



Genotipificación de la región promotora de *CHRD12* para la búsqueda de variantes potencialmente relacionadas con la etiología del cáncer colorrectal

Nasly Yurany Roa Torres

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C
2019

Genotipificación de la región promotora de *CHRD* para la búsqueda de variantes potencialmente relacionadas con la etiología del cáncer colorrectal

Martha Lucía Posada Buitrago, PhD
Docente facultad de ciencias de la salud
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Asesora interna

Paul Laissue Hormaza, MD, MSc, PhD, HDR
Líder funcional del Centro de investigaciones en genética y genómica de la
universidad del Rosario facultad de medicina

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C
2018

INTRODUCCIÓN

Cáncer colorrectal

Características generales

Acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en las células epiteliales del colon

Enfermedad multifactorial

(T. Armaghany, et al.,2012)

-
-
-

Signos o síntomas

Sangrado rectal

Dolor abdominal

Perdida de peso

Diarrea o estreñimiento

746.000 casos
(10% de todos los tipos de cáncer)



Tasa de incidencia de 20,6 por cada 100.000 habitantes

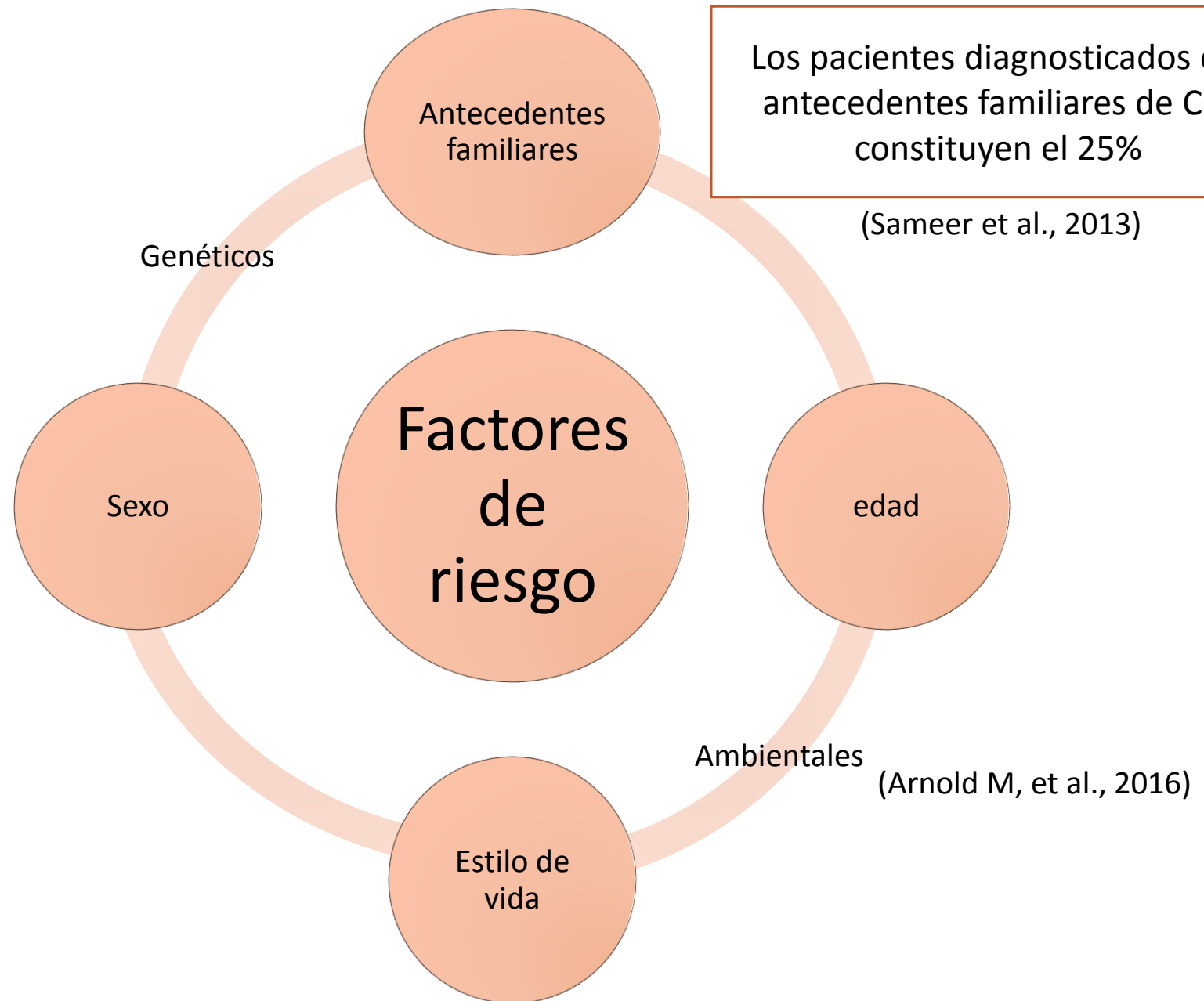
614.000 casos
(9,2% de todos los tipos de cáncer)



Tasa de incidencia de 14,3 por cada 100.000 habitantes

(Kolligs.,2016)

(Kuipers et al.,2015)

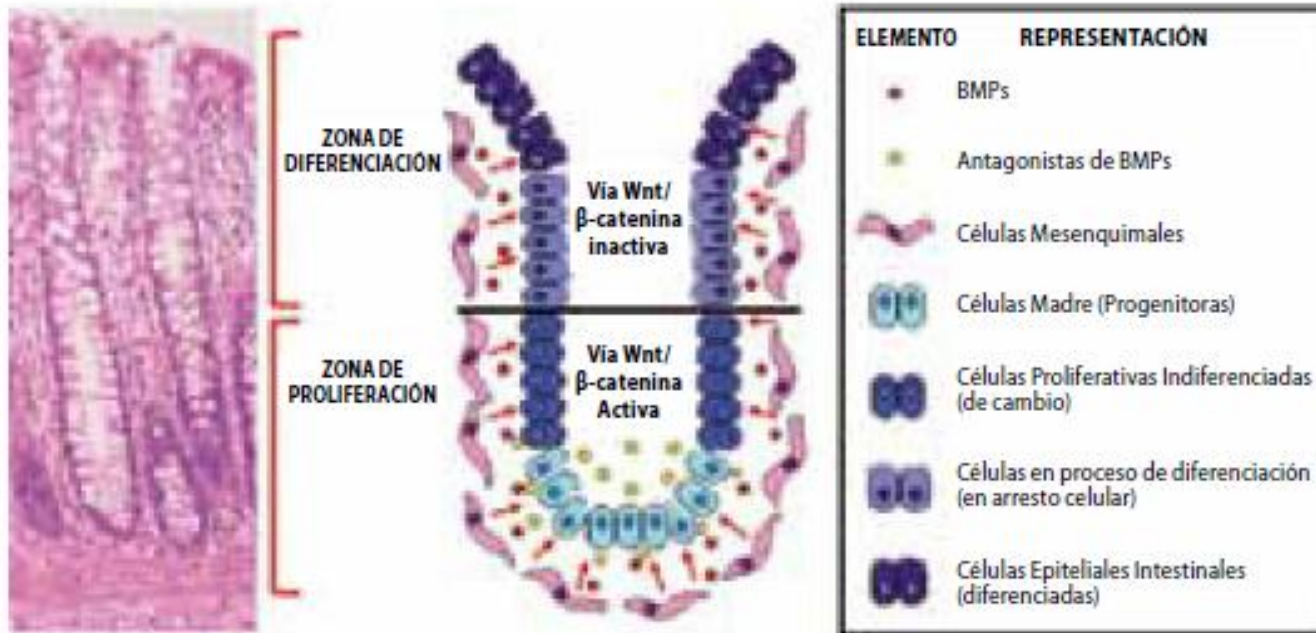


Los pacientes diagnosticados con antecedentes familiares de CCR constituyen el 25%

El 80% de los casos de CCR son esporádicos

(Kuipers et al., 2015)

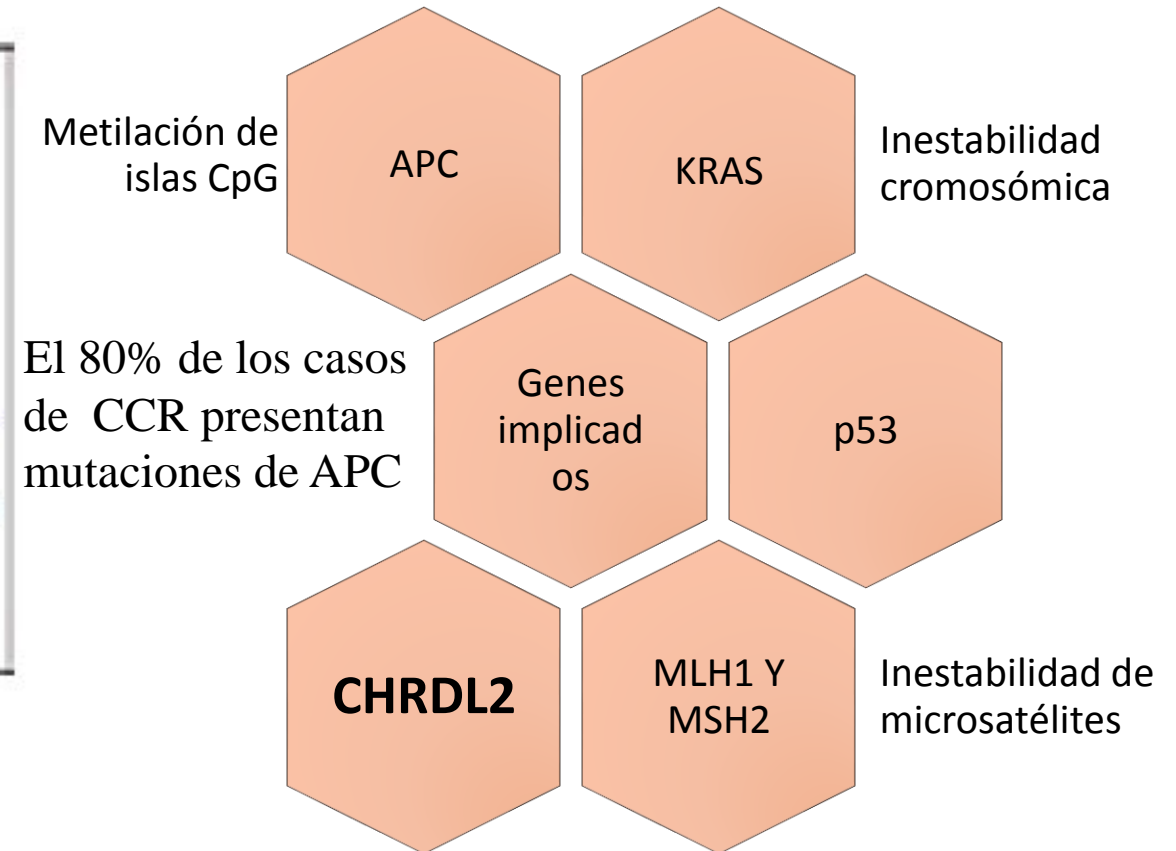
Fisiopatología molecular



(Sanabria, et al.,2012)

Las anomalías de la vía WNT caracterizan a la mayoría de los cánceres colorrectales esporádicos.

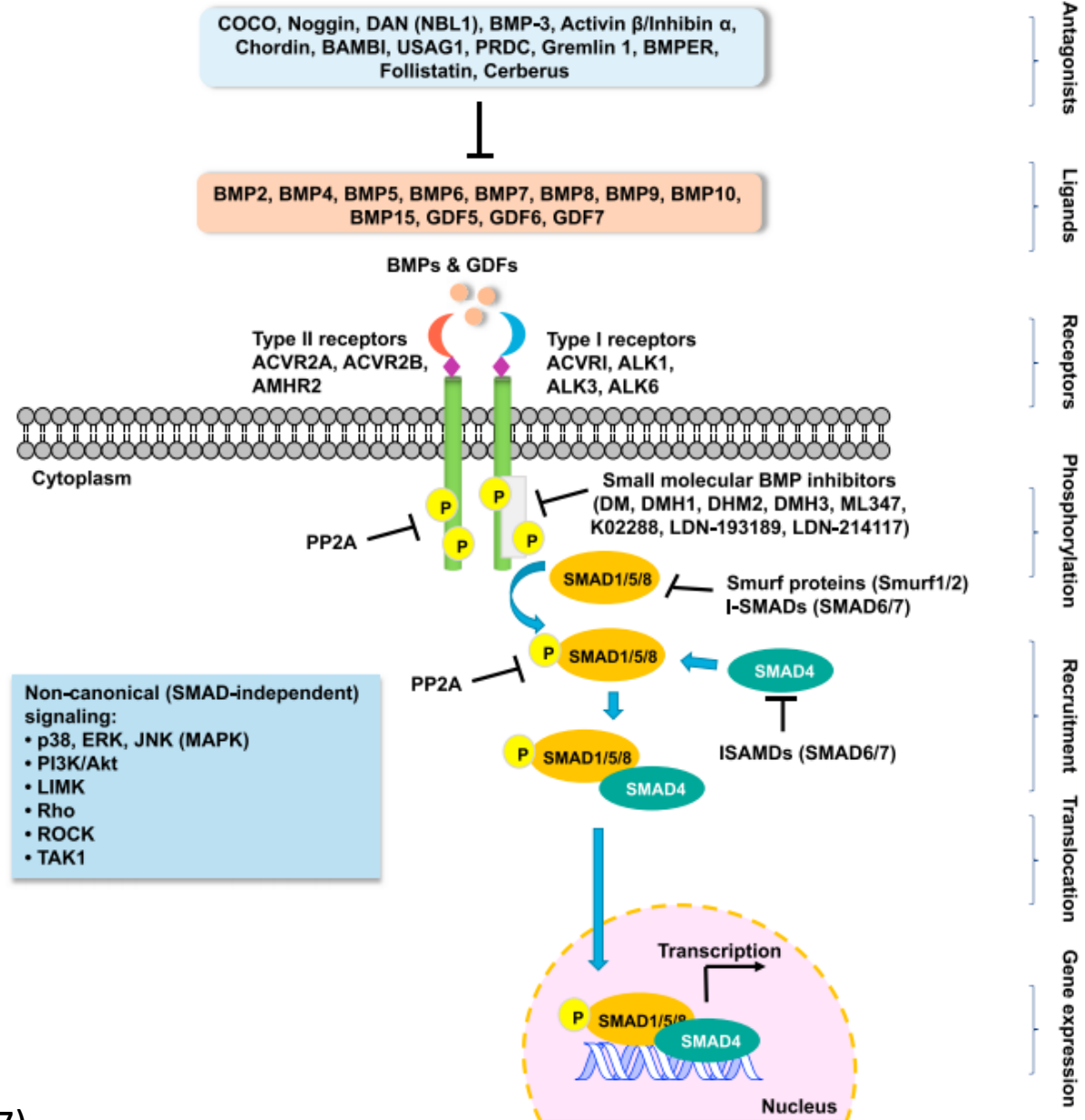
(Muller, et al.,2016)



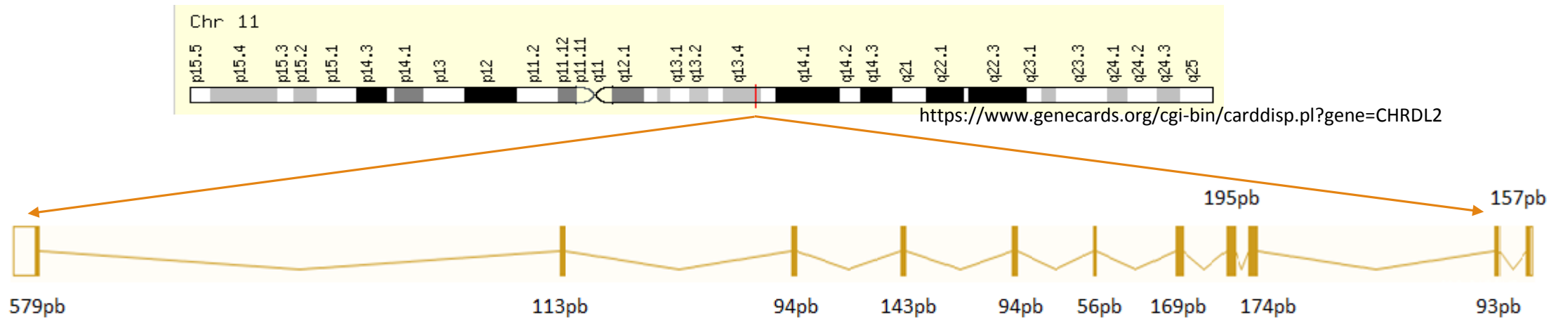
Fisiopatología molecular de *CHRD*L2

CHORDIN LIKE 2 inhibe la señalización de BMPs, interactuando con estas proteínas e impidiendo su unión a receptores específicos BMPs

(Jian Sun, et al., 2017)



Oncogén *CHRD*L2



Exones	12
Pares de bases	1867

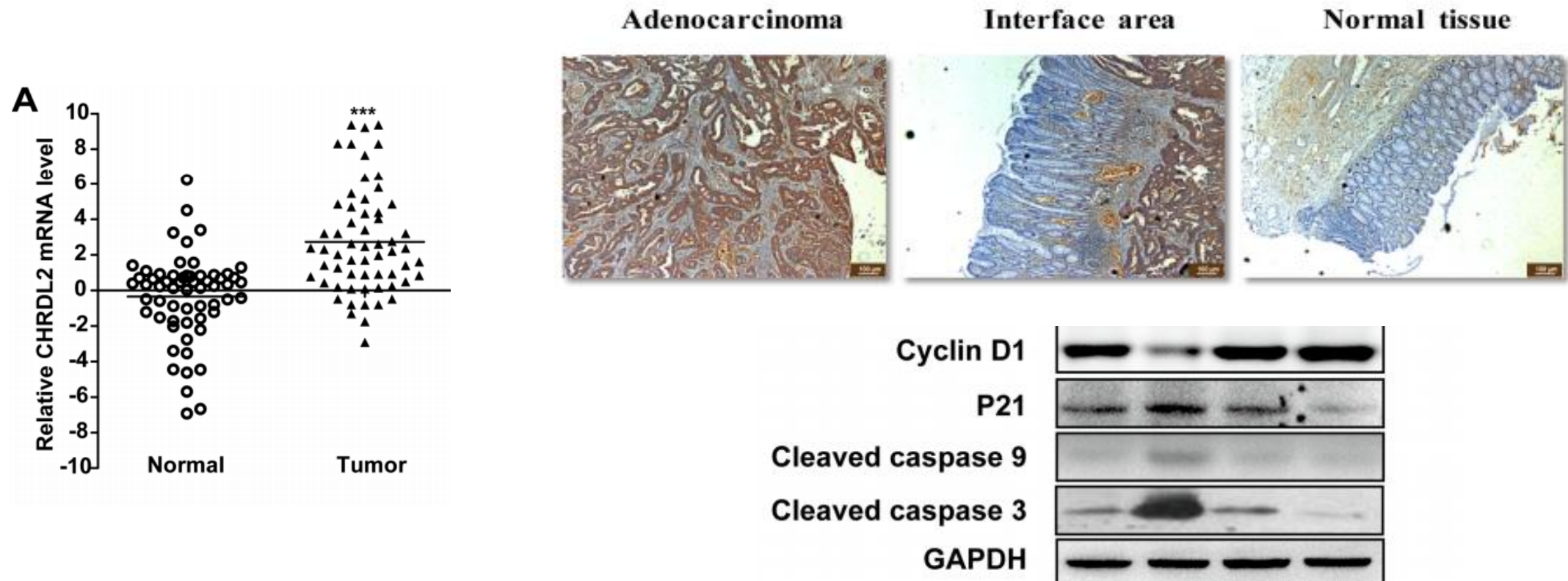


*CHRD*L2 codifica para la proteína CHORDIN-LIKE 2, cuya ubicación es extracelular y citoplasmática.

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG0000054938;r=11:74696429-74731385;t=ENST00000376332

CHRD2 y el cáncer colorrectal

Overexpression of colorectal cancer oncogene CHRD2 predicts a poor prognosis



(Sun, et al., 2017)

OBJETIVOS

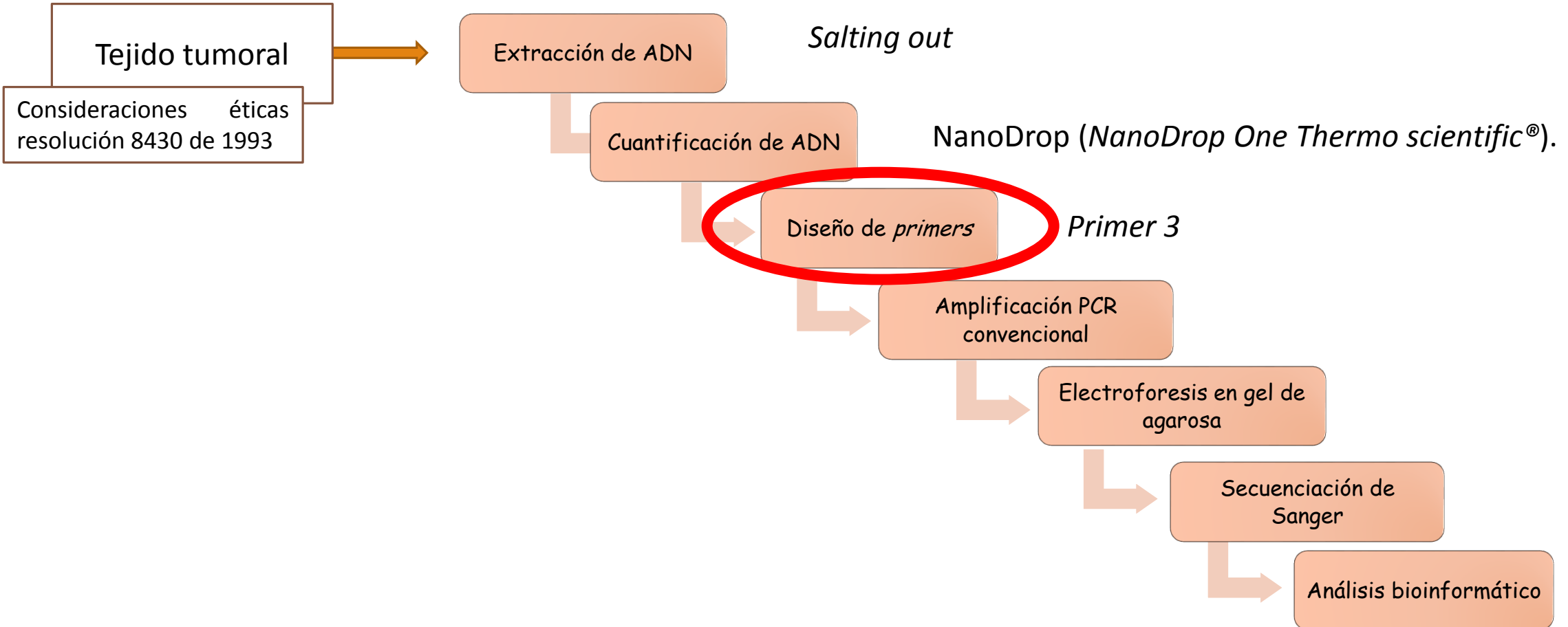
GENERAL

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.

METODOLOGÍA



Diseño de *primers*

Transcript: CHRDL2-203 ENST00000376332.7

Description: chordin like 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:[HGNC:24168](#)]

Gene Synonyms: BNF1

Location: [Chromosome 11: 74,696,429-74,731,385](#) reverse strand.

About this transcript: This transcript has [11 exons](#), is annotated with [24 domains and features](#), is associated with [8427 variations](#) and maps to [383 oligo probes](#).

Gene: This transcript is a product of gene [ENSG00000054938](#) [Hide transcript table](#)

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq	Flags
CHRDL2-203	ENST00000376332.7	1867	429aa	Protein coding	CCDS60893	Q6WN34	NM_001278473 NM_001304415 NP_001265402 NP_001291344	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P1

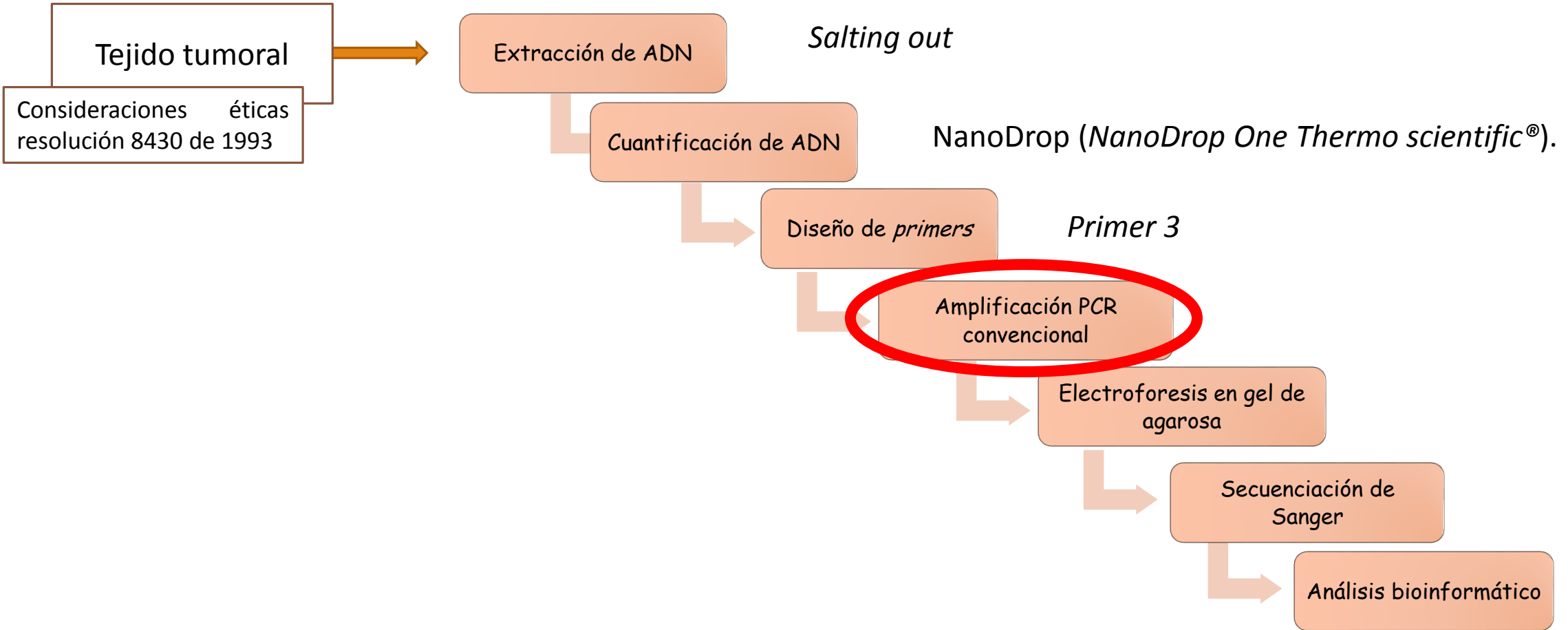
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000054938;r=11:74696429-74731385;t=ENST00000376332

Transcrito utilizado para el diseño de *primers*

Primers de amplificación del fragmento de 595pb del promotor de *CHRDL2*

Nombre del Primer	Secuencia 5`3`	Amplicon esperado
h_CHRDL2prom_-557_F_KpnI_pgl4.22 Primer forward	GCCGGTACCGAGCGCGGCCTGAAGCCCTTG	595pb
h_CHRDL2prom_38_R_HindIII_pgl4.22 Primer reverse	GGGAAGCTTCCCAGCAAGGAGGAGAGGACCC TC	

METODOLOGÍA



PCR convencional

Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de PCR

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

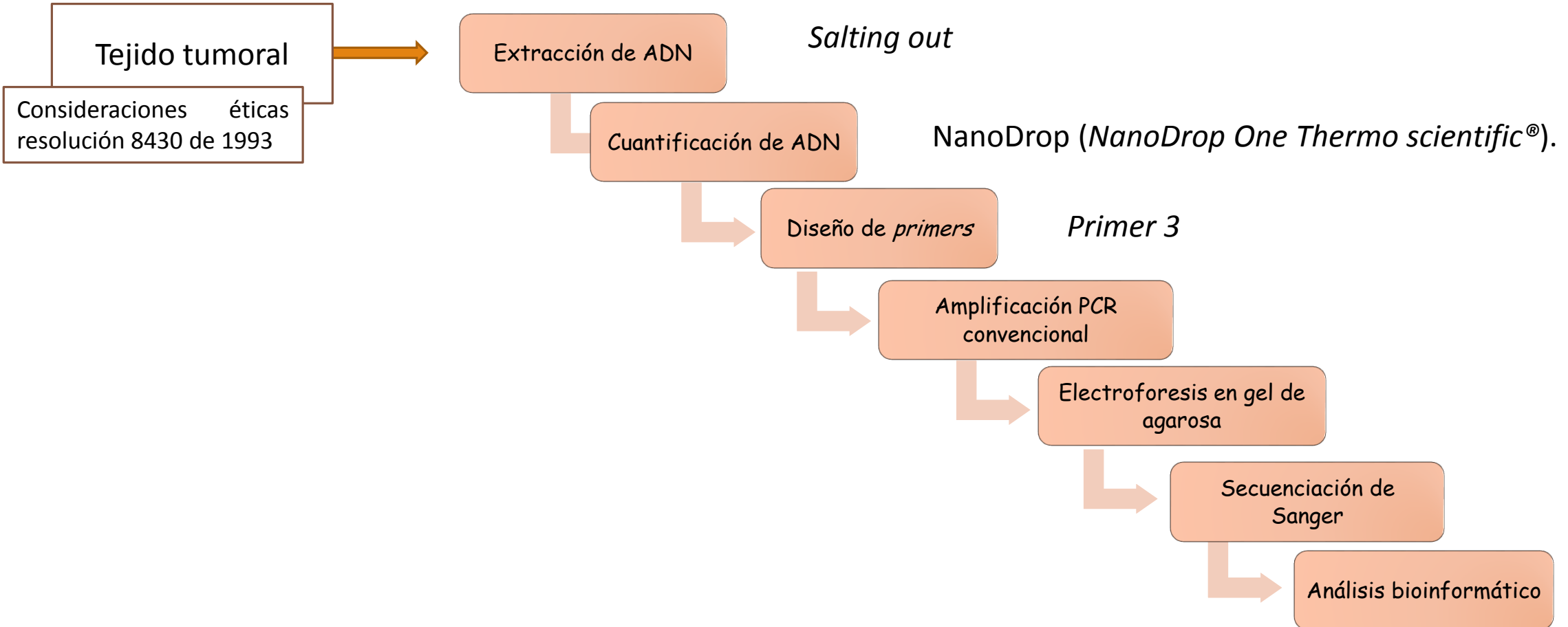
Realizado por: Nasly Roa Torres

Condiciones de la PCR

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	

Realizado por: Nasly Roa Torres

METODOLOGÍA



Resultados y discusión

Extracción de ADN y datos demográficos

ADN de tejido tumoral en 45 pacientes  314 ng/μL a 2963 ng/μL

La relación
260/280 mostro
un rango de
1.80 hasta 2.05

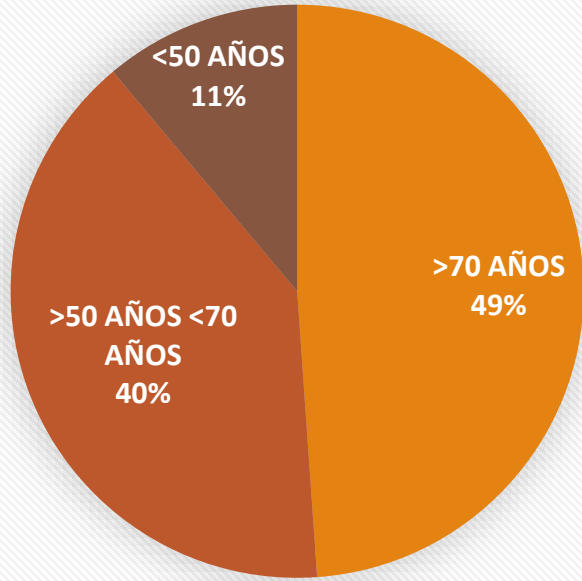


la relación
260/230 mostro
un rango de
variación entre
1.50 a 2.24



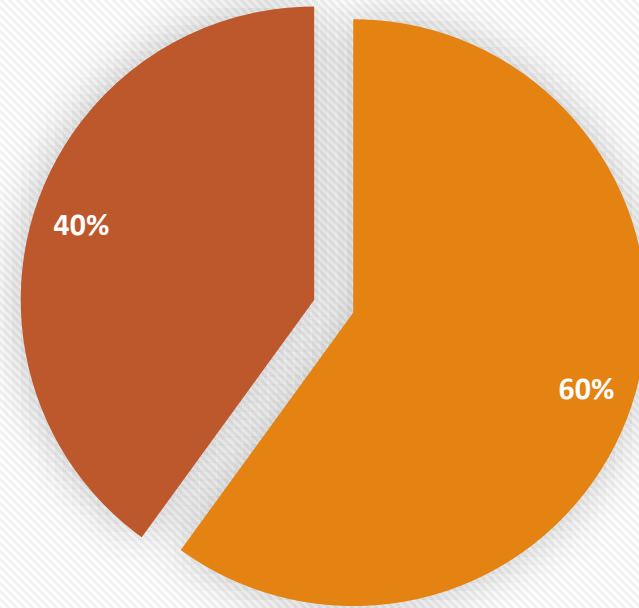
ADN ACEPTABLE

Edad



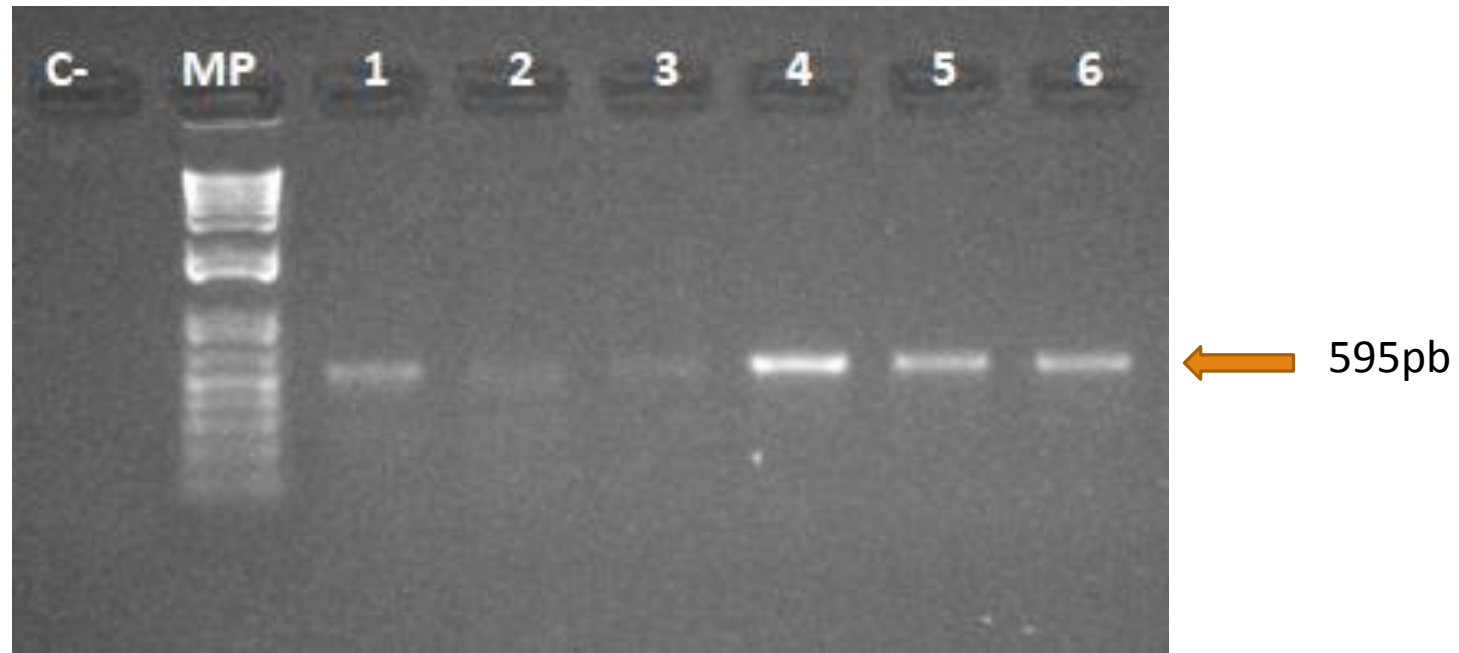
Realizado por: Nasly Roa Torres

Sexo



Realizado por: Nasly Roa Torres

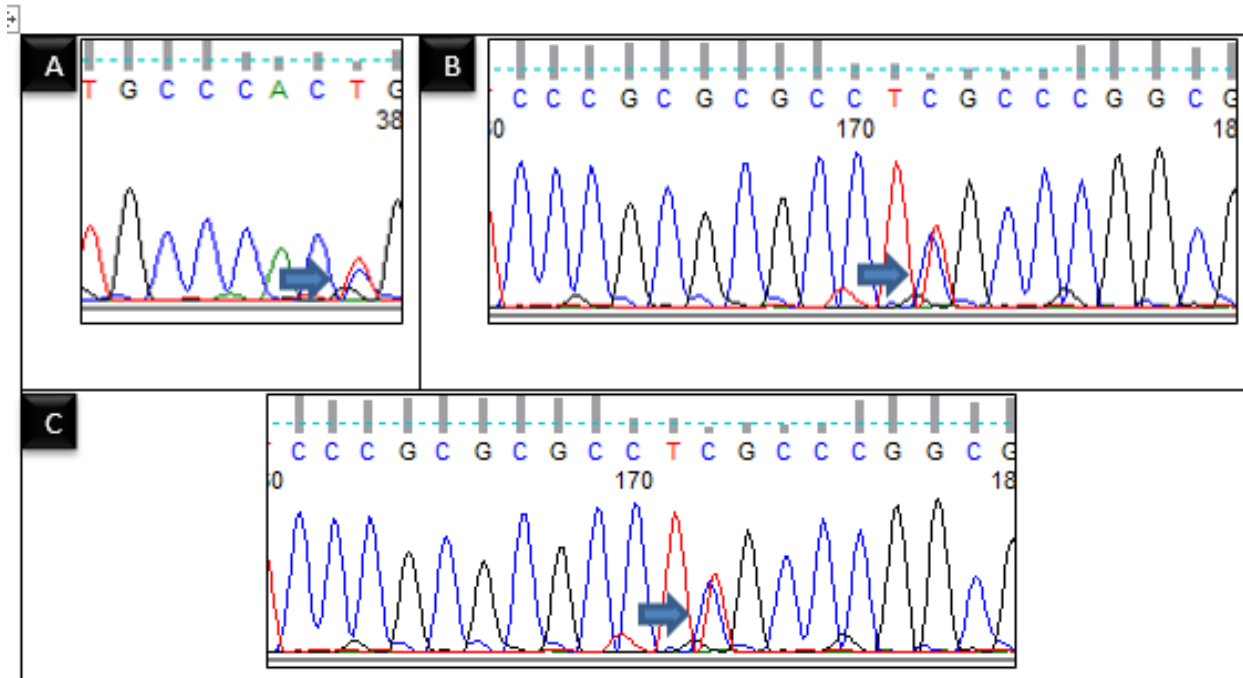
Electroforesis en gel de agarosa



Electroforesis en gel de agarosa del fragmento de 595pb de la región promotora de *CHRD12*. *CIGGUR*

Secuenciación de Sanger y análisis bioinformático

Variantes heterocigotas tejido tumoral 3

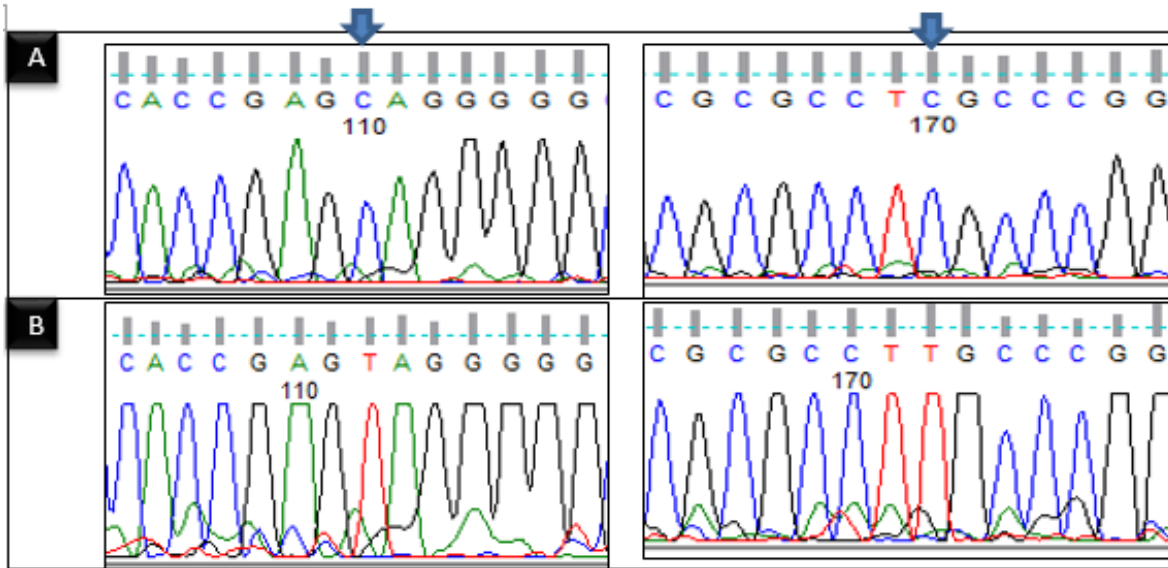


```

CHRDL2_PROMWT      GCCGCCGCGCCGCCGCTGCTGGGACCGCCGCCCGCCGCGGCCAGGCCCGCGGC
CHRDL2_PROMTT3ALFA -----GC
                    **
                    ↓
CHRDL2_PROMWT      CCGACCCCGAGCCACCGAGCAGGGGGCGCCGCGCCTCTAGCCCGCGCCCGCAACA
CHRDL2_PROMTT3ALFA CCGACCCCGAGCCACCGAGTAGGGGGCGCCGCGCCTCTAGCCCGCGCCCGCAACA
                    *****
CHRDL2_PROMWT      CCCGCTGGTCCC GCGCCTCGCCGGCGCTGCGCGCTCGGCAGACGCCGGTCTCTCCC
CHRDL2_PROMTT3ALFA CCCGCTGGTCCC GCGCCTCGCCGGCGCTGCGCGCTCGGCAGACGCCGGTCTCTCCC
                    *****
CHRDL2_PROMWT      TGCTTTCCTCTCTCCCTCTCACCTTCCCCCTTCTTTGATCGCCTCTCCCTTCTGCT
CHRDL2_PROMTT3ALFA TGCTTTCCTCTCTCCCTCTCACCTTCCCCCTTCTTTGATCGCCTCTCCCTTCTGCT
                    *****
CHRDL2_PROMWT      GGACCTTCCTTCGTCTCTCCATCTCTCCCTCCTTTCCCGCGTCTCTTTCCACCTTCT
CHRDL2_PROMTT3ALFA GGACCTTCCTTCGTCTCTCCATCTCTCCCTCCTTTCCCGCGTCTCTTTCCACCTTCT
                    *****
                    ↓
CHRDL2_PROMWT      CTTCTCCACCTTAGACCTCCCTTCTGCCCTCCTTCTGCCCACCGTGCTTCTGG
CHRDL2_PROMTT3ALFA CTTCTCCACCTTAGACCTCCCTTCTGCCCTCCTTCTGCCCACCTG-----
                    *****
CHRDL2_PROMWT      CCTTCTCCGACCCCGCTCTAGCAGCAGACCTCCTGGGGTCTGTGGGTTGATCTGTGGCC
CHRDL2_PROMTT3ALFA -----
    
```

Variantes homocigotas tejido tumoral 43

Secuencia WT



Secuencia TT43

```

PROMCHRDL2_WT      CCGACCCGAGCCCACCGAGCAGGGGGCGCCGGCCGCTCTAGCCCGCGCGCCCGCAACA
PROMCHRDL2_TT43ALFA -----GAGCCCACCGAGTAGGGGGCGCCGGCCGCTCTAGCCCGCGCGCCCGCAACA
*****

PROMCHRDL2_WT      CCGGCTGGTCCCGCGCGCCTCGCCGCGCTGCGCGCTCGGCAGACGCCGGTCTCTCC
PROMCHRDL2_TT43ALFA CCGGCTGGTCCCGCGCGCCTCGCCGCGCTGCGCGCTCGGCAGACGCCGGTCTCTCC
*****

PROMCHRDL2_WT      TGCTTTCTCCTCCTCTCCCTCTCACCCTCCCTTTCTTTGATCGCCTCTCCCTCTGCT
PROMCHRDL2_TT43ALFA TGCTTTCTCCTCCTCTCCCTCTCACCCTCCCTTTCTTTGATCGCCTCTCCCTCTGCT
*****

PROMCHRDL2_WT      GGACCTTCCTTCGTCTCTCCATCTCTCCCTCCTTCCCGCGTTCCTTTCCACCTTCT
PROMCHRDL2_TT43ALFA GGACCTTCCTTCGTCTCTCCATCTCTCCCTCCTTCCCGCGTTCCTTTCCACCTTCT
*****

PROMCHRDL2_WT      CTTCCTCCCACCTTAGACCTCCTTCTGCCCCTCTTCCGCCCACCGCTGCTTCTGG
PROMCHRDL2_TT43ALFA CTTCCTCCCACCTTAGACCTCCTTCTGCCCCTCTTCCGCCCACCGCTGCTTCTGG
*****

PROMCHRDL2_WT      CCCTTCTCCGACCCCGCTCTAGCAGCAGACCTCCTGGGGTCTGTGGGTGATCTGTGGCC
PROMCHRDL2_TT43ALFA CCCTTCTCCGACCCCGCTCTAGCAGCAGACCTCCTGGGGTCTGTGGGTGATCTGTGGCC
*****

PROMCHRDL2_WT      CCTGTGCCTCCGTGTCCTTTTCGTCTCCCTTCCCGACTCCGCTCCCGGACCAGCGGC
PROMCHRDL2_TT43ALFA CCTGTGCCTCCGTGTCCTTTTCGTCTCCCTTCCCGA-----
*****

PROMCHRDL2_WT      CTGACCTGGGGAAAGGATGGTTCCCAGGAGGGTCCCTCTCCTCCTTGTGGGACTCG
PROMCHRDL2_TT43ALFA -----
    
```

	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
Total de secuencias que presentan en polimorfismo	7/45 Heterocigoto: 6 pacientes Homocigoto: 1 pacientes	35/45 Heterocigoto: 20 pacientes Homocigoto: 15 pacientes	33/45 Heterocigoto: 20 pacientes Homocigoto: 13 pacientes

8 PACIENTES DE 45 ANALIZADOS NO PRESENTARON POLIMORFISMOS

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.

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.

GRACIAS