

Nueva mutación en el gen *TSC2* protege contra el cáncer colorrectal en población mexicana

Christian O. González-Villaseñor,¹ Angélica A. Ramírez-Guerrero,¹ José M. Moreno-Ortiz,²
Evelia Leal-Ugarte,³ Valeria Peralta-Leal³ y Nelly M. Macías-Gómez^{1*}

¹Laboratorio de Genética Humana, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Jalisco; ²Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Jalisco; ³Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Tamaulipas. México

Resumen

Introducción: El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad compleja debido al gran número de factores que influyen en su desarrollo, incluyendo variantes en genes supresores de tumores. **Objetivo:** Estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes c.3915G>A y c.5371G>A del gen *TSC2* en una población mexicana con CCR, así como analizar la asociación con el desarrollo de CCR. **Métodos:** Se incluyeron 126 muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de CCR esporádico y 134 de individuos sanos, considerados como grupo de control. La identificación de los genotipos se llevó a cabo mediante PCR tradicional y digestión enzimática. Todos los individuos firmaron una carta de consentimiento informado. **Resultados:** El alelo A de la variante c.3915G>A ($RM = 0.31$, IC 95 % = 0.15-0.69, $p = 0.004$), así como el haplotipo A/G de las variantes c.3915G>A y c.5371G>A ($RM = 0.28$, IC 95 % = 0.12-0.68, $p = 0.005$) mostraron un posible efecto protector contra CCR esporádico. El análisis *in silico* indicó que ambas variantes generan modificaciones en el proceso de corte y empalme. **Conclusión:** La presencia de la variante c.3915G>A del gen *TSC2* sugiere un posible efecto protector contra CCR esporádico en población mexicana; sin embargo, no se observó esta asociación con la variante c.5371G>A.

PALABRAS CLAVE: Cáncer colorrectal. Complejo esclerosis tuberosa 2. Gen *TSC2*. Genes supresores de tumores.

A novel mutation in the TSC2 gene protects against colorectal cancer in the Mexican population

Abstract

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is a complex disease due to the large number of factors that influence its development, including variants in tumor suppressor genes. **Objective:** To estimate allelic and genotypic frequencies of c.3915G>A and c.5371G>A variants of the *TSC2* gene in a Mexican population with CRC, as well as to analyze their association with the development of CRC. **Methods:** 126 peripheral blood samples from patients diagnosed with sporadic CRC and 134 from healthy individuals, regarded as the control group, were included. Identification of genotypes was carried out using traditional PCR and enzymatic digestion. All individuals signed an informed consent letter. **Results:** The A allele of the c.3915G>A variant ($OR = 0.31$, 95% CI = 0.15-0.69, $p = 0.004$), as well as A/G haplotype of the c.3915G>A and c.5371G>A variants ($OR = 0.28$, 95% CI = 0.12-0.68, $p = 0.005$) showed a possible protective effect against sporadic CRC. **In silico** analysis indicated that both

Correspondencia:

*Nelly M. Macías-Gómez

E-mail: nellymacias_2000@yahoo.com.mx

0016-3813/© 2022 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 02-02-2022

Fecha de aceptación: 29-04-2022

DOI: 10.24875/GMM.22000037

Gac Med Mex. 2022;158:293-298

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

variants generate modifications in the splicing process. Conclusion: The presence of TSC2 gene c.3915G>A variant suggests a possible protective effect against sporadic CRC in the Mexican population; however, no association was observed with the c.5371G>A variant.

KEYWORDS: Colorectal cancer. Tuberous sclerosis complex 2. TSC2 gene. Tumor suppressor genes.

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad compleja en cuyo desarrollo intervienen factores genéticos y ambientales, así como la evolución propia de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.¹ El CCR es el cuarto cáncer más común en todo el mundo y la tercera causa de muerte por cáncer.² De acuerdo con el modelo de Vogelstein, el desarrollo del CCR se inicia con la adquisición de una mutación “driver” en alguno de los oncogenes o genes supresores de tumores.³

Recientemente se han identificado variantes involucradas en el desarrollo del cáncer en el gen supresor de tumor TSC2, el cual regula el crecimiento y la proliferación celular mediante la inactivación de la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa que inhibe al complejo mTOR (*mammalian target of rapamycin*).⁴ TSC2 forma un heterodímero con TSC1 y ambos han sido estudiados como reguladores del crecimiento tumoral en pacientes con esclerosis tuberosa, caracterizada por la presencia de tumores benignos en piel, cerebro, riñón, pulmón, retina y corazón.^{5,6} Se ha descrito una asociación de variantes del complejo TSC1/TSC2 con el desarrollo de cáncer, incluido el CCR.^{7,8}

En este trabajo determinamos las frecuencias alélicas y genotípicas de dos variantes de TSC2 recientemente incluidas en Catalogue of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC):

- c.3915G>A (COSV51911975), ubicada en el exón 33, involucra un nucleótido no conservado y se ha relacionado con meningioma y CCR.
- c.5371G>A (COSV51913362), en la que se reemplaza el aminoácido glicina con un residuo de serina (variante AA = p.G1791S) y cuyo significado es incierto.^{9,10} Posteriormente exploraremos su posible asociación con el desarrollo de CCR en población mexicana.

Métodos

Muestras y diseño del estudio

Se incluyeron muestras de ADN extraído de sangre periférica de 126 pacientes con diagnóstico de CCR

esporádico y 134 de sujetos sanos sin historia familiar de cáncer, obtenidas de un banco de sangre. Se incluyeron pacientes con CCR esporádico, de ambos sexos, con edad de 18 a 80 años, sin metástasis y sin características clínicas de esclerosis tuberosa. Los pacientes fueron captados en el Hospital Alfredo Pumarejo (Matamoros, Tamaulipas, México) durante 2017 y 2018. Las muestras del grupo de control fueron obtenidas del área clínica del Centro Universitario del Sur en Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

Extracción del ADN y PCR-RFLP

El ADN se extrajo a partir de 5 mL de sangre periférica mediante el método de Miller.¹¹ La pureza y la cuantificación del ADN se analizaron con un equipo NanoDrop ONE™ (Thermo Fisher Scientific). Las variantes alélicas se identificaron mediante el método PCR-RFLP tradicional. El diseño de los iniciadores utilizados para la amplificación de los fragmentos de las variantes se realizó con el programa Primer-Blast (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Estados Unidos).¹² Los fragmentos amplificados fueron de 215 pares de bases en la variante c.3915G>A, para lo cual se usó el iniciador sentido 5' AGGAGAAGGCTG GTTCTCG 3' y el iniciador antisentido 5' GCCTACAGCAGGGTGAGTGT 3'. En la variante c.5371G>A, el fragmento amplificado fue de 111 pares de bases con la utilización del iniciador sentido 5' CCCTCCGTCCCATAGCAAA 3' y del iniciador antisentido 5' GTGGAGGACTTCACCGAGTT 3'. Los fragmentos amplificados fueron digeridos con las enzimas Hpall y Haelli, respectivamente, de acuerdo con el programa NEBcutter V2.0 (New England Biolabs).¹³ En ambos casos, las enzimas reconocieron el alelo silvestre y la digestión se realizó a 37 °C en un plazo de 16 a 24 horas, con una inactivación a 80 °C por 20 minutos. Los fragmentos de digestión fueron observados mediante geles de poliacrilamida y AgNO₃ (Figura 1).

Análisis estadístico e in silico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 25 (IBM Corp., Armonk, New York,

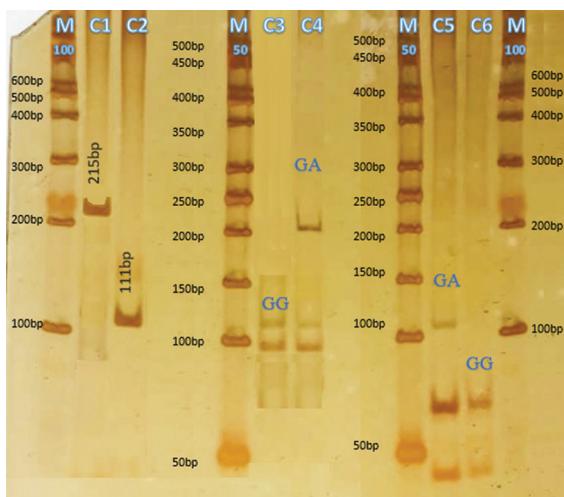


Figura 1. Electroforesis de los productos de PCR y digestión enzimática en gel de poliacrilamida a 6 % teñido con AgNO_3 . M100 se refiere al uso de un marcador de pares de bases (pb) y cada fragmento visible equivale a 100 pb; se aprecian fragmentos desde 100 pb hasta 600 pb. M50 se refiere al uso de un marcador de pb y cada fragmento visible equivale a 50 pb; se aprecian fragmentos desde 50 bp hasta 500 bp. C1 muestra el fragmento amplificado de c.3915G>A. C2 muestra el fragmento amplificado de c.5371G>A. C3 y C4 indican los fragmentos digeridos de c.3915G>A con el genotipo encontrado. C5 y C6 indican los fragmentos digeridos de c.5371G>A con el genotipo encontrado. Para evitar un error en la metodología ocasionado por una posible digestión parcial, se utilizó el fago lambda al no encontrar el genotipo AA, con lo cual se pudo verificar que efectivamente la digestión fue correcta y el genotipo no estaba presente en la población analizada.

Estados Unidos). Se estableció la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de las dos variantes, que se compararon entre grupos mediante prueba de chi cuadrada. Se realizaron cuatro modelos de herencia (codominante, dominante, sobredominante y recesivo) y se calcularon las razones de momios (RM) y los intervalos de confianza de 95 % (IC 95 %) correspondientes para medir las asociaciones. El análisis de haplotipos se efectuó con el programa Arlequin ver 3.5.2.2 (Genetics Software, Berna, Suiza).¹⁴ El criterio de significación estadística fue $p < 0.05$. Para cada variante se realizó un análisis predictivo *in silico* con el programa Human Splicing Finder (Genomnis SAS, Marsella, Francia).¹⁵

Aprobación ética

El estudio fue aprobado por el comité de ética local del Centro Universitario del Sur (número 05-2010-1-853) de acuerdo con la Declaración de Helsinki y las guías nacionales de la Ley General de Salud de México en Materia de Investigación en Salud, título segundo,

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes con cáncer colorrectal y de los sujetos del grupo de control

Variable	Con cáncer colorrectal (n = 126)		Grupo de control* (n = 134)	
	Media ± DE		Media ± DE	
Edad en años	58.9 ± 9.2		40.6 ± 10.1	
	n	%	n	%
Mujeres	52	41.3	55	41.0
Hombres	74	58.7	79	59.0

*Sujetos sanos. DE: desviación estándar.

artículo 17, además de los artículos 13 a 21 (publicada el 22 de junio de 2017 en el Diario Oficial de la Federación).

Resultados

La muestra total estuvo integrada por 153 varones (59 %) y 107 mujeres (41 %), la edad promedio fue de 59.4 ± 7.2 años en el grupo con CCR y de 40.6 ± 10.4 en el grupo de control (Tabla 1); ambos grupos fueron pareados por sexo, pero no por edad. Las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes c.3915G>A y c.5371G>A, así como los modelos de herencia se describen en la Tabla 2. En los modelos codominante y sobredominante de la variante c.3915G>A se observó que el genotipo GA muestra una disminución del riesgo de CCR en comparación con el grupo de control (RM = 0.29, IC 95 % = 0.13-0.64, $p = 0.002$), al igual que el alelo A (RM = 0.31, IC 95 % = 0.15- 0.69, $p = 0.004$). Es importante resaltar que el genotipo AA de esta variante no se observó en ningún grupo. Respecto a la variante c.5371G>A no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Las distribuciones genotípicas de las dos variantes examinadas en este estudio estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$, datos no mostrados).

De acuerdo con el análisis de haplotipos (Tabla 3), el haplotipo A/G, en el orden c.3915G>A/c.5371G>A, mostró un posible efecto protector contra CCR (RM = 0.28, IC 95% = 0.12-0.68, $p = 0.005$).

Finalmente, el análisis *in silico* mostró que la variante c.3915G>A crea un sitio silenciador de empalme exónico, lo que puede generar una modificación en el empalme alternativo, con el resultado de una proteína trunca o fácilmente degradable, lo cual probablemente altera su funcionalidad. Por otro lado, la presencia del alelo A de c.5371G>A activa un sitio

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes c.3915G>A y c.5371G>A del gen TSC2 en pacientes con cáncer colorrectal y en los sujetos del grupo de control, conforme a cuatro modelos de herencia

	Modelo de herencia	Alelos	CCR (n = 126)		Grupo de control* (n = 132)		RM	IC 95 %	p
			n	%	n	%			
c. 3915G > A	Codominante	GG	117	92.9	106	79.1	1	Referencia	-
		GA	9	7.1	28	20.9	0.29	0.13-0.64	0.002
		AA	0	0	0	0	0.9	0.02-46.08	0.960
	Dominante	GG	117	92.9	106	79.1	1	Referencia	-
		GA + AA	9	7.1	28	20.9	0.29	0.13-0.64	0.002
	Recesivo	GG + GA	126	100	134	100	1	Referencia	-
		AA	0	0	0	0	1.06	0.02-53.99	0.976
	Sobredominante	GG + AA	117	92.9	106	79.1	1	Referencia	-
		GA	9	7.1	28	20.9	0.29	0.13-0.64	0.002
		G	243	96.4	240	89.5	1	Referencia	-
		A	9	3.6	28	10.5	0.31	0.15-0.69	0.004
c. 5371G > A	Codominante	GG	117	95.9	117	95.9	1	Referencia	-
		GA	5	4.1	5	4.1	1.0	0.28-3.55	1.000
		AA	0	0	0	0	1.0	0.02-50.82	1.000
	Dominante	GG	117	95.9	117	95.9	1	Referencia	-
		GA + AA	5	4.1	5	4.1	1.0	0.28-3.55	1.000
	Recesivo	GG + GA	126	100	134	100	1	Referencia	-
		AA	0	0	0	0	1.0	0.02-53.99	0.976
	Sobredominante	GG + AA	117	95.9	117	95.9	1	Referencia	-
		GA	5	4.1	5	4.1	1.0	0.28-3.55	1.000
		G	239	97.9	239	97.9	1	Referencia	-
		A	5	2.1	5	2.1	1.0	0.29-3.49	1.000

*Sujetos sanos.

Las variables fueron comparadas con la prueba de chi cuadrada. Se tomó en cuenta como valor de referencia el genotipo y el alelo más frecuente de cada variante. Los valores en negritas indican los datos estadísticamente significativos. Se consideró una p < 0.05.

CCR: cáncer colorrectal; IC 95 %: intervalo de confianza de 95 %; RM: razón de momios.

Tabla 3. Análisis de haplotipos de las variantes c.3915G>A y c.5371G>A del gen TSC2 en muestras de pacientes con cáncer colorrectal y grupo de control

Haplótipo c. 3915G>A/c. 5371G>A	CCR (n = 100)	Grupo de control* (n = 107)	RM	IC 95 %	p
G/G	0.944	0.867	1	Referencia	-
G/A	0.016	0.016	0.98	0.19-4.91	0.979
A/G	0.036	0.114	0.28	0.12-0.68	0.005**
A/A	0.004	0.003	0.98	0.06-15.77	0.988

Las variables fueron comparadas con la prueba de chi cuadrada. *Sujetos sanos.

**Representa una diferencia significativa entre los pacientes con CCR y los individuos del grupo de control (p < 0.05).

CCR: cáncer colorrectal; IC 95 %: intervalo de confianza de 95 %; RM: razón de momios.

aceptor críptico exónico y un sitio donante críptico exónico, que también pueden ocasionar modificaciones del corte y el empalme (Tabla 4).

Discusión

Las variantes en el heterodímero TSC1/TSC2 están asociadas a esclerosis tuberosa; estudios recientes han sugerido que TSC2 es un regulador celular negativo importante de la vía de señalización mTOR, que participa en procesos asociados al desarrollo de tumores.¹⁶

En el presente estudio, las frecuencias genotípicas de la variante c.3915G>A en el grupo de control son

Tabla 4. Análisis *in silico* de variantes del gen *TSC2* humano

	Variante c.3915G>A	Variante c.5371G>A	
Posición	16:2083816-2083729: +	16:2088547-2088560: +	16:2088551-2088559: +
Secuencia	AGGGAAAGTCCGGGC	CTATGAGGTGGGCC	GAGGTGGGC
Localización y cambio de nucleótido	16 2083726 g/a	16 2088557 g/a	16 2088557 g/a
Señal	Nuevo aceptor del sitio de empalme.	Nuevo aceptor del sitio de empalme.	Nuevo donador del sitio de empalme.
Variación	44.66 > 72.53 (62.4 %)	38.78 > 66.65 (71.87 %)	6.32 > 8.7 (37.66 %)
Puntuación	72	66	8
Fuerza	Débil	Débil	Media
Interpretación	— Activación de un sitio aceptor críptico exónico. — Alteración potencial del corte y empalme.	— Activación de un sitio aceptor críptico exónico. — Alteración potencial del corte y empalme	— Activación de un sitio donador críptico exónico. — Alteración potencial del corte y empalme.

diferentes a las reportadas en la base de datos HapMap (mapa de haplotipos) y en el Proyecto 1000 Genomas, en mexicanos de Los Ángeles ($G = 0.959$ y $A = 0.041$), caucásico-estadounidenses ($G = 0.94$ y $A = 0.006$) y poblaciones europeas ($G = 0.998$ y $A = 0.002$). Sin embargo, fueron más cercanas a las encontradas en población luhya de Kenia ($G = 0.867$ y $A = 0.133$). Estas cifras pueden explicarse debido al alto mestizaje de la población indígena mexicana con los aproximadamente 250 000 africanos traídos en los tiempos de la Colonia; Kenia fue uno de los lugares de procedencia. Actualmente existen dos millones de afrodescendientes en México y es de estimar que un gran porcentaje de individuos no reconocidos como afrodescendientes posean características genotípicas africanas.^{17,18} Respecto a c.5371G>A, la frecuencia genotípica del alelo G fue de 0.979 y la del alelo A de 0.021 en el grupo de control; el alelo A estuvo ausente en los pacientes con cáncer colorrectal.¹⁹⁻²²

Como lo muestra el análisis *in silico*, la activación de un sitio aceptor críptico de la variante c.3915G>A parece modificar tanto la secuencia intrónica como el proceso de empalme, lo que puede traducirse en diferentes modificaciones del empalme, como los silenciadores de empalme exónico, los cuales regulan el empalme alternativo, con lo que se producen dos o más isoproteínas con funciones distintas.²³ De acuerdo con nuestros resultados, sugerimos que la presencia del alelo A de la variante c.3915G>A favorece el empalme del ARNm que se traduce en una ventaja proteica. Los estudios funcionales podrían ayudar a

determinar si esta variante tiene un efecto sobre la síntesis o expresión de la proteína.^{22,24-26} Por otro lado, el alelo A de la variante c.3915G>A se observó únicamente en heterocigosis y con una frecuencia muy baja en ambos grupos, lo que sugiere un posible efecto protector contra el desarrollo de CCR ($p = 0.004$). Sin embargo, debido a que no existen reportes previos al respecto, será necesario confirmar estos datos, principalmente en tejido tumoral, así como su posible relación con variantes en el gen APC.

La variante c.5371G>A ha sido previamente identificada en forma heterocigota en muestras de tejido de melanoma maligno.²⁶ Hasta el momento, nuestro estudio es el primero en reportar las frecuencias genotípicas de la variante en población sana, así como en pacientes con CCR; observamos que en la mayoría de los sujetos del grupo de control se encontró de manera heterocigota y que estuvo ausente el genotipo homocigoto en el alelo A, tanto en el grupo de control como en los pacientes con CCR.

La variante sin sentido c.5371G>A genera el cambio de la glicina a serina y se encuentra justo al final de TSC2, muy cerca del gen PDK1. Los resultados del análisis *in silico* mostraron que el alelo A activó un sitio donante críptico exónico con un efecto potencial sobre el empalme. Debido a que el genotipo GA se observó en solo cinco pacientes (4.1 %) con CCR y en cinco individuos del grupo de control (4.1 %), no fue posible estimar su efecto sobre el desarrollo de CCR, lo cual resultó ser una limitación del estudio. Posiblemente, el seguimiento de la enfermedad en los individuos con

presencia del genotipo GA pudiera proporcionar más información respecto al impacto de la variante en la evolución del CCR.²⁶ Finalmente, se observó que el haplotipo A/G de las variantes c.3915G>A y c.5371G>A, respectivamente, tiene un posible efecto protector en la población con CCR; por lo que podemos concluir que el haplotipo con los alelos ancestrales no brinda protección ni reduce el riesgo de CCR.

Conclusiones

El presente estudio muestra que el alelo A de la variante c.3915G>A de *TSC2* tiene un posible efecto protector contra CCR, al igual que el haplotipo A/G de las variantes c.3915G>A y c.5371G>A. Sin embargo, debido al tamaño muestral, será necesario realizar más estudios en una población mayor de las mismas regiones geográficas para obtener resultados con una fuerza estadística más robusta, ya que la comparación de sujetos de poblaciones distintas (en los casos o en los sujetos de control) podría derivar en conclusiones incorrectas. Asimismo, el análisis *in silico* señala que la presencia de las variantes puede implicar una modificación del proceso de corte y empalme que cambie la expresión de la proteína en pacientes con CCR.

Agradecimientos

Los autores agradecen al doctor Horacio Rivera por su apoyo y revisión crítica del manuscrito, así como a la doctora Ana Rebeca Jaloma Cruz y al estudiante de doctorado Irving Jair Lara Navarro, por su apoyo en los procedimientos metodológicos.

Financiamiento

Christian Octavio González Villaseñor recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para la realización del doctorado.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no realizaron experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Bibliografía

1. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15065.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-249.
3. Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, Kern S, Preisinger A, Leppert M et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319:525-532.
4. Dibble C, Cantley L. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol.* 2015;25:545-555.
5. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The genecards suite: From Gene Data Mining to disease genome sequence analyses. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2016;54:1.30.1-1.30.33.
6. Xu L, Sterner C, Maheshwar M, Wilson P, Nellist M, Short P, et al. Alternative splicing of the tuberous sclerosis 2 (*TSC2*) gene in human and mouse tissues. *Genomics.* 1995;27:475-480.
7. Yang P, Cornejo K, Sadow P, Cheng L, Wang M, Xiao Y, et al. Renal cell carcinoma in tuberous sclerosis complex. *Am J Surg Pathol.* 2014;38:895-909.
8. Ho D, Chan L, Chiu Y, Xu I, Poon R, Cheung T, et al. *TSC1/2* mutations define a molecular subset of HCC with aggressive behaviour and treatment implication. *Gut.* 2016;66:1496-1506.
9. Tate J, Bamford S, Jubb H, Sondka Z, Beare D, Bindal N, et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D941-D947.
10. Howe K, Achuthan P, Allen J, Allen J, Álvarez-Jarreta J, Amode M, et al. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res.* 2020;49:D884-D891.
11. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215-1215.
12. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13.
13. Vincze T, Posfai J, Roberts R. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3688-3691.
14. Excoffier L, Lischer H. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10:564-567.
15. Desmet F, Hamrou D, Lalande M, Collod-Béroud G, Claustrès M, Béroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e67.
16. Salido-Vallejo R, Garnacho-Saucedo G, Vélez A. Bases moleculares y aplicaciones farmacológicas de la vía de mTOR en dermatología. *Act Dermo Sifiliogr.* 2016;107:379-390.
17. Bryc K, Velez C, Karafet T, Moreno-Estrada A, Reynolds A, Auton A, et al. Colloquium paper: genome-wide patterns of population structure and admixture among Hispanic/Latino populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:8954-8961.
18. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Censo de población y vivienda 2020. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía; 2020.
19. Sherry S, Ward M, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigelski E, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:308-311.
20. The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426:789-796.
21. Auton A, Abecasis G, Altshuler D, Durbin R, Abecasis G, Bentley D, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526:68-74.
22. Landrum M, Lee J, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2017;46:D1062-D1067.
23. Mort M, Sterne-Weiler T, Li B, Ball E, Cooper D, Radivojac P, et al. MutPred Splice: machine learning-based prediction of exonic variants that disrupt splicing. *Genome Biol.* 2014;15:R19.
24. Goren A, Ram O, Amit M, Keren H, Lev-Maor G, Vig I, et al. Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences—The complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell.* 2006;22:769-781.
25. Cai X, Pacheco-Rodríguez G, Fan Q-Y, Haughey M, Samsel L, El-Chehaimy S, et al. Phenotypic characterization of disseminated cells with *TSC2* loss of heterozygosity in patients with lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:1410-1418.
26. Berger M, Hodis E, Heffernan T, Deribe Y, Lawrence M, Protopopov A, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature.* 2012;485:502-506.