

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- Diseño del estudio.

Se trata de un estudio observacional de casos y controles incidentes. Se concibió como un trabajo preliminar de epidemiología molecular en oncología colorrectal, base de futuras investigaciones.

Las muestras biológicas base de la parte experimental proceden de pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal como población de casos y pacientes hospitalarios sin esta patología, como población control, a los que se les extrae sangre periférica, previamente a la intervención quirúrgica. A partir de las muestras hemáticas se obtiene y purifica ADN genómico, material de partida para el análisis de la frecuencia de polimorfismos genéticos en los genes analizados en ambas poblaciones.

Las técnicas empleadas en este tipo de análisis son características de genética molecular. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR, se amplifican las regiones que contienen los polimorfismos a estudiar. En una segunda fase se identifican los polimorfismos en cada muestra mediante enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas que cortan o no la doble hebra según los nucleótidos. En el caso de CYP1A1*3 hemos empleado la técnica ASO de amplificación específica de alelo.

3.2.- Población muestral

3.2.1.- Población de casos

La muestra de casos que utilizamos son 93 personas caucásicas del Area de Salud 20 del Hospital Vega Baja de Orihuela con el diagnóstico confirmado anatomopatológicamente de adenocarcinomas colorrectales, sometidos a intervención quirúrgica en el Servicio de Cirugía del citado Hospital. Se trata de una serie de casos incidentes que recogemos entre enero de 2003 y febrero de 2004. Son pacientes con residencia habitual en la zona geográfica de la Vega Baja de Alicante. En esta serie de casos, quedaron excluidos los pacientes con formas hereditarias de neoplasias colorrectales, es decir, las Poliposis Coli Familiares (sobre la base del diagnóstico anatomopatológico) y los Síndromes de Lynch I y II sobre la base de las historias familiares .

3.2.2.- Población de controles

La muestra de controles que se utiliza la constituye una serie de 117 personas caucásicas , pacientes sometidos a cirugía no oncológica del Area de Salud 20, atendidos en el Servicio de Cirugía del Hospital Vega Baja de Orihuela a los que se les practican colecistectomías y herniorrafias.

3.3.- Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras biológicas

A todos los pacientes de la población de casos y de controles se les citó en la forma habitual previa a la intervención quirúrgica en el Servicio de Análisis por parte del Servicio de Anestesia para la realización de las pruebas analíticas prescritas.

La muestra hemática la obtiene por venopunción el personal de enfermería del Servicio y se recoge en tubo de EDTA-3K (4ml) el día anterior a la intervención quirúrgica, salvo los pacientes intervenidos de urgencia de los que se obtiene la muestra el mismo día de la intervención. La muestra en tubo rotulado con nombre y nº de Historia Clínica se mantiene a 4°C, un máximo de 5 días en el Servicio de Cirugía hasta su traslado al laboratorio de Análisis Genéticos ANCOR. Tras su identificación, registro y alicuotado, se procesan dentro de las 24 horas de su recepción .

3.4.- Variables clínicas y anatomopatológicas.

Las variables clínicas analizadas se obtuvieron de los documentos clínicos siguientes:

- Informe de preanestesia
- Informe del Servicio de Anatomía Patológica
- Informe del Servicio de Cirugía.

Las variables :

- **Edad y fecha de nacimiento, peso en Kg, talla en cm, hábitos tabáquicos, hábitos de ingesta alcohólica.**

Se recogieron del informe de Preanestesia elaborado por el Servicio.

La variable:

- **Índice de Masa Corporal (IMC)**

se calculó a partir de los valores de peso en Kg y talla en m., obtenidos del informe de Preanestesia con la fórmula :

$IMC = P(Kg)/T^2(m)$. Este valor permite clasificar al paciente en : bajo ($IMC < 20$), peso aceptable (IMC entre 20 y 25), Obesidad grado I (IMC entre 25-30) y obesidad grado II (IMC mayor de 30).

Bajo	IMC < 20
Peso aceptable	IMC entre 20-25
Obesidad grado I	IMC entre 25-30
Obesidad grado II	IMC > 30

Las variables:

- **Estadío de Dukes y clasificación histológica**

Se recogieron del informe de cada paciente elaborado por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vega Baja. La serie de tumores se codificaron con el sistema del Colegio Americano de Patólogos (ESNOMED) sobre la base de la clasificación de WHO.

La variable :

- **Localización tumoral.**

Se obtuvo a partir de los informes del Servicio de Anatomía Patológica y del Servicio de Cirugía del citado Hospital.

3.5.- Material inventariable.

El análisis de los polimorfismos se realiza en el laboratorio de Biología Molecular de Análisis Genéticos ANCOR S.L.. Consta de dos salas acondicionadas de 30 m²; sala preanalítica de preparación, extracción, purificación y amplificación de ácidos nucleicos y sala analítica. Cuenta con el siguiente equipamiento utilizado :

- Centrífuga sobremesa analógica Mixtasel Selecta.
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R
- Biophotometro Eppendorf 6131 con impresora
- 2 Termocicladores Primus 25 PCR system MWG BIOTECH
- Cabina de Flujo Laminar Vertical Telstar Mini-V/PCR
- PH metro Basic 20 Crison
- Balanza electrónica de precisión SCALTEC

- Sistema agitador de tubos vortex Heidolph.Reax control.
- Sistema de agitación con calentador para microtubos y microplaca.Labnet VorTemp56.
- Sistema de agitación magnético con calentamiento Variomag. Monotherm.
- Cubetas de electroforesis horizontal. Scieplas de 6X10 y 10X12 cm.
- Cubetas de electroforesis vertical. Scieplas.
- Fuente de alimentación Life Technologies PS 608 –600 Volts-800mA.
- Sistema de fotodocumentación con transiluminador y sistema informático de almacenamiento de imagen.UVIDOC DOC-008-XD.
- Pipetas automáticas Biohit de 1-10 ul,10-200 ul y 100-1000 ul.
- Horno microondas Samsung.
- Nevera y congelador –20° C Corberó.

3.6.- Material fungible y reactivos

Los reactivos, enzimas, buffers empleados se describen a continuación:

- Agarosa grado Biología Molecular Genotek AG-2
- Buffer Al
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Bromuro de Etidio solución 1% 10 mg/ml Applichem
- Cl₂Mg 50 mM BIOTOOLS S.A.

- **Enzimas de Restricción:**
 - **MspI (Hpa II)** de *Moraxella species* 10u/ul Fermentas
Buffer reacción Msp I Tango : 33mM Tris-acetato(pH 7,9), acetato magnésico 10 mM, acetato potásico 66 mM y BSA 0,1 mg/ml
Secuencia reconocimiento: 5'-C/CGG-3'
3'-GGC/C-5'

 - **Hinf I** de *Haemophilus influenzae* Rf 10 u/ul Fermentas
Buffer R+ : Tris-ClH 10 mM (pH 8,5) ,Cl₂Mg 10 mM , ClK 100 mM y BSA 0,1 mg/ml
Secuencia de reconocimiento: 5'- G/ANTC-3'
3'-CTNA/G-3'

- Marcador de pesos moleculares : 100 bp ladder 0,5mg/ml
BIOTOOLS-Banda referencia 500 bp (bandas de 80,100,200,300,400,500,600,700, 800,900,1031)
- Nucleótidos dNTP: dATP,dTTP,dGTP y dCTP 25 umol de cada uno se prepara mezcla de los cuatro nucleótidos en solución stock de 5 mM AB gene.
- Proteinasa K Sigma P 2308 14,5 u/mg

- Tampón TBE 10X

Tris	0,89 mol/l	53,9 gr	107,81	gr /l
EDTA-Na ₂	0.02	3,77 gr	7,44	gr/l
A.Bórico	0.89	27,51 gr	55,03	gr/l
PH agua			8.3 ±0,2	
Volumen		500 ml	1 L	

- Tampón TBE 1X preparado a partir de Stock TBE 10X
- Tampón de carga:
 - 0,25% Bromophenol Blue.
 - 0,25% Xilene cyanol FF.
 - 15% Ficoll (Type 400, Farmaco) en agua.
- Taq Polimerasa. BIOTOOLS DNA polimerasa 5u/ul
Tampón reacción polimerasa: Tris ClH 75 mM(pH 9,0) ClK 50 mM y SO₄(NH₄)₂

3.7.- Técnicas empleadas

3.7.1.- Obtención y purificación de ácidos nucleicos.

En la extracción y purificación del ADN genómico se utiliza el kit comercial de Quiagen QIAamp DNA sangre mini kit ® para sangre total y fluidos corporales. Consiste en la utilización de un buffer de lisis celular y tratamiento con proteinasa K para liberar al ADN del núcleo celular y posterior adsorción del mismo a una matriz de silica-gel en columna que se lava con distintos buffers (condiciones salinas y pH) que aseguran la eliminación de proteínas y otros contaminantes que pueden inhibir la PCR. Finalmente el ADN retenido en la matriz se eluye con TE.

Se parte de un volumen de 200 ul de sangre total. Se alícuota el resto de sangre no utilizada en la extracción y se conserva a -20°C . Se siguen los pasos siguientes:

- 1.- Se equilibra la muestra a temperatura ambiente y se verifica que no hay precipitado en el buffer AL y si lo hay, se disuelve calentando a 70°C . Se pipetea 20 ul de proteasa en un tubo de 1,5 ml.
- 2.- Se añaden 200 ul de sangre total, 200 ul de buffer AL y se vortesea 15" con intensidad media.

- 3.-** Se incuba en baño termostatzado a 56°C durante 10'. Se centrifuga brevemente para eliminar gotas de los tapones de los tubos.
- 4.-** Se añaden 200 ul etanol 96-100%, se vortesea 15" y se centrifuga brevemente.
- 5.-** Se vierten con cuidado la mezcla en columna sin humedecer el borde y se centrifuga a 7.500 rpm 1'.
- 6.-** Se añaden 500 ul de buffer de lavado AW1 sin humedecer el borde de la columna, se centrifuga a 7.500 rpm 1'.
- 7.-** Se abre la columna con cuidado y se añaden 500 ul de buffer de lavado AW2 y se centrifuga a 13.000 rpm durante 3'.
- 8.-** Se coloca la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml y se añaden 200 ul de agua bidestilada estéril o buffer AE, se deja incubar a temperatura ambiente 5' y finalmente se centrifuga a 7.500 rpm 1'.
- 9.-** Finalmente se determinar espectrofotometricamente la concentración y pureza del ADN extraído.
- 10.-** Se mantiene la muestra congelada a -20°C hasta su utilización.

3.7.2.- Polimorfismos en GSTM1 y GSTT1

Se utiliza el método descrito por Arand M. (1996) para el análisis simultáneo de los polimorfismos nulos en los genes GSTM1 y GSTT1. Consiste en una multiplex, amplificación simultánea en el mismo tubo de reacción de dos fragmentos de los genes citados. Las parejas de oligonucleótidos son las descritas en la **tabla IX** para cada uno de los genes. Para GSTM1 por Bell et al (1993) y para GSTT1 por Pemble (1994). Las condiciones de amplificación se optimizan variando las temperaturas de emparejamiento y las concentraciones de cada pareja de oligonucleótidos para obtener unas intensidades de banda similares en cada uno de los fragmentos correspondientes a GSTM1 y GSTT1. Como control interno que permite verificar fallos de amplificación en aquellos resultados GSTM1- /GSTT1-, se emplea una tercera pareja de oligonucleótidos que permite la amplificación en todos los casos de un fragmento del gen de la albúmina de 350 bp. La múltiplex permite un considerable ahorro de tiempo y reactivos en el estudio de los dos polimorfismos nulos.

Tabla IX.- Oligonucleótidos empleados en el análisis de los polimorfismos nulos en GSTM1 y GSTT1

NOMBRE	SECUENCIA	
GSTT1	5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'	480
GSTT1-R	5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'	
Albúmina	5'-GCC CTC TGC TAA CAA GTC CTA C-3'	350
Albumina-R	5'-GCC CTA AAA AGA AAA TCG CCA ATC-3'	
GSTM1	5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3'	215
GSTM1-R	5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'	
PCR	Desnaturalización 95°C- 2'	
30 ciclos	94 ⁰ -1'/64 ⁰ -1'/72 ⁰ -1' Elongación final 72⁰-5'	

Se prepara la reacción de amplificación para un volumen total de 25 ul en tubos de PCR de 0,2 ml. Se parte de una mezcla con todos los reactivos en las cantidades adecuadas para el número de tubos calculados en cada serie de amplificaciones (10-20 tubos por tanda) con un blanco en cada serie que contiene todos los reactivos menos muestra de ADN. Las cantidades y concentraciones de los reactivos se reflejan en la **tabla X**.

Tabla X.- Reactivos, concentraciones y volúmenes empleados en el análisis de los polimorfismos nulos en **GSTM1** y **GSTT1**.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCION
Buffer	10 x	2,5 ul
Cl ₂ Mg	50 mM	1 ul
dNTP	5mM	1 ul
Mezcla oligonucleótidos GSTT1/GSTT1-R	10 pmoles/ul	1,5 ul
Mezcla oligonucleótidos Albumina/Albumina-R	10 pmoles/ul	2,5 ul
Mezcla oligonucleótidos GSTM1/GSTM1-R	10 pmoles/ul	3 ul
Taq Polymerasa	5u/ul	0,1 ul
Muestra ADN		3 ul
H ₂ O		10,2 ul
Volumen total		25 ul

La lectura de resultados se realiza en gel de agarosa al 2 % al que se añade bromuro de etidio 2,5 ul (10 mg/ml). Se cargan en cada pocillo del gel 10 ul de producto amplificado más 1,5 ul de tampón de carga. La electroforesis tiene lugar a 120 V durante 45', tras los que se realiza la lectura en transiluminador y se registra la imagen obtenida en sistema de fotodocumentación UVIDOC. Los patrones de bandas obtenidos corresponden a los genotipos descritos en la **tabla XI**.

En las **figuras 4** y **5** se muestran ejemplos de resultados obtenidos tras correr las muestras en geles de agarosa y leer los resultados tras someter los geles a exposición con luz ultravioleta en transiluminador.

Tabla XI.- Tamaños de los amplificadores en el análisis de los polimorfismos nulos en ***GSTM1*** y ***GSTT1***.

NOMECLATURA GENOTIPOS	GENOTIPOS	PATRON BANDAS
GSTM1*1	+	215
GSTM1*0	Nulo	-
GSTT1*1	+	480
GSTT1*0	Nulo	-
Control Albúmina		350 bp

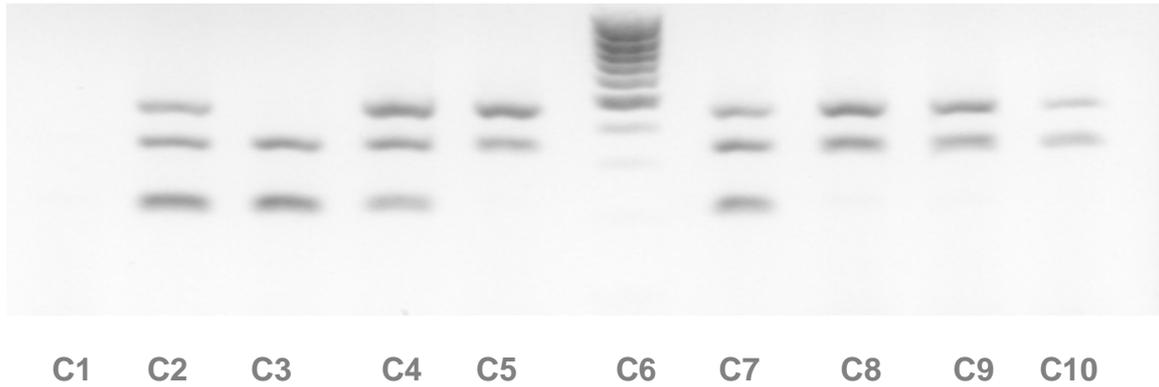


Figura 4.- Polimorfismos nulos GSTM1-GSTT1

Calle 1	Blanco	Calle 6	Control pesos moleculares 100 bp
Calles 2-4-7			GSTM1*1-GSTT1*1
Calles 5-8-9-10			GSTM1*0-GSTT1*1
Calle 3			GSTM1*1-GSTT1*0

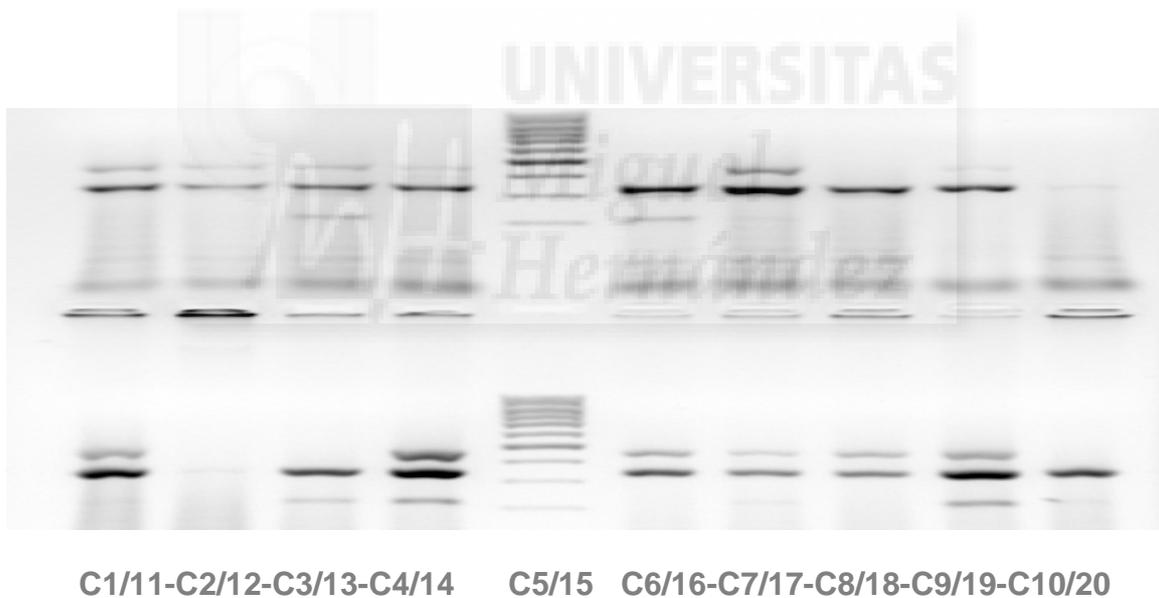


Figura 5.- Polimorfismos nulos en GSTM1-GSTT1
Gel 6,5X10 cm doble peine

Calles 5 /15	Control pesos moleculares 100 bp
Calles 3-14-19	GSTM1*1-GSTT1*1
Calles 1-2-4-7-9-11-16-17-18	GSTM1*0-GSTT1*1
Calles 6-13-20	GSTM1*1-GSTT1*0
Calles 8-10-12	GSTM1*0-GSTT1*0

3.7.3.- Genotipado de CYP1A1. Amplificación, RFLP y ASO

El gen CYP1A1 humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 15, 5q22-q24 , tiene 7 exones y 6 intrones con un tamaño de 5810 bp. Se han analizado dos polimorfismos en este gen; el primero se localiza en la posición 6235 región 3' , 1.194 bp tras el exón 7, representa una transición T→C, que determina la aparición de un punto de corte para la endonucleasa de restricción Msp I que es la que se utiliza en el estudio.

El segundo polimorfismo es una transición A→G en la posición 4889 del exón 7. Este polimorfismo resulta en la sustitución del aminoácido isoleucina por valina (codon 462) en la región de unión al grupo hemo de CYP1A1.

Se sigue el protocolo de análisis descrito por Drakoulis (1994) que consiste en tres amplificaciones con los oligonucleótidos descritos en las **tablas XII y XVI**. En el caso del primer polimorfismo estudiado, el producto amplificado se somete a la acción de la enzima de restricción Msp I.

Para el segundo, se emplea la técnica ASO (amplificación oligo específica), para ello se realiza una primera amplificación que sirve de base para una segunda amplificación con dos pares de oligonucleótidos específicos, cada uno de ellos complementarios de las dos posibles bases, A y G en la posición 4889.

3.7.3.1- Polimorfismo CYP1A1*2. Amplificación y RFLP con Msp I

Se emplea la pareja de oligonucleótidos y condiciones de amplificación descritas en la **tabla XII**.

Tabla XII.- Oligonucleótidos para el análisis del polimorfismo **CYP1A1*2** y condiciones de la reacción de amplificación

OLIGO	SECUENCIA	POSICION
P79	5'-AAG AGG TGT AGC CGC TGC ACT-3'	6106-6126
P80	5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3'	6440-6420
	Fragmento amplificado 335 bp	
PCR	Desnaturalización 95°C- 5'	
30 ciclos	92°-1'/63°-1'/72°-1'	
	Elongación final 72°-5'	

Se prepara la reacción de amplificación para un volumen total de 25 ul en tubos de PCR de 0,2 ml. Se parte de una mezcla con todos los reactivos en las cantidades adecuadas para el número de tubos calculados en cada serie de amplificaciones (10-20 tubos por tanda) con un blanco en cada serie que contiene todos los reactivos menos muestra de ADN. Las cantidades y concentraciones de las soluciones stock de cada uno de los reactivos utilizados se reflejan en la **tabla XIII**.

Tabla XIII.- Reactivos, concentraciones de las soluciones madres y volúmenes de reacción para el análisis del polimorfismo **CYP1A1*2**

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCION
Buffer	10 x	2,5 ul
Cl ₂ Mg	50 mM	1 ul
dNTP	5mM	0,75 ul
Mezcla oligonucleótidos P79/P80	10 pmoles/ul	1 ul
Taq Polymerasa	5u/ul	0,1 ul
Muestra ADN		3 ul
H ₂ O		16,65 ul
Volumen total		25 ul

Se verifica la reacción de amplificación y se corren las muestras en gel de agarosa al 2%, se leen los resultados en transiluminador y se registra la imagen en sistema de fotodocumentación UVIDOC.

Un volumen variable de producto amplificado según la intensidad de la banda (entre 10-12 ul) se somete a la acción durante 5 horas a 38°C de la enzima de restricción **Msp I** que reconoce la secuencia y corta el fragmento de 335 bp según el genotipo en dos fragmentos de 206 bp y 129 bp. Para el análisis por RFLP con la endonucleasa se emplean los reactivos y cantidades descritas en la **tabla XIV**.

Tabla XIV.- Volúmenes de reactivos y condiciones de digestión con la enzima de restricción Msp I en el análisis del polimorfismo **CYP1A1*2**.

REACTIVO	CONCENTRACION	VOLUMEN EN REACCION
Buffer digestión	10 x	2,5 ul
Enzima Msp I	10 u/ul	1,5 ul
Producto PCR		12 ul
H ₂ O		9 ul
Volumen reacción		25 ul
Condiciones restricción: baño 38°C durante 5 horas		

La lectura de resultados se realiza en gel de agarosa al 2,5 %. Se cargan 10 ul de producto digerido mas 1,5 ul. de tampón de carga. La electroforesis tiene lugar a 120 V durante 45' tras los que se realiza la lectura y registro de los tres patrones posibles que corresponden a los tres genotipos analizados para CYP1A1*2, estos quedan reflejados en la **tabla XV**. Ejemplos en las **figuras 6** y **7**.

Tabla XV.- Tamaños de los productos de digestión con Msp I en el análisis del polimorfismo **CYP1A1*2**.

NOMECLATURA GENOTIPOS	GENOTIPOS	PATRON DE CORTE BANDAS
CYP1A1*1	Homocigoto.No corte Msp I	335
CYP1A1*2	Homocigoto corte Msp I	206+129
CYP1A1*1/*2	Heterocigoto corte Msp I	335+206+129

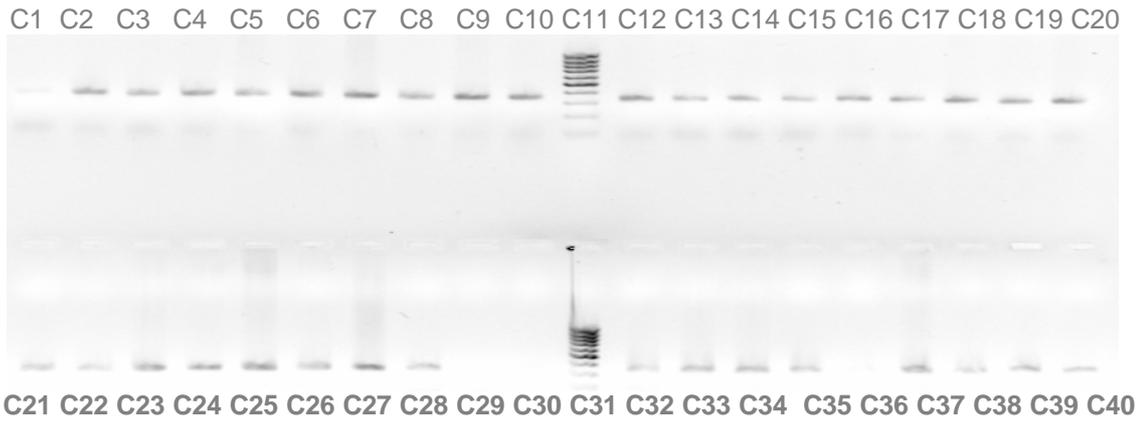


Figura 6.- CYP1A1 Gel 15X12 cm

Calle	1	Blanco
Calles	11-31	Control pesos moleculares 100 bp
Calles	29-30-36	No amplificación
Calles	2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28	

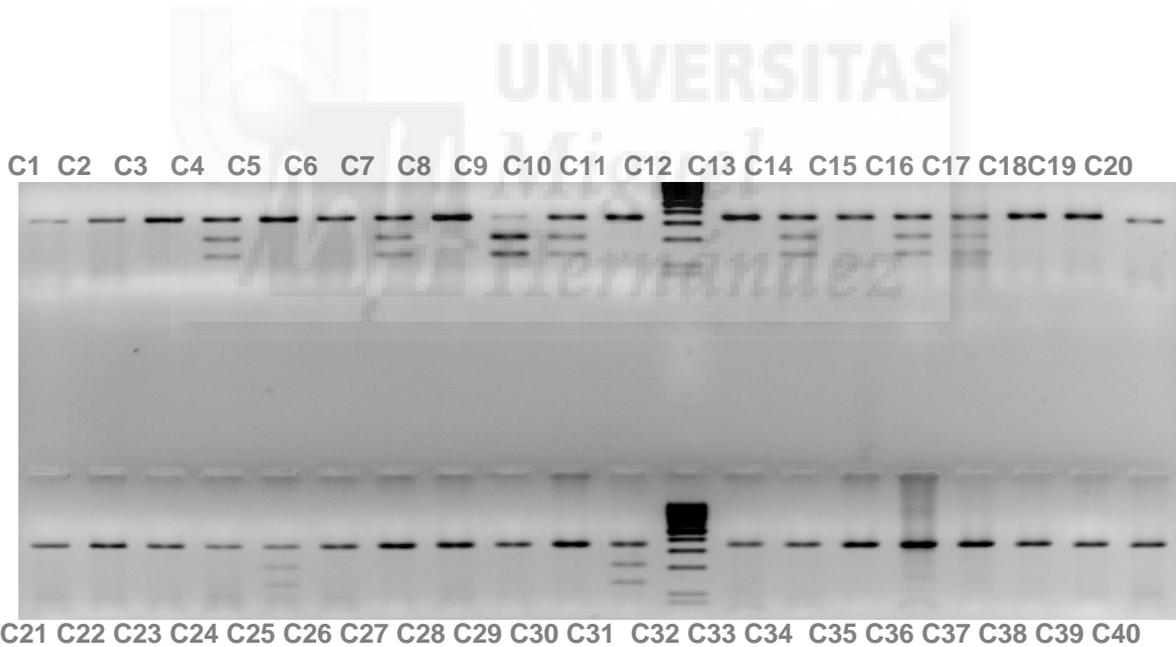


Figura 7.- CYP1A1*1 Restricción Msp I Gel 15X12 cm

Calles	12-32	Control pesos moleculares 100 bp
Calles	4,7,10,14,16,17,25,31	Heterocigotos corte CYP1A1*1/*2
Calles	1,2,3,5,6,8,11,13,15,18,19,20,21,22,23,24,26,27,28,29,30,33,34,35,36,37,38,39,40	Homocigotos no corte CYP1A1*1
Calle	9	Homocigoto corte CYP1A1*2

Tabla XVI.- Oligonucleótidos para el análisis del polimorfismo **CYP1A1*3** por ASO y condiciones de las reacciones de amplificación.

OLIGO	SECUENCIA	bp
P71	5'-ATT AGG GTT AGT GGG AGG GAC ACG-3'	1472
P72	5'-GCT CAA TGC AGG CTA GAA TAG AAG G-3'	-
P57	5'-GAA GTG TAT CGG TGA GAC CA-3'	996
P58	5'-GAA GTG TAT CGG TGA GAC CG-3'	996
	Condiciones 1ª amplificación	
PCR	Desnaturalización 95°C- 5'	
30 ciclos	92°-1'/63°-1'/72°-1'	
	Elongación final 72°-5'	
	Condiciones 2ª amplificación	
PCR	Desnaturalización 95°C- 5'	
12 ciclos	92°-1'/63°-1'/72°-1'	
	Elongación final 72°-5'	

3.7.3.2.- Polimorfismo **CYP1A1*3** ASO.

Se reflejan las parejas de oligonucleótidos y condiciones de amplificación en la **tabla XVI**.

Se prepara la reacción de amplificación para un volumen total de 25 ul. en tubos de PCR de 0,2 ml. Se parte de una mezcla con todos los reactivos en las cantidades adecuadas para el número de tubos calculados en cada serie de amplificaciones (10-20 tubos por tanda) con un blanco en cada serie que contiene todos los reactivos menos muestra de ADN. Las cantidades y concentraciones de las soluciones stock de cada uno de los reactivos siguientes se reflejan en la **tabla XVII**.

Primera Amplificación

Tabla XVII.- Reactivos, concentraciones de las soluciones madres y volúmenes de reacción en el análisis del polimorfismo **CYP1A1*3** por ASO, primera amplificación.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCION
Buffer	10 x	2,5 ul
Cl ₂ Mg	50 mM	1 ul
dNTP	5mM	0,75 ul
Mezcla oligonucleótidos P71/P72	10 pmoles/ul	2,5 ul
Taq Polymerasa	5u/ul	0,1 ul
Muestra ADN		3 ul
H ₂ O		14,9 ul
Volumen total		25 ul

Segundas amplificaciones

Tras verificar en gel de agarosa al 1% la presencia de fragmento amplificado de 1472 pb se procede a realizar la segunda serie de amplificaciones, dos reacciones para cada muestra, se siguen las condiciones descritas en las **tablas XVIII y XIX.**

Para la identificación de A (4889)

Tabla XVIII.- Reactivos, concentraciones de las soluciones madres y volúmenes de reacción para la identificación de A (4889) en CYP1A1.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCION
Buffer	10 x	2,5 ul
Cl ₂ Mg	50 mM	1 ul
dNTP	5mM	0,75 ul
Mezcla oligonucleótidos P57/P72	10 pmoles/ul	1 ul
Taq Polymerasa	5u/ul	0,1 ul
Producto PCR 1 ^a		1 ul
H ₂ O		15,4 ul
Volumen total		25 ul

Para la identificación de G (4889)

Tabla XIX.- Reactivos, concentraciones de las soluciones madres y volúmenes de reacción para la identificación de G (4889) en CYP1A1.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCION
Buffer	10 x	2,5 ul
Cl ₂ Mg	50 mM	1 ul
dNTP	5mM	1 ul
Mezcla oligonucleótidos P58/P72	10 pmoles/ul	2,5 ul
Taq Polymerasa	5u/ul	0,1 ul
Producto PCR 1 ^a		1 ul
H ₂ O		15,4 ul
Volumen total		25 ul

Tras esta segunda amplificación, se corren en gel de agarosa al 1%, 10 ul. de producto amplificado más 1,5 ul. de tampón de carga de las muestras pareadas P57/P72 –P58/P72 de cada paciente. La **tabla XX** muestra los patrones de amplificación de los tres posibles genotipos.

Tabla XX.- Tamaños de los productos de amplificación con los oligonucleótidos específicos P57 para A y P58 para G

NOMECLATURA GENOTIPOS	GENOTIPOS 462	PATRON DE BANDAS
CYP1A1*1	Ile	996 / -
CYP1A1*3	Val	- / 996
CYP1A1*1/*3	Ile/Val	996 / 996

En las **figuras 8** y **9** se muestran ejemplos de los resultados obtenidos tras correr las muestras en geles de agarosa y leer los resultados al someterlos a exposición con luz ultravioleta en transiluminador.

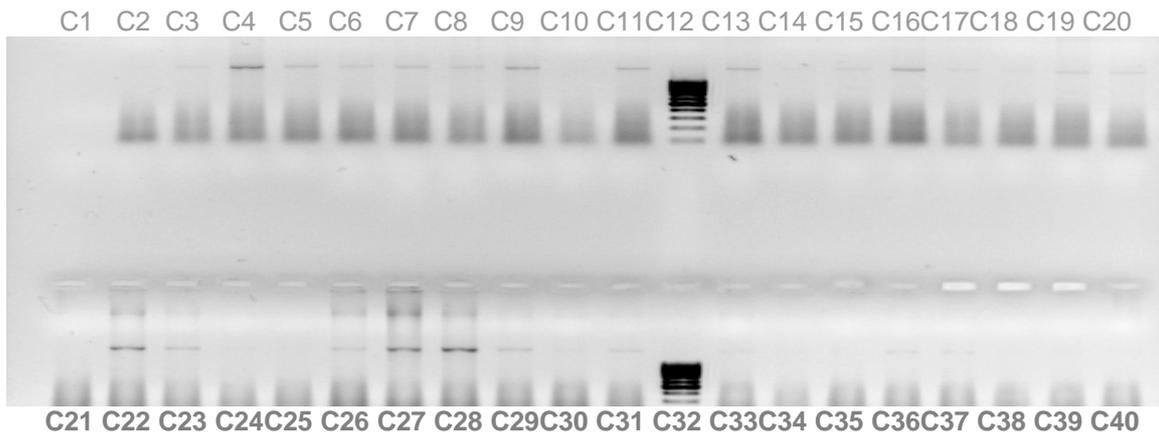


Figura 8.- CYP1A1*1-CYP1A1*3 ASO Gel agarosa 15x12 cm

Calle	1	Blanco
Calles	12-32	Control pesos moleculares 100 bp 80-1032 bp
Calles	resto	Amplificación 1472 bp

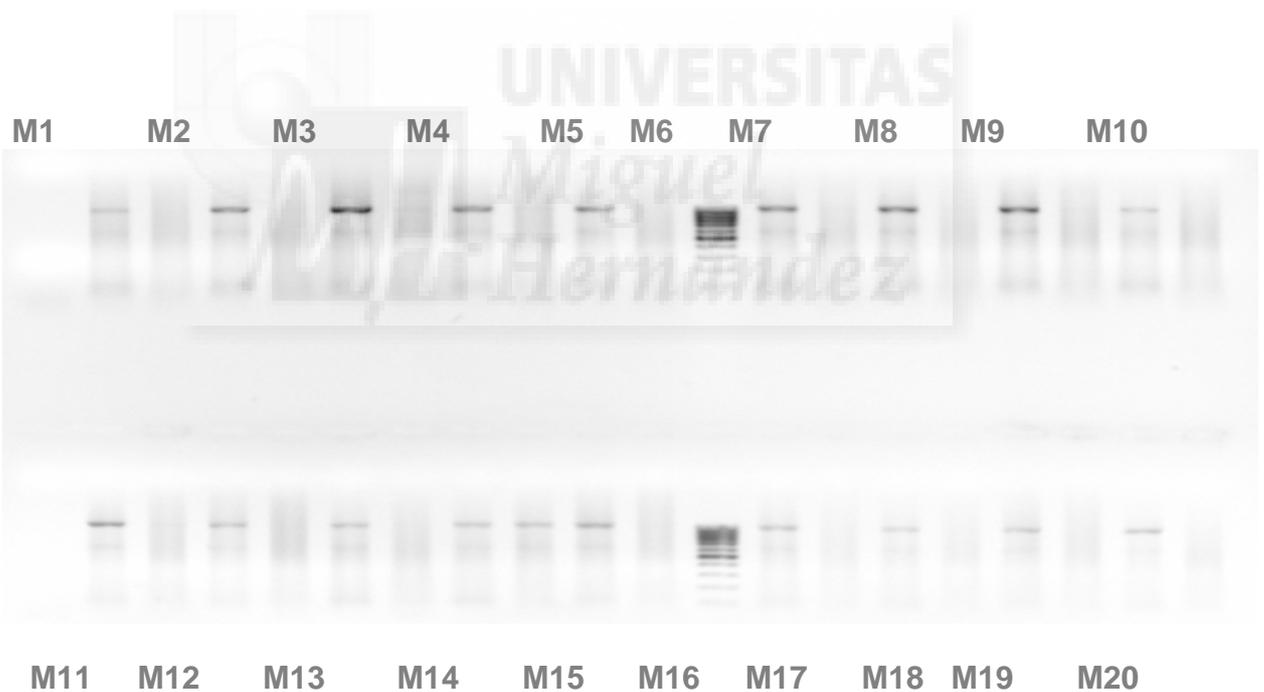


Figura 9.- CYP1A1*1/*3 ASO Gel agarosa 15x12cm. 2 calles por muestra

Homocigotos	G	Muestras	1-2-3-4-5-7-8-9-10-11-12-12-15-17-18-19-20
Heterocigoto	G/A	Muestra	14
Control P. molecular 100 bp		Muestras	6-16

3.7.4.- Polimorfismos en MTHFR. Amplificación y RFLP.

Se emplea el método de genotipado descrito por Frosst et al (1995). Se amplifica un fragmento de 198 bp del exón 4 del gen MTHFR que contiene 11 exones (AF105977). En la posición 677 se encuentra situado el polimorfismo C/T Ala→Val estudiado. En la **Tabla XXI** se refleja la pareja de oligonucleótidos y las condiciones de amplificación.

Tabla XXI.- Oligonucleótidos para el análisis del polimorfismo *MTHFR**2 (C677T) y condiciones de la reacción de amplificación

NOMBRE	SECUENCIA
MTHFR-F	5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'
MTHFR-R	5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'
PCR	Desnaturalización 95°C- 2'
30 ciclos	94°-30''/60°-30''/72°-30''
	Elongación final 72°-10'

Se prepara la reacción de amplificación para un volumen total de 25 ul en tubos de PCR de 0,2 ml. Se parte de una mezcla con todos los reactivos en las cantidades adecuadas para el número de tubos calculados en cada serie de amplificaciones (10-20 tubos por tanda) con un blanco en cada serie que contiene todos los reactivos menos muestra de ADN. Las cantidades y concentraciones de las soluciones stock de cada uno de los reactivos se reflejan en la **tabla XXII**.

Tabla XXII.- Reactivos, concentraciones de las soluciones madres y volúmenes de reacción en el análisis del polimorfismo *MTHFR*2* (C677T) por RFLP.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK REACTIVO	VOLUMEN EN REACCION
Buffer	10 x	2,5 ul
Cl ₂ Mg	50 mM	1 ul
dNTP	5mM	1 ul
Mix oligonucleótidos MTHFRF/ MTHFR-R	10 pmoles/ul	1,5 ul
Taq Polymerasa	5u/ul	0,1 ul
Muestra ADN		3 ul
H ₂ O		15,9 ul
Volumen total		25 ul

Se verifica la reacción de amplificación y se corren las muestras en gel de agarosa al 2%, se leen los resultados en transiluminador y se registra la imagen en sistema de fotodocumentación UVIDOC.

Un volumen variable de producto amplificado según la intensidad de las bandas obtenidas (entre 10-12 ul) se somete a la acción de la enzima de restricción **Hinf I** durante 3 horas a 38°C. Esta endonucleasa reconoce la secuencia y corta el fragmento de 198 bp, según el genotipo en dos fragmentos de 175 bp y 23 bp. En la **tabla XXIII** se reflejan las condiciones de la reacción de digestión.

Tabla XXIII.- Volúmenes de reactivos y condiciones de digestión con la enzima de restricción Hinf I en el análisis del polimorfismo C677T de *MTHFR*

REACTIVO	CONCENTRACION	VOLUMEN EN REACCION
Buffer digestión R+	10 x	2,5 ul
Enzima HinfI	10 u/ul	0,5 ul
Producto PCR		10 ul
H ₂ O		12 ul
Volumen reacción		25 ul
Condiciones restricción: baño 38°C durante 3 horas		

La lectura de resultados se realiza en gel de agarosa al 2,5 % y se cargan 10 ul de producto digerido más 1,5 ul de tampón de carga. La electroforesis tiene lugar a 120 V durante 45' tras los que se realiza la lectura y registro de los tres patrones posibles que corresponden a los tres genotipos analizados para *MTHFR*, estos quedan reflejados en la **tabla XXIV**.

Tabla XXIV.- Tamaños de los productos de digestión con Hinf I en el análisis del polimorfismo C677T de *MTHFR*

NOMECLATURA GENOTIPOS	GENOTIPOS	PATRON DE CORTE BANDAS
MTHFR*1 -/-	Ala/Ala	198
MTHFR*1/*2 -/+	Ala/Val	198+175
MTHFR*2 +/+	Val/Val	175

En las **figuras 10** y **11** se muestran ejemplos de los resultados obtenidos tras correr las muestras en geles de agarosa y leer los resultados, tras someterlos a exposición con luz ultravioleta en transiluminador.



C1/11-C2/12-C3/13-C4/14-C5/15-C6/16-C7/17-C8/18-C9/19-C10/20

Figura 10.- MTHFR Gel agarosa 6,5x10 cm.

Calle	1	Blanco
Calles	6-16	Control Pesos moleculares 100 bp
Calles	2,4,5,7,8,9,10,11,12,13,14,15,17,18,19	amplificación
Calle	20	No amplificación

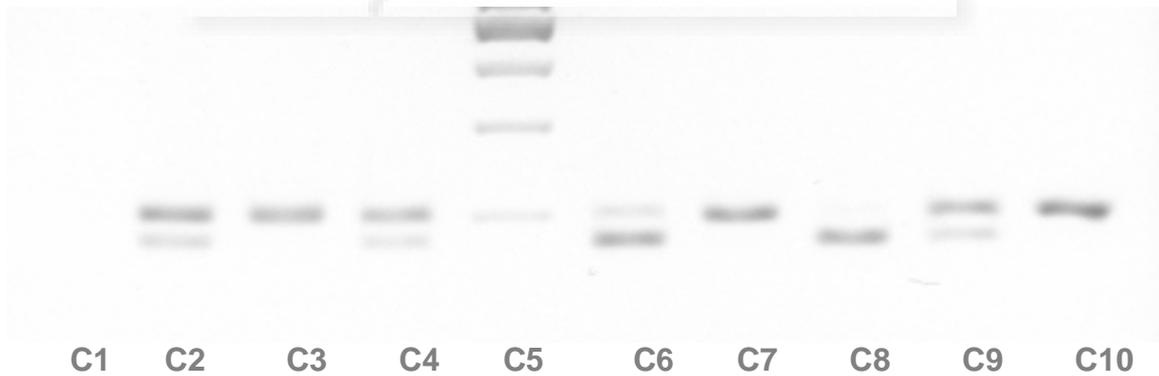


Figura 11.- MTHFR Restricción Hinfi Gel agarosa 6,5x10 cm

Calle	1	Blanco
Calles	2,4,6,9	Heterocigoto corte
Calles	3,7,10	Homocigoto no corte
Calle	8	Homocigoto corte

3.8.- Método estadístico.

Simultáneamente al análisis molecular, se recogieron los datos clínicos y epidemiológicos de casos y controles con los criterios de exclusión reflejados en población muestral. Se agruparon todos los datos en tablas de variables en hoja de Excell (Windows 2000) y se realizó un primer estudio de estadística descriptiva de todas las variables recogidas.

Establecidas las categorías de variables epidemiológicas, clínicas y moleculares, se ajustó un modelo general lineal (GLM), modelo alternativo a las transformaciones de la respuesta (presencia o ausencia de CCR) justificadas por la falta de linealidad y homogeneidad de la varianza, habituales de los modelos lineales. Con este modelo de regresión general se estudian las relaciones existentes entre las variables y la presencia o ausencia de enfermedad. El modelo es por tanto un modelo logístico cuya variable respuesta es binaria (dicotómico).

Para el estudio de la asociación se ha aplicado el test del chi cuadrado; para evaluar la magnitud de la asociación se calcula el odds ratio (riesgo relativo) con un intervalo de confianza del 95%. Para el contraste de las hipótesis se utiliza un nivel de significación del 95%, $P < 0.05$.

El análisis se realizó con el paquete estadístico R (libre disposición) desarrollado por AT&T Bell Laboratorios. (<http://www.R-project.org/>).

Se analizó con el modelo de regresión lineal el posible significado estadístico de algunas asociaciones entre variables. Por un lado, las posibles asociaciones entre genotipos de riesgo y por otro alguna de las combinaciones posibles entre variables clínicas y epidemiológicas y entre éstas y genotipos de riesgo.

Las diferencias en la localización de las neoplasias colorrectales, junto con algunas citas en la bibliografía consultada referentes al efecto de los polimorfismos de riesgo en función de la localización, movió al análisis estadístico de esta asociación, agrupando para su análisis en dos categorías: tumores proximales (ciego+colon ascendente+ángulo hepático+colon transverso+ángulo esplénico) y distales (descendente +unión recto sigma+ recto).

Se analizó el posible significado estadístico de todas las asociaciones posibles de genotipos de riesgo, dado que frente a tumores de pulmón, Bartsch et al (2000) describen que las interacciones gen-gen en portadores de ciertos genotipos de riesgo (CYP1A1-GSTM1) confiere daño y riesgo con un efecto superior al aditivo.