

Para la realización de la PCR se utilizara la metodología estandarizada en el laboratorio del centro de investigación odontológica y basada en la bibliografía consultada para el gen *MSX1* y según lo expuesto por *Pinarbasi, E. et al. Para AXIN2(31)*.

5.4.1. Condiciones de PCR para MSX1

Para la PCR de MSX1 se utilizaron los primers o cebadores siguientes: para el directo o forward 5'-TTTGTTCACATTTTATCCGGG-3' y para el reverso 5'-CTGTTTCTAAGAGGGCTGGC-3'

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Ciclo 1 (1x)	94°C	5 min
Ciclo 2 (35x)	94°C	30 seg
	60°C	30 seg
	72°C	1 min
Ciclo 3 (1x)	72°C	5 min

Reactivos	Cantidad
H2O	13.3 µL
Buffer	5 µL
MgCl2	3 µL
DNTPs	1 µL
Primer F	0,75 µL
Prmer R	0,75 µL
Polimerasa	0,2 µL
ADN	1 µL
Volumen final	25 µL

- Se tomó para el control negativo las mismas condiciones pero sin DNA.
- Fue utilizado ADN a un concentración de 200 ng/µL

5.4.2. Condiciones de PCR para AXIN2

Para la PCR de AXIN2 se utilizaron los primers o cebadores siguientes: para el directo o forward 3'-CCTGGAGAGGGAGAAATGC-5' y para el reverso 3'-CATCACCGACTGGATCTCG-5'

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Ciclo 1 (1x)	94°C	5 min
Ciclo 2 (35x)	94°C	30 seg
	60°C	30 seg
	72°C	1 min
Ciclo 3 (1x)	72°C	5 min

Reactivos	Cantidad
H2O	14.55 µL
Buffer	2,5 µL
MgCl2	3 µL
DNTPs	0,75 µL
Primer F	0,75 µL
Prmer R	0,75 µL
Polimerasa	0,2 µL
ADN	1 µL
Volumen final	25 µL

- Se tomó para el control negativo las mismas condiciones pero sin DNA.

- Fue utilizado ADN a un concentración de 200 ng/dL

5.5. Electroforesis:

La electroforesis se realizó a partir de un gel de agarosa preparado en el momento en el laboratorio con agarosa al 2,5% en TBE 0,5x y corrido a 60V durante 60 minutos.

Una vez realizado el gel, se procedió a montarlo en la cámara de electroforesis sumergido en TBE 0,5x, en cada uno de los pozos se pondrán un mezcla realizada a partir de (3 μ L de Agua, 1 μ L de Buffer de carga y 1 μ L de producto de la PCR) y en el último pozo se puso una mezcla de (3 μ L de agua, 1 μ L de buffer cargado y 1 μ L de marcador molecular) esto para verificar que la secuencia obtenida corresponde al número de pares de bases esperadas (pb).

5.6. Digestión Enzimática

Los productos de PCR resultantes para el gen AXIN2 sometidos a digestión enzimática durante 16 horas con la enzima Esp3I, junto con una secuencia control (constructo) que presenta el SNP rs2240308, que fue sintetizado específicamente con la secuencia del SNP a estudiar.

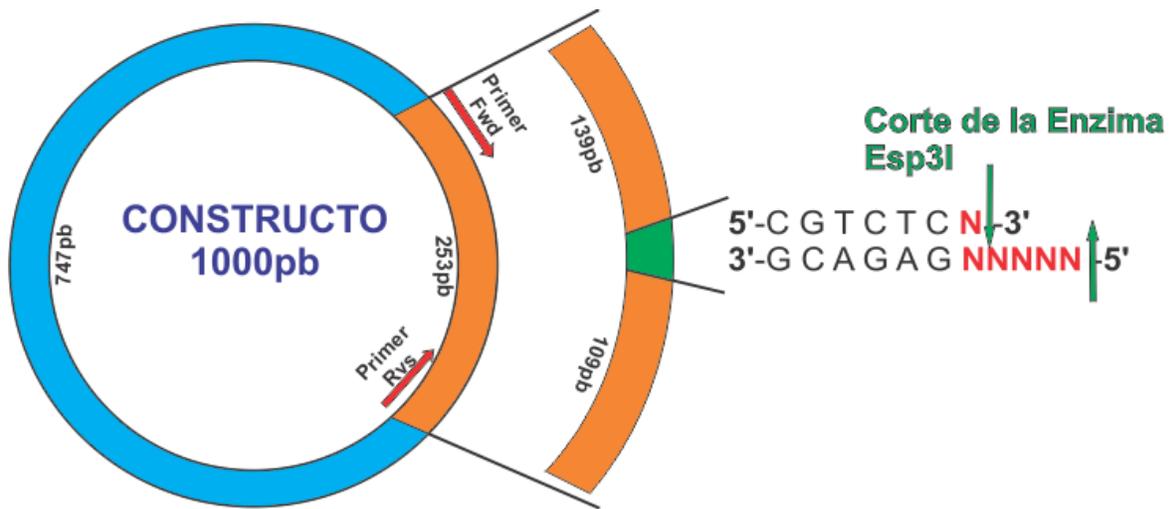


Figura 4: En esta imagen se puede observar la estructura circular del constructo, y la porción amplificada para la digestión enzimática, y dentro de esta el punto y la forma del corte de la enzima Esp3I

La digestión enzimática fue realizada bajo las siguientes condiciones y a 37°C durante 16 horas:

Reactivos	Cantidad
H2O	10,25µL
Buffer Tango	1 µL
DDT	0,75 µL
Esp3I	0,5 µL
Producto PCR	2,5 µL
Volumen final	15 µL

- Después de 16 horas en incubación se procede a inactivar la enzima a 60°C por 20 minutos.
- Electroforesis: después de digeridas las muestras junto con el constructo, y una inactivada la enzima. Se procede a realizarse un gel de electroforesis, donde se evidenciará el corte de cada fragmento de ADN y está presente el SNP rs224038.

5.7. Secuenciación:

La secuenciación y purificación de los productos obtenidos de las PCR para el gen *MSX1*, fueron realizadas por la empresa McLab (Molecular Cloning Laboratories).

5.8. Análisis de Secuencias:

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software Geneious 6.1.6. Este programa permite hacer alineamientos respecto a la secuencia de referencia.

5.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el software Graphpad Prism v.5, se realizaron pruebas de t-Test y Test exacto de Fisher. Se tomó como significativo valores con un $p < 0.05$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados los resultados serán expuestos de la siguiente forma:

6.1. Extracción de ADN

Luego de la extracción de ADN se evaluó la concentración y la pureza del ADN como se observa en la (figura 4), El software del equipo muestra la concentración de ADN en ng/uL y además la relación de las absorbancias 260nm/280nm con el fin de evaluar la pureza del ADN. El rango óptimo de esta relación es de 1,8-2,0. Todas las extracciones de ADN se encontraban dentro del rango óptimo de pureza, un ejemplo se observa en la (figura 4).

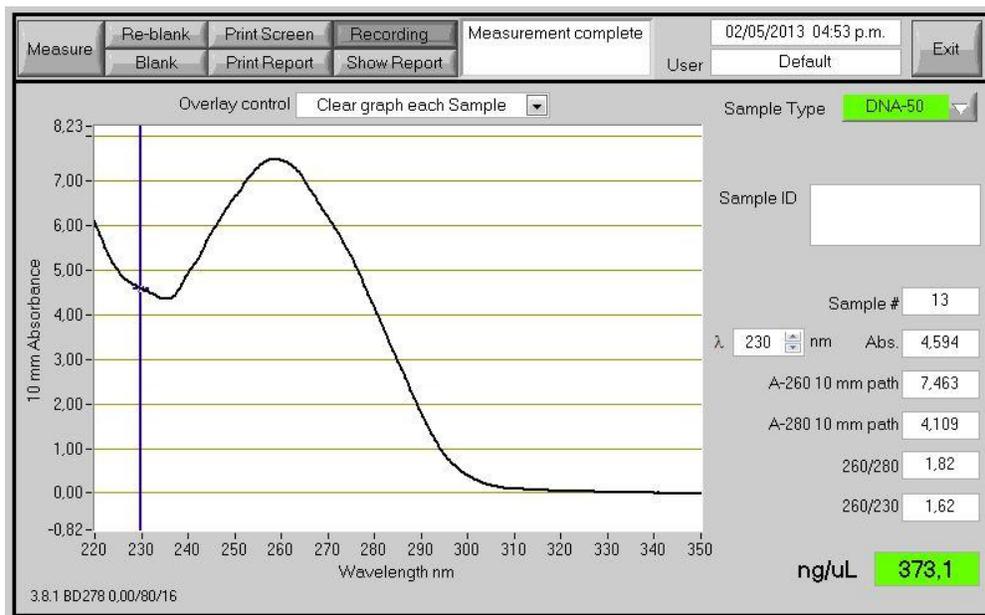


Figura 5: Imagen obtenida en el momento de medición de la concentración de ADN de una muestra, en el nanodrop

6.2. PCR para MSX1

Para la secuenciación se realizaron previamente unas PCR para obtener la amplificación del gen en la zona deseada, obteniendo resultados observados en la (figura 6).



Figura 6: Electroforesis de los productos de PCR de las muestras de cáncer de Colon (K1-K15).

Como se observa en la (figura 6) se logró obtener el producto esperado para cada una de las muestras y controles, (otras muestras y controles no mostradas), donde el producto final esperado era de aproximadamente 250 pb y donde se espera encontrar el polimorfismo CA en los pacientes con cáncer.

6.3. Secuenciación MSX1

Al recibir los resultados de la secuenciación, se evaluó la calidad del electroforetograma. Todas las muestras tenían buena calidad, excepto las muestras 2 y 4 (32), por lo cual, fueron excluidas del análisis. Se realizó un alineamiento con la secuencia reportada (NG_008121.1) para facilitar la lectura de las secuencias Ver (Anexo 1).

El análisis de secuencias indicó que ocho muestras de pacientes con cáncer colorrectal tienen 9 repeticiones CA, y cinco muestras son heterocigotas para este alelo, teniendo 9 repeticiones para un alelo y 10 para el otro.

Para los controles se obtuvo un resultado similar al de las muestras experimentales, once muestras provenientes de individuos controles tiene 9 repeticiones CA, a excepción de las muestras 1, 2, 6 y 9, en las que también se observaron alelos heterocigotos teniendo 9 repeticiones para un alelo y 10 para el otro. Ver (figura 7).

El análisis estadístico mostró que no hay diferencias significativas entre los dos grupos (Test exacto de Fisher $p=0.6891$).

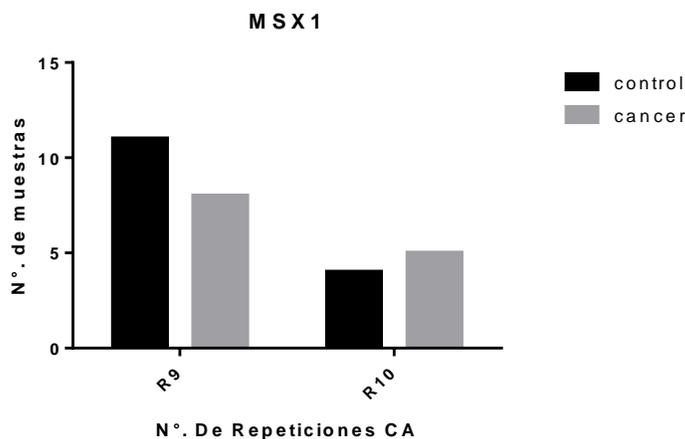


Figura 7: Resultados para el gen MSX1 de muestras de cáncer y controles, donde se muestra el número de repeticiones y cuantas tuvieron 9 ó 10 repeticiones.

Al no presentarse ninguna diferencia entre las secuencias y no encontrarse el polimorfismo, se puede sugerir que este microsatélite CA en MSX1 no está asociado a la presencia de cáncer de colon, sin embargo cabe resaltar que este es un estudio piloto, para que en un futuro se puedan hacer más estudios con suficientes pacientes para realizar esta afirmación.

Shames, D. et al. Afirma que una posible causa es la pérdida en la heterocigocidad a causa de un hipermetilación. Así causando una inestabilidad del genoma, y provocando la pérdida de la función del gen, pues esta metilación es

vista con alta frecuencia y especificidad en la presencia de tumores. Debido a que estos genes promotores presentan en sus secuencias regiones CpG que son metiladas fácilmente por la presencia del grupo fosfato (p) (33)(33).

En muchas células tumorales puede producirse una hipermetilación lo que provoca una pérdida de heterocigocidad en un mismo locus, provocando un daño en la función o pérdida total de la función del gen, provocándose allí un desarrollo tumoral. Aunque no existe una regla de cuándo deben ser metilados estos genes durante la patogénesis, existen marcadores de metilación muy específicos y que son fáciles de detectar en muchos tipos de tumores, y que en un futuro podrían ser muy útiles en el diagnóstico precoz de varios tipos de cáncer(34).

6.1. PCR AXIN2

Las PCR realizadas para la amplificación de la región deseada de gen AXIN2 se realizaron bajo las condiciones ya descritas en la metodología obteniendo los resultados observados en la (Figura 8), donde se pueden los productos obtenidos de 13 de los 15 controles usados, y 14 de las 15 muestras control (Figura 8).



Figura 8: Electroforesis para productos de PCR del gen AXIN2 muestras de Cáncer (K1-K13)



Figura 9: Electroforesis para productos de PCR del gen AXIN2 muestras controles (C1-C14)

6.2. Digestión enzimática de los productos de PCR de AXIN2

La digestión enzimática fue realizada luego de obtener los productos de PCR deseados, después de estar incubadas a 37°C se puede observar en la (Figura 10) como el control (constructo).

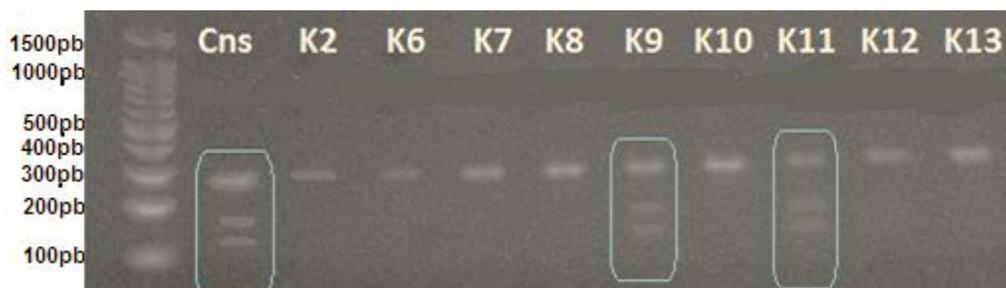


Figura 10: Electroforesis de la Digestión enzimática de muestras de cáncer de colon de los productos de PCR de AXIN2.

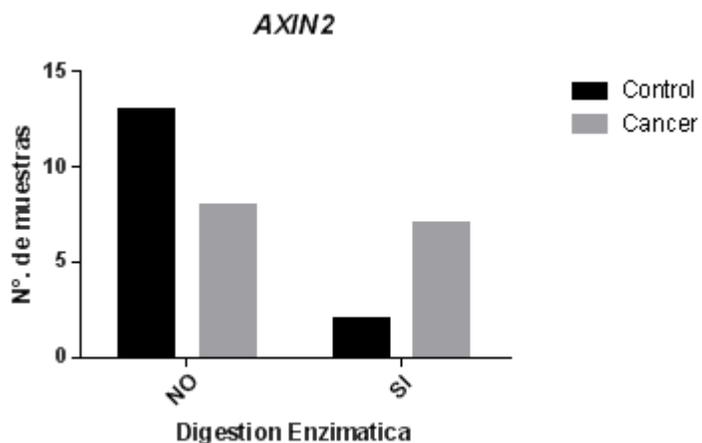


Figura 11: muestra los resultados de la digestión enzimática, y cuantas muestras fueron digeridas

La digestión enzimática indicó que siete muestras de pacientes con cáncer colorrectal tienen el SNP rs2240308, y ocho muestras no lo presentan evidenciándose en la (figura 10 y 11).

Para los controles se obtuvo un resultado con 2 muestras que digirieron y presentan el SNP rs2240308, 13 muestras que no digirieron las cuales no presentan este polimorfismo.

El análisis estadístico mostró que no hay diferencias significativas entre los dos grupos (Test exacto de Fisher $p=0.1086$).

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Para el gen *MSX1* y el polimorfismo CA, no se encontraron diferencias significativas en el número de repeticiones de pacientes con cáncer, respecto a los controles. Con lo cual, según este estudio, se muestra que no hay asociación entre este polimorfismo y la presencia de cáncer de colon.

Para la búsqueda del SNP rs2240308 como también se puede observar en los resultados no se encuentran diferencias significativas entre los pacientes con cáncer respecto los pacientes control, lo cual afirma que para este proyecto, no se encuentra ninguna asociación entre el rs2240308 con el cáncer colorrectal.

Según lo discutido en este trabajo, la metilación de estos genes es una posible causa asociada al cáncer colorrectal, por lo cual se recomienda evaluar patrones epigenéticos, como los patrones de metilación en los genes estudiados.

Se recomienda para posteriores estudios realizar un muestreo más amplio, este proyecto se trataba de un estudio piloto, sin embargo, sería interesante, comparar mayor grupo de pacientes, junto con el análisis de la secuenciación de estos genes completos para determinar posibles mutaciones en estos genes, diferentes a las evaluadas, y su relación con cáncer colorrectal.

BIBLIOGRAFÍA

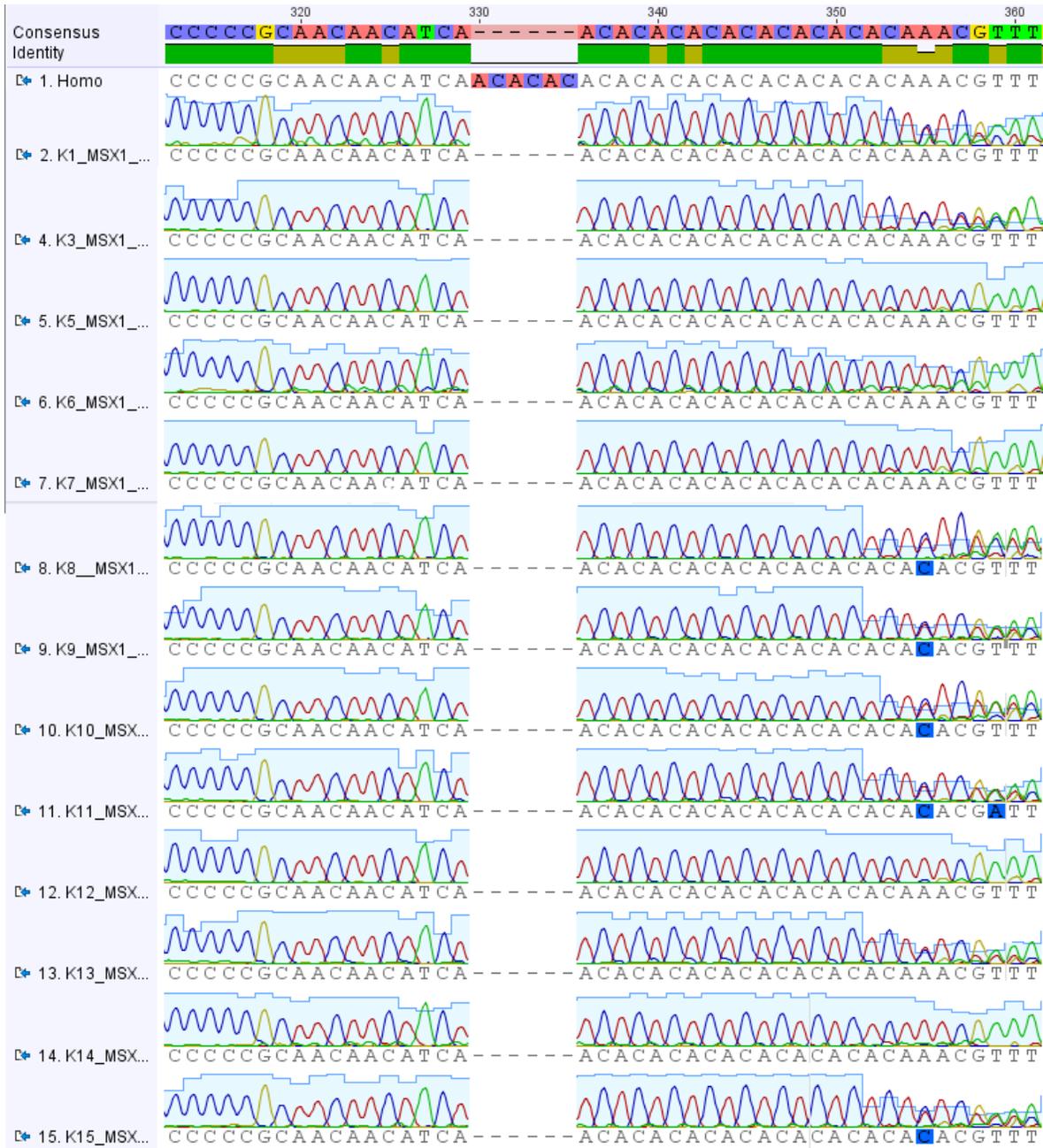
1. Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2011;(3): p. 51-58.
2. Chiang AC, Massagué J. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Metastasis. *The New England Journal of Medicine*. 2008;(359): p. 2814-23.
3. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *The new England Journal of Medicine*. 2009;(361): p. 2449-60.
4. Cardona HJ, Otero W, Forero E, Gutierrez O. Significado de los pólipos en colon distal, en una población de un país en vía de desarrollo: prevalencia y asociación con neoplasia proximal sincrónica. *Revista colombiana de gastroenterología*. 2004; 19(4): p. 253-262.
5. Instituto Nacional De Cancerología. Publicaciones: Cancer en Cifras. [Online].; 2013 [cited 2013 Julio 31. Available from: <http://www.cancer.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=437&conID=790&pagID=775>.
6. Kyoungsook P, Kwangbae K, Seung BR, Kyusam C, Dojin K, Sun-Hee O, et al. Apoptosis, Homeobox Msx1 Interacts with p53 Tumor Suppressor and Inhibits Tumor Growth by Inducing. *Cancer Research*. 2005;(65): p. 749-757.
7. Park K, Kim K, Bae Rho S, Choi K, Kim D, Oh SH, et al. Homeobox Msx1 interacts with p53 tumor suppressor and inhibits tumor growth by inducing apoptosis. *Cancer Research*. 2005;; p. 749-757.
8. Organización Mundial De La Salud (OMS). Cáncer. [Online].; 2013 [cited 2013 Julio 28. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
9. Lammi L, Arte S, Somer M, Järvinen H, Lahermo P, Thesleff I, et al. Mutations in AXIN2 Cause Familial Tooth Agenesis and Predispose to Colorectal Cancer. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;(74): p. 1043-1050.
10. Hiromu S, D Neil W, Jair KW, Kornel E S, Sanford D M, Wei Dong C, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive. *Nature Genetics*. 2004; 36(4): p. 417-422.
11. Ochoa-Hernández AB, Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA, Barros-Núñez P. La vía de señalización Wnt- β -catenina y su relación con cáncer. *Cir Cir*. 2012;(80): p. 389-398.
12. Lieberman DA. Screening for Colorectal Cancer. *The New England Journal of medicine*.

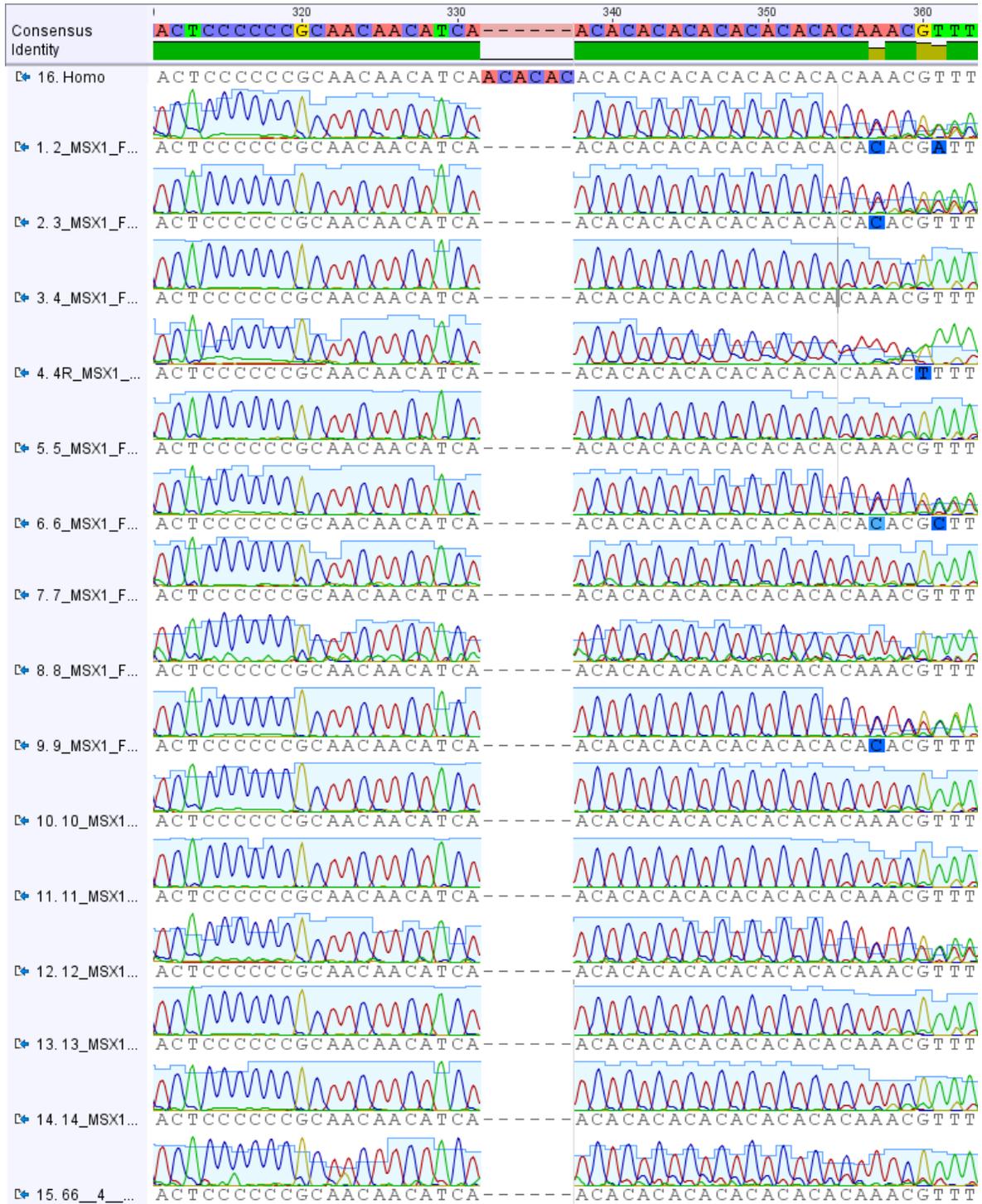
- 2009;(361): p. 1179-87.
13. Horst D, Budczies J, Brabletz T, Kirchner T, Hlubek F. Invasion associated up-regulation of nuclear factor kappaB target genes in colorectal cancer. *Cancer*. 2009;; p. 4946-4946.
 14. Croce CM. Molecular Origin Of Cancer: Oncogenes And Cancer. *The New England Journal Of Medicine*. 2008;(358): p. 502-11.
 15. Cillo C, Cantile M, Faiella A, Boncinelli E. Homeobox Genes In Normal and Malignant Cells. *Jouornal Of Cellular Physiology*. 2001; 188: p. 161-169.
 16. Bal L, Zhu WG. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules*. 2006; 2(4): p. 141-153.
 17. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 00(a001883): p. 1-12.
 18. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology*. 2001;(13): p. 332-337.
 19. Bullock A, Fersht A. Recuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(1): p. 68-76.
 20. Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expresion in cancer: cause or consequence? *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(10): p. 777-785.
 21. Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. Homeobox genes and cancer. *Experimental Cell Research*. 1999;(248): p. 1-9.
 22. Liu W, X D, Mai M, Seeland R, Taniquchi K, Krishnadath K, et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet*. 2000 Diiembre;(26): p. 501.
 23. Salahshor S, Woodget JR. The links between axin and carcinogenesis. *Journal Clinical Of Pathology*. 2005;(58): p. 225-236.
 24. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *nature Publishing Group*. 2006;(25): p. 7531-7537.
 25. Yochum G. AXIN2: Tumor suppressor, oncogene or both colorectal cancer. *Journal of cancer Science and Therapy*. 2012; 4(7): p. 11-12.
 26. Checa MA. Polimorfismos genéticos: Importancia y Aplicaciones. *Revista Del Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias de Mexco*. 2007; 20(3): p. 213-221.

27. Jesus H, Martinez J, Valverde V. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Publica de Mexico*. 2009; 51: p. 455-462.
28. Ramírez J, Vargas G, Tovilla C, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta medica de Mexico*. 2013; 149: p. 220-228.
29. Demarchi DA. Microsatelites, Distancias geneticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropologia Biologica*. 2009; 11(1): p. 73-88.
30. Pinarbasi E, Pinarbasi H. AXIN2 polymorphism and its association with prostate cancer in a Turkish population. *Med Oncol*. 2011; 28: p. 1373-1378.
31. Shames D, Girard L, gao B, Sato M, Lewis C, Shivapurkar N, et al. A Genome-Wide Screen for Promoter Methylation in Lung Cancer Identifies NMethylation Markers for Multiple Malignancies. *PLOS Medicine*. 2006; 3: p. 2244-2263.
32. Lim D, Maher E. DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *The Obstetrician And Gynaecologist*. 2010; 12: p. 37-42.
33. Suzuki M, Bird A. DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*. 2008; 9: p. 465 - 476.
34. Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene Expression. *Microbiological Reviews*. 1991; 55(3): p. 451 -458.

Anexos

Análisis de secuencias MSX1





Secuencia del constructo para la digestión enzimática

TCGACCGCCTGCAGTTCTTCAAGAAGAAGCAGGGCGAATTCGCCGATGGCCA
CGGCGAGACCAGCAACGAGAGCCGCGCCTGGGAAGGTGCCTACCGGCAGC
GCTGGCAGCACGACAAGATCGTGCGCTCCACCCACGGGGTGAAGTGCACGC
CCTCCTGCTCCTGGTAGTTCTACGTGAAGAACGGCCACGCCGATTGCTGAGA
GGAAGTGAAGAAGAAAATTCCCAGACTCAGTGGGAAGAGCTCCCTCACCA
TGAGTAGCGCTATGTTGGTGACTTGCCTCCCGGACCCCAGCAGCAGCTTCCG
TGAGGATGCCCCGCGGCCCCAGTGCCAGGGGAAGAAGGGGAGACCCCAC
CGTGTGAGCCAGCCGTGGGCAAGGGCCAGGTCACCAAACCCATGCATGTCT
CTTCCAACACCAGGCGGAACCTGATCACCTGGGAAACCCAGCAGACCGACTA
CCCGCGCACCCGTCCGGACCTGCCCAACCACGAGGGCCAGCTATTCCTGGT
ACATCTACAGCGCCAACCGCCTGAAGTACCCGAAGGTGCGCAAGCCGTTGCT
CAAGCT **CCTGGAGAGGGAGAAATGC** GTGGATACCTTAGACTTCTGGTTTGCC
TGCAATGGATTGAGGCAGATGAACCTGAAGGATACCAAACCTTTACGAGTAGC
CAAAGTGAATCTACAAAAGGTACATTGAGAACAACAGCAT **CGTCTC** CAAGCAGC
TGAAGCCTGCCACCAAGACCTACATAAGAGATGGCATCAAGAAGCAGCAGAT
TGATTCCATCATGTTTGACCAGGCGCAGAC **CGAGATCCAGTCGGTGATG** CTG
GCGCGAGGCGCGGGCGCAGCACGGCGACCCGGTGAACGCCTGGGCCAGCA
TCGTGAGGACGCCGCAAGGCGAAGAGCTACAAGAGCCAGCGCGGCCTGG
GTGGCTTCGTCCGTTCCAGCTGGGACGAGGTCACCGAGATCATCGCCGCGG
CCAACGTCTACACCGCCAAGA