



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
**La Universidad Católica de Loja**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**  
**MODALIDAD CLÁSICA**

**POLIMORFISMO DEL GEN MAD1 EN UNA POBLACIÓN  
INFANTIL DE LA CIUDAD DE LOJA**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR:**

**MILTON LEONARDO YAGUANA CUENCA**

**DIRECTORA:**

**BIOQ. GABRIELA CEVALLOS SOLÓRZANO**

**CENTRO UNIVERSITARIO LOJA**

**2009**

## **CERTIFICACION**

Bioq. Farm. Gabriela Cevallos Solórzano  
**DIRECTORA DE TESIS**

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por Milton Leonardo Yaguana Cuenca, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 25 de Mayo de 2009.

-----  
Bioq. Farm. Gabriela Cevallos Solórzano  
**DIRECTORA DE TESIS**

## **AUTORÍA**

Los conceptos, ideas, metodologías, esquemas, recursos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de absoluta responsabilidad de su autor.

Milton Leonardo Yaguana Cuenca.

## **DEDICATORIA**

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño:

A ti DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

A mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí.

A mis dos angelitas las cuales son fuente de inspiración, y hacen q mis días sean llenos de felicidad.

## **AGRADECIMIENTO**

Primero y antes que nada, dar gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar, y esta claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios no hubiesen sido posible.

A mis hermanas Vanesa y Karina, porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindan me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

De igual manera mi más sincero agradecimiento al Dr. Luis Miguel Romero, Rector Canciller de la Universidad; a la Dra. Paula Torres Bailón, Directora de la Escuela de Bioquímica y Farmacia; a la Dra. Natalia Bailón Moscoso, Directora del Centro de Biología Celular y Molecular; y a mi directora de tesis, Bioq. Gabriela Cevallos Solórzano; a quienes debo el realizar mi Trabajo de Fin de Carrera en una Universidad tan prestigiosa como lo es la Universidad Técnica Particular de Loja.

Yo, Milton L. Yaguana C. declaro ser autor del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

-----  
Milton L. Yaguana C.  
**AUTOR**

-----  
Bioq. Farm. Gabriela Cevallos  
**DIRECTORA DE TESIS**

## **INDICE DE CONTENIDOS**

Certificación	II
Autoría	III
Dedicatoria	IV
Agradecimiento	V
Contrato de Cesión de Derecho de Tesis	VI
Índice de Contenidos	VII

### **CAPITULO 1. INTRODUCCION**

Resumen	9
Abstract	10
Justificación	11
Cáncer	12
Ciclo Celular	12
Puntos de Monitoreo	13
Deficiencia de la Detección Mitótica	14
Objetivos	16

### **CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS**

Esquema	17
Muestreo	18
Extracción ADN	18
Reacción en cadena de la Polimerasa	18
Digestión Enzimática	18
Análisis Estadístico	19

### **CAPITULO 3. RESULTADOS**

Concentración ADN	20
Comprobación PCR	20
Comprobación Digestión Mvnl	21
Frecuencia Genotípica Mad1	21
Frecuencia Alélica Mad1	22

<b>CAPITULO 4. DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
------------------------------	-----------

<b>CAPITULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	27
<b>CAPITULO 6. BIBLIOGRAFIA</b>	28
<b>CAPITULO 7. ANEXOS</b>	
Cálculos: Equilibrio Hardy-Weinberg	33
Protocolo PCR Mad1	35
Protocolo Digestión MvnI	36



## RESUMEN

En células eucariotas, los puntos de monitoreo son una seguridad universal, un dispositivo que asegura la fidelidad de la segregación cromosómica en la mitosis. La inestabilidad genética es un mecanismo clave de la carcinogénesis, una interrupción del punto de control del huso mitótico es uno de los mecanismos que conllevan a errores en la célula. Mad 1 (Mitotic Arrest Deficient 1), es un gen que codifica una proteína del punto de monitoreo del huso mitótico, cuya función biológica es impedir el inicio de la anafase. Una alteración a nivel de dicho gen, da por consiguiente una inactivación de sus funciones lo cual ocasiona inestabilidad cromosómica, principalmente aneuploidías lo cual contribuye a que se genere un proceso carcinogénico. Por ello para nuestro estudio se amplificó el exón 17 del gen Mad1 a partir de linfocitos humanos mediante reacción en cadena de la polimerasa y posterior digestión enzimática con la enzima MvnI que reconoce la secuencia CGCG y su comprobación mediante corrida electroforética, para la determinación del genotipo GG, GA y AA y la frecuencia genotípica y alélicas de este gen (gen Mad1), presente en la población infantil lojana estudiada.

**PALABRAS CLAVES:** ciclo celular, puntos de chequeo, polimorfismo, mad1.

**ABSTRACT**

In eukaryotic cells, checkpoints are a universal security, a device that ensures the fidelity of chromosome segregation in mitosis. The genetic instability is a key mechanism of carcinogenesis, an interruption of the control point of mitotic spindle is one of the mechanisms that lead to errors in the cell. Mad 1 (Mitotic Arrest Deficient 1), is a gene that encodes a protein of the monitoring point of the spindle mitotic, whose function is to prevent the onset of anaphase. An alteration to the level of gene inactivation is therefore one of their functions which results in chromosomal instability, mainly aneuploidy which helps to generate a carcinogenic process. Therefore our study was to amplify exon 17 of gene Mad1 from human lymphocytes by reaction polymerase chain and later enzymatic digestion with enzyme MvnI which recognizes the sequence CGCG and checked using electrophoretic run, to determine the genotype GG, GA, AA and genotypic and allelic frequency of this gene (gene Mad1), present in children lojana population studied.

**KEY WORDS:** cell cycle, check points, polymorphism, mad1.

## INTRODUCCION

### ***Justificación:***

A nivel mundial el cáncer es una enfermedad con una incidencia en ascenso, alrededor de 12.3 millones de personas desarrollaron algún tipo de cáncer según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud en 2007. La cual se la ha correlacionado con la sobreexpresión o pérdida de función de ciertos genes, provocado por factores genéticos heredados o externos. La OMS señala que el consumo de tabaco es el principal factor para desarrollar la enfermedad, así como el sobrepeso u obesidad, una dieta baja en frutas y hortalizas, el consumo de alcohol, la contaminación del aire urbano, entre otros. En Ecuador esta realidad no es diferente de acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) la mortalidad por cáncer se ha incrementado en las últimas décadas, según el estudio "Incidencia del Cáncer en Loja & Registro de Tumores" llevado a cabo entre 1997 y 2003 en nuestra ciudad, se registraron que el número de muertos por cada 100 enfermos de cáncer es de 46 hombres y 40 para mujeres por año (SOLCA 2003).

Mitotic Arrest Deficient 1 (Mad 1), es un gen muy importante que codifica una proteína del mismo nombre, su función biológica es impedir el inicio de la anafase, es decir la separación de las cromátidas hermanas, antes de que los cromosomas se encuentren adheridos a los microtúbulos del huso mitótico y que se hallen alineados en la placa metafásica. Una alteración a nivel de dicho gen, da por consiguiente una inactivación de sus funciones ocasionando inestabilidad cromosómica, principalmente aneuploidías que contribuiría a que se genere un proceso carcinogénico (Sze 2006).

Al igual como se ha hecho en países como México, que se han descrito tres variantes alélicas para este gen, siendo una de las más reconocidas la transición de G por A en la posición 558 del exón 17 del gen (Santibáñez *et al.* 2007).

Para ello nuestro interés de promover en nuestro país, estudios que busquen correlacionar la susceptibilidad genética con el riesgo de desarrollar cáncer, entender aquellos mecanismos de regulación de genes en el punto de monitoreo del huso mitótico y de establecer que genotipo y con que frecuencia se presenta el polimorfismo del gen *mad 1* en la población ecuatoriana (Iwanaga and Jeang 2002; Alazzouzi 2006).

### **Cáncer:**

El cáncer es una enfermedad que se desarrolla lentamente, durante este tiempo las células cancerígenas adquieren la capacidad de dividir, invadir y diseminarse, debido a que pierden su mecanismo de función y muerte (Loeb *et al.* 2003). Tomando en cuenta su incidencia mundial según la OMS en 2007 podemos destacar diversos tipos: cáncer de pulmón (14%), mama (13.9%), colón y recto (9.42%), estómago (9%), próstata (6.26%). Además una proporción de todos estos cánceres humanos (70–80%) son aneuploides (Vaclavicek *et al.* 2007). De hecho, se ha propuesto que la aneuploidía representa un evento incitante para el desarrollo de cáncer.

Actualmente los mecanismos precisos de la transformación celular siguen siendo no del todo claros. Anomalías a nivel cromosómico por pérdida o ganancia, son comúnmente observadas en células cancerosas (Iwanaga *et al.* 2007).

La susceptibilidad genética puede ser crítica en muchos de los procesos carcinogénicos, esta susceptibilidad se debe a la presencia de variantes alélicas de genes involucrados (Ames 1999), que se encuentran presentes en una amplia proporción de la población normal. Estos polimorfismos en una gran variedad de genes pueden modificar o predisponer que se presente un cuadro carcinogénico (Perera and Weistein *et al.* 2000).

### **Ciclo Celular:**

La división celular consiste en dos procesos consecutivos, principalmente caracterizados por la replicación del ADN y la segregación de cromosomas. Al principio, la división celular fue

dividida en dos etapas: Mitosis (M), proceso de división celular, e Interfase, interludio entre dos fases M. Las etapas de la mitosis incluyen: profase, metafase, anafase y telofase. Al microscopio, las células de interfase simplemente crecen en tamaño, pero técnicas diferentes revelaron que la interfase incluyen las fases G1, S y G2. La replicación del ADN ocurre en una parte específica de la interfase llamada fase S. La fase S es precedida por un lapso llamado G1 durante el cual la célula se prepara para la síntesis de ADN y es seguida de un periodo llamado G2 durante el cual la célula se prepara para mitosis. Las células en G1, antes de la replicación del ADN pueden entrar en un estado de descanso llamado G0 (Vermeulen, *et al.* 2003).

Hay alteraciones fundamentales en el control genético de la división celular, causando una proliferación celular desenfrenada. Las alteraciones principalmente ocurren en dos clases de genes: proto-oncogenes y genes supresores de tumores. En células normales, los productos de proto-oncogenes actúan en niveles diferentes a lo largo de los senderos que estimulan la proliferación celular. Las versiones transformadas de proto-oncogenes u oncogenes pueden promover el crecimiento del tumor. Mientras la inactivación de genes supresores de tumores causa la disfunción de proteínas que normalmente inhiben la progresión del ciclo celular. La desregulación del ciclo celular asociada con el cáncer ocurre por la alteración de proteínas importantes en diferentes niveles del ciclo. En el cáncer, las alteraciones han sido observadas en genes que codifican Quinasas dependientes de ciclinas (CDK), CDK-activador de enzimas, Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKI), CDK sustratos, y proteínas de los puntos de chequeo (Vermeulen, *et al.* 2003).

### ***Puntos de Monitoreo:***

En mamíferos las células eucariotas, han desarrollado mecanismos de control, los cuales nos aseguran la correcta segregación cromosómica en la mitosis, por tanto la pérdida de función del punto de monitoreo del huso mitótico en células de mamífero se la ha correlacionado con inestabilidad genética (Tsukasaki *et al.* 2001; Geert *et al.* 2005). La cual existe en dos

ámbitos distintos: inestabilidad microsatélital (MIN), que es usualmente comparada con errores en la DNA polimerasa; e inestabilidad cromosómica (CIN), la cual puede ser resultado de errores en la separación de los cromosomas durante la mitosis (Beckman and Loeb 2005; Loeb 2001).

Estudios recientes sugieren que los defectos de los puntos de control mitóticos desempeñan un papel importante en la carcinogénesis (Cahill *et al.* 1999), debido a que estos puntos de control pueden retrasar la progresión del ciclo celular en caso de que un requisito previo no se halla completado correctamente. En células eucariotas el ciclo celular es protegido en tres puntos de control: G1/S, G2/M, y punto de chequeo o checkpoint metafase/anafase (Bharadwaj and Yu 2004; Novák, *et al.* 2002).

Estudios genéticos en mamíferos, han implicado al menos 7 genes en la función del punto de monitoreo del huso mitótico, encargadas de velar porque estos procesos se lleven a cabo sin ningún fallo, *mad* (mitotic arrest deficiency) 1, 2, 3 y *bub* (budding uninhibited by benomyl) 1, 2, 3 y *mps1* (monopolar spindle) (Iwanaga *et al.* 2002). En condiciones normales estos genes se encargan de detener el avance del ciclo celular hasta que todos los cromosomas estén bien alineados en la placa metafásica y anclados por los microtúbulos para su correcta segregación cromosómica (Seeley *et al.* 1999; Martin *et al.* 2002; Iwanaga and Jeang 2002).

### ***Deficiencia de la Detección Mitótica / Mitotic Arrest Deficient 1 (mad1):***

La proteína MAD1 (*Mitotic Arrest Deficient 1*) en humanos, es un polipéptido de 718 aminoácido, cuyo gen esta localizado en el cromosoma 7p22 (Iwanaga and Jeang 2002), es un componente del punto de control del huso mitótico que previene el inicio de anafase hasta que todo el cromosoma sea correctamente alineado en el centro de la metafase. MAD1 funciona como un homodímero y actúa recíprocamente con MAD2, movilizándolo al cinetocoro, y promoviendo su interacción con Cell Division Cycle (CDC20), inhibiendo así el progreso del ciclo celular hacia la anafase (Santibáñez *et al.* 2007). Tres tipos de mRNA, que

codifican la misma proteína han sido encontradas para este gen. Siendo una de las más reconocidas la transición de G por A en la posición 558 del gen (Santibáñez *et al.* 2007).

## **OBJETIVO GENERAL**

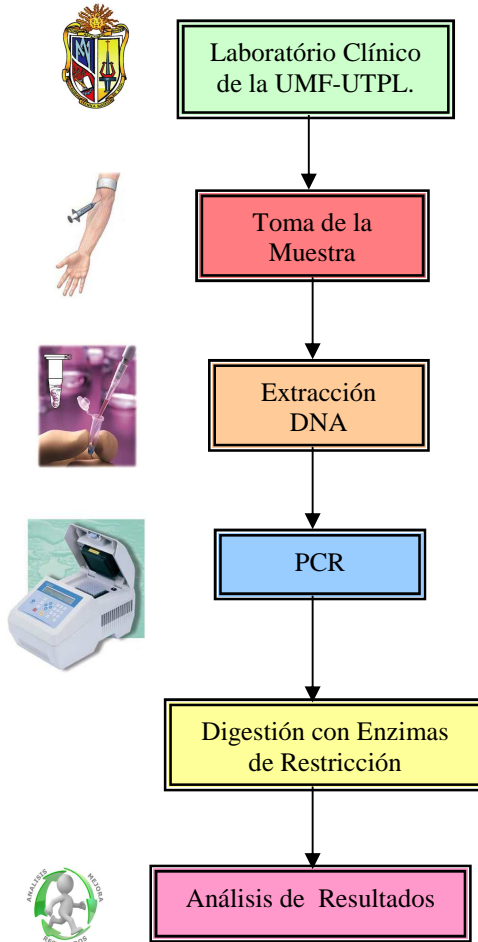
Determinar el polimorfismo del gen Mad1 en niños menores de 12 años que acudieron laboratorio clínico de la Unidad de Medicina Familiar (UMF) de la UTPL.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Estandarizar la técnica de digestión enzimática, para su posterior utilización en la comprobación de las variaciones del gen Mad1.
- Determinar la frecuencia del polimorfismo del gen Mad1 en niños menores de 12 años acudieron laboratorio clínico de la Unidad de Medicina Familiar (UMF) de la UTPL.



## MATERIALES Y MÉTODOS



***Muestreo:***

Las 56 muestras que se analizaron pertenecen a una población infantil de la ciudad de Loja, la cual se selecciono de acuerdo al siguiente criterio de inclusión: que sus padres y abuelos sean de descendencia ecuatoriana; además la recolección se realizo previo consentimiento de sus padres para la toma de una muestra de sangre periférica en tubos con anticoagulante ácido etilen diamino tetracético (EDTA) en el laboratorio clínico de la Unidad de Medicina Familiar y su posterior almacenamiento y procesamiento en el Centro de Biología Celular y Molecular de la UTPL.

***Extracción ADN:***

La extracción de ADN se realizo mediante el Kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega). El producto obtenido se almacenó a -20°C para evitar su degradación. La comprobación de los resultados se realizo cuantitativamente por lecturas espectrofotométricas y cualitativamente por geles de agarosa al 0.8 %. El revelado se hizo con bromuro de etidio bajo acción de luz ultravioleta.

***Reacción en Cadena de la Polimerasa:***

Para determinar el polimorfismo del codon G558A se amplifico el exon 17 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver anexo: Protocolo 1). Con la siguiente secuencia de primers: *F* 5' GTC TGA GAA TTC CTG CAG GGT GAC TAT GAC CAG 3' y *R* 5' GAG TCT GGA TCC CTG CCA CCT CCT TGG ACG ATG GCA GAC 3'. Seguido de su verificación mediante gel de agarosa al 1.5%.

***Digestión Enzimática:***

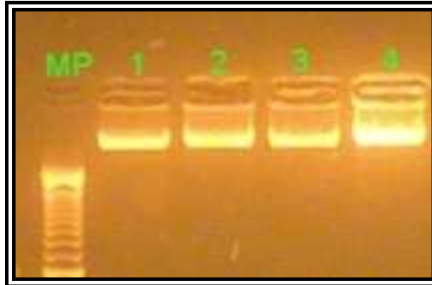
Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción Mvn I que reconoce la secuencia CGCG (refiérase anexo: Protocolo 2). Las muestras sometidas a digestión se corrieron en geles de agarosa al 3%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz ultravioleta.

***Análisis Estadístico:***

El análisis estadístico con el cual se valoro el polimorfismo del gen fue mediante el test de Handry-Weinberg, y un test de Ji-Cuadrado.

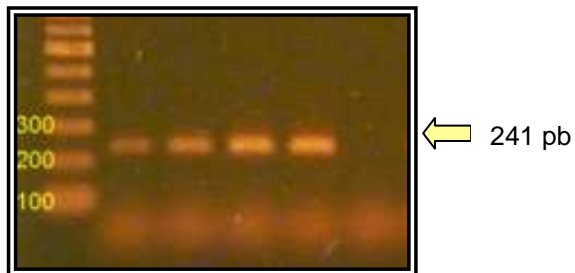
## RESULTADOS

Una vez extraído el ADN, se comprobó la presencia del templado, observándose una banda en la parte superior del gel, sobre los 2012pb. Posterior a la corrida electroforética se cuantifico la concentración espectrofotométricamente; obteniéndose una concentración promedio de 500 ng/ul.



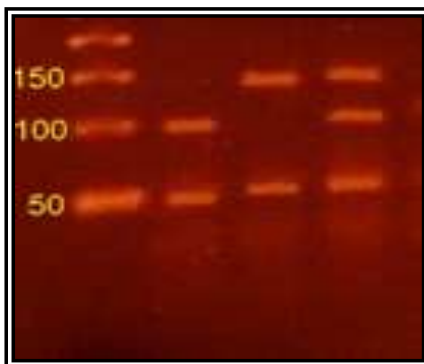
**Fig. 1.** Concentración de DNA. Carril MP = Marcador de peso Molecular 100 pb. Carriles 1 - 4 = muestras DNA.

En la comprobación de la PCR, se observa una banda equivalente a 241 pb.



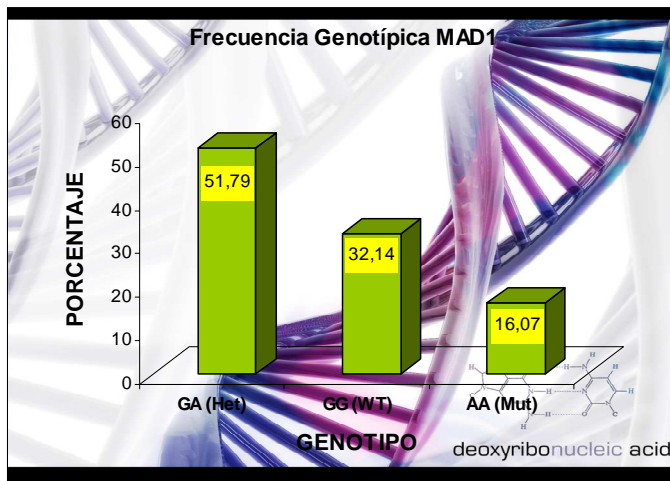
**Fig.2.** Productos de PCR. Carril MP = Marcador de peso Molecular 100 pb. Carriles 1 - 3 = Productos de PCR. Carril 4 = Control positivo y Carril B = Control negativo.

En los resultados de la digestión enzimática, se puede observar que para el alelo 558R (silvestre o normal) presenta un fragmento de 94, 50, 43, 42 y 12 pares de bases, mientras que para el alelo 558H (mutante) se genera un fragmento de 136, 50, 43, 12 pares de bases.



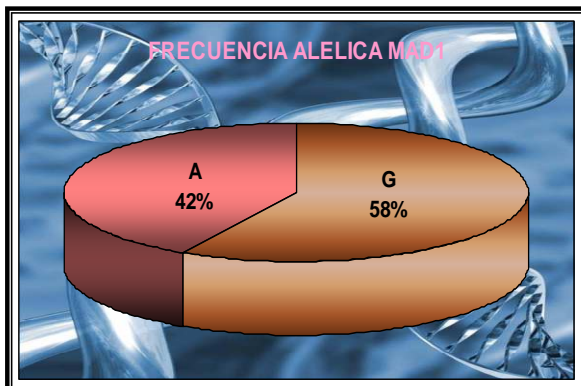
**Fig.3.** Productos de Digestión. Carril MP = Marcador de peso Molecular 50 pb. Carriles 1= Genotipo GG, Carril 2= Genotipo AA, Carril 3= genotipo GA.

De un total de 56 individuos sometidos al estudio para el Gen Mad1: 29 presentaron el genotipo heterocigoto (GA), 18 el genotipo normal (GG) y 9 el genotipo mutante (AA). Dando como resultado una frecuencia genotípica del 51.79, 32.14 y 16.07% respectivamente.



**Fig. 4.** Frecuencia Genotípica Mad1. GA = Alelo Heterocigoto, GG = Alelo Homocigoto Dominante, AA = Alelo Homocigoto Recesivo.

Y una frecuencia alélica de 58% para el alelo G y 42% para el alelo A.



**Fig. 4.** Frecuencia Alélica Mad1. G = Alelo Dominante. A = Alelo Recesivo.

Al someter nuestros datos al test de Hardy-Weinberg; llamaremos  $p$  a la frecuencia de G, el primer alelo, y  $q$  a la frecuencia de A, el segundo alelo. Obteniendo las frecuencias esperadas de cada genotipo:  $Np^2$  GG (18.8 GG),  $2Npq$  GA (27.2 GA) y  $Nq^2$  AA (9.9 AA), donde N representa a los 56 individuos sometidos al estudio. Al contrastan estas frecuencias esperadas con las observadas mediante el test de Ji-Cuadrado ( $X^2$ ), con un grado de libertad. Tenemos que  $X^2$  vale 0.22, que corresponde a una probabilidad de entre 60 -70 %.

## DISCUSIÓN

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Aproximadamente el 99.9% de la secuencia del ADN de dos individuos diferentes es la misma. Una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos radica en el 0.1% de variación; a este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos. Existen aproximadamente 6 millones de polimorfismos de nucleótido sencillo o SNP, del inglés single nucleotide polymorphism. Cabe mencionar que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los SNP's, y en menor grado a delecciones, secuencias repetidas, inserciones, etc. La gran mayoría de los SNP's tienen dos alelos los cuales están representados por la sustitución de una base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o "silvestre" y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente (Checa 2007).

Los SNP's pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido y afectar directamente a la función de la proteína. Asimismo, pueden estar localizados en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones modulando la estabilidad de la proteína, en sitios de "splicing" (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas (Luque et al 2001).

Para la identificación de polimorfismos existen varios métodos, pero nos remitiremos al uso de enzimas de restricción que cortan secuencias específicas de ADN; es decir, un fragmento de ADN amplificado por PCR se somete a digestión con una endonucleasa, ésta tendrá un sitio de corte específico y las



variaciones alterarán este patrón de corte; dando como resultado un patrón diferente de migración que puede ser visualizado mediante el corrimiento de estos fragmentos en geles de agarosa, comparando y distinguiendo los distintos genotipos (Checa 2007).

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina locus. Para nuestro estudio del gen Mitotic Arrest Deficient 1 se produce el cambio de G por A en el codon 558 del exón 17. Como dicho gen se encuentra en un cromosoma autosómico (7p22), cada individuo será portador de dos alelos uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y madre de manera independiente. La pareja de alelos observada en un individuo se denomina genotipo y existen tres posibilidades de parejas de alelos: Los individuos con dos alelos idénticos GG y AA se denominan homocigotos, y los que tienen diferentes alelos GA heterocigotos. Considerando como variante al alelo menos frecuente (AA) según lo expuesto por Iniesta et al 2005. Cuando se presenta el polimorfismo del codon 558 existe una sustitución de una G por una A, lo cual provoca el cambio del aminoácido Arginina (R) por Histidina (H). Lo cual acarrea la anulación del cierre de leucina como fue demostrado por Santibáñez et al. 2007. Además, de las tres variantes anteriormente descritas para este gen, según lo expuesto por Iwanaga et al. 2007: "Las células de los individuos portadores de la variante AA, al ser expuestos a un tratamiento con un agente que induce una arresto del ciclo celular, no se detienen en metafase. Lo cual las hace más susceptibles a presentar errores en la segregación cromosómica, es decir a dar origen a células aneuploides.

Refiriéndonos al análisis estadístico, consiste en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y de cada genotipo posible, lo que en genética se denomina estimar las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente. Utilizando una muestra de ADN extraído a partir de sangre periférica, extrajimos el ADN lo amplificamos mediante reacción en cadena de la polimerasa y utilizamos enzimas de restricción para identificar los genotipos presentes en nuestra población equivalente a 56 individuos,

obteniendo: 29 GA, 18 GG y 9 AA. Para estimar las frecuencias alélicas se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma y se calcula la proporción de cada alelo; 0.58 GG y 0.42 AA. Realizados los cálculos de frecuencias, aplicamos la Ley del Equilibrio de Hardy-Weinberg, el cual nos permite determinar que frecuencias deben esperarse en una población panmíctica, en la cual el apareamiento se realice al azar y no haya sido influenciada por factores distorsionadores. Estas frecuencias esperadas se compararon con las observadas utilizando el Test de Ji-Cuadrado ( $X^2$ ), con un grado de libertad. Para nuestro caso tenemos que  $X^2$  vale 0.22, valor que corresponde a una probabilidad de 60–70 % por lo que podemos concluir que nuestra muestra se encuentra bajo equilibrio Hardy-Weinberg (Iniesta et. al. 2005).

Por todo lo anteriormente expuesto proponemos como perspectivas para nuestra investigación: un screening genético con líneas celulares establecidas en el área de citogenética del CBCM-UTPL para determinar la el genotipo presente en el gen *mad1*, seguido de una purificación del producto obtenido, para la subsecuente secuenciación e identificación de la base alterada. Para determinar los efectos de *mad1* mutante y normal en las células, someteremos a las líneas celulares a una disrupción de los microtúbulos usando nocodazol para su posterior análisis; según lo expuesto por Tsukasaki et al. 2001.

## CONCLUSIONES

- Se observó un grado de expresión mayor del genotipo heterocigoto (GA = 51.79%), comparado con los otros genotipos homocigotos dominante y recesivo (GG = 32.14% & AA = 16.27%), respectivamente.
- Lo que nos hace suponer que la variación del codon G558A en niños menores de 12 años que acudieron al Laboratorio Clínico de la Unidad de Medicina Familiar de la UTPL, no puede deberse a una suma de factores que impulsen a la célula a una transformación maligna.

## RECOMENCACIONES

- Se necesitan más estudios para determinar que variantes en otros genes pueden contribuir a defectos en los puntos de control mitótico. Cuales son las más relevantes a nivel de nuestro país y cual sería su efecto a nivel celular.
- La búsqueda de nuevos agentes que puedan activar los puntos de monitoreo del ciclo celular podrían ser utilizados como una manera de explotar la diferencia entre células normales y malignas, y mejorar los resultados de la quimioterapia.

**BIBLIOGRAFIA**

- Alazzouzi H, 2006. La Inestabilidad Genómica en Cáncer. Tesis doctoral realizada en el Centro de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.
- Ames BN, 1999. Cancer prevention and diet: Help from single nucleotide polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:12216-8.
- Beckman R, Loeb L, 2005. Genetic instability in cancer: Theory and experiment. *Cancer Biology*.
- Bharadwaj R, and Yu H, 2004. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* 23, 2016–2027.
- Cahill P., Costa L, Carson E, Kinzler K, Vogelstein B, and Lengauer C. 1999. Characterization of MAD2B and other Mitotic Spindle Checkpoint Genes. *Genomics* 58, 181-187.
- Checa M. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev inst nal enf resp mex*. Volumen 20 - número 3. Julio-septiembre 2007. Páginas: 213-221.
- Chun A. and Jin D. 2003. Transcriptional Regulation of Mitotic Checkpoint Gene MAD1 by p53. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278, No. 39, pp. 37439–37450.
- Chung E. and Chen R. 2002. Spindle Checkpoint Requires Mad1-bound and Mad1-free Mad2. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 13, 1501–1511.
- Geert J. P. L. Kops, Beth A. A. Weaver & Don W. Cleveland, 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Reviews Cancer* 5, 773-785.
- Imai Y., Shiratori Y., Kato N., Inoue T. and Omata M. 1999. Mutational Inactivation of Mitotic Checkpoint Genes,

hsMAD2 and hBUB1, Is Rare in Sporadic Digestive Tract Cancers. *Cancer Res.* 90, 837–840.

- Iniesta R, Guinó E, Moreno V, 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, Vol.19. N.4. pp. 333-341.
- Iwanaga Y, and Jeang K, 2002. Expression of Mitotic Spindle Checkpoint Protein hsMAD1 Correlates with Cellular Proliferation and Is Activated by a Gain-of-Function p53 Mutant. *Cancer Research* 62, 2618-2624.
- Iwanaga Y, Chi Y, Miyazato A, Sheleg S, Haller K, Peloponese J, Li Y, Ward J, Benezra R and Jeang K, 2007. Heterozygous Deletion of Mitotic Arrest-Deficient Protein 1 (MAD1) Increases the incidence of Tumors in Mice. *Cancer Res* 67, 160.
- Iwanaga Y, Kasai T, Kibler K, and Jeang K, 2002. Characterization of regions in hsMAD1 needed for binding hsMAD2: a polymorphic change in an hsMAD1 leucine zipper affects Mad1-Mad2 interaction and spindle checkpoint function. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, No. 34, 31005–31013.
- Li H., Cuenin C., Murr R., Wang Z. and Herceg Z. 2004. HAT cofactor Trrap regulates the mitotic checkpoint by modulation of Mad1 and Mad2 expression. *The EMBO Journal* 23, 4824–4834.
- Loeb L, 2001. A Mutator Phenotype in Cancer. *Cancer Research* 61, 3230-3239.
- Loeb L, Loeb K, and Anderson J, 2003. Multiple mutations and cancer. 100, 776-781.
- Luque J, 2001. Análisis de Genes. Detección y Aplicaciones de los Polimorfismo, *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Elsevier, España, pp. 381-387.

- Martin S, Volker M. Stucke, and Nigg E, 2002. Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science* 297:5590, 2267(4).
- Molinari M. 2000. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* 33, 261±274.
- Mondal G., and Roychoudhury S., 2003. The Spindle Assembly Checkpoint and Its effects in Human Cancer. *Int J Hum Genet*, 3(2): 89-97.
- Musacchio A., and Salmon E, 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Molecular Cell Biology*, Volume 8.
- Novák B, Sible J, and Tyson J, 2002. Checkpoints in the Cell Cycle. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Olesen S., Thykjaer T. and Ørntoft T. 2001. Mitotic checkpoint genes hBUB1, hBUB1B, hBUB3 and TTK in human bladder cancer, screening for mutations and loss of heterozygosity. *Carcinogenesis*. Vol.22. no.5 pp.813–815.
- Organización Mundial de la Salud. 2008. El Cáncer.[online][http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs\\_297/es/print.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs_297/es/print.html)
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P, 2002. Global Cancer Statistics. *Cancer Journal for Clinicians* 74, 108-2005.
- Perera FP, Weistein IB, 2000. Molecular epidemiology: Recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, 21:517-24.
- Pinto M., Soares M., Cerveira N., Henrique R., Ribeiro F., Oliveira J., Jerónimo C., Teixeira M. 2007. Expression changes of the MAD mitotic checkpoint gene family in renal cell carcinomas characterized by numerical chromosome changes. *Virchows Arch* 450:379–385.

- Qi W., Yu H. 2006. The Spindle Checkpoint and Chromosomal Stability. *Genome Dyn.* Basel, Karger. Vol 1, pp 116–130.
- Santibáñez M, Castro C, López A, and Herrera L, 2007. Study of the polymorphism Mad1 G558A in a Mexican population and its relationship with the generation of aneuploidy. *Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer-INCan-IIB, Instituto Nacional de Cancerología.*
- Seeley T, Wang L, Zhen J, 1999. Phosphorylation of Human MAD1 by the BUB1 Kinase in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257, 589-595.
- Sironi L., Mapelli M., Knapp S., De Antoni A., Jeang K., and Musacchio A. 2002. Crystal structure of the tetrameric Mad1±Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *The EMBO Journal* Vol. 21, No. 10 pp. 2496-506.
- SOLCA, 2003. Incidencia del Cáncer en Loja. Registro de Tumores 1997-2003.
- Sze M. 2006. Characterization of Mitotic Checkpoint Proteins, Mad1 And Mad2, In Hepatocellular Carcinoma.
- Tanaka K., Nishioka J., Kato K., Nakamura A., Mouri T., Miki C., Kusunoki M. and Nobori T. 2001. Mitotic Checkpoint Protein hSMAD2 as a Marker Predicting Liver Metastasis of Human Gastric Cancers. *Cancer Res.* 92, 952–958.
- Tsukasaki K, Miller C, Greenspun E, Eshaghian S, Kawabata H, Fujimoto T, Tomonaga M, Sawyers C, Said J and Benin H, 2001. Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers. *Oncogene* 20, 3301-3305.
- Vaclavicek A, Bermejo J, Wappenschmidt B, Meindl A, Sutter C, Schmutzler R, Kiechle M, Bugert P, Burwinkel B,

Bartram C, Hemminki K, and Försti A, 2007. Genetic variation in the major mitotic checkpoint genes does not affect familial breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment* 106, 205-213.

- Vermeulen K, Van Bockstaele D, and Berneman Z, 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131–149.
- Zamorano E., Inestabilidad Cromosómica. Laboratorio de Genética Toxicológica (GENETOX). Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad del Bío-Bío, Chillán-CHILE.



## ANEXOS

**CALCULOS: EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG-MAD1**

Genotipo	Frecuencia
GA (Het)	29
GG (WT)	18
AA (Mut)	9
<b>TOTAL</b>	<b>56</b>

**1. Calculo de Frecuencias Alélicas:**

$$p = GG = [29 + 2(18) / 56 (2)] = 0.58$$

$$q = AA = [9 + 2(9) / 56 (2)] = 0.48$$

**2. Calculo de Frecuencias Genotípicas.**

$$GG = p^2N = [(0.58)^2 (56)] = 18.8$$

$$GA = 2pqN = [2(0.58) (0.42) (56)] = 27.2$$

$$AA = q^2N = [(0.42)^2 (56)] = 9.9$$

**3. Ji-Cuadrado ( $X^2$ ).**

Genotipo	Observado	Esperado	(O-E)	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
GG	18	18.86	-0.86	0.7396	0.03922
GA	29	27.28	1.72	2.9584	0.1084
AA	9	9.86	-0.86	0.7396	0.0750
Total	56		0		<b><math>X^2 = 0.22</math></b>

**4. Determinar los grados de Libertad.**

$$gl = \text{fenotipos} - \text{alelos} = 3 - 2 = 1$$

**5. Interpretar el valor de  $X^2$ .**

El valor de 0.22 correspondiente a la prueba de Ji-Cuadrado equivale a una probabilidad aproximada de 0.60 y 0.70

**PROTOCOLO 1:****PCR MITOTIC ARREST DEFICIENT 1 GENE (MAD1).**

<b>COMPONENTES</b>	<b>1X</b>	<b>8X</b>	<b>Ci</b>	<b>Cf</b>
<i>H2O dd</i>	34,71	277,68		
<i>Green Buffer</i>	10	80	5 x	1x
<i>dNTP Mix</i>	1	8	10 mM	0,2 mM
<i>Primers F</i>	1	8	10 mM	0,2 mM
<i>Primers R</i>	1	8	10 mM	0,2 mM
<i>BSA 10 %</i>	0,04	0,32	100 ug/ul	0,08 ug/ul
<i>Go Taq DNA Polymerase</i>	0,25	2		
<i>DNA</i>	2		50 ng/ul	2 ng/ul
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>			

<b>PROGRAMA TERMOCICLADOR VERITI</b>	
Desnaturalización Inicial	94 x 2 min
Desnaturalización	94 x 30 seg
Anillamiento	69 x 30 seg
Extensión	72 x 30 seg
Nº ciclos	35
Extensión final	72 x 5 min
Mantenimiento	4º for ever

<b>COMPROBACION :</b>
<i>Producto de PCR: Agarosa al 1,5 %</i> (Cargamos 10 ul del producto)
<b>Condiciones de Corrida:</b> 30 min, 90 V, 200mA.

**PROTOCOLO 2:****DIGESTION CON ENZIMA DE RESTRICCION MVN I**

<b>COMPONENTES</b>	<b>1X</b>	<b>8 X</b>
H2O dd	2,02	16,16
Mvn I	0,48	3,84
Buffer 10 x	2,5	20
Muestra (producto de pcr)	5	5 ul por muestra
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	

**Resultados de la Digestión:**

Genotipo Silvestre: 12 - 42 - 43 - 50 y 94 bp

Genotipo Variante: 12 - 43 - 50 y 136 bp

Genotipos: GG - GA - AA

**COMPROBACION :**

*Producto Digestión Enzimática:* Agarosa al 4 %  
(10 ul de producto)

Condiciones de Corrida: 30 min, 100 V, 300mA.