



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Departamento de Genética

DETECCION DE MUTACIONES PUNTUALES Y REARREGLOS
GENOMICOS EN PACIENTES CON POLIPOSIS ADENOMATOSA
FAMILIAR

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

VALERIA ARELI MONTES APARICIO

TUTOR DE TESIS:

DRA. JAZMÍN ARTEAGA VÁZQUEZ

CO-TUTOR DE TESIS:

M.C. YEVGENIYA SVYRD

CIUDAD UNVIERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

MARCO TEORICO

- *Poliposis adenomatosa familiar clásica*
- *Poliposis adenomatosa familiar atenuada*
- *Diagnostico*
- *Diagnostico diferencial*
- *Estudio molecular*
- *Correlación genotipo-fenotipo*
- *Gen APC*
- *Mutaciones en línea germinal*
- *Mutaciones somáticas*
- *La proteína APC y sus dominios*
- *Vías de señalización en las que interviene APC*
- *Rol funcional de APC en el núcleo*
- *APC y apoptosis*
- *Expresión tisular de APC*

OBJETIVOS

- *Objetivo general*
- *Objetivos Específicos*

DISEÑO DEL ESTUDIO

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONSLUSIÓN

BIBLIOGRAFIA

DETECCION DE MUTACIONES PUNTUALES Y REARREGLOS GENOMICOS EN PACIENTES CON POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN.

MARCO TEÓRICO

El cáncer colorrectal es el tercer tumor más común en hombres y el segundo en mujeres, corresponde a un 10% de todos los tipos de tumores a nivel mundial y la mortalidad estimada es de 608,000 muertes por año (aproximadamente 8% de todas las muertes por cáncer). El riesgo de desarrollar cáncer de colon depende de algunos factores, tales como el estilo de vida y genéticos. Dentro de los factores genéticos, los síndromes de predisposición a cáncer de colon aportan 5 a 10% de todas las causas de cáncer colónico.

La poliposis adenomatosa familiar (PAF), y sus variantes se observan con una frecuencia aproximada del 1% [1]. Las condiciones asociadas a poliposis incluyen poliposis adenomatosa familiar (PAF), PAF atenuada, adenocarcinoma gástrico y poliposis estomacal proximal.

Poliposis adenomatosa familiar clásica

La poliposis adenomatosa familiar es una enfermedad que se hereda de forma autosómica dominante, causada por mutaciones en línea germinal de el gen *APC*. Esta enfermedad afecta aproximadamente a 1 en 13, 500 personas. Los individuos portadores de mutación en el gen están predispuestos en la mayoría de los casos a desarrollar cientos o inclusive miles de pólipos colorectales entre la segunda y tercera década de la vida; en promedio la edad de diagnóstico de pólipos es a los 16 años (promedio de 7-36 años). A los 35 años el 95% de los individuos con PAF tendrá pólipos. Una vez presentes los pólipos, incrementan rápidamente en número, cuando la expresión colónica se completa se han desarrollado cientos y miles de poliposis adenomatosos colónicos lo cuales son típicamente observados. Sin la realización de colectomía, el cáncer de colon es inevitable. El promedio de edad de diagnóstico de cáncer de colon en individuos no tratados es de 39 años (promedio 34-43 años). Siete por ciento de individuos sin tratamiento desarrollan cáncer de colon a los 21 años, 87% a los 45 años y 93% a los 50 años. Aunque es raro, individuos asintomáticos a los 50 años han sido reportados. La variabilidad fenotípica intrafamiliar es común. En adición, los pacientes con PAF pueden desarrollar formas extracolónicas.

Tabla 1: riesgo de desarrollar cáncer extracolónico a lo largo de la vida en PAF.

Sitio	Tipo de cáncer	Riesgo de cáncer a lo largo de la vida
Duodeno o periampular	Carcinoma	4-12%
Duodeno distal	Carcinoma	Raro
Páncreas	Adenocarcinoma	1%
Tiroides	Carcinoma papilar tiroides	1-12%
SNC	Meduloblastoma	<1%
Hígado	Hepatoblastoma	1.6%
Ductos biliares	Adenocarcinoma	Incrementado
Estómago	Adenocarcinoma	<1%

Otras formas de presentación variable en poliposis adenomatosa familiar

-Pólipos de intestino delgado y cáncer: pólipos adenomatosos del duodeno, observados en 50-90% de individuos con PAF son comúnmente encontrados en la segunda y tercera porción de duodeno y

menos frecuentemente en el intestino delgado distal. Una clasificación sistemática para pólipos duodenales basada en el número de pólipos, histología y grado de displasia ha sido desarrollada. No está clara la asociación entre el número de pólipos colónicos y el número de pólipos gastrointestinales identificados.

Los pólipos adenomatosos de la región periampular (incluyendo la papila y el ámpula de Váter) son vistos en aproximadamente 50% de los individuos con PAF. Los pólipos en esta área pueden causar obstrucción del conducto pancreático, resultando en pancreatitis u obstrucción biliar. Ambos ocurren con incrementada frecuencia en PAF. Estos pólipos, con frecuencia son pequeños y requieren endoscopia para su visualización. Algunos autores sugieren que las secreciones pancreatobiliares afectan el desarrollo de adenomas y pueden contar para incrementar el riesgo de desarrollar malignidad en los pólipos de la región periampular.

El riesgo de desarrollar cáncer de intestino delgado a lo largo de la vida es del 4-12% y la gran mayoría ocurren en el duodeno. El adenocarcinoma duodenal ocurre más comúnmente en la región periampular. Este ha sido reportado que ocurre entre los 17 y 81 años con una media de diagnóstico entre los 45 y 52 años. El cáncer distal de intestino delgado ocurre en el duodeno, pero es raro. En 2010 se identificaron solo 17 casos de carcinoma yeyunal y 3 casos de carcinoma ileal individuos con PAF reportados en la literatura.

Cáncer páncreatico. Aunque existen datos limitados, un estudio realizado de 197 familias con PAF revelo el riesgo relativo para desarrollo de cáncer de 4.5 en individuos con PAF comparados con el riesgo de la población general.

Cáncer de tiroides y enfermedad tiroidea benigna. Un alto grado de variabilidad en la frecuencia de cáncer tiroideo es reportada en individuos con PAF. Varias revisiones retrospectivas han reportado una prevalencia de 2.6 a 11.8%. Existe un rango llamativo de 80:1 en PAF en la relación mujer: varón y mayor del 80% en los individuos que son diagnosticados de los 18 a 35 años. Predomina la histología papilar y puede presentar un patrón cribiforme. Un subtipo de carcinoma papilar de tiroides llamado variante cribiforme-morular es típicamente asociado con PAF. Aunque este tipo de cáncer ocurre de forma esporádica, esta variante de carcinoma papilar de tiroides es un criterio para el diagnóstico molecular de *APC*.

Los datos en cuanto a la enfermedad tiroidea benigna son limitados. En retrospectiva 9.1% de los individuos con PAF tienen enfermedad benigna tiroidea caracterizada por la presencia de hipotiroidismo, quistes, bocio y/o tiroiditis. Se ha observado ocurrencia familiar y preponderancia femenina.

SNC. Los tumores del SNC en individuos con variantes patogénicas en *APC* son típicamente meduloblastomas. El riesgo para desarrollar tumores de SNC esta sustancialmente incrementado en personas con PAF, aunque el riesgo absoluto de aproximadamente 1%. Históricamente la combinación de poliposis colónica y tumores de SNC estaban incluidos en el síndrome de Turcot.

Hepatoblastoma. El riesgo de hepatoblastoma en PAF es de 750 a 7500 veces más alto que en poblaciones generales, aunque el riesgo absoluto es menor del 2%. La mayoría de los hepatoblastomas ocurren antes de los 3 años.

Pólipos gástricos y cáncer. El riesgo para pólipos adenomatosos y de las glándulas fúndicas del estómago esta incrementado en PAF.

Los pólipos de las glándulas fúndicas gástricas son neoplasias benignas localizadas en el fondo y cuerpo del estómago, ocurren aproximadamente en la mitad de los individuos con PAF.

Los pólipos adenomatosos son las segundas lesiones estomacales más prevalentes en individuos con PAF y usualmente confinadas al antro gástrico.

Lesiones no malignas.

La combinación de pólipos colónicos y manifestaciones extraintestinales, como osteomas, anomalías dentales y lesiones cutáneas benignas se nombró como síndrome de Gardner en honor a Elvin Gardner quien originalmente describió esta asociación.

Los osteomas ocurren en el 20% de los individuos con PAF, corresponden a crecimientos óseos encontrados comúnmente en el cráneo y mandíbula, pero pueden crecer en cualquier parte del cuerpo. No tienen potencial de malignizar.

Anomalías dentales. Alteraciones como ausencia congénita de uno o más dientes, dientes supernumerarios, quistes odontogénicos, y odontomas han sido reportados en aproximadamente 17% de los individuos con PAF.

Hipertrofia congénita del epitelio de la retina. Hace referencia a lesiones pigmentadas, planas, de la retina, no son dependientes de la edad, no causan ningún problema clínico y se ha reportado ocurren en más del 75% de los individuos con PAF.

Lesiones cutáneas benignas, incluye quistes epidermoides y fibromas, pueden ocurrir en cualquier parte del cuerpo incluyendo la cara, no parecen tener ningún potencial maligno, solo cosmético.

Los tumores desmoides se desarrollan en aproximadamente el 20 al 30% de individuos con PAF. El riesgo de tumores desmoides en individuos con PAF es más de 800 veces el riesgo de la población general. Aproximadamente el 80% ocurre a los 40 años, y el 65% ocurre dentro de la cavidad abdominal o pared abdominal. Estos tumores fibrosos son benignos, se consideran proliferación local sin metástasis. Predictores independientes para el desarrollo de tumores desmoides incluye: la detección de una variante patogénica en la posición 3' del codón 1399, historia familiar, sexo femenino, cirugías abdominales previas.

Tumores adrenales. La mayoría de estas masas son reportadas como adenomas asintomáticos, encontrados accidentalmente. Se han reportado de 2 a 4 veces más frecuente en PAF que en la población general.

Poliposis adenomatosa familiar atenuada

La PAF atenuada se caracteriza por una menor cantidad de pólipos (promedio 30), que la PAF clásica, pero con riesgo significativo de desarrollar cáncer de colon. Los pólipos tienden encontrarse más proximales en el colón. El riesgo acumulativo para cáncer colorrectal a los 80 años en PAF atenuada es del 70%. La edad promedio de diagnóstico de cáncer de colón en individuos con cáncer de colon es de 50 a 55 años (10 a 15 años después que en PAF clásica).

En grandes familias reportadas previamente con PAF atenuada y variantes idénticas en línea germinal se reportó:

La media de número de pólipos hamartomatosos en 120 individuos con variante patogénica fue de 25 (0-400).

44 (37%) de 120 individuos con variantes patogénicas, tuvieron disponibles los reportes de colonoscopias que en promedio reportaban 10 pólipos.

3 de 44 individuos con variantes patogénicas tuvieron menos de 10 pólipos y cáncer colorrectal.

Hallazgos adicionales en PAF atenuada:

Pólipos y cáncer del tracto GI superior, similar a lo visto en PAF clásica.

Manifestaciones extracolónicas (CHPRE y tumores desmoides son raros).

Cáncer de tiroides.

Diagnostico

El grupo de trabajo internacional de cáncer (NCCN), publicó un algoritmo que debe considerarse en el diagnóstico tanto de PAF como de PAF atenuada. Estas guías incluyen recomendaciones para el examen genético de *APC*.

Acorde con las guías de manejo de la NCCN, las condiciones asociadas a poliposis deben ser sospechadas en individuos con cualquiera de las siguientes características clínicas:

Múltiples pólipos adenomatosos colorrectales (aproximadamente 10 a 20 adenomas colorrectales)

Historia familiar de poliposis adenomatosos colorrectales (>10 en un solo individuo o menos, si >1 de un familiar tiene múltiples pólipos, diagnosticado a edad temprana) y /o si presenta algunas de las manifestaciones extracolónicas mencionadas a continuación. El total del número de pólipos, la edad de inicio, número de familiares afectados y la presencia o ausencia de hallazgos extracolónicos pueden influir para la realización de pruebas y asesoramiento genético.

Hepatoblastoma

Hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina (multifocal/bilateral)

Tumor desmoide

Cáncer papilar de tiroides variante morular cribiforme

Formas adicionales sugerentes de poliposis asociada a *APC*. Estas pueden influenciar en la decisión de ofrecer la realización de examen genético para *APC*. Cáncer colorrectal de inicio temprano con o sin pólipos adenomatosos, anomalías dentales (dientes supernumerarios), osteomas, odontomas, quistes epidermoides, adenomas duodenales y cáncer, poliposis gástrica fúndica, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, carcinoma de intestino delgado y/o meduloblastoma.

Para establecer el diagnóstico es típicamente considerado un individuo con hallazgos clínicos característicos y establecer la identificación de una variante patogénica heterocigota en línea germinal en el gen *APC*.

El diagnóstico de poliposis adenomatosa familiar (PAF) es considerado en un individuo con una variante patogénica en línea germinal en *APC*, por examen genético, y la presencia de una de las siguientes:

Aproximadamente 100 pólipos colorrectales adenomatosos (individuos a edades jóvenes o con colectomías pueden tener menos de 10 pólipos adenomatosos). La presencia de 100 o más pólipos no es específico de PAF, en este caso el examen genético para *APC* puede ayudar a distinguir de la PAF de otras condiciones colorrectales.

Múltiples adenomas, pero menos de 100 pólipos y un familiar con PAF confirmada.

Para el diagnóstico de PAF atenuada es considerado cuando un individuo con una variante patogénica en línea germinal en *APC* y una de las siguientes características:

Un familiar con PAF atenuada confirmada y/o

Menos de 100 pólipos adenomatosos colorrectales; o

Más de 100 pólipos colorrectales a edad avanzada (>40 años).

El diagnóstico de adenocarcinoma gástrico y poliposis gástrica proximal es considerada en un individuo con los siguientes datos:

Pólipos gástricos restringidos al cuerpo y fondo.

Más de 100 pólipos en el estómago proximal o más de 30 pólipos en un familiar de primer grado.

Pólipos predominantes en las glándulas fúndicas, algunos tienen regiones de displasia (o un miembro en la familia con poliposis del fondo gástrico o adenocarcinoma gástrico).

Patrón de herencia autosómico dominante

No evidencia de poliposis duodenal o colorrectal.

Otras causas de poliposis gástrica deben ser excluidas, incluyendo el uso de inhibidor de la bomba de protones y otras causas hereditarias. Los criterios anteriores fueron propuestos originalmente para la identificación de variantes asociadas a la enfermedad, localizadas en el promotor IB del gen *APC*.

Diagnóstico diferencial

La poliposis asociada a *APC* puede ser distinguida de otras condiciones hereditarias de cáncer de colon y otros síndromes de poliposis gastrointestinal por medio de pruebas moleculares. Hallazgos histopatológicos y características fenotípicas.

Enfermedades hereditarias a considerar en el diagnóstico diferencial:

Poliposis asociada a *MUTYH* (MAP): el fenotipo de MAP puede ser similar a la PAF atenuada pero es heredada de forma autosómica recesiva. Variantes patogénicas bialelicas en línea germinal en *MUTYH* predisponen a la formación de múltiples adenomas o poliposis colónica.

Poliposis asociada a síndrome de Lynch: es causado por variantes heterocigotas patogénicas en línea germinal en uno de los 4 genes de reparación por mal apareamiento de bases (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* o *EPCAM*). El síndrome de Lynch se caracteriza por un incremento de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal y otro tipo de cáncer (endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, hepatobiliar, tracto urinario superior, cerebro y piel). Puede ser difícil de distinguir entre síndrome de Lynch y PAF atenuada en un individuo con cáncer colorrectal de inicio temprano y algunos pólipos colónicos adenomatosos. En esta situación la historia familiar de neoplasias extracolónicas y manifestaciones como análisis de la inestabilidad microsatelital y/o inmunohistoquímica de tejido tumoral pueden ser de utilidad para decidir a cuál condición asemeja más.

Poliposis asociada a *MSH3*: causado por variantes patogénicas bialelicas en el gen *MSH3*, es heredada de forma autosómica recesiva. Se caracteriza por adenomas duodenales y colorrectales, cáncer gástrico y astrocitoma de inicio temprano.

Síndrome de Peutz Jeghers: es caracterizado por la asociación de pólipos gastrointestinales y pigmentación mucocutánea, ninguno de los cuales están presentes como condiciones asociadas a la poliposis asociada a *APC*.

Síndrome de formación de tumores hamartomatosos asociados a *PTEN*: el síndrome de Cowden es la presentación más común del síndrome de tumores hamartomatosos asociados a *PTEN*, se observan múltiples pólipos colorrectales, aunque poco asociado a *APC* ya que estos son de tipo hamartomatoso y se pueden presentar algunas otras formas clínicas como pólipos juveniles, lipomas y ganglioneuromas, con un riesgo incrementado para el desarrollo de cáncer colorrectal.

Síndrome de poliposis juvenil: es caracterizado por predisposición para formación de pólipos hamartomatosos, los cuales en ocasiones distinguen los síndromes de poliposis asociados a *APC* y el síndrome de poliposis juvenil. Los pólipos hamartomatosos ocurren en el tracto gastrointestinal, específicamente en el estómago, intestino delgado, colon y recto. Muchos individuos con SPJ

desarrollan pólipos a la edad de 20 años. La mayor parte de los pólipos juveniles son benignos, de cualquier forma, la transformación maligna puede ocurrir. Esta enfermedad se hereda de forma autosómica dominante y el 20% de los individuos con SPJ tienen variantes patogénicas en *SMAD4*. No han sido detectadas variantes patogénicas en *APC*.

Síndrome de poliposis mixta hereditaria: asociada con un incremento de riesgo de cáncer colorrectal y múltiples tipos de pólipos colorrectales. Las lesiones características en síndrome de poliposis mixta hereditaria son pólipos colónicos adenomatosos mixtos. Adicionalmente, adenomas hiperplásicos, adenomas serrados y pólipos hiperplásicos adenomatosos pueden ocurrir. Esta enfermedad es causada por una duplicación río arriba de *GREM1*.

Poliposis asociada a *NTHL1*:

Condiciones adquiridas para ser consideradas en el diagnóstico diferencial:

Síndrome de Cronkhite-Canada: considerado por poliposis hamartomatosa astointestinal, hiperpigmentación cutánea, pérdida de cabello y atrofia ungueal.

Hiperplasia nodular linfoide: desorden linfoproliferativo que resulta en nódulos linfoides hiperplásicos en intestino delgado, estómago, colon y puede estar asociado a inmunodeficiencia común variable.

Poliposis linfomatosa: caracterizada por ocurrencia de linfomas extranodales primarios en el tracto gastrointestinal.

Poliposis inflamatoria: es caracterizada por pólipos no neoplásicos acompañados de enfermedad inflamatoria intestinal, más comúnmente colitis ulcerativa.

Tumores esporádicos colorrectales: en la mayoría de los tumores colorrectales no se conoce historia familiar asociada, tienen variantes patogénicas somáticas en *APC* y se cree que estas ocurren en la tumorigenesis colorrectal temprana.

Poliposis asociada a terapia: recientemente se han reportado como una posible causa de poliposis gastrointestinal en pacientes tratados con radioterapia y quimioterapia.

Estudio molecular

El examen molecular puede incluir estudio de un solo gen o la realización de un panel multi gen.

Examen de un solo gen: el examen puede incluir análisis por secuenciación y delección/duplicación de *APC*, podría también incluir estudio de las regiones reguladoras (específicamente el promotor 1B) de *APC* si es que las variantes patogénicas en *APC* no se identifican en el estudio inicial.

Panel multigen: estos incluyen *APC* y otros genes de interés que pueden ser considerados. Los genes incluidos en cada panel pueden variar dependiendo del laboratorio donde se realice. Los métodos usados en el panel multigen pueden incluir análisis de secuenciación, delección/duplicación y/o otros estudios basados en secuenciación.

Método análisis	Proporción de probandos con variantes patogénicas detectables por este método
Secuenciación	≤ 90%
Análisis delección/duplicación	~8%-12%

Correlación genotipo-fenotipo

A pesar de que ocurren variaciones entre individuos y entre familias con variantes patogénicas en *APC*, se ha logrado realizar algunas correlaciones fenotipo-genotipo. Algunos han sugerido estrategias de manejo basadas en estas asociaciones.

Las siguientes correlaciones pueden consideradas importantes en el manejo y toma de decisiones en el futuro.

- La variante patogénica más frecuente está localizada en el codón 1309 (c.3927_3931delAAAGA). Las variantes patogénicas en este codón llevan a la formación de un gran número de adenomas colónicos a edad temprana.
- En promedio la edad de inicio en individuos con síntomas colónicos varía dependiendo de la localización de la variante patogénica:
Codón 1309: edad de 20 años.
Entre el codón 168 y 1580 (excluyendo 1309): edad de 30 años.
5' de codón 168 y 3' del codón 1580: edad de 52 años.
- Poliposis profusa (en promedio 5000 pólipos): se han reportado con variantes patogénicas en los codones 1250-1464.
- PAF atenuada asociada con los siguientes:
Variantes patogénicas (usualmente variantes proteína trunca) en la parte 5' del gen (codón 1-177), exón 9 y la porción distal final de 3' del gen.
Deleciones intersticiales del cromosoma 5q22 que incluyen *APC*.
Deleciones parciales y deleciones de todo el gen.
Mosaicismo somático para variantes patogénicas de *APC* que generalmente están asociadas con PAF.
- Existe un riesgo de 4 veces más para el desarrollo de adenomas duodenales con variantes patogénicas entre los codones 976 y 1067.
- Manifestaciones prominentes extracolónicas a veces se correlacionan con variantes patogénicas más distales en el gen *APC*. Un estudio retrospectivo de 190 individuos con PAF, se evaluaron 9 manifestaciones extracolónicas (tumores desmoides, osteomas, quistes epidermoides, adenomas duodenales, pólipos gástricos, hepatoblastoma, anomalías dentales, cáncer periampular y tumores de SNC), revelaron que:
Individuos con variantes patogénicas en los codones 1395-1493 tienen rangos significativamente más altos de tumores desmoides y quistes epidermoides que los que tienen variantes patogénicas en los codones 177-452.
Individuos variantes patogénicas en codones 1395-1493 tienen en promedio mayor cantidad de tumores desmoides y osteomas que aquellos pacientes con variantes patogénicas en los codones 457-1309.
Ningún individuo con variantes patogénicas en codones 177-452 desarrollaron osteomas o cáncer periampular.
Solo los individuos con variantes en codones 457-1309 desarrollaron hepatoblastoma y/o tumores cerebrales.
Tumores desmoides también mostraron la siguiente correlación:
Múltiples familias con tumores desmoides graves con variantes patogénicas en el extremo final 3' de el gen, han sido reportados
A pesar de que se encontró una elevada incidencia de variantes patogénicas en 3' del codón 1399, los autores concluyeron que la enfermedad desmoide se puede desarrollar independientemente de los sitios de mutación de *APC*. Adicionalmente las variantes patogénicas en esta región son ocasionalmente más sintomáticas y letales.
- Hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina:
Variantes patogénicas entre los codones 148 a 243
Deleciones de todo el gen *APC*.
- Individuos con cáncer de tiroides
La mayoría de las variantes patogénicas identificadas fueron en 5' del codón 1220

9 de 12 pacientes tuvieron variantes patogénicas identificadas proximales a la MCR (mutation región cluster), codones 1286-1513.

- Una revisión de 2006 reveló 89 deleciones submicroscópicas de *APC*. Deleciones parciales y de todo el gen fueron asociadas con el desarrollo de 100 a 200 adenomas colónicos aunque en PAF atenuada también ha sido visto. Los hallazgos extracolónicos fueron vistos en 36% de los individuos sin diferencias significativas entre las deleciones parciales y de todo el gen. En 6 reportes de individuos con deleciones parciales y de todo el gen, se clasificaron con un fenotipo consistente con PAF opuesto a una PAF atenuada.

Gen *APC*

El gen *APC* tiene un peso de 108 kb de DNA genómico (138,742 pares de bases) desde la base 112.118.468 hasta la 112.209.532, está localizado en el cromosoma 5q22 y contiene 21 exones y codifica para una proteína formada por 2843 aminoácidos y 311646 Da. Normalmente este gen codifica para una proteína supresora tumoral, la cual actúa como antagonista de la vía de señalización de Wnt; promueve la rápida degradación de CTNNB1: la actividad de *APC* se correlaciona con su estado de fosforilación. Activa a GEF a través de SPATA13 y ARHGEF4. Además juega un rol de factor de crecimiento de hepatocito e induce la migración celular. Requiere de MMP9 para una sobrerregulación de la vía de señalización JNK en los tumores colorrectales. Actúa como mediador de ERBB2 dependiente de la estabilización de microtúbulos en la corteza celular. También es requerido para la localización de MACF1 en la membrana celular y esta localización de MACF1 es crítica para la función de estabilización de los microtúbulos. Los defectos en este gen son causales de la poliposis adenomatosa familiar (PAF), una enfermedad autosómica dominante premaligna que usualmente progresa a cáncer. Las mutaciones asociadas a la enfermedad tienden a estar agrupadas en una pequeña región llamada "mutation cluster región" (MCR) y los productos resultantes son aquellos correspondientes a proteína trunca. Mutaciones en *APC* han llevado a hacer algunas observaciones interesantes. 1) la gran mayoría de las mutaciones a la fecha pueden resultar en proteína *APC* trunca. 2) casi todas las mutaciones en *APC* ocurren en la primera mitad de la secuencia codificante y las mutaciones somáticas en los tumores colorrectales se encuentran en la región llamada MCR (mutation cluster region). 3) muchas de las mutaciones puntuales identificadas en el gen *APC* son transiciones de citosina por otro nucleótido. 4) la localización de las mutaciones en línea germinal tienden a correlacionar con el número de pólipos colorrectales en pacientes con PAF. La inactivación de ambos alelos de el gen *APC* son requeridas como un evento temprano para el desarrollo de adenomas y carcinomas de colon, recto y algunos en estómago.

Mutaciones en línea germinal de *APC*.

Estas se han demostrado en la mayoría de los pacientes, el 95% corresponden a mutaciones sin sentido o que cambian el marco de lectura, las cuales resultan en una proteína trunca con función anormal. Acorde con la hipótesis del doble hit de Knudson, los tumores colorrectales de pacientes con PAF portan mutaciones somáticas adicionales o pérdida de la heterocigocidad en este locus en adición a la mutación en línea germinal original.

Las mutaciones más comunes en línea germinal ocurren en los codones 1061 y 1309 entre estos se localiza un tercio de todas las mutaciones en línea germinal. Aparte de estos picos, las mutaciones en línea germinal en *APC* están distribuidas uniformemente entre los codones 200 y 1600, pero raramente ocurren cercanas al codón 1600.

El tipo de mutación germinal en *APC* parece determinar la naturaleza del segundo hit en *APC*. Si la mutación en línea germinal ocurre entre los codones 1194 y 1392, entonces hay selección para pérdida alélica de *APC* como segundo evento en el desarrollo de adenomas colorrectales.

Si la mutación en línea germinal esta fuera de esta región, el segundo hit en tumorigénesis es más probable que produzca una mutación truncada en la MCR (mutation cluster región).

Variantes sentido erróneo en APC.

Las variantes de sentido erróneo en *APC* han sido descritas en pacientes no PAF con múltiples adenomas o desarrollo de carcinoma a edad temprana. Una variante de sentido erróneo en particular I1307K, se encontró en judíos Ashkenazi, los portadores de ese alelo tienen alto riesgo de desarrollar múltiples adenomas y cáncer colorrectal. Esta variante (I1307K) consiste en una sustitución de T por A, produciendo un tracto de poly A, se asume que dicha variante precipita la polimerización y esta indirectamente predispone al desarrollo de cáncer.

Otra variante en línea germinal detectada por polimorfismos conformacionales de una sola hebra y fragmentos de restricción es E1317Q. Esta mutación ha sido detectada en pacientes con pólipos o cáncer colorrectal, incluso en controles normales. E1317Q codifica para una mutación en *APC* en la MCR que se encuentra entre los repetidos de 20 aminoácidos, que son sitios de unión a beta catenina.

Mutaciones somáticas en APC

Mutaciones somáticas resultan en la pérdida de heterocigocidad del alelo silvestre de *APC* en la mayoría de los carcinomas colorrectales esporádicos.

Mutaciones en *APC* ocurren de forma temprana durante la tumorigénesis. Las mutaciones somáticas se encuentran en la mayoría de los adenomas y carcinomas colorrectales, incluyendo adenomas >5 mm de tamaño. La inactivación de ambos alelos de *APC* ocurre muy comúnmente en el cáncer colorrectal.

Más del 60% de todas las mutaciones somáticas en *APC* ocurren dentro de un 10% de la región codificante de el gen, entre los codones 1286 y 1513; esta región es llamada MCR. Dentro de la MCR se encuentran 2 hot spots para mutación somática entre los codones 1309 y 1450. Las mutaciones dentro del MCR están asociadas con pérdida de la heterocigocidad, mientras que los tumores con mutaciones no MCR están acoplados con mutaciones truncas, estos datos indican que existe una fuerte presión selectiva para un mutante más ventajoso que el *APC* mutante que aparece por primera vez.

El número de transversiones contribuye menos de un 15% de todas las mutaciones somáticas en *APC*. Cualquier agente ambiental es causal en la tumorigénesis colorrectal.

Metilación del promotor de APC.

El gen *APC* tiene dos regiones promotoras IA y IB. El promotor IA es el más comúnmente activo. La hipermetilación del promotor ha sido postulada como un posible mecanismo de segundo hit en los tumores colorrectales donde solo se presenta una sola mutación. Trabajos iniciales en ratones Min con una disminución general de la actividad de metiltransferasas, demostró una reducción dramática en el desarrollo de tumores intestinales. La región promotora IA de *APC* ha mostrado ser altamente metilada en cánceres y adenomas colorrectales. Tumores con la hipermetilación del promotor también han fallado para expresar transcritos de *APC*. La hipermetilación del promotor IA también ha sido reportada en gran número de tumores gastrointestinales, incluyendo de esófago, pancreático y hepático. Hasta el momento no hay evidencia de mecanismos epigenéticos con el promotor IB de *APC*. Estos hallazgos sugieren que la hipermetilación del promotor IA puede proveer un mecanismo epigenético alternativo para la inactivación de *APC* en los estadios tempranos de la tumorigénesis colorrectal, pero puede ser un evento normal en la mucosa gástrica. Sin embargo, la preponderancia de mutaciones en *APC* y pérdida de la heterocigocidad de *APC* en tumores colorrectales impide que la hipermetilación sea uno de los principales eventos en este proceso.

Funciones y dominios de la proteína APC.

La proteína APC consiste en dominios de oligomerización y un dominio armadillo en la región N-terminal. Un número de 15 a 20 repetidos de aminoácidos en la porción central y un C-terminal contiene un dominio básico y un sitio de unión a las proteínas EB1 y HDLG.

Los múltiples dominios de la proteína APC permiten la interacción con numerosos pares de proteínas. La proteína APC es parte integral del mecanismo de señalización wnt, pero también juega un rol en la adhesión celular, estabilización de los microtúbulos del citoesqueleto, la regulación del ciclo celular y en la apoptosis. Cada dominio de APC tiene una importancia funcional.

La región armadillo

Consiste en una región de siete repetidos y muestra un alto grado de homología similar a un área en beta catenina. Es altamente conservado e invariablemente retenido en las proteínas APC mutantes. La región armadillo de APC ha mostrado unirse a la subunidad de la proteína fosfatasa A2, una enzima la cual también se une a axina vía subunidad catalítica. Este hallazgo puede sugerir que PPA2 puede actuar como antagonista de la fosforilación de la cinasa sintasa de glicógeno 3 beta, la cual marca a beta catenina para su posterior degradación.

Un rol alternativo para APC es la estabilización y motilidad del citoesqueleto de actina. Es probable que el dominio armadillo sea esencial para la supervivencia celular, es poco probable que juegue un papel integral en el rol de supresor tumoral.

Región de repetidos de 15 aminoácidos

Tres repetidos de 15 aminoácidos ocurren entre los aminoácidos 1020 y 1169, proveen sitios de unión para beta catenina. Estos sitios de unión a beta catenina de 15 aminoácidos en APC no marcan a beta catenina para su subsecuente regulación a la baja, a diferencia de los sitios de unión de 20 aminoácidos. Similar a la región armadillo los repetidos de 15 aminoácidos son retenidos en la mayoría de las proteínas APC mutantes. Esto es soportado por el hecho de que ambos tipos de APC, mutante y silvestre pueden unirse a beta catenina.

Región de repetidos de 20 aminoácidos.

La región central de la proteína APC contiene una serie de 7 motivos de repetidos de 20 aminoácidos. Estos fragmentos de APC contienen estos repetidos de unión a beta catenina, pero solo uno es esencial para dicha unión. La unión a beta catenina en estos sitios de APC solo ocurre después de la fosforilación de cada sitio por GSK3B. La unión de beta catenina a APC y a axina en un complejo es promovido por la fosforilación de cada uno de sus propios residuos de serina. De esta forma B catenina es marcada para su subsecuente degradación por proteólisis mediada por ubiquitinación. La regulación a la baja de B catenina es dependiente de la presencia de aproximadamente 3 de los 7 repetidos de 20 aminoácidos. El límite 3' de la región MCR en el gen APC cae en el codón 1513, el cual coincide con el final 3' del tercer repetido de 20 aminoácidos. La mayoría de las proteínas mutantes truncas, tienen ausencia total o en su mayor parte de los repetidos de 20 aminoácidos. Sugiere que esta área es blanco de eliminación durante el desarrollo del tumor.

Roles de APC y B catenina en la señalización WNT

Si B catenina no es fosforilada y por ende no regulada a la baja, esta se acumula dentro del citoplasma célula y núcleo. Acumulación de beta catenina puede ocurrir como el resultado de la señal wnt, por inactivación de APC o por mutaciones en sí misma. Dentro del núcleo B catenina

se asocia con miembros de la familia de activadores transcripcionales de factor de células T (TCF) y el factor promotor linfóide (LEF). TCF4 es expresado en el núcleo de células del epitelio intestinal. B catenina y TCF/LEF forman un complejo el cual activa la transcripción de genes blanco. Mutaciones en los genes APC o en B catenina previene la fosforilación mediada por GSK3B y la subsecuente degradación de B catenina. Resultando en la acumulación, activación y transcripción B catenina.

B catenina tiene aproximadamente 2 dominios de activación transcripcional. Los cuales probablemente actúan en colaboración. Se ha demostrado que los dominios de activación transcripcional reaccionan directa y específicamente con la proteína de unión TATA. El objetivo para la activación transcripcional por B catenina incluye el oncogén c-myc y ciclina D1, los cuales regulan la progresión del ciclo celular. Otros objetivos posibles incluyen las proteínas conexas 43 y la metaloproteinasas matrilisina.

Sitios de unión a axina en APC.

Axina es el homólogo de la proteína murina de fusión. Axina se une a los sitios de unión a APC presentes dentro de la región de unión a beta catenina (repetidos de 20 aminoácidos). Se une a APC entre el tercero y el cuarto, cuarto y quinto y después del séptimo repetido de 20 aminoácidos. Cada sitio de unión a axina contiene la secuencia de aminoácidos SAMP, la cual si esta alterada, resulta en la abolición de la unión de axina a APC.

La sobreexpresión de axina estimula el incremento de la degradación de beta catenina.

Axina parece actuar como andamio en la formación de un complejo de APC con B catenina, dentro de la vía de señalización de por reducción de la cuenta de B catenina disponible para activación transcripcional.

La ausencia de señal en wnt lleva a la fosforilación de axina mediada por GSK3B y eficiente unión de APC a B catenina.

Los roles de APC y B catenina en la adhesión intercelular.

El hecho de que B catenina se une a APC implica que APC puede tener un rol en la adhesión celular epitelial. Las cateninas alfa, beta y plakoglobina (gama catenina) están todas asociadas con cadherinas las cuales median la adhesión intracelular. E-cadherina es responsable de la adhesión célula-célula en las células epiteliales, con esto las cateninas se unen a un dominio citoplásmico que es esencial para su función. El dominio citoplásmico en cadherinas comparte la secuencia SLSSL encontrada en 4 de los repetidos de 20 aa de APC. B catenina localiza la unión adherente a la zonula e interactúa con E-cadherina para unirse después a la alfa catenina y de allí a la red de actina. La interacción entre E cadherina y B catenina es regulada por la fosforilación de tirosina. APC citoplásmico se acumula predominantemente en los bordes de las células, para visualizarlo depende de la presencia de microtúbulos intactos (pero no de la red de actina).

APC contribuye a ordenar la migración de las células intestinales dentro de las criptas intestinales y B catenina juega un rol crucial en esta función. De hecho, si APC es sobre expresado, la migración de células epiteliales en modelos murinos, se torna desordenada. APC y E cadherina compiten por sitios de unión de la región armadillo en B catenina, pero mientras la unión de una excluye la otra, esto parece separar (sobrelapar) regiones de B catenina mediante su rol en la señalización de wnt y adhesión celular. Ciertamente parece afectar una vía que podría impactar en la otra, pero la naturaleza precisa de esta interacción no está clara.

El dominio básico en APC.

El dominio básico de APC se encuentra dentro de la región C-terminal de APC entre los aminoácidos 2200 y 2400. Estos dominios derivan su nombre de una proporción grande de residuos básicos arginina y lisina. Pero también contiene un inusual alto porcentaje de residuos de prolina. Esta combinación sugiere que el dominio básico es probablemente un sitio de unión a microtúbulos, una teoría que ha sido comprobada es que el C-terminal de APC se une a microtúbulos y estimula la polimerización de tubulina in vitro.

Las proteínas APC truncas encontradas en tumores colorrectales rara vez retienen el dominio básico.

El dominio de unión EB1 de APC

El C terminal de APC también contiene un sitio de unión para la proteína EB1. EB1 se ha encontrado estar asociada con el centrómero, huso mitótico y microtúbulos distales en todos los estadios del ciclo celular. Si el dominio de unión EB1 es eliminado de la proteína APC, este último todavía puede unirse a los microtúbulos, pero lo hace indiscriminadamente. Estos hallazgos sugieren que EB1 dirige a APC a los extremos de los microtúbulos y puede entonces facilitar la interacción de APC con otros sitios específicos de la membrana celular. EB1 por sí misma no parece jugar un rol directo sobre la tumorigenesis, mutaciones somáticas en el gen EB1 no se han encontrado en tumores colorrectales y en ratones transgénicos con proteínas truncas con ausencia del sitio de unión EB1 en APC.

El sitio de unión HDLG en APC

HDLG es el homólogo de *Drosophila* (Discs large tumour suppressor protein). El C terminal de APC se une a HDLG, asociación que se encuentra abolida por una deleción final de 72 aminoácidos de APC mientras un fragmento de APC contiene solo estos 72 aminoácidos asociados fuertemente con HDLG. La sobreexpresión de APC suprime la progresión del ciclo celular desde G0/G1 a la fase S, evidencias recientes sugieren que el complejo APC-HDLG es responsable de este efecto en una manera independiente del efecto de B catenina en el ciclo celular.

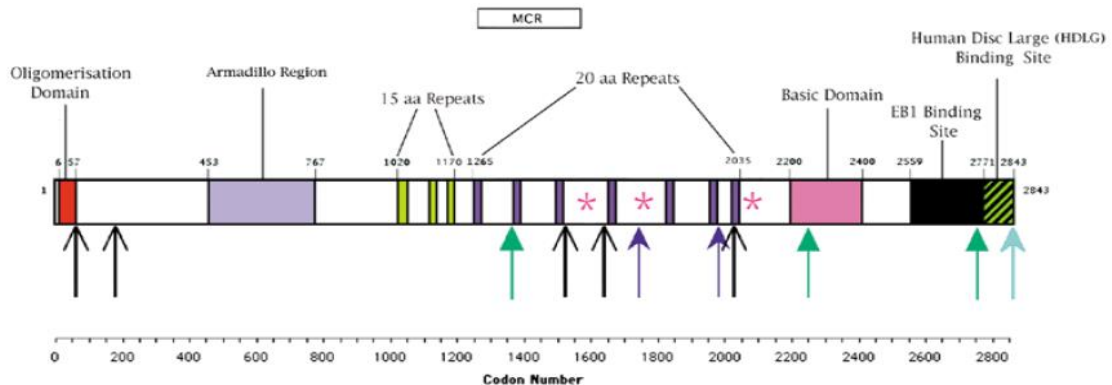


Figura 1. Dominios funcionales de la proteína APC. Los asteriscos rosas indican sitios de unión a axina en los repetidos SAMPs. Las flechas negras marcan NEs. Flechas moradas indican sitios de NLS. Las flechas verdes indican las posiciones de unión con DNA. el extremo 3' se localiza antes de la localización del MCR en su porción de unión a axina (Human molecular genetics, 2001, 721-733).

Papel funcional de APC en el núcleo

Ha sido reconocido por algún tiempo que APC se encuentra dentro del núcleo, así como en el citoplasma. Evidencia más reciente sugiere que APC puede transportar B catenina entre el núcleo y el citoplasma.

APC es demasiado grande para entrar en el núcleo sin la presencia de una señal de localización nuclear, la cual puede ser reconocida por importinas las cuales median la translocación de una manera dependiente de energía.

La presencia de APC dentro del núcleo puede interactuar directamente con DNA. Tres potenciales sitios de unión han sido mapeados, cada uno contiene un grupo de 3 y 5 secuencias repetidas S/TPXX. Los primeros sitios de unión se sobrelapan con la porción proximal del segundo repetido de 20 aminoácidos, el segundo se ubica dentro del dominio básico y el último cercano a el C-terminal de APC. Estos dominios se pueden unir preferencialmente a secuencias ricas en A/T y regulan directa o indirectamente la transcripción. Si APC muestra interacción simultáneamente con los microtúbulos y con DNA estos podrían indicar un rol directo en la división celular.

APC y apoptosis.

En el colon humano normal, la expresión de APC es limitada en las células de las criptas luminales. Las células son el techo de la superficie luminal después de la apoptosis (muerte celular programada). Contacto intercelular y las citocinas específicas proveen protección en contra de la apoptosis en células epiteliales colónicas. Las células epiteliales adenomatosas muestran patrones desordenados de apoptosis pero permanecen susceptibles a las señales apoptóticas. Esto es posible ya que APC juega un rol indirecto en la regulación de la apoptosis, como la inducción de la expresión de APC tipo silvestre en una célula cancerosa con un incremento de muerte celular con APC mutante. Existe evidencia preliminar de la región de APC involucrada en la regulación de la apoptosis coincide con la región que media la unión y degradación a beta catenina. Apoptosis está asociada con el exporte de células desde la matriz extracelular o desde los contactos celulares. Es concebible que APC tenga un impacto indirecto en la adhesión intracelular y el matiz extracelular, esto provee estímulos para apoptosis.

Localización de APC intracelular

Dentro de las localizaciones subcelulares del producto de APC este se puede encontrar en las uniones celulares y como proteína de adherencia celular, en el citoplasma, citoesqueleto, en la proyección celular hacia el exterior.

Expresión tisular de APC

En cuanto a la expresión normal de este gen en los tejidos humanos se observa una sobreexpresión desde etapa embrionaria preferencialmente hacia sistema nervioso central (cerebro y medula espinal). La evidencia de expresión aumentada sobre tejidos está documentada y corresponde a sistema nervioso central, hígado, sangre periférica e intestino. La expresión diferencial proteica está caracterizada por sobreexpresión en el humor vítreo y en el cerebro fetal.

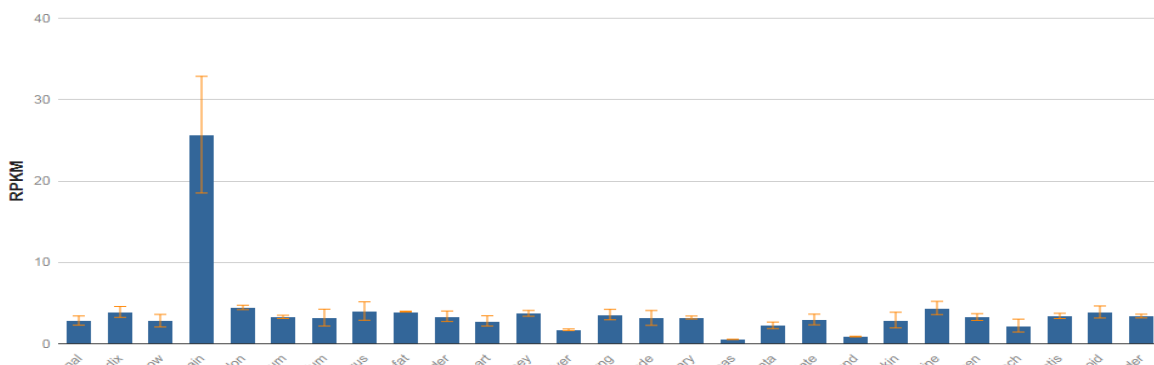


Figura 2. Muestras de tejido de 95 individuos humanos que representan 27 tejidos diferentes para determinar la especificidad tisular de todos los genes que codifican proteína (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Vías de señalización en las cuales interviene APC.

- Vía de señalización Wnt en cáncer
- Vía de señalización beta catenina
- Degradación de beta catenina por el complejo de destrucción
- Regulación del citoesqueleto de actina.
- Muerte celular programa

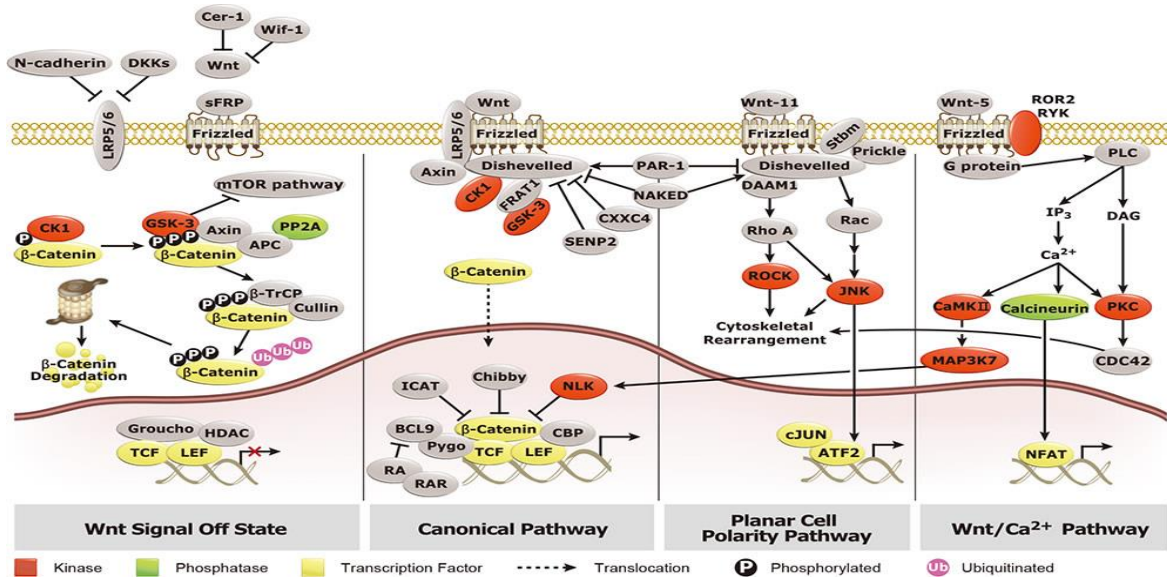


Figura 3. Las proteínas Wnt son morfógenos secretados que se requieren para diversos procesos de desarrollo; que incluyen la determinación del destino celular, la proliferación celular y la muerte celular. Después de unirse al receptor Frizzled, se activan tres vías: la vía canónica, la vía de polaridad celular plana y la vía Wnt / Ca²⁺ +. En la vía canónica, la principal β-catenina efectora ingresa al núcleo y promueve la expresión génica regulada por Wnt. La ruta de polaridad celular plana promueve la remodelación del citoesqueleto y el movimiento celular a través de la activación de RhoA y Rac. La vía Wnt-Ca²⁺ + media múltiples funciones a través de un aumento en los niveles transitorios de Ca²⁺ + y la posterior activación de PKC, CAMKII y calcineurina. Las vías de Wnt no solo facilitan varios aspectos de la embriogénesis, incluida la polaridad apical / basal y el patrón del tubo neural, sino que también inducen la tumorigénesis. Wnt señalización también se ha informado recientemente para regular la diferenciación de células madre. (<http://www.genetex.com>).

OBJETIVOS

GENERAL

Conocer los diferentes tipos de mutaciones en pacientes con poliposis adenomatosa familiar e identificar si existen posibles diferencias en el fenotipo dado por el tipo de mutación.

ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia de mutaciones tipo delección/duplicación (Rearreglos genómicos grandes) en el gen *APC* mediante la técnica de MLPA.
2. Determinar la frecuencia de mutaciones puntuales en el gen *APC* mediante la técnica de secuenciación masiva.
3. Establecer una probable correlación genotipo-fenotipo en individuos con mutaciones puntuales y tipo delección/duplicación en el gen *APC*.
4. Brindar adecuado asesoramiento genético a los pacientes y familiares portadores de este tipo de mutaciones en *APC*.

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Se trata de un estudio descriptivo, observacional, transversal y prolectivo. En cuanto a la recolección de la muestra se realizó por conveniencia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

EN MÉTODOS FALTA AGREGAR EL PROTOCOLO DE LABORATORIO DE LA TÉCNICA DE MLPA. YA ESTA ESCRITO, PIDESELO A YEVGENIYA.

La muestra analizada se obtuvo de la revisión de los expedientes de pacientes referidos a la consulta del departamento de Genética en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" con diagnóstico clínico de PAF, en el período de febrero 2017-febrero 2018.

Todos los casos se revisaron en la base de datos del departamento de Genética y del archivo clínico del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Se seleccionaron 8 casos no relacionados para el fenotipo clásico. Y se consideraron los casos que clínicamente podían corresponder al fenotipo de poliposis adenomatosa familiar atenuada, estos correspondieron a 3 casos no relacionados.

De todos los casos que se seleccionaron se tomó en cuenta estudios de gabinete como tomografías computadas de abdomen, colonoscopías y el reporte de anatomía patológica de las biopsias o espécimen quirúrgico completo.

Para el presente estudio se realizó una entrevista clínico-genética, para definir el caso en estudio podía corresponder a un caso de PAF. Consideramos un caso de PAF cuando se contaba con la encuesta clínico genética, el reporte de colonoscopia y reportes histopatológicos compatibles con PAF.

Para cada caso clínicamente compatible con PAF se realizó secuenciación del gen *APC* mediante amplificación mediante múltiplex PCR con Multiplicon Master Assay 2.1 del gen *APC* (NM_000038.5) según nomenclatura recomendada por la Human Genome Variation Society. Posterior secuenciación masiva en el pirosecuenciador 454 GS Junior (Roche). Las variantes encontradas fueron clasificadas tras la revisión de la literatura científica actual y la información contenida en las siguientes bases de datos:

- a) HGDM (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)
- b) LOVD (<http://www.lovd.nl/3.0/home>)
- c) UMD (<http://www.umd.be>)
- d) NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

Se describen como mutaciones patogénicas aquellas conocidas como causantes de enfermedad en las bases de datos consultadas o en la revisión bibliográfica realizada.

No se incluyeron variantes codificantes sinónimas, ni variaciones intrónicas, que hayan sido previamente establecidas como clínicamente no relevantes en el desarrollo de la patología, según la evidencia científica actual.

Sin embargo, la ausencia de mutaciones en el gen APC no excluyen esta patología, y debido a que podemos encontrar un resultado negativo, consideramos el estudio de alteraciones en el gen APC no detectables mediante secuenciación (grandes deleciones/duplicaciones), por lo que en los casos encontrados con estas características se realizó la técnica de MLPA (Amplificación de sondas múltiples dependientes de ligamiento) usando el kit SALSA-MLPA® P043-D1 APC. Por el método siguiente:

SALSA® MLPA® probemix P043 APC diseñado diagnóstico in vitro, exclusivo para la detección de deleciones o duplicaciones en el gen APC humano, el gen MUTYH y la región río arriba del gen GREM1, con el fin de confirmar una posible causa y diagnóstico de PAF, la poliposis asociada a MUTYH (MAP) o síndrome de poliposis mixta hereditaria, respectivamente. Además las mutaciones puntuales más comunes en el gen MUTYH entre los europeos pueden detectarse mediante la sonda P043. Las alteraciones detectadas con la sonda P043 APC se verificaron con QT-PCR.

Especificaciones de la sonda

Sonda probemix P043-E1: esta sonda de MLPA, SALSA P043 contiene 45 sondas de MLPA con productos de amplificación entre 130 y 438 nt; 29 sondas para APC, 6 sondas para el gen MUTYH, 2 sondas GREM1, y 8 sondas de referencia.

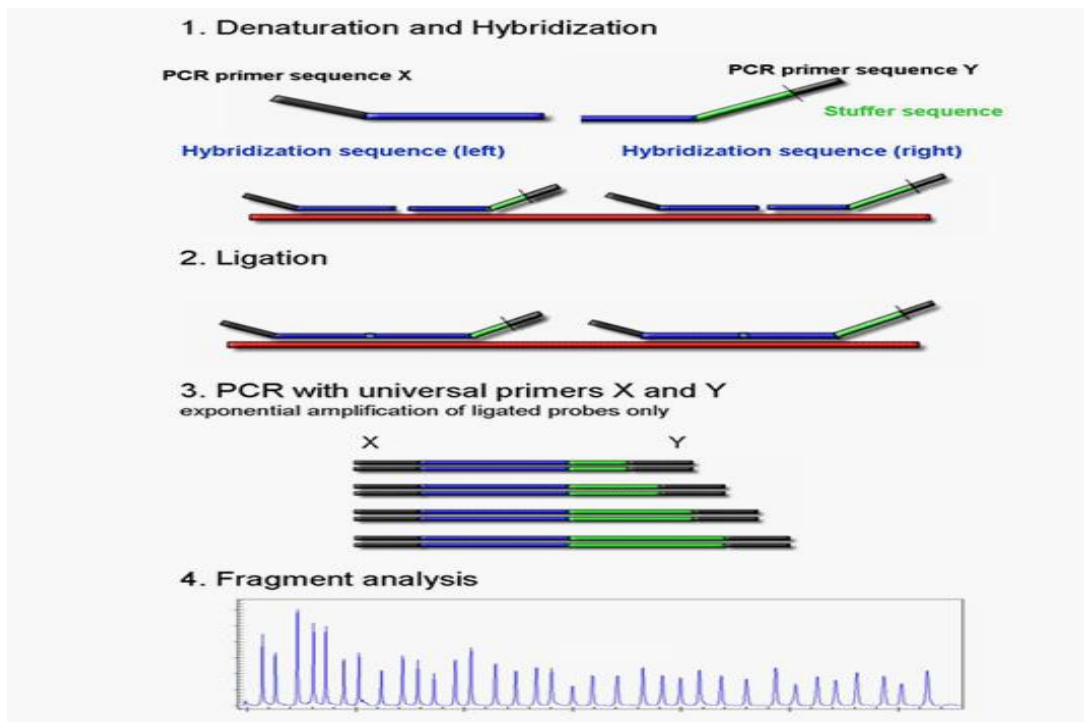


Figura 4. Únicamente cuando las dos sondas se encuentren hibridadas correctamente podrán ser ligadas (Fig. 1: paso 2), para posteriormente ser amplificadas por PCR (Fig. 1: paso 3). Finalmente, los productos amplificados generarán fragmentos de longitud variable que serán separados por

electroforesis capilar y analizados en un secuenciador automático, pudiéndose estimar la cantidad de producto obtenido mediante la emisión de un pico de señal. (Fig. 1: paso 4). Las hemisondas que no fueran ligadas, no podrán ser amplificadas exponencialmente, y por consiguiente no generaran señal. Los resultados serán analizados mediante un software. El área de señal de intensidad de pico de los productos de PCR puede ser medido, permitiendo inferir la cantidad de secuencia presente. Una disminución del área de señal indica delección y un aumento duplicación.

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

Para todos los casos seleccionados se tomaron en cuenta los siguientes datos clínicos:

1. Historia familiar de >20 adenomas y/o cáncer de colon.
2. Mutación deletérea en APC conocida por medio de SNG (secuenciación de nueva generación) (LABCONOUS) o estudio de secuenciación negativo para variantes patogénicas en el gen APC.
3. Historia personal de tumores desmoides, hepatoblastoma, cáncer papilar de tiroides en su variante cribiforme-morular o multifocal, hipertensión congénita del epitelio pigmentario de la retina bilateral, 10 a 20 adenomas en colon.

Criterios de exclusión:

Que el paciente no cumpla cualquiera de los criterios mencionados.

Criterio de eliminación:

Que el paciente en cualquier momento del estudio decidiera no seguir colaborando.

RESULTADOS:

El tamaño de la muestra estuvo constituido por un total de 12 casos familiares no relacionados con poliposis adenomatosa familiar. 9 casos familiares (33 individuos) correspondieron al fenotipo clásico (72.7%) se asoció con la presencia de >100 pólipos por medio de la colonoscopia y 3 casos (3 pacientes) al fenotipo atenuado (27.2%) donde se observaron pólipos en un rango de <20. El total de la muestra consistió en 33 pacientes. La edad de presentación de poliposis se estimó en un rango de los 10-50 años de edad. Se realizaron estudios moleculares en menores de edad asintomáticos para descartar riesgo de hepatoblastoma. El promedio de edad de presentación de la enfermedad fue de 43.9 años de la muestra total. Y de 28 años para el fenotipo clásico y de 36.3 años para el fenotipo atenuado.

I Clasificación de los pacientes en el presente estudio.

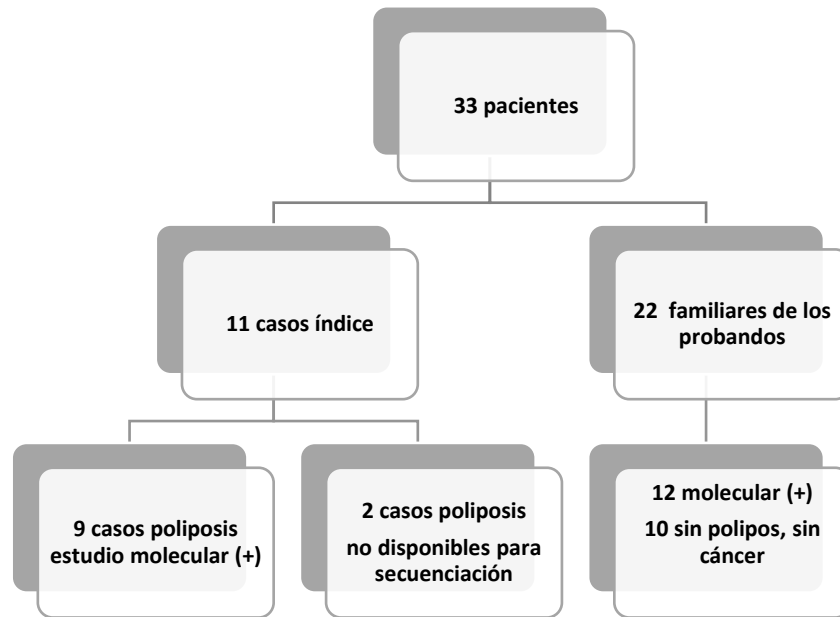


Figura 5. El esquema corresponde a la clasificación de el numero total de individuos en el presente estudio y su clasificación en 11 probandos o casos índice, de este grupo se cuenta con 9 casos con estudio molecular que confirma la enfermedad. Posterior a la detección de una mutación causal de enfermedad se extendió la búsqueda a familiares en riesgo (22), lográndose detectar las mismas variantes en 12 familiares asintomáticos.

Continuando con el algoritmo diagnóstico establecido por el grupo de trabajo internacional de cáncer (NCCN), se solicitó estudio de secuenciación masiva sobre el gen APC en 11 pacientes de casos no relacionados de 12 familias. Sin embargo, solo 9 casos índice no relacionados estuvieron disponibles para realización de dicho estudio. Por lo tanto, el estudio molecular de 2 familias (16 individuos) con criterios clínicos de poliposis adenomatosa familiar no se logró realizar. De los casos en los que el estudio de secuenciación no reportó variantes patogénicas asociadas a la enfermedad (2 casos con fenotipo clásico y 3 casos con fenotipo atenuado), se procedió a la realización de MLPA en búsqueda de Re arreglos genómicos tipo delección/duplicación sobre el gen APC (solo estuvo disponible un caso con fenotipo clásico y otro con fenotipo atenuado). En cuanto a las mutaciones puntuales en PAF se identificaron 4 distintas variantes patogénicas en 4 individuos no relacionados con fenotipo clásico de PAF, todas localizadas en el exón 15. En cuanto a los hallazgos en relación al estudio de deleciones y duplicaciones en el gen APC en un caso se encontró la delección completa de la región promotora de APC y el otro caso no estuvo disponible para su estudio. Finalmente se realizó un análisis de correlación genotipo fenotipo con las variantes patogénicas y los casos estudiados, los cuales se comentarán con detalle a continuación.

Los casos que no cuentan con estudio molecular, se negaron a su realización, continuaron su seguimiento como PAF clásica.

En cuanto a los familiares en riesgo (22 individuos) de los casos índice detectados, seis (4 femeninos y 2 masculinos) de estos 22 ya habían desarrollado poliposis y 4 ya presentaban cáncer colorrectal al momento del análisis. El rango de edad para este grupo se encontraba entre los 25 y 40 años de edad.

La tabla resume las mutaciones encontradas por secuenciación masiva y MLPA complementario en los casos índice analizados (6 individuos), el fenotipo clínico y los antecedentes heredofamiliares.

Tabla 2: mutaciones y fenotípico clínico de pacientes reportados en el presente estudio.

Sexo	Mutación, región afectada, cambio proteico	Edad de presentación	Número de pólipos	CRC Edad al Dx de CCR	Formas extracolónicas	Historia familiar
M	c.4348C>T, p.Arg1450X	13	>100	(-)	adenomas duodenales, osteoma	(+) padre y hermano con PAF
M	c.3460delG, p.Glu1154LysfsTer11	30	>100	30	osteomas	Dos hijos (+)
M	c.3927_3931delAAAGA p.Glu1309AspfsTer	44	>100	44	(-)	(+) madre, dos hermanas con ca colon
F	c.G3289T, p. Glu1097Ter	37	3	(-)	adenocarcinoma del ámpula de Váter	(-)
F	del promotor 1A, 1B, exón	54	>100	(-)	lipomas	(+) abuela materna, madre y dos hermanos con cáncer de colon

De las mutaciones encontradas, logramos documentar cuatro variantes patogénicas del tipo puntual, en todas se produce un codón de paro prematuro. En un caso se documentó la delección completa de la región reguladora (ambos promotores) del gen *APC*.

La mutación (c.3460delG) se localiza en el exón 15, origina un desplazamiento del marco de lectura generado a partir del aminoácido 1154, ocasionando un codón de paro prematuro y genera una proteína trunca de 1164 aminoácidos, esta mutación se encuentra entre los codones 168 y 1580 lo cual se relaciona con aparición de síntomas gastrointestinales (poliposis, sangrado de tubo digestivo bajo y cáncer de colon) a los 30 años. Esta misma mutación se detecto en dos hijos del probando, menores de edad (gemelos monocigotos) y posteriormente se descartó hepatoblastoma por USG, enviaron a un centro de referencia pediátrico para su seguimiento como familiares en riesgo portadores de una mutación en *APC*. Dicha mutación no ha sido previamente reportada en la literatura. En el estudio in silico se informa su carácter patogénico. Otra mutación fue reportada en un caso familiar que corresponde a una delección de cinco pares de bases, localizada en el exón 15, ((c.3927_3931delAAAGA) (rs121913224)) localizada en el codón 1309, ésta delección genera un codón de paro en el aminoácido 1312, es la más frecuentemente observada en los pacientes con poliposis adenomatosa familiar con fenotipo clásico. Esta variante patogénica se asocia con la aparición de la sintomatología a una edad temprana, así como la presentación de cáncer de colon. En este caso se detectó esta misma alteración en la descendencia del propósito (una hija de 25 años de dicho individuo), con antecedente de múltiples pólipos reportados por colonoscopia. La mutación ((c.4348C>T (rs121913332)), corresponde a una variante reportada previamente como patogénica, que se localiza en el exón 15, es una mutación sin sentido que genera una proteína trunca de 1450 aminoácidos. Por su localización también se relaciona con la presencia de más de 1000 pólipos en todo el colon, esta misma alteración a nivel del gen *APC* se detecto en el hermano del probando que tenía múltiples pólipos en el informe de colonoscopia. La cuarta mutación puntual encontrada en las familias analizadas (G3289T) se localiza en el exón 15, comprende un cambio de nucleótido en la posición 3289, que genera una proteína trunca de 1097 aminoácidos. Esta mutación tampoco ha sido documentada previamente en reportes de familias con PAF.

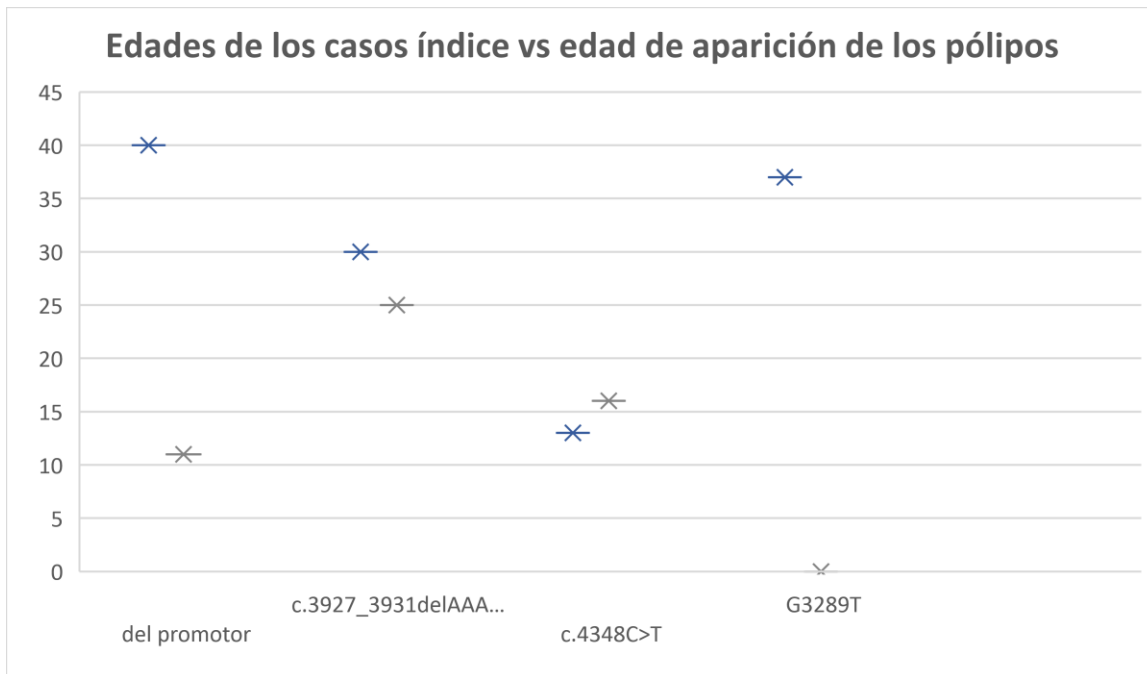


Figura 6. Este grafico nos permite apreciar la diferencia en la edad de aparición de la sintomatología gastrointestinal que pudiera estar en función de la variante patogénica encontrada. Todas se encuentran dentro de la MCR, con excepción de la delección de ambos promotores del gen APC. No se encuentra diferencia en la frecuencia de estas mutaciones por sexo.

Por otro lado, los hallazgos reportados en el análisis de MLPA de los casos índice con secuenciación negativa, un caso corresponde a la delección de los promotores IB y IA del gen APC, ambos corresponden a la región reguladora de la transcripción en APC, lo que se traduce en pérdida de la expresión y depleción proteica. Este cambio no ha sido reportado, contamos con casos en el mundo donde se observó la pérdida del promotor IB o del IA pero nunca en conjunto. Podemos suponer que esta alteración predispone a una aparición tardía de la enfermedad, sin embargo, este estudio correspondería al primer reporte de una familia con esta variante causante de enfermedad.

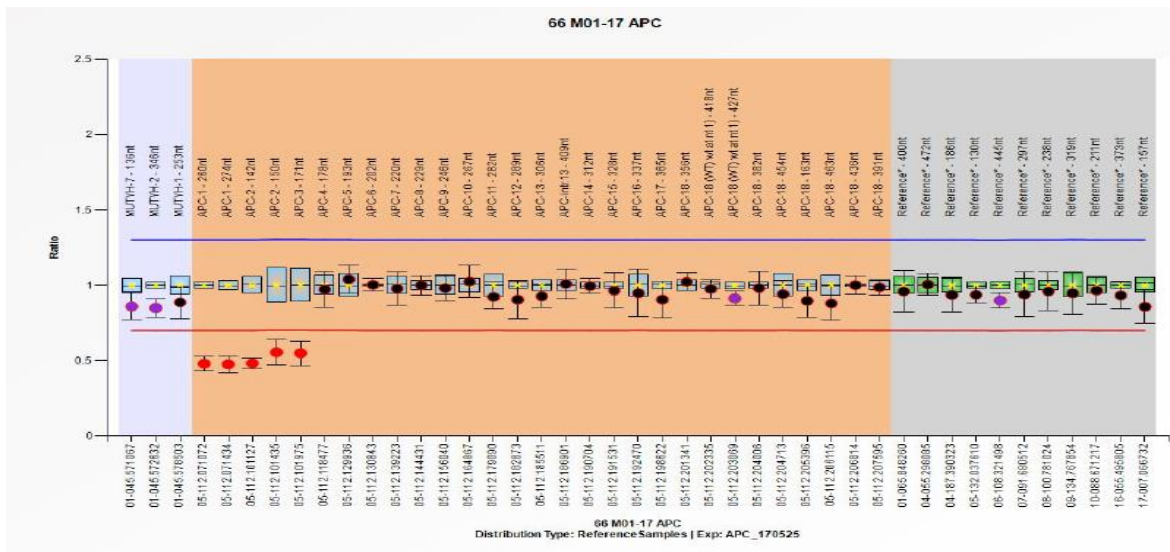


Figura 7. Resultado de la prueba de MLPA, mostrando delección de 5 sondas correspondientes a los promotores 1B y 1A de APC.

DISCUSIÓN:

Durante esta evaluación pudimos documentar mutaciones puntuales y delecciones grandes sobre el gen APC siguiendo el algoritmo diagnóstico recomendado para los pacientes con poliposis colónica, dentro de estas, 2 mutaciones son variantes patogénicas previamente no reportadas en la literatura y la delección de la región promotora de APC puede ser considerada el primer caso reportado a nivel mundial.

En nuestro estudio reportamos que de un total de la muestra, 72% de los casos confirmados corresponden al fenotipo clásico, y el 9% de los casos restantes presentaban un fenotipo atenuado, estos resultados coinciden con lo previamente reportado por la literatura (Nieuwenhuis). Múltiples estudios realizados partir de 1991 se han enfocado a tratar de establecer una posible correlación genotipo-fenotipo según la región afectada del gen APC y su traducción clínica. En el año de 1992 se realizó el primer análisis de correlación genotipo-fenotipo al proponer una mutación truncada entre los codones 1250 y 1464 con la presencia de >5000 pólipos colorrectales en los individuos portadores. Ahora se conoce que mutaciones sobre el codón 1309 (localizados entre los codones 1250 y 1464) están asociadas con poliposis grave y edad temprana de los síntomas. Por otro lado, ya también se sabe que la mayoría de las mutaciones en línea germinal de el gen APC que llevan a un fenotipo intermedio están localizadas en el codón 157 y 1595 (excluyendo la MRC). Información de PAF atenuada por alteraciones puntuales o genómicas en APC se ha centrado en la región 5' y 3', además del exón 9 codón 312-412 donde se localiza un sitio de splicing alternativo, estas alteraciones se expresan clínicamente con la aparición de una menor cantidad de pólipos (<100) a una edad mayor (4ta-5ta década de la vida).

En este reporte llama la atención que todos los pacientes con el fenotipo clásico (>20 adenomas y/o antecedente de cáncer de colon) presentaron una mutación puntual en el exón 15 del gen APC. Este sitio corresponde a dos tercios de la región codificante del gen, además de que contiene la MCR (rica en repetidos de 15 y 20 aa) que en la proteína corresponden a sitios indispensables para su interacción con beta catenina, estas uniones son indispensables para el marcaje por fosforilación y la posterior degradación de beta catenina. La regulación a la baja de beta catenina es dependiente de la presencia de aproximadamente 3 de los 7 repetidos de 20 aa en APC. La no degradación de

beta catenina tiene resultados catastróficos como su acumulo en el núcleo que en asociación con el factor de células T y el factor promotor linfoide activan la transcripción de genes blanco que incluyen el oncogén *c-myc*, ciclina D1 los cuales regulan la progresión del ciclo celular. Otros posibles genes blanco incluyen la proteína de unión gap conexina 43 y la proteinasa matrilisina. Clínicamente esto se traduce como la pérdida de función normal de *APC* como un evento temprano corresponde a la patogénesis de cáncer, ocurriendo lesiones adenomatosas como un estadio precancerígeno.

Además de las mutaciones puntuales, las deleciones alélicas grandes de la región codificante *APC*, un rango anormal de isoformas de mRNA, la expresión alélica reducida o ausente, cambios en la secuencias intrónicas profunda, han sido reportadas en pacientes con PAF, en adición a esto una pequeña fracción de familias con PAF han sido asociadas con defectos en línea germinal que involucran la región promotora de *APC* que mantienen la secuencia génica intacta, como es el caso del paciente índice que reportamos con una deleción que involucra los promotores IB y IA, esta misma deleción también fue identificada en otros familiares en riesgo, incluyendo dos de sus hijos. La probando cuenta con hermanos portadores de la deleción e inclusive con cáncer de colon. Por MLPA no podemos establecer el limite preciso de esta deleción y si es que hay secuencias alternativas cercanas a esta región.

La existencia de dos promotores en *APC* ha sido bien documentada, así como la ocurrencia bajo una gran variedad de condiciones de múltiples transcritos de *APC* de forma tejido específica. El promotor IB esta localizado aproximadamente 30 Kb río arriba del promotor IA. Por lo tanto, podemos establecer la teoría de la consecuencia funcional de esta nueva deleción de ambos promotores. Estos datos sugieren que la mutación por deleción genómica de los promotores de *APC* da como resultado falta de transcripción del alelo mutante portador de la deleción lo que conduce a AFAP en esta familia.

A continuación, presentamos una tabla comparativa de los estudios que se han realizado hasta el momento alrededor del mundo con deleciones en la región promotora de *APC*, ningún reporte hasta el momento es idéntico al que obtuvimos por medio de MLPA (**Tabla 3**).

Hasta el momento no ha sido reportada una alteración genómica como la que identificamos en este trabajo. Rohlin et al. describieron por primera vez la deleción completa del gen *APC*, (incluyendo ambos promotores) en 5 familias con poliposis adenomatosa familiar con fenotipo clásico; en este trabajo Rohlin propone la recombinación homóloga no alélica entre las regiones flanqueantes de la ruptura, como el mecanismo de formación del rearreglo genómico ya que son ricas en elementos SINE, con la posterior confirmación de la ausencia de expresión de productos funcionales y el desarrollo de enfermedad. Sin embargo, el resto de los artículos revisados donde se ha documentado la deleción del promotor IB con su confirmación mediante la expresión reducida en tejidos específicos, es la principal causa de PAF, una de las explicaciones es que se ha observado que este promotor tiene un rol funcional mayor que el promotor IA. Pero aun, hay algunas discrepancias en cuanto al tamaño de las deleciones, los transcritos producidos a partir de estas alteraciones y el fenotipo encontrado en los pacientes. Debido a la baja frecuencia de este tipo de rearreglo genómico en PAF aun es complicado poder establecer una correlación genotipo-fenotipo.

Tabla 3. *Deleciones en el promotor de APC.*

Referencia	País	Delección	Localización genómica	Secuencia de la ruptura 5´	Secuencia de la ruptura 3´
Presente estudio	México	NA	?-112,707,473 112,738,449- 112,754,878	NA	NA
Rohlin, A. <i>et al.</i>	Suecia	~61 Kb (~19 Kb and ~42 Kb)	112,645,201- 112,663,968 112,665,480- 112,707,631	L2 (LINE/L2) <i>AluSx3</i> (SINE/ <i>Alu</i>)	L1PA15 (LINE/L1) Secuencia única
Charames, G. S. <i>et al.</i>	Canadá	NA	NA	NA	NA
Kadiyska, T. K. <i>et al.</i>	Bulgaria	~22 Kb	112,697,798- 112,719,688 insTTGCTCTA TGACCAATT	Secuencia única	<i>AluSx</i> (SINE/ <i>Alu</i>)
Lin, Y. <i>et al.</i>	Estados Unidos	~11 Kb	112,699,129- 112,710,148	MER2 (DNA/TcMar- Tigger)	Secuencia única
Pavicic, W. <i>et al.</i>	Finlandia	132 Kb	112,578,669- 112,710,741	MLT1A0 (LTR/ERVL- MaLR)	MIRb (SINE/MIR)
Snow, A. K. <i>et al.</i>	Estados Unidos	11 Kb	112,699,129- 112,710,148	MER2 (DNA/TcMar- Tigger)	Secuencia única
Ranzani, N. <i>et al.</i>	Italia	7 Kb	112,703,831- 112,710,688	MLT1N2 (LTR/ERVL- MaLR)	MIRb (SINE/MIR)
Yamaguchi, K. <i>et al.</i>	Japón	10 Kb	112,700,228- 112,709,815	<i>AluSq2</i> (SINE/ <i>Alu</i>)	<i>AluJb</i> (SINE/ <i>Alu</i>)

La tabla 3 resume los estudios previamente reportados en la literatura, así como la comparación con nuestros hallazgos. (Incluye tamaño de la delección, secuencia genómica y la localización genómica).

Otro punto que vale la pena destacar sobre el uso de pruebas genéticas predictivas en pacientes asintomáticos, como es el caso del grupo de los 22 familiares los cuales recibieron un asesoramiento preprueba donde se explicaron las ventajas y desventajas del estudio, se resolvieron dudas y se procedió a la toma de la muestra. Posteriormente el asesoramiento postprueba, al entregar los resultados a cada individuo y dependiendo de su condición fue que se le asignó un estado de individuo sano al no haber heredado la variante patogénica o de individuo con probable poliposis adenomatosa familiar que amerita un seguimiento como lo indica la última revisión de las guías NCCN con el objetivo de reducir al máximo el riesgo de cáncer de colon en estos pacientes. El seguimiento está basado principalmente en la realización de colonoscopia o una sigmoidoscopia flexible cada 12 meses a partir de los 15 años. Otro aspecto a tomar en cuenta son las manifestaciones extracolónicas, el seguimiento de estas se basa en la realización de una panendoscopia que se debe iniciar dentro de los 20 a 25 años, examen anual de tiroides el cual inicia en la adolescencia tardía. Examen neurológico anual, resonancia magnética abdominal para vigilar la aparición de tumores desmoides intraabdominales cada 5 a 10 años. El riesgo de hepatoblastoma se considera elevado los primeros 5 años de vida por lo que en la infancia de un individuo portador de una variante patogénica es imprescindible la toma de alfa fetoproteína cada 3 a 6 meses. En nuestro caso se inició con la realización de colonoscopias de todos los individuos positivos para una

mutación en *APC* (6 pacientes) y en caso de los menores de edad (2 pacientes), se solicitó USG hepático y determinaciones de alfafetoproteína.

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo logramos identificar distintos tipos de variantes patogénicas en un grupo de pacientes con datos clínicos de poliposis adenomatosa familiar.

Documentamos 4 diferentes mutaciones puntuales, todas contenidas dentro del exón 15 del gen *APC*. Los pacientes afectados presentaron un fenotipo clásico con aparición de los pólipos en la adolescencia. Dos casos con datos de malignización antes de los 40 años. Por otro lado, describimos el caso de un paciente portador de rearreglo genómico tipo deleción en ambos promotores del gen, que no ha sido descrito hasta el momento.

Identificamos individuos sanos no portadores y portadores asintomáticos que se mantendrán en seguimiento y vigilancia de acuerdo a las guías internacionales de cáncer de colon polipósico.

La frecuencia de mutaciones tipo deleción duplicación en el gen *APC* fue de un 20% del total de los pacientes con poliposis adenomatosa familiar. En este punto es importante mencionar que a pesar de que son pocos pacientes, la frecuencia es mayor a la reportada previamente en la literatura que oscila de un 8 a un 12% de las variantes patogénicas en este gen.

La prevalencia de las mutaciones puntuales observadas en este trabajo fue del 80%. Sin embargo, las mutaciones encontradas, todas se localizan en el exón 15.

Los casos analizados presentan concordancia fenotípica con los datos previamente reportados, exceptuando el caso con un rearreglo genómico en el que aún está pendiente realizar un análisis de expresión tisular y confirmar el carácter patogénico.

Todos los pacientes recibieron asesoramiento preprueba y postprueba. A los individuos no portadores de mutación se les brindó asesoramiento genético para pacientes sanos no portadores, y a los portadores asintomáticos se les inició manejo enfocado a disminuir el riesgo de cáncer según la edad al momento del estudio. A los individuos con síntomas y estudio molecular positivo se les solicitó apertura de expediente en el Instituto para su manejo interdisciplinario.

BIBLIOGRAFIA

[1] The Official Journal of the National Comprehensive Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN (2017) National Comprehensive Cancer Network.

- [2] Genereviews. (1993-2018) *APC-associated Polyposis Coli*. University of Washington, Seattle. Recuperado de: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1345/.
- [3] Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, Niebuhr E, Mohr J: Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 1994; 3: 121–125.
- [4] H. J. R. Bussey. *Familial Polyposis Coli. Family Studies, Histopathology, Differential Diagnosis and Results of Treatment*. Johns Hopkins University Press 1975; 104.
- [5] Neklason DW, Stevens J, Boucher KM, Kerber RA, Matsunami N. American founder mutation for attenuated familial adenomatous polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008; 6:46–52.
- [6] A Rohlin, Y Engwall, K Fritzell, K Göransson, A Bergsten: Inactivation of promoter 1B of *APC* causes partial gene silencing: evidence for a significant role of the promoter in regulation and causative of familial adenomatous polyposis. *Oncogene* 2011, 30: 4977–4989.
- [7] Charames GS, Lily Ramyar, Angela Mitri, Terri Berk, Hong Cheng: A large novel deletion in the *APC* promoter region causes gene silencing and leads to classical familial adenomatous polyposis in a Manitoba Mennonite kindred. *Hum Genet* 2008,124:535–541.
- [8] Kadiyska TK, Todorov T.P., Bichev S.N., Vazharova R.V., Nossikoff A.V: *APC* promoter 1B deletion in familial polyposis: implications for mutation-negative families. *Clin Genet* 2014, 85: 452–457.
- [9] Snow A.K., Tuohy T.M.F., Sargent N.R., Smith L.J., Burt R.W: *APC* promoter 1B deletion in seven American families with familial adenomatous polyposis. *Clin Genet* 2015, 88: 360-365.
- [10] Yiing Lin, Shin Lin, Melanie D Baxter, Lawrence Lin, Susan M Kennedy: Novel *APC* promoter and exon 1B deletion and allelic silencing in three mutation-negative classic familial adenomatous polyposis families. *Genome Medicine* 2015, 7:42.
- [11] Walter Pavicic, Taina T. Nieminen, Annette Gylling, Juha-Pekka Pursiheimo, Asta Laiho: Promoter Specific Alterations of *APC* are a Rare Cause for Mutation-Negative Familial Adenomatous Polyposis. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2014, 00:00.
- [12] Kiyoshi Yamaguchi, Satoshi Nagayama, Eigo Shimizu, Mitsuhiro Komura, Rui Yamaguchi: Reduced expression of *APC-1B* but not *APC-1A* by the deletion of promoter 1B is responsible for familial adenomatous polyposis. *Nature Scientific Reports* 6:26011.
- [13] Monica Marabelli, Viviana Gismondi, Maria Teresa Ricci, Annalisa Vetro, Raefa Abou Khouzam: A novel *APC* promoter 1B deletion shows a founder effect in Italian patients with classical familial adenomatous polyposis phenotype.10.1002/gcc.22488.
- [14] National Center for Biotechnology Information,U.S. National Library of Medicine (4-Feb-2018). *APC, WNT signaling pathway regulator [Homo sapiens (human)]*. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Recuperado de: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/324.
- [15] GeneTex. Quality antibodies. Quality results. (2013). Wnt Pathway. Irvine, CA 92606 USA. Recuperado: http://www.genetex.com/Web/Pathway/Wnt-Pathway33?utm_source=GeneCards&utm_medium=referral&utm_campaign=GeneCards_pathway.
- [16] The Human Gene Mutation Database. (2017). The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Cardiff University. Recuperado de: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.

[17] Leiden Open Variation Database 3.0. (2004-2018). Locus Specific Mutation Databases. Leiden University Medical Center, Netherlands. Recuperado de: <http://www.lovd.nl>.