

Polimorfismo P.D1134A del gen *TJP1* en población con ancestría zapoteca; potencial marcador para cáncer de tiroides y otras neoplasias

Madrigal-Ruiz Perla, Dávalos-Rodríguez Nory Omayra, Ramirez-Garcia Sergio Alberto, Topete-González Luz Rosalba, Mazariegos-Rubi Manuel, Flores-Alvarado Luis J., Ruiz-Mejia Rosalba, Aguilar-Aldrete Ma. E., Magallanes-Ordoñez José de Jesús, Ramón-Canul Lorena Guadalupe, Siliceo-Murrieta José Isaías, Zurita-Vásquez Guilbaldo Gabriel y Cruz-Bastida Jareth Marco.

Autor para correspondencia

Dr. en C. Sergio Alberto Ramírez García, Profesor Investigador Titular B, de la Universidad de la Sierra Sur. Sistema Nacional de Investigadores Nivel C, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
Domicilio: Calle Guillermo Rojas Mijangos S/N, Esq. Av. Universidad Col. Ciudad Universitaria, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México C.P. 70800
Teléfono: 01 (951) 57 31 41 00
Contacto al correo electrónico: sergio7genetica@hotmail.com.

Palabras clave: Polaridad celular, tráfico celular, uniones estrechas, zona occludens-1.

Keywords: Cell polarity, cell traffic, tight junctions, zone occludens-1.



Polimorfismo P.D1134A del gen *TJP1* en población con ancestría zapoteca; potencial marcador para cáncer de tiroides y otras neoplasias

Grupo Multidisciplinario para el Estudio Integral de las Enfermedades Metabólicas e infecciosas en Población Mexicana. Madrigal-Ruiz P^a, Dávalos-Rodríguez NO^b, Ramírez-García SA^c, Topete-González LR^d, Mazariegos-Rubi M^e, Flores-Alvarado LJ^f, Ruiz-Mejía R^f, Aguilar-Aldrete ME^g, Magallanes-Ordoñez JJ^h, Ramón-Canul LG^c, Siliceo-Murrieta JI^c, Zurita-Vásquez GG^c, Cruz-Bastida JMⁱ

Resumen

Introducción

TJP1, gen que codifica una proteína ZO-1, se requiere para la conformación de las ocludinas y claudinas en las uniones estrechas estando implicada en la polarización celular. Cuenta con diferentes variaciones que se han estudiado en diferentes poblaciones. En México no existen estudios de este gen, siendo necesarios porque sus polimorfismos pueden ser utilizados en estudios de asociación para cáncer de tiroides u otras neoplasias. Considerando el nivel de expresión, se ha demostrado el incremento de ZO-1 en cáncer medular de tiroides; por lo cual el objetivo del trabajo fue estimar la frecuencia de los alelos y genotipos de polimorfismo rs2291166 (p.D1134A) del gen *TJP1* en población mexicana con ascendencia zapoteca.

Material y Métodos

159 individuos fueron incluidos con ancestría zapoteca. El polimorfismo fue identificado por PCR-PASA y electroforesis en PAGE 7%.

Resultados

El alelo más frecuente en las dos poblaciones es el alelo ancestral (T). Similar a otras poblaciones. El polimorfismo esta en equilibrio Hardy-Weinberg $p > 0.05$ en la población analizada.

Discusión

El SNP rs2291166 es marcador polimórfico en la población mexicana y se puede utilizar en estudios de asociación en la carcinogénesis de la tiroides.

Palabras clave: Polaridad celular, tráfico celular, uniones estrechas, zona occludens-1.

Grupo Multidisciplinario para el Estudio Integral de las Enfermedades Metabólicas e infecciosas en Población Mexicana:

Benemérita Universidad de Guadalajara

a. Programa de Doctorado de Biología Molecular en Medicina, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS).

b. Instituto de Genética Humana, Departamento de Biología Molecular y Genómica, CUCS.

e. Licenciatura en Médico Cirujano y Partero CUCS Universidad de Guadalajara.

f. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, CUCS.

g. Departamento de Salud Pública, CUCS.

Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE).

d. Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Regional Valentín Gómez Farías, Guadalajara, Jalisco.

h. Servicio de Cirugía Reconstructiva del Hospital Regional Dr. Valentín Gómez Farías, Guadalajara, Jalisco.

Sistema de Universidades Estatales de Oaxaca (SUNEO)

c. Instituto de Investigaciones sobre la Salud Pública, Universidad de la Sierra Sur, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, México.

Universidad LaSalle, Oaxaca, Oaxaca, México.

i. Licenciatura en Derecho.

Autor para correspondencia

Sergio Alberto Ramírez García, Profesor Investigador Titular B, de la Universidad de la Sierra Sur. Sistema Nacional de Investigadores Nivel C, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Calle Guillermo Rojas Mijangos S/N, Esq. Av. Universidad Col. Ciudad Universitaria, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oax., México C.P. 70800. Tel: 01 (951) 57314100. Contacto al Correo electrónico: sergio7genetica@hotmail.com.

Polymorphism P.D1134a of the TJP1 in population with Zapotec ancestry: A marker for potential thyroid cancer and other neoplasms

Abstract

Introduction.

TJP1 gene encodes protein ZO-1, that is required for the recruitment of occludins and claudins in tight junctions involved in cell polarization. It has different variations that have been studied in several populations. There are no studies regarding this gene in Mexico. It is necessary to continue investigation because its polymorphisms may be used in association studies for thyroid cancer and other neoplasms. Considering its expression level, an increase in ZO-1 has been demonstrated in thyroid medullar cancer. The objective of this study is to estimate the frequency of genotypes and alleles of polymorphism rs 2291166 (p.D1134A) in gene TJP1 among Mexican population with Zapotec ancestry.

Material and Methods.

159 individuals with Zapotec ancestry were included. The polymorphism was identified by PCR-PASA and electrophoresis PAGE 7%..

Results.

The most frequent allele in both populations was ancestral allele (T), as in other populations. The polymorphism is in Hardy-Weinberg equilibrium among the population analyzed ($p > 0.05$).

Discussion.

SNP rs2291166 is a polymorphic marker in Mexican population and it may be used in association studies regarding thyroid carcinogenesis.

Key Words: Cell polarity, cell traffic, tight junctions, zone occludens-1.

Introducción

La neoplasia maligna más común en endocrinología es el carcinoma tiroideo, ésta es poco común en las unidades de atención médica que no son de tercer nivel en la población mexicana, pero es un problema de salud pública ya que representa el 1% de todas las enfermedades malignas; con una incidencia anual de 9/100,000.¹ Como tal, el cáncer de tiroides es una enfermedad multifactorial modulada por factores genéticos así como ambientales, de los factores de riesgo ambientales destaca la deficiencia de yodo y dentro de las mutaciones genéticas destacan cambios puntuales, así como la alteración en la expresión de oncogenes como *RAS* hasta un 40% de casos y en los genes *PAX8* y *PPAR γ* .¹ Sin embargo, el componente poligénico, requiere la búsqueda de nuevos genes candidato. Se propone que los genes de claudinas y ocludinas están relacionados, ya que la pérdida del contacto célula-célula es un factor importante en la transformación maligna.

Las claudinas y las ocludinas son constituyentes de las uniones estrechas *-tight junctions-* (TJP), su regulación está alterada en una variedad de tumores malignos. De los estudios de estas proteínas, podemos destacar los de la ocludina-1 o zona occludens-1 (ZO-1), codificada por el gen *TJP1*. En este sentido, se ha reportado alteración de la arquitectura de ZO-1 por disminución de la expresión de ésta y por incremento. Para el primer caso, la desregulación de ZO-1 en colangiocarcinomas intrahepáticos y extrahepáticos, tumores de la vesícula biliar así como en neoplasias de mama con metástasis hepáticas.²⁻⁵ En el segundo caso sobreexpresión de ZO-1 en adenocarcinoma ductal

pancreático en zonas apicales, apico-laterales con proliferación ductal, así como en largas metaplasias ductales.⁴ Esto también está asociado con el estadio I-II de cáncer de colon y carcinoma de colon con metástasis hepáticas.⁶⁻⁹ También se ha descrito incremento de ZO-1 en el estroma de tumores gastrointestinales, correlaciona con el diámetro pequeño del tumor, extirpe histológica, así como con la sobrevida.¹⁰ La alta expresión de ZO-1 en cáncer pulmonar de células no pequeñas es un indicador de buen pronóstico.¹¹

Los estudios de las claudinas son limitados en el estudio de la carcinogénesis tiroidea, la claudina-1 está reducida en carcinoma medular; y la claudina-7 en carcinoma folicular y medular pobremente diferenciados; la desdiferenciación se acompaña de una reducción de la expresión de claudina-1,4,7. La expresión de la claudina-1 es un indicador pronóstico de la recurrencia de carcinomas tiroideos.¹² Hay muy pocos estudios de la variación del gen *TJP1* que codifica para ZO-1; se han reportado cuatro polimorfismos en regiones intrónicas asociados con los desórdenes de espectro autista, queratocono y respuesta a los antipsicóticos.¹³⁻¹⁵ Y un SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) que conduce a cambio de aminoácido con numero de referencia rs2291166 en población México Americana asociado con albuminuria. Esta variación es producto de la transversión T>G en el exón 23 en el cual está la secuencia para el codón 1334 que a nivel de proteína (ZO-1) se traduce en el cambio de aspartato por alanina.¹⁶ En población mexicana no hay reportes de este polimorfismo, su estudio es un reto debido a la diversidad genética que presenta donde la variación genómica de los grupos étnicos constituye la contribución significativa de este

tema, sobre todo grupos étnicos del estado de Oaxaca muy poco estudiados.

Establecer si es polimórfico un marcador, es un paso previo a un estudio de asociación para determinar si en la población mexicana y en sus diferentes grupos, un polimorfismo está presente y puede ser validado como marcador para estudios de gen candidato en diferentes enfermedades como en cáncer de tiroides así como en otras neoplasias.

Con las premisas anteriores, los objetivos del trabajo fueron establecer si la variante p.D1134A de ZO-1 (*TJP1*) es un polimorfismo en población Mexicana, así como determinar las frecuencias de alelos y genotipos, estimar el equilibrio de Hardy-Weinberg, así como comparar las frecuencias de alelos y genotipos con otras poblaciones.

Material y métodos

Diseño del estudio y selección de pacientes

El presente estudio es transversal descriptivo en el cual se incluyeron 159 probandos sanos (n=318 cromosomas), con edad entre los 25-82 años, los cuales correspondían a mestizos de la región de la Sierra Sur del Estado de Oaxaca, con ancestría zapoteca. Este trabajo forma parte del proyecto titulado: “Estudio de tamizaje poblacional para la identificación de factores de riesgo ambientales y genéticos, asociados al desarrollo de enfermedades complejas relacionadas con la nutrición en el occidente así como sur de México”, con número de registro IISSP/BAMM/03, aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad. Fue realizado acorde a la Declaración de Helsinki de 1975 y a los principios del tratado de Belmont.

Análisis estadístico

Se estimó la frecuencia alélica y genotípica por conteo directo, su distribución se evaluó al considerar las diferencias en las frecuencias observadas así como las esperadas mediante una $X^2 > 3.84$ y una $p < 0.05$. El equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) se consideró cuando las diferencias en las frecuencias genotípicas observadas y esperadas no fueron significativas, con un valor de $X^2 < 3.84$, $p > 0.05$.

Estudio molecular

De 3 ml de sangre periférica de cada probando, se aisló el DNA mediante el método de sales de Miller. La detección del polimorfismo p.D1134A fue mediante la reacción en cadena de la polimerasa alelo específico (PCR-PASA), con los iniciadores: FW1G5'-CTTCATCTTCTTCAGGTT-3', FW2A5'-ATATTCTTCATCTTCTTCAGGTG'-3, RW35'GTCATTATTATCTGTTAGG-3'.

El programa de amplificación fue: 30 ciclos, 95°C durante 5 min (desnaturalización inicial), 95°C por 30 segundos (desnaturalización), 48°C durante 45 segundos (hibridación), 72°C durante 30 segundos (polimerización), extensión final de 72°C por 5 minutos.

Mezcla de reacción. Buffer KCl 2.5 µl(1X), MgCl₂ 1.5 µl(25 mM), 0.5 µl de dNTP's (0.2 mM), 0.5 µl de cada iniciador (25 pmoles), 2 µl de templado de ADN (200 ng), DNA Pol Taq 0.3 µl (3 U/ul) (Invitrogen), y finalmente 17.20 µl de agua, reacción final 25 ml.

Electroforesis y tinción. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en poliacrilamida (PAGE) proporción 19:1 al 7%, buffer TBE 1X. Los geles de poliacrilamida se sometieron a un corrimiento electroforético de 1.5 horas a 200 volts, 80-84 mA. Los productos se diferenciaron por los tamaños, 102 pb corresponde al alelo T, 107 pb corresponde al alelo G como se observa en la figura 1. Para su visualización fueron teñidos con una solución a base nitrato de plata 0.100 g/0.5 µl de ácido acético, 1 ml etanol absoluto/100 ml de agua.

Resultados

En relación a la distribución de alelos del polimorfismo rs2291166 (p.D1134A) del gen *TJP1* (ZO-1), la frecuencia relativa (fr) en la población Mexicana con ancestría Zapoteca analizada fue la siguiente; 0.9906 (n=925) para el alelo ancestral o silvestre T y 0.0094 (n=21) para el alelo G. La distribución de genotipos fue la siguiente: 0.9812 para los homocigotos T (n=156), 0.0188 para los heterocigotos (n=3) y 0.000 para los homocigotos G (n=0). El índice de heterocigocidad promedio en la población total analizada fue de 0.99 y el de homocigocidad de 0.01. Los homocigotos G no se encontraron en la población analizada. Al comparar las frecuencias de alelos y genotipos con las otras poblaciones reportadas en el Banco de SNP, la distribución fue similar para los diferentes grupos étnicos (Tabla 1).

Al analizar la distribución de las frecuencias relativas observadas, así como compararlas con las esperadas, se encontró un valor de X^2 de 0.61, con un valor de $p > 0.05$, por lo tanto el polimorfismo rs2291166 (p.D1134A) del gen *TJP1*(ZO-1), está en equilibrio Hardy-Weinberg, muy similar a lo reportado en otras poblaciones.

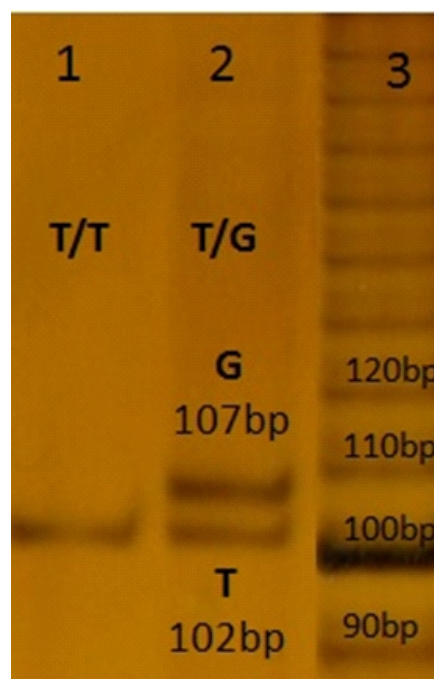


Figura 1. Electroforesis in 7% PAGE, 0.5X TBE, del SNP rs2291166 de TJP1

Tabla 1. Frecuencia de alelos y genotipos del SNP rs2291166 del gen *TJP1* en diferentes poblaciones

Población/grupo individual	Núm. Chrom.	Genotipo			Alelos	
		TT	TG	GG	T	G
Grupos en Estados Unidos de Norte America						
Resident of Utah with ancestry European	120	0.867	0.133	0.0	0.933	0.067
Resident of Utah North and East with European ancestry	226	0.885	0.115	0.0	0.942	0.058
Gujara Indians, Houston Texas	176	0.864	0.136	0.0	0.932	0.068
Europeos						
Descendants of Europeans ClinSeq project	1323	0.894	0.101	0.005	0.945	0.056
Italian Tuscan	176	0.943	0.057	0.0	0.972	0.028
Africanos						
Luhayin Webye, Kenia África	180	0.978	0.022	0.0	0.989	0.11
Masaiin Kenia	286	0.895	0.084	0.021	0.937	0.063
Yoruba, Ibadán, Nigeria, Sub-Sahara África	224	0.982	0.018	0.0	0.991	0.009
Asiáticos						
Japanese, Tokio Japan	172	0.965	0.035	0.0	0.983	0.017
Chinese in Metropolitan Denver, Colorado	168	0.917	0.083	0.0	0.958	0.042
Otras Poblaciones o grupos étnicos						
Residents Angeles with Mexican ancestry	100	0.940	0.060	0.0	0.970	0.030
Este estudio, población ancestría Zapoteca	318	0.9812	0.0188	0.0	0.9906	0.0094

Discusión

Este es el primer estudio en la población mexicana con ancestría Zapoteca que muestra la distribución de la frecuencia de alelos y genotipos del polimorfismo rs2291166 de *TJP1*. El alelo T, también los genotipos TT, TG fueron los más frecuentes, como se ha reportado en otras poblaciones del Banco de SNP (ver Cuadro 1) y en México Americanos previamente reportado por Lehman y cols.¹⁶

Cabe señalar que el genotipo GG del SNP rs2291166, que está ausente en la población analizada en este trabajo, solo ha sido reportado en una muestra amplia de más de 1000 Europeos (proyecto ClinSeq; A *Large-Scale Medical Sequencing Clinical Research Pilot Study*)(fr=0.005), en los Maasai de Kenia (fr=0.021), en población aparentemente sana de la colección AGI-ASP (fr=0.029). En residentes de los Ángeles con ancestría Mexicana, se ha reportado también una frecuencia nula para el homocigoto G, esto se puede explicar por dos hipótesis: La primera, es que la ausencia del genotipo o baja frecuencia se conservó durante el mestizaje de los nativos

Amerindios, como se ha observado para los alelos *A, *B Y *C del polimorfismo (GC) del gen para la fosfatasa ácida de eritrocitos.¹⁷ La segunda, es que la frecuencia baja o nula del homocigoto G, podría estar relacionada con una selección en contra, teniendo un efecto fenotípico severo asociado con la albuminuria que evoluciona a daño renal terminal, lo que se apoya por los estudios realizados en los México-Americanos.¹⁶

También se validó que la variante rs2291166, sí es un polimorfismo en México, ya que su distribución de genotipos está en Equilibrio de Hardy-Weinberg. Establecer este parámetro fue necesario previo a un estudio de asociación, como se ha reportado previamente.¹⁸ En este sentido, en el presente estudio, se incluyó un número mayor de 100 cromosomas como en la mayoría de los reportes del Banco de SNP's, lo que reduce de manera importante la posibilidad del sesgo por falta de verosimilitud, proporcionando certeza de los resultados del presente trabajo, lo cual permite que el marcador pueda ser usado en posteriores estudios de

asociación en diferentes tumores de origen tiroideo en población mexicana.¹⁹

Este trabajo cobra importancia desde los aspectos de la medicina legal así como para la patología y antropología forense que se encargan de la caracterización de los individuos así como grupos étnicos para su identificación legal y cultural mediante marcadores genéticos. En este sentido en grupos étnicos del Estado Oaxaca, hay pocos estudios al respecto. Se han reportado siete trabajos de 1994 a la fecha; algunos con 15 STR (*short tandem repeat*) (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, D5S818, and FGA) en indígenas de De Amuzgo, Chinanteco, Chontal, Huave, Mazateco, Mixe, Mixteco, Triqui, Zapoteco del Istmo, Zapoteco del Valle y Zoque de Oaxaca, México, sugieren que las comunidades indígenas aunque aisladas culturalmente, se pueden definir genéticamente como una gran población en los cuales la migración podría ser el mecanismo más importante de la deriva genética.²⁰ Por otra parte, en tres poblaciones amerindias de Oaxaca (Zapoteca, Mixteca and the Mixe) se examinaron variantes genéticas de los genes HLA (*Human Leukocyte Antigen region*) para cuatro loci clase II; DRB1, DQA1, DQB1, DPB1; encontrándose evidencia de desequilibrio de ligamiento fuerte de los haplotipos en toda la región HLA analizada. Existe significativa vinculación desequilibrio global excepto aquellas variantes que incluyen el locus DPB1.²¹ Los marcadores genéticos de genes del eritrocito o relacionados con su función son clásicos en los estudios antropológicos. En este sentido podemos citar tres ejemplos, las variantes del gen del polimorfismo (GC)n de la fosfatasa ácida de eritrocitos en población Oaxaqueña, la frecuencia de los alelos GC*1S, GC*1F, and GC*2 fue 0.454, 0.337 y 0.209 respectivamente. Estos resultados son similares en otras poblaciones mestizas y grupos indígenas en México, debido a que el principal componente étnico es amerindio.¹⁷ Por otra parte las mutaciones del gen para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) en los estados de la costa del pacífico (que incluye Oaxaca, Guerrero y Chiapas); las mutaciones A-(202A/376G) y A-(376G/968C) están en el 73% de casos de

anemia hemolítica, éstas se han observado también en el contexto de dos diferentes haplotipos comunes también en África, Islas Canarias y España.²² Tercero, también los marcadores analizados en los genes beta(A) y beta(S) de la hemoglobina, que revelan alta similitud a la población de la República central de África, su frecuencia sugiere orígenes distintos para los marcadores en estos genes en los individuos de la región costa Chica de México de Oaxaca.²³ Más marcadores se han estudiado en individuos de Santiago Jamiltepec, como lo son *Pst I* (insulina gen), *Nsi I* (gen del receptor de insulina) y Gly972Arg (substrato 1 del receptor de insulina gen) para analizar su impacto epidemiológico como factores de predisposición en relación a diabetes mellitus, obesidad e hipertensión.²⁴ Recientemente se ha estudiado polimorfismos en los genes TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9 en el grupo étnico Mazateco nombrado Temascal, en un área rural de la ciudad de Tuxtepec, Oaxaca, la cual tiene con alta incidencia de tuberculosis.²⁵ Y en ambos con ancestría Zapoteca de la sierra sur de México se ha estudiado la variación G>A en el locus g.37190613 del gen *ELMO1*.²⁶

Conclusiones

Se estableció la frecuencia de alelos y genotipos así como el Equilibrio Hardy-Weinberg en la Población Mexicana con ancestría Zapoteca, con respecto al polimorfismo rs2291166 del gen *TJP1* (ZO-1), por lo cual queda validado para realizar futuros estudios de asociación en el campo de carcinogénesis tiroidea. También se estableció la similitud de la distribución relativa de alelos y genotipos con otras poblaciones, asemejándose a la mayoría de las poblaciones, incluyendo los Residentes de los Ángeles con ancestría mexicana. Así también se contribuyó al campo de la antropología forense del estado de Oaxaca, al analizar un nuevo marcador genético en población con ancestría Zapoteca.

Agradecimientos

Por el Financiamiento al Grupo Multidisciplinario para el Estudio Integral de las Enfermedades Metabólicas e Infecciosas en Población Mexicana.

Referencias bibliográficas

- Gutiérrez-Hermosillo H, Tamez-Peréz HE, et al. Características clínicas del carcinoma folicular de tiroides. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2013;51(2):188-91
- Németh Z, Szász AM, Somorácz A, et al. Zonula occludens-1, occludin, and E-cadherin protein expression in biliary tract cancers. *Pathol Oncol Res* 2009;15(3):533-9.
- Erin N, Wang N, Xin P, Bui V, Weisz J, Barkan GA, et al. Altered gene expression in breast cancer liver metastases. *Int J Cancer* 2009;124(7):1503-16.
- Tian R, Wang RL, Xie H, Jin W, Yu KL. Overexpressed miRNA-155 dysregulates intestinal epithelial apical junctional complex in severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2013;19(45):8282-91.
- Kleeff J, Shi X, Bode HP, Hoover K, Shrikhande S, Bryant PJ. Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer. *Pancreas* 2001;23(3):259-65.
- Resnick MB, Konkint T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005;18(4):511-8.
- Kojima T, Sawada N. Regulation of tight junctions in human normal pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. *Ann NY Acad Sci* 2012;1257:85-92.
- Orbán E, Szabó E, Lotz G, Kupcsulik P, Páska C, Schaff Z, et al. Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors. *Pathol Oncol Res* 2008;14(3):299-306.
- Kaihara T, Kawamata H, Imura J, Fujii S, Kitajima K, Omotehara F, et al. Redifferentiation and ZO-1 reexpression in liver-metastasized colorectal cancer: possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1. *Cancer Sci* 2003;94(2):166-72.
- Zhu H, Lu J, Wang X, Zhang H, Tang X, Zhu J, Mao Y. Upregulated ZO-1 correlates with favorable survival of gastrointestinal stromal tumor. *Med Oncol* 2013;30(3):631.
- Ni S, Xu L, Huang J, Feng J, Zhu H, Wang G, et al. Increased ZO-1 expression predicts valuable prognosis in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2013 15;6(12):2887-95.
- Tzelepi VN, Tsamandas AC, Vlotinou HD, Vagianos CE, Scopa CD. Tight junctions in thyroid carcinogenesis: diverse expression of claudin-1, claudin-4, claudin-7 and occludin in thyroid neoplasms. *Mod Pathol*. 2008;21(1):22-30.
- Coon H, Villalobos ME, Robison RJ, Camp NJ, Cannon DS, Allen-Brady K, et al. Genome-wide linkage using the Social Responsiveness Scale in Utah autism pedigrees. *Mol Autism* 2010;1(1):8.
- Clark SL, Souza RP, Adkins DE, Aberg K, Bukszár J, McClay JL, et al. Genome-wide association study of patient-rated and clinician-rated global impression of severity during antipsychotic treatment. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23(2):69-77.
- Lu Y, Vitart V, Burdon KP, Khor CC, Bykhovskaya Y, Mirshahi A, et al. Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus. *Nat Genet* 2013;45(2):155-63.
- Lehman DM, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Fowler S, Almsy L et al. Evaluation of tight junction protein 1 encoding zona occludens 1 as a candidate gene for albuminuria in a Mexican American population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*

- 2006;114(8):432-7.
17. Lisker R, Ramírez E, Peñaloza R, Salamanca F. Red cell acid phosphatase types and GC polymorphisms in Mérida, Oaxaca, León, and Saltillo, Mexico. *Hum Biol* 1994;66(6):1103-1109.
 18. Topete-González LR, Ramirez-García SA, Charles-Niño C, Villa-Ruano N, Mosso-González C, Dávalos-Rodríguez NO. Polymorphism g.37190613 G>A of the ELMO1 gene in the Mexican population: potential marker for clinical-surgical pathology. *Cir Cir* 2014; 82(4):403-412.
 19. Flores-Alfaro E, Burguete-García A, Salazar-Martínez E. Diseños de Investigación en epidemiología genética. *Rev Panam Salud Pública* 2012;31(1):88-94.
 20. Quinto-Cortés CD, Arriola LA, García-Hughes G, García-López R, Molina DP, Flores M, Palacios R, Piñero D. Genetic characterization of indigenous peoples from Oaxaca, Mexico, and its relation to linguistic and geographic isolation. *Hum Biol* 2010;82(4):409-32.
 21. Hollenbach JA, Thomson G, Cao K, Fernandez-Vina M, Erlich HA, Bugawan TL, Winkler C, Winter M, Klitz W. HLA diversity, differentiation, and haplotype evolution in Mesoamerican Natives. *Hum Immunol* 2001;62(4):378-90.
 22. Arámbula E, Aguilar L JC, Vaca G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in Mexican Mestizos. *Blood Cells Mol Dis*. 2000 Aug;26(4):387-94.
 23. Magaña MT, Ongay Z, Tagle J, Bentura G, Cobián JG, Perea FJ, Casas-Castañeda M, Sánchez-López YJ, Ibarra B. Analysis of betaS and betaA genes in a Mexican population with African roots. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28(2):121-6.
 24. Flores-Martínez SE, Islas-Andrade S, Machorro-Lazo MV, Revilla MC, Juárez RE, Mújica-López KI, Morán-Moguel MC, López-Cardona MG, Sánchez-Corona J. DNA polymorphism analysis of candidate genes for type 2 diabetes mellitus in a Mexican ethnic group. *Ann Genet* 2004;47(4):339-48.
 25. Torres-García D, Cruz-Lagunas A, García-Sancho Figueroa MC, Fernández-Plata R, Baez-Saldaña R, Mendoza-Milla C, Barquera R, Carrera-Eusebio A, Ramírez-Bravo S, Campos L, Angeles J, Vargas-Alarcón G, Granados J, Gopal R, Khader SA, Yunis EJ, Zuñiga J. Variants in toll-like receptor 9 gene influence susceptibility to tuberculosis in a Mexican population. *J Transl Med* 2013;11:220.