



Genotipificación de la región codificante de *SPOCK1* en el cáncer colorrectal: hacia la descripción de nuevos marcadores moleculares de la enfermedad

Orlando Alfredo Pineda Arrieta

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 codificante de *SPOCK1* en el cáncer colorrectal: hacia la descripción de nuevos marcadores moleculares de la enfermedad

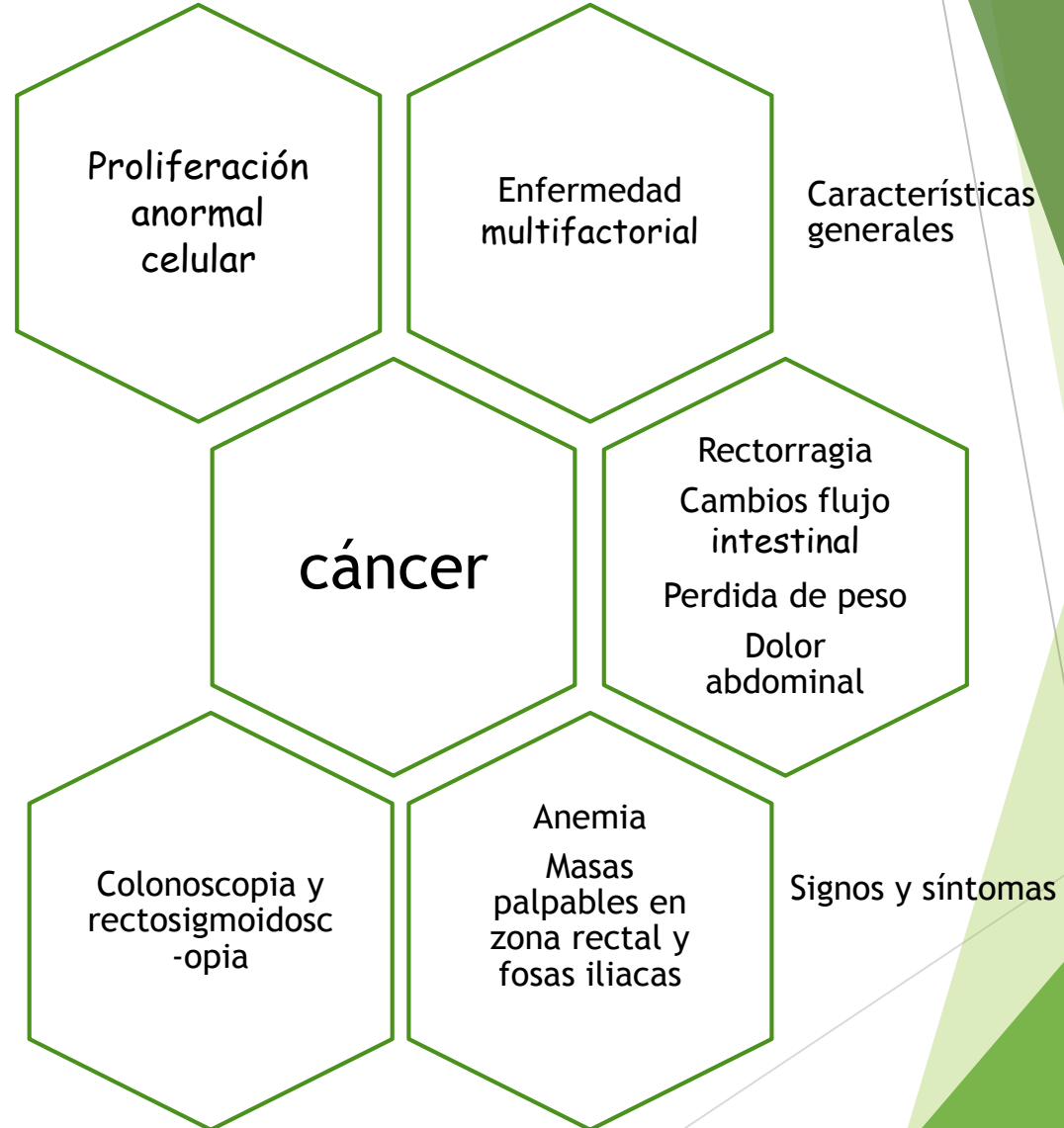
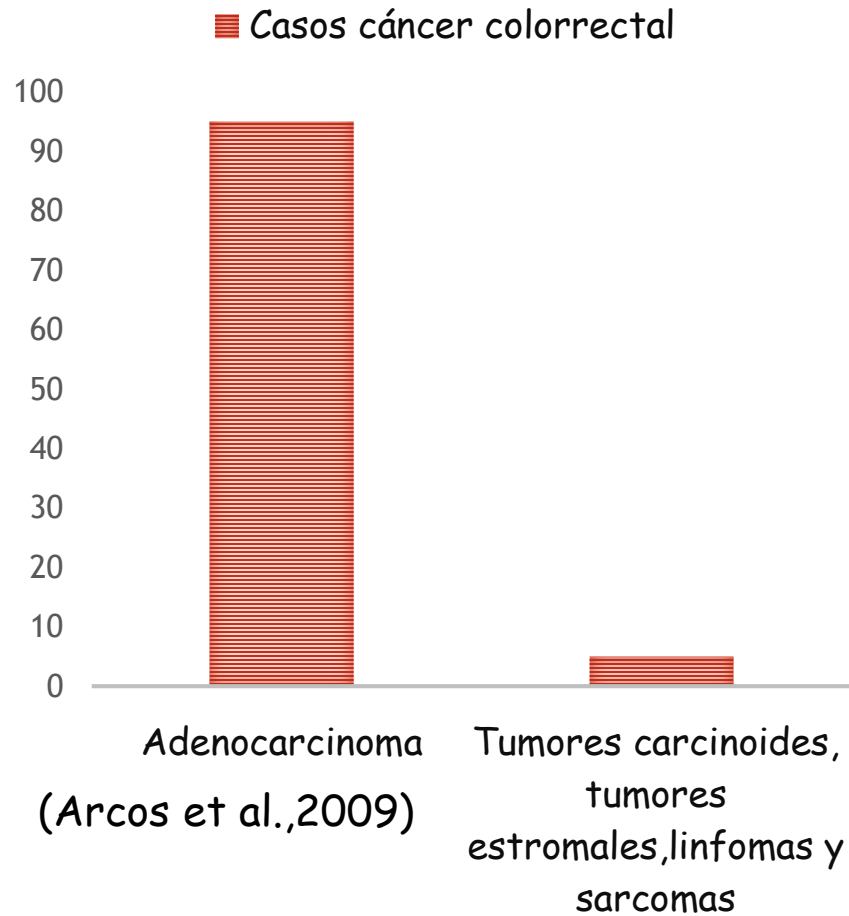
Paul Laissue Hormaza, MD, MSc, PhD, HDR
Líder funcional del Centro de investigaciones en genética y genómica de la universidad del Rosario facultad de medicina

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

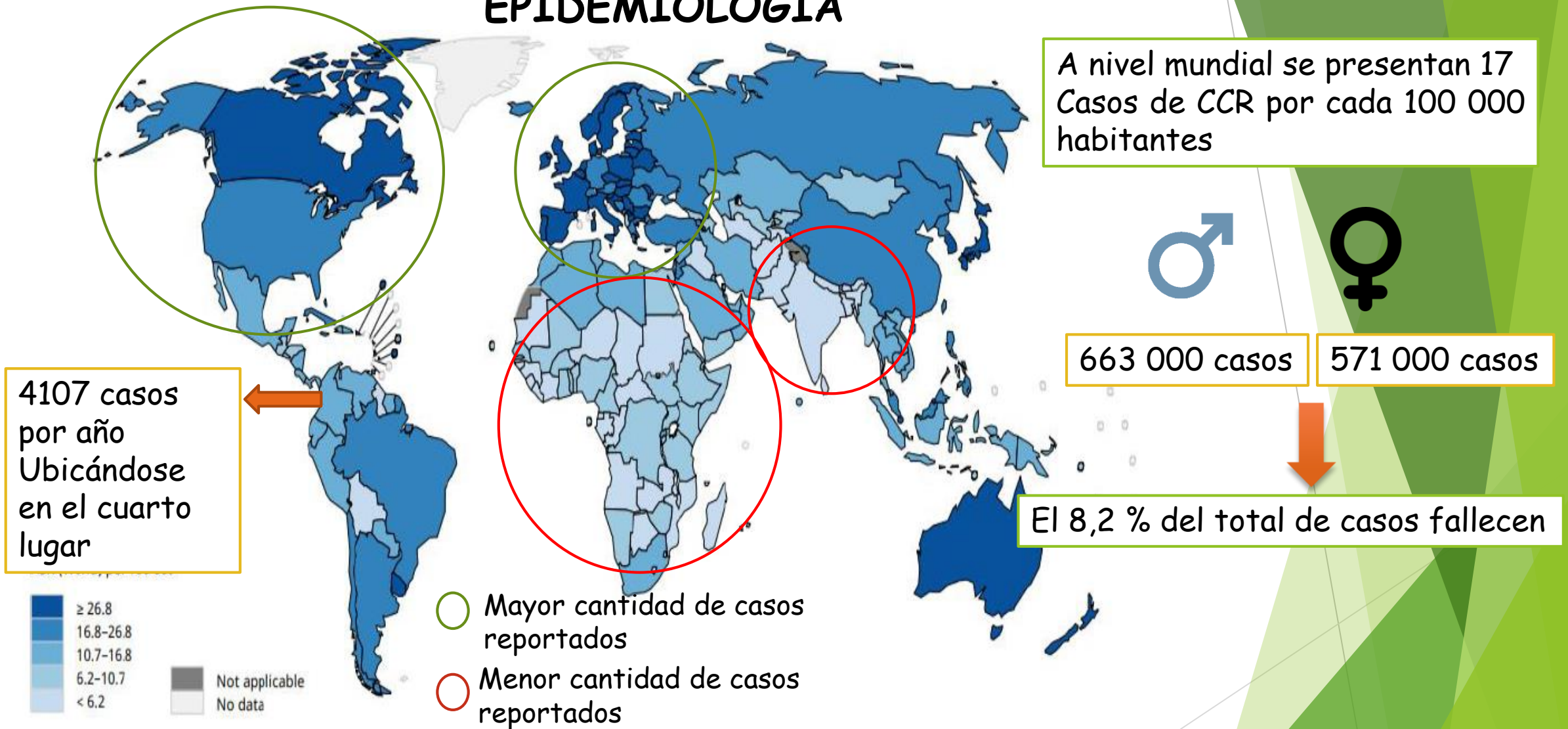
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C
2018

INTRODUCCIÓN

CÁNCER COLORRECTAL

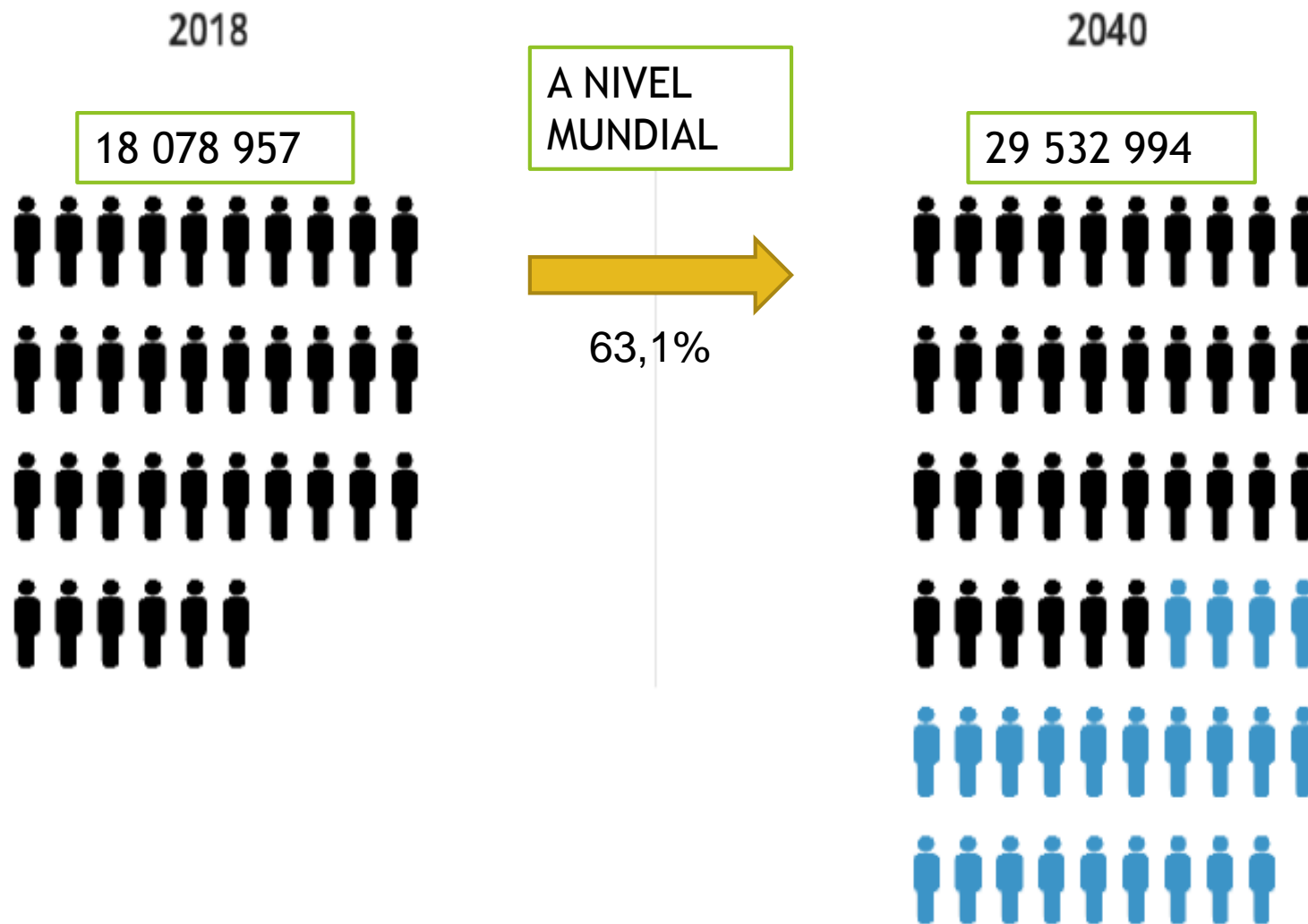


EPIDEMIOLOGÍA



Tasas de incidencia de cáncer colorrectal en hombres y mujeres a nivel mundial. Fuente *World health organization, International Agency For Research on Cancer globocan, 2018*

EPIDEMIOLOGÍA



casos estimados a Fuente: *2040 World health organization, International Agency for Research on Cancer globocan, 2018.*

CAUSAS Y FACTORES DE RIESGO

Edad

3% de los casos antes de los 40 años y el 97% después de los 40 años (Ruíz et al., 2016)

Herencia

5 a 10% del total de casos son hereditarios, (Sánchez et al., 2018)

Exposiciones

A sustancias químicas (Jurado et al., 2015)

Infecciones

Bacteroides fragilis y cepas productoras de colibactina. (Tolosa et al., 2018)

Radiaciones

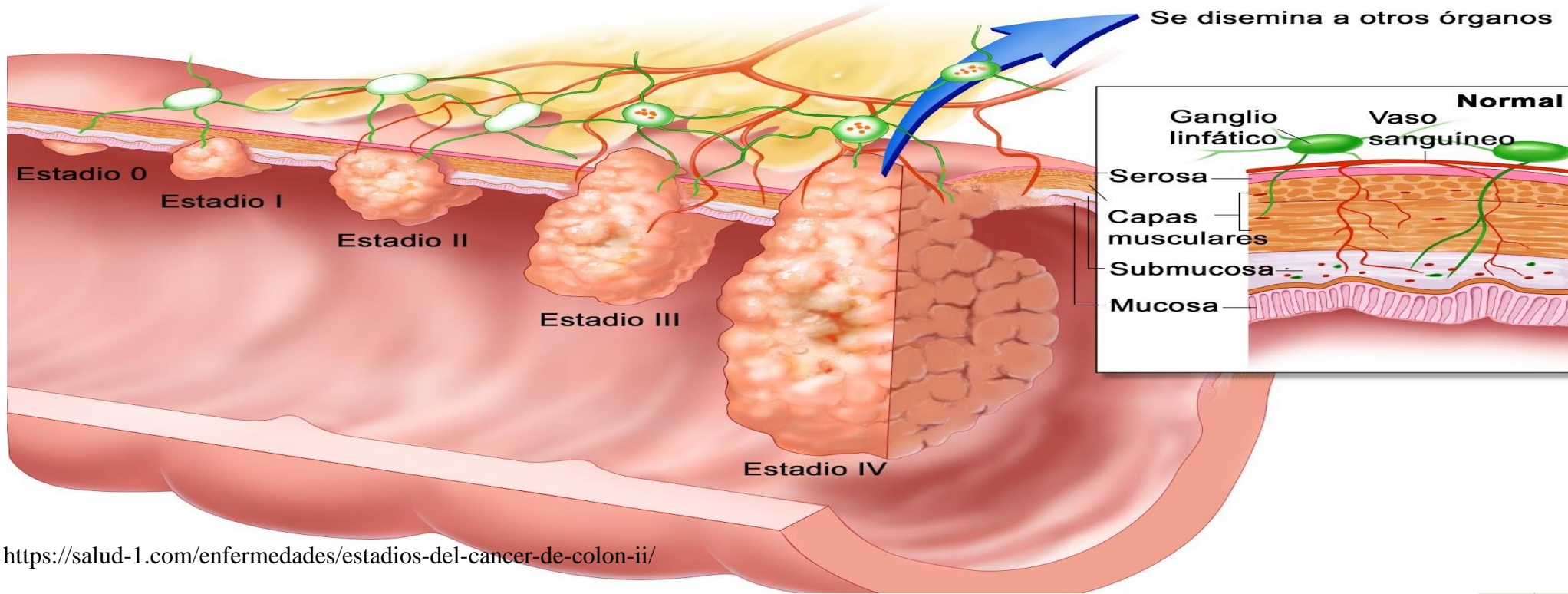
Afectan directamente el material genético. (Sánchez et al., 2018)

Hábitos de vida

Consumo de alcohol, dieta, sedentarismo, entre otros. (Campos et al., 2016)

Campos F. Colorectal cancer in young adults: A difficult challenge. World Journal of clinical oncology.[Internet] 2016[citado 2018 septiembre 22].Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5537173/>
Ruiz R, Taxa L, Ruiz E, Mantilla R et al. Colorectal cancer in the young: clinicopathologic features and prognostic factors from a cancer institute in Peru.Revista de gastroenterología del peru.[Internet] 2016[citado 2018 septiembre 22].Available in: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292016000100001
Campos F. Colorectal cancer in young adults: A difficult challenge. World Journal of clinical oncology.[Internet] 2016[citado 2018 septiembre 22].Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5537173/>

CLASIFICACIÓN Y ESTADIOS



T :La extensión del tumor

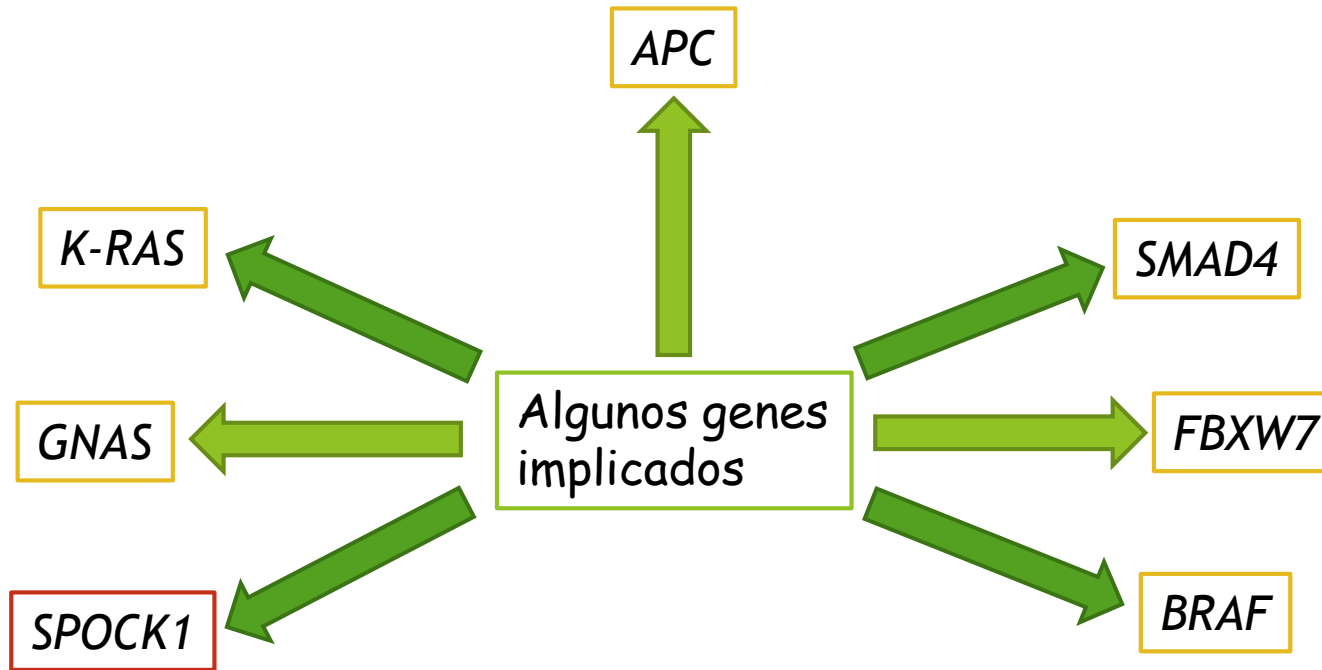
N :la afectación o no de los ganglios

M :la ausencia o presencia de metástasis

(Akkoca et al., 2014)

Akkoca A, Yanik S, Ozdemir Z, Goksin F. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. International Journal of clinical and experimental medicine. [Internet] 2014[citado 2018 septiembre 27] ; 7(9): 2828-2835..Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211795/>

FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR



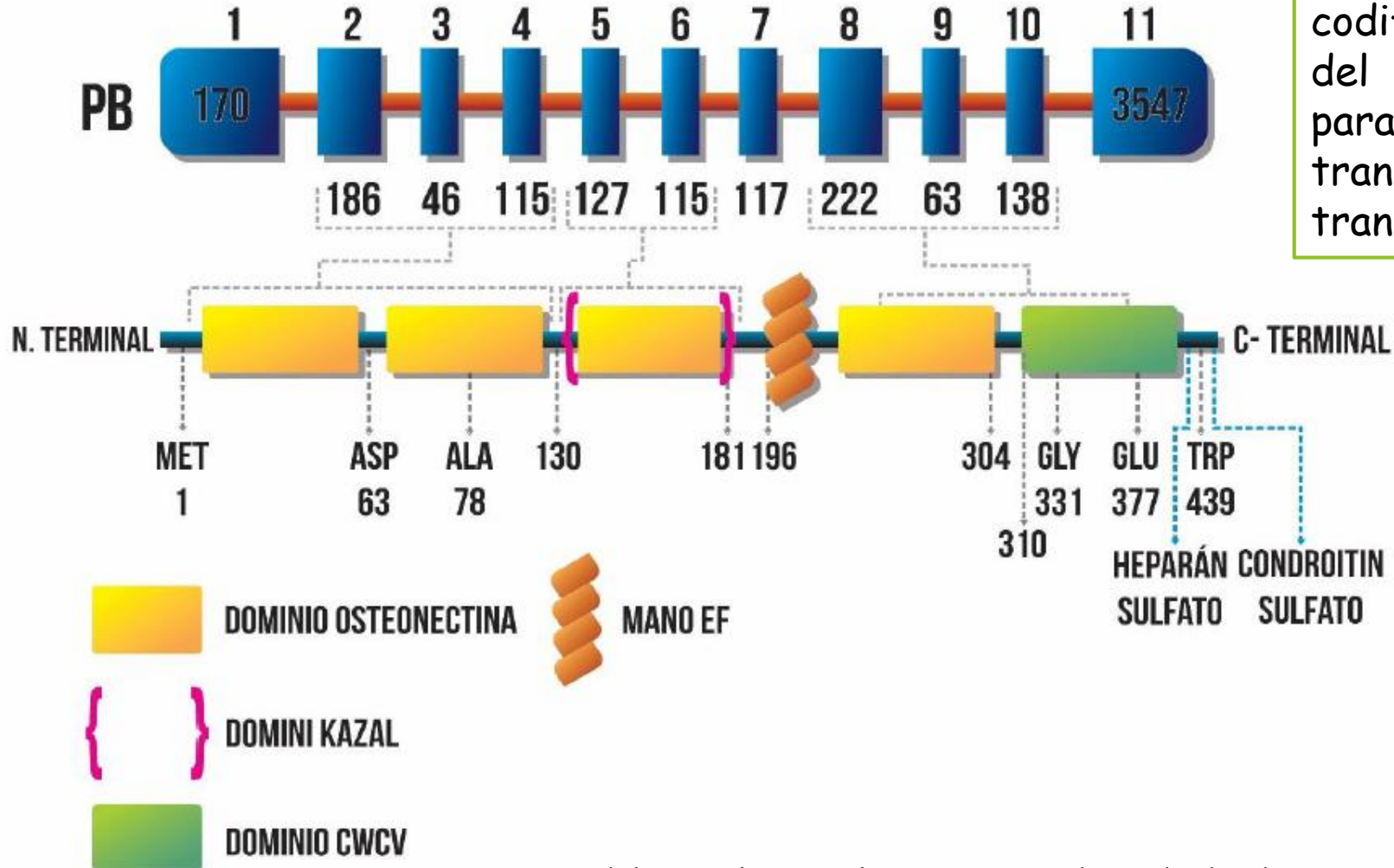
Secuencia adenoma-carcinoma



FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR

SPOCK1

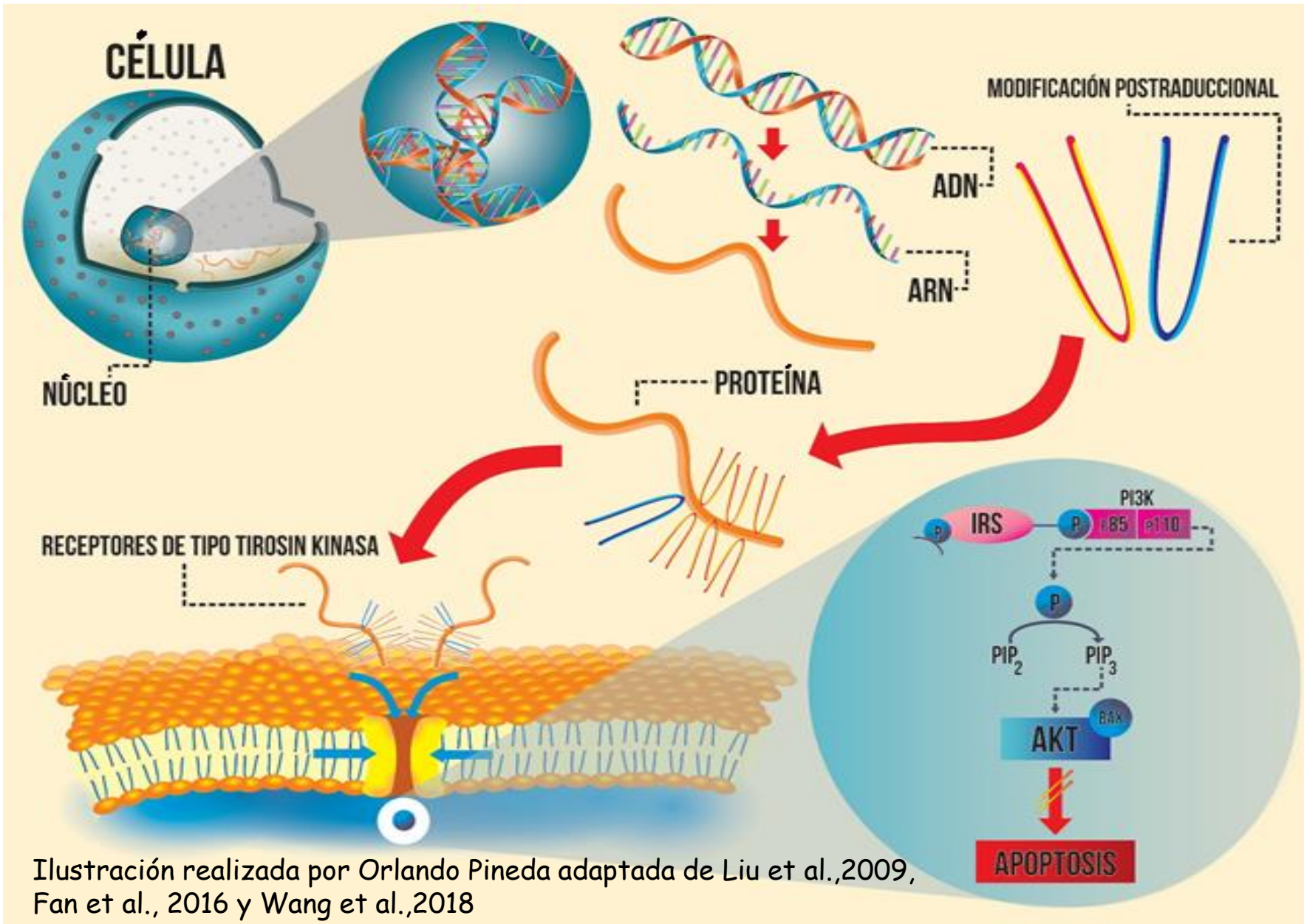
EXONES



Charbonnier et al., establecen el primer exón como no codificante, debido a la ausencia del codón ATG, imprescindible para iniciar el proceso de transcripción y finalmente de transducción

estructura del gen y la proteína SPOCK1. Adaptada de Charbonnier et al.1997.
Ilustración realizada por Orlando Pineda

FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR-*SPOCK1*



Esquematzación de la síntesis de *SPOCK1*, su modificación postraducciona (unión de heparán y condroitin sulfato en la región c terminal). Interacción del proteoglicano con receptores de la membrana celular y la activación de la ruta PI3K/AKT inhibiendo la apoptosis.

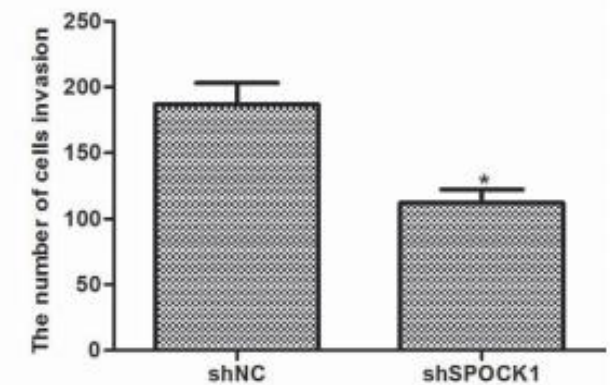
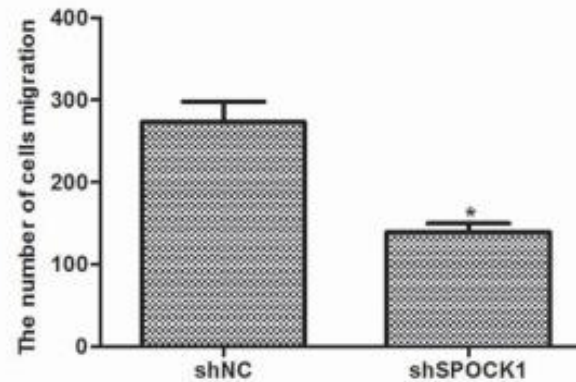
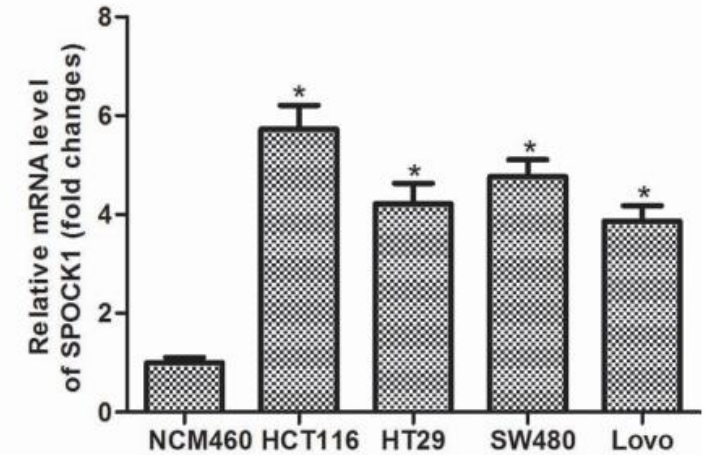
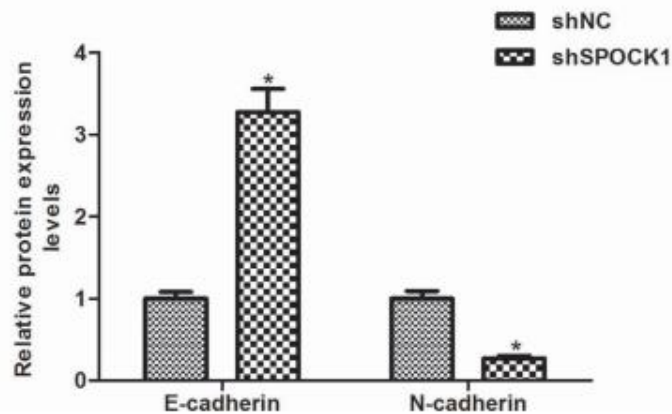
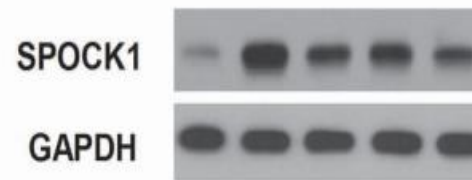
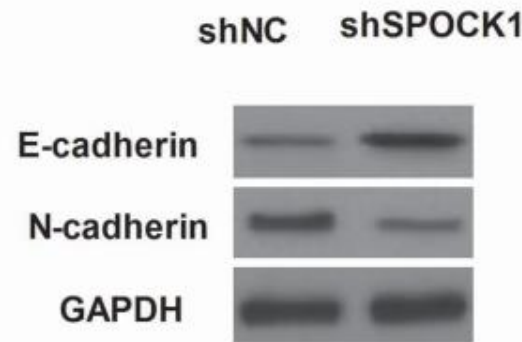
Ilustración realizada por Orlando Pineda adaptada de Liu et al.,2009, Fan et al., 2016 y Wang et al.,2018

Knockdown of SPOCK1 Inhibits the Proliferation and Invasion in Colorectal Cancer Cells by Suppressing the PI3K/Akt Pathway

Ping Zhao,* Hai-Tao Guan,† Zhi-Jun Dai,† Yu-Guang Ma,† Xiao-Xu Liu,† and Xi-Jing Wang†

*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, P.R. China

†Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, P.R. China



Fuente: todas las gráficas usadas son originarias del artículo de Zhao et al., 2016

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si variantes presentes en la región codificante de *SPOCK1* pueden relacionarse potencialmente con la etiología del cáncer colorrectal.

Objetivos específicos

- Establecer la importancia de *SPOCK1* en el cáncer colorrectal.
- Identificar variantes presentes en la secuencia nucleotídica de *SPOCK1*.
- Analizar las variantes encontradas en la secuenciación de *SPOCK1* de tejidos tumorales.

METODOLOGÍA



39 tejidos de pacientes con neoplasias colorrectales



Consideraciones éticas resolución 8430 de 1993

Sangre

Tejido tumoral, variaciones somáticas

Tejido adyacente

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante

Diseño de *primers* Primer3

Amplificación PCR convencional

Electroforesis en gel de agarosa

Secuenciación de Sanger

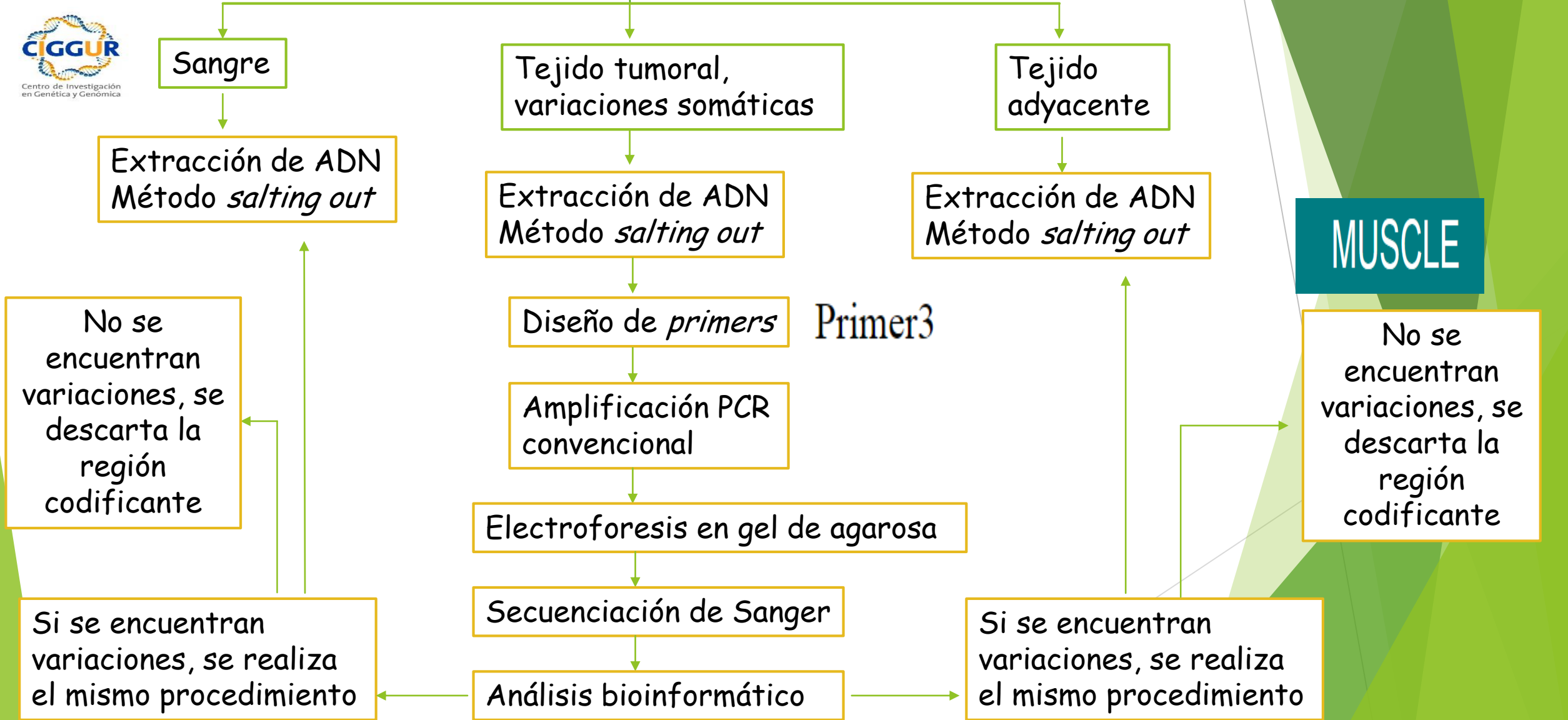
Análisis bioinformático

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

MUSCLE

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante



39 tejidos de pacientes con neoplasias colorrectales



Consideraciones éticas resolución 8430 de 1993



Sangre

Tejido tumoral, variaciones somáticas

Tejido adyacente

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

MUSCLE

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante

Diseño de *primers*

Primer3

Amplificación PCR convencional

Electroforesis en gel de agarosa

Secuenciación de Sanger

Análisis bioinformático

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

DISEÑO DE PRIMERS

Tamaño	Idealmente entre 18-25 nucleótidos
Temperatura melting (Tm) o Temperatura Fusión	Entre 55-75°C idealmente
Contenido de GC	Entre un 40-60% de CG
Autocomplementariedad	Debe evitarse la complementariedad entre las bases del primer con el fin de minimizar la formación de estructuras secundarias
Complementariedad entre los dos primers	Debe ser evitada. Cuando los dos primers son complementarios entre sí tenderán a hibridarse entre ellos y formarán dímeros de primer
Similaridad	Cada primer debe ser 100% complementario al DNA al cual se va a hibridar.

Tabla extraída de "diseño de *primers*, maestría en genética humana Universidad del Rosario

```
start len tm gct any 3' seq
```

```
LEFT PRIMER      66  24  64.06  45.83  5.00  2.00  tggattcagaacacttccccacta
RIGHT PRIMER     825  24  64.01  45.83  4.00  1.00  gtttgagcacttgagagcaccatt
PRODUCT SIZE: 760, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00
```

```
hSPOCK1_Int8_-363_F: tggattcagaacacttccccacta
hSPOCK1_Int9_334_R: gtttgagcacttgagagcaccatt
```



Síntesis



ELIM BIOPHARM
Excellence Accelerated

39 tejidos de pacientes con neoplasias colorrectales



Consideraciones éticas resolución 8430 de 1993



Sangre

Tejido tumoral, variaciones somáticas

Tejido adyacente

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

MUSCLE

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante

Diseño de *primers* Primer3

Amplificación PCR convencional

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante

Electroforesis en gel de agarosa

Secuenciación de Sanger

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

Análisis bioinformático

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

PCR CONVENCIONAL

Tabla de reactivos usado en la PCR convencional

Reactivos	Volumen	Concentración Inicial	Concentración final Para 25 μ L
Master mix 2X promega	8 μ L	2x	0,64X
Primer Forward	2 μ L	10 μ M	0,8 μ M
Primer Reverse	2 μ L	10 μ M	0,8 μ M
H2O destilada	11 μ L	-o-	
ADN a amplificar	2 μ L	100ng/ μ L	8ng/ μ L
Total	25 μ L		

Tabla realizada por Orlando Pineda

PCR CONVENCIONAL

Programación del termociclador

Proceso	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	10min	1
Desnaturalización	95 °C	40seg	35
Annealing	57-66 °C	40seg	
Extensión	72 °C	1min	
Extensión final	72 °C	10min	1
Almacenamiento	4 °C	Infinito	1

39 tejidos de pacientes con neoplasias colorrectales



Consideraciones éticas resolución 8430 de 1993



Sangre

Tejido tumoral, variaciones somáticas

Tejido adyacente

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante

Diseño de *primers*

Primer3

Amplificación PCR convencional

MUSCLE

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

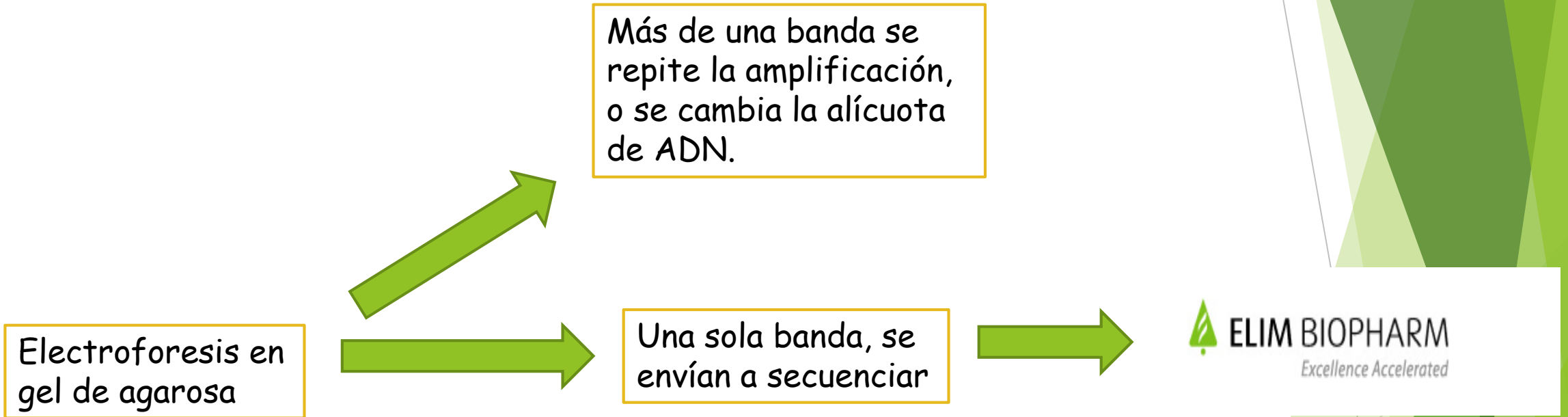
Electroforesis en gel de agarosa

Secuenciación de Sanger

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

Análisis bioinformático

ELECTROFORESIS Y SECUENCIACIÓN DE SANGER





39 tejidos de pacientes con neoplasias colorrectales



Consideraciones éticas resolución 8430 de 1993

Sangre

Tejido tumoral, variaciones somáticas

Tejido adyacente

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

Extracción de ADN
Método *salting out*

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante

Diseño de *primers* Primer3

Amplificación PCR convencional

Electroforesis en gel de agarosa

Secuenciación de Sanger

Análisis bioinformático

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

Si se encuentran variaciones, se realiza el mismo procedimiento

MUSCLE

No se encuentran variaciones, se descarta la región codificante

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO



Tools > Multiple Sequence Alignment > MUSCLE

Multiple Sequence Alignment

MUSCLE stands for **M**ultiple **S**equence **C**omparison by **L**og-**E**xpectation. MUSCLE is claimed to achieve both better average accuracy and better speed than [ClustalW2](#) or [T-Coffee](#), depending on the chosen options.

Important note: This tool can align up to 500 sequences or a maximum file size of 1 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of sequences in any supported format:

Captura de la herramienta bioinformática
MUSCLE

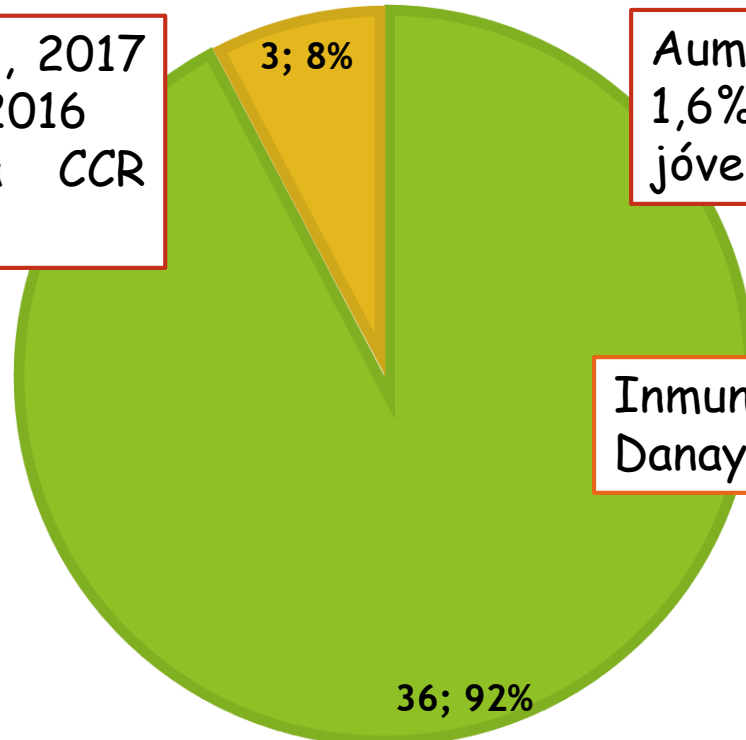
Exons/ Introns	Translated sequence	Flanking sequence	Intron sequence	UTR			
Variants	5 prime UTR	Coding sequence	Frameshift	Inframe deletion	Inframe insertion	Missense	Stop gained
	Synonymous						
Markup	loaded						
5' upstream sequence			cagagccttggtcgcgcgctcggcctcctccgccgggacgcgcgcgc			
1	ENSE00001520082	137,499,348	137,499,179	-	-	170	CGAGCCCGGAGCCAGCAGACCACTGCTCGGGCTCAAAAGCGCCAGTCCTCGGC GGCGGCTGTGGCAGGAGCCAGCGGCGGAGCCGATCAGCCTTCCCGCCACCGTG CCGCGGAGCTCGAGCACTCGGACTAGGGACCGGGCCGCACCCCAAG
Intron 1-2		137,499,178	137,498,559			620	gtacgtgccagaggaaacccgcgc.....tcgcctcgcgcgcctgccgcgag
2	ENSE00003612709	137,498,558	137,498,373	0	0	186	ATGCCGCATCGGCTGTTGGCGCGCCGCGCGGCGTGGCTTCCCAAGTCGAG AGCCGCACTTGGACCGCTGCGCGGGCGGCGCCCAACCAAGCAATTTCTTAGAC AATGACCACTGGCTGAGCACGCTCTCCAGTAGACCGGACAAGTACGGACCGCTT CGAGAC
Intron 2-3		137,498,372	137,267,056			231,317	gtgagtagccggcgcacccggccct.....tgtttctatcttttctctatatag
3	ENSE00003594531	137,267,055	137,267,010	0	1	46	GATGATTAATTCAGAACTGGAACTCCACCAAGCCCTTCAACCAAG
Intron 3-4		137,267,009	137,140,695			126,315	gtaatggatgcaatattcttctgtg.....gcctcctcttctgtttttgcctcag
4	ENSE00003548873	137,140,694	137,140,580	1	2	115	CCCTGGACCCATCAAGGACCCCTGCCTGAAGGTAAATGCAGCCCTCAACAAAGTGTG TGACCCGAGCACTACAGACCCGCTGTGTGTGAGCCGACGACCTGTCTCCAG
Intron 4-5		137,140,579	137,112,562			28,018	gtaaggcaggaaggccggggctgtg.....ttatccctttttctctctcttag
5	ENSE00003615496	137,112,561	137,112,435	2	0	127	GCAGAGAAAGGGAGCGTGGCCAGAAACCTGGGTGGCTCTTCCAAATTTGGTCAAGTG CAAGGCTGTCTCCCTGGCACAGTCAGCAATGGTGTGGGCTCAGATGGCCCTCTACAC ATCCAG
Intron 5-6		137,112,434	137,067,830			44,605	gttggttttctgtctttttatgtt.....gacctgtgtgtctctcttttgcag
6	ENSE00001004926	137,067,829	137,067,715	0	1	115	TGCAGTTGGATTCATCTTGTCTACTGGCAAAAGGCTGGCCACCCTCTGTGTGGG CCCTGTCTGTCTCCAGAGCCTGAGCCACCAGGACAGAGGAGGAGGAGTG
Intron 6-7		137,067,714	136,992,601			75,114	gtgagtgagggttccctcagagaa.....gtctgttctgtttgttttctctag
7	ENSE00003608222	136,992,600	136,992,484	1	1	117	CCTCACTGAGGAGCTTGGGAGCTTCCCTCCGCTCAAGCAATGGTGTGGAGCTG

Captura de secuencia nucleotídica encontrada
en [ensembl.org](#)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PACIENTES MENORES Y MAYORES DE 40 AÑOS

■ mayores ■ Menores



Abanto et al., 2017
y Ruíz et al, 2016
Epidemiología CCR
jóvenes

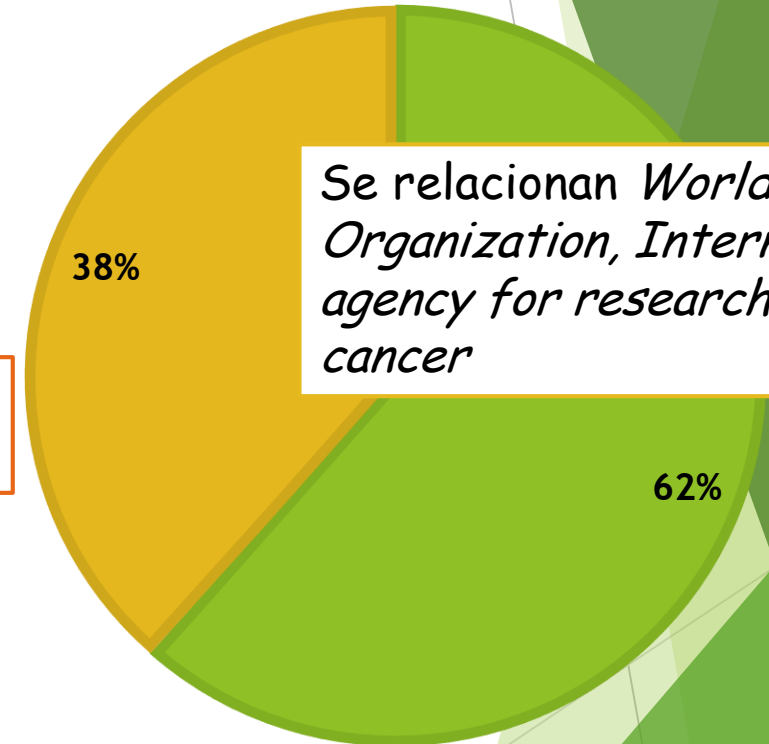
Aumento 1,5% y
1,6% en adultos
jóvenes Globocan

Inmunosenescencia
Danay et al.,2014

Desde hace más de 20 años se
demuestra susceptibilidad Varma
et al., 1990

HOMBRES Y MUJERES

■ Hombres ■ Mujeres



Se relacionan *World Health Organization, International agency for research on cancer*

Ruiz R, Taxa L, Ruiz E, Mantilla R et al. Colorectal cancer in the young: clinicopathologic features and prognostic factors from a cancer institute in Peru. *Revista de gastroenterología del peru*. [Internet]. 2016 [citado 2018 septiembre 22]. Available in: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292016000100005
Varma JR, Sample L. Colorectal cancer in patients aged less than 40 years. *J Am Board Fam Pract* [Internet]. 1990;3(1):54-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2407049>
Danay D, Hernández S, Beatriz D, Verdecia G. Inmunosenescencia: efectos de la edad sobre el sistema inmune. *Immunosenescence: effects of aging process on immune system*. 2014;30(4):332-45.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN CUANTIFICACIÓN

200 ng/ μ L

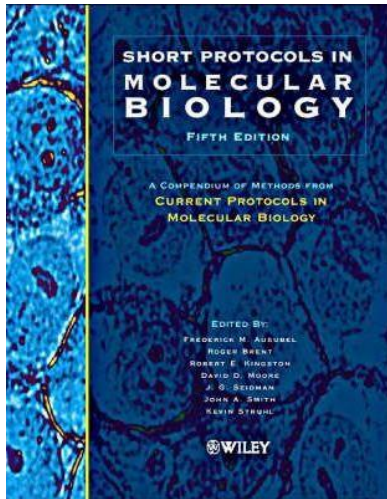


1173 ng/ μ L

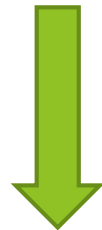


Valores obtenidos en
tejidos tumorales

current protocols of molecular biology



Armas et al., 2011
Javadi et al, 2014



comparan distintos métodos
como el fenol-cloroformo con
métodos de gradientes de sales
(*Salting out*) y kits comerciales

260/280 entre 1,7 y 1,96

260/230 entre 1,83 y 1,90.

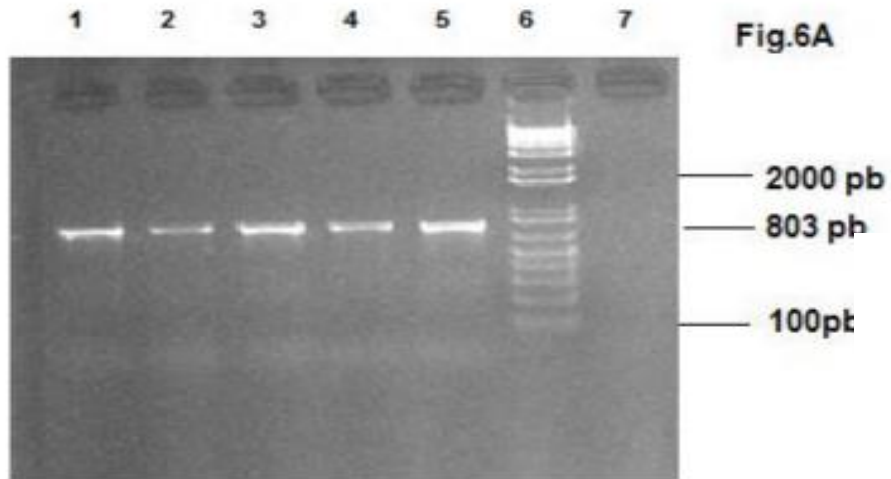
<https://www.bookdepository.com/Short-Protocols-Molecular-Biology-Kevin-Struhl/9780471250920>

De Armas Y, Capó V, López LX, Mederos L, Díaz R. Comparación de tres métodos de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina. *Biotechnol Apl.* 2011;28(1).

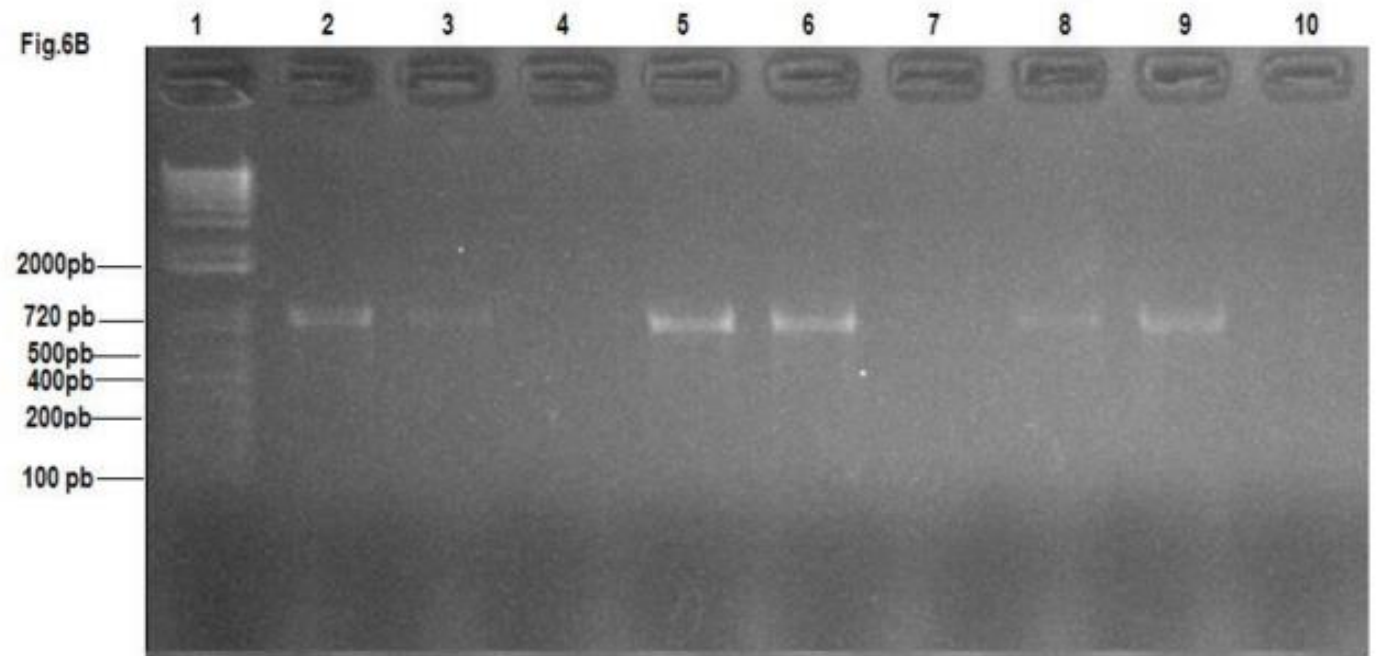
Javadi A, Shamaei M, Ziazi LM, Pourabdollah M, Dorudinia A, Seyedmehdi SM, et al. Qualification study of two genomic DNA extraction methods in different clinical samples. *Tanaffos.* 2014;13(4):41-7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRIDO ELECTROFORÉTICO

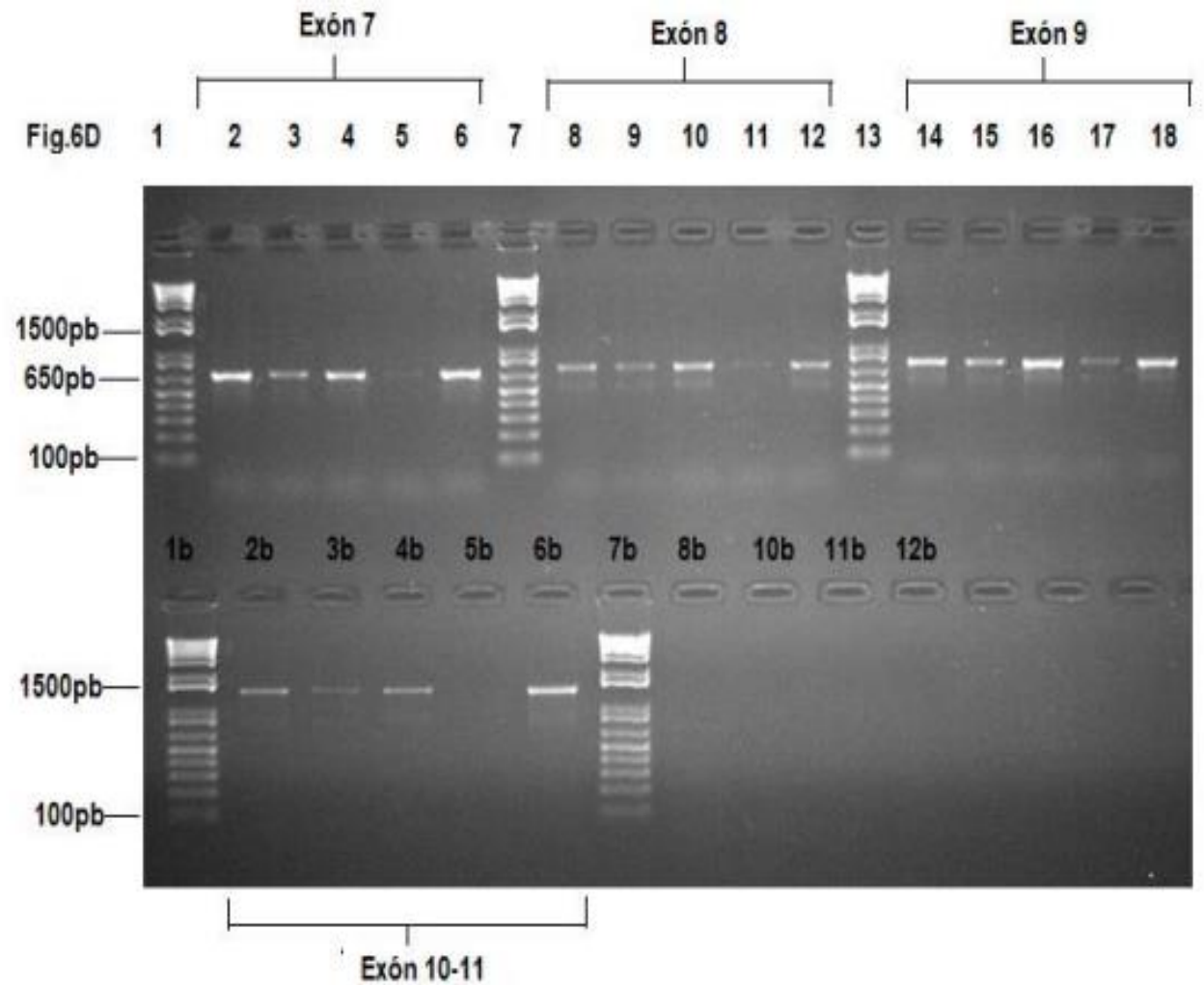
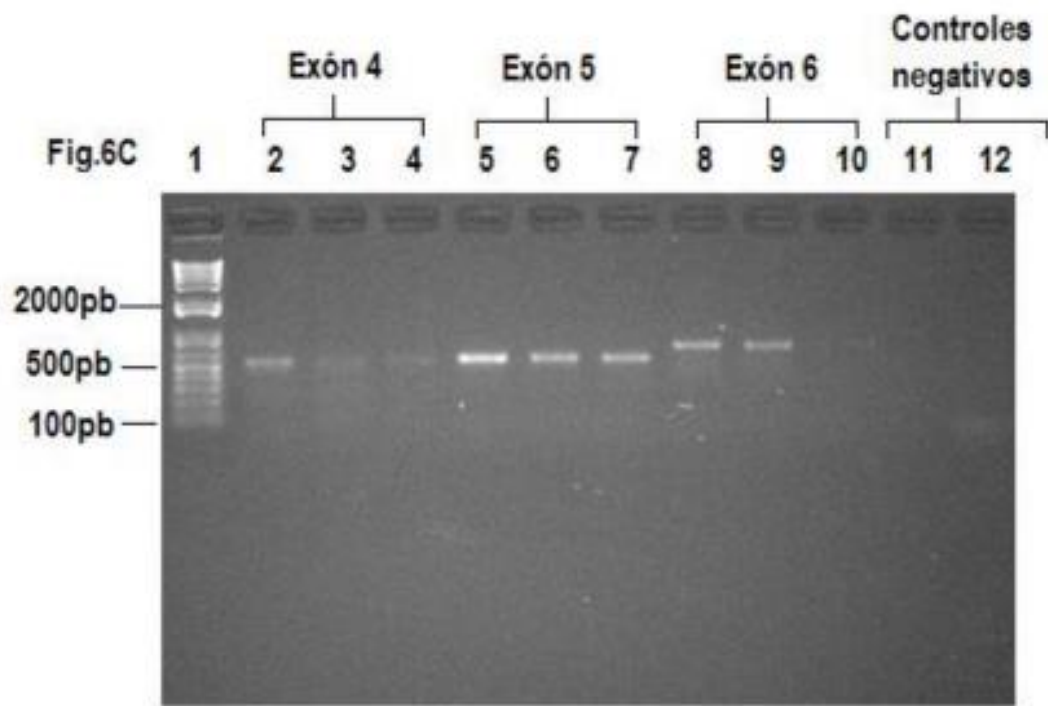
Exón 2



Exón 3

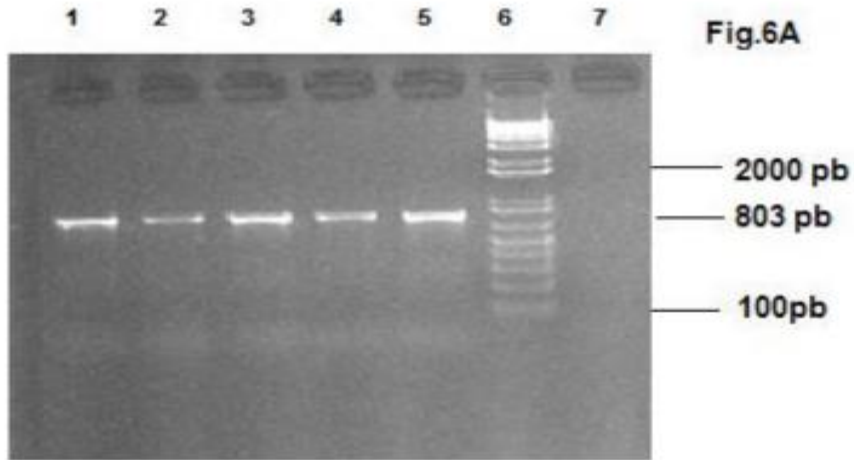


RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRIDO ELECTROFORÉTICO



RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRIDO ELECTROFORÉTICO

Exón 2



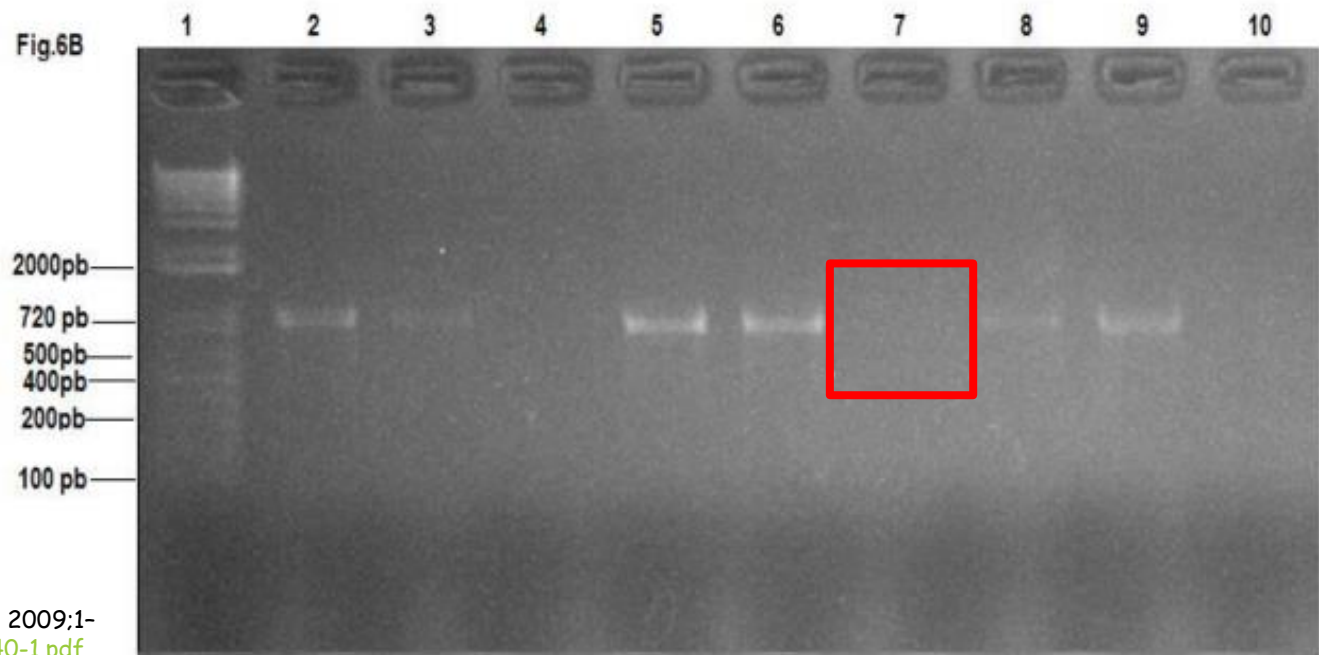
Se realizaron 351 PCR más las repeticiones

Presencia de sales inhibidoras que bloquean sitios de unión del cofactor Mg^{2+} (Davalieva et al.,2010)

Exón 3

Valones et al.,2013, proponen Las fuerzas intermoleculares De la regiones ricas en guaninas y citosinas

Exón 3 región rica en G-C



Agne M, Valones A, Guimarães RL, André L, Brandão C. usefulness of PCR in mmb. 2009;1-11. Available <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768498/pdf/bjm-40-1.pdf>

Davalieva K, Efremov GD. Influence of salts and PCR inhibitors on the amplification capacity of three thermostable DNA polymerases. Maced J Chem Chem Eng. 2010;29(1):57-62.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Fig.7A

```

WThSPOCKex2      CGCAGCCTCCTCGTTCGTAGATGAGTCCCCAATTCGTGAGAGGGGTCCTGGGTCTAGAG
hSPOCK1TT12ex2  -----TCCTCGTTCGTAGATGAGTCCCCAATTCGTGAGAGGGGTCCTGGGTCTAGAG
*****

WThSPOCKex2      GCGCGACAGGCGCCAGGTGCGCGAGCGCTGCCCGTCCCGCCGCGGGGTCCCGCCTC
hSPOCK1TT12ex2  GCGCGACAGGCGCCAGGTGCGCGAGCGCTGCCCGTCCCGCCGCGGGGTCCCGCCTC
*****

WThSPOCKex2      CGGGCTGGGGCGTGGGACCGCTGGTGGCCCGGGCTCGCGCCCGCCCGCCTCTTCGCT
hSPOCK1TT12ex2  CGGGCTGGGGCGTGGGACCGCTGGTGGCCCGGGCTCGCGCCCGCCCGCCTCTTCGCT
*****

WThSPOCKex2      CATCGCCCTGCGCGCCCTGCCCGCAGATGCCCGGATCGGGTGTGGCGCGCGCCGCC
hSPOCK1TT12ex2  CATCGCCCTGCGCGCCCTGCCCGCAGATGCCCGGATCGGGTGTGGCGCGCGCCGCC
*****

WThSPOCKex2      GCGCGTGGTCTTCTCCAAGTCGAGAGCGCGCACCTGGACGGCTCGCGGAGGCGCG
hSPOCK1TT12ex2  GCGCGTGGTCTTCTCCAAGTCGAGAGCGCGCACCTGGACGGCTCGCGGAGGCGCG
*****

WThSPOCKex2      GCGCCCAACCAGGCAATTTCTAGACAATGACCACTGGCTGAGCACCCGCTCCAGTAC
hSPOCK1TT12ex2  GCGCCCAACCAGGCAATTTCTAGACAATGACCACTGGCTGAGCACCCGCTCCAGTAC
*****

WThSPOCKex2      GACCGGGACAGTACTGGAACCGCTTCCGAGAGCTGAGTACGGCGCCACCCGCGCTGG
hSPOCK1TT12ex2  GACCGGGACAGTACTGGAACCGCTTCCGAGAGCTGAGTACGGCGCCACCCGCGCTGG
*****

WThSPOCKex2      GGGCGCGGAGCCTCTCGAGGGGACCCCTGAAGCGGGTGGGGTGTGTGTGTGTGTGT
hSPOCK1TT12ex2  GGGCGCGGAGCCTCTCGAGGGGACCCCTG-----
*****
    
```

Fig.7B

```

WThSPOCK1ex3    CCAGTATTGAATACATACGGTTTGAAGACAGGAATTTGAAAGGAATTTGATATTTTTT
hSPOCK1TT1ex3  CCAGTATTGAATACATACGGTTTGAAGACAGGAATTTGAAAGGAATTTGATATTTTTT
*****

WThSPOCK1ex3    TATTACACATTAATGCGTGTTTGGGAAAATTTCTAAGCTTTTCAGTGTTCCTTTGTG
hSPOCK1TT1ex3  TATTACACATTAATGCGTGTTTGGGAAAATTTCTAAGCTTTTCAGTGTTCCTTTGTG
*****

WThSPOCK1ex3    TTTGGGAGGTGAAAAGGAAGCAGGTTTTATGCAAGTATGTGAGAGGCTTTTGAACI
hSPOCK1TT1ex3  TTTGGGAGGTGAAAAGGAAGCAGGTTTTATGCAAGTATGTGAGAGGCTTTTGAACI
*****

WThSPOCK1ex3    CTGACCTTTGTTTCTAATTTTTCTTATATAGTAAATATTGAAAGGAGGAGGAGTCC
hSPOCK1TT1ex3  CTGACCTTTGTTTCTAATTTTTCTTATATAGTAAATATTGAAAGGAGGAGGAGTCC
*****

WThSPOCK1ex3    AAGCAAGGCTTTGACCAAGTAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
hSPOCK1TT1ex3  AAGCAAGGCTTTGACCAAGTAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
*****

WThSPOCK1ex3    TGTGGTCTCATTTTCTTCTGATGCTGAGTAAATGTTCCACAGGGCCAGCTAGC
hSPOCK1TT1ex3  TGTGGTCTCATTTTCTTCTGATGCTGAGTAAATGTTCCACAGGGCCAGCTAGC
*****

WThSPOCK1ex3    GGTGTTAATTTTATGACTTTGGGAGTAAATGATGATGATGATGATGATGATGATG
hSPOCK1TT1ex3  GGTGTTAATTTTATGACTTTGGGAGTAAATGATGATGATGATGATGATGATGATG
*****

WThSPOCK1ex3    AAATGGTATTGTTCTGAGGTTAATCTAGGGCTGATTTAAACAATTTCTTTAATTGG
hSPOCK1TT1ex3  AAATGGTATTGTTCTGAGGTTAATCTAGGGCTGATTTAAACAATTTCTTTAATTGG
*****

WThSPOCK1ex3    CTGACCAATATAATCATGATCGTTTGTGTTTTAAAAAAGTAAATTTGATATCA
hSPOCK1TT1ex3  CTGACCAATATAATCATGATCGTTTGTGTTTTAAAAAAGTAAATTTGATATCA
*****

WThSPOCK1ex3    AATTAACTGGTAAATTTGGGGCTGATGCTGCTTTTCAATCGAAGACACTAT
hSPOCK1TT1ex3  AATTAACTGGTAAATTTGGGGCTGATGCTGCTTTTCAATCGAAGACACTAT
*****
    
```

Fig.7C

```

WThSPOCK1ex4    AAAAAAAAAATAAATTTCCCTGGAGTCTAAACCCTGCCCTCCTTCTGTTTTGCGCT
hSPOCK1TT20ex4  AAAAAAAAAATAAATTTCCCTGGAGTCTAAACCCTGCCCTCCTTCTGTTTTGCGCT
*****

WThSPOCK1ex4    CAGCCCTGGACCCATCCAGGACCCCTGCTGAAGGTAATAATGAGCCCTCACAAAGTGT
hSPOCK1TT20ex4  CAGCCCTGGACCCATCCAGGACCCCTGCTGAAGGTAATAATGAGCCCTCACAAAGTGT
*****

WThSPOCK1ex4    GTGTGACCCAGSACTACAGACCGCCCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
hSPOCK1TT20ex4  GTGTGACCCAGSACTACAGACCGCCCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
*****

WThSPOCK1ex4    AAGGCAGGAAGGCCGGGGCTGGGGCTGGGAGGCATCTGCAGCTGGCAGATCTGAGGG
hSPOCK1TT20ex4  AAGGCAGGAAGGCCGGGGCTGGGGCTGGGAGGCATCTGCAGCTGGCAGATCTGAGGG
*****
    
```

Fig.7D

```

WThSPOCKex5     CTTCTGGGACAAAATCCTCTGCTTCTATCAATGAGTGGAGCAAATGGAAGTGTGGCT
hSPOCK1TT12ex5R -----TCCTTCATCAATGAGTGGAGCAAATGGAAGTGTGGCT
*****

WThSPOCKex5     AAGGCCCTCAGSATCCCTTGGCCCTGGTGGATAGTCCCTTATTTAATTTGGCCCTTTATTC
hSPOCK1TT12ex5R AAGGCCCTCAGSATCCCTTGGCCCTGGTGGATAGTCCCTTATTTAATTTGGCCCTTTATTC
*****

WThSPOCKex5     TGGAACTTACAGGAAGACTCATAGGCTCTGGAGCTTCAACTAATTTATCCCTTTTTTT
hSPOCK1TT12ex5R TGGAACTTACAGGAAGACTCATAGGCTCTGGAGCTTCAACTAATTTATCCCTTTTTTT
*****

WThSPOCKex5     CTCATCITTAGCAAAGAGGGGAACTGSCCLAAACACTGSSITGACCTTCCAAAT
hSPOCK1TT12ex5R CTCATCITTAGCAAAGAGGGGAACTGSCCCAGAACACTGSSITGACCTTCCAAAT
*****

WThSPOCKex5     TGTGCAAGTGCAGCCCTGTCCCGTGGACAGTCAAGCATTGTCCGGCTCAGATGG
hSPOCK1TT12ex5R TGTGCAAGTGCAGCCCTGTCCCGTGGACAGTCAAGCATTGTCCGGCTCAGATGG
*****

WThSPOCKex5     GACTCTACAGATCCAGGTTGGTTTTCTGTCITTTTTATGTTATCAAAAATACTTCATG
hSPOCK1TT12ex5R GACTCTACAGATCCAGGTTGGTTTTCTGTCITTTTTATGTTATCAAAAATACTTCATG
*****

WThSPOCKex5     TCGGCTTGTCTAACACTTCTCTATGCAAAACTGGGGCTGGGAAGCGTGGTGGGCTCC
hSPOCK1TT12ex5R TCGGCTTGTCTAACACTTCTCTATGCAAAACTGGGGCTGGGAAGCGTGGTGGGCTCC
*****

WThSPOCKex5     AGGCCCTGGCCCTTGAAGAGCTGCTGATTAGCAGACTCAGAGATGTTCTCTGGCCATGGA
hSPOCK1TT12ex5R AGGCCCTGGCCCTTGAAGAGCTGCTGATTAGCAGACTCAGAGATGTTCTCTGGCCATGGA
*****

WThSPOCKex5     GACAAGCAAATAAAAAATTTCTATCCTGTGTAAGTGGGCTGGTTGAGGGGAAGAAGAA
hSPOCK1TT12ex5R GACAAGC-----
*****
    
```

Fig.7E

```

WThSPOCKex6     TGTAAAGTTTCAATATAAATTTTTATTTAGAAATAGTACAGTAGGGTTTACCAATCAT
hSPOCK1TT7ex6  -----AATTTATTTTAAATAGTACAGTAGGGTTTACCAATCAT
*****

WThSPOCKex6     TAAAGGAAGTCTTACAGGCTTCCACAGTGTTTTAAAGGATATCCTCTGCATTTGGTAA
hSPOCK1TT7ex6  TAAAGGAAGTCTTACAGGCTTCCACAGTGTTTTAAAGGATATCCTCTGCATTTGGTAA
*****

WThSPOCKex6     AATATAAAGGCCATTTCTAATTTAGTATTTCTGTAATTTAGAACCTTCACTGAGGTCGAC
hSPOCK1TT7ex6  AATATAAAGGCCATTTCTAATTTAGTATTTCTGTAATTTAGAACCTTCACTGAGGTCGAC
*****

WThSPOCKex6     CTCCTCGCTTGTCTTTCCTTTTGTGAAGCAAGGGCAGTCTGTTTCTAGAGGGCG
hSPOCK1TT7ex6  CTCCTCGCTTGTCTTTCCTTTTGTGAAGCAAGGGCAGTCTGTTTCTAGAGGGCG
*****

WThSPOCKex6     GGGTAGGGTCTGTTATGGCTCATTCTTAAGACCTGTGTGTCTCTCTTTTGCAGTGG
hSPOCK1TT7ex6  GGGTAGGGTCTGTTATGGCTCATTCTTAAGACCTGTGTGTCTCTCTTTTGCAGTGG
*****

WThSPOCKex6     AATGGAGTCTATGCTTGTCTTAAAGGCTTCCAGCCCTCTGTGATGGGCG
hSPOCK1TT7ex6  AATGGAGTCTATGCTTGTCTTAAAGGCTTCCAGCCCTCTGTGATGGGCG
*****

WThSPOCKex6     TCCCTTCTCCAGAGCCTGGCCCAACAAACACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
hSPOCK1TT7ex6  TCCCTTCTCCAGAGCCTGGCCCAACAAACACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
*****

WThSPOCKex6     GGTTCCTTCAAGAAATCTGGGCAAGAAATGGGGGTCACAGAGGTTGATGTGGCCGA
hSPOCK1TT7ex6  GGTTCCTTCAAGAAATCTGGGCAAGAAATGGGGGTCACAGAGGTTGATGTGGCCGA
*****

WThSPOCKex6     GCTCTGCTCCAGCAGCTAGGAACAACTGGAGAAATGAGCAGACATGACAGGTAAGTACT
hSPOCK1TT7ex6  GCTCTGCTCCAGCAGCTAGGAACAACTGGAGAAATGAGCAGACATGACAGGTAAGTACT
*****
    
```

Fig.7F

```

WThSPOCKex7     GCAAAACCTGCAAGAGCAAGCTTTATGCGGTTAGCAAAGTGAICTGTGATTGTCTGCTT
hSPOCK1TT12ex7 -----TCCTGCTTT
*****

WThSPOCKex7     CTGAGGATGCTACACAACGGTGAAGCACTGCCAGTCTGCTTTCACAGCACAGAGGCCATC
hSPOCK1TT12ex7 CTGAGGATGCTACACAACGGTGAAGCACTGCCAGTCTGCTTTCACAGCACAGAGGCCATC
*****

WThSPOCKex7     CAAATTCAGTTCGAAACAAGGCTGCTTCCCTGGGGCTGAGGCTCTTTTTGTCCC
hSPOCK1TT12ex7 CAAATTCAGTTCGAAACAAGGCTGCTTCCCTGGGGCTGAGGCTCTTTTTGTCCC
*****

WThSPOCKex7     ACTCITTTGTTGACTAACAGCACTTTTGGGTTTTCACAGTGAAGTACAGTTAAT
hSPOCK1TT12ex7 ACTCITTTGTTGACTAACAGCACTTTTGGGTTTTCACAGTGAAGTACAGTTAAT
*****

WThSPOCKex7     CGTGTGGATAGAAAGGTTTCTTGAACCTGGCTTGGCCAGTGGCCCTGCACACAGAA
hSPOCK1TT12ex7 CGTGTGGATAGAAAGGTTTCTTGAACCTGGCTTGGCCAGTGGCCCTGCACACAGAA
*****

WThSPOCKex7     GGCAGAAAGCCCCAGCCCAATGCTGTTCTGTTTGTCTTCTAGCCTGCACAGAC
hSPOCK1TT12ex7 GGCAGAAAGCCCCAGCCCAATGCTGTTCTGTTTGTCTTCTAGCCTGCACAGAC
*****

WThSPOCKex7     GGGATTCGGGAACTTCCCTCCCGGCTGAAGGATGGTTTGGAGCTTCCACAGGAT
hSPOCK1TT12ex7 GGGATTCGGGAACTTCCCTCCCGGCTGAAGGATGGTTTGGAGCTTCCACAGGAT
*****

WThSPOCKex7     GAAACAGATCATCAAGCCACAGCTCCACACAGCCAGAGGCTGTRAGACCATTTTAA
hSPOCK1TT12ex7 GAAACAGATCATCAAGCCACAGCTCCACACAGCCAGAGGCTGTRAGACCATTTTAA
*****

WThSPOCKex7     ATATCACATTTCTCAATTTATAGACATGATTTAGGTTAGCAATATCTTTGGGGT
hSPOCK1TT12ex7 ATATCACATTTCTCAATTTATAGACATGATTTAGGTTAGCAATATCTTTGGGGT
*****

WThSPOCKex7     GAAAACACCCATTACATTAATATATACTTTGACTTTAATATGTCACCAATCTCAAAA
hSPOCK1TT12ex7 GAAAACACCCATTACATTAATATATACTTTGACTTTAATATGTCACCAATCTCAAAA
*****
    
```


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

```

WThSPOCKex7      GCAAAACTGCAAGAGCAAGCTTTATGCGGTTAGCAAAAGTGATCTGTGATTGTCTGTCTT
hSPOCK1TT12ex7  -----TCTGTCTT
                  *****

WThSPOCKex7      CTGAGGATGCTACACAACGGTGGAGACCACTGCAGCTTGTCTTTCACAGCACAGAGGCCATC
hSPOCK1TT12ex7  CTGAGGANGCTACACAACGGTGGAGACCACTGCAGCTTGTCTTTCACAGCACAGAGGCCATC
                  *****

WThSPOCKex7      CAAATTCAGTTTCTGAACAAGGCTGCTTGGCCCTGGGGGTCTAGGCTCTCTTTTTGTCC
hSPOCK1TT12ex7  CAAATTCAGTTTCTGAACAAGGCTGCTTGGCCCTGGGGGTCTAGGCTCTCTTTTTGTCC
                  *****

WThSPOCKex7      ACTCTTTGTTTGTACTAACAGCATCTTTGGGGTGTTCACAGTGAAGTAAACAGTTATAT
hSPOCK1TT12ex7  ACTCTTTGTTTGTACTAACAGCATCTTTGGGGTGTTCACAGTGAAGTAAACAGTTATAT
                  *****

WThSPOCKex7      CGTGGTTGGATAGAAAGGTTTGTCTTGAACGTTGGCTTTGCCAGTAGCCCTGCACACAGAA
hSPOCK1TT12ex7  CGTGGTTGGATAGAAAGGTTTGTCTTGAACGTTGGCTTTGCCAGTAGCCCTGCACACAGAA
                  *****

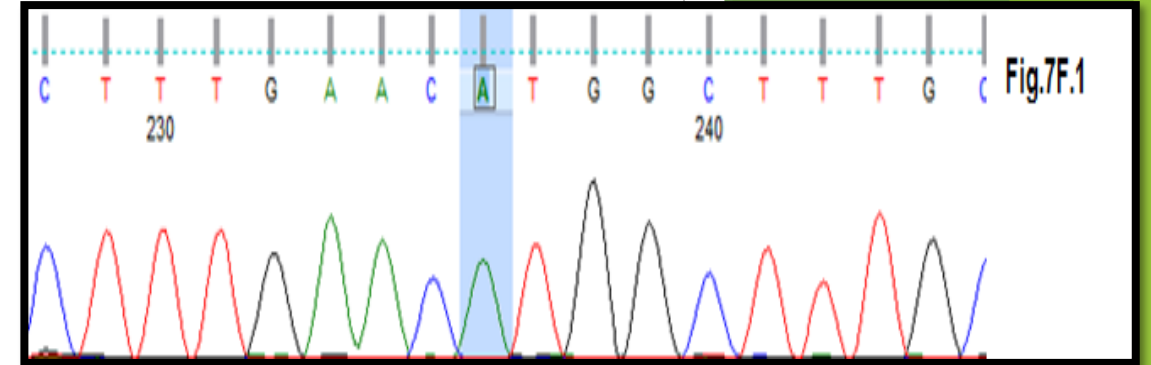
WThSPOCKex7      GGCAGAAAGCCCCAGCCCCATTGTCGTTCGTGTTTGTCTTTCTCTAGCCTGCACAGACA
hSPOCK1TT12ex7  GGCAGAAAGCCCCAGCCCCATTGTCGTTCGTGTTTGTCTTTCTCTAGCCTGCACAGACA
                  *****

WThSPOCKex7      AGGAGTTGCGGAACCTTGCTCCCGGCTGAAGGATTGGTTTGGAGCTCTCCACGAGGATG
hSPOCK1TT12ex7  AGGAGTTGCGGAACCTTGCTCCCGGCTGAAGGATTGGTTTGGAGCTCTCCACGAGGATG
                  *****

WThSPOCKex7      CGAACAGAGTCATCAAGCCCACCAGCTCCAACACAGCCCAGGCCGTAAGACCATTTTAA
hSPOCK1TT12ex7  CGAACAGAGTCATCAAGCCCACCAGCTCCAACACAGCCCAGGCCGTAAGACCATTTTAA
                  *****

WThSPOCKex7      ATATCACATTTCCCTCAATTTATTAGACATTGATTTAGGGTTAGCAATATCATTGGGGGT
hSPOCK1TT12ex7  ATATCACATTTCCCTCAATTTATTAGACATTGATTTAGGGTTAGCAATATCATTGGGGGT
                  *****

WThSPOCKex7      GAAAAACACCCATTACATTAAATATACTTTGACTTTAAATATGTCCTCAATCTCAAAA
hSPOCK1TT12ex7  GAAAAACACCCATTACATTAAATATACTTTGACTTTAAAT-----
                  *****
    
```



En el electroforetograma se observa pico homocigoto

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Fig.7E

```

WThSPOCKex6      TGTTAAGTTTCATATTAATAATTTTATTTTAGAAATAGTGACAGTAGGGTTTACCATCAT
hSPOCK1TT7ex6    -----AATTTTATTTTAGAAATAGTGACAGTAGGGTTTACCATCAT
                  *****

WThSPOCKex6      TAAAGGAAGTCTTCTAGGGCTTCCACAGTGTTTTTAGAAAGTTATCCTCTGCATTTGGTAA
hSPOCK1TT7ex6    TAAAGGAAGTCTTCTAGGGCTTCCACAGTGTTTTTAGAAAGTTATCCTCTGCATTTGGTAA
                  *****

WThSPOCKex6      AATATAAAAGGCCATTTCCTATTTAGTATTCTGTAATTGAGACCTCTACCTGAGGTCGAC
hSPOCK1TT7ex6    AATATAAAAGGCCATTTCCTATTTAGTATTCTGTAATTGAGACCTCTACCTGAGGTCGAC
                  *****

WThSPOCKex6      CTCTCCCTGCTTTGICTTTGCTTTTGTGAAGCAAAGGGCACTGCTGTTTCTTAGGAGGCG
hSPOCK1TT7ex6    CTCTCCCTGCTTTGICTTTGCTTTTGTGAAGCAAAGGGCACTGCTGTTTCTTAGGAGGCG
                  *****

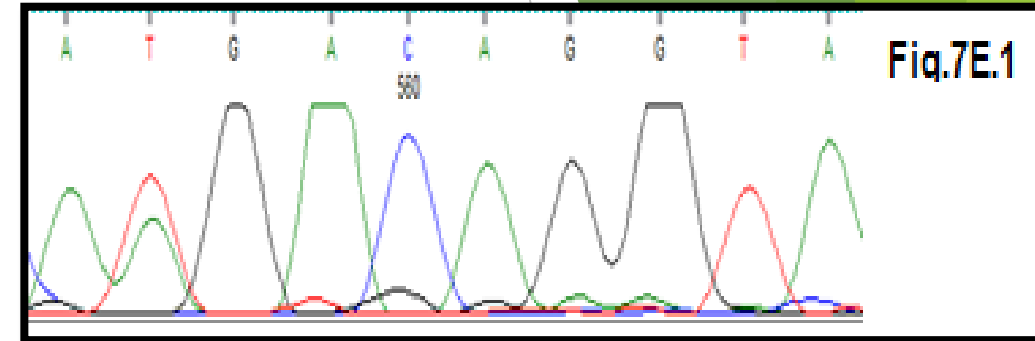
WThSPOCKex6      GGGTAGGGGCTGTTATGGCTGCATTCTTAAGACCTGTTGTGCTCTCTTTTGCAGTGCA
hSPOCK1TT7ex6    GGGTAGGGGCTGTTATGGCTGCATTCTTAAGACCTGTTGTGCTCTCTTTTGCAGTGCA
                  *****

WThSPOCKex6      AATGGAGTTCCTAGCTTGTCTACTGGCAAAGCCTCGCCACCCCTCTGTGATGGGCCCT
hSPOCK1TT7ex6    AATGGAGTTCCTAGCTTGTCTACTGGCAAAGCCTCGCCACCCCTCTGTGATGGGCCCT
                  *****

WThSPOCKex6      GTCCCTGTCTCCCAGAGCCTGAGCCACCAAAGCACAAGGCAGAAAGGAGTGGTGAGTGAG
hSPOCK1TT7ex6    GTCCCTGTCTCCCAGAGCCTGAGCCACCAAAGCACAAGGCAGAAAGGAGTGGTGAGTGAG
                  *****

WThSPOCKex6      GGTTTCCTTCAGAGAATTCGTGGGCAGGAATGGGGGGTCCACAGAGGGTTGATGTGGCCGA
hSPOCK1TT7ex6    GGTTTCCTTCAGAGAATTCGTGGGCAGGAATGGGGGGTCCACAGAGGGTTGATGTGGCCGA
                  *****

WThSPOCKex6      GCTCTGTCCCAGGCACTAGGAACAAACTGGAGAAATGAGCAGACATGACAGGTAAGTACT
hSPOCK1TT7ex6    GCTCTGTCCCAGGCACTAGGAACAAACTGGAGAAATGAGCAGACATGACAGGTAAGTACT
                  *****
    
```



Pico heterocigoto, el alineamiento se hizo con el alelo WT

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Variaciones en las regiones intrónicas

Variaciones encontradas en las regiones intrónicas

2	3	4	5	6	7	8	9	10-11
	c.187-437 A>G			c.589+115 T>A	c.590-78G>A		c.991+71T>C	c.992-43delA
	MAF:0,50			MAF:0.33	MAF: 0,50		MAF: 0,34	MAF 0,48
	Heterocigoto			Heterocigoto	Homocigoto		Heterocigoto	rs3217011
	rs6596370			rs718703				

Variaciones intrónicas encontradas en zonas aledañas a exones de algunos tejidos tumorales.

MAF: frecuencia alélica mínima

rs: referencia del SNP

A pesar que no se encontraron variaciones codificantes, *SPOCK1* ha sido implicado como oncogen y como oncoproteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

European Review for Medical and Pharmacological Sciences

2018; 22: 637-644

Reduced SPOCK1 expression inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and migration through Wnt/ β -catenin signaling

T. WANG¹, X. LIU¹, Q. TIAN¹, T. LIANG¹, P. CHANG²

¹Department of Thoracic Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing, China

²Department of Stomatology, Chinese PLA General Hospital, Beijing, China

La revisión literaria realizada demuestra la relación entre *SPOCK1* y el cáncer

Up-regulation of SPOCK1 induces epithelial–mesenchymal transition and promotes migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma

Xiaopeng Song^{1,2} · Ping Han¹ · Jingmei Liu¹ · Yunwu Wang¹ · Dongxiao Li¹ · Jiayi He¹ · Jin Gong¹ · Mengke Li¹ · Wei Tu¹ · Wei Yan¹ · Mei Liu¹ · Huanjun Huang¹ · Dean Tian¹ · Jiazhi Liao¹



Research Paper

SPOCK1 Overexpression Confers a Poor Prognosis in Urothelial Carcinoma

Li-Jung Ma¹, Wen-Jen Wu^{2,3,4,5,6}, Yu-Hui Wang⁷, Ting-Feng Wu⁸, Peir-In Liang⁹, I-Wei Chang¹⁰, Hong-Lin He¹⁰, Chien-Feng Li^{1,8,11,12,13}✉

Drug Design, Development and Therapy

Dovepress

open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

SPOCK1 promotes tumor growth and metastasis in human prostate cancer

This article was published in the following Dove Press journal:
Drug Design, Development and Therapy

18

ONCOLOGY REPORTS 35: 3566-3576, 2016

SPOCK1 promotes the proliferation, migration and invasion of glioma cells through PI3K/AKT and Wnt/ β -catenin signaling pathways

JINGHUI YANG¹, QIWEI YANG², JING YU³, XIMENG LI⁴, SHAN YU⁵ and XUEWEN ZHANG¹

CONCLUSIONES

Los resultados indican que *SPOCK1* es un oncogen con una participación significativa en diferentes tipos de cáncer. Por tanto, un candidato en estudios adicionales en el CCR.

Los resultados excluyen la implicación de variantes codificantes en la etiopatología del CCR; por lo tanto, este estudio podría descartar la región exónica y los sitios de *splicing* como posibles marcadores moleculares de la enfermedad.

A partir de los experimentos realizados y la literatura revisada, se sugiere que el método no comercial más eficiente para realizar extracción de ADN de tejido es el *high salting out*.

Con respecto a la población se demuestra un aumento de casos de cáncer colorrectal en población menor de 40 años.

PERSPECTIVAS

En este marco se sugiere que variaciones en otras regiones genómicas asociadas a *SPOCK1* (e.g reguladoras) podrían relacionarse con el fenotipo. Por consiguiente, se recomienda en estudios futuros la secuenciación del promotor de este gen (mínimo 1000 pb) en mayor cantidad de muestras que permitan evidenciar un estudio estadístico. De encontrarse se recomienda iniciar estudios funcionales de luciferasa para reconocer la fijación de factores de transcripción en la región promotora que contribuyan a su sobre expresión.



GRACIAS



Centro de Investigación
en Genética y Genómica



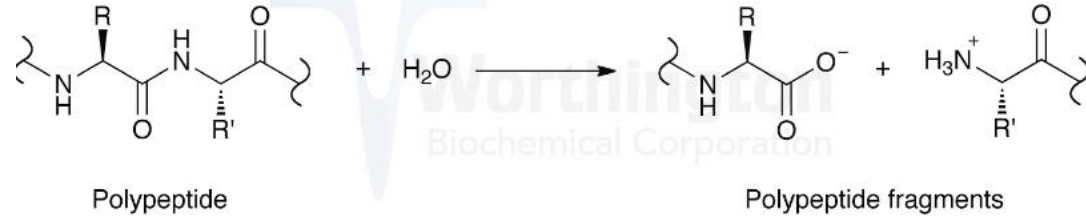
EXTRACCIÓN DE ADN SALTING-OUT

Adición de sales caotrópicas que favorecen la denaturalización de proteínas de membrana



<http://www.pquimicas.com/productos/61.html>

Adición de proteasa



R = aromatic or aliphatic (preferred)

<http://www.worthington-biochem.com/PROK/>

NaCl

Precipitación del ADN



<https://www.slideshare.net/Werwita/extraccin-de-adn-70065140>

Lavado del pellet

Resuspensión del pellet

Cuantificación *Nano-drop*



<https://www.thermo.com/blog/proteomics/protein-quantification-with-the-nanodrop-one/>