

VI. Estudios moleculares del cáncer de colon en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

Arturo Panduro, Guadalupe Lima, Jorge Meléndez, Gustavo Cabrera, Laura del Bosque, Luis Morales, Arturo Santos, J. Jesús Villalobos.

Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", Vasco de Quiroga No. 15, C.P. 14000

(Recibido, diciembre 15, 1992; aceptado, febrero 2, 1993)

Resumen

En la última década se detectó un aumento en la incidencia y en la tasa de mortalidad por cáncer gastrointestinal en nuestro país. De éstos, el cáncer de colon ocupa uno de los primeros lugares. A pesar de los avances en el campo de la medicina, no se ha podido modificar la sobrevida y pronóstico de estos pacientes, por lo que todos los estudios encaminados al diagnóstico temprano, así como a terapias alternativas, son de particular interés. Los factores hereditarios juegan un papel muy importante en la génesis del cáncer de colon, por ejemplo; la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) es un padecimiento autosómico dominante en el cual se presentan, a edad temprana, cientos a miles de pólipos adenomatosos, mismos que progresan de manera inevitable a cáncer. Por lo que, al realizar el diagnóstico por colonoscopías seriadas, es necesario efectuar una colectomía total. Con el objeto de hacer el diagnóstico principalmente en pacientes presintomáticos, se analizan varios fragmentos polimórficos generados por enzimas de restricción (RFLPs), los cuales tienen una unión estrecha al gen de la PAF mutado. Al realizar el diagnóstico con este tipo de estudios, se evitan los procedimientos invasivos. Recientemente, se logró localizar y secuenciar el gen de la PAF (APC), de tal manera que se puede detectar específicamente la presencia y localización de las mutaciones puntuales del mismo, en pacientes con dicha alteración. Más interesante aún es el descubrimiento de que mutaciones de este gen se detectan también en el cáncer esporádico, lo cual hace suponer un denominador común en la etiología del cáncer de colon. En nuestro laboratorio estamos realizando estudios de RFLPs para hacer el diagnóstico presintomático de este padecimiento. Otro de nuestros objetivos es detectar directamente las alteraciones estructurales del gen APC en pacientes afectados, primero con el método de RNasa y posteriormente por secuenciación. Lo anterior nos permitirá realizar el diagnóstico de certeza, así como para estudiar la patogénesis del cáncer colorectal a través de protocolos de investigación específicos.

Palabras clave: Cáncer-Poliposis adenomatosa familiar

Summary

In Mexico, an increase in the incidence and mortality caused by gastrointestinal cancers has been detected. Of these, the colonic cancer occupies one of the first places. Despite all the advances in medical knowledge, the prognostic for these patients is the same as years ago; therefore, the research in early diagnosis and alternative therapies is very important. Hereditary factors play an important role in the etiology of colonic cancer. The Adenomatous Polyposis Coli Syndrome (APC) is a dominant autosomic disease in which hundreds to thousands of adenomatous polyps emerge from the colon and progress to cancer. Once the diagnosis is made (by colonoscopic studies), it is imperative to perform a total colectomy. In order to make an earlier diagnosis, particularly in presymptomatic patients, researchers have found several restriction fragment length polymorphisms (RFLPs, with a very close relationship to the mutated APC gene, so that the diagnosis can be made avoiding invasive procedures. Recently, localization and sequencing of the APC gene has been achieved. This information enables to detect the presence and localization of point mutations or other structural alterations of the APC gene in patients with this pathology. Furthermore, the discovery of structural alterations of this gene in sporadic colon cancer suggests that colon cancers, either hereditary or sporadic, have a common etiological factor. In our laboratory we are studying specific RFLPs to reach presymptomatic diagnoses of this disease. We are also analyzing structural alterations of the APC gene in affected patients. For these studies we performed first the RNase protection assay, and then the sequence analysis of the altered gene fragment. These studies will enable us to make specific diagnoses and to study the pathogenesis of colonic cancer through specific research protocols.

Key words: Cancer-Adenomatous polyposis-syndrome

En México, la tasa de mortalidad en todos los grupos de edad por enfermedades infecto-contagiosas ha disminuido considerablemente en los últimos 20 años¹. Por el contrario, se ha detectado un aumento en la

incidencia y en la tasa de mortalidad por las enfermedades crónico degenerativas, entre las que se incluye el cáncer de estómago y de colon^{1, 2}. Existen varios factores que pueden explicar lo anterior: mayor

acceso a los servicios de salud, mejores diagnósticos, aumento de información demográfica, cambios en los patrones culturales, así como los factores ambientales y dietéticos. De las enfermedades malignas del aparato digestivo, el cáncer de estómago y de colon ocupan los primeros lugares tanto en nuestro país como en otros países^{1,3}.

El CA de colon tiene una máxima incidencia en la sexta o séptima década de la vida y, con excepción de los síndromes hereditarios, es poco frecuente en pacientes menores de 40 años de edad⁴. En los últimos 30 años no se ha modificado la sobrevida de estos pacientes. Si bien se han utilizado diferentes estrategias quirúrgicas, cerca del 60% de los pacientes mueren en los primeros cinco años^{5,6}. Lo anterior nos indica la importancia del diagnóstico temprano así como del estudio de terapias alternativas tales como la terapia génica. No obstante, para poder hacer el diagnóstico molecular y llegar a la terapia génica es importante tener un mejor conocimiento de los factores etiológicos y, por lo tanto, de los mecanismos moleculares que conducen a la enfermedad.

Respecto a los factores etiológicos más estudiados del cáncer de colon están los dietéticos; básicamente regímenes ricos en grasas animales y bajos en fibras^{7,8}. Por otro lado, los factores hereditarios juegan un papel muy importante. Aproximadamente el 10% del total de los pacientes con cáncer de colon tienen un factor hereditario primario como agente etiológico⁹. Sin embargo, cuando se hace una historia clínica orientada al problema, se ha observado que en los Estados Unidos hasta un 50% de estos enfermos tienen por lo menos un pariente de primer grado con cáncer, mientras que en Francia esta incidencia es del 35 al 40%¹¹. Desafortunadamente, esta información no existe en nuestro país.

De los diversos síndromes hereditarios y familiares con alto riesgo para desarrollar cáncer se incluye al cáncer colorectal sin poliposis hereditaria, el cual Henry Lynch ha clasificado clínicamente como síndrome de Lynch I y síndrome de Lynch II¹². Otros síndromes hereditarios son la poliposis adenomatosa familiar¹³ y los síndromes de Gardner y de Turcot¹⁴. Asimismo, entre los síndromes hereditarios con un bajo riesgo para desarrollar cáncer están las poliposis hamartomatosas, el síndrome de Peutz Jeghers y la poliposis juvenil familiar¹⁵. También existe un grupo representado por aquellos pacientes que desarrollan pólipos adenomatosos aislados y carcinoma colorectal en edad avanzada. En estos últimos se sugiere que tienen un origen genético con un patrón autosómico

dominante^{16,17,18}.

Otro tipo de cáncer hereditario es el cáncer familiar, en el cual los familiares suelen estar afectados con cáncer en otro u otros órganos. Se supone que en este padecimiento los agentes etiológicos pueden ser factores genéticos primarios, o bien factores ambientales o una mezcla de ambos. Sin embargo, la mayoría de los investigadores definen al cáncer de colon familiar como un padecimiento en donde dos o más parientes de primer grado tienen cáncer de colon^{9,10,12}.

Si bien hasta el 50% de los cánceres de colon tienen un factor hereditario predisponente, no se puede descartar que el cáncer de colon esporádico tenga la misma alteración genética a nivel molecular, originada ésta por agentes químicos (dietéticos), físicos o infecciosos (virus). Por ejemplo, en 1985 se identificó por primera vez el gen de la poliposis familiar en el brazo largo del cromosoma 5 en seres humanos^{19,20}. Por medio de estudios de **hibridación in situ**, citogenéticos y por el análisis de fragmentos polimórficos generados con enzimas de restricción se demostró que el gen de la poliposis familiar está alterado en los pacientes que tienen esta enfermedad¹⁹⁻²⁵. Sin embargo, en otros estudios el mismo gen se encuentra alterado hasta en un 60% de pacientes con cáncer de colon no hereditario²⁶⁻²⁹. Esto trae a consideración dos aspectos importantes. Primero, que los pacientes que heredan el gen alterado desarrollarán cáncer de colon en una predeterminada etapa de la vida, mientras que en el resto de los pacientes o bien sufrieron mutaciones espontáneas del mismo gen, o éste altera su expresión o estructura debido a factores ambientales.

Con base en estos antecedentes se ha puesto especial atención al gen de la poliposis adenomatosa familiar (PAF), tanto en el aspecto clínico como en el aspecto genético molecular. La PAF es un padecimiento autosómico dominante, lo cual indica que cada hijo(a) de una persona afectada tendrá un 50% de posibilidades de estar afectado. Este padecimiento tiene una incidencia en la población de 1 en 5,000 y de 1 en 17,000 en los Estados Unidos y en Japón, respectivamente³⁰, mientras que en nuestro país no tenemos dicha información. Los individuos afectados desarrollarán de cientos a miles de pólipos adenomatosos en el colon y recto, de los cuales un número de ellos progresarán a carcinoma. La edad de aparición de dichos pólipos puede ser desde los 5 hasta los 70 años; no obstante, la mayoría de los individuos afectados los presentan en la pubertad o

antes de los 30 años. Una vez que se hace el diagnóstico de la enfermedad, se indica una colectomía total para evitar la transición de los pólipos adenomatosos al estado carcinomatoso. Ya que la edad de aparición puede ser desde los 5 años, se recomienda realizar estudios periódicos a través de colonoscopías, las cuales se deben practicar, por lo general, cada 6 meses. Una desventaja de este procedimiento de escrutinio es que se tienen que someter a este tipo de estudios todos los hijos de un padre afectado, por el hecho de ser un padecimiento autosómico dominante, además de la angustia de estar afectado o no por el padecimiento, el cual terminará en un proceso maligno.

Después de haberse descubierto que el gen de la PAF se localiza en el brazo largo del cromosoma 5q, se han hecho un buen número de estudios genéticos con los fragmentos polimórficos generados con diferentes enzimas de restricción. Algunos de estos estudios indican que existen ciertos fragmentos polimórficos que tienen una unión muy estrecha al padecimiento y se han utilizado para hacer el diagnóstico aún antes de que aparezcan los pólipos, con la consecuente ventaja para los pacientes, que incluye el poder evitar los estudios colonoscópicos periódicos y, además, suprimir la angustia en aquellos familiares que no tienen dicha alteración genética.

Por otro lado, metodológica y científicamente se han logrado aún más avances. Por ejemplo, en 1991 Kinzler, Vogelstein y Nakamura³¹ lograron secuenciar el gen de la poliposis familiar. Este hecho, a diferencia de los estudios con fragmentos polimórficos, permitirá analizar directamente las alteraciones estructurales de dicho gen; ya sean estas mutaciones puntuales, deleciones de mayor consideración, translocaciones, o bien, alteraciones en la expresión. Más aún, con base en lo que se mencionó anteriormente, estos estudios se podrán realizar no sólo en aquellos síndromes hereditarios que conducen al cáncer de colon, sino también en el cáncer de colon esporádico, para un mayor conocimiento de los agentes ya sean químicos, físicos o infecciosos que conduzcan a una alteración molecular específica.

Fragmentos polimórficos generados con enzimas de restricción (RFLPs). Su uso en el diagnóstico de la poliposis adenomatosa familiar en pacientes asintomáticos. Dos estudios independientes, uno en la Gran Bretaña y el otro en los Estados Unidos, fueron los primeros en señalar la estrecha relación (unión) que existe entre la PAF y los fragmentos polimórficos

de ADN que se generan con la enzima de restricción Taq-I (RFLPs). El lugar en donde reside este polimorfismo (locus D5S71) se encuentra en el cromosoma 5q y se detecta con el DNA complementario o genómico C11P11^{23, 32-34}. Los RFLPs que se asocian a la PAF representan uno de los pocos marcadores moleculares que tienen una gran precisión y, por lo tanto, utilidad en el diagnóstico de PAF en pacientes asintomáticos. Lo anterior se debe a la cercanía que existe entre los fragmentos polimórficos y el gen del APC.

Más recientemente, Dunlop y col.³³ publicaron un mapa de unión genética de seis marcadores polimórficos de ADN cerca del gen de la PAF (APC) en el cromosoma 5q (Cuadro 1). Estos marcadores proporcionan una mayor certeza respecto al diagnóstico de pacientes asintomáticos y, además, son útiles para la mejor caracterización del gen APC.

CUADRO 1. Marcadores moleculares ordenados a partir de eventos de recombinación en relación a la posición del gen de la poliposis familiar.

CENTROMERO	GEN APC	TELOMERO
	EF5.44	
	YN5.48	
	L5.62	
	ECB27	
	C11P11	
	pi227	

Con el uso de marcadores genéticos de unión, un gen determinado se puede identificar y rastrear, aunque su función sea desconocida. La utilidad de una sonda (DNAc o genómico) depende de dos aspectos importantes: primero, del grado de información (heterocigosidad) del polimorfismo; y, segundo, de la distancia que existe entre el gen y el marcador, medido por la fracción de recombinación. Por convención, el nivel de significancia de unión se define como un puntaje LOD ≥ 3.0 , representando una probabilidad de 1 en 1000 para una recombinación que ocurre entre el marcador y el locus de la enfermedad. En la población de Estados Unidos, la unión del marcador C11P11 al locus de la PAF muestra una recombinación máxima de 0.274, indicando una relación de recombinación de 1 en 4 meiosis. Un

puntaje LOD de -5.74 a 0=0 no apoya la unión del marcador C11P11 al gen de la APC, lo cual sugiere que este marcador no está muy cerca del gen de la APC³⁴. Para el mismo marcador, Nakamura reporta una distancia de recombinación de cerca de 17%²². Estudios de recombinación con la misma sonda han sido descritos en el Hospital de San Marcos en Londres³⁵. No obstante, en estos estudios no se encontraron recombinantes en cerca del 50% de las meiosis informativas. El mismo RFLP no dió información para estudios de unión en 15 familias holandesas con poliposis.

CUADRO 2. Tamaño del alelo y frecuencia reconocida de 6 marcadores polimórficos de DNA (LOCI) del cromosoma 5q en una población escocesa control.

Sonda/(Enzima que reconoce el polimorfismo)	Frecuencia	Tamaño (kb)
EF5.44 (MspI)	.18/2.9	.82/2.1
L5.62 (BglII)	.93/9.0	.07/5.5
YN5.48 (MspI)	.45/9.0	.55/8.0
ECB27 (BglII)	.39/11.9	.61/10.5
C11P11 (taqI)	.14/4.4	.86/3.9
pi227 (PstI)	.25/3.0	.75/4.3
pi227 (BclI)	.17/3.0	.46/1.8.37/1.2
pi227 (BstXI)	.29/2.7	.71/2.3
pi227 (Mbol)	.25/5.5	.75/4.5

Otro estudio informó un polimorfismo con una delección de cuatro pares de bases (DEL1) en el locus D5S71³⁶, con el cual aumentó el contenido de información del polimorfismo de este marcador de 0.17 a 0.40 en la población holandesa. Siete de 20 familias con poliposis monitoreadas para la DEL1, así como para el polimorfismo con Taq1, dieron un pico combinado de puntaje LOD de 5.68 sin recombinantes en 37 meiosis informativas. Estos datos, junto con los descritos en la literatura, hacen que aumente el puntaje LOD a 17.09, con una fracción de recombinación de 0.05 y el límite de confianza superior a 95% de 0.09.

A pesar de que este marcador puede ser muy útil para el diagnóstico presintomático en un porcentaje muy importante de familias con PAF, es conveniente enfatizar que si se utiliza en combinación con otro marcador informativo, por ejemplo el D5S81 (sonda YN5.48) ubicado estrechamente en el otro lado del

gen de la PAF, el diagnóstico presintomático de la enfermedad se puede hacer con más del 99.9% de certeza³⁷.

Otro aspecto importante en el diagnóstico de pacientes asintomáticos de la PAF está representado por casos únicos o aislados. En familias holandesas se ha encontrado que un 30 a 40% de pacientes con PAF son casos únicos³⁸, en los cuales se sugiere mutaciones de novo. De tal manera que siempre habrá un número de pacientes de primer grado con alto riesgo de desarrollar la enfermedad y cuyo diagnóstico con estudios de unión (RFLPs) será difícil. Sin embargo, algunas de estas familias se podrán beneficiar con exámenes de fondo de ojo para determinar la presencia de hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina, ya que estas alteraciones suelen estar asociadas a la presencia de PAF^{39, 40, 41}. En la mayoría de estos casos tendrá que precisarse la alteración estructural del gen de la PAF por medio de estudios de secuenciación.

CUADRO 3. Características de marcadores de la poliposis adenomatosa familiar.

Sonda	Fuente	Alela (kb)	Frecuencia
pC11p11	Spurr	TaqI 4.7	0.35
		4.0	0.65
		Taq 9.0	0.43
cKK5.33	Nakamura	8.0	0.57
		BclI 3.0	0.43
pi227	Kurnit	1.8	0.37
		1.2	0.20
		BstXI 2.7	0.61
		2.3	0.39
		PstI 4.3	0.16
		3.0	0.84

La ventaja de este tipo de estudios moleculares es que del 50% de riesgo que tienen todos los parientes de primer grado de los enfermos con PAF, se puede reducir a % a la edad de 30 años si existe un resultado negativo en la sigmoidoscopia y un diagnóstico negativo por el análisis de unión (RFLPs)⁴². Por otro lado, el manejo clínico para aquellos pacientes que han heredado la PAF será el mismo, es decir, revisiones periódicas incluyendo colonoscopias además de que, en un futuro cercano, serán candidatos idóneos a la terapia génica.

El gen de la poliposis adenomatosa familiar está unido a marcadores que se localizan en el cromosoma 5q y se conoce como gen APC¹⁹⁻²⁵. Se sugiere que el gen APC juega un papel importante como gen supresor de tumores y participa en la biología, si no en la génesis del cáncer colorrectal esporádico. Se ha demostrado pérdida de material genético del cromosoma 5 en la PAF y en adenomas y carcinomas colorrectales esporádicos²⁶⁻²⁹, sugiriéndose que tal pérdida es por delección intersticial²⁸. Los datos parecen apoyar la hipótesis de que las mutaciones del gen de la APC son recesivas a nivel celular y, al igual que en otros genes supresores de tumores, requieren inactivación de ambos alelos para el desarrollo de malignidad⁴³. Además de causar el síndrome de la poliposis adenomatosa familiar, las mutaciones del gen APC parecen participar en la herencia de la susceptibilidad al cáncer colorectal diferente al PAF. Existen varios grupos de cáncer colorectal⁴⁴⁻⁴⁹, la mayoría de los cuales tienen un tipo de herencia autosómica dominante y una frecuencia génica en la población general tan alta como 19%⁵⁰. Clínicamente, ciertas características extracolónicas de la PAF ocurren con mucha frecuencia en el cáncer de colon esporádico⁵¹ y en el cáncer de colon hereditario no relacionado a poliposis⁵², lo cual sugiere una etiología genética común. Por otro lado, utilizando sondas del cromosoma 5q, se ha demostrado linkage en una familia en la cual individuos afectados tenían un número variable de pólipos, los cuales no reunían los criterios para el diagnóstico de la PAF³².

Vogelstein y Nakamura han detectado mutaciones del gen APC tanto en los pacientes con PAF como en pacientes con el síndrome de Gardner³¹. Esto sugiere que el mismo gen es el responsable de ambas enfermedades. Más recientemente, los mismos autores, además de identificar el gen APC, analizaron la región codificadora completa y encontraron que contiene 15 exones⁵³; de éstos, el exón más largo es el último (número 15), con una longitud de 6571 pares de base. Al mismo tiempo estudiaron 53 pacientes con PAF y observaron mutaciones puntuales en los exones 5, 6, 8, 9, y del 12 al 15. Sin embargo, en 29 casos detectaron delecciones o inserciones en el exón 15. Es precisamente en este largo exón en donde encontraron el 68% del total de las mutaciones (codones 713-1597). Un aspecto importante, que se muestra en el Cuadro 4, es que la misma mutación se detectó en diferentes pacientes no emparentados entre sí. Otro aspecto muy importante de estos estudios es que, de las mutaciones que se han detectado, el 92% originan un producto incompleto por crear algunas de ellas nuevos codones de terminación.

CUADRO 4. Diferentes alteraciones estructurales del gen APC en pacientes con poliposis adenomatosa familiar.

Número de pacientes	Codón	Cambio de nucleótido	Cambio de amino ácido
2	302	CGA-TGA	Arg-Stop
3	625	CAG-TAG	Gln-Stop
1	827	AAT-AAATT	inserción AT
4	1061	AAACAAAG-AAG	delección ACAA
10	1309	GAAAAGAT-GAT	delección AAAGA

Estudios clínicos y moleculares de la poliposis adenomatosa familiar en México. En la clínica de cáncer de colon y estómago del Departamento de Gastroenterología del INNSZ, se han detectado 9 familias con Poliposis Adenomatosa Familiar. En todas estas familias hay más de 50 pacientes afectados. Asimismo, más de 200 parientes cercanos requieren de estudios moleculares para el diagnóstico presintomático de la enfermedad. Con estos antecedentes, hemos iniciado un centro nacional de referencia de la Poliposis Adenomatosa Familiar, con el objeto de realizar el estudio familiar integral, lo cual incluye desde los estudios clínicos hasta los moleculares. Lo anterior empieza a representar verdaderas ventajas para los pacientes. Se podrá tener una idea más clara de la frecuencia de esta enfermedad en nuestro país y, a pesar de que los estudios son muy costosos, los pacientes pueden tener acceso a los mismos.

a) Estudios clínicos. A los estudios clínicos sólo nos referiremos muy brevemente, ya que esto requiere de otra comunicación. Sólo mencionaremos que a los pacientes que se han estado atendiendo se ha practicado fondoscopía indirecta con el objeto de correlacionar la presencia de hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de retina con los marcadores moleculares que a continuación se mencionan.

b) Estudios moleculares. El enfoque molecular que hemos iniciado para investigar y realizar el diagnóstico presintomático de la PAF consiste en la realización de estudios de unión (RFLPs). Esta estrategia nos permite detectar de una manera más rápida aquellos pacientes candidatos a tener alteraciones estructurales del gen APC. Para este fin esperamos contar muy pronto con más sondas o ADNc a diferentes marcadores de la PAF, que nos permita hacer el diagnóstico presintomático hasta con un 99% de

certeza, como se mencionó anteriormente.

En segundo paso consiste en detectar alteraciones estructurales del gen APC en los pacientes afectados y en aquellos en quienes se sospeche que tienen la enfermedad, o bien, en quienes se haya hecho el diagnóstico presintomático de la enfermedad por medio de los estudios de unión o RFLPs. Para este fin se utiliza el ensayo de protección de RNAsa. Para realizar este estudio, el Dr. Vogelstein nos ha proporcionado la secuencia de varios oligonucleótidos. Con estas secuencias podemos analizar todos los exones del gen APC de los pacientes en estudio, de tal manera que la estrategia consiste en amplificar inicialmente exones o segmentos de los mismos del gen APC, utilizando el método del PCR. Posteriormente, el producto amplificado se hibrida con el transcrito marcado con ³²P de la secuencia normal del gen del APC y se digiere con RNAsa A. Si existen alteraciones estructurales del producto amplificado entonces se obtienen dos o más fragmentos, los cuales se identifican por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida. Cuando no existe mutación o alteración estructural alguna, el producto será del mismo tamaño del segmento del ADN amplificado (Fig. 1).

ESTRATEGIAS PARA DETECTAR MUTACIONES DEL GEN APC.

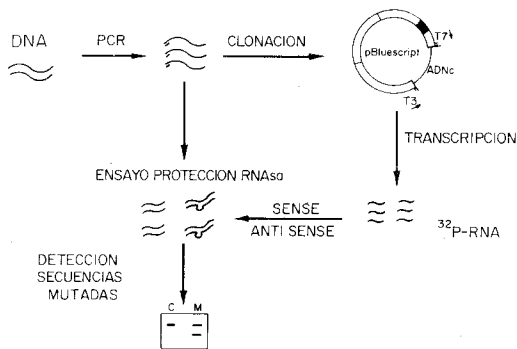


Fig. 1. Amplificación de segmentos de ADN de pacientes con PAF. Las secuencias amplificadas se clonan y se analizan por medio del Ensayo de Protección de RNAsa para detectar alteraciones estructurales.

Una vez que se detectan mutaciones con el método de RNAsa, el fragmento amplificado con la mutación se clona y se realiza la secuencia del mismo. Este estudio se realiza con la técnica de secuenciación por terminadores de cadena o "didideoxi" ⁵⁴. Con este método se lleva a cabo una amplificación lineal de la secuencia deseada mediante iniciadores específicos (primers) en 4 reacciones separadas, cada una con tres

deoxinucleótidos o dNTPs (uno de los cuales está marcado con ³²P) y un didideoxynucleótido o ddNTP en presencia de la polimerasa Klenow ^{54, 55}. Los ddNTPs, por carecer del grupo 3'OH, no actúan como sustrato para la polimerasa, por lo que al incorporarse al extremo 3'terminal de la nueva cadena de DNA impide su elongación posterior. Esto nos lleva a obtener fragmentos de DNA parcialmente elongados de todos los tamaños posibles, los cuales se analizan en un gel desnaturante de poliacrilamida ^{54, 55}. Posteriormente se hace una autorradiografía del gel y se leen las bandas de las cuatro reacciones separadas de abajo hacia arriba en forma consecutiva (Fig. 2). Es así como esta técnica nos permite conocer la secuencia de bases del fragmento en cuestión y detectar de una manera más precisa las mutaciones o rearrreglos estructurales del gen APC.

CLONACION Y SECUENCIACION DE FRAGMENTOS DEL GEN APC CON ALTERACIONES ESTRUCTURALES

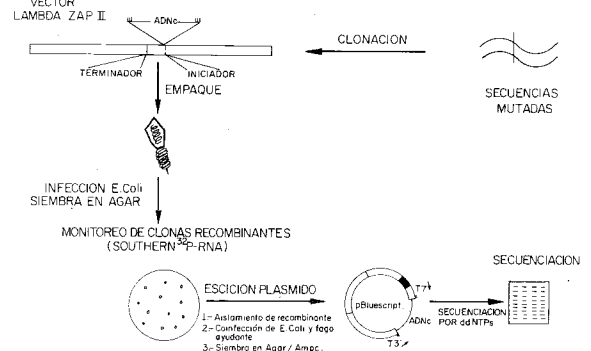


Fig. 2. El DNA amplificado con alteraciones estructurales se clona en el vector Lambda ZAP II. Posteriormente se detectan las clonas recombinantes positivas y se analiza su secuencia por el Método de Terminadores de Cadena.

La importancia del diagnóstico temprano de esta patología, como ya se ha mencionado, es el informar, éticamente, de la presencia del gen de la PAF y de sus posibles implicaciones futuras. Asimismo, las técnicas empleadas en este procedimiento nos ayudan a entender un poco más su patogénesis, avanzando en la profundización del conocimiento, que en un futuro nos podría conducir a la prevención o cura de este padecimiento. Es importante señalar que este tipo de estudios no se encuentran al alcance de cualquier centro hospitalario, razón por la cual este Instituto, y particularmente la Unidad de Hepatología Molecular, se ha convertido en un centro de referencia a nivel nacional para el estudio y tratamiento de alto nivel de pacientes con poliposis adenomatosa familiar.

Referencias

1. González Carbajal E: Diagnóstico de la salud en México, México: Trillas, 1988.
2. Villalobos JJ, Anzures ME, Rodríguez L. Noveno informe del grupo de estudios sobre cáncer del aparato digestivo de la Académica Nacional de Medicina. *Rev Gastroenterología Méx*, 1988;53:103-9.
3. American Cancer Society, Cancer facts and figures, 1985.
4. Martin EW, Joyce S, Lucas J. Colorectal carcinoma in patients less than 40 years of age: Pathology and prognosis. *Dis Colon Rectum* 1981;24:25-8.
5. Calman KC. Gastrointestinal cancer. En: Halman KE, ed *Cancer*. London, Chapman and Hall, 1982;399-408.
6. Alm T. Hereditary adenomatosis of the colon and rectum. En: Lynch PM, Lynch HT, eds. *Colon cancer genetics*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1985;30-51.
7. Willet WC, Stampfer MJ, Golditz GA, et al. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med*, 1990;323(24):1664-72.
8. Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(8):650-61.
9. Lynch PM, Lynch HT. *Colon cancer genetics*. New York, Van Nostrand Reinhold Co. 1985.
10. Lynch HT, Guirgis HT, Albert S. Familial breast cancer in a normal population. *Cancer*. 1974;34:2080-5.
11. Reunión Franco-Mexicana de Gastroenterología, Morelia, Michoacán, México, Comunicación personal, 1989.
12. Lynch HT, Kinberling WS, Albano WA. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1985;56:934.
13. Bulow S. Familial polyposis coli. *Dan Med Bull* 1987;34:1.
14. Gardner EJ, Burt RW, Freston JW. Gastrointestinal polyposis: syndrome and genetic mechanisms. *West J Med* 1980;132:488-99.
15. Cooke SA. Polyposis coli. *S. Afr Med J* 1978;53:454-9.
16. Bussey HJR, Beale ANO, Morson BC. Genetics of gastrointestinal polyposis. *Gastroenterology* 1978;74:1325-30.
17. Woolf CM, Richards RC, Gardner EJ. Occasional discrete polyps of the colon and rectum showing an inherited tendency in a kindred. *Cancer* 1955;8:403-8.
18. Burt RW, Bishop DT, Cannon La. Dominant inheritance of adenomatous colonic polyps and colorectal cancer. *N Engl J Med* 1985;312:1540-4.
19. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, et al. Localization of the gene for familial polyposis coli on chromosome 5. *Nature* 1987;328:614-6.
20. Leppert M, Dobbs M, Scambler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer D, Woodward S, et al. The gene for familial adenomatous polyposis maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 1987;238:1411-3.
21. Meera Khan P, Tops CMJ, Van der Broek M, Bruekel C, Wijnen JT, Oldenburg M, van der Bos J, et al. Close linkage of a highly polymorphic marker (D5S37) to familial polyposis (FAP) and confirmation of FAP localization on chromosome 5q21-q22. *Hum Genet* 1988;79:183-5.
22. Nakamura Y, Lathrop M, Leppert M, Dobbs M, Wasmuth J, Wolff E, Carlson M, et al. Localization of the genetic defect in familial adenomatous polyposis within a small region of chromosome 5. *Am J Hum Genet* 1988;43:638-44.
23. Dunlop MG, Steel CM, Wyllie AH, Bird CC, Evans HJ. Linkage analysis in familial adenomatous polyposis: order of C11P11 (D5S71) and pi227 (D5S37) loci at the APC gene. *Genomics* 1989;5:350-3.
24. Murday V, Cottrell S, Bodmer WF, Sheer D, Varesco L, Frischauf AM, Solomon E, et al. Fine linkage map around the adenomatous polyposis (APC) gene. *Cytogenet Cell Genet* 1989;5:1049.
25. Varesco L, Thomas HJW, Cottrell S, Murday V, Fennell SJ, Williams S, Searle S, et al. CpG island clones from a deletion encompassing the gene for adenomatous polyposis coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:10118-22.
26. Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jasse JR, Jeffreys AJ, Lucibello FC, et al. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987;328:616-9.
27. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
28. Ashton-Rickardt PG, Dunlop MG, Nakamura Y, Morris RG, Purdie CA, Steel CM, Evans HJ, et al. High frequency of APC loss in sporadic colorectal carcinoma due to breaks clustered in 5q21-22. *Oncogene* 1989;4:1169-74.
29. Sasaki M, Okamoto M, Sato C, Surgio K, Soejima J-I, Iwama T, Ikeuchi T, et al. Loss of constitutional heterozygosity in colorectal tumours from patients with familial adenomatous polyposis and those with nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1989;49:4402-6.
30. Utsunomiya J, Lynch HT. *Hereditary Colorectal Cancer* Berlin: Springer 1990.
31. Kinzler KW, Nilbert MC, Su L, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991;253:661-4.

32. Leppert M, Burt R, Hughes JP, Samowitz W, Nakamura Y, Woodward S, Gardner E. et al. Genetic analysis of an inherited predisposition to colon cancer in a family with a variable number of adenomatous polyps. *N Engl J Med* 1990;322:904-8.
33. Dunlop MG, Wyllie AH, Nakamura Y, Steel CM, Evans HJ, White RL, Bird C. Genetic linkage map of six polymorphic DNA markers around the gene for familial adenomatous on chromosome 5. *Am J Hum Genet* 1990;47:982-7.
34. Paul P, Jagelman DG, Fazio VW, McGannon E. Evaluation of polymorphic genetic markers for linkage to the familial adenomatous polyposis locus on chromosome 5. *Dis Col & Rect* 1990;33:740-4.
35. Alfred MA, Rees M, Tsioupra K, Leigh SE, Neale KF, Delhanty JD. Familial polyposis coli (letter). *Lancet*, Sept 3, 1988;565.
36. Breukel C, Tops C, Meera Khan P. Four-base deletion polymorphism at D5S71 (C11P11) linked to APC in the human chromosome 5q21-q22 region. *Nucleic Acid Res* 1989;17:10512.
37. Tops CMJ, Breukel C, van der Klift HM, Leeuwen ISJ, Wijnen JT, Griffioen G, Vasen HFA, den Hartog Jager FCA, Nagengast FM, Lamers CBHW, Meera Khan P. A new deletion polymorphism at D5S71 raises the linkage information on adenomatous polyposis coli: implication for presymptomatic diagnosis. *Hum Genet* 1991;86:365-8.
38. Bulow S. Familial adenomatous polyposis. *Dan Med Bull* 1987;34:1-15.
39. Baker RH, Heineman MH, Miller HH, Decosse JJ. Hyperpigmented lesions of the retinal pigment epithelium in familial adenomatous polyposis. *Am J Genet* 1988;31:427-35.
40. Chapman PD, Church W, Burn J, Gunn A. Congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium: a sign of familial adenomatous polyposis. *Br Med J* 1989;298:353-4.
41. Traboulsi EI, Maumenee IH, Krush AJ, Alcorn D, Giardiello FM, Burt RW, Hughes P, Hamilton SR. Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium predicts colorectal polyposis in Gardner's syndrome. *Arch Ophthalmol* 1990;108:525-6.
42. Petersen GM, Slack J, Nakamura Y. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology* 1991;100:1658-64.
43. Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820-3.
44. Woolf CM. A genetic study of carcinoma of the large intestine in man. *J Natl Cancer Inst* 1958;10:42-7.
45. Macklin MT. Inheritance of cancer of the stomach and large intestine in man. *J Natl Cancer Inst* 1960;24:551-71.
46. Lovett E. Family studies in cancer of the colon and rectum. *Br J Surg* 1976;63:13-8.
47. Duncan JL, Kyle J. Family incidence of carcinoma of the colon and rectum in north-east Scotland. *Gut* 1982;23:169-71.
48. Lynch HT, Kimberling WJ, Albano Wa, Lynch JF, Biscione K, Scheukle GS, Sandberg AA. et al. Hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome 1 and 2). I. Clinical description of resource. *Cancer* 1985;56:934-8.
49. Bonelli L, Martines H, Conio M, Bruzzi P, Aste H. Family history of colorectal cancer as a risk factor for benign and malignant tumours of the large bowel: a case control study. *Int J Cancer* 1988;41:513-7.
50. Cannon-Albright LA, Skolnick MH, Bishop DT, Lee RG, Burt RW. Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N Engl J Med* 1988;319:533-7.
51. Sondergaard JO, Svedsen LB, Witt IN, Bulow S, Lauritsen KB, Tetens G. a. Mandibular osteomas in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 1985a;20:759-61.
52. Sondergaard JO, Svedsen LB, Witt IN, Bulow S, Lauritsen KB, Tetens G. b. Mandibular osteomas in the cancer family syndrome. *Br J Cancer* 1985b;52:941-3.
53. Miyoshi Y, Ando H, Nagase H. et al. Germ-line mutation of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4452-6.
54. Hindley J. *DNA Sequencing. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* Elsevier Biomedical Press, 1985.
55. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977;74:5463-7.