



Genotipificación del promotor de *CHRD2* para la búsqueda de variantes potencialmente relacionadas con la etiología del cáncer colorrectal

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C., ENERO DEL 2019



Genotipificación del promotor de *CHRD2* para la búsqueda de variantes potencialmente relacionadas con la etiología del cáncer colorrectal

Nasly Yurany Roa Torres

Asesor interno

Martha Lucía Posada Buitrago, PhD

Asesor externo

Paul Laissue Hormaza, MD, MSc, PhD. HDR

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C., ENERO DEL 2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de grado de manera especial a mi hijo Alan y a mis padres. Gracias por permanecer de manera incondicional, por su apoyo en cada uno de mis proyectos, por sus palabras y su ayuda constante, gracias por siempre creer en mí y permitir que mis sueños puedan realizarse.

AGRADECIMIENTO.

A Dios por acompañarme y ser mi guía en cada paso de mi vida.

A mi hijo Alan Nicolas por impulsarme a empezar este proceso que pronto culminara y por ser la motivación para querer cada día ser mejor.

A mis padres y hermanas por apoyarme y permitirme cumplir mis sueños. Por siempre creer en mí y brindarme su apoyo y amor incondicional.

Al Doctor Paul Laissue y a la Doctora Dora Fonseca por permitirme hacer parte de su proyecto de investigación, por sus enseñanzas y apoyo durante la realización de este trabajo.

Al grupo del CIGGUR y Universidad del Rosario, especialmente a Carolina Sierra y Danyela Valero, por compartir sus conocimientos y contribuir en la realización de esta investigación.

A la Doctora Martha Posada por su acompañamiento y asesoría.

A mis amigos Orlando Pineda, Lorena Florián y Felipe Rodríguez por su amistad, apoyo y cariño durante este proceso y para siempre.

A la Universidad Colegio mayor de Cundinamarca por ser la institución que me abrió sus puertas y me brindó la oportunidad de formarme como profesional.

ABREVIATURAS

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

BMP: proteínas morfogénicas óseas

BMPR: Receptores de proteínas morfogénicas óseas

CCR: Cancer colorrectal

CHRD2: *CHORDIN LIKE 2*

CIMP: metilación de islas CpG

CIN: inestabilidad cromosómica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

MAF: Frecuencia alélica mínima

MSI: inestabilidad de microsatélites

Rs: Referencia de polimorfismo de nucleótido único.

SNPs: Polimorfismos de nucleótido único

TGFβ: factor de crecimiento transformante beta

WHO: *World Health Organization*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1 MLH1.....	15
2.2 APC.....	16
2.3 PMS2.....	17
3. MARCO TEÓRICO.....	18
3.1 Epidemiología.....	18
3.2 Factores de riesgo.....	19
3.3 Signos y síntomas.....	20
3.4 Etiología.....	21
3.5 Proteínas morfogénicas óseas.....	24
3.6 Oncogen <i>CHRD2</i>	24
3.2 Regiones promotoras y su relación con el cáncer.....	25
4. DISEÑO METODOLÓGICO	
4.1.1 Universo.....	26
4.1.2 Población.....	26
4.1.3 Muestra.....	27
4.1.4 Variables.....	27
4.2 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	
4.2.1 Extracción de ADN de tejido por método de salting out.....	27
4.2.2 Cuantificación del ADN extraído.....	28
4.2.3 Amplificación de la región promotora del gen <i>CHRD2</i> en muestras de tejido tumoral.....	28
4.2.2.1 Diseño de <i>primers</i>	29

4.2.3 Visualización de productos de PCR.....	30
4.2.4.1 Purificación de muestras para la reacción de secuenciación.....	30
4.2.4 Secuenciación productos de PCR del fragmento de 595pb del promotor de <i>CHRD2</i>	31
4.2.5 Análisis de las secuencias.....	31
5. RESULTADOS	
5.1 Datos demográficos.....	32
5.2 Cuantificación y determinación de pureza del ADN extraído.....	34
5.3 Amplificación por PCR de un fragmento de 595pb de <i>CHRD2</i>	36
5.3 Análisis de las secuencias.....	37
6. DISCUSIÓN.....	44
7. CONCLUSIONES.....	47
8. PERSPECTIVAS.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación TNM del cáncer colorrectal según la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.

Tabla 2: *Primers* de amplificación del fragmento de 595pb del promotor de *CHRD2*

Tabla 3: Reactivos utilizados en la PCR.

Tabla 4: Programación del termociclador para la amplificación del promotor de *CHRD2*.

Tabla 5: Descripción de anatomopatológica de los tejidos tumorales.

Tabla 6: Cuantificación de ADN extraído de biopsias de tejido tumoral

Tabla 7: Resultados de los análisis de secuencia en FinchTv y alineamiento en *MUSCLE* de los 45 tejidos tumorales de CCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: tasas de incidencia global de cáncer colorrectal.

Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa del fragmento de 595pb de la región promotora de *CHRD12*.

Figura 3: Variantes heterocigotas en el ADN del tejido tumoral de CCR.

Figura 4: Alineamiento de secuencias con variantes heterocigotas.

Figura 5: Variantes homocigotas en el ADN del tejido tumoral de CCR.

Figura 6: Alineamiento de secuencias con variantes homocigotas.



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO.

Genotipificación del promotor de *CHRD2* para la búsqueda de variantes potencialmente relacionadas con la etiología del cáncer colorrectal

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en el genoma de las células de la mucosa del colon que conduce a la transformación de una célula normal a una célula neoplásica. Variantes en la secuencia de ADN de la región promotora podrían desempeñar un papel importante en la regulación de genes favoreciendo con esto la susceptibilidad a la enfermedad. En el presente estudio se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con *primers* específicos y posterior secuenciación de Sanger para la identificación de variantes de baja frecuencia en una región de 595pb del promotor del oncogén *CHRD2* en 45 muestras de biopsias de tejido tumoral procedentes de pacientes diagnosticados con cáncer de colon o recto. La secuenciación de esta región promotora permitió identificar

tres polimorfismos de nucleótido único (SNPs): c.-150C<T en 7 muestras, c.-357C<T en 35 muestras y c.-417C<T en 33 muestras. La frecuencia alélica mínima (MAF) reportada en *Ensembl* determino que estos polimorfismos son frecuentes en la población y por lo tanto no son causa de la patología, lo cual indica que variantes en este fragmento de la región promotora no se relacionan con la etiología del CCR.

PALABRAS CLAVE: Cáncer colorrectal, *CHRD2*, región promotora, oncogen, secuenciación, polimorfismos.

Estudiante: Nasly Yurany Roa Torres

Docente: Paul Laissue Hormaza MD, MSc, PhD. HDR.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

31 de agosto de 2018

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si existen variantes alélicas poco frecuentes en una región de 595 pb del promotor de *CHRD2* que puedan relacionarse con la etiología del cáncer colorrectal.

ESPECÍFICOS

- Iniciar un banco de ADN proveniente de tejidos tumorales de cáncer colorrectal en el Centro de investigación en genética y genómica de la Universidad del Rosario (CIGGUR).
- Determinar si existen variantes de secuencia poco frecuentes en la región promotora de *CHRD2* que puedan relacionarse con la etiología del cáncer colorrectal.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es un cáncer de origen epitelial localizado en el intestino grueso y el recto. El CCR es una de las patologías más frecuentes en la población y una de las mayores causas de morbimortalidad en el mundo, especialmente en países desarrollados¹. El CCR se ha convertido en un cáncer predominante en los países occidentales, representando aproximadamente el 10% de la mortalidad asociada al cáncer. En 2013 cerca de 771,000 personas murieron como resultado del CCR en todo el mundo, lo que hace que la enfermedad sea la cuarta causa más común de muerte relacionada con el cáncer después del cáncer de pulmón, hígado y estómago². La mayoría de los casos de CCR son esporádicos, aproximadamente tres cuartas partes de los pacientes tienen un historial familiar negativo³. Los factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en la etiología de la enfermedad.

Está bien establecido que el CCR es uno de los tipos de cáncer que en gran medida se pueden prevenir mediante la detección temprana¹. Nuevos tratamientos para el cáncer colorrectal primario y metastásico han surgido proporcionando opciones adicionales para los pacientes. La detección molecular de la enfermedad ofrece resultados rápidos y procedimientos no invasivos; sin embargo no existen marcadores moleculares confiables y el >50% de los pacientes son diagnosticados en estadios tardíos de la enfermedad, lo que reduce las diferentes opciones de tratamiento⁴. En este sentido, los avances en la comprensión de su fundamento molecular y la búsqueda de nuevos marcadores confiables para el diagnóstico temprano, el pronóstico y potencial tratamiento conducen a la reducción de las muertes relacionadas con esta patología⁵.

2. ANTECEDENTES

El cáncer colorrectal una patología con gran importancia en salud pública se estiman 800 000 casos nuevos por año. El CCR es descrito como una afección multifactorial, hecho que subraya la necesidad de entender los mecanismos moleculares y su interacción con el entorno para la identificación de nuevos marcadores y blancos terapéuticos de la patología¹. En la actualidad se conoce gran cantidad de genes implicados en el desarrollo de CCR, a continuación se enuncian algunos de ellos.

2.1 MLH1

Es un gen ubicado en el brazo corto del cromosoma 3, participa en procesos de reparación del material genético durante la duplicación del ADN, estudios realizados por Schneider et.al en 2017 utilizando 60 tejidos tumorales de pacientes con CCR demostraron la presencia de mutaciones *missense*, *nonsense* y *frameshift* con secuenciación de sanger, siendo los exones 17, 18 y 19 los más susceptibles a tener modificaciones en la secuencia nucleotídica². Sin embargo, la región codificante no es la única afectada en el desarrollo de esta enfermedad, ensayos realizados previamente por Li et al., en 2013 demostraron la presencia de cambios epigenéticos en una revisión que incluyó 96 artículos con un total de 5584 pacientes en donde el 20,3 % de ellos poseían metilación de la región promotora, este hecho promueve potencialmente la susceptibilidad a desarrollar CCR⁶, esto fue sustentado posteriormente por Haraldsdottir et al., en 2016 utilizando 189 tejidos tumorales de pacientes con CCR encontrando un 74,1% de ellos con hipermetilación del promotor del gen *MHL1* a partir de técnicas de inmunohistoquímica⁴, además, estudios realizados por Ward et al., en 2013 utilizando 416 tejidos tumorales de pacientes con CCR encontraron en la secuenciación del promotor epimutaciones en el 1,7% (16

pacientes) que al ser evaluadas en líneas celulares HCT 116 de CCR con estudios de luciferasa disminuyeron su expresión con respecto al control de renilla⁵.

2.2 APC

Por sus siglas en inglés *Adenomatous polyposis coli* es un gen ubicado en el cromosoma 5, la pérdida de su función ha sido asociada a mutaciones en la región codificante, promotora y cambios epigenéticos, dando lugar a un fenotipo carcinogénico relacionado con el CCR⁶. Estudios realizados por Li et al., en 2017 utilizando 60 tejidos tumorales de pacientes con CCR demostraron a partir de la técnica de PCR metilación específica un 68,33% de casos (41 pacientes) con metilación de este gen, esto promovió en los investigadores la realización de estudios funcionales en líneas celulares SW1116 de CCR a que poseían metilación del gen *APC* encontrando a partir de ensayos MTT (experimentos colorimétricos) el aumento en la proliferación además con estudios de migración (Transwell-assay) evidenciaron un incremento significativo en elementos que facilitan la metástasis⁷. Un meta análisis realizado por Liang et al., en 2016 que incluía 12 artículos con un total de 2025 pacientes con CCR encontró una incidencia del 62,8 % de pacientes con hipermetilación en el gen *APC*⁸. En otros estudios realizados por Rohlin et al., en 2011, se evaluaron 54 familias con FAP (polipomatosis adenomatosa familiar) y AFAP (polipomatosis adenomatosa familiar atenuada) encontrándose una mutación deletérea (patológica) en el promotor del 97% de los casos de FAP y 26 % en los casos de AFAP, al realizar la determinación de los niveles de expresión con q-PCR se encontró una reducción en la expresión del gen *APC* en los individuos afectados por la mutación deletérea⁹.

2.3 PMS2

Por sus siglas en inglés *mismatch repair endonuclease* es un gen ubicado en el cromosoma 7 involucrado en los procesos de reparación del ADN. Estudios realizados por Karahan en 2015 evaluaron la interacción de diferentes genes como MLH-1, MSH2, MSH6 y PMS2 en 186 tejidos tumorales de pacientes con CCR encontrándose en el 76,3% de los casos a partir de técnicas de inmunohistoquímica una pérdida de la expresión correlacionándola con la histología poco diferenciada de cada uno de ellos, cabe destacar que en esta investigación se evidencia la expresión conjunta de los distintos marcadores subrayando la prevalencia del CCR como enfermedad multifactorial¹⁰. Otros ensayos realizados por Alpert et al., en 2018 compararon las características clínico patológicas de 93 tejidos tumorales de carcinomas colorrectales con pérdida de la función de *PMS2* con otro tipo de disfunciones en genes supresores de tumores a partir de inmunohistoquímica, encontrándose una disminución significativa en la expresión del 95% de los casos, cabe resaltar que esta inactivación genética está mediada por metilación del promotor y a pesar que los demás marcadores utilizados mostraron reducción, para el caso de este gen la inhibición de la expresión fue significativa y se correlaciona con el estadio del CCR por ende se concluye que puede ser utilizado como un marcador pronóstico y de respuesta al tratamiento¹⁰.

3. MARCO TEÓRICO

El CCR es una enfermedad frecuente considerada como problema de salud pública en el mundo. El CCR es el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en el genoma de las células de la mucosa del colon que conduce a la transformación de una célula normal a una célula neoplásica seguido de la proliferación y, en algunos casos de metástasis¹¹.

3.1 Epidemiología

El CCR es uno de los más frecuentes y una de las mayores causas de morbimortalidad en el mundo. El CCR es el tercer cáncer más común con una incidencia mundial de 1.4 millones de individuos diagnosticados. Constituye la cuarta causa de mortalidad por cáncer de cualquier tipo con 693,900 muertes reportadas en 2012 superado por el cáncer pulmón, hígado y estómago⁴. El CCR es el segundo cáncer más común en mujeres (9.2%) y el tercer más común en hombres (10%)^{12,13}. Los valores de incidencia y mortalidad por CCR son marcadamente más bajos en los países menos desarrollados. Los estudios epidemiológicos muestran las variaciones de incidencia entre regiones, las cuales pueden ser parcialmente explicadas por la cultura y el estilo de vida¹⁴. Se estima que la tasa de incidencia y el número de muertes aumentara a 2,2 millones de nuevos casos y 1,1 millón de muertes para el año 2030¹⁵.

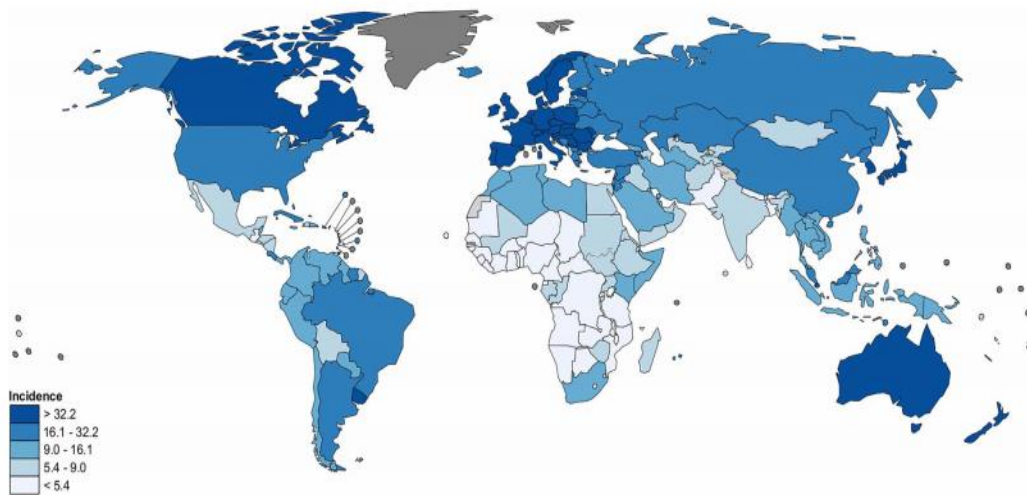


Figura 1: tasas de incidencia global de cáncer colorrectal. *World Health Organization (WHO) (Globocan 2012)*

3.2 Factores de riesgo.

El riesgo de padecer CCR está definido fundamentalmente por los factores genéticos y los factores ambientales. El principal factor de riesgo para desarrollar esta patología es la edad ocurriendo generalmente en pacientes mayores de 50 años¹³. Adicionalmente, existen otros factores de riesgo, los cuales incluyen antecedentes familiares de cáncer colorrectal, presencia de enfermedad inflamatoria del intestino y colitis ulcerativa, una dieta rica en grasas y carnes rojas y baja en fibra y folato, estilos de vida como el consumo de alcohol y cigarrillo, y la vida sedentaria relacionada con la obesidad y la falta de ejercicio^{16,17}. El CCR es una enfermedad con presentación clínica heterogénea. Los síntomas de la enfermedad son inespecíficos y varían de acuerdo al estadio. En estadios tempranos los síntomas más comunes son el sangrado rectal (rectorragia) y el dolor abdominal¹¹. En estadios avanzados se observan cambios en los hábitos intestinales como la frecuencia y la dificultad de evacuación, la consistencia y la forma de las heces, diarrea o estreñimiento y la pérdida de peso¹⁸.

3.3 Signos y síntomas.

Los signos clínicos de la enfermedad incluye masas palpables como: el tumor rectal palpable y masas en la fosa ilíaca derecha o izquierda. La anemia es otro signo relacionado con el CCR, definida como hemoglobina plasmática por debajo de 13g/dl para hombres y menor de 12g/dl para mujeres⁵. Esta anemia desarrollada por la deficiencia de hierro secundaria a la pérdida de sangre en heces¹⁹. Muchos factores afectan el pronóstico del CCR. Los factores pronósticos más importantes son: la etapa del tumor, el grado de invasión de la pared intestinal, las metástasis ganglionares y hacia otros órganos. Tres sistemas diferentes se utilizan para la clasificación clínica del CCR: sistema de Dukes, sistema de Astle-Coller y sistema TNM²⁰. El sistema de clasificación que se emplea con más frecuencia para esta patología es el sistema TNM de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*. Este sistema se fundamenta en tres principios de información: la profundidad del tumor (T) dentro de la pared del intestino, la propagación a los nódulos o ganglios linfáticos (N) y las metástasis (M). Los números de 0 a 4 y las letras después de la T, N y M proporcionan más detalles sobre cada uno de estos factores. Los números más altos significan que el cáncer está más avanzado ⁽¹¹⁾.

Tabla 1: Clasificación TNM del cáncer colorrectal según la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.

	T	N	M
Estado 0	Tis	N0	M0
Estado 1	T1-T2	N0	M0
Estado 2	T3-T4	N0	M0
Estado 2A	T3	N0	M0
Estado 2B	T4a	N0	M0
Estado 2C	T4b	N0	M0
Estado 3	Alguna	N+	M0

Estado 3A	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Estado 3B	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
Estado 3C	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
Estado 4	Alguna	Alguna	M+
Estado 4A	Alguna	Alguna	M1a
Estado 4B	Alguna	Alguna	M1b

Más del 90% de los carcinomas colorrectales son adenocarcinomas originados a partir de células epiteliales de la mucosa de colon. Otros tipos poco frecuentes de cáncer colorrectal incluyen los carcinomas neuroendocrinos, los adenoescamosos, los de células escamosas y los de células fusiformes¹¹. El adenocarcinoma se caracteriza histológicamente por la formación de tejido glandular, el cual se utiliza para la clasificación histológica del tumor. En el adenocarcinoma bien diferenciado, >95% del tumor tiene una formación de tejido glandular y es de mejor pronóstico. El adenocarcinoma pobremente diferenciado es mayormente sólido con <50% formación de tejido glandular y supone peor pronóstico²².

3.4 Etiología.

La mayoría de los casos de CCR comienzan con pólipos que ocurren en el revestimiento epitelial del colon o el recto. Estos pólipos pueden ser benignos como los pólipos hiperplásicos, premalignos como el adenoma tubular o malignos como el adenocarcinoma colorrectal¹⁷. La malignización de pólipos a carcinomas surge como consecuencia de la acumulación de mutaciones en

genes supresores de tumores o de oncogenes que desregulan las funciones homeostáticas y causan la transformación de células normales a células cancerosas²². La evolución de las células epiteliales normales del colon a adenocarcinoma generalmente sigue una progresión de cambios histológicos, cambios genéticos y cambios epigenéticos¹⁹. Estas alteraciones proporcionan una ventaja de crecimiento y conducen a la expansión clonal de las células alteradas. La expansión ocurre como consecuencia de eventos progresivos que proporcionan ventajas de crecimiento para las células como la pérdida de la inhibición del contacto celular²³. El CCR puede alterar aún más los perfiles genéticos y epigenéticos para adquirir la capacidad de invasión para hacer metástasis a órganos distantes, principalmente al hígado, y en menor grado al pulmón a través de los linfáticos²⁴. El verdadero potencial neoplásico de esta patología aún no está claro. Parece que algunos de estas lesiones albergan mutaciones en *KRAS* o *APC* y pueden progresar a un adenocarcinoma²³.

En 1990 Fearon y Vogelstein propusieron un modelo genético que fundamenta el desarrollo del CRC²⁵. A partir de esta propuesta, la etiología del CCR ha sido ampliamente estudiada, lo que condujo a un conocimiento sobre los mecanismos genéticos y epigenéticos que desempeñan funciones específicas en la fisiopatología de la enfermedad¹⁵. En la actualidad, es claro que hay múltiples vías moleculares en el desarrollo de CCR⁴. Una característica es la inestabilidad genética que puede surgir a partir de por lo menos dos diferentes mecanismos. El primero es la inestabilidad cromosómica (CIN), que constituye el mecanismo más común con aproximadamente el 85% de los casos aislados. La CIN se caracteriza por cambios en el número y la estructura de los cromosomas como las deleciones, las ganancias, las translocaciones, los reordenamientos y otros cambios en regiones que incluyen genes importantes para el proceso de carcinogénesis colorrectal²⁶. La CIN es el resultado de defectos en la segregación cromosómica con aneuploidía posterior, disfunciones de los telómeros o defectos en los mecanismos de respuesta al daño del ADN. El segundo mecanismo, el cual implica alrededor del 13% al 16% de los casos de

CCR aislados, se ha asociado a la inestabilidad de microsatélites (MSI). Los microsatélites son secuencias cortas repetitivas que se extienden a lo largo del genoma y son propensos a errores durante la replicación²⁴. El sistema de reparación por malapareamiento del ADN (*MMR*) reconoce y repara los daños que ocurren durante la replicación del ADN¹⁶. La inestabilidad de los microsatélites es un reflejo de la incapacidad del sistema *MMR* para corregir estos errores. Otro mecanismo epigenético bien descrito es el proceso de metilación de islas CpG (CIMP). Esta es una característica que induce hipermetilación del promotor silenciando un grupo de genes supresores de tumores^{26,27}.

En la actualidad, nuevas técnicas genómicas han permitido la identificación de un gran número de alteraciones involucradas en el desarrollo del CCR, estas técnicas han determinado la variación genética que implica secuencias de ADN de unas pocas kilobases hasta millones de bases, o de una sola base como polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs²⁸. Estos daños pueden afectar vías importantes como las vías WNT, MAPK / PI3K, TGF- β) y funciones dentro de la célula como *TP53* y la regulación del ciclo celular. La ruta del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) tiene una función en los procesos celulares fundamentales como el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis^{28,29}. La superfamilia TGF β incluye dos tipos de receptores que son mediadores de la señalización intracelular. Los receptores de tipo I incluyen ACTIVIN y NODAL, cuyas señales se transmiten a través de SMAD2 y SMAD3. Los receptores tipo II incluyen BMPs y GDFs, que transducen señales a través de SMAD1, SMAD5, y SMAD8³⁰.

3.5 Proteínas morfogénicas óseas

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) ayudan a controlar la renovación celular, la proliferación y la diferenciación en el epitelio colónico. También poseen una potente actividad antitumoral. La ruta de señalización de BMPs se desencadena por ligandos que se unen a los receptores BMPs (BMPR), seguidos por la activación de SMAD1, SMAD5, y SMAD8³¹. La pérdida de la señalización BMP es un evento asociado con la progresión de adenomas a carcinomas. Investigaciones recientes han demostrado que la señalización de BMPs se pierde o se bloquea en el CCR y resulta en su baja expresión, así como una alta expresión de sus antagonistas^{32,33}. La vía BMPs es regulada negativamente por sus antagonistas, que son proteínas secretadas que se unen a los ligandos de BMP y bloquean sus interacciones con receptores de superficie. La ruptura del equilibrio entre BMPs y sus antagonistas contribuye a la progresión de la enfermedad^{34, 35}.

3.6 Oncogén *CHRD2*

CHRD2 es un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 11. *CHRD2* está constituido por 12 exones y un total de 1867 pares de bases. Este gen es expresado en útero, corazón, hígado, próstata, testículos y ovarios. *CHRD2* codifica para cinco isoformas de la proteína CHORDIN-LIKE 2, cuya ubicación es extracelular y citoplasmática. CHORDIN-LIKE 2 es una proteína de 429 aminoácidos con dominios conservados ricos en cisteína que cumple una función de antagonista. CHORDIN LIKE 2 inhibe la señalización de BMPs, interactuando con estas proteínas e impidiendo su unión a receptores específicos BMPs³⁶. El equilibrio dinámico entre la proliferación y la diferenciación de las células madre de la cripta intestinal depende de la regulación de la señalización de BPMs por lo que la sobreexpresión de su antagonista *CHRD2* resulta en la pérdida de señalización y función de BMPs

(21). En este sentido se concluye que la sobreexpresión de *CHRD2* se relaciona con la biología tumoral por lo que constituye un potencial marcador molecular de la enfermedad³.

3.7 Regiones promotoras y su relación con el cáncer

El promotor es el centro de regulación de la transcripción de genes. Mutaciones o polimorfismos relacionados con el promotor afectan la unión a factores de transcripción alterando la transcripción de genes y traducción de proteínas³⁷. La alteración en los niveles de proteína favorece la susceptibilidad del individuo a enfermedades como el cáncer³⁸. Además, los polimorfismos en las regiones promotoras también afectan susceptibilidad al cáncer mediante la alteración de los mecanismos epigenéticos tales como metilación del ADN y modificaciones de histonas^{27,28}. La hipermetilación de islas CpG en la región promotora de los genes supresores de tumores causan el silenciamiento transcripcional, con la consiguiente pérdida de la expresión de proteínas³⁹. En este sentido el estudio del promotor como una región reguladora de importancia en el CCR es de crucial importancia.

4. DISEÑO METODOLÓGICO.

4.1 Universo, población, muestra.

4.1.1 Universo

Pacientes colombianos con neoplasias colorrectales que asistieron al servicio de cirugía del hospital de MEDERI fueron incluidos en este estudio

4.1.2 Población

Muestras de pacientes con neoplasias colorrectales.

- Criterios de inclusión

Los casos de estudio incluyeron hombres y mujeres adultos, que presentaron neoplasias colorrectales de cualquier tipo. Participaron igualmente pacientes con metástasis de tumores de origen colorrectal. Los pacientes fueron incluidos en el estudio a partir de la selección efectuada por parte de los especialistas clínicos adscritos al proyecto. Los coinvestigadores con formación médica tuvieron acceso a los datos pertinentes incluidos en las historias clínicas. Antes de efectuar los procedimientos conducentes a obtener muestras biológicas, todos los participantes del estudio firmaron un consentimiento informado.

- Criterios de exclusión

Pacientes sometidos a terapias adyuvantes en las que se incluye radioterapia o quimioterapia.

4.1.3 Muestra

La muestra de estudio incluyó 45 biopsias de tejidos tumorales de pacientes con cáncer colorrectal conservadas en etanol al 100% en tubos *Eppendorf*

4.1.4 Variables.

Estadio y grado histológico del tumor.

4.2 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

4.2.1 Extracción de ADN de tejido por método de salting out.

La extracción de ADN se realizó mediante el método manual de *salting out* de acuerdo a los parámetros descritos en el *current protocols of molecular biology*. El ADN genómico se extrajo de biopsias de tejido tumoral de cáncer colorrectal que venían en etanol al 100% para su conservación. Para la extracción se precalentó un baño serológico a 56°C, se retiró el etanol del tejido y se dejó secar por 10 minutos. Con ayuda del bisturí y las pinzas, en condiciones de esterilidad para cada muestra, se cortó el tejido en fragmentos pequeños y se agregaron a tubos *Eppendorf* de 1.5 ml. Se adicionó a cada tubo 600µL de TNES buffer y 22µL de proteinasa K (50 µg/ml). Se mezcló y se incubó a 56°C en el baño serológico. Posteriormente se retiraron los tubos del baño serológico y se procesó con el homogeneizador en condiciones de esterilidad para cada muestra. Se llevó nuevamente los tubos *Eppendorf* a incubación a 56°C en el baño serológico por toda la noche. Luego de la incubación se agregó a cada uno 170µL de NaCl 6M mezclando cada tubo fuertemente por 20 segundos de forma manual. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se removió el sobrenadante y se adicionó a un nuevo tubo

Eppendorf debidamente marcado. Se adicionó un volumen igual de etanol al 100% previamente enfriado. Se mezcló suavemente y se sometió por 2 horas a -20°C. Se centrifugó a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante evidenciando el *pellet* en fondo del tubo. Se realizó un lavado con 700µL de etanol al 100% y se centrifugó a 13.000 rpm por 2 minutos a 4°C. Este último paso se repitió dos veces. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* sobre una toalla de papel por aproximadamente 2 horas. Se agregó 200µL de buffer TE 1X al pellet de ADN obtenido y se incubó a 4°C toda la noche. El ADN extraído fue almacenado posteriormente a -20°C para su posterior análisis.

4.2.2 Cuantificación del ADN extraído.

Se cuantificó la cantidad de ADN en un espectrofotómetro NanoDrop (*NanoDrop One Thermo scientific®*). La pureza se obtuvo mediante la relación A260/A280 y A260/A230. El ADN obtenido se almacena a -60° en el CENTRO DE INGENIERIA EN GENETICA Y GENOMICA (CIGGUR) para la construcción de un banco de ADN proveniente de tejidos tumorales.

4.2.3 Amplificación de la región promotora del gen *CHRD2* en muestras de tejido tumoral.

4.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de 595pb del promotor de *CHRD2*

Las amplificaciones del fragmento de 595pb del promotor de *CHRD2* se realizaron por PCR convencional en un termociclador Axygen en un volumen final de 25 µL. Se utilizaron los *primers* diseñados incluidos en la Tabla 2. La reacción de PCR se realizó según las especificaciones de las tablas 3 y 4.

4.2.3.2 Diseño de *primers*

Se utilizó el programa Primer3 para el diseño de los *primers* (oligonucleótidos) para la amplificación de una región del promotor de *CHRD2* de 595 pb. Los *primers* diseñados se utilizaron adicionalmente para la secuenciación de los productos de PCR del fragmento del promotor de *CHRD2*.

Tabla 2: *Primers* de amplificación del fragmento de 595pb del promotor de *CHRD2*

Nombre del <i>Primer</i>	Secuencia 5`3`	Amplicon esperado
h_CHRD2prom_-557_F_KpnI_pgl4.22 <i>Primer forward</i>	GCCGGTACCGAGCGCGGCGCCTGAA GCCCTTG	595pb
h_CHRD2prom_38_R_HindIII_pgl4.22 <i>Primer reverse</i>	GGGAAGCTTCCCAGCAAGGAGGAGA GGACCCTC	

Tabla 3: Reactivos utilizados en la PCR: Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de PCR para la amplificación de 585pb de la región promotora de *CHRD2*.

Reactivo	VOLUMEN
Master Mix 2X (Promega)	8.0 µL
Primer Forward (10 µM)	2.0 µL
Primer Reverse (10 µM)	2.0 µL
H2O destilada	10.0 µL
ADN a amplificar (≈100 ng/µL)	2.0 µL
DMSO (dimetilsulfóxido)	1.0 µL
Total	25.0 µL

Tabla 4: Programación del termociclador para la amplificación del promotor de *CHRD2*

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
35 Ciclos		
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	64°C	40 segundos
Elongación	72°C	30 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos
Conservación	4°C	

4.2.3.3 Visualización de productos de PCR.

La presencia de los amplímeros obtenidos en las reacciones de PCR se confirmó analizando 4 µL del producto de cada reacción de PCR en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb (*1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen Thermo scientific®*) para establecer la talla de los fragmentos amplificados.

4.2.4 Secuenciación de 595pb del promotor de *CHRD2*.

4.2.4.1 Purificación de muestras para la reacción de secuenciación.

La purificación del producto de PCR se realizó por tratamiento con exonucleasa I y fosfatasa alcalina se realizó en *Elim biopharmaceutical* (<https://www.elimbio.com/index.htm>). La mezcla de exonucleasa 1 y fosfatasa alcalina fue añadida a la reacción de PCR del promotor de *CHRD2* e incubada por 15 minutos. La exonucleasa I degradó los restos de cebadores presentes en la muestra y la fosfatasa alcalina catalizó la defosforilación de los nucleótidos

no incorporados. Las enzimas se desnaturalizaron a causa del calor y los productos de PCR quedaron listos para su secuenciación y posterior análisis.

4.2.4.2 Secuenciación de los productos de PCR del fragmento de 595 pb del promotor de *CHRD2*.

Los productos de PCR purificados se secuenciaron por el método de Sanger en la plataforma internacional *Elim biopharmaceutical* (<https://www.elimbio.com/index.htm>) ubicada en Estados Unidos. Fueron enviados 10 µL de cada una de las muestras en las que se evidenció una banda única de amplificación en el gel de agarosa correspondiente a 595 pb. Para la secuenciación se utilizaron los *primers* de amplificación descritos en la tabla 2 a una concentración de 3mM.

4.2.5 Análisis de las secuencias.

Los electroforetogramas de la secuenciación se analizaron manualmente a través del programa FinchTv. Todas las secuencias obtenidas se compararon a través de la herramienta bioinformática *Multiple Sequence Alignment* (MUSCLE) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) con las secuencias silvestres del promotor de *CHRD2* registradas en la base de datos *ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>) transcrito (ENST00000376332.7).

5. RESULTADOS

5.1 Datos demográficos

Tabla 5: Descripción de anatomopatológica de los tejidos tumorales.

TT	Descripción anatomopatológica	Edad	Sexo
1	Tumor de comportamiento incierto	72 años	Femenino
3	Tumor maligno de recto	26 años	Masculino
4	Adenocarcinoma de tipo intestinal, infiltrante moderadamente diferenciado	58 años	Femenino
5	Adenocarcinoma de colon bien diferenciado con componente mucinoso originado en adenoma vellosos infiltrante hasta la submucosa	68 años	Masculino
6	Tumor maligno del colon descendente	72 años	Masculino
7	Adenocarcinoma bien diferenciado de colon con presencia de lagos de moco en un 15%	61 años	Femenino
8	Adenocarcinoma de tipo intestinal bien diferenciado ulcerado infiltrante hasta el mesocolon	80 años	Masculino
9	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	53 años	Masculino
10	Pólipos hiperplásicos, tumor maligno del colon sigmoide.	81 años	Masculino
11	Adenocarcinoma infiltrante a submucosa originado de adenoma vellosos con displasia de alto y bajo grado en ciego.	77 años	Masculino
12	Adenocarcinoma de colon infiltrante de tipo intestinal moderadamente diferenciado que compromete hasta la serosa con componente mucinoso del 30%.	50 años	Femenino
13	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado, bien diferenciado que se extiende hasta la serosa.	67 años	Masculino
14	Adenocarcinoma de patrón clásico moderadamente diferenciado y ulcerado	46 años	Masculino
16	Adenocarcinoma de colon de patrón convencional, moderadamente diferenciado infiltrante a todo el espesor de la pared colonica hasta la serosa.	74 años	Femenino
18	Adenocarcinoma infiltrante de tipo intestinal moderadamente diferenciado.	75 años	Femenino
19	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante moderadamente diferenciado que se extiende hasta la muscular mucosa.	84 años	Femenino
20	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante moderadamente diferenciado que se extiende hasta la serosa.	65 años	Femenino

21	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante, ulcerado moderadamente diferenciado que se extiende hasta la serosa.	79 años	Masculino
22	Adenocarcinoma de patrón convencional moderadamente diferenciado, ulcerado, infiltrante hasta la serosa.	33 años	Femenino
23	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante, ulcerado moderadamente diferenciado que se extiende hasta el mesocolon.	64 años	Femenino
24	Adenoma túbulo-velloso displasia de alto grado	74 años	Femenino
25	Adenocarcinoma de tipo usual moderadamente diferenciado en un 90% con componente de adenocarcinoma mucinoso en un 10% infiltrante hasta la serosa.	80 años	Masculino
26	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado moderadamente diferenciado	63 años	Masculino
27	Adenomas predominantemente tubulares, otros tubulovellosos con displasia de bajo grado compatible con poliposis adenomatosa familiar.	18 años	Masculino
28	Adenocarcinoma de colon, bien diferenciado que infiltra hasta la subserosa	81 años	Femenino
29	Adenocarcinoma de tipo intestinal usual moderadamente a mal diferenciado, ulcerado, infiltrante a toda la pared.	56 años	Femenino
30	Adenocarcinoma de tipo intestinal usual ulcerado, moderadamente diferenciado, infiltrante a toda la pared y focalmente a la grasa del meso, con formación y perforación de plastrón.	84 años	Masculino
31	Adenocarcinoma de tipo mucinoso	60 años	Masculino
33	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado, moderadamente diferenciado que se extiende hasta la capa muscular.	47 años	Femenino
34	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado, moderadamente diferenciado que se extiende hasta el mesocolon	54 años	Femenino
36	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado ulcerado	77 años	Masculino
37	Adenocarcinoma de colon pobremente diferenciado que infiltra todo el espesor de la pared	78 años	Masculino
38	Adenocarcinoma de tipo mucinoso	73 años	Masculino
39	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado, moderadamente diferenciado que se extiende hasta el mesocolon	79 años	Masculino
41	Adenoma velloso con neoplasia intraepitelial glandular de bajo grado, displasia leve a moderada	67 años	Masculino

42	Adenocarcinoma de patrón clásico moderadamente diferenciado con componente mucinoso del 10%.	75 años	Masculino
43	Adenocarcinoma de tipo intestinal usual moderadamente diferenciado, ulcerado, infiltrante a toda la pared y focalmente a la grasa del mesocolon.	70 años	Masculino
44	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado moderadamente diferenciado que se extiende hasta la serosa.	70 años	Masculino
45	Adenocarcinoma de tipo intestinal moderadamente diferenciado con componente mucinoso	74 años	Masculino
46	Adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado ulcerado que infiltra todo el espesor de la pared con compromiso del tejido adiposo pericolónico.	57 años	Femenino
47	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado moderadamente diferenciado	62 años	Masculino
48	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado moderadamente diferenciado	59 años	Masculino
49	Adenocarcinoma de patrón clásico moderadamente diferenciado	47 años	Femenino
50	Tumor maligno del colon descendente	71 años	Masculino
51	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado moderadamente diferenciado que se extiende hasta la serosa.	68 años	Femenino
53	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado ulcerado	54 años	Femenino

5.2 Cuantificación y determinación de pureza del ADN extraído.

La cuantificación del ADN extraído a partir de muestras de tejido tumoral en 45 pacientes mostró una variabilidad representada en un rango entre 314 ng/μL a 2963 ng/μL. La relación 260/280 que permite cualificar la cantidad de proteínas que tiene el ADN mostro un rango de 1.80 hasta 2.05. Para la relación 260/230, que permite cualificar la pureza del ADN mostro un rango de variación entre 1.50 a 2.24 por lo que el ADN se consideró aceptable.

Tabla 6: Cuantificación de ADN extraído de biopsias de tejido tumoral

Muestra de tejido tumoral	[ng/ul]	A260/280	A260/230
1	833	1,96	1,65
3	1326	1,80	1,75
4	2257	2,05	1,92
5	462	1,80	1,90
6	1020	1,89	1,70
7	1173	1,80	1,80
8	444	2,03	1,54
9	871	1,95	1,76
10	585	1,85	1,75
11	921	1,87	1,86
12	429	2,01	1,22
13	264	2,00	1,70
14	554	2,00	1,60
16	522	2,00	1,70
18	851	1,90	1,50
19	1,90	1,10	1,90
20	548	1,90	1,10
21	622	1,80	1,20
22	314	1,80	1,60
23	712	1,90	1,00
24	545	1,90	1,80
25	592	1,90	1,60
26	951	1,90	1,57
27	587	1,90	1,30
28	609	1,96	1,01
29	823	1,91	1,85
30	2158	1,85	1,75
31	340	1,88	1,59
33	1637	1,88	1,96
34	1197	1,87	2,00

36	1736	1,90	1,71
37	1028	1,93	1,81
38	2092	1,94	1,77
39	2511	1,93	1,72
41	496	1,81	1,91
42	1475	1,96	1,87
43	790	1,89	2,13
44	1394	1,88	1,54
45	2044	1,91	1,57
46	2963	1,92	2,13
47	1982	1,91	2,11
48	1738	1,91	2,24
49	1032	1,89	2,09
50	1929	1,84	1,65
51	451	1,89	1,99
53	881	1,88	1,91

5.3 Amplificación por PCR del fragmento de 595pb de *CHRLD2*.

La amplificación por PCR con los *primers* descritos en la tabla 3 y condiciones mostradas en la tabla 5 mostró una banda de 595pb, coincidiendo así con el tamaño esperado (figura 2). La temperatura de anillamiento fue modificada para lograr la estandarización de la PCR.

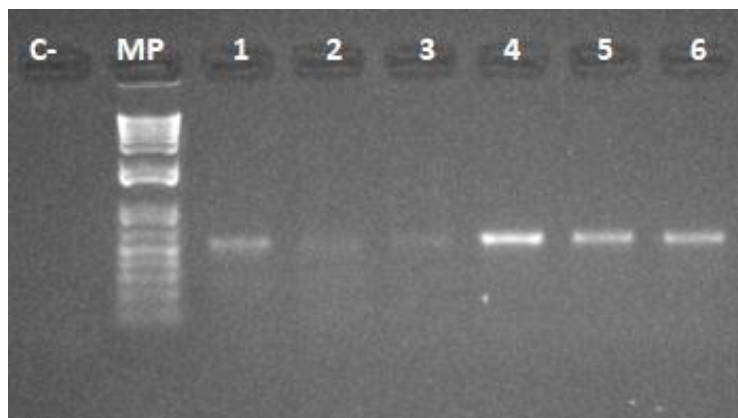


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa del fragmento de 595pb de la región promotora de *CHRD2*. En el pozo 1 se sembró el marcador de peso molecular 1kb (1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen Thermo scientific®), en los pozos 2 al 7 se sembraron los productos de PCR correspondientes a los tejidos tumorales 33 al 38 respectivamente.

5.3 Análisis de las secuencias.

El alineamiento y análisis de las cuarenta y cinco secuencias de ADN provenientes de muestras de tejido tumoral de CCR permitió identificar tres polimorfismos de nucleótido único (SNPs): c.-150C<T, c.-357C<T y c.-417C<T.

Los electroforetogramas fueron analizados de forma manual a través del programa FinchTv. El cambio de secuencia es evidenciado por la aparición de un doble pico que muestra la diferencia entre los dos alelos; es decir, una variante heterocigota encontrada en el tejido tumoral 3(Fig 3).

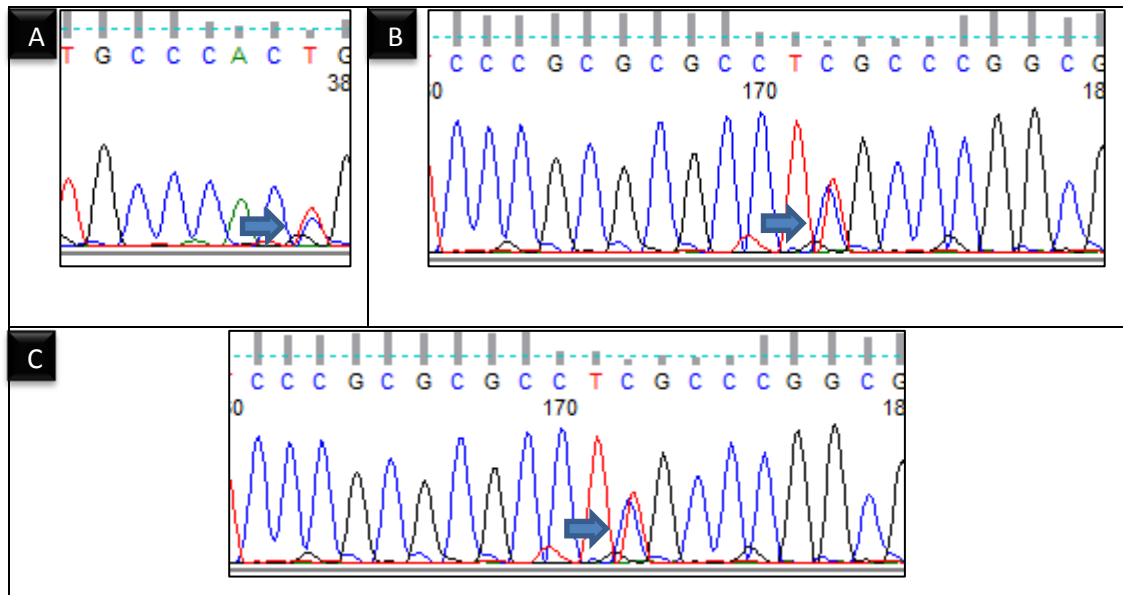


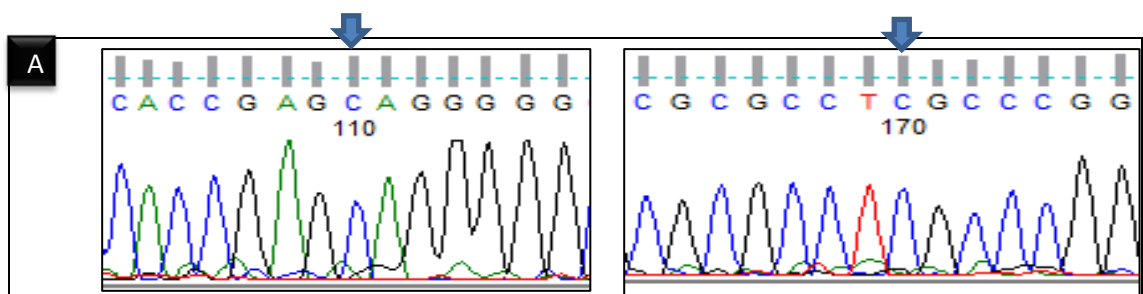
Figura 3: Variantes heterocigotas en el ADN del tejido tumoral de CCR: (A) Doble pico evidencia el cambio de una citosina por una timina en la posición -150 o c.-150C>T en el tejido tumoral 3. (B) Doble pico evidencia el cambio de una citosina por una timina en la posición -357 o c.-357C>T en el tejido tumoral 3. (C) Doble pico que evidencia el cambio de una citosina por una timina en la posición -417 o c.-417C>T en el tejido tumoral 3.

Las variantes fueron confirmadas a través del alineamiento de la secuencia silvestre encontrada en las bases de datos públicas, dicha secuencia se encuentra ubicada en la parte posterior del alineamiento y es denominada CHRDL2_PROMWT. La comparación se realiza con la con la secuencia de la muestra correspondiente al tejido tumoral 3 ubicada en la parte inferior, denominada CHRDL2_PROMTT3ALFA (Fig4).



Figura 4: Alineamiento de secuencias con variantes heterocigotas: Alineamiento de la secuencia silvestre nombrada como CHRD2_PROMWT con la secuencia de ADN del tejido tumoral 3 nombrada como CHRD2_PROMTT3ALFA. Se confirman variantes observadas en los electroforetogramas del tejido tumoral 3 (Fig 3).

Las variantes homocigotas de las muestras no se evidencian en los electroforetogramas el cambio en los dos alelos se manifiesta en la aparición de un solo pico correspondiente al polimorfismo del fragmento (Fig 5).



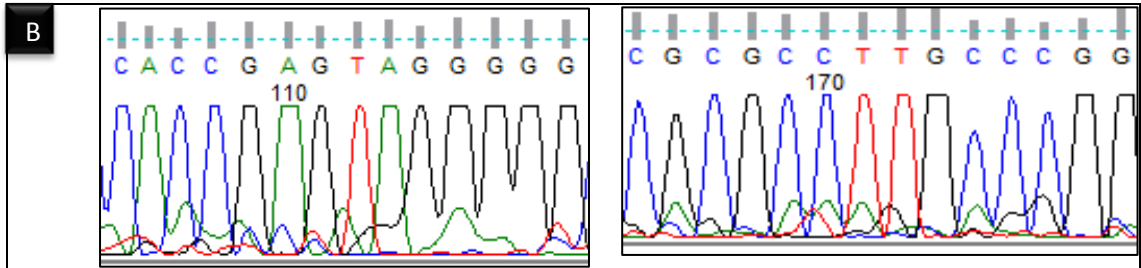


Figura 5: Variantes homocigotas en el ADN del tejido tumoral de CCR: (A) Electroforetograma de secuencias que no presentan variantes en la secuencia nucleotídica en las posiciones -357 y -417 (B) Electroforetograma de secuencia que presenta el cambio de una citosina por una timina en la posición -357 y -417 en los dos alelos, la secuencia corresponde al tejido tumoral 43.

Las variantes homocigotas se evidenciaron a través del alineamiento de la secuencia silvestre con la con la secuencia de la muestra correspondiente al tejido tumoral en *MUSCLE* (Figura 6).

```

PROMCHRD2_WT          CCGACCCCGAGCCCACCGAGCAGGGGGCGCCGGCCGCCTCTAGCCCGCGCGCCCGCAACA
PROMCHRD2_TT43ALFA   -----GAGCCCACCGAGTAGGGGCGCGCCGGCCGCCTCTAGCCCGCGCGCCCGCAACA
                      *****

PROMCHRD2_WT          CCCGCTGGTCCCGCGCGCCCTCGCCGCGGCTGCGCGCTCGGCAGACGCGGTCTCTCCC
PROMCHRD2_TT43ALFA   CCCGCTGGTCCCGCGCGCCTTGCCTCGCGGCTGCGCGCTCGGCAGACGCGGTCTCTCCC
                      *****

PROMCHRD2_WT          TGCTTTCTCCTCCTCTCCCCTCACCTTCCCCTTTCTTTGATCGCCTCTCCCTTCTGCT
PROMCHRD2_TT43ALFA   TGCTTTCTCCTCCTCTCCCTCACCTTCCCCTTTCTTTGATCGCCTCTCCCTTCTGCT
                      *****

PROMCHRD2_WT          GGACCTTCCTTCGTCTCTCCATCTCTCCCTCTTTCCTTCCCGGTCTCTTTCCACCTTTCT
PROMCHRD2_TT43ALFA   GGACCTTCCTTCGTCTCTCCATCTCTCCCTCTTTCCTTCCCGGTCTCTTTCCACCTTTCT
                      *****

PROMCHRD2_WT          CTTCTCCCACCTTAGACCTCCCTTCTGCTCCCTTCCCTGCCCACCGCTGCTTCTGCTG
PROMCHRD2_TT43ALFA   CTTCTCCCACCTTAGACCTCCCTTCTGCTCCCTTCCCTGCCCACCGCTGCTTCTGCTG
                      *****

PROMCHRD2_WT          CCCTTCTCCGACCCCGCTCTAGCAGCAGACCTCCTGGGGTCTGTGGGTGATCTGTGGCC
PROMCHRD2_TT43ALFA   CCCTTCTCCGACCCCGCTCTAGCAGCAGACCTCCTGGGGTCTGTGGGTGATCTGTGGCC
                      *****

PROMCHRD2_WT          CCTGTGCCTCCGTGTCCTTTTCGTCTCCCTTCTCCCGACTCCGCTCCCGGACCAGCGGC
PROMCHRD2_TT43ALFA   CCTGTGCCTCCGTGTCCTTTTCGTCTCCCTTCTCCCGA-----
                      *****

PROMCHRD2_WT          CTGACCCTGGGAAAGGATGGTCCCGAGGTGAGGGTCTCTCTCTCTGCTGGGACTCG
PROMCHRD2_TT43ALFA   -----

```

Figura 6: Alineamiento de secuencias con variantes homocigotas: Alineamiento de la secuencia silvestre nombrada como CHRD2_PROMWT con la secuencia de ADN

del tejido tumoral 43 nombrada como CHRDL2_PROMTT43ALFA. El electroforetograma correspondiente al ADN de este tejido no muestra doble pico en esta posición pero sí muestra el cambio de una citosina por una timina en la secuencia de la muestra.

Tabla 7: Resultados de los análisis de secuencia en FinchTv y alineamiento en *MUSCLE* de los 45 tejidos tumorales de CCR.

Muestra de tejido tumoral	SNP: c.-150C<T MAF: 0.18 Rs: 72991239	SNP: c.-357C<T MAF: 0.48 Rs: 61897000	SNP: c.-417C<T MAF: 0.48 Rs: 112639765
1	Heterocigoto	Heterocigoto	Heterocigoto
3	Heterocigoto	Heterocigoto	Heterocigoto
4	Heterocigoto	Heterocigoto	Heterocigoto
5	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
6	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
7	Homocigoto	Heterocigoto	Heterocigoto
8	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
9	NP	Homocigoto	Homocigoto
10	NP	Homocigoto	Homocigoto
11	NP	NP	NP
12	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
13	NP	Homocigoto	Homocigoto
14	NP	Homocigoto	Homocigoto
16	NP	Homocigoto	Homocigoto
18	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
19	NP	Homocigoto	Homocigoto
20	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
21	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
22	NP	NP	NP
23	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
24	Heterocigoto	NP	NP

25	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
26	NP	NP	NP
27	NP	Homocigoto	NP
28	NP	Homocigoto	Homocigoto
29	NP	Homocigoto	Homocigoto
30	Heterocigoto	Heterocigoto	Heterocigoto
31	NP	Homocigoto	Homocigoto
33	NP	Homocigoto	Homocigoto
34	NP	NP	NP
36	NP	NP	NP
37	NP	NP	NP
38	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
39	NP	Homocigoto	NP
41	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
42	NP	NP	NP
43	NP	Homocigoto	Homocigoto
44	NP	NP	NP
45	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
46	NP	NP	NP
47	NP	Homocigoto	Homocigoto
48	Heterocigoto	NP	NP
49	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
50	NP	Homocigoto	Homocigoto
51	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
53	NP	Heterocigoto	Heterocigoto
Total de secuencias que presentan en polimorfismo	7/45	35/45	33/45
Total de alelos que presentan el polimorfismo	8/90	50/90	46/90

NP: No presenta

El polimorfismo c.-150C<T se encontró en estado homocigoto en un paciente y en estado heterocigoto en seis pacientes. El polimorfismo c.-357C<T se encontró en estado homocigoto en quince pacientes y en estado heterocigoto en veinte pacientes. El polimorfismo c.-417C<T se encontró en estado homocigoto en trece pacientes y en estado heterocigoto en veinte pacientes.

6. DISCUSIÓN

La secuenciación de la región promotora de 595pb de *CHRD2* realizada en este trabajo fue el primer estudio de secuenciación de este oncogén y tuvo como objetivo la búsqueda de variantes en la secuencia nucleotídica de un fragmento de 595 pb de *CHRD2* que pudieran relacionarse con la etiología del CCR. Estudios recientes señalaron a *CHRD2* como un oncogén cuya sobreexpresión está relacionada con la etiología y las características clínicas del CCR. Las proteínas codificadas por *CHRD2* funcionan como antagonistas de las BMP inhibiendo la apoptosis en las células del colon y promoviendo la proliferación³. Los estudios en la genética del cáncer se han centrado principalmente en las variantes o SNPs en las regiones codificantes de proteínas que generan alteraciones en las secuencias de aminoácidos⁴⁰. Los SNPs en regiones no codificantes no se habían enfocado de manera primordial⁴¹. Los SNPs ubicados en regiones no codificantes como la región promotora pueden alterar los sitios de unión a proteínas como los factores de transcripción; esto puede resultar en la activación o la represión de la transcripción, lo que a su vez podría relacionarse con la etiología del cáncer⁴².

La extracción de ADN realizada mediante el método manual de *salting out*, fue el primer paso para la secuenciación de *CHRD2*. La extracción de ADN por este método en este estudio fue económica, libre de compuestos tóxicos y libre de inhibidores de PCR como el fenol-cloroformo⁴³, aunque el método de *salting out* suele presentar sales inhibidoras la relación 260/280 y la relación 260/230 fueron óptimas para la realización de las amplificaciones y su posterior secuenciación, la calidad del ADN se evidenció en el éxito de la PCR. Para la amplificación del fragmento de 595pb de la región promotora de *CHRD2* se usó la secuencia silvestre del transcrito (ENST00000376332.7) encontrada en la base de datos de Emsembl, esta secuencia permitió realizar el diseño de *primers* a través de herramientas bioinformáticas, el conocimiento de esta secuencia también

permitió determinar el uso de dimetil sulfóxido en la mezcla de PCR, el fragmento de 595pb de *CHRD2* tiene secuencia rica en citosinas y guaninas, esto genera la formación estructuras secundarias⁴⁴. El método de secuenciación utilizado en este estudio fue el de Sanger, este método resultó ser adecuado para secuenciar el fragmento de 595 pb de la región promotora de *CHRD2* de las muestras de ADN de tejido tumoral sin generar inespecificidades o complicaciones en la lectura de las secuencias, proporciono datos de fácil análisis mediante herramientas bioinformáticas y electroforetogramas legibles que dan soporte a este estudio. El método de Sanger además de ser económico, es una técnica *gold standard* que aportó resultados que se correlacionaron con las bases de datos⁴⁶.

Los análisis de secuencias a través de herramientas bioinformáticas como *FinchTv* y *MUSCLE* mostraron la presencia de tres polimorfismos, el alineamiento de las secuencias de ADN de las biopsias con las secuencias silvestres encontradas en bases de datos públicas confirmo los cambios de nucleótidos en las secuencias de ADN extraídas de tejido tumoral. Las variantes heterocigotas reflejaban dobles picos en los electroforetogramas, las variantes homocigotas se evidenciaron en los alineamientos y fueron confirmados en los electroforetogramas (ver Fig 5). La revisión de las bases de datos públicas permitió establecer que estos polimorfismos habían sido previamente identificados y referenciados (RS). La frecuencia alélica mínima de cada polimorfismo determinó que estos son comunes y, por lo tanto, no se relacionan con la etiología y el fenotipo del CCR⁴⁴. La comparación entre las frecuencias alélicas de los resultados y las frecuencias alélicas reportadas en las bases de datos mostró que el cambio de una citosina por una timina en la posición -150 es el polimorfismo menos común de los tres encontrados y el de una citosina por una timina en las posiciones -357 y -417 como las más comunes, con frecuencias similares.

Los datos presentados de acuerdo a las frecuencias alélicas y la identificación de variantes como SNP descartan la relación de las variantes en la secuencia

promotora de *CHRD2* con la etiología del cáncer colorrectal, puesto que los SNPs no cambian significativamente el fenotipo y son comunes a lo largo del genoma⁴⁷. Los resultados en nuestro estudio no descartan la relación de *CHRD2* con la etiología del cáncer. Los polimorfismos encontrados en combinación con otros SNPs podrían estar relacionados con la enfermedad, por lo que pueden estar sujetos a análisis de haplotipo o GWAS⁴⁸. Adicionalmente la región secuenciada abarca únicamente 595bp lo que no permite descartar que otras regiones más alejadas del sitio de inicio de la transcripción sean portadoras de mutaciones deletéreas. También es importante señalar que los niveles de expresión diferenciales de *CHRD2* descritos en el CCR podrían relacionarse con aspectos epigenéticos como la metilación de la región promotora³¹.

7. CONCLUSIONES

- Se inició la construcción de un banco de ADN de tejidos tumorales de cáncer colorrectal en el Centro de Investigación en Genética y Genómica de la Universidad del Rosario (CIGGUR) con 45 biopsias de cáncer colorrectal que permitirán posteriores estudios moleculares y fisiológicos del cáncer de colon.
- Se logró La secuenciación de las 595pb del promotor de *CHRD2* y la identificación de tres polimorfismos previamente registrados en bases de datos y cuya frecuencia alélica descartó la relación de la región promotora de *CHRD2* con la etiología del cáncer colorrectal.

8. PERSPECTIVAS

Se propone hacer análisis de haplotipos para identificar si los polimorfismos encontrados en combinación con otros polimorfismos se encuentran relacionados con la etiología del cáncer colorrectal.

Se sugiere realizar estudios de la metilación del promotor para identificar alteraciones epigenéticas en el promotor que se relacionen con la patología.

8. REFERENCIAS

1. Coppedè, F. (2014). Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(4), p.943.
2. Jia S, Zhang R, Li Z, Li J. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017.
3. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi M. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(1):197.
4. Lizarbe M, Calle-Espinosa J, Fernández-Lizarbe E, Fernández-Lizarbe S, Robles M, Olmo N et al. Colorectal Cancer: From the Genetic Model to Posttranscriptional Regulation by Noncoding RNAs. *BioMed Research International*. 2017;2017:1-38.
5. Puccini A, Berger M, Naseem M, Tokunaga R, Battaglin F, Cao S et al. Colorectal cancer: epigenetic alterations and their clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2017;1868(2):439-448.
6. Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen-Corish, M. and Warusavitarne, J. (2012). Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(9), pp.1423-1431.

7. Wang Y, Li Z, Li W, Liu S, Han B. Methylation of promoter region of CDX2 gene in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(5):3229–33.
8. John S, George S, Primrose J, Fozard J. Symptoms and signs in patients with colorectal cancer. *Colorectal Disease.* 2010;13(1):17-25.
9. Blanco-Calvo M, Concha Á, Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M. Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015;16(6):13610-13632.
10. Akkoca AN, Yanık S, Özdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, et al. TNM and modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(9):2828–35.
11. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):153–73.
12. Rodriguez-Salas, N., Dominguez, G., Barderas, R., Mendiola, M., García-Albéniz, X., Maurel, J. and Batlle, J. (2017). *Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes.* *Critical Reviews in Oncology/Hematology,* 109, pp.9-19.
13. Bardhan K, Liu K. Epigenetics and Colorectal Cancer Pathogenesis. *Cancers.* 2013;5(2):676-713.
14. Grady, W. and Carethers, J. (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology,* 135(4), pp.1079-1099.

15. Draht MXG, Niessen H, Engeland M Van. Promoter CpG island methylation markers in colorectal cancer: the road ahead Review. 2012;4:179–94.
16. Müller M, Ibrahim A, Arends M. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*. 2016;469(2):125-134.
17. Kim MS, Lee J, Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(1):181–206.
18. David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(7):419–35.
19. Chruścik A, Gopalan V, Lam AK yin. The clinical and biological roles of transforming growth factor beta in colon cancer stem cells: A systematic review. *Eur J Cell Biol [Internet]*. 2017;(November):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.11.001>
20. Bierie B, Moses HL. TGF- β and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17(1–2):29–40.
21. Sun J, Liu X, Gao H, Zhang L, Ji Q, Wang Z et al. Overexpression of colorectal cancer oncogene CHRD2 predicts a poor prognosis. *Oncotarget*. 2016;.

22. Kodach L, Bleuming S, Musler A, Peppelenbosch M, Hommes D, van den Brink G et al. The bone morphogenetic protein pathway is active in human colon adenomas and inactivated in colorectal cancer. *Cancer*. 2008;112(2):300-306.
23. Villalba M, Evans SR, Vidal-Vanaclocha F, Calvo A. Role of TGF- β in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. *Cell Tissue Res*. 2017;370(1):29–39.
24. Cyr-depauw C, Northey JJ, Tabariès S, Annis MG, Dong Z, Cory S. Breast Cancer Cell Migration and Invasion. 2016;36(10):1509–25.
25. Hardwick JC, Kodach LL, Offerhaus GJ, Van Den Brink GR. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(10):806–12.
26. Itoh N, Ohta H. Secreted bone morphogenetic protein antagonists of the Chordin family. *BioMolecular Concepts*. 2010;1(3-4).
27. Melton C, Reuter JA, Spacek D V., Snyder M. Recurrent somatic mutations in regulatory regions of human cancer genomes. *Nat Genet*. 2015;47(7):710–6.
28. Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(66):110635–49. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/22372>

29. Sereewattanawoot S, Suzuki A, Seki M, Sakamoto Y, Kohno T, Sugano S, et al. Identification of potential regulatory mutations using multi-omics analysis and haplotyping of lung adenocarcinoma cell lines. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–14.
30. Saifullah, Tsukahara T. Genotyping of single nucleotide polymorphisms using the SNP- RFLP method. *Biosci Trends* [Internet]. 2018;12(3):240–6. Available from: <http://10.0.21.206/bst.2018.01102%0Ahttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=asn&AN=130519593&lang=pt-br&site=ehost-live>
31. Akl E a, Doormaal FF Van, Barba M, Kamath G, Kim SY, Kuipers S, et al. Promoter polymorphisms of DNMT3B and the risk of colorectal cancer in Chinese: a case-control study : a Cochrane systematic review. 2008;10:1–10.
32. Neagoe A, Molnar A, Seicean A, Serban A et al. Risk factors for colorectal cancer: an Epidemiologic Descriptive Study of a Series of 333 patients. *Medicine and pharmacy*. [Internet] 2004[citado 2018 septiembre 22]. Available in: <http://www.jgld.ro/32004/187-193.pdf>
33. Tan C, Xiang D. *KRAS* mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World Journal of clinical oncology*. [Internet] 2012[citado 2018 septiembre 25]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3468848/>
34. Therkildsen C, Bergmann T, Schnack T, Ladelund S et al. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta oncologica*. [Internet] 2014[citado 2018 septiembre

25].Available in:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/0284186X.2014.895036>

35. Lan X, Zhou J, Chen Z, Wee-Joo C. *p53* mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of clinical oncology*. [Internet] 2015[citado 2018 septiembre 25]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4284363/>
36. Chen H, Zhou L, Wu X, Li R et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer. *Department of Urology*. . [Internet] 2016[citado 2018 septiembre 25]. Available in: <https://www.bioscience.org/2016/v21/af/4443/fulltext.htm>
37. G CYR, Corredor M, O LM. A Review of Polymorphisms in Genes Involved in the Development of Gastric Cancer. 2016; available http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v31n4/en_v31n4a09.pdf
38. Barras D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Libertas academia*. [Internet] 2015[citado 2018 septiembre 19]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4562608/pdf/bic-suppl.1-2015-009.pdf>
39. Strickler J, Christina W, Tanios S. Targeting BRAF in metastatic colorectal cancer: Maximizing molecular approaches. *Cancer treatment Reviews*. [Internet] 2015[citado 2018 septiembre 19]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737217301299>
40. Hamzeh K, Goode E, Sclafani F, Gerlinger M et al. Treatment and Survival Outcome of BRAF-Mutated Metastatic Colorectal Cancer: A Retrospective

Matched Case-Control Study. Clinical colorectal cancer. [Internet] 2017[citado 2018 septiembre 19]. Available in: [https://www.clinical-colorectal-cancer.com/article/S1533-0028\(17\)30069-5/pdf](https://www.clinical-colorectal-cancer.com/article/S1533-0028(17)30069-5/pdf)

41. Zhaol M, Mishra L, Dengl C. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. International Journal of Biological Sciences. [Internet] 2018[citado 2018 septiembre 19]; 14(2): 111-123. Available in: <http://www.ijbs.com/v14p0111.pdf>
42. Zhang B, Chen X, Singh K, Washington M et al. Loss of Smad4 in colorectal cancer induces resistance to 5-fluorouracil through activating Akt pathway. British Journal of Cancer. [Internet] 2014[citado 2018 septiembre 19]; 110, 946–957. Available in: <https://www.nature.com/articles/bjc2013789.pdf>
43. Chien-Hung Y, Bellon M, Nicot C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. Molecular cancer. [Internet] 2018[citado 2018 septiembre 19]. Available in: <https://www.molcancer.com/content/17/1/10>
44. Theiss AP, Chafin D, Bauer DR, Grogan TM, Baird GS. Immunohistochemistry of colorectal cancer biomarker phosphorylation requires controlled tissue fixation. PLoS One. 2014;9(11):1–6.
45. Akhooi S, Sun D, Von der Lehr N, Klotz K et al. FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. Cancer Research. [Internet] 2007[citado 2018 septiembre 19]. Available in: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/19/9006.long>
46. Barras D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. Libertas academia. [Internet] 2015[citado 2018 septiembre 19]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4562608/pdf/bic-suppl.1-2015-009.pdf>

47. Strickler J, Christina W, Tanios S. Targeting BRAF in metastatic colorectal cancer: Maximizing molecular approaches. *Cancer treatment Reviews*. [Internet] 2015[citado 2018 septiembre 19]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737217301299>
48. Hamzeh K, Goode E, Sclafani F, Gerlinger M et al. Treatment and Survival Outcome of BRAF-Mutated Metastatic Colorectal Cancer: A Retrospective Matched Case-Control Study. *Clinical colorectal cancer*. [Internet] 2017[citado 2018 septiembre 19]. Available in: [https://www.clinical-colorectal-cancer.com/article/S1533-0028\(17\)30069-5/pdf](https://www.clinical-colorectal-cancer.com/article/S1533-0028(17)30069-5/pdf)

ANEXOS

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Extracción de ADN.

Solución de lisis de glóbulos rojos (preparación 1000 ml)

1. Pesar 8.3 g de cloruro de amonio, 1 g de Bicarbonato de potasio y 2 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0
2. Mezclar los reactivos en un Erlenmeyer que contenga 800 ml de agua ultrapura utilizando un agitador magnético hasta homogenización completa. Transferir el contenido a una probeta y completar el volumen hasta 1000 ml con agua ultrapura. Almacenar a temperatura ambiente

Solución de lisis celular o de glóbulos blancos (preparación 1000 ml)

1. Medir 50 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 y 200 ml de SDS al 10 %.
2. Mezclar cuidadosamente los reactivos en un Erlenmeyer que contenga 600 ml de agua destilada utilizando un agitador magnético hasta homogenización completa. Evitar la formación de espuma.
3. Transferir el contenido a una probeta y completar el volumen hasta 1000 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

SDS 10 % (preparación para 200 ml)

1. Pesar 20 g de SDS
2. Mezclar cuidadosamente el reactivo en un Erlenmeyer que contenga 200 ml de agua destilada utilizando un agitador magnético hasta homogenización completa. Evitar la formación de espuma. Almacenar a temperatura ambiente

Solución Precipitante de Proteínas (preparación para 500 ml)

1. Pesar 385.4 g Acetato de Amonio
2. Mezclar el reactivo en un Erlenmeyer que contenga 100 ml de agua destilada utilizando un agitador magnético hasta homogenización completa. Puede requerir calentamiento ligero.

3. Transferir el contenido a una probeta y si es necesario completar el volumen hasta 500 ml con agua destilada.

TE 100X (preparacion 50 ml)

1. Medir 25 ml de tris-HCL 2M pH 7.5, 10 ml de EDTA 0.5 M y 15 ml de agua destilada
2. Mezclar las soluciones. Se debe realizar una solución debido a que la concentración de solución de trabajo es 1X, para ello Se agrega 1 ml de la solución preparada (100X) a 99 ml de agua destilada.

EDTA 500mM pH 8.0

1. Pesar 9,31g de Ácido etilendiamonitetracético, sal disódica dihidrato (PM: 372,24 g/mol)
2. Pre-disolver en 35ml de agua destilada.
3. Ajustar a pH 8.0 con NaOH sólido.
4. Completar a 50ml con agua destilada

Tris-HCL 2M pH 7.5 (preparación 500 ml)

1. Pesar 121.1 g de Trizma
2. Mezclar el reactivo en un Erlenmeyer que contenga 350 ml de agua destilada utilizando un agitador magnético hasta homogenizar.
3. Titular con HCL 1M para ajustar el pH a 7.5
4. Transferir el contenido a una probeta y completar el volumen hasta 500 ml con agua destilada.

Proteinasa K 50 µg/µl

1. Disolver 100 mg de Proteinasa K liofilizada en 20 ml de agua estéril.

2. Realizar alícuotas de 1ml y congelar a -20 °C.



**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL
ROSARIO ESCUELA DE MEDICINA Y
CIENCIAS DE LA SALUD**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y GENÓMICA
(CIGGUR)**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN
EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Genotipificación del promotor de *CHRD2* para la búsqueda de variantes potencialmente relacionadas con la etiología del cáncer colorrectal

usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Centro de Investigación en Genética y Genómica (CIGGUR) de la Universidad del Rosario y el Hospital Universitario Mayor Méderi - con la participación de:

Dr. PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD: Médico e Investigador, genetista molecular.

Dr. CARLOS FIGUEROA: Médico Jefe del Servicio de Colon y Recto - Hospital Universitario Mayor Méderi.

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- (a) La participación en este estudio es totalmente voluntaria y no implica ningún costo para el individuo. Los materiales y reactivos del estudio serán financiados por el proyecto de investigación.
- (b) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- (c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

- (d) La participación en el estudio no tendrá repercusiones en su atención clínica, ya que el proyecto planteado no implica modificaciones en las aproximaciones diagnósticas o terapéuticas.
- (e) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados por el médico tratante. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted, el equipo investigador y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.

De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (“Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”), este estudio puede ser clasificado como una “Investigación con riesgo mínimo”. Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social colombiano (antiguo Ministerio de Salud), la ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente

con: PAUL LAISSUE

Centro de Investigación en Genética y Genómica
(CIGGUR). Facultad de Medicina.

Universidad del Rosario. Tel (57-1)2970200 (Ext. 3314)

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO:

Usted como paciente está afectado por una forma frecuente de cáncer. Esta enfermedad se presenta por la acumulación de distintas alteraciones. Una de ellas se relaciona con características y cambios genéticos del tejido afectado

(el colon en este caso). El propósito del estudio en el que Usted de manera voluntaria va a participar se enfoca en el análisis de algunos de estos cambios genéticos (gen *CHRD2*) para poder entender mejor su enfermedad. Los resultados no alterarán el curso de su enfermedad, no modificarán el diagnóstico y ni el tratamiento.

PROCEDIMIENTO:

Luego de haber tomado la muestra de sangre y de tejido colorrectal (tumoral y adyacente) para obtención de ADN cómo se estipulo en el consentimiento informado del proyecto autorización para la toma de muestras y realización de estudios de laboratorio adicionales”, se procederá, en el laboratorio del Centro de Investigación en Genética y Genómica de la Universidad del Rosario, a procesar la muestra. Se extraerán los ácidos nucleicos (ADN y ARN total) y las proteínas que permitan efectuar distintos tipos de análisis para analizar las regiones codificantes del gen *CHRD2* y su expresión en el tejido colorrectal (tumoral y adyacente).

En caso de obtener un resultado que pudiera explicar genéticamente la enfermedad, en el mismo laboratorio, se realizarán pruebas para su validación.

RIESGOS E INCOMODIDADES:

La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento. El análisis de la muestra no implica riesgo para su salud ni efectos contaminantes para el medio ambiente. **La utilización del ADN genómico o el ARN humano no implica a la fecha de hoy ningún riesgo para el donante y/o quienes lo manipulan.**

BENEFICIOS ADICIONALES:

Este estudio permitirá en algunos casos realizar consejería genética. La consejería genética consiste en efectuar una consulta médica en el que se le informará, si es el caso, sobre hallazgos que pudieran ser útiles para una mejor comprensión de su enfermedad. De esta manera usted tendrá la opción de autorizar o no a que se realice la consejería genética.

Debe aclararse que este estudio no arrojará resultados directos sobre el tratamiento, por lo cual no se ofrecerá esta posibilidad a los participantes. Además, no recibirá un incentivo monetario, porque el estudio, ni equipo de investigación tiene intereses comerciales o financieros de ningún tipo.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES:

Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

El análisis genómico a partir de muestras de ADN y ARN humanas provenientes de un banco de dicho material biológico no implica riesgos para el paciente.

MANEJO DE RESULTADOS:

Los resultados del estudio se informaran a los participantes de manera oral y escrita. Se efectuará para tal fin una consulta con los especialistas clínicos y los responsables del análisis molecular. Se informará entonces sobre la implicación del gen *CHRD2* en el cáncer colorrectal de la siguiente forma: **A)** No es posible determinar si el gen *CHRD2* o está implicado en la causa de su enfermedad. **B)** El gen *CHRD2* no está implicado en la causa de su enfermedad. **C)** El gen *CHRD2* tiene una probabilidad baja de estar asociado al origen de su enfermedad **D)** El gen *CHRD2* una alta probabilidad de estar asociado a la

causa de su enfermedad. En este último caso se realizará consejería genética al paciente.

AUTORIZACION:

Por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez termine el estudio. SI ___ NO ___

Por favor marque su decisión con respecto a la consejería genética:

Deseo participar en la consulta médica de consejería genética si mi caso fuese seleccionado para esta actividad. SI ___ NO ___

Habiendo sido enterada(o) del contenido del presente estudio, sé que mi participación en este estudio permitirá realizar análisis posteriores que ayuden al entendimiento de las causas genéticas de la enfermedad que padezco.

Yo, _____ con documento de identificación

número: _____ de _____, acepto voluntariamente

participar en el estudio:

Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Fecha: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Firma: _____ C.C.:

Firma: _____

C.C.:

Dirección:

Teléfono:

Testigo 1

Firma:

C.C.:

Dirección:

Teléfono:

Testigo 2

El Comité de Ética en Investigación de la Universidad del Rosario
avala la ejecución del presente proyecto de investigación.

Puede comunicarse con nosotros en caso de tener alguna inquietud
o si desea hacernos algún comentario:

Dra. Diana Rocío Bernal, Presidente CEI - Sala de Ciencias Sociales: diana.bernalc@urosario.edu.co

Dr. Juan Guillermo Pérez, Secretario Técnico CEI; Presidente (E) – Sala de Ciencias de la Salud:
juangu.perez@urosario.edu.co

Johanna Mayerly González, Auxiliar Administrativa CEI: comite.etica@urosario.edu.co



Universidad del
Rosario

Calle 12C No. 6-25. Bogotá D.C. Colombia
Teléfono: (+57)(1) 2970200. Extensión: 3295