



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

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



*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

Asesor interno

Martha Lucía Posada Buitrago, PhD

Asesores externos

Paul Laissue Hormaza, MD, PhD, HDR

Carolina Sierra, MD, MSc, PhD(c)

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
PROYECTO DE GRADO  
BOGOTÁ  
ENERO DEL 2019

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo en primer lugar a mí familia, lo más valioso en mi vida, el amor hecho personas, la magia de sus espíritus, las ocurrencias de mi papá y la ternura de mi mamá, el apoyo de los viejos zorros en todos los momentos, la comprensión de mis hermanos Jorge, Geraldine y Jhon y su particular manera de darme fortaleza. A todas las personas que han hecho parte de este camino. Por último y por supuesto, al TOC por mostrarme quien vale la pena estar a mi lado, por enseñarme que la felicidad no puede depender de los demás y que la vida no se detiene por nadie.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional, por estar conmigo en todo momento. Agradezco infinitamente al Doctor Paul por abrirme las puertas del CIGGUR y permitirme aprender y conocer el mundo de la investigación, por enseñarme a escribir y darle una nueva perspectiva a mi vida. A la Doctora Dora, por ser una gran maestra, un excelente ser humano y transmitirme esa energía tan bonita que irradia todos los días, por enseñarme la belleza de la genética. A la Doctora Martha Posada, por ser mi guía, por entenderme apoyarme y enseñarme el lado menos cuadriculado de la vida y de la investigación, gracias por siempre estar ahí. A la Doctora Carolina Sierra por dedicar tanto tiempo para que yo mejorara, por su paciencia y gran cantidad de conocimientos que pude adquirir de ella. A la Doctora Danyela, por ayudarme tanto, por ser tan sencilla, por permitirme crecer como persona y mostrarme la bonita perspectiva de la bacteriología en el campo de la genética. A todo el CIGGUR por ser parte de este bonito camino. Simplemente a todos muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

Resumen .....	7
1. Introducción.....	9
2. Objetivos.....	10
2.1 Objetivos Generales.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. Antecedentes.....	11
4. Marco referencial.....	19
4.1 Generalidades.....	19
4.2Causas.....	19
4.3 Epidemiología.....	20
4.4 Signos y síntomas.....	18
4.5 Clasificación tumoral.....	22
4.6 Inmunohistoquímica.....	22
4.7 Tratamiento.....	23
4.8 Fisiopatología del CCR.....	23
4.9 Impacto proteico de los tipos de mutaciones puntuales	
5. Descripción del gen <i>SPOCK1</i> .....	24
5.1 Matriz extracelular y <i>SPOCK1</i> .....	26
6. Materiales y métodos.....	27
6.1 Consideraciones éticas .....	27
6.2 Extracción de ADN en sangre periférica.....	30
6.3 Extracción de ADN en tejidos tumorales y tejidos adyacentes.....	31
6.3.1 Día 1.....	31
6.3.2 Día 2.....	31
6.4 Amplificación y secuenciación de la región codificante del gen <i>SPOCK1</i> .....	31
6.5 Diseño de primers.....	32

6.6 Amplificación de la región codificante de <i>SPOCK1</i> .....	33
6.7 Programación del termociclador.....	33
6.8 Electroforesis en gel de agarosa.....	33
6.9 Secuenciación de Sanger.....	34
6.10 Proceso de purificación en <i>Elimbiopharmaceuticals</i> .....	34
6.11 Lectura de secuencias.....	34
7. Resultados.....	35
7.1 Datos demográficos.....	35
7.2 Cuantificación de ADN.....	35
7.3 PCR y corrido electroforético .....	35
7.4 Secuenciación y alineamiento.....	40
8. Discusión.....	51
9. Conclusiones.....	55
10. Perspectivas.....	55
11. Referencias bibliográficas.....	56
12. Anexos.....	71

### Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de genes que participan en diferentes tipos de cáncer..	12
Tabla 2. Universo, población muestra.....	27
Tabla 3. Descripción anatomopatológica de los tejidos tumorales.....	28
Tabla 4. Secuencias de primers para cada exón.....	32
Tabla 5. Reactivos utilizados en la PCR convencional.....	33
Tabla 6. Programación del termociclador.....	33
Tabla 7. Temperaturas de anillamiento de cada exón.....	36
Tabla 8. Variaciones de secuencia nucleotídica encontradas.....	31



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

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

RESUMEN

El cáncer colorrectal es una enfermedad de amplia distribución mundial con índices de morbilidad elevados. Su origen es multifactorial, por lo que es imprescindible el estudio de múltiples genes junto con factores ambientales que inciden en su causa para entender la etiología de la patología. *SPOCK1* es un gen relacionado con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Variaciones en su secuencia nucleotídica podrían estar relacionadas con el fenotipo de la enfermedad. En el presente estudio se realizó la genotipificación de la región codificante del gen *SPOCK1* en tejidos tumorales de pacientes con cáncer colorrectal que ingresaron al servicio de cirugía del hospital de Méderi. Para esto se realizó la extracción de ADN en sangre, tejidos adyacentes y tejidos tumorales de 39 pacientes. La amplificación se realizó con PCR convencional y el tamaño de los amplicones confirmado por electroforesis en gel de agarosa para su posterior secuenciación. Con ayuda de herramientas bioinformáticas como *FinchTV*, *Muscle Sequence alignment*, y bases de datos como *Ensembl.org* se realizó lectura de las secuencias. Se encontraron polimorfismos no codificantes en las regiones intrónicas. Sin embargo, en la región codificante no se

encontraron variaciones, por lo que se concluye que el fenotipo del CCR no tiene relación con mutaciones o polimorfismos de la región codificante de *SPOCK1*.

**Palabras clave:** *Cáncer colorrectal, genotipificación, bioinformática, SPOCK1*

**Estudiante:** Orlando Alfredo Pineda Arrieta

**Docentes:** Dr. Paul Laissue Hormaza

Dra. Martha Lucia Posada Buitrago

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Agosto de 2018**

## 1. INTRODUCCIÓN

¿Existen variantes de secuencia en la región codificante de *SPOCK1* potencialmente relacionadas con el fenotipo del cáncer colorrectal?

Según la *American cancer society* el cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad con altos índices de morbilidad, siendo el tercer cáncer con más casos registrados por año a nivel mundial<sup>1</sup>. La mayoría de los diagnósticos se realizan en estadios avanzados de la enfermedad, por lo que es necesario recurrir a tratamientos invasivos. Estos procedimientos al igual que cualquier cirugía implican otros riesgos como las hemorragias e infecciones<sup>2</sup>.

El avance de la tecnología, especialmente en materia de biología molecular para el seguimiento de la enfermedad, ha permitido que la utilización de los procedimientos invasivos se reduzca<sup>3</sup>. Sin embargo, la complejidad de la biología molecular del cáncer subraya la necesidad de fortalecer la búsqueda de nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico. Además, entre el 10% y el 30% de los pacientes con cáncer colorrectal poseen antecedentes familiares, por lo que la descripción de marcadores moleculares facilita la implementación de medidas preventivas de asesoramiento genético.<sup>4</sup>

El presente estudio es un aporte a la búsqueda de marcadores moleculares del cáncer colorrectal, para ello se genotipificó la región codificante de tejidos tumorales procedentes de 39 pacientes con esta patología. Este proceso tiene como fin la búsqueda de variantes de secuencia que puedan estar potencialmente relacionadas con el fenotipo tumorogénico. *SPOCK1* ha sido propuesto como un oncogen que da lugar a una oncoproteína<sup>5, 6, 7, 8, 9</sup>, por lo que su estudio es el siguiente paso para proponerlo como marcador molecular candidato.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

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

### 2.2 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.

### 3. ANTECEDENTES

La palabra cáncer es atribuida a Hipócrates en el siglo V a.C. quien diferenció dos clases de carcinomas rectales, los formadores de úlceras y los no formadores de úlceras. Las primeras referencias sobre el cáncer colorrectal fueron encontradas por George Ebers en un papiro del año 1500 a.C. perteneciente al Nuevo Reino de Egipto<sup>10</sup>. En la actualidad la comprensión del CCR en términos macroscópicos es imprescindible. Sin embargo, la biología molecular de la patología sigue siendo motivo de investigación. En un principio se intentó dar explicación a la función de diferentes oncogenes retrovirales, pero hasta 1979 se logró la transmisión de ADN murino tratado con carcinógenos químicos. Este fue transfectado a células de fibroblastos de ratón (NIH3T3), produciendo focos de células aberrantes. El estudio concluyó que los procesos carcinogénicos estaban fuertemente relacionados con la alteración del ADN de las células diana<sup>11</sup>. Esto permitió describir posteriormente la existencia de oncogenes humanos<sup>12</sup>. En 1982 fue posible aislar el primer oncogen humano (Harvey ras gene, *H-ras*) a partir de células de cáncer de vejiga T24 y tumores extraídos quirúrgicamente. Los genes fueron activos en células de tejido tumoral pero no en células normales, identificando mutaciones de tipo somático<sup>13</sup>. El hallazgo de oncogenes humanos promovió la investigación en genes supresores de tumores. Para 1971 se conocía la existencia del gen *Rb1* (gen supresor de tumores) que producía la proteína del retinoblastoma (Rb). Sin embargo, su participación en procesos tumorogénicos se desconocía. Para 1987 se logró el clonaje de cDNA de *Rb1* demostrando su expresión como una fosfoproteína nuclear de 110 KDa. Estudios adicionales encontraron, en el aislamiento de material genético de tumores oculares de retinoblastoma, variaciones de secuencia nucleotídica. Estas generaban una pérdida de su función supresora. La proteína es capaz de unirse a factores de transcripción como E2F deteniendo el ciclo celular en la fase G1<sup>14, 15</sup>. El gen *P53* fue descubierto a finales de los 70s. Sin embargo su acción supresora se conoció hasta 1989. Mutaciones de su secuencia confieren alta susceptibilidad a desarrollar cáncer. Al igual que la proteína Rb, la P53 se encuentra aumentada en presencia de alteraciones del ADN dando una regulación transcripcional. Esto detiene el ciclo celular en fase G1<sup>16, 17</sup>. El conocimiento de los genes supresores de tumores permitió identificar

que la acción aditiva de los mismos puede dar lugar a diferentes tipos de cáncer como el CCR<sup>18</sup>. En 1990 Fearon y Vogelstein establecieron la secuencia adenoma-carcinoma (epitelio normal, adenoma inicial, adenoma displásico y carcinoma). Esta evolución consta de dos mecanismos principales: la inactivación del gen *APC* y la supresión de la familia de genes *Mismatch* (MMR) (fig.1)<sup>19, 20, 21</sup>

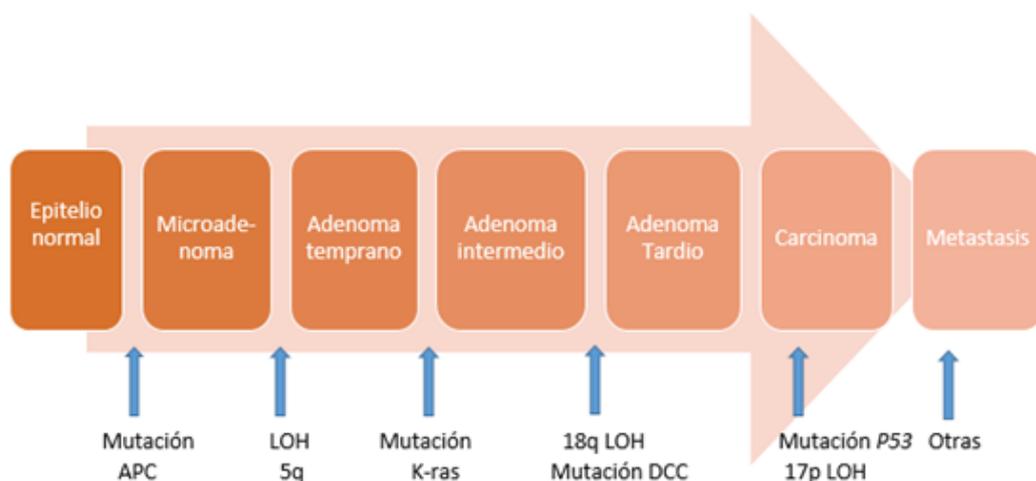


Figura 1. Secuencia Adenoma- Carcinoma. LOH (Loss of heterozygosity), APC (Adenomatous polyposis coli), DCC (Deleted in colorectal carcinoma). Imagen adaptada de Fearon y Vogelstein.<sup>19,20 y 21</sup>

En la actualidad se conoce una amplia cantidad de genes implicados en la fisiopatología del CCR, las técnicas en inmunohistoquímica y los avances en biología molecular han hecho posible la identificación de nuevos oncogenes<sup>22</sup>. A continuación se muestran algunos de los genes que participan en la fisiopatología del cáncer como el colorrectal incluyendo a *SPOCK1* (tabla 1).

Tabla1. Descripción de algunos genes implicados en la fisiopatología del cáncer como el colorrectal incluyendo a *SPOCK1*.

Gen	Descripción	autores
<i>K-RAS</i>	Se localiza en el cromosoma 12 y participa en las vías de señalización PI3K/ PTEN/AKT, estudios realizados en 2016 en 109 adenocarcinomas primarios colorrectales mostraron 46 pacientes con mutaciones en la región codificante principalmente en aquellos mayores de 40 años. Este gen es utilizado como marcador de respuesta al tratamiento <sup>23</sup> .	Roa et al.,2016

<p><i>APC</i></p>	<p>Por sus siglas en inglés <i>Adenomatous polyposis coli</i> es un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 5 y aparece en más del 80% de los casos de cáncer colorrectal esporádico. En 2014 Rúa et al., genotipificó el exón 15 del gen <i>APC</i> (región con mayor cantidad de mutaciones reportadas) en tejidos tumorales de 30 pacientes con cáncer colorrectal esporádico, encontrando mutaciones en el 26,7 % de los casos<sup>24</sup>. Sin embargo estudios realizados por Vasovcak et al., en 2011 con 103 pacientes demostraron hasta un 60% de mutaciones en los casos, estas variaciones dan lugar a una proteína truncada con pérdida de su función<sup>25</sup>. En la revisión realizada por Zhang et al., en 2017, se propone que la disrupción de la interacción de la región terminal de la proteína truncada APC con <math>\beta</math>-catenin reduce la interacción con la E-Cadherinas promoviendo los procesos de metástasis.<sup>26</sup></p>	<p>Rúa et al.,2014 Vasovcak et al., 2011 Zhang et al., 2017</p>
<p><i>SMAD4</i></p>	<p>Es un gen supresor de tumores ubicado en el cromosoma 4, da lugar a una proteína de 522 aminoácidos que hace parte de la ruta de señalización del TGF-<math>\beta</math> (factor de crecimiento transformante beta), el cual se une a la superficie de la célula activando una serie de proteínas pertenecientes a la familia SMADS específicamente SMAD4 que se une a dominios específicos del ADN regulando procesos de proliferación y división celular, por lo que cumplen con funciones inhibitoras y activadoras<sup>27</sup>. Estudios realizados por Zhang et al., en el 2014 demostraron que el silenciamiento de <i>SMAD4</i> induce procesos de tumorigénesis, migración, invasión y resistencia a agentes quimioterapéuticos como el 5-fluorouracil en líneas celulares CT26 (proveniente de adenocarcinoma indiferenciado colónico murino), de tal forma que las líneas celulares a las que se les silenció el gen presentaban mayor confluencia celular en comparación</p>	<p>Zhao et al., 2018 Zhang et al.,2014</p>

	al control. Además, presentaban activación de la ruta AKT inhibiendo finalmente la apoptosis <sup>28</sup> .	
<i>FBXW7</i>	Es un gen supresor de tumores ubicado en el cromosoma 4 que da lugar a la proteína de reconocimiento del sustrato SCF ( <i>Skp1-Cul1-F-box-protein</i> ) parte fundamental del complejo E3 ubiquitina ligasa, que regula negativamente diferentes oncoproteínas como la ciclina E que participa en el ciclo celular (transición fase G1/S) <sup>29</sup> . Un estudio realizado por Korphaisarn et al., entre 2009 y 2015 que incluía 855 pacientes con cáncer colorrectal encontró que <i>FBXW7</i> se encontraba afectado por variaciones <i>missense</i> en el 7,5% de los casos (527 pacientes) <sup>30</sup> . Sin embargo estudios realizados previamente por Akhoondi et al., utilizando 1556 pacientes con diferentes tipos de cáncer entre ellos 523 con cáncer colorrectal encontró una incidencia de mutaciones <i>missense</i> en este gen del 43% y en los pacientes con cáncer colorrectal en un 9%. Se evidenció un empeoramiento de los pacientes con mutaciones <i>missense</i> por lo que permitió concluir que la sobrevida de los individuos con esta variación es menor <sup>31</sup> .	Korphaisarn et al.,2017 Akhoondi et al., 2007 Hung et al.,2018
<i>BRAF</i>	Es un gen ubicado en el cromosoma 7, da lugar a la proteína B-RAF, la cual participa en la señalización del EGFR (factor de crecimiento epidérmico), que finalmente da lugar a proliferación celular seguida de angiogénesis. Esta ruta no se activa sin la unión del EGFR con su respectivo receptor. Sin embargo mutaciones en el gen <i>BRAF</i> llevan a procesos tumorigénicos <sup>32</sup> . Este gen hace parte de la ruta MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), comenzando con una GTPasa la cual activa la familia de proteínas RAS que incluye a B-RAF, esta fosforila la MEK1/2 (quinasa fosforilada y activada) que a su vez fosforila la ERK (quinasa regulada por señales extracelulares), que tiene la capacidad de activar diversidad	Barras et al., 2015 Strickler et al., 2017 Kayhanian et al., 2017

	<p>de factores de transcripción induciendo el ciclo celular con consecuente proliferación<sup>33</sup>. Mutaciones oncogénicas en <i>BRAF</i> se encuentran en un 10% de los casos de CCR estudiados, ensayos clínicos realizados por Kayhanian entre el 2010 y 2014 en 503 pacientes demostró que el 12%(59 individuos) de ellos tenían mutaciones en este gen, para cada uno de los pacientes fue realizado un expediente que incluía datos demográficos y tratamiento, de tal forma que fue posible evaluar la refracción de los pacientes con mutaciones en <i>BRAF</i> a los tratamientos quimioterapéuticos y al ser un estudio prospectivo disminución en la sobrevida en comparación a los pacientes <i>wild type</i> (normales) con respecto a este gen<sup>34</sup>.</p>	
<p><i>PIK3CA</i></p>	<p>Es un gen ubicado en el cromosoma 3 que da lugar a la subunidad catalítica de la PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa), mutaciones en este gen han sido reportadas en 10 a 20% del total de casos de cáncer colorrectal, siendo los exones 9 y 20 los que poseen mayor cantidad de variaciones registradas<sup>35</sup>. Esta proteína participa como segundo mensajero en la ruta PI3K/AKT inhibiendo la apoptosis. Estudios clínicos realizados por Wang et al., en 2018 evaluaron la efectividad de tratamientos quimioterapéuticos de primera línea como <i>FOLFOX</i> en 440 pacientes con cáncer colorrectal, encontrándose que 9,55% (42 pacientes) presentaban mutaciones en <i>PIK3CA</i> con refracción al tratamiento. Además fue evaluado el comportamiento de líneas celulares de CCR como HCT116 en presencia de <i>FOLFOX</i> y perifosin (agente quimioterapéutico) con técnicas moleculares como PCR en tiempo real y western blot, demostrando una disminución de la apoptosis por sobreexpresión de la proteína AKT y AKT fosforilada en contraste con las células <i>wild type</i> (sin mutación en la secuencia del gen <i>PIK3CA</i>) lo que</p>	<p>Cathomas et al.,2014 Wang et al., 2018</p>

	demuestra la resistencia que confiere esta variación en la patología <sup>36</sup> .	
<i>GNAS</i>	Es un gen ubicado en el cromosoma 20 que codifica para la subunidad alfa de la proteína G, esta es expresada siempre que existan señales de transducción transmitidas por hormonas y factores de crecimiento, la mutación característica de este gen se produce en el codón 201, lo que conlleva a la activación del gen de la adenilato ciclasa inactivo que al unirse a la subunidad alfa se activa y da lugar al cAMP activando la PKA (proteína quinasa A) y finalmente la fosforilación de diferentes sustratos entre ellos factores de transcripción que aumentan la proliferación <sup>37</sup> . Un estudio realizado por Zauber et al., en 2016 demuestra la presencia de la mutación en el gen <i>GNAS</i> en 10 de 50 tejidos de tipo adenocarcinoma vellosos de cáncer colorrectal. La principal característica de estos 10 tejidos era su cobertura de más del 50% de mucina <sup>38</sup> . Estudios realizados previamente por Nishikawa et al., en 2013 utilizando 186 tejido tumorales en los que encontró 16 adenocarcinomas mucinosos de bajo grado con mutaciones en el gen <i>GNAS</i> concluyen que estas variaciones son órgano específicas y se encuentran principalmente en tejidos productores de mucina. Sin embargo su causa aún es incierta. Además se realizaron ensayos en líneas celulares de cáncer colorrectal HT29 con <i>GNAS</i> mutante y <i>wild type</i> , evidenciando un aumento del crecimiento celular y producción de mucina <sup>39</sup> .	Pietrantonio et al., 2016 Zauber et al., 2015 Nishikawa et al., 2013
<i>SPOCK1</i>	También llamado testican 1, es un gen ubicado en el cromosoma 5, da lugar a la proteína SPOCK1, se hará énfasis en la siguiente sección. Se ha visto implicada en diversidad de procesos tumorigénicos en varios tipos de cáncer como el pancreático, estudios realizados por Damhofer et al., en 2013 evaluaron la interacción entre células Capan-2 cells (línea celular de cáncer pancreático)	Damhofer et al., 2013 Wang et al., 2018 Yang et al., 2016 Chen et al., 2017 Song et al., 2015 Zhao et al., 2016

y un microambiente que simulaba los compartimientos estromales a partir de líneas celulares de fibroblastos (el tumor se da siempre que haya interacción con la matriz extracelular). Se observó la formación de esferas similares a un tumor epitelial pancreático en comparación al control que carecía de un co-cultivo de fibroblastos, además, el estudio utilizó 36 tejidos tumorales pancreáticos a los que se les realizó inmunohistoquímica con la adición de anticuerpos anti-SPOCK1, evidenciando su expresión extracelular en comparación a tejidos sanos<sup>40</sup>.

También se ha visto fuertemente implicado en cáncer de pulmón, ensayos realizados por Wang et al., en 2018 evaluaron la expresión de ARN mensajero producto de *SPOCK1* en tejidos de cáncer de pulmón de células no pequeñas y tejido adyacente a la neoplasia. La extracción de ARN total, la retrotranscripción por RT-PCR (PCR con retrotranscriptasa) y la cuantificación por PCR en tiempo real, utilizando *primers* específicos para *SPOCK1* permitieron concluir que la expresión de ARN mensajero en tejidos tumorales es mayor que en tejido adyacente no afectado por el cáncer, este hecho motivó a los investigadores a realizar estudios adicionales en líneas celulares provenientes de neoplasias pulmonares como A549 y HCC-827. Con la utilización de si-SPOCK1 (*small interfering RNA*) silenciaron la expresión del gen seguido de la medición del crecimiento celular por MTT (ensayo colorimétrico relacionado al metabolismo celular) encontrando una disminución significativa con respecto al control (células A549 Y HCC-827 transfectadas con *si-RNA negative control*)<sup>41</sup>.

A nivel cerebral, experimentos realizados por Yang et al., en 2016 utilizando las líneas celulares de glioma U251 y U87MG demostraron que la sobreexpresión de *SPOCK1*

facilita la proliferación y migración en células de glioma, para esto la línea U251 fue transfectada con un vector de expresión (pEGFP-N1) que contenía el cADN completo de *SPOCK1* y Mediante *transwell chambers* (ensayo de migración e invasión celular) se demostró la participación de este gen en procesos metastásicos. La línea U87MG fue transfectada con si-RNA contra *SPOCK1*, encontrando en los ensayos de proliferación celular realizados con el kit comercial *cell-counting kit 8* (homologo a los ensayos MTT) inhibición de la proliferación celular<sup>42</sup>.

Con respecto al cáncer gástrico, estudios realizados por Chen et al., en 2017 utilizando tejidos de adenocarcinoma primario gástrico y tejido adyacente al afectado de 102 pacientes, encontraron a partir de inmunohistoquímica y *western blot* una sobreexpresión del gen en la neoplasia con respecto al tejido sano. Además, evaluaron en líneas celulares provenientes de cáncer de estómago (AGS, SNU216, SGC7901, MKN45, MGC803 y KATO-III) con el silenciamiento del gen, transfectandolas con *sh-SPOCK1* (*short hairpin RNA SPOCK1*) la disminución de los procesos de migración y proliferación *in-vitro*, hecho que subraya la participación del oncogén en metástasis<sup>43</sup>.

En el esófago, ensayos generados por Song et al., en 2015 en líneas celulares de carcinoma esofágico de epitelio escamoso Eca 109, se determinó la interacción de la oncoproteína con las fibras de F-actina del citoesqueleto celular, evidenciando un cambio conformacional que terminaba en la separación de baso-lateral apical de este epitelio, esto se demostró con el silenciamiento del gen con *si-RNA* y otro cultivo de la misma línea sin silenciar. Se observó el aumento de la expresión de marcadores mesenquimales (e.g vimentina) y la disminución de los marcadores epiteliales (e.g E-cadherina), lo que permite

	<p>concluir que además influye en el proceso de transición epitelio mesénquimal, hecho que permite desdiferenciarlas y facilitar su migración para posterior invasión<sup>44</sup>.</p> <p>Otro hecho a resaltar sobre este gen, es su capacidad de activar la vía PI3K/AKT inhibiendo la apoptosis, experimentos desarrollados por Zhao et al., en 2016 encontraron que al silenciar el gen con <i>sh-SPOCK1</i> en la línea celular de CCR HCT116, disminuían en <i>western blot</i> los niveles de PI3K y AKT fosforilado en comparación al control (células HCT116 transfectadas con <i>sh-RNA</i> aleatorio) <sup>45</sup>.</p>	
--	--	--

## 4. MARCO REFERENCIAL

### 4.1 Generalidades

El término neoplasia define la proliferación anormal de las células de un tejido. Se clasifican en malignas y benignas. Todas las neoplasias de tipo maligno se denominan cáncer<sup>46</sup>. El adenocarcinoma constituye el 95% de los casos de cáncer colorrectal (CCR). Los tumores carcinoides desarrollados por las células productoras de hormonas a nivel intestinal, los tumores estromales producto de las células intersticiales de Cajal, los linfomas y los sarcomas representan el 5% <sup>47</sup>.

### 4.2 Causas

Uno de los principales factores de riesgo del CCR es la edad. El 3% de los casos ocurre antes de los 40 años, el resto de los casos (97%) después de esta edad<sup>48</sup>. Sin embargo, estudios epidemiológicos demuestran un incremento en la susceptibilidad al desarrollo de CCR en la población joven<sup>48, 49</sup>. Existen múltiples causas que contribuyen al origen del cáncer, como la herencia, (el 5% al 10% de los casos son hereditarios), la exposición prolongada a sustancias químicas, los procesos infecciosos (e.g. Epstein-Barr y *Helicobacter pylori*), las radiaciones ionizantes, entre otros, contribuyen al desarrollo de esta enfermedad. Los hábitos de vida como el consumo de alcohol (el cual produce inhibición de los

mecanismos de reparación del ADN), enfermedades como la colitis ulcerativa crónica, la dieta, la falta de ejercicio, predisponen para desarrollar el CCR<sup>50</sup>. Además se ha demostrado que el calcio reduce la hiperploriferación epitelial y su bajo consumo aumenta el riesgo de desarrollar adenomas<sup>51</sup>.

Son diversos los procesos moleculares que originan el CCR como: la metilación de los promotores de genes supresores de tumores que inactivan su expresión, cambios en la proteína *K-RAS* (la cual inicia una cascada de señalización que modifica la expresión de genes que participan en la regulación del ciclo celular, la migración, la proliferación, apoptosis y quimiotaxis) <sup>52,53</sup> y mutaciones en el gen *TP53* el cual participa en la respuesta celular frente a daños en el ADN ocasionando la apoptosis. *TP53* se encuentra mutado en el 42% de los casos de CCR<sup>54</sup>. La vía de señalización PI3K/AKT es estimulada por la activación de receptores de membrana tirosina quinasa fosforilando el receptor de insulina IRS, lo que genera cambios conformacionales en la subunidad p85 de la PI3K<sup>55</sup>. Las modificaciones estructurales permiten la unión de la subunidad catalítica p110 originando una PI3K activa. Este proceso termina con la aparición del segundo mensajero PIP3 que acciona la proteína AKT. Esta proteína participa a su vez en la inhibición de la apoptosis (unión AKT-BAX) y el crecimiento celular (activación de mTOR) <sup>56</sup>.

### **4.3 Epidemiología**

Según el Instituto Nacional de Cancerología (INC), a nivel mundial se presentan 17,2 casos de CCR por cada 100 000 habitantes<sup>57</sup>. Esta patología se ubica en el tercer lugar de incidencia, 663 000 casos corresponden a hombres y 571 000 corresponden a mujeres, de los cuales aproximadamente 8,2 casos del total, fallecen <sup>58</sup>. En Colombia, se presentan aproximadamente 4107 casos nuevos por año, lo que ubica esta enfermedad en el cuarto lugar de todos los tipos de cáncer <sup>59</sup>. Los países con mayores índices de morbilidad se sitúan en Europa y Norte América (fig. 2). Las tasas más bajas se encuentran en África y el sur de Asia. Sin embargo, estos indicadores están sujetos a la accesibilidad de la población a los servicios diagnósticos del CCR, como la colonoscopia<sup>60</sup>. Globocan estima un aumento significativo del número de casos de cáncer colorrectal para 2040(fig.3)<sup>61</sup>.

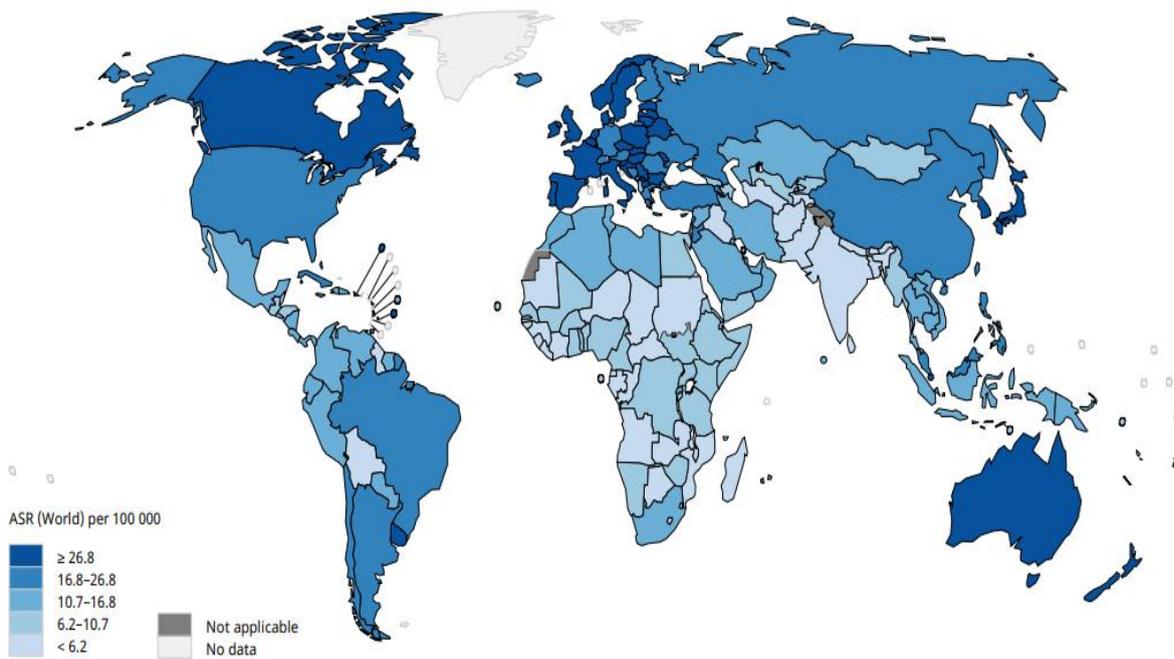


Figura 2. Tasas de incidencia de cáncer colorrectal en hombres y mujeres a nivel mundial. Fuente *World health organization, International Agency For Research on Cancer globocan, 2018* <sup>61</sup>.

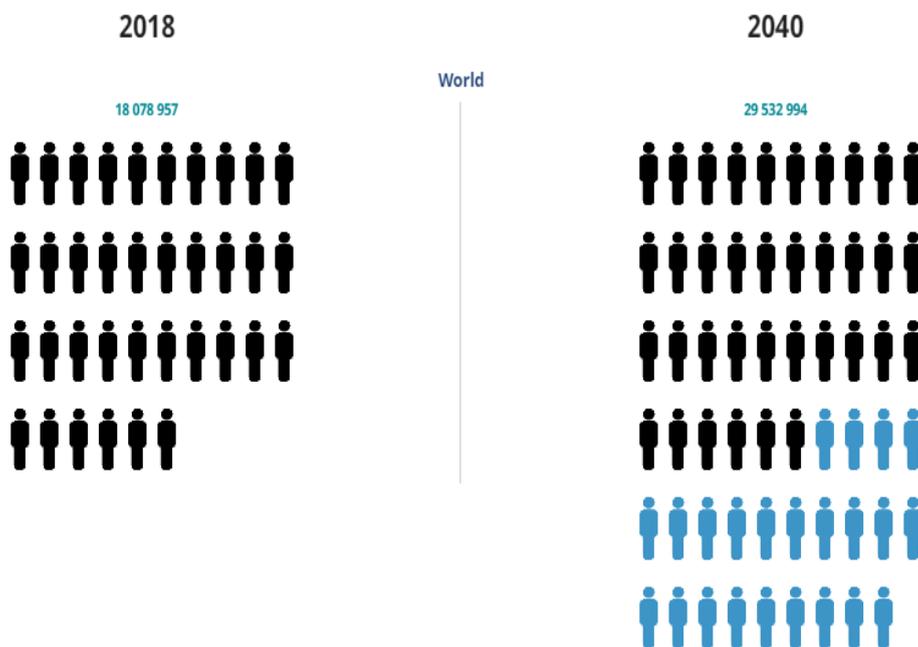


Figura 3. Proyección del aumento en número de casos de cáncer colorrectal para el 2040. Para 2018, 18 078 957 millones de casos reportados, al 2040 se espera un aumento del 63,1% es decir un total de 29 532 994 millones de casos. Fuente

World health organization, International Agency for Research on Cancer *globocan*, 2018 <sup>61</sup>.

#### **4.4 Signos y síntomas**

En el CCR la rectorragia es uno de los síntomas característicos, junto con los cambios en el flujo intestinal, la pérdida de peso y el dolor abdominal. La anemia por deficiencia de hierro, las masas palpables en la zona rectal y la fosa iliaca derecha, constituyen los principales signos clínicos para el médico<sup>62</sup>.

#### **4.5 Clasificación tumoral**

La clasificación TNM es un sistema utilizado para describir la extensión del tumor (T), la afectación o no de los ganglios (N), y la ausencia o presencia de metástasis (M). El sistema de clasificación de Dukes es homólogo al TNM, pero se diferencia por la nomenclatura pues en este caso se utilizan las letras A, B1, B2, C y D<sup>63</sup>. El primer estadio del CCR es el "0" llamado también carcinoma *in situ*. En el estadio I se produce invasión de la submucosa y la muscularis propia. El estadio II se caracteriza por una afectación de la subserosa además de la diseminación hacia tejidos adyacentes. En el estadio III se produce metástasis hacia diferentes ganglios linfáticos, principalmente a los perirrectales, (la sobrevida para estos pacientes a 5 años es del 40% al 72%). El estadio IV se caracteriza por metástasis a diferentes órganos<sup>64</sup>. Histológicamente el CCR se caracteriza por una formación glandular con debris necróticos y desmoplasia (exceso de tejido conectivo) <sup>65</sup>. La Organización Mundial de la Salud propone como variantes de la enfermedad: los adenocarcinomas mucinosos (caracterizados por largas estructuras glandulares con depósitos de mucina extracelular), los adenocarcinomas con células en anillo de sello (que se distinguen por la presencia de una gran vacuola mucinosa intracitoplasmática) y los carcinomas medulares (que estructuralmente poseen lamelas de células epiteliales neoplásicas con cromatina laxa y un gran nucléolo) <sup>66</sup>.

#### **4.6 Inmunohistoquímica**

Las técnicas de inmunohistoquímica son ampliamente utilizadas en el diagnóstico de diferentes patologías incluyendo el cáncer. Para el caso del CCR

las citoqueratinas CK20 y CK7 y el factor de transcripción CDX2 constituyen los marcadores más importantes<sup>67, 68</sup>.

#### **4.7 Tratamiento**

El tratamiento de elección del CCR depende del estadio y la localización. En una etapa inicial, el tratamiento se reduce a una escisión del tumor por métodos quirúrgicos<sup>69</sup>. En estadios avanzados es común el uso de 5-fluorouracil, un análogo de la pirimidina que interrumpe la síntesis de ADN y ARN. Sin embargo, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado diferentes agentes quimioterapéuticos y biológicos para el tratamiento del CCR (e.g. oxaliplatin, irinotecan, regorafenib, bevacizumab, aflibercept, cetuximab, panitumumab, entre otros)<sup>70</sup>.

#### **4.8 Fisiopatología del cáncer colorrectal**

El colon, en condiciones normales presenta un equilibrio en la expresión de sus genes (e.g. *APC*)<sup>71</sup>. Sin embargo, múltiples variables pueden generar alteraciones que aumentan la proliferación y disminuyen la apoptosis en las criptas intestinales, ocasionando focos de glándulas aberrantes que macroscópicamente se definen como pólipos<sup>72</sup>. En los casos de CCR hereditario se producen mutaciones germinales en genes como *APC* y *MYH*. Sin embargo, estas alteraciones no explican por completo la etiología de la enfermedad porque, en su gran mayoría, el CCR depende también de la interacción de factores epigenéticos y ambientales<sup>73</sup>. La poliposis adenomatosa familiar (FAP) es una enfermedad autosómica dominante predecesora del CCR, es el producto de mutaciones *nonsense* y *frameshift* del gen *APC* en el 95% de los casos. Se caracteriza por focos de criptas aberrantes y el desarrollo de múltiples adenomas en el periodo de la adolescencia. Como tratamiento preventivo a los pacientes afectados se les realiza una colectomía profiláctica, lo que disminuye el riesgo de ser diagnosticados con cáncer después de los 40 años<sup>74</sup>. Se han definido variantes representativas de la FAP: el síndrome de Gardner, que presenta hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina y osteomas en cráneo y huesos largos, el síndrome de Turcot caracterizado por la presencia de neoplasias malignas en colon y el sistema nervioso central (e.g el glioblastoma multiforme y el meduloblastoma)<sup>75</sup>.

#### **4.9 Impacto proteico de las mutaciones *nonsense*, *missense* y *frameshift*.**

Las mutaciones *nonsense* se caracterizan por variaciones puntuales que dan lugar a un codón de parada prematuro. El resultado es una proteína truncada. Se han descrito CGA (Arg) →TGA y CAG (Gln) →TAG como las dos variaciones más frecuentes<sup>76, 77</sup>. Al igual que las *nonsense* las mutaciones *missense* se caracterizan por variaciones puntuales. Sin embargo, estas producen el cambio de un aminoácido por otro<sup>78</sup>. Las mutaciones *frameshift* generan un desplazamiento del marco de lectura por adición o deleción de un número de nucleótidos que no es múltiplo de 3. La proteína producto es traducida completamente diferente a la original, generalmente con colas aberrantes en la porción c-terminal<sup>79</sup>.

### **5. DESCRIPCIÓN DEL GEN *SPOCK1***

*SPOCK1* (también llamado *Testican-1*) es un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 5. Consta de 11 exones con un total de 4846 pares de bases (pb) que se traduce en una proteína de 439 aminoácidos<sup>80</sup>. El primer exón no es codificante. Los exones 2,3 y 4 albergan los 2 primeros dominios de osteonectina. Los exones 5 y 6 codifican el dominio homólogo de Kazal y el tercero de osteonectina. El exón 8 codifica el cuarto dominio de osteonectina y el exón 10 el dominio CWCV<sup>81</sup>. La proteína fue aislada como un fragmento proteolítico del plasma seminal humano. *SPOCK1* se expresa en la matriz extracelular de diferentes tejidos (e.g. próstata, testículos, ovarios, entre otros). Estructuralmente posee un dominio homólogo a la folistatina (Kazal) y dominios de unión al calcio extracelular (osteonectina). En la región C-terminal se encuentra un dominio homólogo a la tiroglobulina con un motivo CWCV que posee dos sitios de anclaje a glicosaminoglicanos. Se ha descrito una modificación postraducciona de *SPOCK1* caracterizada por la unión de heparán sulfato y condroitín sulfato que le permiten interactuar con la membrana celular en diferentes tipos de cáncer<sup>82</sup>. El dominio osteonectina/SPARC facilita la unión al calcio extracelular. El dominio homólogo a la folistatina funciona como inhibidor de la serina proteasa (enzima proteolítica)<sup>83</sup>. El bucle denominado mano-EF se ha descrito como una estructura de unión al calcio<sup>81</sup> (Fig.4).

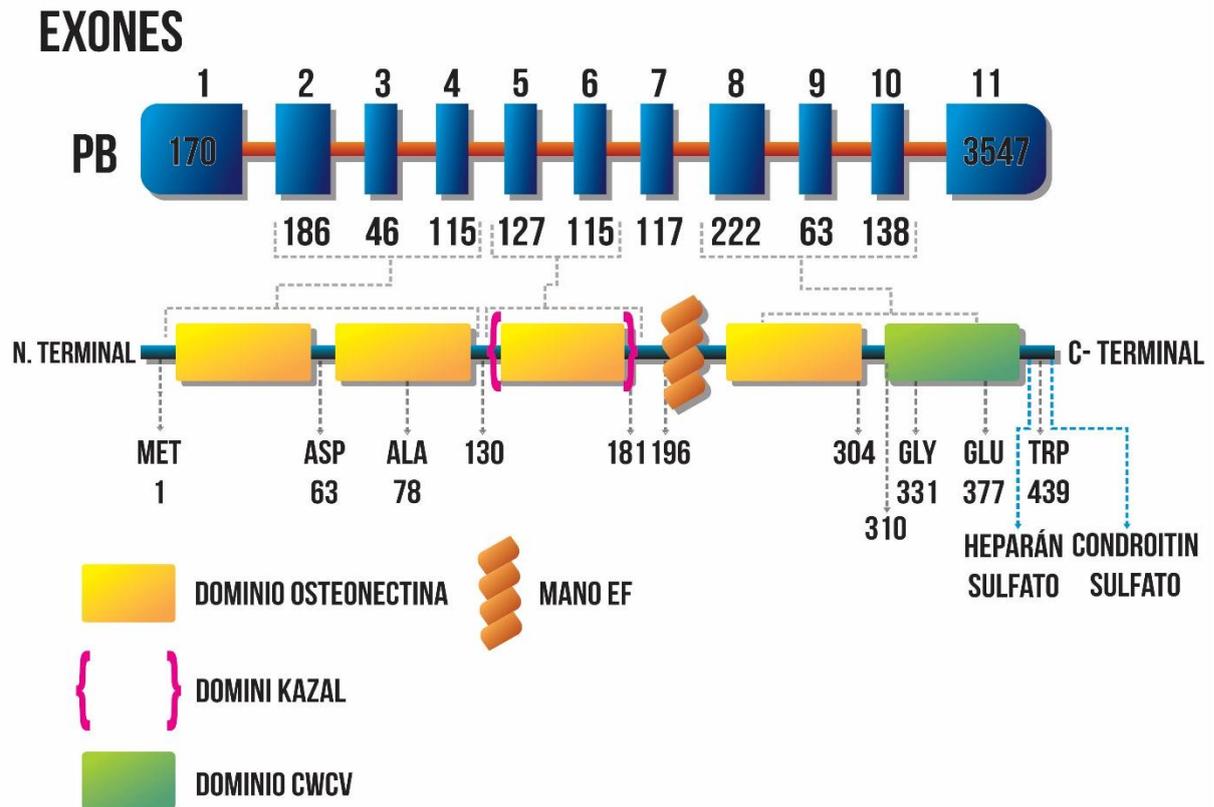


Fig.4 estructura del gen y la proteína SPOCK1. Adaptada de Charbonnier et al.1997<sup>81, 82,83</sup>. Ilustración realizada por Orlando Pineda

### 5.1 Matriz extracelular y SPOCK1

La matriz extracelular (MEC) está conformada por proteoglicanos, proteínas estructurales y de adhesión. Estas interactúan activamente con la célula asociándose a cascadas de señalización para promover la diferenciación y migración celular<sup>84</sup>. Debido a su modificación postraduccional SPOCK1 es considerado un proteoglicano, el cual desarrolla diferentes procesos en la matriz extracelular<sup>85</sup>. Se caracteriza por ser un inhibidor de proteasas, como las metaloproteinasas y catepsina L que participan en procesos de metástasis y angiogénesis<sup>86, 87</sup>. Al ser parte de la MEC le permite no ser degradado. Sus múltiples dominios facilitan la interacción simultánea con elementos de la matriz. Entre ellos se encuentran los glicosaminoglicanos como el heparán sulfato y condroitín sulfato que se unen al *core* proteico, adhieren citoquinas, factores de crecimiento y morfógenos. Además, sirven como receptores de proteasas regulando su actividad y distribución espacial. Una sus funciones más

importantes es facilitar la interacción de la MEC con las células adyacentes<sup>85</sup>. Sin embargo, la unión de SPOCK1 con la célula aún es incierta por lo que esto constituye una posible explicación<sup>88</sup>. Estas interacciones se relacionan con la activación de la ruta de señalización PI3K/AKT inhibiendo la apoptosis. Se encontró que el silenciamiento de *SPOCK1* disminuye la proliferación de las células de cáncer colorrectal por supresión de PI3K/AKT demostrando su expresión en líneas celulares de origen tumoral (fig.5)<sup>89,81</sup>. La transición epitelio-mesenquimal (EMT) es un proceso de transformación celular que facilita la migración. La presencia de SPOCK1 se ha asociado a la disminución de la expresión de marcadores epiteliales (e.g. E-cadherina) y con el aumento de los marcadores mesenquimales (e.g. vimentina y N-cadherina) facilitando la EMT. La pérdida de las características epiteliales, los cambios conformacionales y la disyunción celular, permiten al tumor alcanzar estadios metastásicos<sup>90</sup>.

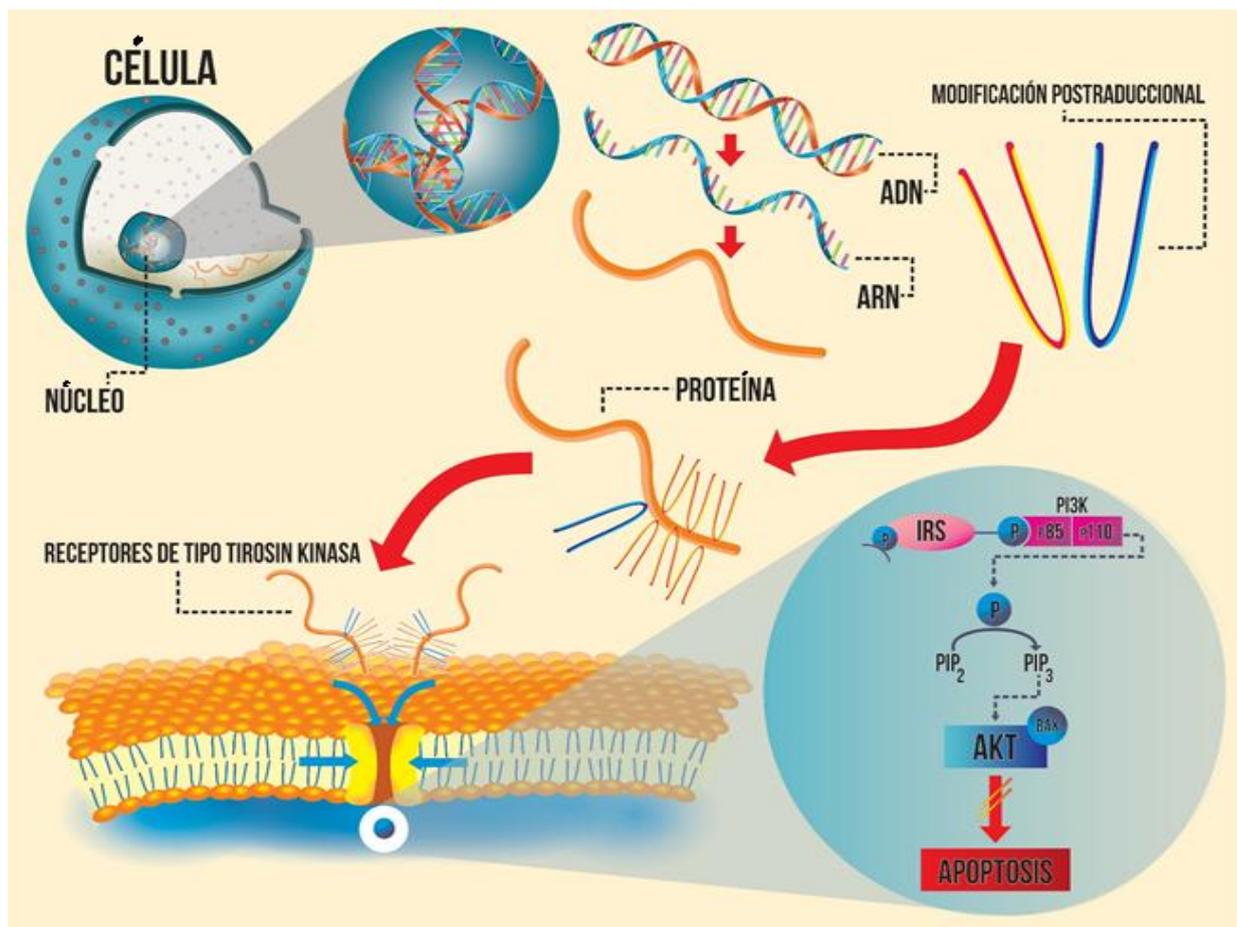


Fig. 5. Esquemización de la síntesis de SPOCK1, su modificación postraduccional (unión de heparán y condroitin sulfato en la región c terminal). Interacción del proteoglicano con receptores de la membrana celular y la activación de la ruta PI3K/AKT inhibiendo la apoptosis<sup>89, 81</sup>. Ilustración realizada por Orlando Pineda.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El siguiente estudio es de tipo observacional analítico prospectivo. Se incluyeron 39 hombres y mujeres adultos que ingresaron al servicio de cirugía del hospital de Méderi con diagnósticos de neoplasias colorrectales. Los individuos fueron sometidos a intervenciones quirúrgicas que permitieron la extracción del tejido tumoral y adyacente. Por flebotomía se obtuvo sangre periférica en tubos con EDTA. Con respecto al tamaño de la muestra, no es posible determinar la cantidad de individuos en los que se pueden identificar mutaciones relacionadas con el desarrollo de la patología, debido al desconocimiento y la complejidad de la biología molecular del cáncer. Se contribuyó a la ampliación del banco de material genético del CIGGUR con la recepción progresiva de los diferentes tejidos provenientes del hospital (Tabla 2).

Tabla 2. Universo, población, muestra y variables.

Universo	Población	Muestra	Variables
<ul style="list-style-type: none"><li>• Personas colombianas con neoplasias colorrectales.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Personas que ingresaron al servicio de cirugía del hospital de Méderi con cualquier tipo de neoplasia colorrectal.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tejidos tumorales, tejidos adyacentes al afectado y sangre periférica.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Grado histológico de los tumores</li><li>• Edad de los pacientes</li></ul>

### 6.1 Consideraciones éticas

De acuerdo con los principios establecidos por el consejo de organizaciones internacionales de ciencias médicas (CIOMS) y en la resolución colombiana 8430 de octubre 04 de 1993 y debido a que esta investigación se consideró como investigación de riesgo mínimo y en cumplimiento con los aspectos mencionados en el artículo 6 de la presente resolución este estudio se desarrolló contando con el Consentimiento Informado y por escrito del sujeto de investigación o su representante legal con las excepciones dispuestas en la Resolución 8430 de 1993(ver anexos formato consentimiento informado) y previa aprobación del

proyecto por parte del Comité de ética en Investigación de la Universidad del Rosario y el hospital universitario Mayor Méderi.

Los tejidos fueron enviados al servicio de anatomía patológica del hospital de Méderi. Su resultado se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción anatomopatológica de los tejidos tumorales de diferentes pacientes. TT: tejido tumoral. Fuente: Hospital de Méderi servicio de patología.

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

<b>24</b>	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante moderadamente diferenciado que se extiende hasta la serosa.	65 años	Femenino
<b>25</b>	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante, ulcerado moderadamente diferenciado que se extiende hasta la serosa.	79 años	Masculino
<b>26</b>	Adenocarcinoma de patrón convencional moderadamente diferenciado, ulcerado, infiltrante hasta la serosa.	33 años	Femenino
<b>27</b>	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante, ulcerado moderadamente diferenciado que se extiende hasta el mesocolon.	64 años	Femenino
<b>28</b>	Adenoma túbulo-velloso displasia de alto grado	74 años	Femenino
<b>29</b>	Adenocarcinoma de tipo usual moderadamente diferenciado en un 90% con componente de adenocarcinoma mucinoso en un 10% infiltrante hasta la serosa.	80 años	Masculino
<b>32</b>	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado moderadamente diferenciado	63 años	Masculino
<b>50</b>	Adenomas predominantemente tubulares, otros tubulovelloso con displasia de bajo grado compatible con poliposis adenomatosa familiar.	18 años	Masculino
<b>51</b>	Adenocarcinoma de colon, bien diferenciado que infiltra hasta la subserosa	81 años	Femenino
<b>52</b>	Adenocarcinoma de tipo intestinal usual moderadamente a mal diferenciado, ulcerado, infiltrante a toda la pared.	56 años	Femenino
<b>53</b>	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
<b>54</b>	Adenocarcinoma de tipo mucinoso	60 años	Masculino
<b>55</b>	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado, moderadamente diferenciado que se extiende hasta la capa muscular.	47 años	Femenino
<b>56</b>	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado, moderadamente diferenciado que se extiende hasta el mesocolon	54 años	Femenino
<b>57</b>	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado ulcerado	77 años	Masculino
<b>58</b>	Adenocarcinoma de colon pobremente diferenciado que infiltra todo el espesor de la pared	78 años	Masculino
<b>59</b>	Adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado ulcerado que infiltra todo el espesor de la pared con compromiso del tejido adiposo pericolónico.	73 años	Masculino

60	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado, moderadamente diferenciado que se extiende hasta el mesocolon	79 años	Masculino
61	Adenoma vellosos con neoplasia intraepitelial glandular de bajo grado, displasia leve a moderada	67 años	Masculino
62	Adenocarcinoma de patrón clásico moderadamente diferenciado con componente mucinoso del 10%.	75 años	Masculino
63	Adenocarcinoma de tipo intestinal usual moderadamente diferenciado, ulcerado, infiltrante a toda la pared y focalmente a la grasa del mesocolon.	70 años	Masculino
64	Adenocarcinoma de tipo intestinal infiltrante ulcerado moderadamente diferenciado que se extiende hasta la serosa.	70 años	Masculino
65	Adenocarcinoma de tipo intestinal moderadamente diferenciado con componente mucinoso	74 años	Masculino

## 6.2 Extracción de ADN en sangre periférica

Luego de recibidas las muestras, en un tubo Falcon se agregaron 6ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y 3ml de sangre. Se agitaron hasta homogenizar. Esta solución fue colocada en un agitador por 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una centrifugación a 4500 rpm por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Todo el proceso se realizó 2 veces. El *pellet* resultante fue desprendido y se adicionaron 4 ml de solución de lisis de glóbulos blancos. Se puso en vortex hasta homogenizar. Se agregaron 10µL de proteinasa K a una concentración de 50 µg/µL, mezclándose vigorosamente en un vortex. Se llevaron las muestras al baño serológico (se precalentó a 56°C) y se incubó por 4 horas agitando las muestras cada hora. Se agregó 800µL de solución precipitante de proteínas. Se homogenizó mediante vortex y se llevó a -20°C por 5 minutos. Se centrifugó a 4500rpm durante 20 minutos a 4°C. Previamente se alicuotaron 3ml de isopropanol por cada muestra y se llevó a -20°C. Se retiró y se le adicionó el sobrenadante de la muestra. Se mezcló suavemente hasta observar el material correspondiente al ADN "mota". Fue retirado el ADN y transferido a un tubo Eppendorf seguido de una centrifugación a 13000g por 5 minutos. Los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente. Se agregó 200 µL de buffer de elución TE 1x y se conservó a 4°C hasta utilización. Su cuantificación

se realizó con *NanoDrop One Thermo scientific*® teniendo en cuenta la relación 260/280 y 260/230<sup>91</sup>. (Ver anexos preparación de reactivos)

### **6.3 Extracción de ADN en tejido tumoral y adyacente**

#### **6.3.1 Día 1**

A los tejidos criopreservados se les retiró el etanol y se dejaron secar por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se cortaron en fragmentos de  $\approx 0,5\text{cm}^2$  y se dispusieron en tubos Eppendorf. Se adicionó 600  $\mu\text{L}$  de TNES buffer (Tris, NaCl, EDTA y SDS) y 22  $\mu\text{L}$  de proteinasa k, a una concentración 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se agitó fuertemente. Se incubó a 56°C en el baño serológico previamente precalentado. Posteriormente, se insertó el homogenizador en cada tubo evitando que existiera contaminación cruzada entre tejidos (se limpió el homogenizador con hipoclorito de sodio a 5000ppm). Se incubó a 56°C toda una noche.

#### **6.3.2 Día 2**

Se adicionó a cada tubo 170 $\mu\text{L}$  de NaCl 6M. Se mezcló manualmente durante 20 segundos y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a nuevos tubos Eppendorf. Se agregó etanol al 100% en una relación 1:1 con respecto al sobrenadante. Se mezcló suavemente y se incubó a -20°C por 2 horas. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se realizó un lavado con 700  $\mu\text{L}$  de etanol al 100%, centrifugándose a 13000 rpm por 2 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados más. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 2 horas. Se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de TE 1x y se dejó en incubación a 4°C por toda una noche. Se cuantificó con *NanoDrop One Thermo scientific*® teniendo en cuenta la relación 260/280 y 260/230<sup>92</sup>. (Ver anexos preparación de reactivos)

### **6.4 Amplificación y secuenciación de la región codificante del gen**

#### ***SPOCK1***

Los procesos de amplificación y secuenciación se realizaron por PCR convencional, electroforesis en gel de agarosa y secuenciación de Sanger.

## 6.5 Diseño de *primers*

Para el diseño de los *primers* de amplificación y secuenciación se utilizó la herramienta bioinformática *Primer3* (Tabla4). Se realizó la solicitud de síntesis a través de <https://www.elimbio.com/> perteneciente a la compañía *Elim Biopharmaceuticals*.

Tabla 4. Secuencias de primers correspondientes a cada exón.

EXÓN	PRIMERS	SECUENCIA	AMPLICÓN ESPERADO(PB)
Exón 2	Forward hSPOCK1_267_Seq_F	5'GCACTCGGAGAATAGACGAGAC 3'	803
	Reverse hSPOCK1_Int2_R	5'ATCACGGTTAGGAGAAGTCGGAAG 3'	
Exón 3	Forward hSPOCK1_Int2_-251	5'CGCTGTTTCTATACTGGGCTGAAA 3'	720
	Reverse hSPOCK1_Int3_428_R	5'GTACCCTTGACAGTCTCCCAGGAT 3'	
Exón 4	Forward hSPOCK1_Int3_-303_F	5'ATCTGAAGTCGGGAGTTTGAGACC 3'	540
	Reverse hSPOCK1_Int4_122_R	5'AAATGGCGACCCTAACACTATGCT 3'	
Exón 5	Forward hSPOCK1_Int4_-191_F	5'CTTCTGGGACAAAATCCTCTGCTT3'	567
	Reverse hSPOCK1_Int5_249_R	5'ATCACATGCCATTCTCAGAACCAT3'	
Exón 6	Forward hSPOCK1_Int5_-356_F	5'GTGGAGAAGATGCCTCAAAGTGAA3'	735
	Reverse hSPOCK1_Int6_264_R	5'CTCCCACACCATAGCGAATATGAC3'	
Exón 7	Forward hSPOCK1_Int6_-348_F	5'GCAAAACTGCAAGAGCAAGCTTTA3'	688
	Reverse hSPOCK1_Int7_223_R	5'GTACCACAGCATGCTTACGGTCAT3'	
Exón 8	Forward hSPOCK1_Int7_-247_F	5'TTGGGGATTTTTCCCCTTTAGAAC3'	710
	Reverse hSPOCK1_Int8_241_R	5'CCAAAGGGAGGAACAGACAGAAGT3'	
Exón 9	Forward hSPOCK1_Int8_-363_F	5'TGGATTCAGAACACTTCCCCACTA3'	760
	Reverse hSPOCK1_Int9_334_R	5'GTTTGAGCACTTGAGAGCACCATT3'	
Exón 10-11	Forward hSPOCK1_Int9_-445_F	5'TGGTTGGGCAAAGTATTGGTAATG3'	1361
	Reverse hSPOCK1_3'UTR_R	5'CCTTGGTGCCTTGGAGTCTTAGAT3'	

## Nota de aclaración

El exón 1 no es codificante por lo que no se incluyó en esta región ni se tuvo en cuenta en el diseño de *primers*. Cada paciente recibió un consecutivo TT (tejido tumoral) acompañado de un número para proteger su identidad.

## 6.6 Amplificación de la región codificante de *SPOCK1*

La PCR convencional se realizó utilizando los reactivos de la tabla 5.

Tabla 5. Reactivos utilizados en la PCR convencional.

Reactivos	Volumen	Concentración final
Master mix 2X promega	8 $\mu$ L	2x
Primer Forward	2 $\mu$ L	10 $\mu$ M
Primer Reverse	2 $\mu$ L	10 $\mu$ M
H2O destilada	11 $\mu$ L	-o-
ADN a amplificar	2 $\mu$ L	200ng
Total	25 $\mu$ L	

## 6.7 Programación del termociclador

Los exones fueron estandarizados siguiendo las condiciones de la tabla 6.

Tabla 6. 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

## 6.8 Electroforesis en gel de agarosa

Se verificó el tamaño de cada amplicón por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se sembraron 4  $\mu$ L de la master mix con los primers, el ADN y el agua en

cada pozo, como control negativo se utilizó master mix con primers y agua omitiendo el uso de ADN. Como agente intercalante se añadió Bromuro de etidio (10 µL por cada 100ml de TE 1X (Tris, EDTA) con agarosa) Se utilizó el marcador de peso molecular de la marca *1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen Thermo scientific®*. Se dejó correr por 60 minutos a 100 voltios en TE 1x. (Ver anexos preparación de reactivos)

### **6.9 Secuenciación de Sanger**

Aquellas muestras que mostraran una sola banda del peso molecular esperado en el gel de agarosa y contaran con un volumen  $\geq 10$  µL Se enviaron a secuenciar a *Elim Biopharmaceuticals*. Se envió 3 µL por primer a una concentración de 3 µM.

### **6.10 Procedimiento de purificación**

En *Elimbiopharmaceuticals* los residuos de primers en el producto de PCR fueron degradados por exonucleasa I. Los dNTPs no utilizados fueron defosforilados por fosfatasa alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). Posteriormente las enzimas se inactivaron sometiéndolas a calor.

### **6.11 Lectura de secuencias**

El análisis de las secuencias nucleotídicas fue realizado utilizando la herramienta bioinformática de alineamientos *Multiple Sequence Alignment MUSCLE* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) comparando la secuencia de cada exón con su secuencia *wild type* encontrada en *Ensembl.org* (<https://www.ensembl.org/index.html>). Los electroforetogramas fueron revisados manualmente. Las variantes halladas fueron tamizadas en las bases de datos confirmando su previa descripción.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Datos demográficos**

De los 39 pacientes el 8% (3 pacientes) corresponden a menores de 40 años y el 92% (36 pacientes) a mayores de 40 años. El 38%(15 pacientes) corresponden a mujeres y el 62%(24 pacientes) corresponden a hombres. El 87% (34 pacientes) poseen adenocarcinomas en diferentes estadios, el 13 %(5 pacientes) padecen de otro tipo de tumores malignos que hacen parte del CCR.

### **7.2 Cuantificación de ADN**

La cuantificación del ADN genómico en sangre de los 39 pacientes mostró valores entre 200 ng/  $\mu$ L (menor cantidad obtenida) y 1173 ng/  $\mu$ L (mayor cantidad obtenida) con una relación 260/280 entre 1,87 y 2,01 y una relación 260/230 entre 1,82 y 2,07.

La cuantificación del ADN genómico en tejido tumoral de los 39 pacientes mostró valores entre 134,7 ng/  $\mu$ L (menor cantidad obtenida) y 990 ng/  $\mu$ L (mayor cantidad obtenida) con una relación 260/280 entre 1,7 y 1,96 y una relación 260/230 entre 1,83 y 1,90. Resultados similares se evidenciaron en tejido adyacente con 264ng/  $\mu$ L (menor cantidad obtenida) y 1056 ng/  $\mu$ L (mayor cantidad obtenida) con una relación 260/280 entre 1,87 y 1,92 y una relación 260/230 entre 1,80 y 1,97.

Las concentraciones de ADN y las relaciones de absorbancia permitieron establecer la pureza entre aceptable y óptima.

### **7.3 PCR y corrido electroforético**

Fue necesario estandarizar la temperatura de anillamiento de cada uno de los exones, encontrando la presencia de una sola banda en temperaturas entre 57 y 64 °C (tabla 7)

Tabla 7. Temperaturas de anillamiento de los *primers* para cada uno de los exones.

EXÓN	TEMPERATURA DE ANILLAMIENTO
2	57 °C
3	62 °C
4	66 °C
5	64 °C
6	64 °C
7	64 °C
8	60 °C
9	64 °C
10-11	64 °C

El corrido electroforético se realizó con el ADN de tejidos tumorales de pacientes diferentes tomados aleatoriamente, se observó la presencia de una sola banda para cada uno de los exones. A continuación se muestran los corridos electroforéticos.

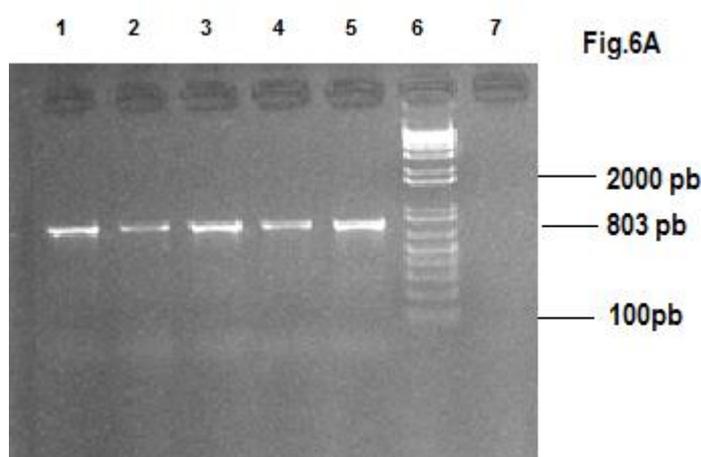


Fig.6A. En esta figura se observa un corrido electroforético en TE1X con una sola banda por pozo sembrado revelada con bromuro de etidio, indicando la amplificación del exón 2 correspondiente a 803 pares de bases(pb),se sembraron los productos de amplificación de los distintos tejidos tumorales de la siguiente manera, en el pozo 1 se sembró el tejido tumoral 7, en el pozo 2 se sembró el tejido tumoral 8, en el pozo 3 se sembró el tejido tumoral 9, en el pozo 4 se sembró el tejido tumoral 10 en el pozo 5 se sembró el tejido tumoral 11, en el pozo 6 se sembró el marcador de peso molecular(ver anexo marcador de peso) y en el pozo 7 se sembró el control negativo que carece de band

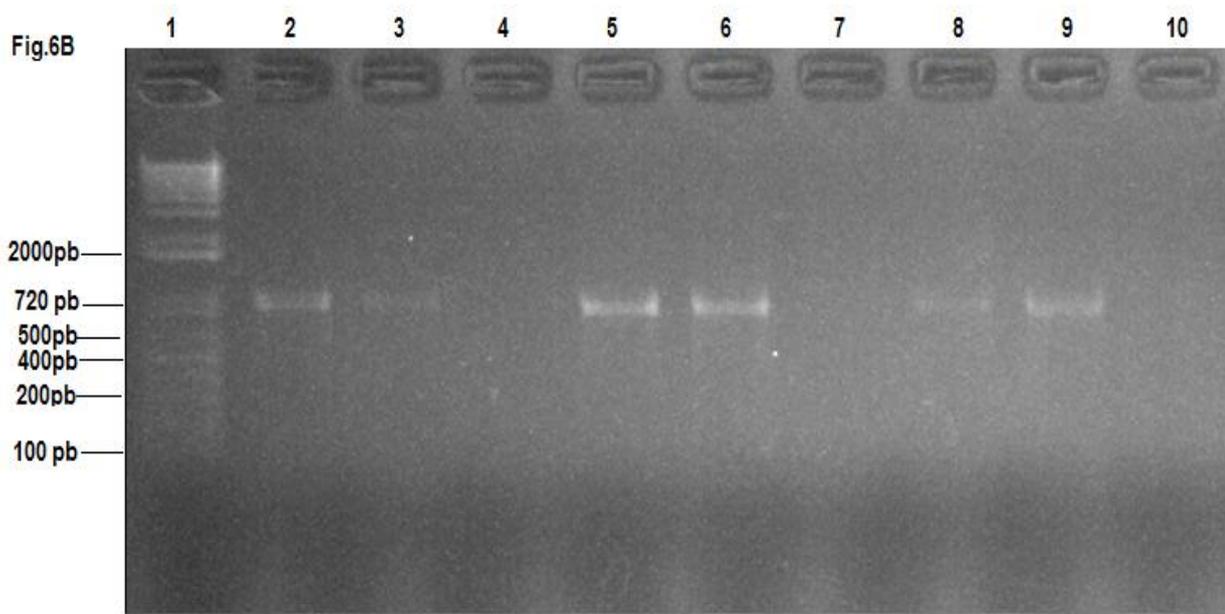


Fig.6B. En esta figura se observa un corrido electroforético en TE1X con la presencia de una sola banda por pozo sembrado revelada con bromuro de etidio correspondiente a los productos de amplificación de los diferentes tejidos tumorales para el exón 3 de 720 pares de bases (pb) con menor intensidad que la figura 6A. En el pozo 1 se sembró el marcador de peso molecular, en el pozo 2 se sembró el tejido tumoral 1, en el pozo 3 se sembró el tejido tumoral 3, en el pozo 4 se sembró el tejido tumoral 4 no hubo amplificación por lo que no se observa presencia de banda, en el pozo 5 se sembró el tejido tumoral 5, en el pozo 6 se sembró el tejido tumoral 6, en el pozo 7 se sembró el tejido tumoral 7 no hubo amplificación, en el pozo 8 se sembró el tejido tumoral 8, en el pozo 9 se sembró el tejido tumoral 9, en el pozo 10 se sembró el control negativo en donde no hubo amplificación. Se utilizó mayor cantidad de muestras por la dificultad de amplificación del exón 3.

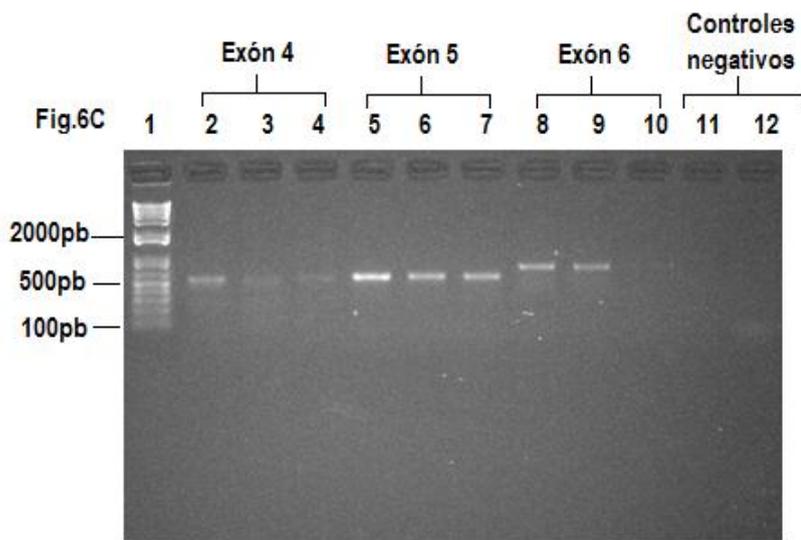


Fig.6C. En esta figura se observa un corrido electroforético en TE1X revelado con bromuro de etidio en donde se evidencia la presencia de una sola banda por pozo sembrado de distintos tamaños correspondientes a los productos de amplificación de los diferentes tejidos tumorales en los exones 4 de 540 pares de bases (pb) (pozos 2,3 y 4), 5 de 567 pb (pozos 5,6 y 7) y 6 de 735pb (pozos 8,9 y 10). En el pozo 1 se sembró el marcador de peso molecular, en el pozo 2 se sembró el tejido tumoral 7, en el pozo 3 se sembró el tejido tumoral 8, en el pozo 4 se sembró el tejido tumoral 10. En el pozo 5 se sembró el tejido tumoral 7, en el pozo 6 se sembró el tejido tumoral 8 y en el pozo 7 se sembró el tejido tumoral 10, en el pozo 8 se sembró el tejido tumoral 7, en el pozo 9 se sembró el tejido tumoral 8 en el pozo 10 se sembró el tejido tumoral 10 en donde se aprecia una banda tenue, en los pozos 11 y 12 se sembraron controles negativos sin amplificación.

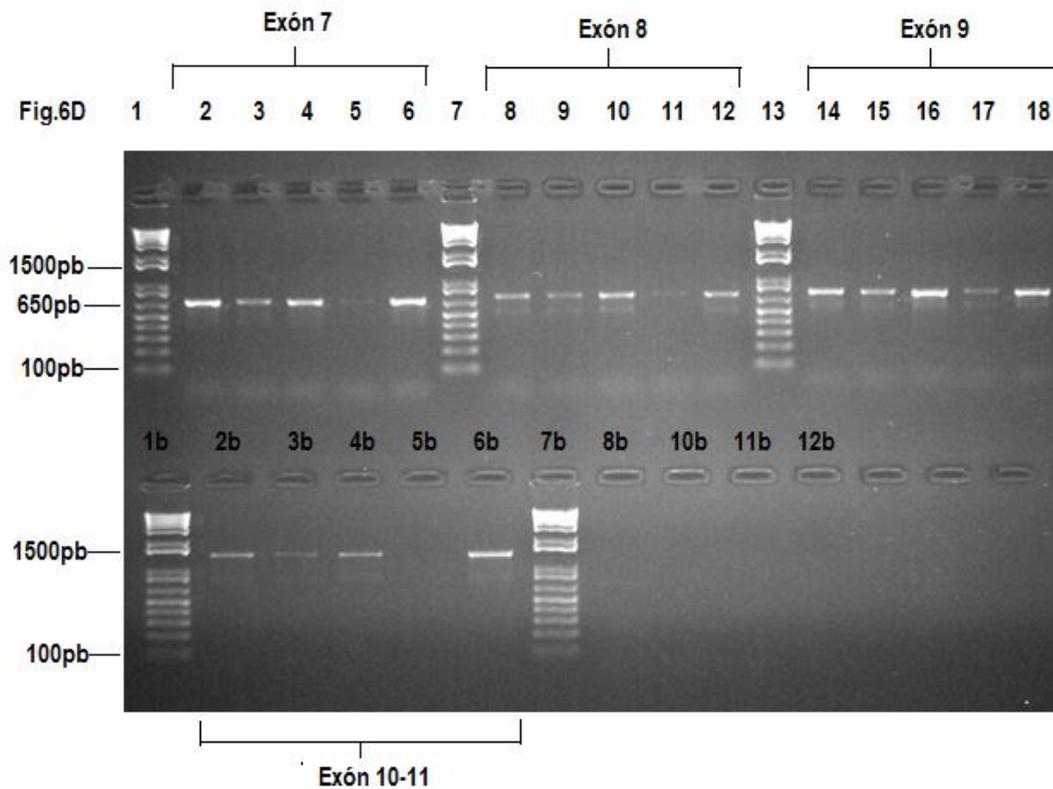


Fig.6D. En esta figura se observa un corrido electroforético en TE1X revelado con bromuro de etidio en donde se evidencia una sola banda por pozo sembrado correspondiente a los productos de amplificación de los diferentes tejidos tumorales para el exón 7 de 688pb (pozos 2, 3, 4, 5 y 6) el exón 8 de 710 pb (pozos 8, 9, 10, 11, y 12, el exón 9 de 760 pb (pozos 14, 15, 16, 17 y 18) y el exón 10-11 de 1361 pb (pozos 2b,3b,4b,5b y 6b). En el pozo 1 se sembró el marcador de peso molecular, en el pozo 2 se sembró el tejido tumoral 7, en el pozo 3 se sembró el tejido tumoral 8, en el pozo 4 se sembró el tejido tumoral 9, en el pozo 5 se sembró el tejido tumoral 10, en el pozo 6 se sembró el tejido tumoral 11, en el pozo 7 se sembró el marcador de peso molecular, en el pozo 8 se sembró el tejido tumoral 7, en el pozo 9 se sembró el tejido tumoral 8, en el pozo 10 se sembró el tejido tumoral 9, en el pozo 11 se sembró el tejido tumoral 10, en el 12 se sembró el tejido tumoral 11, en el pozo 13 se sembró el marcador de peso molecular, en el pozo 14 se sembró el tejido tumoral 7, en el pozo 15 se sembró el tejido tumoral 8, en el pozo 16 se sembró el tejido tumoral 9, en el pozo 17 se sembró el tejido tumoral 10, en el pozo 18 se sembró el tejido tumoral 11, para todos los casos anteriormente nombrados hubo amplificación, el gel fue dividido en dos por lo que en la siguiente mitad se corrió en el pozo 1b el

marcador de peso molecular, en el pozo 2b el tejido tumoral 7, en el pozo 3b el tejido tumoral 8, en el pozo 4b el tejido tumoral 9, en el pozo 5b el tejido tumoral 10, en el pozo 6b el tejido tumoral 11, en el pozo 7b el marcador de peso molecular y en los pozos 8b, 10b, 11b y 12b se sembraron los controles negativos que no muestran amplificación.

En los 39 tejidos tumorales se amplificó cada uno de los exones, su producto de amplificación fue corrido en geles de agarosa al 1%, los tejidos que no mostraran amplificación se repetían disminuyendo la temperatura de anillamiento hasta que mostraran una sola banda, en caso de no mostrarla se cambiaba la alícuota de ADN del paciente correspondiente. Para el caso de las bandas tenues se repitió su amplificación utilizando mayor cantidad de ADN.

#### 7.4 Secuenciación y alineamiento

La secuenciación de la región codificante completa de *SPOCK1* en 39 pacientes no mostró variaciones de secuencia. Sin embargo, se encontraron variaciones en las regiones intrónicas. Los alineamientos fueron realizados utilizando la secuencia *Wild type* encontrada en la base de datos *Ensemble* y se etiquetó WT (wild type) hSPOCK (nomenclatura del gen) y el exón, la muestra fue etiquetada como hSPOCK1 el número del tejido tumoral y el exón, además se señaló la parte correspondiente al exón como se muestra en la figura 7A.

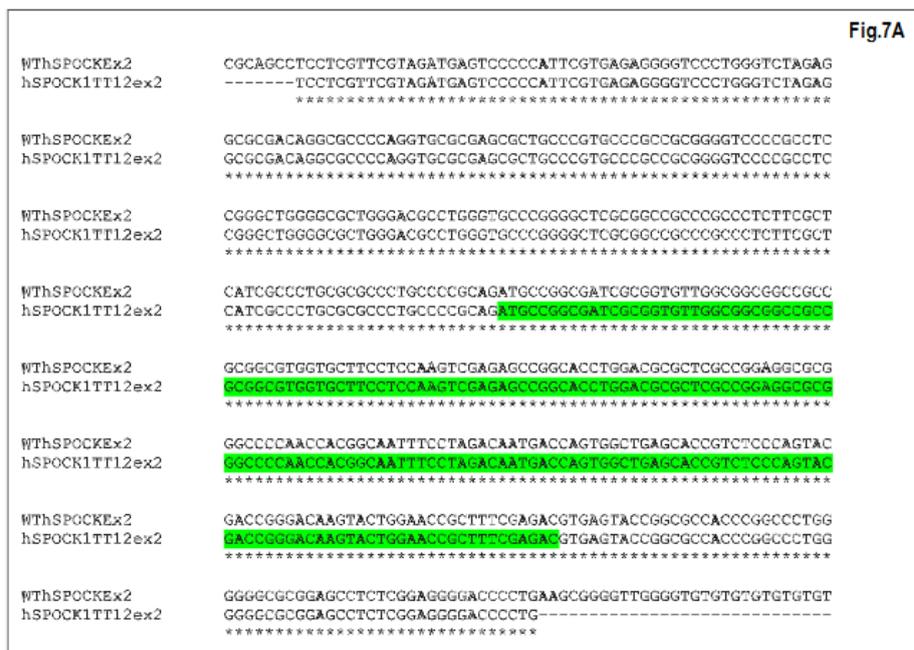


Fig.7A. Se observa el alineamiento del exón 2 en el tejido tumoral 12 con la secuencia *wild type*, se evidencia un alineamiento completo del exón sin variaciones, los sitios de *splicing* correspondientes a los nucleótidos AG y GT carecen de polimorfismos y la región intrónica secuenciada no muestra cambios, los resultados fueron iguales en el exón 2 de los 39 pacientes. No se observó presencia de dobles picos en el electroforetograma.

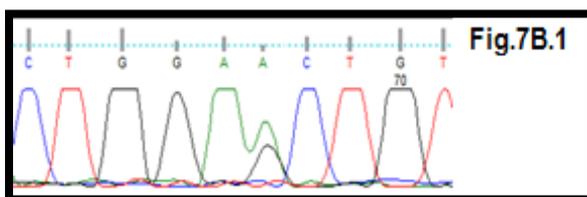
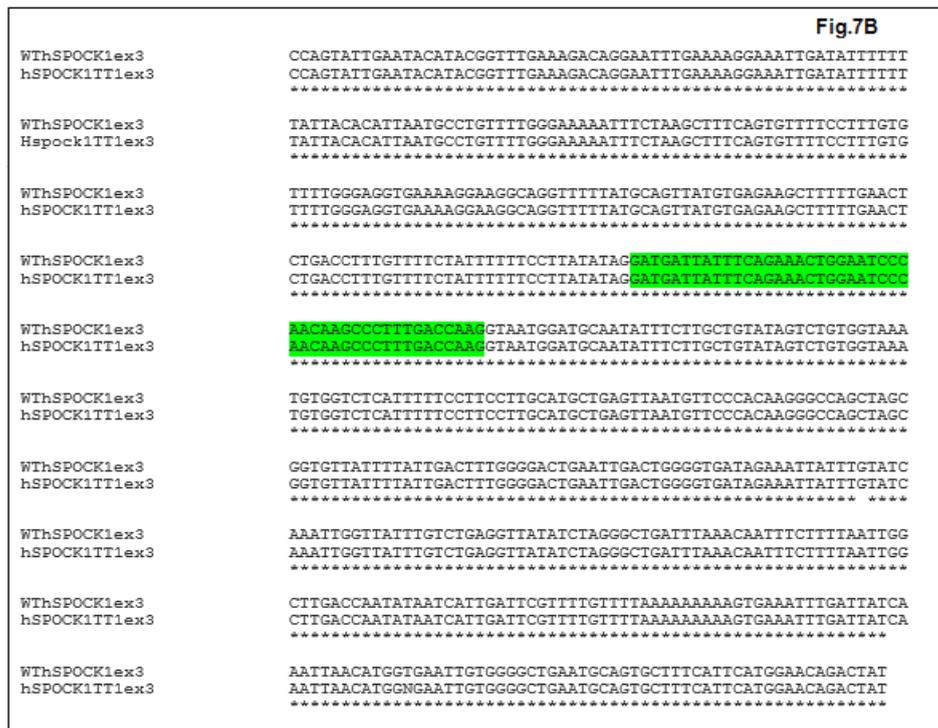


Fig. 7B. Se observa el alineamiento del exón 3 en el tejido tumoral 1, se evidencia un alineamiento completo del exón sin variaciones, los sitios de *splicing* se encuentran *wild type*, y las regiones intrónicas no presentan variación, sin embargo, al revisar manualmente el electroforetograma se encontró un doble pico en donde hay un cambio de una adenina por una guanina en la posición 187-437 en uno de los alelos (heterocigoto) razón por la que se observa en el electroforetograma y no en el alineamiento ( Fig.7B.1)

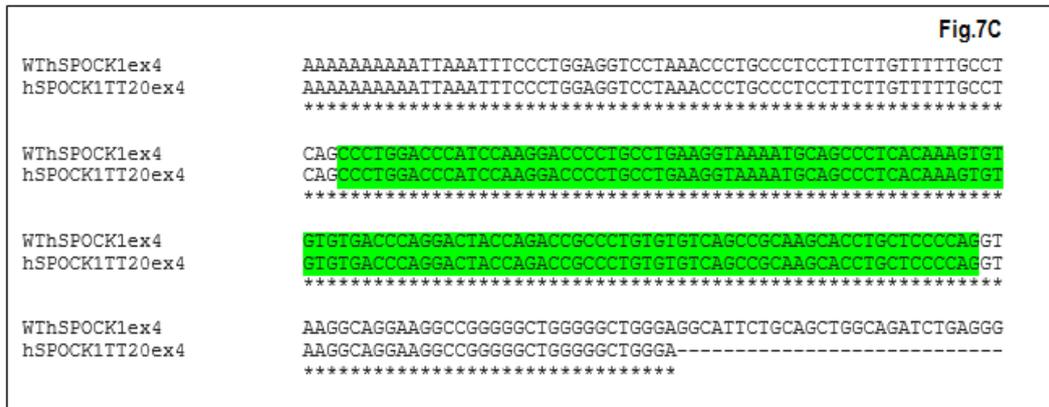


Fig.7C. Se observa el alineamiento completo del exón 4 del tejido tumoral 20 sin cambios, no se evidencian variaciones en las regiones intrónicas ni en los sitios de *splicing*. La revisión de los electroforetogramas no mostró dobles picos en ninguno de los pacientes.

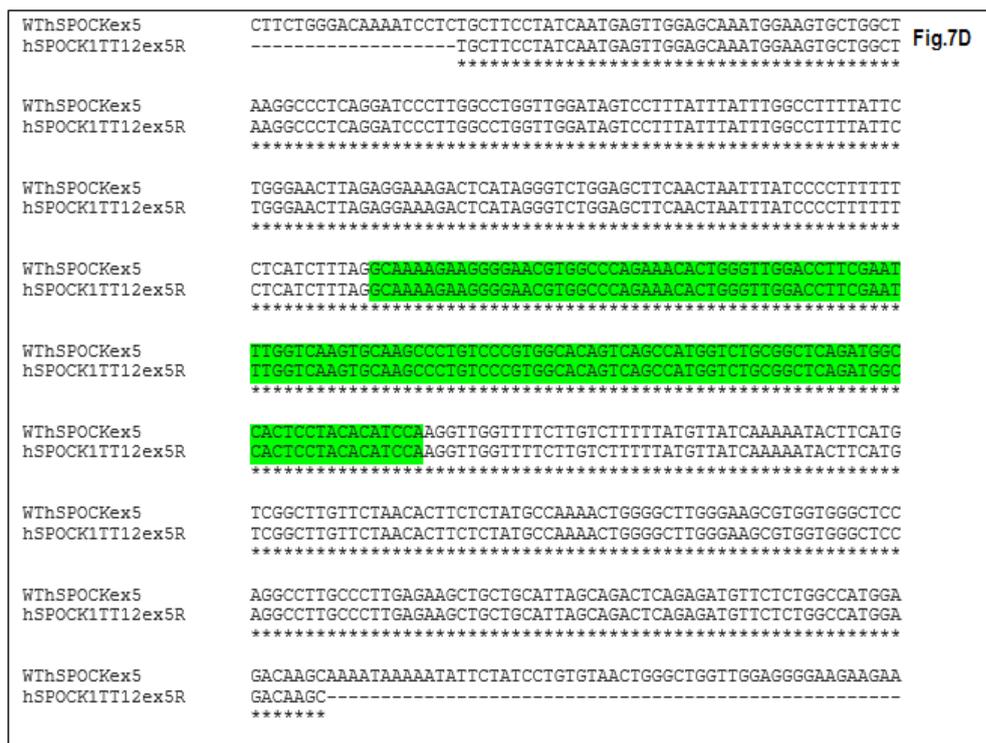


Fig.7D. Se observa el alineamiento completo del exón 5 del tejido tumoral 12 sin cambios, no se evidencian variaciones en las regiones intrónicas ni en los sitios de *splicing*, la revisión de los electroforetogramas no mostró dobles picos para ninguno de los pacientes.

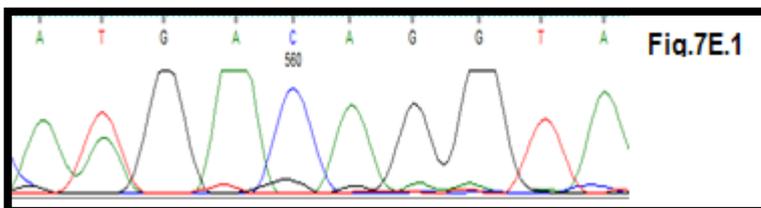
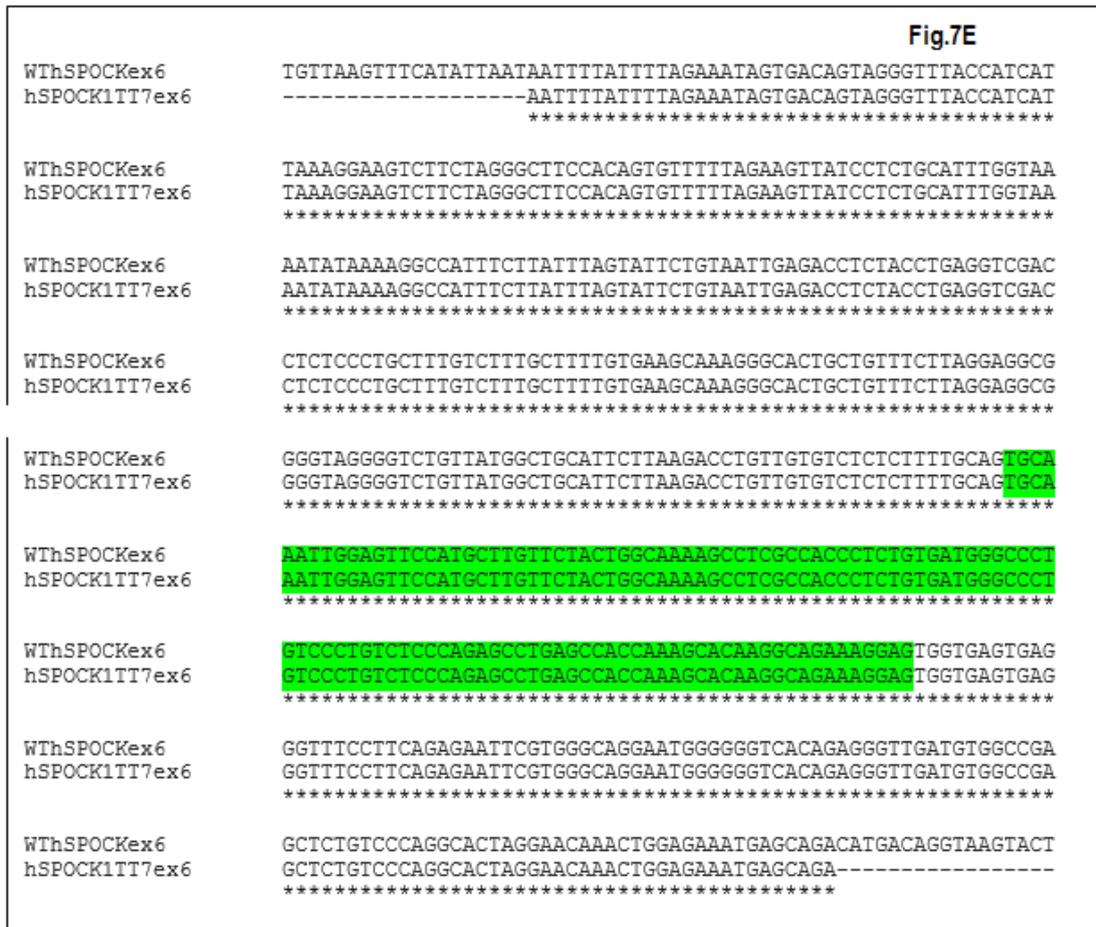


Fig.7E. Se observa el alineamiento completo del ex6 del tejido tumoral 7, no se evidencian variaciones, los sitios de *splicing* y las regiones intronicas no presentan cambios, sin embargo, al revisar manualmente el electroforetograma se observa un doble pico correspondiente al cambio de una timina por una adenina en la posición 589+115 en uno de los alelos razón por la cual se observa en el electroforetograma pero no en el alineamiento (Fig.7E.1).

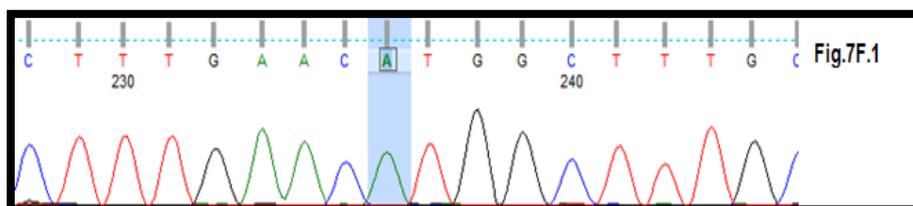
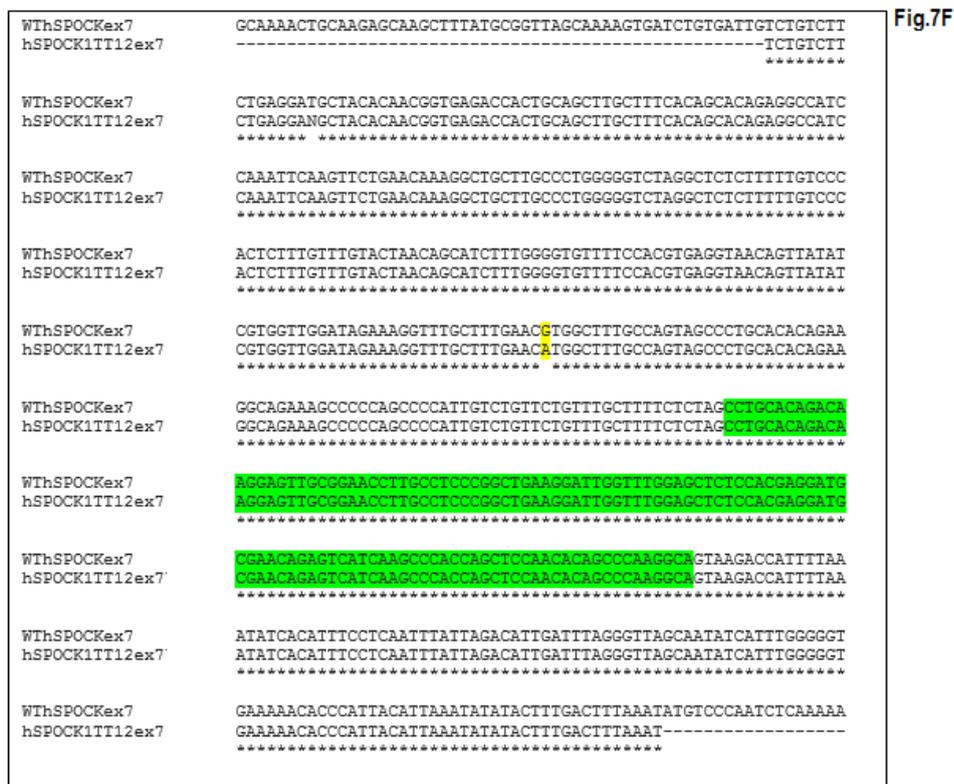


Fig.7F. Se observa el alineamiento completo del exón 7 del tejido tumoral 12 sin variaciones, los sitios de *splicing* carecen de modificaciones, en la región intrónica se evidencia el cambio de una guanina por una adenina en la posición 590-78 y en el electroforetograma se encuentra un solo pico correspondiente a una variación homocigota (Fig.7F.1)

```

WThSPOCKex8      CTAAAAACAAAAACAAAAACAAAAATATTCTAGAGAACCCTAAATCTGTATGCTGG
hSPOCK1TT12ex8  -----TATTCTAGAGAACCCTAAATCTGTATGCTGG
                  *****

WThSPOCKex8      GAAGGAAACAGCCTCAGGAAGGGAGTCAGGTGGGCCTTGGCATCTTCTTGGGGCAGAAAAG
hSPOCK1TT12ex8  GAAGGAAACAGCCTCAGGAAGGGAGTCAGGTGGGCCTTGGCATCTTCTTGGGGCAGAAAAG
                  *****

WThSPOCKex8      CTGGGGAGTGTAGCAGGGAGGAAAGCATCAGGCTTGGTGGCAGCTGAGATATGCCTTTTGT
hSPOCK1TT12ex8  CTGGGGAGTGTAGCAGGGAGGAAAGCATCAGGCTTGGTGGCAGCTGAGATATGCCTTTTGT
                  *****

WThSPOCKex8      TTGGCAGGTTTGGACACTAGCATCTCTGCCATCTGCAAGGACTCCCTGGGCTGGATGTT
hSPOCK1TT12ex8  TTGGCAGGTTTGGACACTAGCATCTCTGCCATCTGCAAGGACTCCCTGGGCTGGATGTT
                  *****

WThSPOCKex8      AACAAAGTGGACATGAACATGACCTCCCTGCTTGCCTTGCAGATCAATGCCATCTAG
hSPOCK1TT12ex8  AACAAAGTGGACATGAACATGACCTCCCTGCTTGCAGATCAATGCCATCTAG
                  *****

WThSPOCKex8      CTGGATAAGTACGAGCCCTGTATCAAGCCCTCTTTTCAACTCGTGTGACTCCCTTCAAGGA
hSPOCK1TT12ex8  CTGGATAAGTACGAGCCCTGTATCAAGCCCTCTTTTCAACTCGTGTGACTCCCTTCAAGGA
                  *****

WThSPOCKex8      GCAAGCTTTCTAACAATGAGTGGTGTACTGCTTCCAGAAGCCTTGGAGGTAAGGTGGGA
hSPOCK1TT12ex8  GCAAGCTTTCTAACAATGAGTGGTGTACTGCTTCCAGAAGCCTTGGAGGTAAGGTGGGA
                  *****

WThSPOCKex8      TGGAGGGTGGGGTCCCTAGCCAGGGCAGCCTTGTCTGGAGCAGAGGAGGACTGCGTATG
hSPOCK1TT12ex8  TGGAGGGTGGGGTCCCTAGCCAGGGCAGCCTTGTCTGGAGCAGAGGAGGACTGCGTATG
                  *****

WThSPOCKex8      ACTATGAATTGGGCAGAGGCCACAGCCAGAGAATAAATAATTCAATCCATTTAATGCCA
hSPOCK1TT12ex8  ACTATGAATTGGGCAGAGGCCACAGCCAGAGAATAAATAATTCAATCCATTTAATGCCA
                  *****

WThSPOCKex8      GGCCCAAAGTCTCATTCTCCAGTTTATTCTGCTTTTAAATGGTATACTAGAAAAAC
hSPOCK1TT12ex8  GGCCCAAAGTCTCATTCTCCAG-----TATTCTGCTTTTAAATGGTATACTAGAAAAAC
                  *****

```

Fig.7G

Fig.7G. Se observa el alineamiento completo del exón 8 del tejido tumoral 12 sin cambios, no se evidencian variaciones en las regiones intrónicas ni en los sitios de *splicing*, la revisión de los electroforetogramas no mostró dobles picos para ninguno de los pacientes.

```

WThSPOCKex9      GGRAAARAGTCCATTACACCACCTATTAGATACTTGGTATTTGCTTGGATTGGTACTAGAA
hSPOCK1TT12ex9  -----CATTACACCACCTATTAGATACTTGGTATTTGCTTGGATTGGTACTAGAA
                  *****

WThSPOCKex9      AGAAAAATTTCTATGCAATGCAAGTGGCCCCAAATACTATTTAAGTGCATTGTGGTAT
hSPOCK1TT12ex9  AGAAAAATTTCTATGCAATGCAAGTGGCCCCAAATACTATTTAAGTGCATTGTGGTAT
                  *****

WThSPOCKex9      GAGTTTGTTTTTTAACTAGTAACTAATGGCCCGAATTTGTTTTCTTGCATAGTAAACA
hSPOCK1TT12ex9  GAGTTTGTTTTTTAACTAGTAACTAATGGCCCGAATTTGTTTTCTTGCATAGTAAACA
                  *****

WThSPOCKex9      GCATATGGACRAATTCCACTCCCAGGTGTGTCATTGTCTACATTCACATCAAGAGTGAA
hSPOCK1TT12ex9  GCATATGGACRAATTCCACTCCCAGGTGTGTCATTGTCTACATTCACATCAAGAGTGAA
                  *****

WThSPOCKex9      GTCAATCATTAGCGATTATACTCCATACCACTGGAAGCTGACTTTCAGAAATTTATTTT
hSPOCK1TT12ex9  GTCAATCATTAGCGATTATACTCCATACCACTGGAAGCTGACTTTCAGAAATTTATTTT
                  *****

WThSPOCKex9      TAGTCTCCCTTGGCAGAATGAAATGAACAGAATTCAGAAGCTGAGTAAGGGGAAAAGCC
hSPOCK1TT12ex9  TAGTCTCCCTTGGCAGAATGAAATGAACAGAATTCAGAAGCTGAGTAAGGGGAAAAGCC
                  *****

WThSPOCKex9      TGTGGTAAAGTACAAATTCCTGGCCACTCAITTAACAACAACTAATTAAGCCAGCCATGTCC
hSPOCK1TT12ex9  TGTGGTAAAGTACAAATTCCTGGCCACTCAITTAACAACAACTAATTAAGCCAGCCATGTCC
                  *****

WThSPOCKex9      CTTGTAATGATCAGCAATGGCAATGGTTATTCAATTAGGGCTAGTGTTCATGAAAGAAAT
hSPOCK1TT12ex9  CTTGTAATGATCAGCAATGGCAATGGTTATTCAATTAGGGCTAGTGTTCATGAAAGAAAT
                  *****

WThSPOCKex9      GCCTTGTITTTAACCAGGCGAGAGCTCTCCAGGCAGCTGGACATAAACAGAGGACTGGC
hSPOCK1TT12ex9  GCCTTGTITTTAACCAGGCGAGAGCTCTCCAGGCAGCTGGACATAAACAGAGGACTGGC
                  *****

WThSPOCKex9      TGGTTGAAAACACTGCTGTGTGTTCCCTTCGGCAGGAAGAGAGGTGAGCCAGGSCCGAAGTCC
hSPOCK1TT12ex9  TGGTTGAAAACACTGCTGTGTGTTCCCTTCGGCAGGAAGAGAGGTGAGCCAGGSCCGAAGTCC
                  *****

```

Fig.7H

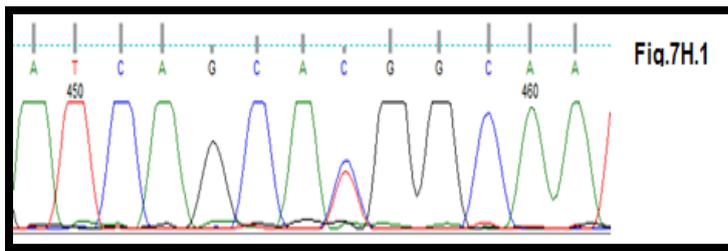


Fig.7H. Se observa el alineamiento completo del exón 9 sin variaciones, los sitios de *splicing* carecen de modificaciones, en la región intrónica se encuentra un cambio de una timina por una citosina en la posición 991+71, en el electroforetograma se observa un doble pico correspondiente a una variación heterocigota, en este caso es posible ver el cambio en el alineamiento y en el electroforetograma (Fig.7H.1)

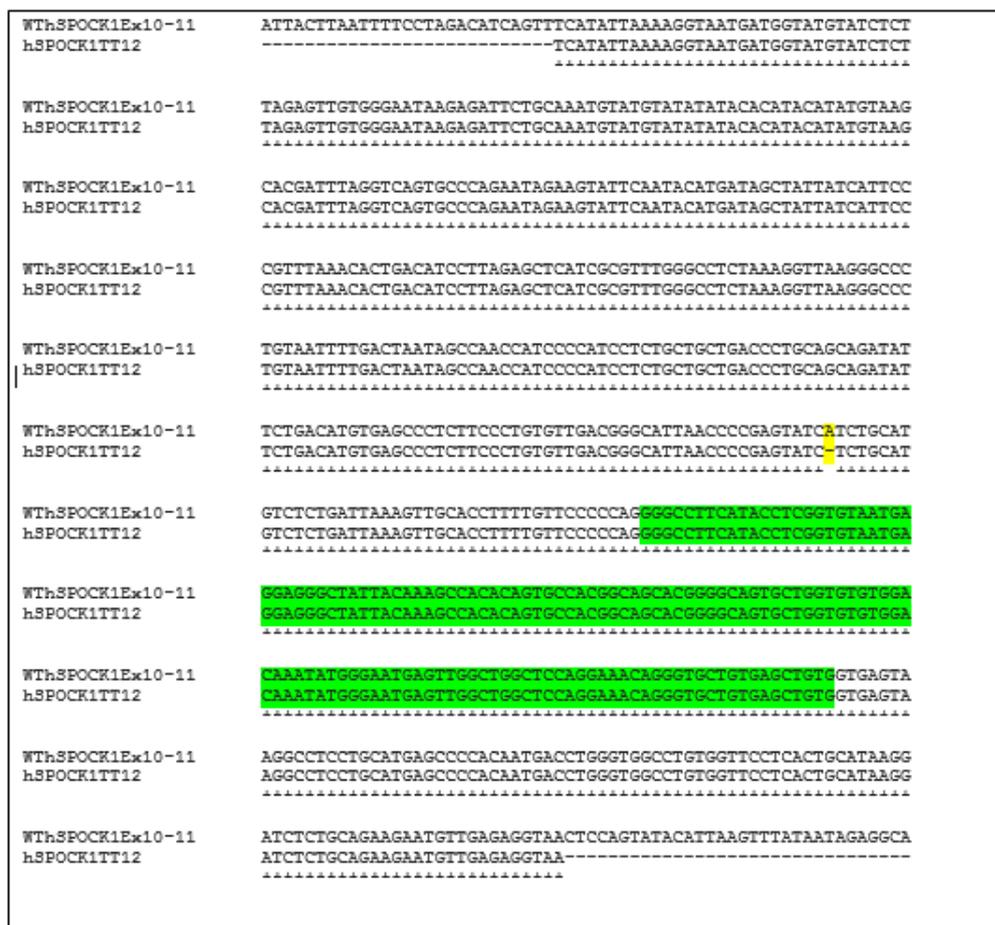


Fig.7I

Fig.7I. La secuenciación del exón 10-11 se realizó como una sola utilizando los mismos *primers* debido al corto tamaño del exón que las separa, en esta imagen se observa el alineamiento completo del exón 10 sin variaciones, los sitios de

*splicing* se encuentran sin modificaciones, en la región intrónica en la posición 992-43 se evidencia una deleción de una adenina, el exón 11 se encuentra sin variaciones.

Los resultados anteriormente presentados fueron tamizados en la tabla 8 teniendo en cuenta su referencia de SNP( polimorfismo de un solo nucleótido) correspondiente a un número de identificación único encontrado en la base de datos *Ensembl*, además se buscó la frecuencia alélica mínima (MAF) y se aclaró si corresponde a una variación homocigota o heterocigota, cada uno de los tejidos corresponde a un paciente diferente, la identificación TT (tejido tumoral) acompañada de un número utilizada en esta investigación tiene como fin proteger la identidad del paciente, el número indica cada uno de los pacientes.

Tabla 8. Variaciones de secuencia nucleotídica en las regiones intrónicas. Se tuvo en cuenta el exón más cercano, por ejemplo el exón 3 empieza en la posición 437 (teniendo en cuenta solo la región codificante) a esta posición se le restan 187 pares de bases es decir región intrónica y acá se sitúa la variación, cada polimorfismo se dispuso en la tabla teniendo en cuenta la misma consideración, los espacios en blanco indican ausencia de variación, es importante resaltar que la región intrónica no fue secuenciada completamente. **TT**: nomenclatura de tejido tumoral en el banco de material genético de la universidad del Rosario **rs**: referencia del SNP **MAF**: frecuencia alélica mínima

TT	Variaciones en las regiones intrónicas									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10-11	
TT1		c.187-437 A>G MAF:0,50 Heterocigoto rs6596370				c.590-78G>A MAF: 0,50 Homocigoto rs3777224				
TT3										
TT5						c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224		c.991+71T>C MAF: 0,34 Heterocigoto rs17521219		
TT6						c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224		c.991+71T>C MAF: 0,34 Heterocigoto rs17521219		

TT7				c.589+115 T>A MAF:0.33 Heterocigoto rs718703			
TT8							
TT9							
TT10				c.590-78G>A MAF 0,50 Heterocigoto rs3777224			c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011
TT11				c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224			c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011
TT12				c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224	c.991+71T>C MAF: 0,34 Heterocigoto rs17521219		c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011
TT18				c.590-78G>A MAF 0,50 Heterocigoto rs3777224	c.991+71T>C MAF: 0,34 Heterocigoto rs17521219		c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011
TT19							c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011
TT20				c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224	c.991+71T>C MAF: 0,34 Heterocigoto rs17521219		
TT21				c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224			
TT22							
TT23							
TT24				c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224			
TT25	c.187-437 A>G MAF:0,50 Heterocigoto rs6596370						c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011
TT26							c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011

TT27				c.589+115 T>A MAF:0.33 Heterocigoto rs718703			c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011
TT28							c.991+71T>C MAF: 0,34 Heterocigoto rs17521219
TT29							
TT32	c.187-437 A>G MAF:0,50 Heterocigoto rs6596370				c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224		
TT50					c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224		
TT51					c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224		
TT52							c.991+71T>C MAF: 0,34 Heterocigoto rs17521219
TT53							c.991+71T>C MAF: 0,34 Heterocigoto rs17521219
TT54							
TT55					c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224		
TT56					c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224		c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011
TT57							
TT58							
TT59					c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224		
TT60							c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011
TT61					c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224		c.991+71T>C MAF: 0,34 Heterocigoto rs17521219

TT62					c.590-78G>A MAF 0,50 Homocigoto rs3777224			
TT63	c.187-437 A>G MAF:0,50 Heterocigoto rs6596370							
TT64								
TT65								c.992-43delA MAF 0,48 rs3217011

## 8. DISCUSIÓN

El presente estudio hace parte de un proceso de búsqueda de nuevos marcadores moleculares para el CCR, siendo una patología de amplia distribución mundial, para la cual se espera un aumento en las tasas de incidencia del 63,1% para 2040<sup>61</sup>. hecho que reafirma la necesidad de encontrar nuevos marcadores de diagnóstico temprano y el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos que disminuyan la cantidad de procesos invasivos con secuelas colaterales. Sunn et al., definen como marcador molecular ideal, a aquel que cuenta con una sensibilidad y especificidad del 100%,<sup>93</sup> un MAF inferior al 1% (debido al aumento de la precisión del marcador para ser potencialmente diagnóstico y pronóstico).

En el caso de las mutaciones somáticas, dichas variaciones no deben encontrarse en ningún tejido diferente al afectado. Además deben producir un fenotipo potencialmente patológico o relacionarse con la enfermedad, es decir las variantes *missense* de tipo sinónimas son excluidas<sup>94</sup>. Los ensayos realizados se basaron en la genotipificación de las regiones exónicas de *SPOCK1* en tumores de CCR. Se evidenció que ninguno de ellos presentaba variantes codificantes lo que sugiere que modificaciones en la secuencia nucleotídica no contribuyen de manera mayoritaria con el fenotipo de la patología. Sin embargo, mutaciones en la región promotora que conduzcan a la modificación de sitios de fijación de factores de transcripción y en consecuencia a cambios en su expresión podrían relacionarse con el fenotipo, la complejidad de la biología molecular del cáncer colorrectal y los limitados artículos sobre *SPOCK1* justifican el estudio de este gen en la enfermedad.

Diversidad de posiciones se han presentado con respecto a los resultados negativos, según Fernandez et al. , estos corresponden al 50 por ciento del conocimiento, por tanto tan validos como aquellos resultados positivos, su no publicación repercute en los procesos de investigación y extensión del conocimiento general. El *international Committee of Medical Journal editor*, establece como obligatorio la publicación de estos, que a pesar de sus características siguen siendo resultados. Se han abierto múltiples espacios dedicados a mostrar estos estudios (e.g biblioteca *Cochrane*), a pesar que los

resultados del presente estudio sean negativos, se contribuye en el proceso de descripción de *SPOCK1*<sup>95</sup>.

Las variantes intrónicas identificadas presentan un MAF entre 0,33 y 0,50. Estas no cambian la secuencia de la proteína por lo que no se relacionan con la tumorigénesis además de no cumplir con las características de un marcador molecular ideal<sup>93</sup>. Por consiguiente, con respecto al estadio histológico, la genotipificación de la región codificante no mostró variación. Este hecho permite descartarla como un marcador diagnóstico y pronóstico. A pesar de los resultados el gen y la proteína *SPOCK1* son candidatos para estudios adicionales en el CCR como oncogen y oncoproteína pues este comportamiento se puede asociar a otras regiones del gen. Esto debido a que *SPOCK1* se ha asociado a diversos procesos biológicos como: interacción célula-célula, proliferación y migración. Diversidad de estudios han demostrado su sobreexpresión en diferentes tipos de cáncer como el de esófago, próstata, pulmón y CCR<sup>5, 6, 7, 8, 9</sup>. *SPOCK1* funciona como un inductor de la EMT, ya que reportes evidenciaron su aumento en tumores metastásicos comparado con tumores *in situ*<sup>54</sup>. El receptor endotelial de la proteína C (REPC) participa en procesos citoprotectores antiapoptóticos y antiinflamatorios. Experimentos realizados en líneas celulares tumorales con expresión ectópica del REPC demuestran que al silenciar el gen *SPOCK1* disminuyó el crecimiento celular lo que indica que el REPC necesita la proteína *SPOCK1* para generar un fenotipo tumorigénico por consiguiente esta oncoproteína interactúa con otros elementos de la bioquímica celular para producir un aumento en la proliferación. En pacientes con cáncer su sobreexpresión es directamente proporcional a la expresión de *SPOCK1*<sup>96</sup>.

Por otro lado, el 92% de los pacientes poseen edades superiores a 40 años, desde 1990 estudios epidemiológicos realizados por Varma et al., demostraron susceptibilidad a desarrollar CCR después de esta edad<sup>97</sup>. Esto se debe a aspectos inmunológicos propios del envejecimiento, denominado inmunosenescencia, que es una disminución de las funciones del sistema inmunitario, siendo las *Natural Killer* la población celular más afectada<sup>98</sup>. Éstas participan en el reconocimiento y destrucción de células tumorales por lo que la reducción de su actividad citotóxica carece de antagonismo frente a la replicación

exacerbada en tumores colorrectales<sup>99</sup>. Sin embargo, se puede observar un 8% de los pacientes con edades inferiores a 40 años. *Globocan* estima un aumento entre 1,5% y 1,6% de adultos jóvenes con CCR<sup>61</sup>. Esto se debe a la modificación de hábitos dietéticos, aumento de consumo de carnes rojas, sedentarismo y obesidad juvenil<sup>100</sup>. Con respecto al sexo el 38% de los pacientes corresponden a mujeres y el 62% a hombres, estos datos se relacionan con las estadísticas mundiales publicadas por *World Health Organization, International agency for research on cancer*<sup>101</sup>.

Por otro lado, en el estudio realizado se extrajo ADN de sangre periférica, tejido tumoral y tejido adyacente. Sin embargo, la secuenciación solo se realizó de tejidos tumorales. Esto se debe a que no fueron encontradas variaciones codificantes en los tejidos estudiados, y los polimorfismos intrónicos poseen un MAF superior al 1%. La secuenciación de tejido adyacente, tumoral y sangre periférica permite determinar si la mutación es de tipo somático o germinal. Las mutaciones de tipo somático solo sería posible encontrarlas en el sitio de la lesión (tejido tumoral) mientras que las germinales se encontrarían en sangre periférica y tejido adyacente<sup>102</sup>.

Además, se omitió el uso de controles (tejidos sanos) por la misma razón anteriormente expuesta. Los pacientes sanos se encontrarían *Wild type* en la región codificante como los pacientes con CCR, es decir secuenciar la región codificante de un paciente con CCR y un paciente sano daría los mismos resultados.

Con respecto a los métodos de extracción de ADN, en el caso de sangre periférica se decidió utilizar el método de *Salting out* descrito en el *current protocols of molecular biology* con base en los estudios realizados por Sánchez et al., en donde comparan distintos métodos como el fenol-cloroformo con métodos de gradientes de sales (*Salting out*) y kits comerciales. Encontrando que los reactivos de la técnica son en su gran mayoría inocuos y poco tóxicos, además de tener el mejor rendimiento en materia de recuperación de ADN (entre 46µg y 54,6µg). Si el proceso es implementado correctamente tiene un porcentaje de amplificación por PCR convencional del 100%<sup>103</sup>. Sin embargo al ser un proceso manual tiene un sesgo de error entre extracción y extracción. Esto se manifestó en diversas amplificaciones en las que fue necesaria su

repetición, una posible explicación a este fenómeno, es la presencia de sales inhibidoras producto de la extracción, ya que éstas son capaces de bloquear los sitios de unión del cofactor (ión Mg<sup>2+</sup>) inhibiendo la acción de la polimerasa<sup>104</sup>.

Para la extracción de ADN de tejidos tumorales y adyacentes se tuvieron en cuenta los estudios realizados por Armas et al., en donde comparan tres técnicas de obtención de material genético en tejidos. Los resultados concluyeron que un procedimiento realizado correctamente que incluyera gradiente de sales (*High salting out*) permitía rescatar mayor cantidad de ADN con respecto a técnicas que utilizan otros reactivos (e.g xilol). Además la utilización de proteinasa K genera una mayor eficiencia en la obtención de material genético de alto peso molecular (e.g ADN genómico) <sup>105</sup>.

Con respecto a los exones Charbonier 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 <sup>80</sup>. Este fue previamente descrito con base en predicciones de la región promotora (utilización de herramientas bioinformáticas en desarrollo), teniendo en cuenta ubicación de la caja TATA, de tal forma que la secuencia inmediatamente seguida correspondería al primero de los 11 descritos<sup>106</sup>. Estos planteamientos serían posteriormente sustentados con la utilización de cDNA de *SPOCK1* en el año 2000, reduciendo su tamaño 162 pares de bases correspondientes al exón número 1.<sup>80</sup> En el proceso de amplificación se evidenció dificultad en la obtención de una banda en el revelado electroforético, esto se debe a la naturaleza de cada uno de los exones y las secuencias pre y posteriores. Las zonas con gran porcentaje de guaninas y citosinas aumentan las fuerzas intermoleculares, dificultando su denaturalización y por consiguiente hibridación de los *primers* <sup>107</sup>.

## 9. CONCLUSIONES

Lo expuesto a lo largo de este trabajo permite concluir que *SPOCK1* es un oncogen con una participación significativa en diferentes tipos de cáncer. Por tanto, un candidato en estudios adicionales en el CCR.

Con respecto a la pregunta de investigación *¿Existen variantes de secuencia en la región codificante de SPOCK1 potencialmente relacionadas con el fenotipo del cáncer colorrectal?* Nuestros datos excluyen la implicación de variantes codificantes en la etiopatología del CCR. Por lo que este estudio podría descartar la región exónica y los sitios de *splicing* como posibles marcadores moleculares de la enfermedad.

Se concluye a partir de los experimentos realizados y la literatura revisada que el método no comercial más eficiente para realizar extracción de ADN en sangre y 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.

## 10. 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.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Street W. Colorectal cancer facts & figures 2017-2019. American cancer society.[Internet] 2017[ citado 2018 septiembre 16]. Available in: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2017-2019.pdf>
2. Suzimar de Fátima B, Natiara Medolago M , Martins Faria F , Castelo C et al. Surgical site infection and its risk factors in colon surgeries. Revista Da escola de enfermagem da Usp. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 16];50(1):43-9. Available in: <http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v50n1/0080-6234-reeusp-50-01-0043.pdf>
3. Lain E, Hurley J, Eleni J, Millar A et al. The molecular genetics of colorectal cancer. Frontline Gastroenterology. [Internet] 2014[ citado 2018 septiembre 16]; 5 : 26-30. Available in: <https://fg.bmj.com/content/flgastro/5/1/26.full.pdf>
4. Yvonne S, Grant S, Gary . Physicians duty to recontact and update genetic advice. Future Medicine. [Internet] 2017[ citado 2018 septiembre 16]; 14. Available in: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/pme-2017-0012?journalCode=pme>
5. Paddon J, Westman E, Mattes RD, Wolfe RR et al. Protein, Weight management and satiety. The american journal of clinical nutrition. [Internet] 2008[ citado 2018 septiembre 16]; 87: 1558- 15561. Available in: <https://academic.oup.com/ajcn/article/87/5/1558S/4650426>
6. Wang T, Liu X, Tian Q, Liang T et al. Reduced SOCK1 expression inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and migration through wnt/  $\beta$ - catenin signaling. European Review for medical and pharmacological sciences. [Internet] 2018[ citado 2018 septiembre 16]; 22 (3): 637-644. Available in: <https://www.europeanreview.org/article/14288>

7. Li-Jung M, Wen-Jen W, Yu-Hui W, Ting-Feng W et al. Spock1 Overexpression confers a poor prognosis in urothelial carcinoma. *Journal of Cancer*. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 16]; 7(4): 467–476. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4749368/>
8. Kara C, Selamet H, Gokmenoglu C, Kara N. Low level laser therapy induces increased viability and proliferation in isolated cancer cells. *Cell proliferation*. [Internet] 2017[ citado 2018 septiembre 16]; 51. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cpr.12417>
9. Chen Q, Yuan- ting Y, Huan X, Yan-bo C et al. Spock1 promotes tumor growth and metástasis in human prostate cancer. *Drug Design Development and therapy*. [Internet] 2016 [ citado 2018 septiembre 16];10 :2311–2321. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4958368/pdf/dddt-10-2311.pdf>
10. Mlynchj P. Historia del cancer colorrectal hereditario no poliposico (HNPCC). *Revista medica clinica las condes*. [Internet] 2017 [ citado 2018 septiembre 16]; 28(4):512-523. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864017301013>
11. Chiaho S, Ben- Zion S, Mitchell P, Goldfarb A et al. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Cell biology*. [Internet] 2017 [ citado 2018 septiembre 16]; 76 (11): 5714- 5718. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC411720/pdf/pnas00011-0308.pdf>
12. Rigby P, The oncogenic circle closes. *Nature*. [Internet] 1982 [ citado 2018 septiembre 17]; 10;297(5866):451-3. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7088130>
13. Nishimura S, Sekiya T. Human cancer and cellular oncogenes. [Internet] 1987 [ citado 2018 septiembre 17]; 243(2): 313–327. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1147857/>
14. De Caprio J. How the Rb tumor suppressor structure and function was revealed by the study of adenovirus and SV40. *Virology*. [Internet] 2008 [ citado 2018 septiembre 17]; 384(2) 274-284. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682208008064>

15. Cala T, Camargo M, Martinez A. Factores genéticos y epigenéticos del cáncer gástrico. Actual Biol. [Internet] 2017 [ citado 2018 septiembre 17]; 39 (106): 5-20. Available in: <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v39n106/0304-3584-acbi-39-106-00005.pdf>
16. Lopez M, Salazar J, Martinez M, Pancorbo. P53, Un gen supresor tumoral. Gaceta medica de Bilbao. [Internet] 2001 [ citado 2018 septiembre 17]; 98 (1):21-27. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304485801743508>
17. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. The new your Academy of Sciences. [Internet] 2006 [ citado 2018 septiembre 17]. Available in: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06705.x>
18. Cloninger C, Rice J, Reich T. Multifactorial inheritance with cultural transmission and assortative mating a general model of combined polygenic and culttural inheritance. Am J Hum Genet. [Internet] 1979 [ citado 2018 septiembre 17]; 39:176-198. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1685756/pdf/ajhg00194-0084.pdf>
19. Peltomak P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. Hum Mol Genet. [Internet] 2001 [ citado 2018 septiembre 17]; 10(7):735-40. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257106>
20. Peltomak P. DNA mismatch repair gene mutations in human cancer. Environmental Health perspectives. [Internet] 1997 [ citado 2018 septiembre 17]; 105( 4): 775–780. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1470030/>
21. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. [Internet] 1990[ citado 2018 septiembre 17]; 61(5):759-67. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188735>

22. Calva Arcos M, Acevedo Tirado M. Revision y actualización general en cancel colorrectal. Anales de Radiología Mexico. [Internet] 1990[ citado 2018 septiembre 17]; 1: 99-115. Available in: <http://www.medigraphic.com/pdfs/anaradmex/arm-2009/arm091i.pdf>
23. Roa I, Sanchez T, Majalis A, Schalper K et al. Mutacion del gen KRAS en el cancer colon y recto. Revista de medicina de chile.[Internet] 2013[ citado 2018 septiembre 19]; 141: 1166-1172. Disponible: [http://scihub.tw/https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872013000900009](http://scihub.tw/https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872013000900009)
24. Rua Palacio K, Jimenez L, Rodriguez E, Garcia H et al. Analisis genético en APC, KRAS y TP53 en pacientes con cancer de estomago y colon. Revista de gastroenterología de Mexico. .[Internet] 2013[ citado 2018 septiembre 19]; 79 (2): 79-89.Disponible en: [https://ac.els-cdn.com/S0375090614000354/1-s2.0-S0375090614000354-main.pdf?\\_tid=d16434b3-62b8-4d14-9cde-f6ae77f5191b&acdnat=1538845877\\_f644de07ee1c824b276a36cb080f85ab](https://ac.els-cdn.com/S0375090614000354/1-s2.0-S0375090614000354-main.pdf?_tid=d16434b3-62b8-4d14-9cde-f6ae77f5191b&acdnat=1538845877_f644de07ee1c824b276a36cb080f85ab)
25. Vasovcak P, Pavlikova K, Sedlacek Z, Skapa Z et al. Molecular Genetic analysis of 103 sporadic colorectal tumours in czech patients. United States of America.[Internet] 2011[ citado 2018 septiembre 19].Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0024114>
26. Zhang L, Shay J. Multiple roles of APC and its therapeutic implications in colorectal cancer. Journal of the national cancer institute.[Internet] 2017[ citado 2018 septiembre 19]; 109(8): 332.Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5963831/>
27. Zhaol M, Mishra L, Dengl C. The role of TGF-  $\beta$ /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>
28. 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>

29. Chien-Hung Y, Bellon M, Nicot C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Molecular cancer*. [Internet] 2018[ citado 2018 septiembre 20]. Available in: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-018-0857-2>
30. 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.
31. 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>
32. 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>
33. 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>
34. 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)
35. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2014;4(March):16–9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00035/abstract>
36. Wang Q, Yan-long S, Zhou K, Wang L et al. PIK3CA mutations confer resistance to first-line chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*.

[Internet] 2018[ citado 2018 septiembre 21]. Available in: <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0776-6.pdf>

37. Pietrantonio F, Berenato R, Maggi C, Caporale M et al. *GNAS* mutations as prognostic biomarker in patients with relapsed peritoneal pseudomyxoma receiving metronomic capecitabine and bevacizumab: a clinical and translational study. *Journal of translational medicine*. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 21]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859944/>

38. Zauber P, Stephen M, Sabbath M. *GNAS* gene mutation may be present only transiently during colorectal tumorigenesis. *Int J Mol Epidemiol Genet*. . [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 21];7(1):24-3. Available in: <http://www.ijmeg.org/files/ijmeg0020142.pdf>

39. Nishikawa G, Sekine S, Ogawa R, Matsubara A, Mori T, Taniguchi H, et al. Frequent *GNAS* mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms. *Br J Cancer* [Internet]. 2013;108(4):951–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.47>

40. Damhofer H, Medema J, Veenstra L, Badeab L. Assessment of the stromal contribution to Sonic Hedgehog-dependent pancreatic adenocarcinoma. *Molecular Oncology*. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 21]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3838447/pdf/MOL2-7-1031.pdf>

41. Wang T, Liu X, Tian Q, Chan P. Reduced SPOCK1 expression inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and migration through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Medical and Pharmacological Sciences*. [Internet] 2018[ citado 2018 septiembre 21]. Available in: <https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/637-644.pdf>

42. Yang J, Yang Q, Jing Y, Ximeng L et al. SPOCK1 promotes the proliferation, migration and invasion of glioma cells through PI3K/AKT and Wnt/Catenin signaling pathways. *Oncology reports*. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 21]. Available in: <https://www.spandidospublications.com/or/35/6/3566?text=fulltext>

43. Chen D, Zhou H, Guiyuan L, Zhao Y et al. SPOCK1 promotes the invasion and metastasis of gastric cancer through Slug-induced epithelial-mesenchymal transition. *Journal of cellular and molecular medicine*. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 21]. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcmm.13357>}
44. Song X, Han P, Liu J, Wang Y et al. Up-regulation of SPOCK1 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Molecular Histology*. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 21]. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10735-015-9627-2>
45. Ping Z, Tao G, Jun D, Guang Y et al. Knockdown of SPOCK1 Inhibits the Proliferation and Invasion in Colorectal Cancer Cells by Suppressing the PI3K/Akt Pathway. *Oncology*. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 21]. Available in: <https://www.ingentaconnect.com/contentone/cog/or/2016/00000024/00000006/art00006>
46. Blackadar C. Historical review of the causes of cancer. *World Journal of clinical oncology*. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 22]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4734938/>
47. Athie Athie A, Gómez Sánchez J, Zárate Martínez J, Sanabria González M et al. Tumores carcinoides gastrointestinales, experiencia en medicina sur. *Clinica medica sur*. [Internet] 2012[ citado 2018 septiembre 22]. Available in: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-00992012000400007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-00992012000400007)
48. 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](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292016000100005)

49. 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/>
50. Sanchez M. Cáncer colorrectal (CCR).Gastroenterol. .[Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 22].Available in: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572005000100006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572005000100006)
51. 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>
52. 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/>
53. 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>
54. 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/>
55. 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>
56. Martini M, Santis M, Braccini L, Gulluni F et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. Annals of Medicine. [Internet] 2014[ citado 2018 septiembre 25].Available in:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07853890.2014.912836?journalCode=iann20>

57. Instituto nacional de cancerología. DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE COLON Y RECTO Priorización de preguntas para actualización Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud Instituto Nacional de Cancerología Octubre de 2016.

58. Helsingen M, Brettahauer M, Emilsson L et al. Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. *Best practice research clinical gastroenterology*. [Internet] 2017[ citado 2018 septiembre 25]; 31 (4): 419-424. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521691817300677>

59. Ospina ML, Huertas JA, Montañó JI, Rivillas JC. Observatorio Nacional de Cáncer Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*. [ Internet] 2015[ citado 2018 septiembre 25]; 33(2): 262-276. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/120/12039090013.pdf>

60. Irabor D. Emergence of Colorectal Cancer in West Africa: Accepting the Inevitable. *Nigerian Medical Journal*. [Internet] 2017[ citado 2018 septiembre 25]; 58(3): 87–91. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6009139/>

61. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. International agency for research on cancer. [Internet] 2018[ citado 2018 septiembre 25]. Available in: <http://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>

62. Primrose J, Fozard J. Symptoms and signs in patients with colorectal cancer. *Colorectal disease*. [Internet] 2010[ citado 2018 septiembre 27]. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1463-1318.2010.02221.x>

63. 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/>

64. Maringe C, Walters S, Rachet B, Butler J et al. Stage at diagnosis and colorectal cancer survival in six high-income countries: a population-based study of patients diagnosed during 2000-2007. *Acta oncologica*. . [Internet] 2013[ citado 2018 septiembre 27]. Available in: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/0284186X.2013.764008>
65. Lanza G, Messerini L, Gafà R, Risio M. Colorectal tumors: the histology report. *Digestive and liver disease*. [Internet] 2011[ citado 2018 septiembre 27]; 43, (4): 344–355. Available in: [https://www.dldjournalonline.com/article/S1590-8658\(11\)60590-2/pdf](https://www.dldjournalonline.com/article/S1590-8658(11)60590-2/pdf)
66. Akthar R, Chandel S, Sarotra P, Bikash M. Current status of pharmacological treatment of colorectal cancer. *World journal of gastrointestinal oncology*. [Internet] 2014[ citado 2018 septiembre 27]; 6(6): 177–183. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4058725/>
67. Fleming M, Ravula S, Tatischev, Wang H. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *World journal of gastrointestinal oncology*. [Internet] 2012[ citado 2018 septiembre 27]; 3(3): 153–173. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3418538/>
68. Theiss A, Chafin D, Bauer D, Grogan T et al. Immunohistochemistry of colorectal cancer biomarker phosphorylation requires controlled tissue fixation. [Internet] 2014[ citado 2018 septiembre 27]. Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0113608>
69. Ciombor K, Wu C, Goldberg RM. Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer. *Annual reviews*. [Internet] 2014[ citado 2018 septiembre 27]. Available in: [https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-051513-102539?rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=med](https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-051513-102539?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=med)
70. Mohammad S, Mohammad R. Rectal cancer: a review. *Medical Journal of the Islamic republic of Iran*. [Internet] 2015[ citado 2018 septiembre 27]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431429/>

71. Bellolio R, Álvarez k, Fuente M, León F. Cáncer colorrectal hereditario: análisis molecular de los genes APC y MLH1. *Revista medica de Chile*. . [Internet] 2006[ citado 2018 septiembre 27]. Available in: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872006000700006](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872006000700006)
72. Bautista R, Villanueva E, Viney A, Marchal A. Poliposis adenomatosa familiar: a propósito de un caso. *Revista científica de America Latina*. [Internet] 2016[ citado 2018 septiembre 27]; 33(2):500-502. Available in: <http://www.redalyc.org/pdf/3092/309245773046.pdf>
73. Goel A, Boland C. Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*. [Internet] 2012[ citado 2018 septiembre 27]; 143(6): 1442–1460. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3611241/>
74. Fearon E. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual REVIEWS*. [Internet] 2011[ citado 2018 septiembre 30]; 6:479-507. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21090969>
75. Pares D, Pera M, Gonzalez S, Cruz M. Poliposis adenomatosa familiar. *Gastroenterología y hepatología*. [Internet] 2006[ citado 2018 septiembre 30] Disponible en : <http://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-poliposis-adenomatosa-familiar-13095198>
76. Taguchi A, Hamada K, Hayashi Y. Chemotherapeutics overcoming nonsense mutation-associated genetic diseases: Medicinal chemistry of negamycin. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 2018;71(2):205–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2017.112>
77. Mort M, Ivanov D, Cooper D, Chuzhanova N. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. [Internet] 2008[ citado 2018 Octubre 1]; 29(8):1037-47. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454449>
78. Stefl S, Nishi H, Petukh M, Panchenko A et al. Molecular mechanisms of disease-causing missense mutations. *Journal Molecular Biology*. [Internet] 2013[ citado 2018 Octubre 1]; 425(21):3919. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23871686>

79. Strauss BS. Frameshift mutation, microsatellites and mismatch repair<sup>1</sup>This article is part of the Reflections in Mutation Research series. To suggest topics and authors for Reflections, readers should contact the series editors, G.R. Hoffmann (ghoffmann@holycross.edu). *Mutat Res Mutat Res* [Internet]. 1999;437(3):195–203. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574299000666>
80. Charbonnier F, Perin J, Mattei M, Camuzat A et al. Genomic organization of the human SPOCK gene and its chromosomal localization to 5q31. *Genomics*. . [Internet] 1998[ citado 2018 Octubre 1]; 48 (3) : 377- 380. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754397951995?via%3Dihub>
81. Fan L, Jeng Y, Lu Y, Lien H. SPOCK1 Is a Novel Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Myoepithelial Marker That Enhances Invasion and Correlates with Poor Prognosis in Breast Cancer. [Internet] 2016[ citado 2018 Octubre 1]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5023187/>
82. Konfeldt E, Maurer P, Vannahmed C. Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *Letters Febs*. [Internet] 1997[ citado 2018 Octubre 1]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579397010703>
83. Bock J, Edgell C, Marr H, Erickson. Human proteoglycan testican-1 inhibits the lysosomal cysteine protease cathepsin L. *Letters Febs*. [Internet] 2003 [ citado 2018 Octubre 1]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511383>
84. Angosto M, Gomez J. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *Academia nacional de gastroenterología*. [Internet] 2009 [ citado 2018 Octubre 6]. Available in: <http://analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/1076/1082>
85. Edgell C, Basalamah M, Marr H. Testican-1: a differentially expressed proteoglycan with protease inhibiting activities. *International Review of Cytology*. [Internet] 2004 [ citado 2018 Octubre 6]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0074769604360031>

86. Riquelme O. Participación de catepsina L en procesos de apoptosis y autofagia en líneas celulares de cáncer de colon sometidas a estrés metabólico. *Revista de Bioquímica y Biología molecular*. Internet] 2016 [ citado 2018 Octubre 6]. Disponible en: [http://repositorio.udec.cl/bitstream/handle/11594/2171/Tesis\\_Participacion\\_de\\_Catepsina.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.udec.cl/bitstream/handle/11594/2171/Tesis_Participacion_de_Catepsina.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
87. Coronato S, Laguens G, Girolamo V. ROL DE LAS METALOPROTEINASAS Y SUS INHIBIDORES EN PATOLOGÍA TUMORAL. *Revista de medicina de Argentina*. [ Internet] 2012 [ citado 2018 Octubre 6]. Disponible en: <https://medicinabuenaosaires.com/demo/revistas/vol72-12/6/495-502-MED5-15.pdf>
88. Sarrazin S, Lamanna W, Esk J. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology*. [ Internet] 2011 [ citado 2018 Octubre 6]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3119907/>
89. Liu P, Cheng H, Roberts T, Zhao J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. [ Internet] 2009 [ citado 2018 Octubre 6]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644473>
90. Song X, Han P, Liu J, Wang Y et al. Up-regulation of SPOCK1 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Europ PMC* [ Internet] 2015 [ citado 2018 Octubre 6]. Available in: <https://europepmc.org/abstract/med/26077618>
91. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. [ Internet] 1988 [ citado 2018 Octubre 12];16 (3): 1215. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334765/>
92. Gaaib J, Nassief F. Simple salting – out method for genomic DNA extraction from whole blood. *Tikrit Journal of pure science*. . [ Internet] 2010[ citado 2018 Octubre 16]. Available in: <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&ald=37997>
93. Cheng W, Su Y, Xu F. CHD1L: a novel oncogene. *Mol Cancer* [Internet]. 2013;12(1):170. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-12-170>

94. Perurena N, Zanduetta C, Martínez-Canarias S, Moreno H, Vicent S, Almeida AS, et al. EPCR promotes breast cancer progression by altering SPOCK1/testican 1-mediated 3D growth. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2017;10(1):23. Available from: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0399-x>
95. 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>
96. 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.
97. Luna Abanto J, Rafael Horna E, Gil Olivares F. Cáncer Colorrectal En Adultos Jóvenes: Características Clínico Epidemiológicas En La Población Peruana. *Rev Gastroenterol Peru*. 2017;37(2):137–41.
98. Milholland B, Dong X, Zhang L, Hao X, Suh Y, Vijg J. Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(May):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15183>
99. Gómez M, Danglot-Banck C, Huerta S GG. El estudio de casos y controles: su diseño, análisis e interpretación, en investigación clínica. *Rev Mex Pediatr* [Internet]. 2003;70:257–63. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/pediat/sp-2003/sp035h.pdf>
100. Ríos Sánchez E, Calleros E, González Zamora A, Rubio J, Martínez OC, Martínez A, et al. Comparative analysis of different DNA extraction methods and their genotyping efficiency in Mexican population. *Acta Univ* [Internet]. 2016;26(4):56–65. Available from: <http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/view/1078>

101. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J Vis Exp [Internet]. 2012;(63):1–15. Available from: <http://www.jove.com/video/3998/>
102. De Armas Y, Capó V, López LX, Mederos L, Díaz R. Comparación de tres métodos de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina. Biotecnol Apl. 2011;28(1).
103. 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.
104. 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.
105. Colace L, Boccia S, Maria R De, Zeuner A. Colorectal cancer : towards new challenges and concepts of preventive healthcare. :10–2. Available <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5529626/pdf/BMRI2017-9306564.pdf>
106. 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](http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v31n4/en_v31n4a09.pdf)
107. 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>



OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	9	24	64.41	45.83	8.00	0.00	caatgagatcacatggacacagga
RIGHT PRIMER	1709	24	64.01	50.00	3.00	0.00	atcacggttaggagaagtcggaag

SEQUENCE SIZE: 1810  
INCLUDED REGION SIZE: 1810

PRODUCT SIZE: 1701, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

hSPOCK1\_-1165\_F: caatgagatcacatggacacagga  
hSPOCK1\_Int2\_R: atcacggttaggagaagtcggaag  
hSPOCK1\_-790\_Seq\_F: CGAGCCAGCGAGCGAGCAGAGC Tm manual: 76°C  
hSPOCK1\_-267\_Seq\_F: gcaactggagaatagacgagac Tm manual: 68°C  
hSPOCK1\_-989\_Seq\_R: cttaagtttagggtacatgt Tm manual: 58°C

### EXÓN 3

acatatagcaaagcaattgaatattaactacaaagggacaaatccttaaagatgctatgaggataatgtg  
catgggtgacacctcttcaacttgcaactgttcagttttgctgatacagtggtgtgcccaggaacaat  
gggggtcaaagtgctgatggggagaataaaagggagtacatggtggctgttaggaaggaaagggttattagg  
agtgggggaagaagttaacatagctgtgaagaattgagtgattgagatccttgcaattttaagtaatgaa  
ttgcctagcctcagagcataaattgatgcaacccaaatgcaggaagacatggttatgaagagaccagac  
tggccagcctttgtttttcatctttccatacccagaacaaatggtattaagctaaatgtacgcctttgg  
ttaattctaacaatttgaaggtgtctcttttttaggtttttgtgagtattgaaaaactggaactgtgcacc  
acaagatgctgtctgtatgtaaaagaaatggtgacagttgaattatcagctgttacaacacagaggtc  
taatcataactgagagcagcaagggcatcacctacagtataaattgatagcaaatcaccttgacctgaa  
ggtgtctgggtttatagtcaactaagaagagcagcgctgtttctataactgggctgaaaatgtttttact  
attcccagatttgaatacacatacaggtttgaaagacaggaatttgaaaaggaaattgatattttttattac  
acattaatgcctgttttgggaaaaatttctaagcctttcagtgttttcctttgtgttttgggaggtgaaa  
ggaagggcaggtttttatgcagttatgtgagaagccttttgaactctgacctttgttttctattttttcc  
ttatatagGATGATTATTTTCAGAACTGGAATCCCAACAAGCCCTTTGACCAAGgtaatggat  
gcaatatttcttctgtatagctctgtggtaaatgtgggtctcatttttcccttcccttgcagctgag  
ttaatgttcccacaagggccagctagcgggtgttattttattgactttgggactgaattgactgggtga  
tagaaattttttatcaaatgtgttatttctgtgaggttataatctagggctgatttaacaatttctttt  
aattggcttgaccaataaatcattgattcgttttttaaaaaaaagtgaatttgattatcaaat  
aacatggtgaattgtggggctgaatgcagtgctttcattcatggaacagactatgcctggagatgcttcc  
ctaattcacatgagccataacaatgaaactttcttctagaaaaaggttaatcctgggagactgtcaagg  
gtactgcgattttatttgttaataaacttcttcatggtttctaaatagaagcctgtttcagagttagctc  
gatgactacttgggtttaagcatggcccacagaaggctttctccacccccattccccagcaagcatcaa  
accagtctctcatgatagctgttgtaaatcactaacagtgctcctcctgtgagttatthaagacacagtga  
ggacctgcatgaatcacatcccttccccgttgttccatgtgtgggtgctgttgaaaatgatggtagatt  
gcacttcatatgttcatatggaattaatgcaaaaacacaatgaaacagattaccacatctcaag  
tgttcattctctgagaatcagcttcagttctgtaattgtgagattcagatgtgatcatgatggtaactt  
gatacgaagaaatcgagggaggcattgacatgtgacatggaggaagggtgctcctttctgccctctgcttg  
gtcagtttaatgggtcactacctctggactctggttttctcgtgaagcaaaaatggattaaaattgcat  
atatacatttatcatagggctttgaagtagtgaacaattttttcattcatgcatgctagcattctcaaac  
atattattgagctttcgtctgtatgcacaagcacaagccaggtactggggatagagaaaaatgca  
tgtggtgacctaccctacaggagc

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	229	24	63.75	45.83	4.00	2.00	cgctgtttctataactgggctgaaa
RIGHT PRIMER	953	24	63.93	54.17	5.00	3.00	gtacccttgacagctctccaggat

SEQUENCE SIZE: 1008  
INCLUDED REGION SIZE: 1008

PRODUCT SIZE: 725, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

hSPOCK1\_Int2\_-251\_F: **cgctgtttctatactgggctgaaa**  
hSPOCK1\_Int3\_428\_R: **gtacccttgacagtctcccaggat**

**Products on target templates**

>[NC\\_000005.10](#) Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p7 Primary Assembly

product length = 725  
Features associated with this product:  
[testican-1 precursor](#)

```
Forward primer 1      CGCTGTTTCTATACTGGGCTGAAA 24
Template       137267306 ..... 137267283

Reverse primer 1      GTACCCTTGACAGTCTCCCAGGAT 24
Template       137266582 ..... 137266605
```

**EXÓN 4:**

tgttatcattttatatgcccgtcatggctccttatctaattctgccttgacacaataaatatattatgtgtaa  
gcttttccccctccctgttacgttgtaactttgtgcggcacaaaactgtcttacatatacctgaagttctt  
caaaaacttaaaataggttgtttatgacatagtgtttattgaaatggaagcaaaaaactctgtcctcaag  
gacttttcataggaaataagtaaaacttaggcattgaatgaagtacataaaaagcaaacaccagattcataacc  
aaagagggaaaagtagctctgtttcttggatcatgtgagattctaaaggattttttaaagtaattcct  
gcctgagctgaagatgctgaaactcccaagcacaaggaaattgctcccctgatggtgaggaagaatgtg  
tgatagacacagaatttcccctggcttgggctttcattctgttcccctccagcctcagagaaacagcaccg  
agggcaaacacatggttggtttacttctatctgtttatttaagtagaatagaattaaggcccgggtgc  
agtggtcagccctgtaatcccagcactttgggaggtcgaggcaggtggatc**atctgaagtcgggagttt**  
**gagacc**agcctggccaacatggtgaaaccccatctctattaaaaatacaaaaattagccgggtatggtgg  
cgtgcacctttagctccagctactttgggaggtcgaggcaggaaaatcactgaaccaggatggggagg  
ttgcagtgagctgagatcgcgccaccgcacaccagctctgggcaacacagcgagagtcctctcaaaaa  
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaattaaatttccctggaggtcctaaaccctgcctcctcttctgtttt  
cctcag**CCCTGGACCCATCCAAGGACCCCTGCCTGAAGGTA**AAATGCAGCCCTC**CACAAAGTGT**  
**GTGTGACCCAGGACTACCAGACCGCCCTGTGTGTCAGCCGCAAGCACCTGCTCCCCAG**  
gtaaggcaggaaggccgggggctgggggctgggaggtcattctgcagctggcagatctgaggggtt  
ccagtctttgacgtggggataggggaggggag**agcatagtgtagggcgcattt**gtatgggtgttgg  
tgctgtactctgactatgataggaatctcagttctcaaacacagggttacaagaatgtccatctttat  
ttcctttaaatctacttccattttgactctgagtcctgatctgaacagatgagcagaaaattccttcttgg  
tcatgattgagaattttctcctcccagagtgatgccacgaccaggaaacttacaactaagaaagcaggg  
gccaagtgtttagctcctggttgactaacaacctcactgtgatgattcttcgaggtccattgaggccc  
aagggtctctgcttccatgtccccattggatgtagcatctttgccatccttgggttttgggtcctgct  
tctcaggaccaccacaccaccattccttctgggaacatgctatttctcagggtacagcccctgatatcc  
tcttttcccagcccagggggaagtatccccatcttctcagggtccttaaagccattgcttttacc  
taattccactcccagcatcatctatccagtggatttaggctttcacaatgatggatacaggcttcaat  
tcagactgcttctgcctttggctcctgcaaaaatacctgaagcatgaaagcaaacatacacatgcaa  
acgggcttttcttaagaaggagtcagatggggcagggatgagaggaaggcaatttcagtgcattctg  
cacttctccctgtgctgctgtacaattgagaggtgtcgcagtggggctttggagttgc  
ccatgt

```
OLIGO      start  len  tm    gc%  any  3'  seq
LEFT PRIMER  102   24  64.14 50.00 4.00 1.00 atctgaagtcgggagtttgagacc
RIGHT PRIMER 641   24  64.11 45.83 2.00 2.00 aatggcgaccctaacactatgct
SEQUENCE SIZE: 996
INCLUDED REGION SIZE: 996
```

PRODUCT SIZE: 540, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

hSPOCK1\_Int3\_-303\_F: **atctgaagtcgggagtttgagacc**  
hSPOCK1\_Int4\_122\_R: **aatggcgaccctaacactatgct**

>NC\_000005.10 Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p7 Primary Assembly

product length = 540

Features associated with this product:

[testican-1 precursor](#)

```
Forward primer 1 ATCTGAAGTCGGGAGTTGAGACC 24
Template 137140997 ..... 137140974

Reverse primer 1 AAATGGCGACCCTAACACTATGCT 24
Template 137140458 ..... 137140481
```

## EXÓN 5:

acagctttggctaagagaggaagggtggcagtaactgcaggcctttatctcagtggttatgatatagtg  
atgggggtccctccgctggacgtaagtcacctaataagcgacatttatcattatgacaaagggttagaatgg  
ggaaaaacttgagctggaatgaaagagtagaattctgattattttaacagttgaaagtacatcacctca  
gagcctctatcaaatggcagattggaagctggactgaaattactttaaaatataccagagatagtttct  
tacagctgtgataaaagctttcagttgtgttcagaggtgtgcttttctctaaagecctcattgagttgcc  
cgtgctgctccacacaaaaggctgcctgtgagtcaggagagctcagactttgggggtgctgttctct  
gggcaccgctgatatgccacatacggatttggggctgattaagccatattccctcaccgtttttttctt  
ttttttctgtgtgtgtgtaaaaatcttcccatgtcagtagtcagttttcaatggctacattgttttct  
cagtcacatctggtttgttgaatctatgcttctgggacaaaatcctctgcttctcatcaatgagttggagc  
aatggaagtgtgctggaagccctcaggatcccttggcctgggtggatagtcctttatttatttggcct  
tttattctgggaacttagaggaagactcatagggctctggagcttcaactaatttatccct  
tttttctcatcttttagGCAAAAGAAGGGGAACGTGGCCAGAAACACTGGGTTGGACCTTCG  
AATTTGGTCAAGTGCAAGCCCTGTCCCGTGGCACAGTCAGCCATGGTCTGCGGCTCAGATGGCCACTCC  
TACACATCCAAGgtttgggttttcttctgtctttttatggttatcaaaaatacttcatgtcggcttgg  
ctaacttctctatgccaaaactggggcttgggaagcgtgggtgggctccaggccttgccttgagaagc  
tgctgcattagcagactcagagatgttctctggccatggagacaagcaaaaataaaaatattctatcctgt  
gtaactgggctggttggaggggaagaagaagggaatgggttctgagaatggcatgtgatcctgaagttaac  
tagacaagcttccctggagaaggtgggatagccagctgttcaaaagaggcaagtcataatagctcaactgat  
ggggagcaaacagtaaggggggctcgtgatgctgccttgtgccagtgagtggaaggaaggggtgtgac  
atcagtgcacacctaattcacacttactgcacatctagaatgcatctggccctgcacaggcccaataa  
ggcactgttcttttctgggggtgcctcagggattcacagatgaatgggggtagggacaagtgtgtgacag  
gtcattttaactcaaaccaacaacaagaaaattgtttcacagaaaaggggctgggataaaaatagtcta  
tttatatttattggagggatgaggggaaggcttatttctatttggaaagatgaggaaaagcctcttctaga  
ggggcatttcacctaagctctaataataggatttacaggcagggaggcaggggttatggaagttagagaa  
ggaggtgataatttgttcttggaaactctccttgggtgaagtatggccatttgtgattgagaatgggtacg  
tttcaccaggataatgaactaaagggaaatcatagaattgataggagtttgcttcttcattttcatatcc  
gacaaccatccctgaggatctaacattgctagactaacattgcttagacacaaaggagcc  
agtgtatg

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	150	24	64.10	45.83	3.00	0.00	cttctgggacaaaatcctctgctt
RIGHT PRIMER	716	24	64.00	41.67	7.00	3.00	atcacatgccattctcagaacct

SEQUENCE SIZE: 923  
INCLUDED REGION SIZE: 923

PRODUCT SIZE: 567, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

hSPOCK1\_Int4\_-191\_F: cttctgggacaaaatcctctgctt  
hSPOCK1\_Int5\_249\_R: atcacatgccattctcagaacct

product length = 567

Features associated with this product:

testican-1 precursor

```
Forward primer 1          CTCCTGGGACAAAATCCTCTGCTT  24
Template       137112752  ..... 137112729

Reverse primer 1          ATCACATGCCATTCTCAGAACCAT  24
Template       137112186  ..... 137112209
```

## EXÓN 6:

```
ctgataattgttggtgctcttttgcacctattaataacattcctctctcctgctggttctgagaattca
ttgagacttttagagtaaagagctgacagaaaaatgactaaaatattaccattgctactgataaagggttg
acaagaggatgtggattatgggcttctaataatcttagaattaggtaaacatttccacggagtcac
aagctagttagaccacaggcatcctctgatgggggaagaccctgtgaaacttaggttttgacaacggaa
gcaagagcattcattcttcattgctcccaaggggaaggggctgagcctcagattaccatacagacttact
aaagggattgttactcttccctcccaggaagagcatgtgagcaggctgagaggaccaggagtggtattc
cagcgggtgttacctccacacgggaggagtgtggagaagatgcctcaaagtgaatggaggggggttctgga
ccagataggactctacagatgtaagtctcatattaataatctttatcttttagaaatagtgcagtaggggt
taccatcattaaaggaagtcttctagggcttccacagtgtttttagaagttatcctctgcatttggtaaa
atataaaaggccatttcttatttagtattctgtaattgagacctctacctgaggtcgacctctccctgct
ttgtctttgcttttgtgaagcaaaagggcactgctgttcttaggaggcggggtaggggtctgttatggct
gcattcttaagacctgttgtgtctctcttttgcagTGCAAATTGGAGTTCCATGCTTGGTTCTA
CTGGCAAAGCCTCGCCACCCTCTGTGATGGGCCCTGTCCCTGTCTCCCAGAGCCTGAGCC
ACCAAAGCACAAAGGCAGAAAGGAGTGgtgagtgagggttcccttcagagaattcgtgggcag
gaaatgggggggtcacagagggttgatgtggccgagctctgtcccaggcactaggaacaaactggagaaa
tgagcagacatgacaggtaagtactccagatttagggaccctaaaccgaattgccttcaactaccattaa
aaagatgaacaagagcctttgaaaataatcctgttagaccaggatccactaggttcttttagaggtca
tattcgctatgggtgaggagtagctgttttccagcatctaagaccggacctgcctggggtagatcttag
tctttcttgaactctaactcttttgaatcctttgaactctcaaggccaaatatcaaacagagactgcag
agatgtcacaacagtgaggagaggttctcccctaaagtatttctttattaatataattctgcttgtaaggca
gcacagagccaggggacagatgaaagagaataacctccctaagggtaactgtttctctctgtggctgaga
gggccaggaaagcttgggctcatttggatgttttcatgatggagaaagtaatgttgtcccactgggtctca
gcctctttttgagccttcccttgggtgagaccaagatagacgtttgaatttgccttctgtggaattcagct
ttctcagctgtagttggcttttcttgaaaattgttgcatttctctctctctctctctctctctgtgtgtg
tgtgtgtgtgtgtgtgatgcttatgttttaaaatctaggagtgatttgaatggagtggaatgaatggg
gtatgagcgtttatctatctggtcctttataagctatgttgtcttttccagggcaataaatgatgaaga
tttcaaatctaaatgtgatcatggtgacttcaggaatattgtgtttaaaggctcttttagagggttaagt
caggatgtggaaggacgttgtaaacatgaaacactgtgattacaaataatctccagttat
tattcttgatttcta
```

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	12	24	63.98	45.83	4.00	1.00	gtggagaagatgcctcaaagtgaa
RIGHT PRIMER	746	24	63.86	50.00	4.00	1.00	ctcccacaccatagcgaatatgac

SEQUENCE SIZE: 921  
INCLUDED REGION SIZE: 921

PRODUCT SIZE: 735, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

hSPOCK1\_Int5\_-356\_F: gtggagaagatgcctcaaagtgaa

hSPOCK1\_Int6\_264\_R: ctcccacaccatagcgaatatgac

>[NC\\_000005.10](#) Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p7 Primary Assembly

product length = 735

Features associated with this product:

[testican-1 precursor](#)

```
Forward primer 1          GTGGAGAAGATGCCTCAAAGTGAA 24
Template       137068185  ..... 137068162

Reverse primer 1          CTCCCACCCATAGCGAATATGAC 24
Template       137067451  ..... 137067474
```

## EXÓN 7:

```
agcgtatgccctgaggggaagaggggaggggctagggaaaagtcaactcccttctctgcaccattttttattcc
tttgggattttctttcctcaagtttttagcactctacaagaccttcaaatagcttgcacctacactacc
tgcccacccatccatctgtctggattttctgttctcaggagatctgtctgccccagtgattctgtctt
accctaagaaatgactaaatagttatagatgggctgaaaggactgtttcatggagaaggcatccatctgt
ttacagtggaagtcgaagaatgagaccactggaaggctagcaaaaataggccaatccccaaatccaaacc
ttgggctaagacaaaattaggagctctgctatttaataaggatcctttgggtgcctaggcagcctctcttaa
gagcattagctgtgctgggtgtaatactcttggcatgagtttagtggaatgtaatctcctctggcaa
aactgcaagagcaagctttatgcggttagcaaaagtgatctgtgattgtctgtcttctgaggatgctaca
caacggtgagaccactgcagcttgcctttcacagcacagaggccatccaaattcaagttctgaacaaaggc
tgcttgccctgggggtctaggtctctttttgtcccactcttggtttactaacagcatctttgggggtg
ttttccacgtgaggtaacagttatatcgtgggtggatagaaaggttgccttgacgtggctttgccagt
agccctgcacacagaaggcagaaagccccagccccattgtctgttctgtttgcttttct
ctagCCTGCACAGACAAGGAGTTGCGGAACCTTGCCCTCCCGGCTGAAGGATTGGTTTGGAGCTC
TCCACGAGGATGCGAACAGAGTCAATCAAGCCCACCAGCTCCAACACAGCCCAAGGCAgt
aagaccattttaaatatcacatttccctcaatttattagacattgattagggttagcaatatcat
ttgggggtgaaaaaacaccattacattaatatatactttgactttaaatatgtcccaatctcaaaaaaa
agttggattaaaaaatgttttagtataggcattttgaaaaaatatagatctcaccattttaatgaccgt
aagcatgctgtggtacataactttaaggtttttctgggtgcatatatgaaacagcgtgtgtgtataat
tacaagtttggatcatactttccagactgttttatgatctttaccatgtagaaatgtgactatctttt
catgttgatgaatagatattctgctttctgatagctacacagaatcccagtttatggagataacagtttact
taatttgatctttattttgggacattgaggttgttgccaatgttaggctaataagaagtaacactgtagca
aacatctttgggtgctatgtctttttgtacaatagtcagactgcataattgtcttccacagaaactcccaga
caggtgtcccctctcccacataacatgcagattgtcaaggagcctcccgcagcatcaggtgctga
gttggcagagaccatactcagttttgtcataagctgcagagaacactcagagtgggctcctcacatttgca
catcaatggagctctctttgatgcctttaattcaaaggcagttaggataggcttctccacactgtggcca
atgagcacagaatagattactaaacacaattatttgatataatgtagtttggccacagccttctctatgta
gccattctgatattatttgggtcaaaaataaaaaacacatcatttaaacagcatttcacctgatcccctg
cttgtttggaatttctgaaagtaatgctcctggattgaaatgcagtaggtaagaagttagtttagagta
gcaactgttgagatcccaggtttgactagcatctggttttcagcca
```

```
OLIGO      start  len  tm  gc%  any  3'  seq
LEFT PRIMER    49   24  64.07  41.67  6.00  2.00  gcaaaactgcaagagcaagcttta
RIGHT PRIMER   736   24  64.44  50.00  8.00  3.00  gtaccacagcatgcttacggtcac
SEQUENCE SIZE: 915
INCLUDED REGION SIZE: 915
```

PRODUCT SIZE: 688, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

hSPOCK1\_Int6\_-348\_F: **gcaaaactgcaagagcaagcttta**  
hSPOCK1\_Int7\_223\_R: **gtaccacagcatgcttacggtcac**

>NC\_000005.10 Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p7 Primary Assembly

product length = 688  
Features associated with this product:  
testican-1 precursor

Forward primer 1 GCAAACTGCAAGAGCAAGCTTTA 24  
Template 136992948 ..... 136992925  
Reverse primer 1 GTACCACAGCATGCTTACGGTCAT 24  
Template 136992261 ..... 136992284

**EXÓN 8:**

caaagtgccttagaagcatgctttctatatagcaacagacgttcacttttatcattggggattccagaaa  
aatacaactagccctagaaaatccagtttatggaataacctgagattgcacgggaccttgattctgaaaa  
aagttgagttttaaactctgggacatgtctacagttagactcaatatcccagtggtgagctaagtgttatt  
atthttagtgcatatactttccattgtggaacaaataattctttaagaaaacaacttcttccccag  
gaaataagaaagaaattattgtctgagttgatttggattccatctcatggatctccttaggggattgcag  
aagagaagagtggggaacagaggcaggcacctggctgttttgccattaacattcagactgcttgattt  
aaaggctctctgggatgcaagcgggtgcttctggattatgctatggtgtttcattcactgctatccttt  
aaaaatattttatthttggttttccagatthttttgaaatacgaaagcatagthttttggtaccataagcta  
tacctctcactcaccatgtttctattatthttctttcaggcacacccccatttaagcaaatgaaaacacata  
tttatatcacagatatgttaaca **ttggggatthttcccccttttagaa**atathttcctcaaatgatgactt  
ttaaaccatttctacttaaaaaacaaaaacaaaaacacaaaatattctagagaaccactaaatctgtatgc  
tgggaaggaaacagcctcaggaaggagtcaggtgggccttggcatcttcttggggcagaaagctgggga  
gtgagcagggaggaaagcatcaggccttgggtggcagctgagatatgcctthttgtttggca  
g**GGTTTGACACTAGCATCCTGCCATCTGCAAGGACTCCCTGGGCTGGATGTTCAACAAGTTGG**  
**ACATGAACATGACCTCCTGCTTGACCCTTCAGAGATCAATGCCATCTACCTGGATAAGTACGAGCCCTG**  
**TATCAAGCCTCTTTCAACTCGTGTGACTCCTCAAGGATGGCAAGCTTTCTAACAATGAGTGGTG**  
**CTACTGCTTCCAGAAGCCTGGAG**gtaagggtgggatggagggttgggggtccctagcccagggc  
agccttgctggagcagaggaggactgcgtatgactatgaattgggcagagagccacagccagagaata  
aataattcattccatttaatgccaggccaaagtctcatttctccagtttatttctgctthtaagtgg  
tatactagaaaaaccaagagtataaatcaagtagtcagtt**acttctgtctgttctctcttgg**ggaagt  
ctctcaactgtccgtatthttcatctatacaatgggtatagaaaccttcatgacataatccaaaggctact  
gtgagctctcaatgtaaaaaataccttaaaaaatgtaagagacaatgaaatcattctcattgagaaagtc  
acttgtcagthttctctaggataagttcagatttataactaagtgctctagacaagaatthttggtataa  
ataaactccagcctaatagaaaaaagaggcaagatttggggaatagaagaaagataaccaggatthttcat  
ataacccaaagtccagacaggttggcctgctgggggattcagattaaggacaggaagccagtgccaggtgc  
cctgactthtacctccctctgtctgtgggggtgcacctgagtagtgccagtcacagttaatgggaccagaaga  
gacagggccacatcgggagaaacatacaactacaggcatagctggtatatcccaccgccaggaaggagga  
tggctgctaataatgaaagtatttaagttatgtatgcatagacaatacacacacacaaaaaacgtgggta  
ttcagtgaaaggtaagtagtggtatgggatttcaagatatgthtttaaaattactagtcaaaaggcat  
gtgcctthtaaaatttgagcaattgacctcacctccaaagaggtggtacaattthttactthtccaaag  
atatatgagaatacctattctctatggcgthtaccagcttcttgatttatgagttaggttg  
aacatctgtaca

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	70	24	64.35	41.67	6.00	0.00 ttggggatthttccccctttagaac
RIGHT PRIMER	779	24	64.12	50.00	2.00	1.00 ccaaagggaggaacagacagaagt

SEQUENCE SIZE: 918  
INCLUDED REGION SIZE: 918

PRODUCT SIZE: 710, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

hSPOCK1\_Int7\_-247\_F: **ttggggatthttccccctttagaac**  
hSPOCK1\_Int8\_241\_R: **ccaaagggaggaacagacagaagt**

product length = 710  
Features associated with this product:  
[testican-1 precursor](#)

Forward primer 1 TTGGGGATTTTCCCCTTTAGAAC 24  
Template 136988890 ..... 136988867  
Reverse primer 1 CCAAGGGAGGAACAGACAGAAGT 24  
Template 136988181 ..... 136988204

**EXÓN 9:**

caagaagtcaacaaaatgtatTTTTACAAGCAGTtTctctcatggaacaagcagcaagaccaggtagcatt  
gtgcagctacacaggtaagagttgtaaatggttgcttagatactttatatgcaagtgtggggcctgcaga  
aagaggcagtatcagccaaagataaagaactcagagaaccagaactcctctgccaaggacaggatgaacca  
tgaacaaatagcagaactcccagagccacaaggtctgcaaaggcaaatcatggtaaaactctgaagaatg  
aatgaggtcacttttcatTTTgcttagaatgaaactaacttcttttctatgacatgcatTTTgccgctga  
ggaccacagaggctgggacaggtgaattcagctaggaggtggcagagcctagatacaaagtctcatcagtg  
cttctccagatctcttctgtagcttcatagttgtccctcaaagcctatTTTacttttctggggggtgga  
ggtctgaagtaaccattcctatccatccttctcctacaggaaaacctaggctatataagtatttgcacct  
ctggtagtctgctgTGGGATTCAGAACACTTCCCCTTTTATAAGCCTGGCTGATTACTTgcttctctga  
tagaaaggaaaaagtccattacaccacctattagatacttgggtatttggcttgagttggtagactagaagaa  
aaatttctatgcaatgcaagtggcccccaataactatTTTtaagtgcattgtggtatgaggtttgttttt  
aactagtaacactaatggccgaatttgttttcttgcatagtaacagcatatggaacaattccactccca  
ggtgtgtcattgtctacatttcacatcaagagtgaagtcaatcattagcgattatactccataccatct  
ggaagctgactttcagaaattatTTTTtagGTCTCCCTTGCCAGAATGAAATGAACAGAAT  
TCAGAAGCTGAGTAAGGGGAAAAGCCTGTTGGgtaagtacaatttcttgccactcatttaaac  
actaattaagccagccatgtcccttgtaatgatcagcatggcaatggttattcaattagggctagtgt  
ttcatgaaagaaatgccttgTTTTaaccacagcagagctctccaggcagctggacataaacagaggac  
tggctgggtgaaaactgctgtgtgttcccttcggcaggaagagaggtcagccagggccgaagtccagcacc  
tccccactgctaactcctccctgatcttagcttaaaacaaatcctggcTTTTtaagtaagatcattg  
aatgggtgctctcaagtgtcaaaatataaaggctcaaaaattatagcatttctccattccccggatagga  
ttgtctgttgaaggagcagatgggctgtaactctcttcagaatttatcaaacaggggtgaacgacatgta  
tgtgcttaagcctatttctaccttcacctaattccctccaggaaagtatgcaggctgTTTggacaccacgg  
aagcaagtgggttgagtgaatgtgtgttcccccaacatgcacaacttgagtcctctcaaagtgtccct  
ttagctccaagcctgcctttctccagcagctggaggaagtctggcatttgtcatagaaacactggccat  
tctcattggTTTgctgaagaaaggaggcctgctttgctttccttgcttttaaaaaagaggtgtcagc  
tgcaacacagtaatacagaattattcccgtgaagcattcagaggcagatgcattcccccaagcagcctgcc  
attcagaagtttctctattcatttgaaggaaatgaatagagaaggaaatgggcaagtttcttgcatg  
tgtcaaatgtaggcagctctatgaattccggtgattttcttctcttaggattttttgagttatttcaaaat  
gcatgtagacttccccaaagtgtgcaggatttcgaactctttaggcctacattcttctgctgagtaaaag  
gacataaagatatatttctggctctgaaggcaaagtggctggatccctcctccataggattttctagtga  
aagacttgtgtttgtttattgatctcatttctccatgtgggatattttttgagtgacgtacctatgatc  
tgcaggtagttgtagaatttagtacattgctgtttatataaacatacattgcctcattggtaagggtc  
acctgtgataagatgtctcatttaccacagtgccacatgaatga

	start	len	tm	gc%	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](#)



```

OLIGO          start  len  tm    gc%  any  3'  seq
LEFT PRIMER    596   24  63.92 41.67 4.00 1.00 tggttgggcaaagtattggtaatg
RIGHT PRIMER   1956  24  64.01 50.00 5.00 3.00 CCTTGGTGCCTTGGAGTCTTAGAT
SEQUENCE SIZE: 2755
INCLUDED REGION SIZE: 2755

```

PRODUCT SIZE: 1361, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

hSPOCK1\_Int9\_-445\_F: **tggttgggcaaagtattggtaatg**  
hSPOCK1\_3'UTR\_R: **CCTTGGTGCCTTGGAGTCTTAGAT**  
hSPOCK1\_Int10\_157\_Seq\_R: **acgggagctcatgtgattcag** Tm manual: 66°C

>[NC\\_000005.10](#) Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p7 Primary Assembly

product length = 1361  
Features associated with this product:  
[testican-1 precursor](#)

```

Forward primer 1          TGTTGGGCAAAGTATTGGTAATG 24
Template       136979924  ..... 136979901

Reverse primer 1          CCTTGGTGCCTTGGAGTCTTAGAT 24
Template       136978564  ..... 136978587

```

## Preparación de reactivos

### Preparación de Reactivos

#### Solución de lisis de glóbulos rojos (preparación 1000 ml)

- 1.1. Pesar 8.3 g de cloruro de amonio.
- 1.2. Pesar 1 g de Bicarbonato de potasio
- 1.3. 2 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0
- 1.4. 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)

- 1.5. 50 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0
- 1.6. 200 ml de SDS 10 %.
- 1.7. 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. 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)**

- 1.8. Pesar 20 g de SDS
- 1.9. 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)**

- 1.10. Pesar 385.4 g Acetato de Amonio
- 1.11. Mezclar el reactivo en un Erlenmeyer que contenga 100 ml de agua destilada utilizando un agitador magnético hasta homogenización completa. Puede requerir calentamiento ligero.
- 1.12. Transferir el contenido a una probeta y si es necesario completar el volumen hasta 500 ml con agua destilada.

### **TE 100X (preparacion 50 ml)**

- 1.13. 25 ml de tris-HCL 2M pH 7.5
- 1.14. 10 ml de EDTA 0.5 M
- 1.15. 15 ml de agua destilada
- 1.16. Se mezclan las soluciones, y se debe realizar una solución ya que debido a que la concentración de solución de trabajo es 1X. Se agrega 1 ml de la solución preparada (100X) a 99 ml de agua destilada.

### **EDTA 500mM pH 8.0**

- 1.17. Pesar 9,31g de Ácido etilendiamonitetracético, sal disódica dihidrato (PM: 372,24 g/mol)
- 1.18. Pre-disolver en 35ml de agua destilada.

- 1.19. Ajustar a pH 8.0 con NaOH sólido.
- 1.20. Completar a 50ml con agua destilada

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

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

#### **Proteinasa K 50 µg/µl**

- 1.25. Disolver 100 mg de Proteinasa K liofilizada en 20 ml de agua estéril.
- 1.26. Realizar alícuotas de 1ml y congelar a -20 °C.

#### **TNES Buffer ( Tris, NaCl, EDTA, SDS)**

- a. 10 ml; Tris, pH 7.5
- b. 400 mM NaCl
- c. 100 EDTA
- d. 0.6% SDS



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

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 *SPOCK1*) 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 *SPOCK1* 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 consejeriagenética.

**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 *SPOCK1* en el cáncer colorrectal de la siguiente forma: **A)** No es posible determinar si el gen *SPOCK1* o está implicado en la causa de su enfermedad. **B)** El gen *SPOCK1* no está implicado en la causa de su enfermedad. **C)** El gen *SPOCK1* tiene una probabilidad baja de estar asociado al origen de su enfermedad **D)** El gen *SPOCK1* 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: *Genotipificación de la región codificante de SPOCK1 en el cáncer colorrectal: hacia la descripción de nuevos marcadores moleculares de la enfermedad*

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: \_\_\_\_\_

Firma:

C.C.:

C.C.:

Dirección:

Dirección:

Teléfono:

Teléfono:

Testigo 1

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](mailto: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](mailto:juangu.perez@urosario.edu.co)

**Johana Mayerly González**, Auxiliar Administrativa CEI: [comite.etica@urosario.edu.co](mailto:comite.etica@urosario.edu.co)



**Universidad del  
Rosario**

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

