

Estudio de polimorfismos de nucleótido simple en el proto-oncogén RET asociados con la enfermedad de Hirschsprung en niños de la población ecuatoriana

María José Guevara ⁽¹⁾, Dolores Franco ⁽²⁾, Marcelo Grijalva ⁽¹⁾, Paola Párraga ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejercito (ESPE); Quito – Ecuador.

⁽²⁾ Departamento de Patología, Hospital Pediátrico Baca Ortiz (HBO); Quito – Ecuador.

Resumen

Contexto: La enfermedad de Hirschsprung es un desorden congénito caracterizado por la ausencia de células ganglionares en una porción variable del tracto gastrointestinal, tiene una incidencia global de 1 por cada 5000 recién nacidos vivos. Está causada por defectos en la migración de las células del sistema nervioso entérico durante el desarrollo embrionario. La motilidad intestinal se ve comprometida en pacientes con Hirschsprung, con el consiguiente riesgo de obstrucción intestinal. Actualmente se sabe el proto-oncogén RET es el principal gen involucrado en la patogénesis de Hirschsprung, entre ellas se han asociado mutaciones sinónimas e intrónicas.

Objetivo: Analizar polimorfismos de nucleótido simple en los exones 2, 7, 15 e intrón 1 del gen RET, en 41 pacientes diagnosticados con Hirschsprung mediante las técnicas PCR-RFLP y secuenciación directa. Todas las muestras fueron proporcionadas por el Hospital Pediátrico Baca Ortiz de la ciudad de Quito.

Diseño: Estudio retrospectivo caso-control.

Resultados: El polimorfismo A45A (c135 G>A, exón 2) está asociados a los enfermos con HSCR, ya que existen diferencias significativas respecto a la población sana ($p=0.001$); además presenta un valor considerable de odds ratio (OR=11.25; IC95%=2.34-54.13). Mientras que los polimorfismos A432A (c1296G>A exón 7) y S904S (c2712C>G exón 15) juegan un papel protector en la patogénesis de HSCR, en la población quiteña.

Conclusiones: Los polimorfismos estudiados del proto-oncogén RET desempeñan un papel importante en la etiología de la enfermedad de Hirschsprung en la población ecuatoriana.

Palabras Clave: Enfermedad de Hirschsprung; polimorfismo nucleótido simple; RET; PCR-RFLP; población ecuatoriana.

Abstract

Context: Hirschsprung's disease, a congenital disorder characterized by the absence of ganglion cells in a variable portion of the gastrointestinal tract, has an overall incidence of 1 per every 5000 live births. It's caused by defects which occur during the migration of cells of the enteric nervous system during embryonic development. Intestinal motility is compromised in patients with Hirschsprung, with possible consequent risk of bowel obstruction. We now know the RET proto-oncogene is a major gene involved in the pathogenesis of Hirschsprung, with them synonymous and intronic mutations have been associated.

Objective: Analyze single nucleotide polymorphisms in exons: 2, 7, 15 and intron 1 of the RET gene in 41 patients diagnosed with Hirschsprung, using PCR-RFLP techniques and direct sequencing. All of the samples were kindly provided by the Baca Ortiz Children's Hospital of Quito.

Design: Case-control retrospective study.

Results: The resulting significant differences with respect to the healthy population indicates that the A45A polymorphism (C135 G> A, exon 2) is associated with Hirschsprung's patients ($p=0.001$); also we are provided with a considerable value odds ratio (OR=11.25; IC95%=2.34-54.13). While the A432A (c1296G> A exon 7) and S904S (c2712C> G exon 15) polymorphisms play a protective role in the pathogenesis of HSCR in the Quito population.

Conclusions: The studied polymorphisms confirm that the RET proto-oncogene plays an important role in the etiology of Hirschsprung in the Ecuadorian population.

Key words: Hirschsprung's disease; HSCR; Polymorphism; RET; Ecuadorian population.

Introducción

La enfermedad de Hirschsprung (HSCR) es una anomalía congénita del sistema nervioso entérico caracterizada por la aganglionosis (ausencia o falta de células ganglionares), en los plexos mientérico de Auerbach y submucoso de Meissner, habitualmente en recto-sigma; dando como resultado una obstrucción intestinal funcional ^[1, 2]. HSCR corresponde a un 33% de los casos de obstrucción neonatal del colon, en el cual existe riesgo de desarrollo de enterocolitis necrotizante ^[3].

Se estima que la incidencia global es de 1 por cada 5000 recién nacidos vivos ^[4], sin embargo, la incidencia varía en los distintos grupos étnicos, estimándose: 2.8 por 10000 en asiáticos, 2.1 por 10000 en afroamericanos, 1.5 por 10.000 en población caucásica y finalmente 1.0 por 10.000 nacidos vivos en hispanos. En hermanos la incidencia es de aproximadamente del 3.5%, aumentando según la longitud del segmento de colon afectado hasta un 20% ^[5, 6].

Según el segmento agangliónico afectado se la clasifica en: HSCR de segmento corto (S-HSCR 74-80% de los casos), es la forma clásica de la enfermedad, en la que se ve afectada una región por debajo del sigmoides superior; HSCR de segmento largo (L-HSCR 12-22% de los casos), en la que la aganglionosis se extiende por encima del plexo esplénico ^[7] y hay una tercera forma, es a la vez rara y asociada con alta morbilidad y mortalidad, la aganglionosis total de colon (ATC 4-13%), con ausencia de células ganglionares en todo el colon ^[6, 8]. El 80% de los casos de HSCR son esporádicos, el 20% restante puede ser de origen familiar con patrones de herencia autosómicos dominantes y recesivos, penetrancia incompleta y expresión variable ^[9]. La enfermedad se presenta con predominio en el sexo

masculino, siendo el ratio hombres:mujeres de 4:1; sin embargo, este valor es significativamente más alto para S-HSCR (hombre:mujer de 5:1), que para la forma más severa L-HSCR (aproximadamente hombre:mujer de 1:1) ^[5]. El diagnóstico se realiza en la mayoría de los casos en el período neonatal ^[10], pero en algunos casos, se realiza más tarde en la infancia o incluso en la edad adulta ^[11].

La etiología se basa en un fallo en la migración, proliferación, diferenciación y/o supervivencia de las células de la cresta neural durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso entérico ^[12]. Hasta la fecha, el análisis molecular de pacientes con HSCR ha permitido identificar mutaciones en nueve genes que pueden estar relacionados con la enfermedad: RET, GDNF, NRTN, PHOX2B, EDNRB, EDN3, ECE1, SOX10 y ZFHX1B; la mayor parte de estos genes codifican proteínas, relacionadas entre sí, para elementos de las vías de señalización más importantes en la formación del sistema nervioso entérico (Figura 1) ^[13, 14]; actualmente se sabe que el proto-oncogén RET es el principal gen de susceptibilidad para HSCR ^[15], pero a pesar del papel central que juega RET en HSCR y la extensa búsqueda de mutaciones que se han llevado a cabo diferentes grupos durante los últimos años, la tasa de mutación todavía resulta demasiado baja como para responsabilizarla por la enfermedad, alrededor del 50% en los casos familiares y 7-35% en los casos esporádicos ^[16].

Es por ello que el objetivo de este estudio es determinar la asociación que hay entre los polimorfismos de nucleótido simple (SNP), presentes en los exones 2, 7 y 15 e intrón 1 del gen RET, con la enfermedad de Hirschsprung presente en niños de la población ecuatoriana ^[17-20]. Tomando en cuenta que debido a factores ambientales, la población ecuatoriana presenta importante variación genética con respecto a otras poblaciones a nivel mundial.

Sujetos y métodos

Muestras biológicas

Se realizó un estudio retrospectivo caso-control, el cual fue aprobado tanto por el Comité de Bioética de la Universidad de las Américas como por el Comité de Investigación del Hospital Baca Ortiz. Se analizaron 41 pacientes diagnosticados con HSCR, basados en la ausencia de plexos entéricos en el examen histológico de la biopsia o material quirúrgico realizado por el Departamento de Patología del Hospital Pediátrico Baca Ortiz de Quito, entre los años 2002-2011. Como población a comparar se utilizaron 41 controles, sin evidencia de problemas entéricos presentes y pasados, 20 biopsias de colon proporcionados por del Hospital Pediátrico Baca Ortiz y 21 muestras de sangre periférica de niños del Hospital Machachi, Área de Salud No.16.

Análisis de secuencias y genotipaje

La extracción de ADN se realizó a partir de las biopsias de tejido embebido en parafina, utilizando PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo el protocolo estandarizado ^[21].

Se seleccionó 4 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en el gen RET de la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), que incluye: rs1800858 (c135 G>A) en el exón 2, rs1800860 (c1296 G>A) en el exón 7, rs1800863 (c2712 C>G) en el exón 15 y rs2435365

(IVS1+1813 C>T), en el intrón 1. Los cebadores de la PCR para la amplificación de los exones: 2, 7 y 15 del gen RET se han descrito previamente ^[19], y se diseñó un par de cebadores para la amplificación de la región intrónica, utilizando el programa Primer3 Plus (Tabla 1). El volumen total de la reacción fue de 50 µL y se utilizaron, para el exón 7 e intrón 1: 10 ng de DNA, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM de cada oligo, 1 mM de MgCl₂ y 1.5 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el exón 2 y 15: 10 ng de DNA, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM de cada oligo, 2 mM de MgCl₂ y 1.5 U de Platinum Taq DNA Polymerase. Se procedió con una activación inicial a 95 °C durante 10 min, 35 ciclos de: desnaturalización a 94 °C durante 30 s, la temperatura de hibridación de cada SNP se detalla en la tabla 1, durante 45 s, extensión a 72 °C durante 45 s, y una extensión final a 72 °C durante 4 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%. Se determinó el genotipo utilizando la técnica PCR-RFLP y secuenciación; las enzimas utilizadas para los SNPs rs1800858 y rs1800863, fueron *EagI* y *RsaI*, respectivamente (Figura 2); y se secuenció el ADN para examinar las variantes genéticas rs1800860 y rs2435365 (Figura 3).

El análisis de secuencia se realizó con la química ABI PRISM® Big Dye™ Terminator, v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Austin, TX), según especificaciones del proveedor. La electroforesis capilar se dio a cabo en el analizador genético ABI PRISM™ 3130 (Applied Biosystems, Austin, TX). El análisis de secuencias se realizó con el programa Sequencing Analyzing Software Version 5.2 (Applied Biosystems, Austin, TX).

Análisis estadístico

Este análisis requirió un diseño experimental de estudio caso-control. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los cuatro polimorfismos estudiados fueron comparadas entre la

población de afectos con HSCR y la población sana. Para determinar la relación de los datos se llevó a cabo un análisis estadístico de tipo descriptivo, mediante el programa PASW 18 (SPSS, Chicago, IL). Las diferencias entre grupos fueron comparadas usando el test de chi-cuadrado (χ^2) y se determinó el riesgo calculando el odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95% y una tabla de contingencia 2 x 2. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

De los 41 casos investigados con HSCR, la frecuencia de afectos hombre-mujer fue 28:13 con edad promedio de 2,8 años en el rango de 15 días a 11 años. La frecuencia en Ecuador de los alelos A 135G>A y T en IVS1+1813C>T fue superior en afectos (55% y 77%), que en los controles (37% y 57%, respectivamente); mientras que la frecuencia de los alelos A en c1296 G>A y G en c2712 C>G fue menor en afectos (23% y 4%), que en el grupo control (59% y 29%), mostrando un comportamiento similar a los datos de investigaciones en países de Europa y Asia^[22-25] (Tabla 2). Realizando el análisis de chi-cuadrado (χ^2), con dos grados de libertad para los genotipos encontrados de cada polimorfismo estudiado c135 G>A, c1296 G>A, c2712 C>G e IVS1+1813 C>T, se obtuvieron valores de 12.54, 20.21, 20.44 y 8.35 respectivamente; los valores altos implican que existen diferencias significativas entre los grupos afecto y control. El marcador 135 G>A (OR=11.25; IC=1.61-78.57; $p=0.027$) se asocia fuertemente con el riesgo once veces mayor de desarrollar la enfermedad de HSCR. No se observaron diferencias significativas en el polimorfismo IVS1+1813 C>T (OR=4.167; IC=0.89-19.58; $p=0.132$); mientras que 1296 G>A y 2712 C>G (OR=0.055; IC=0.01-0.26; $p=0.000$ y

OR=0.135; IC=0.01-1.28; p=0.13), parecen jugar un papel protector en la patogénesis de HSCR (Tabla 3).

Discusión

El proto-oncogén RET es el principal gen de susceptibilidad para HSCR; ya que se encuentra implicado en el desarrollo del sistema nervioso entérico, durante la embriogénesis ^[15]; desde 1994, se han asociado mutaciones sinónimas e intrónicas del gen RET con la patogénesis de HSCR ^[9], las cuales provocan una pérdida de función por un mal plegamiento de proteína, falta de transporte en la superficie celular o supresión de su actividad biológica ^[26, 27]. Nuestros datos indican que, tal y como han descrito otras poblaciones: española, alemana, italiana, china, polaca y estadounidense ^[20, 22-25, 28], el alelo A del polimorfismo c135 G>A, está más representado en los enfermos HSCR, y los individuos que portan los genotipos GA/AA tendrían un riesgo once veces mayor de padecer la enfermedad de Hirschsprung; se propuso que la variante A45A podría estar en desequilibrio de ligamiento con algún locus funcional desconocido en aquel momento ^[29]; aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual la sustitución silenciosa del codón 45 actúa en el origen de HSCR; se muestra que la variante c135A está asociada fuertemente con el fenotipo de HSCR. Los polimorfismos c1296 G>A y c2712 C>G parecen ser factores significativamente protectores en la patogénesis de HSCR, aunque el mecanismo que habría detrás de un posible efecto protector aún no se ha esclarecido ^[20]. Por otra parte, en la población ecuatoriana no se encontró asociación entre esta enfermedad y el polimorfismo IVS1+1813 C>T, a diferencia de la investigación realizada en China ^[17, 30].

Ecuador aporta a la comunidad científica datos muy relevantes sobre las frecuencias alélicas y genotípicas que le caracterizan a la población, particularmente por las variantes genéticas encontradas en diversos genes como EGFR en cáncer de pulmón ^[31], GPX-1 en cáncer de vejiga ^[32], SRD5A2 en cáncer de próstata ^[33], hMSH2 en linfoma no-Hodgkin ^[34], NF2 en neurofibromatosis ^[35] y hRAD5 en leucemia mieloide crónica ^[36], los cuales están presentes debido a factores epigenéticos. Entre ellos, ambientales como la altura, los altos índices de luz UV, los altos niveles de consanguinidad etc. Por lo que esta investigación aporta en el entendimiento de variantes genéticas en la enfermedad de Hirschsprung en población tanto ecuatoriana como latinoamericana.

Agradecimientos

Se agradece al Departamento de Patología del Hospital Pediátrico Baca Ortiz de Quito y al Hospital de Machachi (Área de Salud No.16) por su colaboración con la toma y entrega de muestras para esta investigación.

Referencias bibliográficas

1. McInerny T, Adam H, Campbell D, Kamat D, Kelleher K & Hoekelman R. Tratado de pediatría. Primera edición. Buenos Aires: Médica Panamericana. Tomo II, 2011.
2. Amiel J, Lyonnet S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet* 2001; 38: 729-39.
3. Moore K & Persaud T. Embriología Clínica. Octava edición. Elsevier España, 2009.
4. Behrman R, Kliegman R & Jenson H. Nelson Tratado de Pediatría. Decimoséptima edición. Elsevier, España. 2004: 1239-41.
5. Torfs C. An epidemiological study of Hirschsprung disease in a multiracial California population. The Third International Meetings: Hirschsprung disease and related neurocristopathies. Evian, France, 1998.
6. Haricharan R & Georgeson K. Hirschsprung's Disease. *Semin in Pediatr Surg*. 2008; 17: 266-75.
7. Chakravarti A & Lyonnet S. Hirschsprung disease. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease. Eds McGraw-Hill Companies, 2002.
8. Kenny S, Tam P & Garcia-Barcelo M. Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 2010; 19(3): 194-200.
9. Lantieri F, Griseri P & Ceccherini I. Molecular mechanisms of RET-induced Hirschsprung pathogenesis. *Annals of Medicine* 2006; 38: 11-19.
10. Teitelbaum D, Cilley R, Sherman N, Bliss D, Uitvlugt N, Renaud E, et.al. A decade of experience with the primary pull-through for hirschsprung disease in the newborn period: a multicenter analysis of outcomes. *Ann Surg* 2000; 232: 372-80.
11. Parc R, Berrod J, Tussiot J & Loygue J. Megacolon in adults. Apropos of 76 cases. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* 1984; 20: 133-41.

12. Okamoto E & Ueda T. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1967; 2: 437-43.
13. Tam P & Garcia M. Genetic basis of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2009; 25: 543-58.
14. Fernández R. Identificación y caracterización molecular de nuevos loci de susceptibilidad para la enfermedad de Hirschsprung y el cáncer medular de tiroides. Tesis para obtención del título de Licenciado en Farmacia. Universidad de Sevilla 2004: 20-24.
15. Lyonnet S, Bolino A, Pelet A, Abel L, Nihoul C, Briard L, et.al. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet* 1993; 4: 346-50.
16. Angrist M, Bolk S, Thiel B, Puffenberger E, Hofstra R, Buys C, et.al. Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 821-30.
17. Liu C, Jin L, Li H, Lou J, Luo C, Zhou et.al. RET polymorphisms and the risk of Hirschsprung's disease in a Chinese population. *J Hum Genet* 2008; 53(9): 825-33.
18. Wu T, Tsai T, Chang H, Su C, Li S, Lai H et.al. Polymorphisms of the RET Gene in Hirschsprung Disease, Anorectal Malformation and Intestinal Pseudo-obstruction in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2010; 109(1): 32-38.
19. Smigiel R, Lebioda A, Patkowski D, Czernik J, Dobosz T, Pesz K, et.al. Single nucleotide polymorphisms in the RET gene and their correlations with Hirschsprung disease phenotype. *Appl Genet* 2006; 47(3): 261-267.
20. Liu C, Tang Q, Lou J, Luo C, Zhou X, Li D, et.al. Association Analysis of the RET Proto-Oncogene with Hirschsprung Disease in the Han Chinese Population of Southeastern China. *Biochem Genet* 2010; 48:496-503.
21. Herrington CS & McGee OD. *Diagnostic Molecular Pathology: A Practical Approach*. The Practical Approach Series. Oxford, IRL Press 1992, 93-94.

22. Borrego S, Saez M, Ruiz A, Gimm O, Lopez A & Antinolo G. Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet* 1999; 36: 771-774.
23. Fitze G, Schreiber M, Kuhlisch E, Schackert H & Roesner D. Association of RET Protooncogene Codon 45 Polymorphism with Hirschsprung Disease. *Ame J Hum Genet* 1999; 65: 1469-73.
24. Lantieri F, Griseri P, Puppo F, Campus R, Martucciello G, Ravazzolo R, et.al. Haplotypes of the Human RET Proto-oncogene Associated with Hirschsprung Disease in the Italian Population Derive from a Single Ancestral Combination of Alleles. *Ann Hum Gene* 2005; 70:12-26.
25. Sancandi M, Griseri P, Pesce B, Patrone G, Puppo F, Lerone M, et.al. Single nucleotide polymorphic alleles in the 59 region of the RET proto-oncogene define a risk haplotype in Hirschsprung's disease. *J Med Genet* 2003; 40: 714-18.
26. Carlomagno F, De Vita G, Berlingieri M, De Franciscis V, Melillo R, Colantuoni V, Kraus M, Di Fiore P, Fusco A & Santoro M. Molecular heterogeneity of RET loss of function in Hirschsprung's disease. *EMBO J* 1996; 15: 2717-25.
27. Martucciello G, Luinetti O, Romano P & Magrini U. Molekularbiologie, Grund - lagenforschung und Diagnose des Morbus Hirschsprung. *Pathologe* 2007; 28:119-124.
28. Emison E, McCallion A, Kashuk C, Bush R, Grice E, Lin S, et.al. A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature*: 2005; 434.
29. Fitze G, Appelt H, König I, Görgens H, Stein U, Walther W, et.al. Functional haplotypes of the RET proto-oncogene promoter are associated with Hirschsprung disease (HSCR). *Hum Mol Genet* 2003; 12 (24): 3207-3214.

30. Paz-y-Miño C, Witte T, Robles P, Llumipanta W, Díaz M & Arévalo M. Association among polymorphisms in the steroid 5 α -reductase type II (SRD5A2) gene, prostate cancer risk, and pathologic characteristics of prostate tumors in an Ecuadorian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 189(2): 71-6.
31. Paz-y-Miño C, López-Cortés A, Muñoz MJ. Incidence of the L858R and G719S mutations of the epidermal growth factor receptor oncogene in an Ecuadorian population with lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 196: 201-3.
32. Paz-y-Miño C, Muñoz MJ, López-Cortés A. Frequency of polymorphisms pro198leu in GPX-1 gene and ile58thr in MnSOD gene in the altitude Ecuadorian population with bladder cancer. *Oncol Res* 2010; 18: 395-400.
33. Paz-y-Miño C, Witte T, Robles P. Association among polymorphisms in the steroid 5 α -reductase type II (SRD5A2) gene, prostate cancer risk, and pathologic characteristics of prostate tumours in an Ecuadorian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 189: 71–7.
34. Paz-y-Miño C, Pérez J, Fiallo B. A polymorphism in the hMSH2 gene (gIVS12-6T-C) associated with non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 133: 29–33.
35. Paz-y-Miño C, Leone O. Three novel somatic mutations in the NF2 tumor suppressor gene (g816T>A; g1159A>G; gIVS11-1G>T). *Hum Mutat* 2000; 15: 487.
36. Paz-y-Miño C, López-Cortés A, Muñoz MJ, Castro B, Cabrera A, Sánchez ME. Relationship of a hRAD54 gene polymorphism (2290 C/T) in the altitude Ecuadorian population with chronic myelogenous leukemia. *Genet Mol Biol* 2000; 33(4): 646–9.

Tablas

Tabla 1. Secuencia de cebadores, longitud de producto amplificado y temperatura de anillamiento.

Exón / intrón	Cambio de nucleótido	Secuencia de cebadores 5'-3'	Amplicón (pb)	Temperatura anillamiento (°C)
2	c135G>A	FW: CCTTATTCTCACCATCCCTCACTC RV: CCTGGATGCAGATCCAGTTGTTCT	238	59.6
7	c1296G>A	FW: AAGGGGAGTAAAGGGTTGAGTCAG RV: TCATTCACAAACAGGATCCCGAG	474	58.3
15	c2712C>G	FW: CGTGCTATTTTTCTCACAGCTCG RV: GAGCGGAGTTCTAATTGGGTCCTT	323	61.6
Intrón 1	IVS1+1813 C>T	FW: GATAACCCGGACACCACAGT RV: TGTGGAAGAACCCTCATCCT	298	58.9

Tabla 2. Frecuencias alélicas de los polimorfismos en el gen RET, en afectos y controles.

Exón / intrón	Codón	Cambio de nucleótido	Frecuencia alélica	
			Pacientes	Controles
2	A45A	c135 G>A	G: 0.45	0.63
			A: 0.55	0.37
7	A432A	c1296 G>A	G: 0.77	0.41
			A: 0.23	0.59
15	S904S	c2712 C>G	C: 0.96	0.71
			G: 0.04	0.29
Intrón 1	-	IVS1+1813 C>T	C: 0.23	0.43
			T: 0.77	0.57

Tabla 3. Distribución genotípica de los polimorfismos del gen RET.

Polimorfismo	Genotipos	Controles (%)	Casos (%)	Odds ratio (95% IC)	p (valor)
c135G>A	GG	15 (36.59)	2 (4.88)	Referencia	
	GA	22 (53.66)	33 (80.49)	11.25 (2.34-54.13)	0.001
rs1800858	AA	4 (9.76)	6 (14.63)	11.25 (1.61-78.57)	0.027
	GG	6 (14.63)	25 (60.98)	Referencia	
c1296G>A	GA	22 (53.66)	13 (31.71)	0.142 (0.05-0.44)	0.001
	AA	13 (31.71)	3 (7.32)	0.055 (0.012-0.258)	0.00001
c2712C>G	CC	21 (51.22)	39 (95.12)	Referencia	
	CG	16 (39.02)	1 (2.44)	0.034 (0.004-0.272)	0.0001
rs1800863	GG	4 (9.76)	1 (2.44)	0.135 (0.014-1.283)	0.131
	CC	6 (14.63)	3 (7.32)	Referencia	
IVS1+1813 C>T	TC	23 (56.10)	13 (31.71)	1.130 (0.241-5.293)	1.00
	TT	12 (29.27)	25 (60.98)	4.167 (0.887-19.581)	0.132

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

Leyenda de figuras

Figura 1. Polimorfismos genéticos y microambiente intestinal
CÉLULA DE LA CRESTA NEURAL

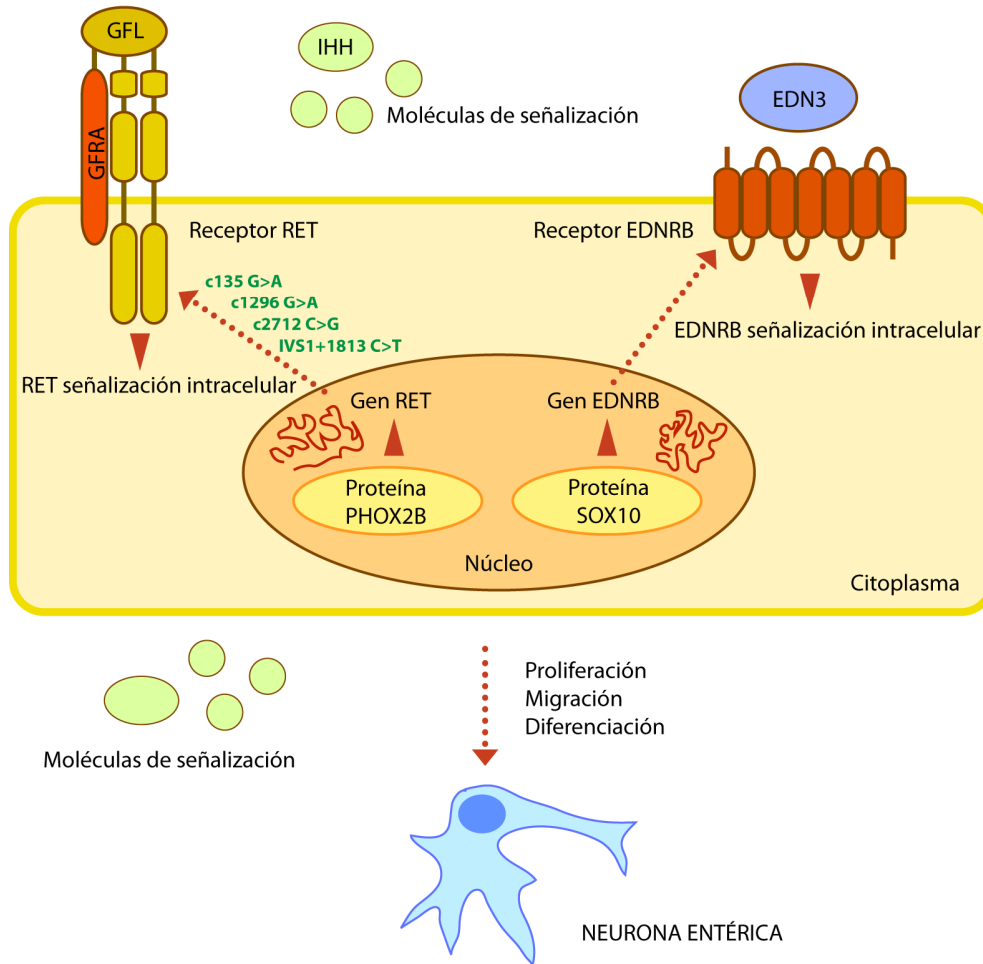


Figura 2. Genotipaje de los polimorfismos c135 G>A y c2712 C>G mediante PCR-RFLP
c135 G>A c2712 C>G

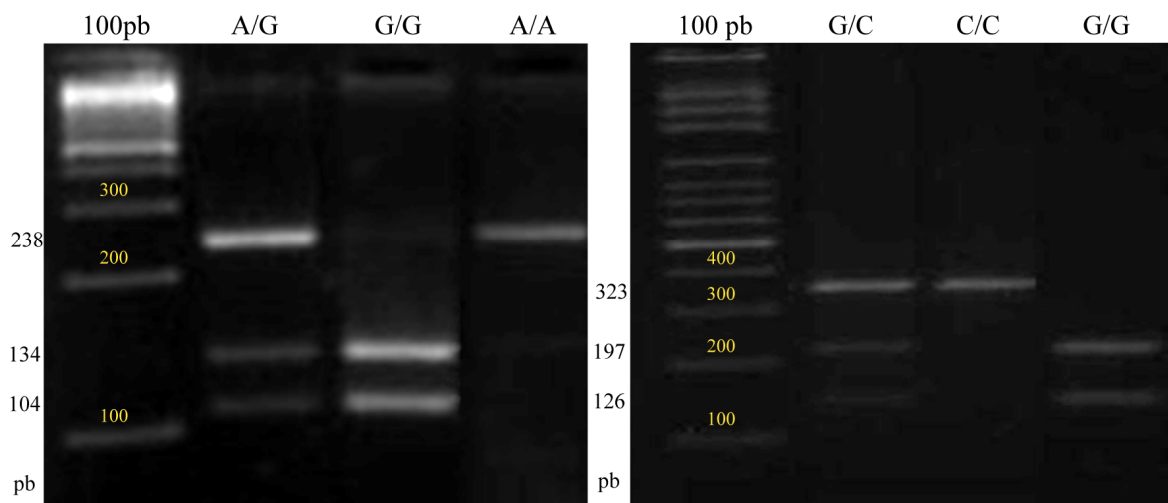
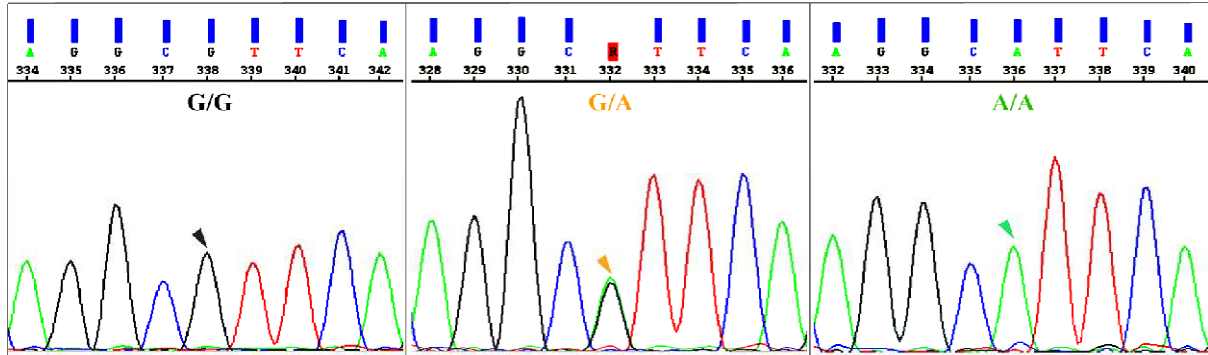


Figura 3. Genotipaje de los polimorfismos c1296 G>A y IVS1+1813 C>T mediante análisis de secuencias

c1296 G>A



IVS1+1813 C>T

