



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

00346
5
201

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANALISIS DE ALTERACIONES ESTRUCTURALES DEL GEN APC
CAUSANTE DE LA POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR (PAF)
MEDIANTE LA TECNICA DE PCR-SSCP.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD BIOLOGIA CELULAR

P R E S E N T A

Q.F.B. ANA MARIA GUADALUPE RIVAS ESTILLA

MEXICO D.F.

1995



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 está 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.

00346

524



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARRER DE ALFABICACIONES ESTRUCTURADAS
DE CON APLICACIONES DE LA FÍSICA
APENDICULO FAMILIAR (FAS) MEDIANTE
LA TÉCNICA DE POLÍSCOPIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD FÍSICA CELULAR

P R E S E N T A

CELESTIA ANA BARRA CHADALOE RIVAS ESTELA

MÉXICO, D. F. 1995



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ANALISIS DE ALTERACIONES ESTRUCTURALES DEL GEN APC
CAUSANTE DE LA POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR (PAF)
MEDIANTE LA TECNICA DE PCR-SSCP.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD BIOLOGIA CELULAR**

P R E S E N T A

Q.F.B. ANA MARIA GUADALUPE RIVAS ESTILLA

Director de Tesis: Dr. Arturo Panduro Cerda

El presente trabajo se realizó en la **Unidad de Hepatología Molecular** del Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", bajo la tutoría del **Dr. Arturo Panduro Cerda**.

Este proyecto fue apoyado por el CONACyT con la beca de Maestría otorgada a la **Q.F.B. Ana María Guadalupe Rivas Estilla** y con el donativo No. **0014-M9105** otorgado al **Dr. Arturo Panduro Cerda**.

INDICE

	PAG
INDICE	I
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS	X
RESUMEN	XII

I INTRODUCCION

1. IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES DE GENES

ESPECIFICOS PARA EL DIAGNOSTICO TEMPRANO DE ENFERMEDADES CRONICO DEGENERATIVAS.	2
---	---

2. CANCER DE COLON

2.1 Epidemiología	3
2.2 Etiología y factores de riesgo del cáncer de colon.	4
2.3 Historia natural del cáncer colorrectal.	5
2.4 Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF)	7
2.5 Historia de la PAF	8
2.6 Gen APC	9
2.7 Análisis de mutaciones del gen APC	12

3. ANALISIS DE MUTACIONES DEL GEN APC

3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	13
3.1.1 Origen y Fundamento	13
3.1.2 Requerimientos para PCR	14
3.1.3 Aplicación en el análisis de mutaciones	14
3.2 Análisis de Polimorfismo Conformacional de Hebra Sencilla	16

3.2.1	Origen y definición	16
3.2.2	Sensibilidad	18
3.3	Aplicación del Análisis PCR - SSCP en el diagnóstico de PAF	19
II	OBJETIVO GENERAL	21
	OBJETIVOS PARTICULARES	21
III	MATERIAL Y METODOS	
1.	ESTRATEGIA GENERAL	23
2.	CAPTACION DE PACIENTES	25
3.	SINTESIS DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA LA AMPLIFICACION DEL GEN APC	
3.1	Descripción del método de fosforamiditas para la síntesis de oligonucleótidos	25
3.2	Proceso de liberación del oligonucleótido del soporte sólido y deprotección	26
3.3	Purificación de oligonucleótidos	26
4.	EXTRACCION DE ADN DE SANGRE PERIFERICA	
4.1	Obtención de células blancas	27
4.2	Extracción del ADN de células blancas	28
5.	AMPLIFICACION DEL GEN A P C POR PCR	
5.1	Establecimiento de las condiciones óptimas para lograr una adecuada amplificación del gen APC	29
5.2	Amplificación del gen APC a partir del ADN de pacientes	30
6.	ANALISIS DE MUTACIONES DEL GEN APC POR SSCP	
6.1	Estandarización de los parámetros críticos en el análisis SSCP	32
6.2	Análisis de mutaciones del gen APC por SSCP a partir de ADN de los pacientes	35

7. EVALUACION DEL METODO UTILIZANDO COMO CONTROL OTRO GEN CON UNA MUTACION CONOCIDA: Gen de Fibrosis Quística	38
8. LISTA DEL MATERIAL PRINCIPAL Y EQUIPO UTILIZADO	40
9. PREPARACION DE REACTIVOS	41
IV RESULTADOS	
1. EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE ADN	46
2. SINTESIS Y PURIFICACION DE OLIGONUCLEOTIDOS	47
2.1 Secuencia de oligonucleótidos sintetizados para amplificar los diferentes exones del gen A P C.	47
2.2 Eficiencia de la síntesis química de oligonucleótidos.	49
3. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LOGRAR UNA ADECUADA AMPLIFICACION POR PCR	50
3.1 Efecto de la variación en la concentración de $MgCl_2$ en la cantidad y calidad del producto amplificado	50
3.2 Efecto de diferentes concentraciones de oligonucleótidos en la mezcla de reacción	52
3.3 Efecto de la variación en la concentración de los dNTPs	53
3.4 Importancia de la concentración de la enzima ADN Taq polimerasa	53
3.5 Importancia de la concentración del ADN	55
3.6 Importancia y efecto del número de ciclos de temperatura en el proceso de amplificación de ácidos nucleicos	55

4. EVALUACION DE LOS PARAMETROS CRITICOS EN EL ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA EFECTUAR EL ANALISIS POR SSCP.	
4.1 Evaluación de los factores involucrados en el éxito del proceso de desnaturalización de ADN para análisis de SSCP.	59
4.2 Influencia de los componentes del gel de poliacrilamida en la electroforesis	60
4.2.1 Efecto de la concentración de acrilamida y presencia de glicerol en la estabilización de los conformeros de hebra sencilla.	60
4.2.2 Efecto de la constitución del bufer en el proceso electroforético.	60
4.3 Influencia de los factores fisicoquímicos en el establecimiento de las condiciones de corrida	61
4.3.1 Efecto de la variación en la temperatura	61
4.3.2 Efecto del voltaje	61
4.3.3 Efecto del tiempo de corrida.	61
4.4 Exposición y desarrollo de autorradiografía	67
5. APLICACION DE LA METODOLOGIA PCR - SSCP EN EL ANALISIS DE MUTACIONES DEL GEN APC EN PACIENTES.	
5.1 Características de los individuos analizados	68
5.2 Amplificación del gen APC	70
5.3 Separación y resolución de las hebras de ADN mediante SSCP.	72
5.4 Detección de mutaciones en el exón 11 del gen APC	77
6. EVALUACION DEL METODO PCR-SSCP EN LA DETECCION DE MUTACIONES UTILIZANDO COMO CONTROL OTRO GEN CON MUTACION CONOCIDA: GEN DE FIBROSIS QUISTICA	79
V DISCUSION	82
VII CONCLUSIONES	91
VII REFERENCIAS	93

DEDICATORIAS

★ ★ ★

A la memoria de mi Padre con cariño y respeto.

A mi Madre por todo su amor, su ejemplo de superación y sobre todo por su comprensión y confianza durante esta etapa de mi vida.

A mis hermanos: Paco, Felipe, Genaro, Flor, Gloria, Chayo y Elsa por todo su apoyo, amor y confianza.

A mis compañeros de laboratorio de la Unidad de Biología Molecular por los gratos momentos que compartimos juntos y por la amistad que siempre me han brindado.

A mis maestros quienes me mostraron sus conocimientos y me forzaron a crecer.

A Mario por toda su cariño, comprensión, paciencia y su gran apoyo, a pesar de la distancia que tuvimos que vencer.

A mi noble conciencia por su compañía y por permitirme ver las cosas con optimismo.

A DIOS por permitirme compartir con las personas que más quiero mis logros y por rodearme siempre de mucho amor.

★ ★ ★

AGRADECIMIENTOS

★ ★ ★

Al Dr. Arturo Panduro por la oportunidad que me brindó y por todo su apoyo.

A la Dra. Lorena Orozco por su apoyo, asesoría y sugerencias a este trabajo.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez por todo su apoyo durante esta etapa académica.

A todos los profesores sinodales agradeciéndoles todo su apoyo, así como las finas y precisas correcciones a este trabajo.

Al Dr. J de Jesús Villalobos jefe del Departamento de Gastroenterología del INNSZ por todas las facilidades brindadas.

A Alfredo Padilla por su artística colaboración con las fotografías que ilustran este trabajo.

A mis invaluable compañeros del laboratorio de Hepatología Molecular por sus consejos, su paciencia y por la gran amistad que nos une.

A la Bióloga Guadalupe Lima por su tiempo, sus consejos, su asesoría incondicional y sobre todo por su amistad.

A la Dra. Ana Rosa Rincón por sus consejos y asesoría, agradeciéndote tu apoyo y la amistad que me has brindado.

A ti Mario que gracias a tu amor y apoyo me permitieron alcanzar esta meta.

A DIOS por permitirme vivir esta etapa de mi vida en plenitud de gozo y satisfacción.

Al CONACyT por la beca de Maestría otorgada que me permitió terminar mis estudios.

★ ★ ★

**El amor que me creó es lo que soy, y me
hace buscar la serenidad y la paz en mí.**

★ ★ ★

**La verdad ni va ni viene, ni se mueve,
ni cambia, no se esconde, la descubre
todo aquel que la busca.**

★ ★ ★

**La comunicación de la verdad por parte del alma,
es el suceso supremo de la naturaleza...necesita
ser traducida y ordenada y será válida hasta que
otra verdad la supere.**

★ ★ ★

Viviendo al nivel de las ideas y dejando una influencia benéfica en la humanidad, el espíritu vive activo en el corazón de todos los hombres y cuando se unen los conocimientos a la ineludible cadena del progreso humano, nos convertimos en uno más de la gran familia forjadora de la evolución del cosmos y en los arquitectos de nuestro propio destino.

ABREVIATURAS

CA: Cáncer	PBS: Solución salina y de fosfatos
PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar	SDS: Dodesil sulfato de sodio
APC: Poliposis Adenomatosa Colónica	Buffer TE: Buffer de Tris-HCl y EDTA
RFLPs: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.	Mg²⁺: Ión magnesio
MCC: Mutado en cáncer colorectal.	MgCl₂: Cloruro de magnesio
pb: Pares de bases	KCl: Cloruro de potasio
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa	dATP: desoxiadenina trifosfato
ADN: Acido desoxiribonucleico	dGTP: desoxiguanina trifosfato
ADNc: Acido desoxiribonucleico complementario	dTTP: desoxitimidina trifosfato
dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfatados	dCTP: desoxicitosina trifosfato
SSCP: Polimorfismo Conformacional de Hebra Sencilla	FQ: Fibrosis quística
ARN: Acido Ribonucleico	PK: Proteinasa K
EDTA: Acido etilendiaminotetrácico	U: Unidades enzimáticas
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución	T_m: temperatura media de fusión de oligonucleótidos
ADD: Agua Destilada y Desionizada	A: Adenina
UV: Ultravioleta	G: Guanina
AKC: Buffer de acetato de K y citratos	T: Timina
	C: Citosina
	NaOH: hidróxido de sodio.

Lista de Figuras

1. Modelo Molecular de Carcinogénesis. Cancer colorectal	6
2. Estructura del gen APC y distribución de mutaciones	11
3. Reacción en Cadena de la Polimerasa	15
4. Esquema general de PCR - SSCP	17
5. Estrategia general análisis de mutaciones del gen APC	24
6. Análisis de la calidad del ADN genómico extraído por el método AKC	47
7. Efecto de la concentración de $MgCl_2$	51
8. Efecto de la cantidad de enzima Taq ADN Polimerasa en la eficiencia de la reacción de amplificación en un volumen de 50 μ L	54
9. Análisis SSCP. Acrilamida 6%, Glicerol 0%, Buffer TBE 1X, V=110V y T=25°C Exon 10	62
10. Análisis SSCP. Acrilamida 6%, Glicerol 0%, Buffer TBE 1X, V=100V y T= 4°C Exon 15-7	63
11. Análisis SSCP. Acrilamida 6%, Glicerol 5%, Buffer TBE 1X, V=110V y T=25°C Exon 4	63
12. Análisis SSCP. Acrilamida 6%, Glicerol 10%, Buffer TBE 1X, V=110V y T= 4°C Exon 15-8	64
13. Análisis SSCP. Acrilamida 6%, Glicerol 5%, Buffer TBE 0.5X, V=100V y T= 4°C Exon 15-3	64
14. Análisis SSCP. Acrilamida 6%, Glicerol 5%, Buffer TBE 1X, V=100V y T=25°C Exon 15-8	65
15. Análisis SSCP. Acrilamida 6%, Glicerol 10%, Buffer TBE 1X, V=110V y T=25°C Exon 15-1	65
16. Amplificación del gen APC de pacientes por PCR. Exon 11	71
17. Amplificación del gen APC de pacientes por PCR. Exon 8	71

18. Análisis SSCP del gen APC con ADN de los pacientes. Exón 1	74
19. Análisis SSCP del gen APC con ADN de los pacientes. Exón 2	74
20. Análisis SSCP del gen APC con ADN de los pacientes. Exón 15-4	75
21. Análisis SSCP del gen APC con ADN de los pacientes. Exón 15-6	75
22. Análisis SSCP del gen APC con ADN de los pacientes. Exón 10	76
23. Análisis SSCP del exón 11 del gen APC	78
24. Amplificación del exón 11 del gen de la fibrosis quística en una persona con mutación en este exón (carril 3)	81
25. Análisis SSCP del exon 11 del gen de la fibrosis quística en una persona con una mutación en este exón (carril 3)	81

Lista de Tablas

1. Resumen de las variaciones en los parámetros críticos para el establecimiento del análisis SSCP.	33
2. Principales variaciones y combinaciones para el análisis SSCP del gen APC . . .	34
3. Principales variaciones y combinaciones de parámetros críticos para el análisis SSCP del exón 11 del gen de fibrosis quística	39
4. Valores de Absorbencia y concentración de ADN de sujetos analizados	46
5. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación del gen APC	48
6. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ en la cantidad de producto amplificado y la presencia de productos inespecíficos.	51
7. Efecto de la concentración de oligonucleótidos presentes en la mezcla de reacción de amplificación en la cantidad de producto amplificado	52
8. Valores de concentración de dNTPs evaluados	53
9. Efecto de la cantidad de enzima Taq ADN Polimerasa utilizada en la reacción de amplificación en la cantidad de producto obtenido	54
10. Ciclos de temperatura para la amplificación del gen APC	56
11. Resumen componentes de mezcla de reacción de amplificación del gen APC. .	57
12. Ciclos de temperatura y tiempo. Amplificación del gen APC	58
13. Parámetros que fueron definidos experimentalmente para efectuar el análisis SSCP del gen APC	66
14. Grupos de personas analizadas por PCR - SSCP.	68
15. Lista de personas a las que se les extrajo ADN de sangre periférica para análisis de mutaciones por PCR - SSCP	69
16. Resultados obtenidos del análisis SSCP de los 31 segmentos en que se dividió el gen APC para su estudio	72

17. Resumen de componentes de mezcla de reacción de amplificación del gen de fibrosis quística	79
18. Ciclos de temperatura y tiempos para amplificación del gen de fibrosis quística	80
19. Parámetros que fueron definidos experimentalmente para efectuar el análisis SSCP del gen de fibrosis quística	80

RESUMEN

El análisis molecular de enfermedades crónico-degenerativas que se relacionan con la presencia de mutaciones en genes específicos ha tomado gran importancia. Una de estas enfermedades es el cáncer de colon, que 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 edad. Este trabajo se enfoca al estudio de un tipo de CA colorectal hereditario, la poliposis adenomatosa familiar (PAF), que tiene un tipo de herencia autosómica dominante. Los individuos afectados desarrollan cientos o miles de pólipos adenomatosos en colon y recto, que invariablemente progresan a carcinoma. La edad de aparición de éstos es desde los cuatro a los 70 años de edad. Se han reportado mutaciones del gen APC en pacientes con PAF y con cáncer de colon esporádico lo que sugiere que el cáncer colorectal, ya sea hereditario o esporádico, tiene un factor etiológico común: mutaciones del gen APC.

El objetivo de este trabajo fue establecer un método molecular que permita detectar mutaciones del gen APC y de esta manera poder proporcionar apoyo para el diagnóstico presintomático en pacientes con PAF. En 1991 se identificó el gen APC y se describió la secuencia de oligonucleótidos para su amplificación por PCR. Por otra parte en 1989 Orita y cols. reportaron un método de análisis de mutaciones basado en la técnica de PCR, llamado Análisis de Polimorfismo Conformacional de Hebra Sencilla (SSCP). Este método se basa en que la conformación de la hebra sencilla de ADN depende de su secuencia nucleotídica, así que cualquier tipo de mutación, incluyendo una mutación puntual puede alterar la conformación, y esto causa un cambio en la movilidad electroforética. En esta técnica las secuencias blanco se marcan y amplifican simultáneamente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con dCTP-³²P, y los productos de la reacción se analizan por electroforesis en gel de poliacrilamida. En el departamento de Gastroenterología del INNSZ existe un centro de referencia para el estudio de CA de colon y PAF (Registro Nacional de Poliposis Familiar), de esta clínica se estudiaron pacientes afectados con PAF. Se realizó un análisis molecular del gen APC de estos individuos, así como de sus familiares en primer grado mediante la técnica de PCR y SSCP. En una etapa inicial, se realizó la estandarización del método de PCR y SSCP. En una segunda etapa, después de la definición de estas

metodologías se llevó al cabo el análisis del ADN. A cada paciente se le extrajeron 10 ml de sangre con anticoagulante, y se aislaron los leucocitos para la extracción del ADN. A partir de este ADN se amplificaron por PCR, el total de los 31 segmentos en que fue dividido el gen APC para su estudio, que corresponden al total de la secuencia codificante del mismo. Una vez amplificados todos los segmentos se realizó el análisis por SSCP. Dentro de los resultados se encontró un cambio conformacional en el exón 11 de una paciente de 60 años de edad afectada con PAF. Se observó que este mismo cambio no se presentó en los sujetos controles ni en sus familiares afectados. Aunque se detectó un cambio conformacional en el exón 11 de esta paciente, no podemos asumir que dicho cambio sea el que este directamente relacionado con la presencia de la enfermedad. Para poder dilucidar la causa de ese cambio conformacional se necesitaría realizar más pruebas como secuenciación para comprobar que este cambio es el responsable del fenotipo de la paciente. Pero por otra parte, confirmamos que mediante esta metodología es posible detectar cambios en la secuencia nucleotídica del gen. Esta conclusión fue apoyada por el análisis del gen responsable de fibrosis quística de una paciente con una mutación conocida que se utilizó como control. De tal manera que podemos concluir que en el establecimiento del método PCR-SSCP para llevar a cabo el análisis del gen APC fue necesario conocer y analizar los factores que participan en las propiedades fisicoquímicas y procesos de amplificación de ácidos nucleicos. Además con el análisis SSCP de un grupo de personas que en este caso incluyó tanto personas afectadas con PAF así como no afectadas, se logró identificar una alteración estructural en el exón 11 del gen APC en una paciente con diagnóstico clínico de PAF.

I INTRODUCCION

1. IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES DE GENES ESPECIFICOS PARA EL DIGNOSTICO TEMPRANO DE ENFERMEDADES CRONICO DEGENERATIVAS.

La habilidad para detectar mutaciones es de importancia fundamental en el área biológica, ya que un gran número de enfermedades en el hombre se deben a la presencia de alteraciones estructurales en genes específicos. En genética humana, se aplica el análisis molecular del material genético para establecer una asociación entre la presencia de mutaciones en genes ya conocidos, con la presencia de fenotipos de enfermedades específicas. Es precisamente en esta área, en donde existe una gran demanda para el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias. Esto ha fomentado en los últimos años el desarrollo de numerosos métodos para detectar mutaciones no caracterizadas y también para aquellas previamente descritas. Es así como comenzó a incrementarse rápidamente la velocidad en la identificación y caracterización de genes responsables de las enfermedades hereditarias en el hombre.

El análisis de mutaciones se aplica al estudio de diversas patologías como por ejemplo hemoglobinopatías (1), fibrosis quística (2) y hemofilia (3) entre otras. Cuando se conoce el locus cromosómico del gen que se asocia con el desorden, pueden utilizarse métodos indirectos para estudiar el gen. Uno de los métodos que se ha utilizado ampliamente en estudios iniciales para numerosas patologías es el análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción conocidos como RFLPs (4-7). Con esta estrategia puede obtenerse información acerca de regiones flanqueadoras e incluso de mutaciones dentro del gen, siempre y cuando se localizen en sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Este análisis es útil en muchos casos, pero no puede aplicarse de manera general, ya que parece ser que el número de familias que proporcionan un resultado informativo es limitado. Esto se debe a que la estructura de los árboles genealógicos o del marcador de ligamiento pueden no ser informativos en todos los casos (7,8). Por otra parte, cuando se conoce la localización exacta del gen,

así como el tipo de alteraciones que presenta, pueden aplicarse otro tipo de pruebas en las que se realiza una detección directa de las mutaciones, y que a su vez proporcionan un resultado más exacto e informativo. Por este medio se puede llegar a tener la certeza de que una persona con una mutación en el gen en cuestión presenta una alta probabilidad de padecer la enfermedad (7,8).

De esta manera se resalta la importancia de los estudios encaminados a la identificación de defectos estructurales en el genoma humano, ya que provee una herramienta muy valiosa en la evaluación de individuos con alto riesgo de desarrollar alguna enfermedad hereditaria relacionada con genes específicos.

De acuerdo a las patologías presentes en nuestra población, una de las enfermedades que se relacionan con mutaciones en genes específicos en pacientes afectados es el cáncer (CA) colorectal. En la actualidad, esta neoplasia es una de las enfermedades en las que los pacientes que la padecen no tienen un buen pronóstico de supervivencia y el tratamiento se limita principalmente a colectomía total (9,10).

Como ejemplo tenemos el caso de la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), un tipo de CA colorectal que tiene un patrón de herencia autosómico dominante. Recientemente se identificó el gen APC por medio de métodos de clonación posicional y se identificó como el gen responsable de la PAF, por la presencia de mutaciones en algunos pacientes con APC (11-14). Así que, en vista del gran número de ventajas y aplicaciones que presenta el análisis molecular en numerosas patologías, en este trabajo se trata de implementar esta tecnología para el estudio del cáncer colorectal. La aplicación principal de este trabajo a largo plazo, se encamina hacia la dilucidación del mecanismo de carcinogénesis de esta enfermedad.

2. CANCER DE COLON

2.1. EPIDEMIOLOGIA

En los últimos años se ha observado en nuestro país, un aumento en la incidencia y en la tasa de mortalidad por enfermedades crónico degenerativas, entre las que se incluye el CA de estómago y de colon (9,10). Actualmente, los estudios epidemiológicos

muestran que de las enfermedades malignas del aparato digestivo, el cáncer de estómago y de colon ocupan uno de los primeros lugares a nivel mundial. Además, se ha visto a nivel mundial que la incidencia de cáncer de colon aumenta aproximadamente el 2% anualmente (9-13). También se sabe que el cáncer 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 edad (19). 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 después de que se establece el diagnóstico clínico. Lo anterior nos indica que el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno son fundamentales para elevar la calidad y la sobrevida de los pacientes; lo que hace indispensable establecer estrategias para el diagnóstico y tratamiento oportuno, así como la búsqueda de terapias alternativas (15,17-19).

2.2. ETIOLOGIA Y FACTORES DE RIESGO DEL CANCER DE COLON

Respecto a los factores etiológicos más estudiados del cáncer de colon están los dietéticos; básicamente regímenes ricos en grasas animales y bajos en fibras (16,23,24). Por otra parte también se ha observado que los factores hereditarios contribuyen de manera muy importante. Aproximadamente el 10% del total de los pacientes con cáncer de colon tienen un factor hereditario primario como agente etiológico (15,20-26). Así mismo se ha planteado en base a estudios moleculares, que el cáncer de colon esporádico presenta la misma etiología que el cáncer hereditario, ya que se observa la misma alteración génica, aunque en el caso del cáncer esporádico éste sea ocasionado por agentes químicos, físicos, dietéticos o ambientales (27,28).

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 clasificó clínicamente como síndrome de Lynch I y síndrome de Lynch II (29,30). Otros síndromes hereditarios son la poliposis adenomatosa familiar (PAF) (31) y los síndromes de Gardner y de Turcot (15,32-34). Por otro lado, entre los síndromes hereditarios con un bajo riesgo para desarrollar cáncer están las poliposis hamartomatosas, el síndrome

de Peutz Jeghers y la poliposis juvenil familiar (15,32). 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 (27,28).

2.3 HISTORIA NATURAL DEL CA COLORECTAL

A continuación se describe la historia natural de los tumores colorectales, en donde se detectan varias etapas evolutivas en donde se observan diferentes mutaciones somáticas y hereditarias (Fig.1). Con base en estudios clínicos e histológicos, se han identificado las siguientes etapas: primero, pequeños pólipos adenomatosos surgen de la mucosa del colon en un proceso de iniciación neoplásica y progresión; en esta fase se sugiere que los adenomas surgen no de la mucosa normal sino preferencialmente de áreas de mucosa con características hiperproliferativas. De ahí que la progresión de pequeños a grandes adenomas, con un aumento subsecuente en el potencial maligno, ocurre solamente en unos cuantos pólipos. La transformación de adenomas a CA colorectal puede suceder en un periodo de años a décadas. Por último, sólo un pequeño porcentaje de los adenomas que sufrieron una transformación maligna progresan a CA invasivo y CA metastásico. Estas diferentes etapas se observan tanto en el CA de colon esporádico como en el hereditario. No obstante, hay que tener presente que, si bien los criterios clínicos e histopatológicos se pueden utilizar para clasificar los tumores en etapas diferentes, la progresión del tumor y la evolución de subpoblaciones celulares nuevas en tumores sea quizás un proceso continuo (25,26,35-41).

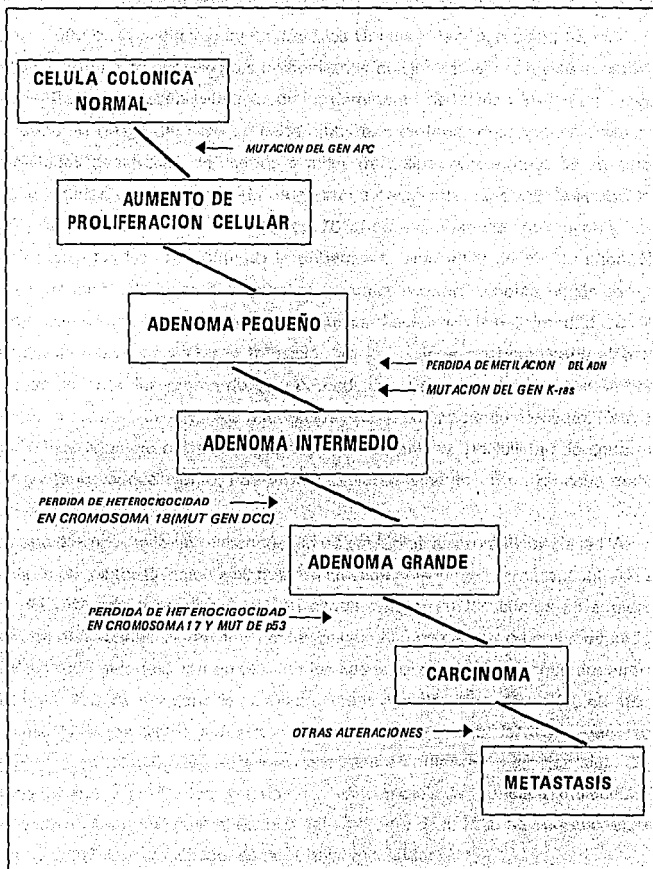


Fig.1 MODELO MOLECULAR DE CARCINOGENESIS CANCER COLORECTAL

2.4 POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR

La Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), presenta una incidencia de 1 en 5,000 y de 1 en 17,000 en la población de los Estados Unidos y Japón, respectivamente (42). Desafortunadamente en nuestro país no contamos con información precisa al respecto.

La PAF es un padecimiento autosómico dominante, de tal manera que un individuo enfermo tiene un riesgo del 50% en cada embarazo de tener descendencia afectada. Estos individuos desarrollan de cientos a miles de pólipos adenomatosos en colon y recto, de los cuales una gran mayoría progresan a carcinoma. La edad de aparición de estos pólipos varía desde los 5 hasta los 70 años; no obstante, la mayoría de los individuos afectados los presentan en la pubertad o bien antes de los 30 años. Para detectar la presencia de pólipos incipientes se realizan colonoscopías periódicas que deben practicarse cada seis meses. Una vez que se diagnóstica la enfermedad, se indica una colectomía total para evitar la transición de los pólipos adenomatosos al estado carcinosomatoso. Una desventaja de este procedimiento de escrutinio es que se tienen que someter a este tipo de estudios a todos los hijos de un paciente afectado. Esto crea angustia e incertidumbre entre los hijos del paciente ante la posibilidad de desarrollar posteriormente el padecimiento, que termina invariablemente en un proceso maligno (14,26,43-45).

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 únicos, en los cuales se sugiere la presencia de mutaciones *de novo*. En estos pacientes con cáncer de colon esporádico se ha demostrado que hasta en un 63% de los casos, el gen que se encuentra alterado es el mismo que se ha relacionado en los pacientes con PAF hereditario (35,46-48). Se especula que estos pacientes sufrieron mutaciones espontáneas del mismo gen, o bien éste alteró su expresión o estructura debido a factores químicos o ambientales. Como lo demuestran los comentarios anteriores, es compleja la genética molecular del carcinoma colorectal por lo cual el estudio del síndrome de la PAF ha cobrado especial interés tanto en el aspecto clínico, como a nivel molecular.

2.5 HISTORIA DE LA PAF

En 1880, Cripps describió por primera vez la poliposis colónica en una familia inglesa. Posteriormente se determinó el patrón hereditario y se estableció que era un padecimiento premaligno en el 100% de los casos. Fue hasta 1930 cuando Lockhart, Mummery y Dukes enfatizaron que la poliposis colónica familiar y la "esporádica" representaban un riesgo significativo de neoplasia a los miembros de la familia. Desde entonces se vigiló cercanamente la evolución y transformación de un adenoma a carcinoma. En las décadas de los 50s y de los 60s, se establecieron registros de este padecimiento en diferentes hospitales con el objeto de estudiar más de cerca a estas familias. Fue de esta manera como se detectó la diversidad de manifestaciones clínicas que suelen presentar estos pacientes y se logró un mayor consenso de que se deben de estudiar a las familias de una manera integral. Precisamente en uno de estos registros de PAF, en el Instituto de Cáncer Roswell Park, en Buffalo, New York, Lemuel Herrera (49) inició una serie de estudios citogenéticos con resultados que dieron un giro definitivo hacia el estudio molecular del CA de colon. Durante la investigación, uno de sus pacientes, con un cuadro clínico de poliposis familiar, CA de colon, retraso mental y otras anomalías congénitas, presentó una alteración citogenética que consistía en una deleción en el brazo largo del cromosoma 5 (49). Dos años después, en 1987, Walter Bodmer de Londres estableció por primera vez, mediante estudios de ligamiento, una unión muy estrecha entre el gen de la PAF que se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 (región q21-q22), y la presencia de esta enfermedad (50). En 1989, en la Universidad de Johns Hopkins, B. Vogelstein (35) sugirió una secuencia biológica molecular que reflejaba la secuencia histológica y clínica de la progresión de un adenoma a carcinoma. La secuencia biológica molecular empezaba en el cromosoma 5q21. En 1991, Cottrell encontró RFLPs en el cromosoma 5q21 que se localizan a unos tres centimorgans del gen APC. Por otro lado, en 1991 Nakamura y Stewart reportaron los marcadores YN5.48 y pi227 respectivamente, los cuales flanquean al gen APC (51,52). En el mismo año se propuso la utilización de estos marcadores moleculares para realizar el diagnóstico presintomático de esta enfermedad (53,54). Asimismo, Vogelstein et al propuso la secuencia de aminoácidos que codifica al gen de la PAF. Por otra parte Kinzler (11,14)

del mismo grupo indentificó otro gen mutado en CA de colon; el gen MCC. Este gen se localiza muy cerca del gen de la PAF en la misma región del cromosoma 5, y también se ha relacionado estrechamente con el desarrollo de PAF. Con el fin de proporcionar un diagnóstico presintomático en pacientes con PAF, se han hecho numerosas investigaciones (53-58), ya sea para encontrar un marcador molecular del padecimiento, o bien para identificar directamente la alteración del gen APC.

Después de que se descubrió en 1991 por medio de estudios de clonación posicional que el gen de la PAF se localiza en el brazo largo del cromosoma 5q (11-14) se realizaron numerosos estudios genéticos y moleculares, que incluyeron inicialmente análisis de RFLPs, para llegar a determinar finalmente las alteraciones estructurales presentes en el gen APC, causante de la PAF. Algunos de estos estudios indicaron que existen ciertos fragmentos polimórficos que tienen una unión muy estrecha a la PAF y se han utilizado como marcadores moleculares para hacer un diagnóstico indirecto de alteraciones estructurales en este gen (53-58).

2.6 Gen A P C

El estudio del gen APC, desde que se indentificó en el brazo largo del cromosoma 5 en seres humanos ha tomado gran interés (11;13). Por medio de estudios de hibridación *in situ*, citogenéticos y análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, se demostró que este gen está alterado en pacientes con PAF hereditario (51,54) así como en pacientes que cursan con cáncer de colon no hereditario (27,28). También se ha demostrado pérdida de material genético del cromosoma 5 en la PAF, en adenomas y carcinomas colorrectales esporádicos, sugiriéndose que tal pérdida es por deleción intersticial del brazo largo del cromosoma 5. Los datos parecen apoyar la hipótesis de que las mutaciones del gen APC son recesivas a nivel celular, aunque fenotípicamente presenten un tipo de herencia autosómico dominante; y de acuerdo con la ley de Knudson, al igual que en otros genes supresores de tumor (como el gen Rb), requieren inactivación de ambos alelos para el desarrollo de malignidad (pérdida de heterocigocidad) (59). 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 colorectal (59), la mayoría de los cuales tienen un tipo de herencia autosómica dominante y una frecuencia génica en la población general tan alta como 19% (60). En 1991 Vogelstein (11), Nakamura et al (13,14) lograron secuenciar en su totalidad el gen de la PAF, este avance a diferencia de los estudios con fragmentos polimórficos, permite analizar directamente las mutaciones de este gen. También estos mismos investigadores detectaron mutaciones del gen APC tanto en pacientes con PAF como en pacientes con síndrome de Gardner, así este hallazgo experimental apoya la idea de 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 exones (61) (Fig. 2), siendo el último el más largo con una longitud de 6571 pares de bases. Al mismo tiempo ellos estudiaron 53 pacientes con PAF y observaron mutaciones puntuales en los exones 5, 6, 8, 9, y 12 - 15. Sin embargo, en 29 casos detectaron deleciones o inserciones en el exón 15. Es precisamente en este exón largo en donde encontraron el 68% del total de las mutaciones (codones 713-1597), y que la misma mutación se detectó en diferentes pacientes no emparentados entre sí. Un aspecto importante es que de las mutaciones que se han detectado, el 92% originan un producto incompleto ya que algunas de ellas generan nuevos codones de terminación.

A partir de entonces diversos grupos de investigadores en todo el mundo, se plantean la tarea de analizar completamente la región codificante del gen APC para lo que se utilizan diferentes estrategias. A la fecha se han reportado más de 250 mutaciones diferentes que incluyen mutaciones somáticas y en línea germinal (56,57,62-64). Dentro de las mutaciones que se reportan se ha visto que la mayor parte de estas se localizan en el extremo 5' del exón 15 dentro de los codones 1055- 1309. Las mutaciones más frecuentes son una deleción de 5 pb en el codón 1309 (en un 10% de los pacientes) y una deleción también de 5 pb en el codón 1061 (en 5% de los pacientes). En uno de los estudios más extensos, en el que se analizaron 150 pacientes con PAF, se encontraron mutaciones en 97 casos de los cuales un 65% presentaron mutaciones en el exón 15 (65-67).

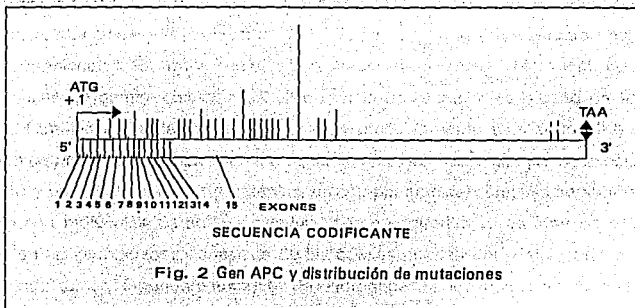


Fig. 2 Gen APC y distribución de mutaciones

Fig. 2 Estructura del gen APC y distribución de mutaciones

En diversos estudios publicados, del total de los pacientes con PAF que se analizaron, se han detectado mutaciones en el gen APC desde un 30% hasta un 60% de los casos. Esto depende del método que se utiliza para rastrear las mutaciones. Este tipo de análisis se dificulta por la naturaleza variada de las mutaciones del gen, que incluyen cambios ya sean en un sólo par de bases, pequeñas deleciones o bien pequeñas inserciones. Además, estas mutaciones se encuentran distribuidas en una larga porción del gen APC que cubre aproximadamente 8500 pb.

Por otro lado, se han reportado mutaciones en regiones no codificantes en el gen APC, algunas en las regiones promotoras, que dan lugar a fragmentos no traducidos en el exon 1 que originan diferentes sitios de inicio de la transcripción; también se han encontrado mutaciones en sitios de reconocimiento de los intrones en donde ocurre el corte en el procesamiento del ARNm para eliminar las secuencias de intrones. Aunado a esto también se han identificado diferentes tamaños de los transcritos y secuencias de reconocimiento en donde no se detectan mutaciones, que pueden dar lugar a un tipo de procesamiento alternativo dentro de la región 5' del exon 1 (64,68a). Lo anterior indica que puede ser muy variada la expresión de este gen, dando lugar a diferentes productos, lo que a su vez provoca diferentes fenotipos en pacientes con mutaciones similares.

Con respecto al producto del gen APC, se ha aislado la proteína codificada por este

gen y se conoce su secuencia (68b). Esta proteína contiene 2843 aminoácidos, pero su secuencia aporta pocas claves acerca de su función. Se han caracterizado algunas regiones funcionales, contiene una región hacia el extremo N-terminal con las características de dominio hélice-alfa-hélice que le conferiría la capacidad de formar dímeros. También presenta una secuencia que probablemente es responsable de la formación de dedos de zinc. En cuanto a su función se ha observado que se asocia con β -catenina y probablemente con α -catenina, un componente del complejo de adherencia asociado con moléculas de adhesión celular como cadherina E. La idea de que los cambios en las propiedades adhesivas de las células pueden ser pasos críticos en la progresión del tumor, dependerá entonces de la integridad de las moléculas involucradas en la adhesión célula-célula. En base a estas investigaciones se enfatiza aún más la complejidad del estudio de las alteraciones en la estructura de este gen, de los diferentes niveles de regulación de su expresión, así como de sus productos, y finalmente de la implicación de todos estos factores en los pacientes afectados (68a, 68b, 69).

2.7 ANALISIS DE MUTACIONES DEL GEN APC

Dentro de los primeros procedimientos que se utilizaron con éxito para determinar alteraciones estructurales gruesas en los genes, se encuentran la técnica de Southern y Northern blot (48,50). Mediante este tipo de análisis fue posible determinar deleciones, inserciones y rearrreglos de genes, que incluyan cambios en una sola base que se localizaban dentro de la secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción. Estas técnicas, además de que su proceso es prolongado y requieren grandes cantidades de ADN, finalmente no logran detectar todas las mutaciones. Posteriormente se utilizó la técnica de secuenciación de ADN (69), con la que puede determinarse con precisión la localización de las mutaciones, ya que se logra establecer la secuencia exacta de bases de un gen. Aunque esta metodología es la más precisa para la determinación de mutaciones genéticas, se recomienda utilizar primero alguna técnica de tamizaje con la cual se determine si la mutación está o no presente (técnica de rastreo) y después en una segunda etapa, efectuar la secuenciación del fragmento donde se encontró la alteración, para determinar el tipo y localización precisa de la mutación. Esta elección

se debe a que también este tipo de análisis involucra un largo y laborioso procedimiento. Con base en estas consideraciones comenzaron a desarrollarse nuevas metodologías para rastrear mutaciones, y tratar de obtener mayor información así como mayor precisión, para llegar finalmente incluso a detectar cambios en un sólo par de bases.

3. ANALISIS DE MUTACIONES DEL GEN A P C

3.1 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

3.1.1 Origen y fundamento.

Con el nacimiento de la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), surgió una poderosa herramienta de investigación, en la cual se fundamentan numerosos sistemas para el estudio del material genético. Este ingenioso proceso fue ideado en 1985 por Kary B. Mullis (70), y la primera secuencia de ADN que se amplificó con esta técnica fue el gen de beta globina (3).

El PCR es un método de síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, en donde un segmento específico de ADN se copia y se replica específicamente varias veces. La técnica de PCR requiere de dos primers o iniciadores que hibridan en los extremos opuestos a la secuencia de interés y se orientan de tal forma que se realice la síntesis de la región situada entre ambos iniciadores por la enzima ADN polimerasa (Fig 3). El PCR consiste en la replicación de una serie de ciclos de temperatura en donde se efectúa la desnaturalización del ADN, la alineación y acoplamiento de los iniciadores y la extensión de éstos últimos por la enzima ADN polimerasa. Esta repetición de ciclos conduce a un crecimiento exponencial de un fragmento de ADN específico cuyos extremos 5' están dados por los iniciadores. La amplificación de una secuencia específica de ADN se efectúa debido a que los productos que se sintetizan en cada ciclo sirven de molde para la siguiente reacción. De tal manera, que el número de copias del fragmento deseado se duplica en cada ciclo, a tal grado que con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial de 2^n , (donde n es el número de ciclos del proceso) lo que corresponde a millones de copias del segmento de ADN amplificado (71-72).

3.1.2 Requerimientos para PCR

De manera general, los componentes que se requieren para la PCR son: el ADN molde, un par de iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el segmento blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs), solución amortiguadora de reacción y la enzima ADN Taq polimerasa.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres etapas, que se determinan por el establecimiento de temperaturas y tiempos específicos. La primera de estas etapas corresponde al proceso de desnaturalización a una temperatura de 92° - 98°C y en el cual se separan o desnaturalizan las dos hebras complementarias del ADN blanco. En una segunda etapa se efectúa el proceso de alineamiento a una temperatura de entre 50° - 60° C. Aquí se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado. Finalmente, se realiza la etapa de extensión a 70° - 74° C. En esta última etapa la ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados, mediante la polimerización de los dNTPs libres, dando como resultado nuevas cadenas complementarias a las dos hebras sencillas presentes desde el inicio (71-75).

3.1.3 Aplicación en el Análisis de Mutaciones.

El enorme impacto que ha tenido la técnica de PCR en la investigación biomédica en los últimos años, se refleja en el enorme crecimiento e implementación de nuevas metodologías para el análisis molecular del material genético (76-79), en las cuales se incluyen aquellas metodologías encaminadas al análisis de alteraciones en el ADN, proporcionando así una valiosa herramienta que permite llegar a un diagnóstico molecular más preciso, rápido y confiable. Es precisamente esta metodología de PCR, la que se toma como base para el Análisis de Polimorfismo Conformacional de hebra sencilla, para llevar a cabo el análisis de mutaciones del gen APC en este trabajo.

PCR ESQUEMA DE AMPLIFICACION

AMPLIFICACION DE UNA SECUENCIA ESPECIFICA DE ADN

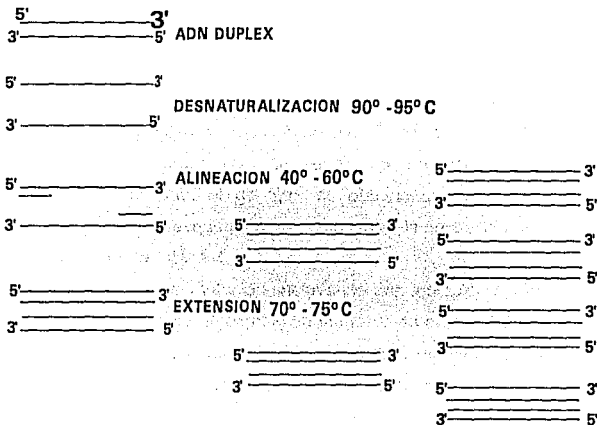


Fig.3 Esquema de amplificación de ADN por PCR

3.2 ANALISIS DE POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE HEBRA SENCILLA

3.2.1 Origen y Definición

Dentro de las metodologías que existen actualmente para la detección de mutaciones, se encuentra la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada al Análisis de Polimorfismo Conformacional de Hebra Sencilla (PCR-SSCP), que es posiblemente una de las técnicas más sencillas de efectuar, ya que involucra pocos pasos y a su vez es una de las que presentan mayor sensibilidad (80-81).

En 1989, Orita y cols. (82) reportaron esta técnica a la que llamarán Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada al Análisis de Polimorfismo Conformacional de Hebra Sencilla (PCR-SSCP). En el análisis PCR-SSCP, la secuencia blanco en el ADN genómico o ADNc se amplifica y simultáneamente se marca con radiactividad utilizando iniciadores o bien nucleótidos radiactivos. Entonces el producto amplificado, ya marcado radiactivamente se desnaturaliza mediante su dilución en solución de formamida al 95% y es sujeto a electroforesis de alta resolución en gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Finalmente, el gel que se obtiene se seca y se expone para autoradiografía (82,83). Un esquema representativo de la secuencia de eventos en esta técnica se observa en la Figura 4.

Así que cualquier tipo de mutación, incluyendo una mutación puntual puede alterar la conformación, y esto causa un cambio en la movilidad electroforética detectable. Así las bandas que se separan muestran una movilidad electroforética particular que depende de su secuencia específica y de la conformación dada por ésta. Entonces cualquier cambio presente como deleciones, inserciones aún en una sola base, en los fragmentos que se amplificaron puede detectarse como alteraciones en movilidad (82,83).

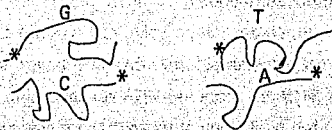
POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE HEBRA SENCILLA (SSCP)



ADN GENOMICO

	G	T
Producto de PCR	C	A
	NORMAL	MUTANTE

³²p - ADN
DESNAUTRALIZADO



ELECTROFORESIS

HEBRA SENCILLA

DOBLE HEBRA

NORMAL		MUTANTE	
SIN DESNAT	DESNAT	SIN DESNAT	DESNAT
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—

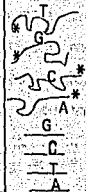


Fig.4. Esquema general PCR - SSCP

3.2.2 Sensibilidad

En este procedimiento se relaciona directamente el tamaño del fragmento que se amplifica y la eficiencia que se logra en la amplificación. La sensibilidad de esta técnica, es decir la habilidad para detectar mutaciones, que se ha reportado por varios autores, varía entre el 90% de eficiencia para fragmentos menores de 200 pb y de aproximadamente 70 a 80% para fragmentos de 200 hasta 450 pb. Lo anterior depende de como las mutaciones afectan el plegamiento o la conformación y como esta conformación afecta la movilidad electroforética de la secuencia que se analiza. La sensibilidad no puede predecirse fisicoquímicamente, ya que en teoría no puede establecerse que conformación tomará una secuencia de ADN, ni como va a comportarse en la electroforesis, por lo tanto esta aproximación de sensibilidad se apoya directamente en reportes experimentales. En base a lo anterior, se puede considerar que la sensibilidad de SSCP en detectar mutaciones puntuales depende de varios factores, que incluyen la longitud del fragmento que se va a analizar, la concentración de acrilamida, la presencia de agentes estabilizantes como glicerol, la temperatura durante la electroforesis y la concentración del buffer. Por otra parte, la sensibilidad de la técnica puede incrementarse si se utilizan moléculas de ARN (en lugar de ADN) en las cuales la estructura secundaria es más sensible a cambios en la secuencia (84-86).

Las principales ventajas del método incluyen una alta sensibilidad, su facilidad de realizar en comparación con otros métodos existentes para detectar mutaciones, y el hecho de que se efectúa en pocos pasos. Además, recientemente se desarrolló una modificación al método que no utiliza radiactividad, sino una tinción de plata, lo que amplía aún más su aplicación (87). La desventaja principal que presenta este método es que no se logran detectar el 100 % de las mutaciones, ya que algunas mutaciones no pueden detectarse bajo ciertas condiciones de electroforesis, por lo tanto no pueden excluirse falsos negativos por esta técnica. Ocasionalmente, es difícil reproducir el patrón de separación para algunos fragmentos cuando la electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente. Esta irreproducibilidad se debe probablemente al hecho de que estas variaciones de temperatura provocan un intercambio entre diversos estados conformacionales de los fragmentos que se analizan (86-88).

3. 3 APLICACION DEL ANALISIS PCR-SSCP EN EL DIAGNOSTICO DE PAF

Con esta metodología se pueden detectar mutaciones en el gen APC y así poder realizar el diagnóstico de la PAF aún antes de que aparezcan los pólipos, con la consecuente ventaja de evitar los estudios colonoscópicos en los pacientes y disminuir la angustia a aquellos familiares que no presenten dicha alteración genética.

La importancia del diagnóstico temprano de esta patología, como ya se mencionó, es el de informar éticamente a los pacientes con probabilidad de desarrollar esta enfermedad y que presentan mutaciones en el gen APC, de las posibles implicaciones futuras, con el objeto de mejorar su calidad de vida. Asimismo, las técnicas empleadas en este procedimiento nos ayudan a entender un poco más los mecanismos de patogénesis de este tipo de padecimientos, avanzando así en la profundización de su conocimiento, que en un futuro nos podría conducir a la prevención o cura de esta enfermedad. Más aún, estos estudios se podrán realizar no sólo en aquellos pacientes con cáncer de colon ya sea hereditario o esporádico, sino en cualquier otro tipo de patología que involucre alteraciones estructurales de genes específicos.

Con los antecedentes mencionados, se refleja la importancia y surge la necesidad de desarrollar metodologías que puedan ser viables para implementarse de manera rutinaria, y así proporcionar apoyo tanto a la investigación básica así como al estudio clínico de estas enfermedades para llegar finalmente a establecer un diagnóstico molecular temprano y poder brindar un asesoramiento genético adecuado y tratamiento oportuno.

1. OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene como objetivo general analizar el impacto de la implementación de un sistema de gestión de calidad en una empresa manufacturera, considerando los aspectos económicos, operativos y culturales.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de esta investigación son:

- 2.1. Identificar los factores que influyen en la adopción de un sistema de gestión de calidad.
- 2.2. Evaluar el impacto económico de la implementación del sistema.
- 2.3. Analizar el impacto operativo del sistema en la producción.
- 2.4. Estudiar el impacto cultural del sistema en el personal de la empresa.

OBJETIVOS

3. METODOLOGÍA

Este estudio se realizó mediante un enfoque cuantitativo, utilizando encuestas y análisis estadístico para medir el impacto del sistema de gestión de calidad.

II OBJETIVO GENERAL

DESARROLLAR UN METODO MOLECULAR QUE PERMITA ANALIZAR LA PRESENCIA DE MUTACIONES DEL GEN APC EN PACIENTES AFECTADOS CON POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR (PAF), ASI COMO EN PERSONAS CON PREDISPOSICION A DESARROLLAR ESTA ENFERMEDAD.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Definir las condiciones óptimas para llevar a cabo de manera eficiente y reproducible el análisis de mutaciones del gen APC por medio del método PCR - SSCP.**
- 2. Utilizar esta herramienta molecular para la búsqueda de mutaciones en el gen APC en pacientes afectados con PAF y en personas con alto riesgo de desarrollar la enfermedad.**

MATERIAL Y METODOS

III MATERIAL Y METODOS

1. ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir los objetivos anteriores se planteó la siguiente estrategia (Fig.4): Se estandarizó la metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa y Análisis de Polimorfismo Conformacional de Hebra Sencilla. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de mutaciones de la región codificante completa del gen APC en pacientes afectados con PAF, familiares no afectados y sujetos normales.

En la primera etapa se separaron las células blancas y se realizó la extracción del ADN. Se sintetizaron los oligonucleótidos y se amplificaron cada uno de los fragmentos que componen el total de la secuencia codificante del gen APC, los cuales posteriormente se sometieron al análisis de SSCP.

Finalmente, se realizó el análisis de los resultados y se compararon los patrones electroforéticos tanto de las personas sanas, como de los pacientes afectados con PAF.

ANALISIS DE MUTACIONES GEN APC

ESTANDARIZACION DE METODOS

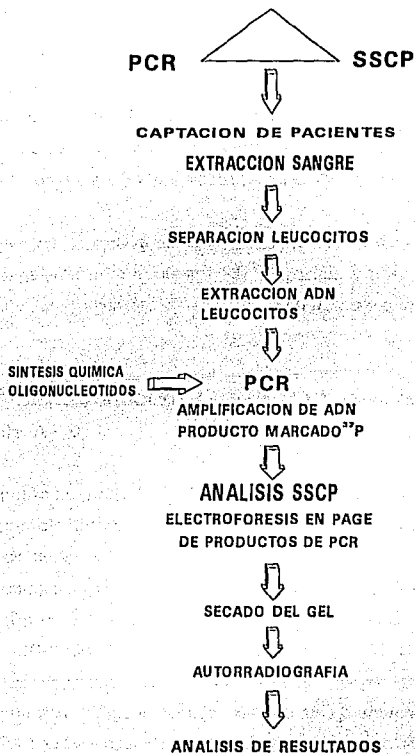


Fig.5 Estrategia Gral.
Análisis de mutaciones del gen APC

2. CAPTACION DE PACIENTES

El Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" cuenta con un centro de referencia para el estudio de cáncer de colon y Poliposis Adenomatosa Familiar (Registro Nacional de Poliposis Familiar) en el cual se tienen bajo estudio pacientes afectados con PAF así como sus familiares.

En este trabajo se incluyeron pacientes de éste registro afectados con PAF, así como sus familiares no afectados con un total de 14 sujetos analizados. En estos individuos se realizó un estudio muy minucioso para poder establecer el diagnóstico de PAF de acuerdo a las manifestaciones clínicas y estudios histopatológicos. También se incluyó un grupo de 10 personas sanas sin antecedentes familiares de cáncer colorectal como controles normales. En todos ellos se realizó la búsqueda de mutaciones en el gen APC.

A cada uno de los individuos se les extrajeron 10 ml de sangre periférica con EDTA como anticoagulante para purificar a los leucocitos y posteriormente el ADN, con el objeto de detectar mutaciones del gen APC con la técnica de SSCP.

3. SINTESIS DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA LA AMPLIFICACION DEL GEN A P C.

3.1 Descripción del método de Fosforamidas para la síntesis de oligonucleótidos.

La síntesis de los oligonucleótidos necesarios para la amplificación de la región codificante completa del gen APC, se llevó a cabo en el Sintetizador para ADN Gene Assembler (Farmacia LKB) y el método que se utilizó fue el de Fosforamidas (Farmacia LKB) (89,90). El fundamento y las etapas del método de síntesis se describen a continuación.

La mayoría de los oligonucleótidos sintéticos se preparan en base a las técnicas de fosforamidas en fase sólida. En esta técnica el primer monómero está anclado por una molécula de unión a un soporte compuesto de esferas de cristal de borosilicato. Los

pasos principales de la síntesis de un oligonucleótido son: deprotección, acoplamiento, capping, oxidación, deprotección y liberación del soporte.

El paso de deprotección consiste en retirar el grupo protector de la posición 5' del monómero anclado para que pueda reaccionar con el monómero siguiente, con su posición 5' protegida y su posición 3' activada se agrega en exceso al soporte sólido.

Es importante que los monómeros que no reaccionaron sean inactivados para evitar que el oligonucleótido se elongue en una secuencia que no es la correcta. Para este efecto en el paso de capping los grupos 5'OH que no reaccionaron son acetilados para impedir su crecimiento posterior. El siguiente paso es la oxidación del grupo fosfato para darle una configuración más estable. Estos pasos se repiten consecutivamente según el número de monómeros de la secuencia que se está sintetizando.

3.2 Proceso de liberación del oligonucleótido del soporte sólido y deprotección.

Después de que se completa la síntesis, el oligómero sintético se separa del soporte sólido y se deprotege de los grupos protectores que aun permanecen. Esto se logra incubando el soporte con el oligonucleótido unido en una solución acuosa de amonio en altas concentraciones (30% v/v) a 55°C por 5 h o bien toda la noche.

3.3 Purificación de oligonucleótidos.

Una vez deprotegido el oligonucleótido se purifica por HPLC (High pressure liquid chromatography), por columnas de intercambio iónico o por electroforesis en acrilamida. El tipo de purificación dependerá del uso que se vaya a dar al oligonucleótido. En este caso fueron deprotegidos con columnas de Shepadex G-25 (NAP-columns). Una vez que se liberó del soporte y se deprotegió el oligonucleótido, el extracto crudo que se obtuvo se pasó a través de la columna NAP (nombre comercial, Pharmacia) que previamente se lavó con agua desionada para eliminar el buffer de almacenamiento. El oligonucleótido se recobró diluido en el eluyente en tubos Eppendorf, y libre de subproductos y iones amonio. Finalmente, se determinó su concentración por espectrofotometría de luz UV a 260/280 nm.

4. EXTRACCION DE ADN DE SANGRE PERIFERICA

4.1 OBTENCION DE CELULAS BLANCAS (91)

El método que se empleó para la extracción de leucocitos utiliza una solución hipertónica (Buffer AKC:Acetato de K, cloruro de amonio), que logra romper la membrana de los eritrocitos sin dañar a los leucocitos. Posteriormente con lavados consecutivos se logra eliminar el plasma y restos celulares de eritrocitos. De tal manera que la obtención de los leucocitos se efectuó como se describe a continuación.

1.- Se extrajeron 10 ml de sangre periférica con anticoagulante EDTA, cada una de las muestras de sangre se depositaron en un tubo Falcon de 50 ml que se llenó con buffer PBS, se agitaron cuidadosamente por inversión y se centrifugó a 2,000 rpm a 4° C durante 15 minutos.

2.- Se retiró el líquido sobrenadante y en el fondo del tubo se depositaron los leucocitos y eritrocitos. Se procedió a la lisis de los eritrocitos, para lo cual las células se suspendieron en buffer AKC (Buffer llsador), y se pusieron en reposo durante 30 min. a 4° C. y después se centrifugaron a 2000 rpm a 4° C durante 10 min.

3.- En el paso anterior se logró lissar la mayor parte de los eritrocitos sin dañar a los leucocitos, por lo que después de la centrifugación se obtuvo un precipitado blanco en el fondo del tubo, compuesto principalmente por leucocitos. Se eliminó completamente el sobrenadante y las células se lavaron con buffer PBS como en el paso 1.

4.- Para eliminar completamente cualquier célula roja residual, el precipitado celular se resuspendió nuevamente con buffer de lisis AKC por 30 min. Posteriormente, se centrifugaron a 2 000 rpm a 4° C por espacio de 10 min.

5.- Después de la centrifugación se obtuvo de nuevo el precipitado blanco de leucocitos pero ahora con menor número de células rojas, y se resuspendió en buffer PBS para lavar los leucocitos. Se centrifugó igual que en los pasos anteriores y se obtuvo de nuevo el precipitado de leucocitos.

6.- Al final de esta etapa si no se realiza inmediatamente la extracción de ADN, el paquete se leucocitos se puede almacenar a - 70° C.

4.2. EXTRACCION DEL ADN DE CELULAS BLANCAS

Después de la separación de leucocitos se procedió a la extracción de ADN de los leucocitos. Para esto se realizó la digestión de la membrana celular con Proteinasa K y SDS, para posteriormente extraer el ADN solubilizado con fenol-cloroformo y precipitación con etanol (91). Se llevó a cabo bajo condiciones estériles de la siguiente manera:

- 1.- Los leucocitos se resuspendieron en 3 ml de buffer RSB, utilizando un agitador vortex en un tubo Falcon de 50 mL.
- 2.- Se agregaron 120 μ l de SDS al 25 % a cada tubo y se incubó a 55°C por 1 hora con el objeto de romper la membrana celular de los leucocitos y liberar el ADN.
- 3.- Después de esta primera digestión se agregaron 40 μ l de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incubaron a 55 °C durante 2 horas (preincubar la PK de 5-10 min a 37°C).
- 4.- Al final de este tiempo se agregaron otros 40 μ l de Proteinas K, y se prosiguió con la incubación a 55 °C durante toda la noche.
- 5.- Una vez que se liberó el ADN, se llevó a cabo la extracción con fenol- cloroformo. Para lo cual se agregó a cada una de las muestras 2 ml de fenol neutralizado (pH de 7.8) y precalentado a 65°C, y 2 ml. de cloroformo y se agitó suavemente. Se centrifugó a 2 000 rpm durante 5 minutos.
- 6.- La fase acuosa en donde se encuentra el ADN se separó con una pipeta Pasteur, con mucho cuidado de no arrastrar la interfase de proteínas y se colocó en otro tubo Falcon al cual se le agregaron 2 ml. de buffer TE 10/1(Tris-HCl 1 M pH8.0 y EDTA 0.5mM).
- 7.- Se repitió la extracción con fenol-cloroformo igual que en el paso 5.
- 8.- Se separó de nuevo la fase acuosa (aprox.5 ml) y se procedió a precipitar el ADN con etanol frío. (125 μ l de NaCl 4.0 M y 2.5 vol. de etanol) a -70°C durante 30 minutos.
- 9.- El ADN se centrifugó a 11,000 rpm a -10°C durante 20 minutos.
- 10.- Se eliminó el sobrenadante y se formó un precipitado blanco de ADN en el fondo del tubo, que se resuspendió en 250 μ l de buffer TE 10/1 pH 8.0.
- 11.- Finalmente, se procedió a la caracterización y cuantificación del ADN mediante

espectrofotometría de luz UV a una longitud de onda de 260/280 nm.

12. El ADN resuspendido en buffer TE 10/1 se almacenó a -20°C hasta su utilización.

5. AMPLIFICACION DEL GEN APC POR PCR

5.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LOGRAR UNA ADECUADA AMPLIFICACION DEL GEN APC.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha evolucionado de manera considerable desde su introducción, favoreciendo el aumento en la especificidad y sensibilidad de la reacción, así como su eficiencia y capacidad para amplificar segmentos de mayor tamaño. Además, cada vez se incrementa aún más la versatilidad de aplicaciones a nivel de diagnóstico y de investigación. Esto se ha logrado a través del control de parámetros críticos como tiempo, temperatura y números de ciclos de amplificación. A su vez, la estandarización de concentraciones de reactivos (oligonucleótidos, ion Mg^{+2} , ADN blanco y dNTPs) permite la disminución de dímeros de oligonucleótidos y contribuye también a la disminución del índice de incorporación errónea, aumentando por consecuencia su fidelidad.

En este trabajo, durante la primera etapa se procedió a realizar la estandarización de todos los factores que participan en el proceso de amplificación como son: concentración de $MgCl_2$, oligonucleótidos, dNTPs, ADN Taq polimerasa y el molde de ADN, así como el volumen final de reacción, número de ciclos y temperaturas, para cada uno de los diferentes segmentos a amplificar.

Se manejaron variaciones en concentración de estos factores con el propósito de definir la concentración con la que logra una amplificación eficiente y con un bajo porcentaje de productos inespecíficos.

Se realizó un análisis muy minucioso de la participación y efecto de estos factores, en el proceso de amplificación de ADN. Además, se tomaron en cuenta datos reportados por otros investigaciones para amplificar el gen, y así definir el rango de variación en cada uno de ellos. Entonces se fue variando uno a uno para ver su efecto en la amplificación hasta llegar finalmente a la obtención de una buena amplificación de los productos. Una descripción mas detallada se anexa con los resultados de los mismos.

5.2 AMPLIFICACION DEL GEN APC A PARTIR DE ADN DE LOS PACIENTES

En una segunda etapa, después de definir los componentes de la mezcla de reacción, número de ciclos y temperaturas, se procedió a llevar a cabo la amplificación del ADN de los pacientes.

La región codificante completa del gen APC se dividió en 31 segmentos que se tomaron de la bibliografía (61) y cada segmento se amplificó por separado. Así el gen APC correspondiente a cada uno de los pacientes captados y de los controles normales se amplificó *in vitro* para posteriormente analizarlo mediante SSCP.

1. Después de obtener el ADN genómico de las muestras de sangre y determinar su concentración, se ajustó a una concentración de 100 ng/ μ l con agua destilada y desionizada estéril (ADD). De la misma manera, se ajustaron las concentraciones de cada uno de los iniciadores a una concentración de 10 μ M.

2. Montaje de la Reacción de amplificación:

Se preparó la mezcla de reacción para cada una de las muestras en un volumen total de 50 μ L como sigue:

Reactivo	Conc.stock	Adicionar	Con. final
Buffer PCR	10 X	5.0 μ L	1X
Tris HCl pH 8.3	100mM		10.0 mM
KCl	500mM		50.0 mM
MgCl ₂	15mM		2.0 mM
Gelatina	0.1 %	5.0 μ L	0.01 %
dATP	1 mM	3.5 μ L	70 μ M
dGTP	1 mM	3.5 μ L	70 μ M
dTTP	1 mM	3.5 μ L	70 μ M
dCTP	1 mM	3.0 μ L	70 μ M
[α^{32} P]dCTP	2 mM(370MBq/mL)	0.5 μ L	70 μ M
Iniciador 1	10 μ M	2.5 μ L	0.5 μ M
Iniciador 2	10 μ M	2.5 μ L	0.5 μ M
Taq. polimerasa	1 U/ μ L	1.25 μ L	1.25 U
ADN	0.1 μ g/ μ L	5.0 μ L	500 ng
ADD	---	16.5 μ L	---
VOLUMEN TOTAL		50.0 μL	

Para disminuir errores de pipeteo y dilución se recomienda preparar una mezcla maestra del total de los reactivos, excepto por la adición del ADN y la enzima, y esta mezcla dividirla entre el total de los tubos de reacción.

3. Posteriormente cada una de las mezclas de reacción con un volumen de 50 μ L se cubrieron con 50 μ l de aceite mineral estéril para prevenir evaporación durante los ciclos repetidos de enfriamiento y calentamiento. Se taparon perfectamente bien y se colocaron en el aparato termociclador.

4. Una vez en el termociclador, se programaron el número de ciclos y temperaturas y los tubos con las mezclas de reacción se amplificaron bajo las siguientes condiciones:

1 ciclo	:	Desnaturalización	95° C por 5 min.
35 ciclos	:	Desnaturalización	94° C por 1 min.
		Alineamiento	55° ±3 por 1 min.
		Extensión	72° C por 1 min.
1 ciclo	:	Extensión	72° C por 10 min.

5. Al terminar los ciclos de temperatura los tubos se retiraron del termociclador y se colocaron inmediatamente en hielo. Después se procedió al análisis de los productos amplificados por SSCP, en algunos casos los tubos con el ADN amplificado se guardaron a -20°C para analizarlos posteriormente.

6. Para verificar la eficiencia de la amplificación y la cantidad de producto que se obtuvo en cada amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE (Tris HCl 1 M pH8, Ac bórico 1M y EDTA 0.5 mM).

6. ANALISIS DE MUTACIONES DEL GEN APC POR SSCP

6.1 Estandarización de los parámetros críticos del análisis SSCP

Igual que para el PCR, en esta etapa se efectuó primero la estandarización de los parámetros críticos que intervienen en el análisis de SSCP. Hay varios factores críticos que deben considerarse para llevar a cabo una detección eficiente de mutaciones por este método. Algunas de ellas que se deben considerar durante la electroforesis son: concentración de acrílamida, presencia de aditivos estabilizadores, componentes del buffer de corrida, temperatura, tiempo de corrida y voltaje aplicado. En este trabajo todos estos parámetros se modificaron de uno en uno a la vez, hasta llegar finalmente a definir los valores para cada uno de los parámetros.

De la misma manera se procedió a variar todos estos parámetros hasta lograr una adecuada separación y definición de las hebras de ADN amplificadas, y llevar a cabo finalmente el análisis SSCP.

Las variaciones y combinaciones en estos parámetros se muestran en las tablas siguientes (1 y 2):

Tabla 1. Resumen de las variaciones en los parámetros críticos para el establecimiento del análisis SSCP.

PARAMETRO	VARIACION
alícuota de la muestra	1,2 y 3 mL de dilución
concentración de acrilamida	5, 6, 8 y 10 %
concentración de glicerol	0, 5 y 10 %
buffer	0,5, 1 y 1,5 %
temperatura	4°C y temperatura ambiente
voltaje	80, 100, 110 y 150 v
tiempo	12 - 24 h

Tabla 2. Principales variaciones y combinaciones para el análisis SSCP del gen APC.

No.	Conc Acril	BufferTBE	Glicerol	Temp	Voltaje	Tiempo
1	5 %	0.5 X	0 %	4°C	100 V	12 h
2	5 %	1.0 X	10 %	4°C	100 V	12-16h
3	5 %	1.0 X	0 %	T A	100 V	12 h
4	5 %	1.0 X	10%	T A	100 V	12-16h
h 5	6 %	1.0 X	0 %	4°C	110 V	12-16h
6	6 %	1.0 X	5 %	4°C	110 V	12-16h
7	6 %	1.0 X	10%	4°C	110 V	12-24
8	6 %	1.0 X	0 %	T A	110 V	12-24h
9	6 %	1.0 X	5 %	T A	110 V	12-24h
10	6 %	1.0 X	10%	T A	110 V	12-24h
11	6 %	0.5 X	10 %	T A	110 V	12-24h
12	6 %	1.0 X	10 %	T A	110 V	12-24h
13	6 %	1.5 X	10 %	T A	110 V	12-24h
14	6 %	1.0 X	10 %	T A	110 V	12-24h

TA: Temperatura ambiente

Las condiciones óptimas para el análisis SSCP finales son las que se describen a continuación para el análisis de los pacientes.

6.2 ANALISIS DE MUTACIONES DEL GEN APC POR SSCP A PARTIR DE ADN DE LOS PACIENTES

Después de verificar mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% , que la amplificación de los segmentos de ADN de los pacientes fue eficiente, se procedió a analizarlos por SSCP. Para ello se diluyó una alícuota de cada uno de los productos amplificados y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida neutro al 6%, con la finalidad de lograr una separación de las dos cadenas, y además determinar la conformación y comportamiento electroforético de cada una de ellas.

1. El gel neutro de poliacrilamida se preparó a una concentración de 6% de acrilamida y 10 % de glicerol (se anexa procedimiento de preparación). Después de su polimerización, el gel se montó en la cámara de electroforesis (cámara de secuenciación BRL-2) y se recorrió con buffer TBE (pH 7.5) por 1 h a 250 volts sin añadir las muestras. El paso anterior se realizó con el propósito de eliminar impurezas presentes en el gel y homogenizar la matriz de corrida.

2. Los productos amplificados se diluyeron de la siguiente manera: dilución de una alícuota de la muestra 1:10 o 1:20 con solución desnaturalizante (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05%, xilencianol 0.05%). La dilución de la muestra depende de la cantidad de producto que se obtuvo en la amplificación.

3. De cada una de las diluciones anteriores se tomaron 2 μ l, que fueron desnaturalizados a 95°C por 5 min en baño de agua caliente y se colocaron en hielo inmediatamente, hasta el momento en que se cargaron en cada uno de los carriles del gel (aproximadamente 3 min).

4. Después de la desnaturalización y enfriamiento, de las muestras diluidas, éstas se colocaron en cada uno de los carriles del gel, se aplicó un voltaje de 110 volts y se procedió a la corrida de las muestras por un tiempo que varió desde 16 - 24 h dependiendo del tamaño del producto. Este procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente (24° - 28°C).

Las características del gel y condiciones de corrida fueron las siguientes:

Gel de poliacrilamida 6%
90 mM Tris-borato (pH 7.5)
2 mM EDTA
10 % Glicerol
Temperatura ambiente
Voltaje: 110 Volts
Tiempo: 16- 24 h

5. Al finalizar la corrida electroforética se desmontó el gel cuidadosamente con papel filtro Whatman 3 MM y se cubrió con papel celofan. Desués el gel se colocó en un secador de geles a 80°C por dos horas.
6. Después de las dos horas de secado, se acomodó el gel seco en un cassette de exposición, se colocó encima una película para radiografía y se procedió a su exposición. El tiempo de exposición varió de acuerdo a la actividad del dCTP-³²P presente en el momento del análisis (desde 24 - 72 h).
7. Al finalizar el tiempo de exposición se reveló la película y se procedió al análisis de resultados.

PREPARACION Y MONTAJE DEL GEL DE POLIACRILAMIDA (92)

1. Antes de iniciar la preparación del gel, se debe preparar todo el equipo necesario para llevar a cabo la electroforesis. Sin excepción todo el material debe estar completamente limpio y libre de grasa. También deben prepararse las placas de vidrio con los espaciadores correspondientes dependiendo del grosor del gel y sellarse muy bien.
2. De acuerdo al tamaño de las placas que se van a utilizar y el grosor de los espaciadores, se calcula el volumen de solución de acrilamida que se requiere para preparar el gel a una concentración de 6%.

Para un volúmen de 100 ml las concentraciones que se requieren son:

Reactivos	mL de reactivos
Acrilamida 30%	19.92
H ₂ O destilada	59.38
Buffer TBE 10X	10.0
Persulfato de NH ₄ 10%	0.7
Glicerol	10.0
Volúmen total	100.0

3. La solución de acrilamida se prepara en un matraz kitasato conectado a vacío, ya que se debe eliminar el aire contenido en la solución. La eliminación de aire de la solución de acrilamida no es esencial, pero reduce la posibilidad de que se formen burbujas de aire dentro del gel. Se utilizan guantes para el siguiente paso.

4. Se añaden 35 µL de TEMED por cada 100 mL de solución de acrilamida y se mezcla la solución por deslizamiento.

5. La solución se carga dentro de una jeringa de 20 mL y se invierte para eliminar todo el aire que pueda contener. Se introduce la aguja de la jeringa dentro del espacio entre las dos placas y se deposita la solución de acrilamida llenando todo el espacio hasta el borde superior. La acrilamida remanente debe mantenerse a 4°C para reducir la velocidad de polimerización. Si las placas están bien limpias no deben quedar burbujas atrapadas y si están bien selladas no gotearán. Si se llegasen a formar burbujas, se debe preparar el gel nuevamente.

6. Inmediatamente se inserta el peine, con mucho cuidado de no introducir burbujas de aire que pudieran quedar atrapadas debajo de los dientes. La parte superior de los dientes debe estar ligeramente más alta que el borde superior de las placas. El peine se fija con pinzas. Si es necesario puede utilizarse la acrilamida remanente para llenar el molde de gel completamente.

7. Una vez que polimeriza la acrilamida, se remueve cuidadosamente el peine e inmediatamente se enjuagan las paredes con el mismo buffer de corrida. Es esencial lavar las paredes de los pozos tan rápidamente como sea posible después de remover el peine, ya que de otra manera pequeñas cantidades de solución de acrilamida

atrapadas por el peine polimerizarán en las paredes, y esto producirá superficies irregulares que darán bandas distorsionadas de ADN.

8. Se monta el gel en el tanque de electroforesis y se fija con pinzas. Se llena el reservorio del tanque de electroforesis con solución TBE 1X (Tris-HCl 1M, ácido bórico 1M y EDTA 0.5mM pH 8.0). También es importante usar la misma solución buffer en el reservorio y en la preparación del gel, ya que pequeñas diferencias en la fuerza iónica o pH produce frentes de buffer que pueden distorsionar la migración de DNA.

9. Al cargar las muestras diluidas de DNA en los pozos del gel, debe efectuarse con mucho cuidado, de tal manera que no se mezclen unas muestras con otras. Finalmente se conectan los electrodos a la fuente de poder (el electrodo positivo debe conectarse en el fondo del reservorio) y se aplica el voltaje indicado.

10. Se corre el gel hasta que los colorantes migren a la distancia deseada. Al terminar se apaga la fuente de poder y se desmonta el gel del reservorio para proceder a secarlo.

7. EVALUACION DEL METODO UTILIZANDO COMO CONTROL OTRO GEN CON MUTACION CONOCIDA: GEN DE FIBROSIS QUISTICA

Para comprobar la eficiencia del análisis de mutaciones mediante PCR-SSCP que se realizó en el presente trabajo, se procedió a efectuar el mismo análisis mutacional para otro gen. El gen de elección fue el gen relacionado con la fibrosis quística. Se llevó a cabo la amplificación por PCR de este gen, para lo cual se consideraron los factores anteriormente analizados. En éste caso se utilizó ADN de un sujeto al que previamente se le determinó la presencia de una mutación puntual (G542X) en el exón 11. Se utilizaron los iniciadores F y R proporcionados gentilmente por la Dra. Lorena Orozco (Instituto Nacional de Pediatría) y el fragmento que se amplificó correspondió a un tamaño de 425 pb. localizado en el exón 11.

Se tomaron en cuenta todos los criterios anteriormente descritos para establecer los parámetros y condiciones críticas para el proceso de amplificación del gen de fibrosis quística mediante PCR. De igual manera, también se consideraron los parámetros y

condiciones reportados en bibliografía para llevar a cabo posteriormente el análisis de los productos de amplificación mediante Análisis de Polimorfismo Conformacional de Hebra Sencilla (93-95).

Para el análisis SSCP del gen de la fibrosis quística se procedió a variar cada uno de los parámetros críticos ya descritos. Entre las principales modificaciones están las siguientes (Tabla 3).

No.	Acrilamida	bufferTBE	Glicerol	Temperatura	Voltaje	Tiempo
1	6%	1X	10%	Ambiente	110	12-24h
2	6%	1X	10%	4°C	110	12-24h
3	8%	1X	10%	Ambiente	110	12-24h
4	10%	1X	10%	Ambiente	150	12-24h
5	12%	1X	10%	Ambiente	150	12-24h
6	12%	1X	10%	4°C	150	12-24h

Tabla 3. Principales variaciones y combinaciones de parámetros críticos para el análisis de SSCP del exon 11 del gen de la fibrosis quística.

Todo este conjunto de experimentos para tratar de definir las mejores condiciones con las que se logra obtener una mayor eficiencia en la resolución de las hebras de ADN nos confirma como la movilidad de las moléculas de hebra sencilla de ADN pueden ser afectadas por variaciones en las condiciones electroforéticas y por lo tanto es posible tomar ventaja de ellas para detectar mutaciones en genes diferentes.

8. LISTA DEL PRINCIPAL EQUIPO Y MATERIAL UTILIZADO

1. Cámara fotográfica de revelado instantáneo Marca Polaroid
2. Película fotográfica para revelado instantáneo
3. Cámara horizontal para electroforesis marca BRL
4. Cámara vertical para electroforesis marca BRL
5. Chasis para autorradiografía
6. Película para autorradiografía marca Kodak
7. Congeladores de -20 y -70°C Marca Revco
8. Contador de centelleo modelo C2425 Packard Tri-Carb
9. Escudo protector de radiactividad
10. Espectrofotómetro marca Beckman Mod. DU-655
11. Homo de secado
12. Fuente de poder
13. Microcentrífuga marca Eppendorff
14. Moldes y peines para la preparación del gel
15. Papel Whatman 3MM
16. Micropipetas automáticas de volumen ajustable
17. Puntillas para micropipetas
18. Tubos Eppendorff de 0.5 y 1.5 mL
19. Tubos Falcon de 15 y 50 mL
20. Centrífuga clínica TJ-6 con unidad de refrigeración Beckman
21. Centrífuga refrigerada modelo J2-21 Beckman
22. Baño María con agitación Lab Line
23. Transiluminador Mod 2011 Macrovue LKB
24. Termociclador automático.

9. PREPARACION DE REACTIVOS

REACTIVOS PARA SEPARACION DE LEUCOCITOS Y EXTRACCION DE ADN

1. Buffer AKC:

Disolver 8.31 g de NH_4Cl (0.155 M) y 1.38 g de K_2CO_3 (0.01M) en 800 mL de ADD
Aforar a 1L y esterilizar.

2. Buffer PBS

Solución de mezcla de fosfatos

Preparar una solución de Na_2HPO_4 1 M: 141.96 g en 1L de ADD.

Preparar una solución de NaH_2PO_4 1 M: 137.99 g en 1L de ADD.

Mezclar ambas soluciones hasta obtener un pH 7.4. Esterilizar.

Solución salina 0.9% NaCl

Disolver 8.1 g de NaCl en 900 mL de ADD

Combinar una parte de la mezcla de Fosfatos mas 9 partes de NaCl 0.9%

3. Acido etilén diamino tetracético (EDTA) 500 mM pH8.0

Disolver 186.1 g de Na_2EDTA en 800 mL de agua desionizada y destilada estéril.

Ajustar el pH a 8.0 y aforar a 1 L. Esterilizar en autoclave.

4. Bromuro de etidio 0.5 mg/mL

Disolver 50 mg de Bromuro de etidio en 80 mL de agua. Aforar a 100 mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente oscuro.

5. Fenol saturado:

1) Para un volumen de fenol previamente fundido añadir un volumen de solución amortiguadora de Tris-HCl 0.5 M pH 8 y mezclar hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor a 7.8.

2) Dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa.

3) Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris -HCl 0.1M pH 8.

4) Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de una solución 0.1 M de Tris-HCl pH 8 con 0.2% de β -mercaptoetanol.

REPOSICION DE REACTIVOS

6. Lauril Sulfato de Sodio (SDS) al 25%

Disolver 250 g de SDS en 800 mL de agua destilada estéril y aforar a 1L

7. Proteínasa K 10 mg/mL

Disolver 100 mg de proteínasa K en 10 mL de agua ultrapura. Dividir en alcuotas de 500 μ L y almacenar a -20°C.

8. Buffer TBE 10X

Disolver 108 g de Tris-base, 10 g EDTA y 55 g Ac. bórico en 1L de ADD
Esterilizar en autoclave.

9. Tris-HCl 1M

Disolver 157.6 g en 1000 mL de ADD y ajustar el pH a 8. Esterilizar.

10. Buffer TE 1/10X:

Tris HCl 1M pH7 tomar de esta solución 1 mL

EDTA 0.5M pH8 tomar 0.2 mL de esta solución

Mezclar ambas soluciones y aforar a 100 mL con ADD. Esterilizar.

REACTIVOS PARA AMPLIFICACION POR PCR

1. Buffer PCR 10X:

Reactivo	Stock	Conc. req. Reacción	Conc. 10X	Vol. stock para Conc. 10 X
Tris HCl	1 M	10 mM	100 mM	1 mL
KCl	1 M	50 mM	500 mM	5 mL
MgCl ₂	1 M	1.5 mM	15 mM	1.5 mL
ADD	-	---	---	2.5 mL
Vol. Total				10.0 mL

Tris HCl 1M (pH 8.3)

Disolver 15.75 g de Tris HCl en 80 mL de DDW, ajustar el pH a 8.3 y aforar a 100 mL con ADD.

KCl 1M

Disolver 7.455 g de KCl en 80 mL de ADD y aforar a 100 mL con ADD.

MgCl₂ 1 M

Disolver 9.53 g de MgCl₂ en 80 mL de ADD, aforar a 100 mL.

Esterilizar todas las soluciones.

2. Gelatina 0.1 % (10 X)

100 mL: Disolver 0.1 g en 100 mL de ADD y esterilizar

10 mL : Disolver 0.01 g en 10 mL de ADD y esterilizar

3. Dilución de los dNTPs

La dilución de los dNTPs (Perkin Elmer) se efectúa con agua destilada

dNTPs	Conc stock inicial	Conc dNTPs dil 1:10(ADD)	Conc req. Rxn PCR	Vol c/dNTP en Rxn
dATP	10 mM	1 mM	70 μM	0.7 μL
dGTP	10 mM	1 mM	70 μM	0.7 μL
dTTP	10 mM	1 mM	70 μM	0.7 μL
dCTP	10 mM	1 mM	70 μM	0.7 μL

4. Preparación del templado de ADN:

Ajustar la concentración de ADN de c/u de las muestras a una concentración de 0.1 μg/μL (100 ng/μL) con agua destilada estéril.

5. Iniciadores:

Ajustar la concentración de c/u de los iniciadores a 10 μM para tomar 2.5 μL de c/u y llevarlos a 50 μL en la reacción estandar y obtener una concentración de 0.5 μM para cada iniciador.

6. Taq polimerasa 1 U/μL

Diluir 1 μL de Taq polimerasa (Perkin Elmer) 5 U/μL con 4 μL de agua destilada para obtener una concentración de la enzima de 1 U/μL.

BIOTECNOLOGIA

REACTIVOS PARA PREPARACION DEL GEL DE ACRILAMIDA

1. Preparar stock de acrilamida al 30%:

Acrilamida		29 g
N,N'metilenbisacrilamida		1 g
Agua destilada	Hasta	100 mL

Calentar la solución a 37° C hasta disolución total.

Precaución: La acrilamida es una potente neurotoxina y se absorbe a través de la piel. Utilizar guantes y mascarilla al prepararla. Durante el almacenamiento, la acrilamida y bisacrilamida lentamente se convierte en ácido acrílico y ácido bisacrílico. Esta reacción de desaminación es catalizada por la luz y alcali. Debe verificarse que el pH de la solución de acrilamida sea de 7.0 o menos y guardar la solución en frascos oscuros a temperatura ambiente. Deben prepararse soluciones frescas regularmente.

2. Buffer TBE 10 X

Reactivos	Cantidad	Conc 10X	Conc Requerida 1X
Tris-base	108 g	890 mM	89 mM
Ac. Bórico	55 g	890 mM	89 mM
EDTA 0.5M pH 8	40 mL	20 mM	2 mM

Disolver los reactivos en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH aproximadamente a 8.3 y aforar a 1 L. Esterilizar.

3. Persulfato de amonio 10%

Disolver 1 g de persulfato de amonio en 10 mL de agua destilada

La solución puede guardarse a 4° C por varias semanas.

REVISTA CIENTÍFICA

RESULTADOS

IV RESULTADOS

1. Extracción y Caracterización de ADN

En la actualidad existe un gran número de procedimientos para la extracción y purificación de ADN, con los cuales se logran obtener fragmentos de ADN de diferentes tamaños y con diferentes grados de pureza. La elección del método depende también del tipo de análisis que se va a realizar posteriormente. En éste trabajo se realizó la extracción de ADN a partir de sangre periférica por un procedimiento simple y sencillo (91) en el que primero se separaron los leucocitos mediante lisis de eritrocitos con solución hipertónica AKC, posteriormente se realizó digestión con PK y SDS de los leucocitos aislados para finalmente realizar la extracción con fenol cloroformo del ADN.

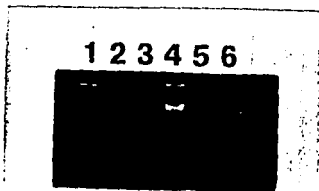
Los resultados obtenidos con éste procedimiento en general reflejaron la extracción de ADN con un buen grado de pureza, el cual se consideró a partir de la relación de absorbencias a 260 y 280 nm. Para la estimación de la concentración de ADN se realizó el cálculo a partir de las lecturas de A 260 nm. Se tomó como referencia que un valor de absorbencia igual a 1 tiene un valor de 50 µg de ADN. En la tabla 4 se muestran como ejemplo algunos de los valores de absorbencia a 280 y 260 nm, así como la concentración final de ADN de cinco individuos analizados.

Tabla 4. Valores de absorbancia y concentración de ADN de sujetos analizados.

No.	Muestra	A280	A260	260-280	conc µg/µl
1	ADN genóm	0.0438	0.0810	1.8485	2.025
2	ADN genóm	0.0369	0.0656	1.7768	1.64
3	ADN genóm	0.0283	0.0556	2.0412	1.39
4	ADN genóm	0.0249	0.0510	2.0412	1.275
5	ADN genóm	0.0226	0.0480	2.1204	1.200

A manera de control de calidad, además del grado de pureza, se evaluó la calidad del ADN con respecto al tamaño de los fragmentos obtenidos. Para ello se llevo a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del ADN genómico. El resultado que se obtuvo se observa en la Fig. 6 que muestra una fotografía de un gel de agarosa en el que se encuentra en cada carril ADN de diferentes muestras con un peso molecular alto y aspecto uniforme, lo cual nos indica que no se degradó durante la extracción.

Fig. 6 Análisis de la calidad del ADN genómico extraído por el método AKC. En cada carril se colocaron 2 μ g de ADN, el cuál se corrió en gel de agarosa al 0.8% a 80 V y por un tiempo de 3 h.



2. SÍNTESIS Y PURIFICACION DE OLIGONUCLEOTIDOS

2.1 Secuencia de oligonucleótidos sintetizados para amplificar los diferentes exones el gen A P C.

Los oligonucleótidos que se utilizarón para la amplificación de los diferentes exones del gen APC son los que reportó Miyoshi et al en 1992 (61) que abarcan toda la región codificante contenida dentro de 15 exones (Fig 2). La región codificante se dividió en 31 segmentos. Los primeros 14 segmentos corresponden a 14 exones individuales, por el contrario como la secuencia codificante del último exon es muy larga (6571 pb), éste se dividió en 17 segmentos sobrepuestos. Todo esto hace un total de 62 oligonucleótidos sintetizados (Tabla 5).

A continuación se muestra una lista con los nombres de los oligonucleótidos sintetizados, su secuencia y localización (Tabla 5).

Tabla 5 SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA LA AMPLIFICACION EL GEN APC

EXON	OLIGO	CODON	SECUENCIA	EXON	OLIGO	CODON	SECUENCIA
1	G31 G18	1-45	ATGGAATTTCTTCTTAAACTGCTTAAAGAG TTTACAAGAGGGAATCTGAAAT	15-3	E9-3 E9-4	862-1022	ACTACACATCCAGCAACAGA TCTAGTTCCTCATATTATCAT
2	G21 G22	46-74	CCTGAATTCAAAGAAATACAGAATCACGTC ATGAAGCTTGTACTTGGATCTACAGACC	15-4	C23 E9-6	998-1141	TCAATACCCAGCCGACCT GGCTTATCATCTTCTTAGTCA
3	G29 G28	74-141	ATGGAATTCATTAAGAATATTTAGACTGCT TTAAAGCTTAAACAATAAAGCTGGAGTACACA	15-5	E9-5 E9-8	1125-1284	GTAAGCCAGTCTTTGTGTGTC CAGCTGATGCAGAAAGATGAT
4	G27 G30	141-177	ATGGAATTCACACTGATGTAAGATTGGCTC ATGAAGCTTTAATGSAATACCTAGTACT	15-6	E9-7 E9-10	1260-1410	AGACTTATTGTGTAGAAGATAC ATGGTTCACCTGCAACGGA
5	G17 G26	178-215	CAGGAATTCCTTATTGGTCTTATATGCT CTGAAGCTTCCATATAGCTCTCGGCTG	15-7	E9-9 C36	1389-1547	TCTGTCACTTCACITGATAG CATTGTGATCTTTAGGGCTGC
6	G23 G20	216-243	CAAGGATCCTGAGCTTTTAAAGTGGTAT CTGAAGCTTTTCTCAGAATAACTACCTA	15-8	E9-11 E9-12	1516-1673	ACAGAAAGATGTGGAAATTAAG TTCTCCAGCAGCTAACTCAT
7	G19 G24	244-278	ACTGAATTCCTGGGCTAAGAAAGCCT ATGAAGCTTCTTAGAACCACTGTGCTTC	15-9	E9-13 E9-14	1654-1826	GCTACATCTCTAAGTGATCT CTTATCATTGAAGTCCCTGG
8	G5 G4	279-311	CATGATGTTATCTGATTTTACC CTTAGCAAAGTAGTATGCGC	15-10	E9-15 C52	1805-1965	CTCAGACAACAAAGATTCAAA GAGAAAAGCAAAGTGGAGTA
9	G1 G2	312-438	GGATATAAAGTCTGAATTTTGT CATGCACACTACGATGTACACT	15-11	E9-17 E9-22	1935-2097	AGTCATCCAAAGACATACCA CTGAATCAGGGGATAGACC
10	G13 G14	438-470	CATCATGTCTTCAAATAACA CACCAGTAATTGTCTATGTCA	15-12	C35 C38	2082-2246	GATATACAGAGACCAGATTCA ACAGGACTTGTACTTAGGGA
11	G9 G10	470-516	TAGATGATTGTCTTTTCCCTCT TCATACCTGAGCTATCTTAAG	15-13	C37 C40	2226-2396	CGAGGCCAGGACAATGATTC GACTCACTTCTTGGAAACTA
12	G7 G8	517-542	GCTTGGCTCAAGTTGTCTT CAGAGTGGAGACCCTGCCT	15-14	C39 C42	2372-2472	CAGATGAGCCAAACAGAACCC GCTGGCTAGATGATGGAG
13	G11 G8	543-581	GCACTAGTATGATTTATGTATAAA ACATGAAATTCATATTATAGTACT	15-15	E9-19 E9-16	2456-2610	TTGAGGAAAACCTGCTTCAATTT TCCTTTTGGGATCTTGG
14	G15 G16	582-653	CAACTCTAATTAGATGACCCA GAGAGTATGAAITCTGTACTT	15-16	E9-21 E9-18	2592-2760	TGAACTCTATTTACAGGAACCC GTACGTTCCCACTAAGAACT
15-1	G35 C22	653-751	CAATCATATTAGCCTTTTGTGCT GATGGCAAGCTTGAGCCAG	15-17	E9-23 E9-20	2745-2843	TGTCCTGTATCAGAGACT TGTCTATATAGCAGTTGTAATT
15-2	E9-1 E9-2	735-884	CGAAGTACAAGGATGCCAAT CAGTGGTGGAGATCTGCCAA				

2000
 1999
 1998
 1997
 1996
 1995
 1994
 1993
 1992
 1991
 1990
 1989
 1988
 1987
 1986
 1985
 1984
 1983
 1982
 1981
 1980
 1979
 1978
 1977
 1976
 1975
 1974
 1973
 1972
 1971
 1970
 1969
 1968
 1967
 1966
 1965
 1964
 1963
 1962
 1961
 1960
 1959
 1958
 1957
 1956
 1955
 1954
 1953
 1952
 1951
 1950
 1949
 1948
 1947
 1946
 1945
 1944
 1943
 1942
 1941
 1940
 1939
 1938
 1937
 1936
 1935
 1934
 1933
 1932
 1931
 1930
 1929
 1928
 1927
 1926
 1925
 1924
 1923
 1922
 1921
 1920
 1919
 1918
 1917
 1916
 1915
 1914
 1913
 1912
 1911
 1910
 1909
 1908
 1907
 1906
 1905
 1904
 1903
 1902
 1901
 1900
 1899
 1898
 1897
 1896
 1895
 1894
 1893
 1892
 1891
 1890
 1889
 1888
 1887
 1886
 1885
 1884
 1883
 1882
 1881
 1880
 1879
 1878
 1877
 1876
 1875
 1874
 1873
 1872
 1871
 1870
 1869
 1868
 1867
 1866
 1865
 1864
 1863
 1862
 1861
 1860
 1859
 1858
 1857
 1856
 1855
 1854
 1853
 1852
 1851
 1850
 1849
 1848
 1847
 1846
 1845
 1844
 1843
 1842
 1841
 1840
 1839
 1838
 1837
 1836
 1835
 1834
 1833
 1832
 1831
 1830
 1829
 1828
 1827
 1826
 1825
 1824
 1823
 1822
 1821
 1820
 1819
 1818
 1817
 1816
 1815
 1814
 1813
 1812
 1811
 1810
 1809
 1808
 1807
 1806
 1805
 1804
 1803
 1802
 1801
 1800
 1799
 1798
 1797
 1796
 1795
 1794
 1793
 1792
 1791
 1790
 1789
 1788
 1787
 1786
 1785
 1784
 1783
 1782
 1781
 1780
 1779
 1778
 1777
 1776
 1775
 1774
 1773
 1772
 1771
 1770
 1769
 1768
 1767
 1766
 1765
 1764
 1763
 1762
 1761
 1760
 1759
 1758
 1757
 1756
 1755
 1754
 1753
 1752
 1751
 1750
 1749
 1748
 1747
 1746
 1745
 1744
 1743
 1742
 1741
 1740
 1739
 1738
 1737
 1736
 1735
 1734
 1733
 1732
 1731
 1730
 1729
 1728
 1727
 1726
 1725
 1724
 1723
 1722
 1721
 1720
 1719
 1718
 1717
 1716
 1715
 1714
 1713
 1712
 1711
 1710
 1709
 1708
 1707
 1706
 1705
 1704
 1703
 1702
 1701
 1700
 1699
 1698
 1697
 1696
 1695
 1694
 1693
 1692
 1691
 1690
 1689
 1688
 1687
 1686
 1685
 1684
 1683
 1682
 1681
 1680
 1679
 1678
 1677
 1676
 1675
 1674
 1673
 1672
 1671
 1670
 1669
 1668
 1667
 1666
 1665
 1664
 1663
 1662
 1661
 1660
 1659
 1658
 1657
 1656
 1655
 1654
 1653
 1652
 1651
 1650
 1649
 1648
 1647
 1646
 1645
 1644
 1643
 1642
 1641
 1640
 1639
 1638
 1637
 1636
 1635
 1634
 1633
 1632
 1631
 1630
 1629
 1628
 1627
 1626
 1625
 1624
 1623
 1622
 1621
 1620
 1619
 1618
 1617
 1616
 1615
 1614
 1613
 1612
 1611
 1610
 1609
 1608
 1607
 1606
 1605
 1604
 1603
 1602
 1601
 1600
 1599
 1598
 1597
 1596
 1595
 1594
 1593
 1592
 1591
 1590
 1589
 1588
 1587
 1586
 1585
 1584
 1583
 1582
 1581
 1580
 1579
 1578
 1577
 1576
 1575
 1574
 1573
 1572
 1571
 1570
 1569
 1568
 1567
 1566
 1565
 1564
 1563
 1562
 1561
 1560
 1559
 1558
 1557
 1556
 1555
 1554
 1553
 1552
 1551
 1550
 1549
 1548
 1547
 1546
 1545
 1544
 1543
 1542
 1541
 1540
 1539
 1538
 1537
 1536
 1535
 1534
 1533
 1532
 1531
 1530
 1529
 1528
 1527
 1526
 1525
 1524
 1523
 1522
 1521
 1520
 1519
 1518
 1517
 1516
 1515
 1514
 1513
 1512
 1511
 1510
 1509
 1508
 1507
 1506
 1505
 1504
 1503
 1502
 1501
 1500
 1499
 1498
 1497
 1496
 1495
 1494
 1493
 1492
 1491
 1490
 1489
 1488
 1487
 1486
 1485
 1484
 1483
 1482
 1481
 1480
 1479
 1478
 1477
 1476
 1475
 1474
 1473
 1472
 1471
 1470
 1469
 1468
 1467
 1466
 1465
 1464
 1463
 1462
 1461
 1460
 1459
 1458
 1457
 1456
 1455
 1454
 1453
 1452
 1451
 1450
 1449
 1448
 1447
 1446
 1445
 1444
 1443
 1442
 1441
 1440
 1439
 1438
 1437
 1436
 1435
 1434
 1433
 1432
 1431
 1430
 1429
 1428
 1427
 1426
 1425
 1424
 1423
 1422
 1421
 1420
 1419
 1418
 1417
 1416
 1415
 1414
 1413
 1412
 1411
 1410
 1409
 1408
 1407
 1406
 1405
 1404
 1403
 1402
 1401
 1400
 1399
 1398
 1397
 1396
 1395
 1394
 1393
 1392
 1391
 1390
 1389
 1388
 1387
 1386
 1385
 1384
 1383
 1382
 1381
 1380
 1379
 1378
 1377
 1376
 1375
 1374
 1373
 1372
 1371
 1370
 1369
 1368
 1367
 1366
 1365
 1364
 1363
 1362
 1361
 1360
 1359
 1358
 1357
 1356
 1355
 1354
 1353
 1352
 1351
 1350
 1349
 1348
 1347
 1346
 1345
 1344
 1343
 1342
 1341
 1340
 1339
 1338
 1337
 1336
 1335
 1334
 1333
 1332
 1331
 1330
 1329
 1328
 1327
 1326
 1325
 1324
 1323
 1322
 1321
 1320
 1319
 1318
 1317
 1316
 1315
 1314
 1313
 1312
 1311
 1310
 1309
 1308
 1307
 1306
 1305
 1304
 1303
 1302
 1301
 1300
 1299
 1298
 1297
 1296
 1295
 1294
 1293
 1292
 1291
 1290
 1289
 1288
 1287
 1286
 1285
 1284
 1283
 1282
 1281
 1280
 1279
 1278
 1277
 1276
 1275
 1274
 1273
 1272
 1271
 1270
 1269
 1268
 1267
 1266
 1265
 1264
 1263
 1262
 1261
 1260
 1259
 1258
 1257
 1256
 1255
 1254
 1253
 1252
 1251
 1250
 1249
 1248
 1247
 1246
 1245
 1244
 1243
 1242
 1241
 1240
 1239
 1238
 1237
 1236
 1235
 1234
 1233
 1232
 1231
 1230
 1229
 1228
 1227
 1226
 1225
 1224
 1223
 1222
 1221
 1220
 1219
 1218
 1217
 1216
 1215
 1214
 1213
 1212
 1211
 1210
 1209
 1208
 1207
 1206
 1205
 1204
 1203
 1202
 1201
 1200
 1199
 1198
 1197
 1196
 1195
 1194
 1193
 1192
 1191
 1190
 1189
 1188
 1187
 1186
 1185
 1184
 1183
 1182
 1181
 1180
 1179
 1178
 1177
 1176
 1175
 1174
 1173
 1172
 1171
 1170
 1169
 1168
 1167
 1166
 1165
 1164
 1163
 1162
 1161
 1160
 1159
 1158
 1157
 1156
 1155
 1154
 1153
 1152
 1151
 1150
 1149
 1148
 1147
 1146
 1145
 1144
 1143
 1142
 1141
 1140
 1139
 1138
 1137
 1136
 1135
 1134
 1133
 1132
 1131
 1130
 1129
 1128
 1127
 1126
 1125
 1124
 1123
 1122
 1121
 1120
 1119
 1118
 1117
 1116
 1115
 1114
 1113
 1112
 1111
 1110
 1109
 1108
 1107
 1106
 1105
 1104
 1103
 1102
 1101
 1100
 1099
 1098
 1097
 1096
 1095
 1094
 1093
 1092
 1091
 1090
 1089
 1088
 1087
 1086
 1085
 1084
 1083
 1082
 1081
 1080
 1079
 1078
 1077
 1076
 1075
 1074
 1073
 1072
 1071
 1070
 1069
 1068
 1067
 1066
 1065
 1064
 1063
 1062
 1061
 1060
 1059
 1058
 1057
 1056
 1055
 1054
 1053
 1052
 1051
 1050
 1049
 1048
 1047
 1046
 1045
 1044
 1043
 1042
 1041
 1040
 1039
 1038
 1037
 1036
 1035
 1034
 1033
 1032
 1031
 1030
 1029
 1028
 1027
 1026
 1025
 1024
 1023
 1022
 1021
 1020
 1019
 1018
 1017
 1016
 1015
 1014
 1013
 1012
 1011
 1010
 1009
 1008
 1007
 1006
 1005
 1004
 1003
 1002
 1001
 1000
 999
 998
 997
 996
 995
 994
 993
 992
 991
 990
 989
 988
 987
 986
 985
 984
 983
 982
 981
 980
 979
 978
 977
 976
 975
 974
 973
 972
 971
 970
 969
 968
 967
 966
 965
 964
 963
 962
 961
 960
 959
 958
 957
 956
 955
 954
 953
 952
 951
 950
 949
 948
 947
 946
 945
 944
 943
 942
 941
 940
 939
 938
 937
 936
 935
 934
 933
 932
 931
 930
 929
 928
 927
 926
 925
 924
 923
 922
 921
 920
 919
 918
 917
 916
 915
 914
 913
 912
 911
 910
 909
 908
 907
 906
 905
 904
 903
 902
 901
 900
 899
 898
 897
 896
 895
 894
 893
 892
 891
 890
 889
 888
 887
 8

2.2 Eficiencia de la síntesis química de oligonucleótidos

En el proceso de síntesis de oligonucleótidos, cuando se presenta una baja eficiencia de acoplamiento, se incrementa el porcentaje de impurezas y se hace más difícil la purificación del oligonucleótido. Como regla general una eficiencia de acoplamiento mayor de 98% (para escala de síntesis de 0.1 y 1.0 μ moles) se considera que se efectuó una síntesis exitosa. Durante la síntesis de los oligonucleótidos necesarios para la amplificación del gen APC, se obtuvo de manera general un buen porcentaje de eficiencia alrededor de 98 % para la mayoría de ellos. Como ejemplo se muestra una hoja de reporte de síntesis de un oligonucleótido.

Hoja de reporte de la síntesis del oligonucleótido C22

Aparato: Gene Assembler Special Date : 2-03-1994
Sequence : C22 Synthesis : Primer C22
Synthesis Type : DNA Scale : 0.2 micromole
Sequence Length : 19 Column : 1
Final Debruylation : Yes

Pos	Base	Debruy Start	Debruy Value
19	G	0.46	39
18	A	0.46	73
17	C	0.46	76
16	C	0.46	79
15	G	0.46	66
14	A	0.47	76
13	G	0.47	68
12	T	0.49	84
11	T	0.49	84
10	C	0.49	82
9	G	0.48	68
8	A	0.50	76
7	A	0.50	75
6	C	0.51	78
5	G	0.50	65
4	G	0.50	66
3	T	0.52	79
2	A	0.51	72
1	G	0.52	62

Total synthesis yield from start = 100.0 %

3. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LOGRAR UNA ADECUADA AMPLIFICACION POR PCR

Esto se logró a través del control de parámetros críticos como tiempo, temperatura y números de ciclos de amplificación. Además, la estandarización de concentraciones de reactivos (oligonucleótidos, ión Mg, ADN y dNTPs) permite la disminución de dímeros de oligonucleótidos y contribuye también a la disminución del índice de incorporación errónea, aumentando por consecuencia la fidelidad de la amplificación.

Al iniciar la estandarización de PCR fue necesario variar cada uno de los parámetros antes mencionados hasta obtener condiciones optimas para la reacción. Los parámetros que fueron estandarizados se describen a continuación.

3.1 Efecto de la variación en la concentración de $MgCl_2$ en la cantidad y calidad del producto amplificado.

La concentración del ión Mg^{+2} juega un papel muy importante para asegurar la especificidad, reproducibilidad y cantidad de producto que se obtiene en PCR. Por lo tanto, es importante definir la cantidad adecuada de $MgCl_2$ que deberá utilizarse, además de asegurar que en cada ensayo de amplificación se adicione la misma cantidad para así obtener una mayor reproducibilidad en los resultados. Las concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, por lo que se recomienda optimizar la concentración de $MgCl_2$ en cada reacción. Para una reacción estándar se recomienda utilizar una concentración final entre 0.5 y 2.5 mM. Si se disminuye demasiado la concentración del ión Mg^{+2} , la actividad de la enzima decae al grado de que algunas veces la amplificación llega a ser nula.

Para el establecimiento de la concentración adecuada de $MgCl_2$ se realizó una curva de concentración de Mg, en la cual se llevaron a cabo amplificaciones de un segmento de ADN utilizando diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (Tabla 6)

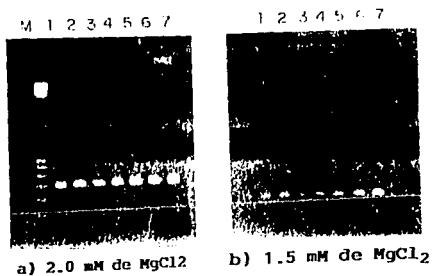
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Tabla 6. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ en la cantidad de producto amplificado y la presencia de productos inespecíficos.

Concentración de $MgCl_2$	Cantidad de producto amplificado	Presencia de productos inespecíficos
0.5 mM	+	No
1.0 mM	+	No
1.5 mM	++	No
2.0 mM	+++	No
2.5 mM	+++	Si

La concentración de $MgCl_2$ con la cuál se obtuvo una mayor cantidad del producto fue de 2.0 mM. Además, con ésta concentración se obtiene una mayor especificidad en la amplificación. Lo anterior se muestra en la Fig. 7, en la que se observa una buena amplificación sin la presencia de productos inespecíficos.

Fig. 7. Efecto de la Concentración de $MgCl_2$. Se muestra una mayor cantidad de producto amplificado utilizando una concentración de 2.0 mM (a) exón 3) que al utilizar 1.5 mM (b) exón 15-1). En ambas amplificaciones no se observa la presencia de productos inespecíficos (M, marcador de pb, 1-7 ADN de diferentes muestras).



3.2 Efecto de diferentes concentraciones de Oligonucleótidos en la mezcla de reacción.

La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. Al ser este uno de los parámetros más importantes que determina la especificidad de la reacción de amplificación, su elección y diseño debe ser muy cuidadoso. Idealmente en cada 100 μ l de reacción, la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1.0 μ M. El uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos. En éste trabajo para definir la concentración adecuada de oligonucleótidos, también se procedió a realizar una curva con diferentes concentraciones de oligonucleótidos como la que se realizó para la concentración de $MgCl_2$ (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la concentración de oligonucleótidos presentes en la mezcla de reacción de amplificación en la cantidad de producto amplificado.

Concentración oligonucleótidos	Cantidad de producto amplificado	Presencia de productos inespecíficos
0.05 μ M	---	No
0.1 μ M	+	No
0.2 μ M	++	No
0.5 μ M	+++	No
0.7 μ M	+++	Si
1.0 μ M	++	Si

A partir de los resultados obtenidos de la amplificación de un segmento de ADN, la concentración de oligonucleótidos con la que se logró una amplificación específica del producto fué de 0.5 μ M para cada uno de los oligonucleótidos. Al utilizar ésta concentración no se observaron amplificaciones inespecíficas que se evidencian con la presencia de barridos al analizar el producto amplificado en gel de agarosa.

3.3 Efecto de la variación en la concentración de los dNTPs:

De la misma manera que el $MgCl_2$, las concentraciones mínimas necesarias de dNTPs disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración de dNTPs también debe optimizarse. Concentraciones entre 20 y 200 μM proporcionan resultados óptimos, además es muy importante hacer énfasis en que las concentraciones de cada uno de los cuatro dNTPs deben ser equimolares.

Para establecer las concentraciones adecuadas de los dNTPs, se procedió inicialmente a utilizar los datos reportados en bibliografía para la amplificación del gen APC (11,91,92). Finalmente, se logró una buena amplificación del producto con una concentración de dNTPs de 70 μM (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de Concentración de dNTPs evaluados.

Concentración de dNTP's	Referencia
1.5 mM	Tops et al 1987(96)
200 μM	Baker et al 1990(97)
70 μM	Groden et al 1991(11)

Al realizar la amplificación con una concentración de 1.5 mM no se observó amplificación. En cambio con 200 y 70 μM el grado de amplificación fué muy similar. Por lo cuál se eligió la menor cantidad que nos proporcionó una buena amplificación.

3.4 Importancia de la concentración de la enzima ADN Taq polimerasa

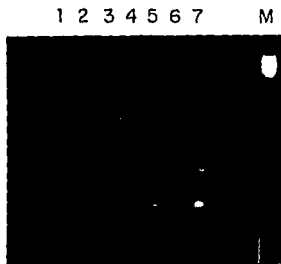
Una de las enzimas termoestables más utilizadas en PCR es la Taq ADN Polimerasa, ya que es fácil de estandarizar en la reacción, y además tiene un costo más bajo que otras disponibles en el mercado. La mayoría de los protocolos recomiendan el uso de 1 a 2.5 U de la enzima por cada 100 μL de reacción. Para el establecimiento de la cantidad mínima de enzima que se requiere para una buena amplificación se procedió a utilizar diferentes concentraciones de enzima de una misma marca comercial (Perkin Elmer) por reacción de amplificación (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la cantidad de enzima Taq ADN polimerasa utilizada en la reacción de amplificación en la cantidad de producto obtenido.

Cantidad de enzima ADN Taq polimerasa	Cantidad de producto amplificado
0.5 U	+
1.0 U	++
1.25 U	+++

Finalmente la concentración de la Taq ADN polimerasa que se utilizó fue de 1.25 U por reacción (volumen 50 μ L), ya que con esta concentración se obtuvo buena cantidad de producto (Fig. 8).

Fig. 8. Efecto de la cantidad de enzima Taq ADN Polimerasa en la eficiencia de la reacción de amplificación del exon 3 en un volumen de 50 ml. Carriles 1, 2 y 3 de 0.5 U, 4 y 5 de 1.0 U, y 6 y 7 de 1.25 U de ADN polimerasa.



3.5 Importancia de la concentración del ADN :

La concentración del ADN blanco en la reacción depende de la fuente utilizada, e idealmente se requieren aproximadamente 10^5 copias de ADN blanco, ésto es, de 300 ng a 1 μ g de ADN genómico humano. Alternativamente, cantidades menores de ADN pueden utilizarse en la amplificación de genes que existen en varias copias en el genoma. En este trabajo la concentración del ADN que se utilizó para amplificar los diferentes segmentos de cada uno de los pacientes fué de 500 ng de ADN. Con ésta cantidad se obtuvo una buena amplificación.

3.6 Importancia y efecto del número de ciclos de temperatura en el proceso de amplificación de ácidos nucleicos.

Teóricamente, en condiciones óptimas el nivel de amplificación del ADN en PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo. Sin embargo en la práctica, después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero a una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se denomina fase de "meseta", posiblemente debido al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos ADN blanco-oligonucleótidos, presentes en los ciclos que se presentan. Esto puede evitarse si se aumenta del tiempo de extensión en los últimos ciclos de reacción o la cantidad de la enzima, aunque lo recomendable es ajustar el número de ciclos de tal manera que la amplificación se realice al obtenerse los niveles máximos de amplificación en una reacción que presente un comportamiento lineal. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 35, dependiendo de la cantidad de ADN inicial. Por otra parte las temperaturas de desnaturalización (92 a 98°C) y extensión (70 a 74°C) son generalmente estándares para todas las reacciones. La temperatura que tiene el efecto más crítico en la especificidad es la de alineamiento, la cuál está determinada principalmente por la temperatura media de fusión (T_m) de los oligonucleótidos.

Tomando en cuenta todos estos antecedentes y revisando la bibliografía en la que se describe la amplificación del gen APC por otros autores, en este trabajo se establecieron los siguientes ciclos de temperatura (Tabla 10).

Tabla 10. Ciclos de Temperatura para la amplificación del gen APC.

No. DE CICLOS	TEMP Y TIEMPO	ETAPA
1 ciclo	94° C por 5 min.	Desnaturalización
35 ciclos	94° C por 1 min.	Desnaturalización
	55° C por 1 min.	Alineamiento
	72° C por 1 min.	Extensión
1 ciclo	72° C por 10 min.	Extensión final

Se estableció un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, mediante el cual se asegura que la mayor parte del ADN se separe en hebras sencillas. Con los siguientes 35 ciclos de amplificación de igual manera se asegura que la reacción llegue a una etapa de meseta con la que se obtenga una máxima cantidad de producto amplificado. Por último, se añadió un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos para permitir que se completen las cadenas incompletas de los ciclos anteriores.

Con respecto a la temperatura de alineamiento, para su establecimiento se consideró la siguiente fórmula empírica basada en la la secuencia y tamaño de cada oligonucleótido: se adicionan 2°C por cada A y T presentes en el oligonucleótido, y 4°C por cada G y C, y se restan 5°C a la suma total de (A+T) y (G+C). Ejemplo:

Exón 15-2 APC Primers E9-1 (20b) y E9-2 (19b)

E9-1 CG AA GTACAAGGATGCCAAT 11(A+T) x2= 22

$$9 (G+C) \times 4 = 36$$

$$58^{\circ}\text{C} \quad 58^{\circ} - 5 = 53^{\circ}\text{C}$$

E9-2 CAG TGGTGGAGATCTGCAA 9(A+T) x2= 18

$$10(G+C) \times 4 = 40$$

$$58^{\circ}\text{C} \quad 58^{\circ} - 5 = 53^{\circ}\text{C}$$

Temperatura de Alineamiento X = 53°C

El tamaño de los oligonucleótidos utilizados para amplificar todos los segmentos del gen APC comprende entre 18 y 30 bases, esto en combinación con el contenido de bases específico para cada uno de ellos, dió de manera general un promedio de temperatura de alineamiento de $55 \pm 3^{\circ}\text{C}$ para la mayoría de los segmentos amplificados.

RESUMEN DE RESULTADOS AMPLIFICACION POR PCR

Con el establecimiento de todos estos parámetros se llegó finalmente a la estandarización de esta metodología para la amplificación de los diferentes segmentos que componen el total de la secuencia codificante del gen APC. Los valores finales para cada uno de los parámetros son los que se describen ampliamente en el apartado de Material y Métodos, y con los cuáles se realizó la amplificación de todos los exónes de los pacientes (Tablas 11 y 12) Se realizaron además, algunas modificaciones en cuanto a la temperatura de alineamiento dependiendo del tamaño y secuencia de los oligonucleótidos involucrados, como ya se mencionó en la descripción de ciclos de temperatura.

Tabla 11. Resumen de componentes de mezcla de reacción Amplificación del gen APC

Componentes	Concentración
Buffer	1X
Gelatina	0.1%
dNTPs	70 μM
Oligonucleótidos	10 μM
Taq ADN polimerasa	1.25 U
ADN genómico	500 ng
Agua destilada	16.5 μL
Vol total	50 μL

Tabla 12. Ciclos de Temperatura y Tiempos.
Amplificación del gen APC

No. de Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	94°C	5 min
35 ciclos	94°C	1 min
	55° ± 3°C	1 min
	72 °C	1 min
1 ciclo	72°C	10 min

UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

4. EVALUACION DE LOS PARAMETROS CRITICOS EN EL ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA EFECTUAR EL ANALISIS DE SSCP

4.1 Evaluación de los factores involucrados en el éxito del proceso de desnaturalización de ADN para análisis de SSCP.

Después del proceso de amplificación, la concentración que se obtiene del ADN amplificado es muy alta, por lo cual los productos amplificados deben ser diluidos. La dilución generalmente se realiza en una solución con características desnaturalizantes, con el objeto de lograr desde el inicio la separación de las dos hebras de ADN amplificado. Este es un punto a considerar importante ya que una excesiva concentración del producto en la muestra diluida que se aplica para la electroforesis, fomenta la formación de realineamientos de la doble hebra de ADN, lo cual complica la interpretación de resultados, por lo cual debe emplearse una dilución del producto amplificado que dependerá inicialmente del producto obtenido específicamente en cada reacción de PCR. De manera general, dependiendo de la eficiencia de la reacción, y del método de detección, la muestra puede diluirse desde 1:2 hasta incluso 1:100 veces.

En base a la eficiencia de la reacción de amplificación, se determinó para cada segmento de ADN, la dilución a la que se sometió cada uno. De manera general, las diluciones empleadas fueron 1:10 y 1:20 dependiendo de la cantidad de producto amplificado que se obtuvo.

Los componentes de la solución desnaturalizante para dilución fueron los siguientes:

Formamida	95%
Azul de bromofenol	0.05%
Xilencianol	0.05%
EDTA	20 mM
NaOH	10 mM

Con diluciones de 1:10 y 1:20 en promedio, en la solución desnaturalizante a base de formamida, se logró obtener de manera eficiente la seoparación de ambas hebras de ADN .

4.2 Influencia de los factores que participan en la electroforesis en gel de poliacrilamida

Hay varios factores críticos que deben considerarse para llevar a cabo una detección eficiente de mutaciones por este método. Algunas de ellas que se deben considerar durante la electroforesis son: concentración de acrilamida, presencia de aditivos, componentes del buffer de corrida, temperatura, tiempo de corrida y voltaje aplicado. En este trabajo todos estos parámetros se fueron modificando de uno en uno a la vez, hasta llegar finalmente a definir los valores para cada uno de los parámetros que se describen a continuación.

4.2.1 Efecto de la concentración de acrilamida y presencia de glicerol en la estabilización de los conformeros de hebra sencilla.

La concentración de acrilamida-bisacrilamida y la presencia de aditivos estabilizantes de hebra sencilla como glicerol, también afecta la separación de las dos hebras así como su permanencia sin renaturalizarse. Se ha reportado que una baja concentración de glicerol generalmente mejora la separación de las dos hebras, ya que permite una mayor estabilización de los conformeros. Este mismo efecto se observó en este trabajo.

4.2.2 Efecto de la constitución del buffer en el proceso electroforético

Las características proporcionadas por cada uno de los elementos que componen el buffer, como son tris HCl, ácido bórico y EDTA, así como su concentración, definen la fuerza iónica presente en el buffer de la corrida electroforética. Ya que se ha visto que a mayor concentración de estos reactivos experimentalmente se observó una alteración en el corrimiento de los ácidos nucleicos que consiste en la formación de las bandas al correr a través del gel de acrilamida.

4.3 INFLUENCIA DE LOS FACTORES QUE DETERMINAN EL ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CORRIDA

4.3.1 Efecto de la variación en la temperatura.

La temperatura es un punto crítico que debe controlarse para obtener resultados reproducibles en SSCP. Una temperatura constante da una mejor definición de las bandas y se obtiene mejores resultados.

4.3.2 Efecto del Voltaje

La indicación de voltaje esta estrechamente ligada al tiempo de corrida, ya que para la aplicación de voltajes bajos se necesitan tiempos de corrida más largos y viceversa para voltajes más grandes.

4.3.3 Efecto del tiempo de corrida

Se ha reportado que tiempos prolongados de electroforesis son más convenientes para obtener una buena separación de las hebras de ADN. Pero debe de jugarse con el voltaje aplicado, de tal manera que no aumente mucho la temperatura del gel y se puedan obtener resultados reproducibles.

Para definir las condiciones óptimas para llevar a cabo el método SSCP en el análisis del gen APC se llevaron a cabo variaciones en cada uno de los parámetros descritos (Tablas 1 y 2 Sección de Material y métodos).

De manera general tuvimos como resultados que al incrementar la fuerza iónica del buffer de corrida (1.5X TBE, 135 mM Tris Borato pH 8.3, 6 mM EDTA) e incrementar la concentración de glicerol arriba del 10 % comparando con las concentraciones reportadas no hubo ninguna mejoría en la separación de las hebras ya que se observan semejantes a las ya mencionadas.

En contraste con el corrimiento de los geles en buffer TBE 1X se obtuvieron resultados mejores dando bandas mejor definidas.

RECIBIDO EN EL
LABORATORIO DE
GENÉTICA MOLECULAR
Y CELULAR
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
CIENFUEGOS

Además también se observó que con la presencia de glicerol al 5% y 10% mejoró notablemente la resolución de las bandas.

Con respecto a las variaciones en temperatura evaluadas fueron a 4°C y a temperatura ambiente. De manera general se encontró que a temperatura ambiente se obtiene una buena resolución de las bandas, y se aumenta la velocidad de migración, en comparación con una temperatura de 4°C.

Se observó que con electroforesis prolongadas, aplicando un voltaje bajo, se logró obtener una buena separación de las bandas, y de esta manera no se incrementó la temperatura, evitando calentamiento del gel que provocaría deformación del mismo y una mala separación de las bandas. En las figuras siguientes se muestran los resultados obtenidos con la modificación de diferentes parámetros (Figs 9-15).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



EXON 10

Fig 9. Análisis SSCP del exón 10. Electroforesis en: acrilamida 6%, glicerol 0%, buffer TBE 1X, V=110V y T=25°C (Carriles 1-15 ADN de diferentes muestras).

RECEIVED

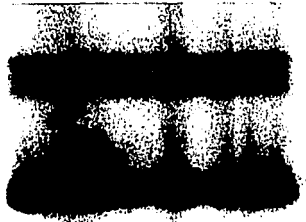
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



EXON 15-7

Fig. 10. Análisis SSCP del exón 15-7. Electroforesis en: acrilamida 6%, glicerol 0%, buffer TBE 1X, V=100V y T= 4°C. (carriles 1-15 ADN de diferentes muestras)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



EXON 4

Fig.11 Análisis SSCP del exón 4. Electroforesis en: acrilamida 6%, glicerol 5%, buffer TBE 1X, V=110V y T=25°C. (carriles del 1-11 ADN de diferentes muestras)

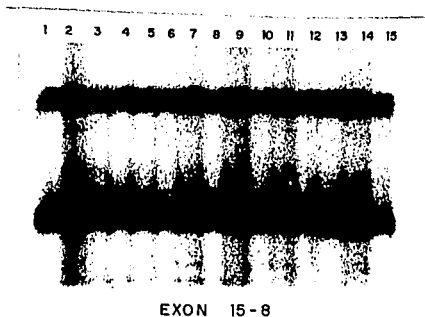


Fig.12. Análisis SSCP del exon 15-8. Electroforesis en: acrilamida 6%, glicerol 10%, buffer TBE 1X, V=110V y T= 4°C (carriles del 1-15 ADN de diferentes muestras)



Fig.13. Análisis SSCP del exon 15-3. Electroforesis en: acrilamida 6%, glicerol 5%, buffer TBE 0.5X, V=100V y T= 4°C (carriles del 1-4 ADN de diferentes muestras)

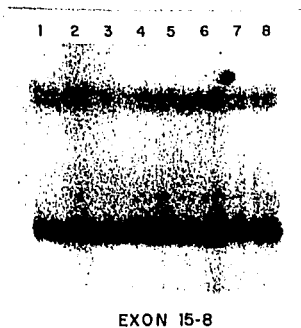


Fig. 14. Análisis SSCP del exón 15-8. Electroforesis en: acrilamida 6%, glicerol 5%, buffer TBE 1X, V=100V y T=25°C (carriles 1-8 ADN de diferentes muestras)

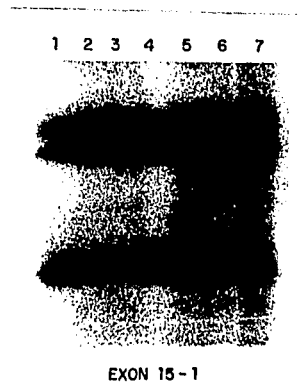


Fig.15. Análisis SSCP del exón 15-1. Electroforesis en: acrilamida 6%, glicerol 10%, buffer TBE 1X, V=110V y T=25°C (carriles 1-7 ADN de diferentes muestras)

RESUMEN DE RESULTADOS ANALISIS SSCP DEL GEN APC

Los valores de los parámetros con los que se obtuvieron mejores resultados reflejados en una mejor separación de las bandas, mayor resolución y mejor movilidad electroforética se muestran en las Figuras 8 a 14.

- La cantidad de muestra aplicada óptima fue de 2 μ L.
- La concentración de acrilamida de 6% proporcionó un gel mucho mas firme que el de 5% y con una buena resolución de bandas.
- Concentración de glicerol: Definitivamente la presencia de glicerol mejora la estabilización de las moléculas de hebra sencilla de ADN ya que se observan bandas mejor definidas en el gel de poliacrilamida.
- Buffer: En este caso fue un parámetro cuya variación no fue muy determinante en los resultados obtenidos.
- Temperatura: La temperatura óptima para la electroforesis fue a temperatura ambiente de 25°C.
- Voltaje y Tiempo de corrida: De manera general se vió que a voltajes pequeños y tiempos de corrida largos se logra una mejor separación de las hebras de ADN.

De tal manera que analizando todos los resultados obtenidos con las variaciones y combinaciones de los diferentes parámetros manejados, finalmente se observa que si se logran separar las dos hebras de ADN, observándose un corrimiento electroforético diferente para cada una de ellas. Esto nos da la pauta para poder utilizar esta metodología en el análisis de mutaciones de genes específicos en este caso APC, en el cual esperaríamos encontrar un cambio en la conformación de las hebras de ADN en aquellos segmentos donde se encuentre una mutación. Esto se manifestaría como un cambio en la movilidad electroforética detectable por la autorradiografía. Las condiciones finalmente definidas para llevar a cabo el análisis del gen APC se enlistan en la tabla 13.

Tabla 13. Parámetros que fueron definidos experimentalmente para efectuar el análisis SSCP del gen APC.

PREPARACION DE LA MUESTRA	ELECTROFORESIS GEL POLIACRILAMIDA
Dilución 1:10 ó 1:20 Dilución en solución de: Formamida al 95% EDTA 20 mM Azú de bromofenol 0.05% Xilencianol 0.05% NaOH 10 mM	Gel de poliacrilamida al 6% en Buffer Tris Borato 90 mM pH 7.5 y 2 mM EDTA Glicerol 10%
CONDICIONES DE CORRIDA	SECADO Y AUTORADIOGRAFIA
Volúmen dilución de muestra 2-3 µL Temperatura ambiente Voltaje 110 V Tiempo de corrida 14-24 h	Secado del gel por 3 h a 80°C Tiempo exposición 12-24 h a -20°C

4.4 Exposición y desarrollo de autorradiografía

El período de exposición para el desarrollo de la autorradiografía dependerá inicialmente de la eficiencia de la reacción, ya que se hace uso de dCTP radiactivo (dCTP-³²P), el cual es incorporado en el producto de amplificación. Además, depende del tiempo de vida media del isótopo radiactivo (14 días). En éste trabajo el tiempo de exposición varió de 1 hasta 5 días dependiendo de la fecha de caducidad del dCTP (Tiempo de vida media). Cuando se utilizó dCTP-³²P con una actividad específica alta se obtuvo una mejor definición de las bandas en la electroforesis.

5. APLICACION DE LA METODOLOGIA PCR - SSCP EN AL ANALISIS DE MUTACIONES DEL GEN APC

5.1 Características de los sujetos analizados

En este trabajo se examinó la secuencia codificante completa (15 exones, divididos en 31 segmentos) para el gen APC de pacientes con diagnóstico de Poliposis Adenomatosa Familiar, los cuales fueron identificados en base a las manifestaciones clínicas (Registro Nacional de Poliposis, INNSZ). Además, se incluyeron algunos familiares no afectados y personas asintomáticas sin antecedentes de CA de colon hereditario (Tablas 14 y 15).

Tabla 14. Grupos de personas analizadas por PCR - SSCP

Sujetos Afectados con PAF	8
Sujetos sin PAF con Familiares Afectados con PAF	6
Sujetos Controles sin PAF y sin antecedentes	10
TOTAL	24

Tabla 15 . Lista de personas a las que se les extrajo ADN de sangre periférica para análisis de mutaciones por PCR - SSCP

Sujeto No.	Edad	Sexo	Dx Clínico PAF	Antecedentes familiares de CA de colon
1	60	F	SI	SI
2	42	F	NO	SI
3	38	M	SI	SI
4	37	M	SI	SI
5	36	F	SI	SI
6	35	F	NO	SI
7	33	M	NO	SI
8	31	M	SI	SI
9	29	M	SI	SI
10	35	M	SI	SI
11	38	M	NO	SI
12	59	M	SI	SI
13	55	F	NO	SI
14	59	M	SI	SI
15	24	F	NO	NO
16	26	F	NO	NO
17	34	F	NO	NO
18	31	F	NO	NO
19	25	M	NO	NO
20	19	F	NO	NO
21	44	F	NO	NO
22	20	M	NO	NO
23	42	M	NO	NO
24	45	M	NO	NO

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA
 INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA

5.2 Amplificación del gen APC

La región codificante completa del gen APC esta contenida dentro de 15 exones, que esta precedida por al menos una secuencia 5' no codificante. Esta región fue dividida para fines experimentales en 31 segmentos de acuerdo con la literatura (56) (Tabla 5). Los primeros 14 segmentos corresponden a 14 exones individuales (números del 1 al 14). La región codificante del último exón es muy larga (6571 pb) y por lo tanto se dividió en 17 segmentos sobrepuestos, cada uno de aproximadamente 400 pb en longitud.

El ADN proveniente de los sujetos que se incluyeron en este trabajo (Tablas 14 y 15) se sometió a amplificación por PCR para todos los exones del gen APC (31 fragmentos amplificados) y posteriormente se analizaron por SSCP, para lo cual se utilizaron los parámetros estandarizados descritos en el apartado de Material y Métodos.

La amplificación de la mayoría de los segmentos se llevó a cabo de manera eficiente obteniéndose una buena cantidad del producto amplificado en la mayoría de los sujetos. Algunos ejemplos de secuencias amplificadas se muestran en las figuras 15 y 16. En estas Figuras se observa que con las condiciones previamente estandarizadas de PCR, se logró obtener una buena amplificación, además de que no se observan productos secundarios e inespecíficos.

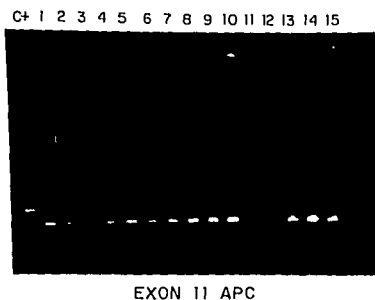


Fig. 16 Amplificación del exón 11 del gen APC (C+, control positivo de amplificación, carriles: 1, ADN paciente afectada con PAF, 2-15 ADN de familiares en primer grado)

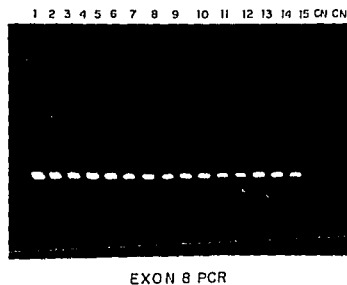


Fig.17Amplificación del Exon 8 del gen APC.(CN control negativo de amplificación, carriles 1, ADN paciente afectado, 2-15 ADN de familiares en primer grado)

5.3 Separación y resolución de las hebras de ADN mediante SSCP

La eficiencia de la amplificación permitió proseguir con el análisis SSCP de cada uno de los productos obtenidos. El análisis del producto de amplificación es la etapa en la cual se logra determinar si se localizan o no mutaciones en el producto amplificado específicamente. Para esto, se sometieron a análisis SSCP a todos los productos del PCR realizado a los pacientes para cada uno de los diferentes segmentos del gen APC.

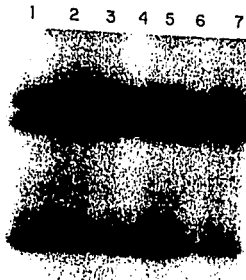
Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16. En general se observó una buena definición de los confórmeros de hebra sencilla de ADN, además se observó de manera general, una buena separación de ambas hebras. En la parte inferior de la mayoría de los geles en los que se observaron las dos hebras separadas, se detectó la presencia de otra banda, de mayor intensidad en ocasiones, que en este caso corresponde a la porción de ADN que no logró desnaturalizarse o bien que volvió a renaturalizarse después de su separación, siendo entonces una doble hebra de ADN. En las siguientes figuras 18 a 22 se observan las características antes descritas.

Tabla 16. Resultados obtenidos del análisis SSCP de los 31 segmentos en que se dividió el gen APC para su estudio.

Abreviaturas: Segmen Amplif: Segmento amplificado. Eficiencia de la Amplificación , DB: definición de las Bandas, RB: Resolución entre Bandas, ME: Movilidad Electroforética, Alter MyR: Alteraciones en Movilidad y Resolución.

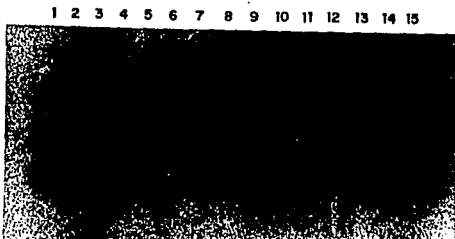
+ Buena, ++Moderada y +++ Alta.

EXON	OLIGONUC LEOTIDOS	TAMAÑO DE SEGMENTO AMPLIF	EFICIENCIA AMPLIFIC	DILUCION	D B	R B	M E	ALTER M Y R
1	G31 G18	138	++	1:10	+++	+++	+++	NO
2	G21 G22	87	+++	1:20	+	++	+++	NO
3	G29 G28	204	++	1:10	+++	+++	+++	NO
4	G27 G30	111	+	1:10	++	++	++	NO
5	G17 G26	114	+++	1:20	++	++	++	NO
6	G23 G20	84	+++	1:20	+	+++	++	NO
7	G19 G24	105	+++	1:20	++	+++	+++	NO
8	G5 G4	89	+++	1:20	++	+++	+++	NO
9	G1 G2	381	+++	1:20	+	+++	++	NO
10	G13 G14	99	+++	1:20	+	+	++	NO
11	G9 G10	141	+++	1:20	+++	+++	+++	SI
12	G7 G8	75	++	1:10	++	++	++	NO
13	G11 G6	114	++	1:10	++	+++	++	NO
14	G15 G16	216	++	1:10	++	++	+++	NO
15-1	G35 C22	294	+	1:10	+++	+++	+++	NO
15-2	E9-1 E9-2	450	++	1:10	++	++	++	NO
15-3	E9-3 E9-4	483	+++	1:10	+	++	++	NO
15-4	C23 E9-6	432	++	1:10	++	+++	+++	NO
15-5	E9-5 E9-8	480	+++	1:20	++	+++	+++	NO
15-6	E9-7 E9-10	453	+++	1:20	+++	+++	+++	NO
15-7	E9-9 C38	477	++	1:10	+	++	++	NO
15-8	E9-11 E912	474	++	1:10	+	++	++	NO
15-9	E9-13 E914	519	+++	1:20	++	++	++	NO
15-10	E9-15 C52	480	++	1:10	++	++	++	NO
15-11	E9-17 E922	469	++	1:10	++	+++	+++	NO
15-12	C35 C38	495	++	1:10	++	++	++	NO
15-13	C37 C40	513	+++	1:20	++	++	+++	NO
15-14	C39 C42	303	++	1:10	+	++	+++	NO
15-15	E9-19 E915	465	++	1:10	++	++	++	NO
15-16	E9-21 E918	507	++	1:10	++	++	++	NO
15-17	E9-23 E920	299	++	1:10	++	++	++	NO



EXON 1

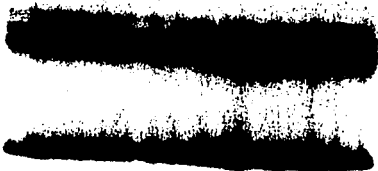
18. Análisis SSCP del exón 1 del gen APC con ADN de pacientes. (carriles: 1 y 2 ADN controles normales; 3, ADN paciente afectado; 4-7 ADN familiares en primer grado)



EXON 2

19. Análisis SSCP del exón 2 del gen APC con ADN de pacientes (carriles.1-3, ADN controles normales; 4 y 5 ADN sujetos afectados; 6-10 ADN familiares en primer grado; 11 y 12 ADN pacientes afectados; 13-15 ADN familiares en primer grado).

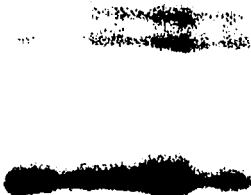
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



EXON 15-4

20. Análisis SSCP del exón 15-4 del gen APC con ADN de pacientes (carriles. 1-3, ADN controles normales; 4 y 5 ADN sujetos afectados; 6-10 ADN familiares en primer grado; 11 y 12 ADN pacientes afectados; 13-15 ADN familiares en primer grado).

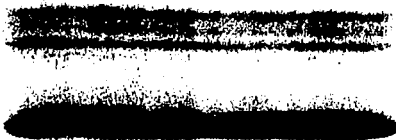
1 2 3 4 5 6 7



EXON 15-6

21. Análisis SSCP del exón 15-6 del gen APC con ADN de pacientes. (carriles 1 y 7, ADN de controles normales; 2 y 3 ADN pacientes afectados; 4-6 ADN de familiares).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



EXON 10

22. Análisis SSCP del exón 10 del gen APC con ADN de pacientes (carriles 1 y 2 ADN pacientes; 3-12 ADN familiares; 13 y 14 ADN controles normales; 14 y 15 controles de amplificación negativos).

5.4 Detección de mutaciones en el exón 11 del gen APC

Al analizar la región codificante completa del gen APC(15 exones) para cada uno de los individuos, en la mayoría de los exones analizados por PCR-SSCP (31 segmentos analizados) (tabla 16), no se detectó ningún cambio en la conformación, a excepción del exón 11 (Fig.23). En el análisis SSCP de este exón se observó claramente un cambio en la conformación de una de las hebras de ADN (Fig. 23 carril 2), dada por el cambio en la movilidad electroforética de una de las hebras. En la Figura 23 se observa el resultado del análisis SSCP de una mujer de 60 años de edad con diagnóstico clínico de PAF (carril 2), así como sus familiares afectados y no afectados (carriles 1 y 3) y un control sin PAF (carril 4). Es precisamente en el carril 2 que corresponde a la paciente propósito, en el cual se observa claramente un cambio conformacional. Al detectar únicamente en esta paciente un cambio en la movilidad electroforética en una de las hebras de ADN, se procedió a repetir la amplificación del exón 11 y análisis SSCP para la paciente y sus familiares, con el objeto de confirmar los resultados anteriores. Se observó de nuevo un cambio en la conformación en el carril 2 similar al anterior, así como una buena separación de las hebras de ADN en todos los demás sujetos, pero no se observó algún cambio electroforético en alguno de ellos.

Esta paciente clínicamente presentó múltiples pólipos adenomatosos los cuales fueron confirmados por colonoscopia.



Fig. 23 Análisis SSCP del exon 11 del gen APC. (carriles:1 ADN control normal; 2 ADN de paciente afectada y 3 y 4 ADN familiares en primer grado).

6. EVALUACION DEL METODO UTILIZANDO COMO CONTROL OTRO GEN CON MUTACION CONOCIDA: GEN DE FIBROSIS QUISTICA

Como se mencionó en el apartado de material y métodos, para comprobar la eficiencia del análisis de mutaciones mediante PCR-SSCP que se efectuó en el presente trabajo, se procedió a efectuar el mismo análisis para el gen de fibrosis quística. Se tomaron en cuenta todos los criterios anteriormente descritos para establecer los parámetros y condiciones críticas para la amplificación por PCR y el análisis por SSCP.

Para el análisis SSCP del gen de la fibrosis quística se procedió a variar cada uno de los parámetros críticos ya descritos (Tabla 13 apartado de material y métodos).

Con los resultados obtenidos de la combinación de todos estos factores se llegó a la estandarización de la amplificación por PCR del gen de la fibrosis quística, así como su análisis por SSCP. Quedando definidos experimentalmente los siguientes parámetros (Tablas 17, 18 y 19) (Figs. 24 y 25).

Tabla 17. Resumen de componentes de mezcla de reacción para la amplificación del gen de fibrosis quística

Componentes	Concentración
Buffer	1X
dNTPs	200 μ M
Oligonucleótidos F y R	100 μ M
Taq ADN polimerasa	1.25 U
ADN genómico	500 ng
Agua destilada	16.5 μ L
Volumen total	50 μ L

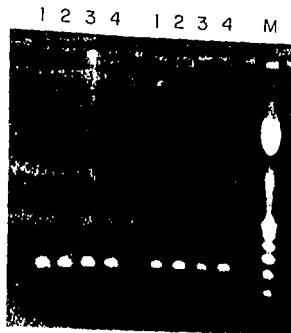
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 18 . Ciclos de Temperatura y Tiempos.
Amplificación del gen de fibrosis quística

No. de Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	94° C	5 min
30 ciclos	94° C	1 min
	56° C	1 min
	72° C	1 min
1 ciclo	72° C	10 min

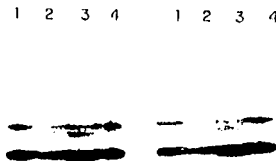
Tabla 19. Parámetros que fueron definidos experimentalmente para efectuar el análisis SSCP del gen de fibrosis quística.

PREPARACION DE LA MUESTRA	ELECTROFORESIS GEL POLIACRIL
Dilución 1:10 Dilución en solución de: Formamida al 95% EDTA 20 mM Azul de bromofenol 0.05% Xilencianol 0.05% NaOH 10 mM	Gel de poliacrilamida al 10% en Buffer Tris Borato 90 mM pH 7.5 y 2 mM EDTA Glicerol 10%
CONDICIONES DE CORRIDA	SECADO Y AUTORADIOGRAFIA
Vol. Dilución de muestra 2 µL Temperatura Ambiente Voltaje 150 V Tiempo corrida 14-24 h	Secado del gel por 3 h a 80°C Tiempo exposición 12-24 h a -20°C



EXON 11 FQ

Fig. 24 Amplificación del exón 11 del gen responsable de la fibrosis quística en una persona con una mutación en este exón. (carriles: M marcador de pb; 1, 2 y 4 ADN de personas sanas; 3 ADN de paciente afectada con fibrosis quística).



EXON 11 FQ
12% T = 25°C

Fig. 25 Análisis SSCP del exón 11 del gen de fibrosis quística en una persona con una mutación en este exón (carriles: M marcador de pb; 1, 2 y 4 ADN de personas sanas; 3 ADN de paciente afectado con fibrosis quística).

DISCUSSION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

DISCUSION

Las técnicas de biología molecular han permitido el descubrimiento de muchas clases de aberraciones tumor-específicas incluyendo mutaciones puntuales, amplificaciones, rearrreglos y deleciones en diferentes genes. Estos cambios en el material genético dan como resultado alteraciones en el fenotipo correspondiente, que a su vez contribuyen al desarrollo de enfermedades hereditarias y procesos neoplásicos (1-4,11). Por esto, es de gran importancia el análisis molecular de enfermedades crónico-degenerativas que están relacionadas con la presencia de mutaciones en genes específicos.

En los últimos años se han desarrollado numerosos métodos para detectar mutaciones (77-81). Se basan principalmente en la tecnología de PCR, y varían en el número de pasos, así como en la sensibilidad para detectar mutaciones. Uno de los métodos con mas alta sensibilidad de los que se han reportado hasta la fecha, es el método de PCR - SSCP (82-82). Además es un método que no presenta un gran número de pasos, lo que lo hace mas sencillo de realizar.

La detección de mutaciones por cambios en la movilidad de ADN de hebra sencilla fue demostrada por primera vez por Kanazawa y cols. en 1986 en estudios de la ATPasa de *E. coli* (98). Este método se hizo mas versátil con el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimersa (71). En el análisis PCR - SSCP las secuencias blanco del ADN genómico o ADNc se amplifican y se marcan simultáneamente por medio de oligonucleótidos marcados radiactivamente o bien se utilizan nucleótidos radiactivos. Solo una pequeña cantidad de ADN se requiere para el análisis PCR -SSCP cuando se utiliza radioactividad. El producto amplificado se desnaturaliza a su forma de hebra sencilla y es sujeto a electroforesis en gel de acrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes. Las bandas de hebra sencilla de ADN en diferentes posiciones indican la presencia de mutaciones. En condiciones no desnaturalizantes, la secuencia nucleotídica determina la forma de la estructura que tomará la hebra sencilla de ADN.

La sensibilidad de PCR-SSCP depende de como las mutaciones afectan el plegamiento y de como este plegamiento afecta la movilidad electroforética de la secuencia blanco. No pueden aplicarse parámetros teóricos exactos para predecir que conformación tomará el ADN, ni tampoco estimar el efecto que tendrá esta variación en la estructura y en la movilidad electroforética. Por lo tanto la sensibilidad de PCR - SSCP no se puede predecir físicoquímicamente. De acuerdo a datos experimentales de algunos autores, la sensibilidad de este método se determina por dos factores (84-85): 1. Las condiciones de corrida del gel de poliacrilamida y 2. La longitud de los fragmentos que se analizan. Hayashi (84) estima que la sensibilidad de este método varía alrededor de 92% para fragmentos de 100 a 300 pb y de aproximadamente 75% para fragmentos mayores de 300- 450 pb. Comparando esta sensibilidad con la de otros métodos para detectar mutaciones, se deja atrás a la mayoría de ellos a excepción del método químico y del método de Análisis Electroforético en Gradiente desnaturalizante (DGGE) que tienen una sensibilidad muy cercana del 100%. El inconveniente de estos métodos es que son mucho mas laboriosos y utilizan reactivos tóxicos.

Después de que se publicó por primera vez este método, y debido a las ventajas que presenta esta metodología, numerosos investigadores la han utilizado para la identificación de mutaciones en genes como myc, ras, p53, gen de fibrosis quística, genes de receptores hormonales, y más recientemente en el gen APC (82,62-64,93). Respecto a su utilización en el análisis del gen APC, en este trabajo se encontró que las condiciones con las cuales se logró la amplificación del gen APC, así como la separación y resolución de las hebras de ADN, difieren de los datos reportados en bibliografía para el análisis del mismo gen. Para el proceso de amplificación, esto puede deberse a que existen rangos de concentración de los diferentes componentes y factores que intervienen en la reacción de amplificación del ADN, con los cuales puede lograrse la amplificación del gen. En lo que sí debe ponerse especial atención es en lograr aplicar adecuadamente el conocimiento de las propiedades de los ácidos nucleicos para lograr hacer los ajustes pertinentes y lograr finalmente una amplificación específica y productiva. Con respecto al análisis SSCP, el rango de valores reportados para el gen APC (concentración de acrilamida de 5 y 6%, glicerol 5 y 10%) son similares a los

valores que se encontraron en este trabajo a excepción del tiempo y el voltaje. Respecto a este último punto puede deberse a variaciones en el tamaño del gel, así como también a la combinación de estos dos factores.

En este trabajo, como se refirió en la sección de resultados en una etapa inicial se realizó la estandarización de las técnicas de PCR y SSCP. Siempre que se va a utilizar un método sea con fines diagnósticos o de investigación deben primeramente estandarizarse y evaluarse todos los parámetros que intervienen para así obtener resultados confiables y reproducibles, de otra manera pueden presentarse errores en las determinaciones y resultados sin explicación aparente, que pueden dar lugar a confusiones. Así en esta primera etapa se manejaron variaciones en los rangos de concentración de los componentes de la reacción de amplificación que son críticos en la amplificación enzimática de ácidos nucleicos. También es muy importante la definición de los ciclos de temperatura y su duración. Teóricamente en condiciones óptimas (específicas para cada segmento a amplificar) el nivel de amplificación del ADN aumenta en forma exponencial con cada ciclo, sin embargo en la práctica, después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Esto puede ser posiblemente debido al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia de llevar a cabo la extensión de los últimos segmentos (73). En nuestros resultados se observó que si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos de reacción, se obtiene mayor actividad del producto amplificado. Esta variación difiere con los datos reportados por otros investigadores para la amplificación del gen APC, en los cuales no se incluye esta modificación al número de ciclos, que en este trabajo redituó en una mejor amplificación. Todo esta evaluación es importante para evitar confusiones al momento de amplificar cada exon, ya que si consideramos que se han evaluado correctamente todos los factores que intervienen, debe esperarse una correcta amplificación y entonces podrán tomarse decisiones adecuadas en caso de que no se lograra amplificar alguno de los exones. La influencia particular de estos factores se evaluó como sigue:

1. Se realizaron cambios en las concentraciones de $MgCl_2$ (desde 0.5- 2.5 mM) para ver que efecto propiciaban en la calidad y la cantidad del producto amplificado.

2. Estos mismos cambios se efectuaron para evaluar el efecto que tiene el cambio en la concentración de oligonucleótidos y dNTPs en la especificidad de la reacción de amplificación del gen APC, ya que en literatura se observó el uso de un rango muy amplio para amplificar este mismo gen.

3. También se consideró la concentración del ADN blanco, ya que es muy importante el número en que esta presente el gen que se va a analizar, y que en este caso es de uno. Por lo tanto se utilizó ADN en exceso para la amplificación.

5. Es importante evaluar la concentración de enzima ADN Taq polimerasa, ya que si se añade en exceso, propicia disminución en la especificidad de la amplificación, y al añadir una cantidad deficiente, no se logra una amplificación productiva.

6. Como ya se menciona antes, es de gran importancia la evaluación del número de ciclos de temperatura en el proceso de amplificación, para lograr una adecuada cantidad del producto, así como especificidad en la reacción.

Asimismo, se evaluarán los parámetros críticos en el establecimiento de las condiciones óptimas para el análisis SSCP como son:

1. Evaluación de los factores que participan en la desnaturalización del ADN: Componentes de la solución de desnaturalización y temperatura de desnaturalización. Su evaluación es muy importante ya que es en este primer paso en el que mediante la aplicación de altas temperaturas (90-98°C) de los productos diluidos en la solución desnaturalizante a base de formamida (agente desnaturalizante), se logra la separación de las dos hebras de ADN.

2. Evaluación de los factores involucrados en la electroforesis en gel de poliacrilamida: Concentración de acrilamida, fuerza iónica y presencia de glicerol. Es importante porque al estar las dos hebras de ADN separadas, experimentalmente se ha visto que es necesaria la presencia de un agente estabilizante, que de alguna manera interactúe con las cadenas de ADN para mantener su conformación. Esto nos permite mantener por más tiempo durante la corrida electroforética las hebras sin renaturalizarse.

3. Influencia de los factores que determinan el establecimiento de las condiciones de corrida: variación en temperatura, efecto del tiempo de corrida y efecto del voltaje. Estos factores están relacionados entre sí, ya que al aumentar el voltaje aumenta la temperatura

del gel, la cual al incrementarse altera la conformación de las hebras de ADN. Además el voltaje también se relaciona directamente con el tiempo de corrida, ya que al disminuir el voltaje aumenta el tiempo de corrida. Esta combinación de voltaje bajo, tiempo largo es la que nos resultó mas adecuada, ya que la variación en temperatura del gel fue mínima.

En base a la experiencia obtenida en este trabajo podemos sugerir que todos los factores analizados anteriormente son de importancia fundamental para una detección eficiente de mutaciones por PCR - SSCP.

En este trabajo se aplicó esta metodología para detectar mutaciones en el gen APC. En cuanto al análisis del gen APC, su importancia de su estudio radica en su participación en el desarrollo de CA colorectal, así como en otro tipo de tumores. En el grupo de pacientes de estudio, solamente se encontró en una paciente de 60 años de edad un patrón electroforético para el exón 11 diferente a los encontrados en los sujetos controles. Pero este mismo cambio en el patrón para este exón, no se presentó en sus familiares afectados también con PAF. Al contrario éstos últimos presentaron un patrón electroforético semejante al de los sujetos controles. Por lo tanto podría suponerse que en efecto, se detectó un cambio en la movilidad electroforética de una de las hebras sencillas de ADN amplificado en el exón 11, debido a algún cambio en la secuencia del fragmento amplificado. Pero no puede asegurarse que este cambio corresponda a una mutación que esté relacionada con el desarrollo de PAF, ya que no se encontró en los hijos afectados. Para poder concluir lo contrario se necesita realizar el análisis de secuenciación de este fragmento. Entonces si podría comprobarse que efectivamente este cambio corresponde al fenotipo presente. Por otro lado, se debe de pensar con mayor posibilidad de que este cambio conformacional detectado sea un polimorfismo heredado por alguno de sus padres (quizá el sano) y que no tenga implicación alguna en la expresión de la proteína APC.

Por otra parte, si se descarta la posibilidad de que el cambio en el patrón electroforético en la paciente de 60 años con PAF estuviera asociado directamente con el padecimiento en esta familia, entonces tienen que estudiarse las posibles causas por las cuales no se detecto algún otro cambio por SSCP en los pacientes diagnosticados

con PAF. Algunas de las posibilidades para tratar de explicar lo anterior son las siguientes:

1. Como se ha reportado por otros autores (57-62), no todas las mutaciones en fragmentos de ADN pueden detectarse por análisis SSCP, ya que la sensibilidad de este método no es del 100% , lo cual nos deja un porcentaje en el cual pueden no detectarse algunas mutaciones. Además como ya se mencionó anteriormente hay una gran número y variedad de alteraciones que se han reportado para el gen APC, que incluyen desde mutaciones puntuales hasta deleciones e inserciones, entonces es posible que un solo cambio de bases en un fragmento no se haya detectado con las condiciones que se utilizaron en este trabajo, por lo que sería conveniente probar otras condiciones alternativas reportadas en la literatura, o bien utilizar otro método para detectar mutaciones sumado a éste.

2. Una posibilidad también implicada con el método, es que es aún mas difícil realizar la detección de todos los cambios en la secuencia en las regiones donde inicia la transcripción (región intermedia entre la región promotora e inicio de la transcripción), o bien en los sitios de unión de exon-intron (splice junctions) donde ocurre el corte y empalme durante el procesamiento en el ARN correspondiente (splicing del ARNm) (67). Ya que el análisis del gen se realizó únicamente para la región codificante del gen APC.

3. La región promotora 5' y la región 3' no traducida del gen APC no esta comprendida en este análisis, y hay reportes de la presencia de mutaciones en estos sitios (64,99). El efecto que podrían tener mutaciones en estas regiones es muy crítico, principalmente en la región promotora, que es donde se encuentran las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento de la maquinaria de transcripción. alguna mutación en esta región podría impedir el inicio de la transcripción y por consiguiente bloquear la expresión de la proteína, dando lugar al fenotipo correspondiente.

4. No fueron analizadas las secuencias contenidas en los intrones y además estos pueden de alguna manera tener influencia en la expresión del gen (64,68). Hay reportes en los cuales se ha detectado un tipo de procesamiento alternativo (que involucra regiones del primer exón e intrón) y también se han encontrado diferentes tamaños en los transcritos del gen APC expresados de una manera tejido-específica. Esto se ha

relacionado con hallazgos en estos mismos transcritos, en los cuales se observan diferentes inicios de transcripción (99,100), lo que induce a pensar en la posibilidad de que realmente existen más de un producto proteico codificado por este gen. Estos hallazgos podrían tener implicaciones clínicas importantes, ya que una mutación en estas regiones podría dar lugar a alteraciones en este tipo de procesamiento alternativo, originando diversos grados de expresión de la proteína o grupo de proteínas implicadas. Entonces se puede pensar que estas modificaciones pueden originar diversos grados de manifestaciones clínicas de esta enfermedad que ya se han reportado, y que incluso pueden agruparse como diferentes síndromes con desarrollo de pólipos.

5. Como también ya se ha reportado, en el desarrollo de Ca de colon pueden estar involucrados otros genes. En algunos de ellos se han identificado y se han encontrado mutados también en CA de colon, estos genes son MCC, DCC y p53(12,25,37,38). Entonces es probable que en las familias estudiadas puedan estar involucrados algunos de estos genes y además del gen APC.

6. Puede incluso presentarse heterogeneidad genética.

Como se observa dentro de este panorama en base a la literatura internacional que emerge al respecto, surgen otro tipo de cuestiones acerca del estudio y participación de este gen. Por ejemplo si el gen APC se expresa en varios tipos de tejido (100) incluyendo pulmón, hígado y riñón y en ellos no se han encontrado mutaciones en algún tumor primario afectando a estos órganos, ¿porque las mutaciones del gen APC pueden ser cruciales solo en ciertos tejidos como colon? Para poder responder esto podríamos suponer que 1. las funciones del producto génico pueden ser diferentes entre los órganos. 2. Los mecanismos que regulan la expresión del gen pueden ser diferentes de un órgano a otro, o bien, 3. Puede haber regulación tejido-especifica por procesamiento alternativo del ARN editado, dando variaciones en los productos proteicos sintetizados. Como vemos todas estas contribuciones experimentales tienden a apoyar la noción de que la expresión del gen APC debe estar altamente regulada a diferentes niveles de su biosíntesis. Por lo tanto la caracterización molecular de las mutaciones es de gran interés en el estudio de las propiedades biológicas del gen APC.

De manera general, la delimitación del espectro de este tipo de mutaciones asociadas con enfermedades genéticas definida, proporciona dos diferentes tipos de información: 1) proporciona información acerca de los mecanismos mutagénicos que dan lugar a cambios en la estructura del ADN y 2) Proporciona claves de las alteraciones estructurales de las proteínas afectadas que causan el fenotipo correspondiente. Finalmente como se ha visto, una aplicación clínica relevante del estudio molecular de las alteraciones genéticas en el CA colorectal, es detectar pacientes que han heredado un gen APC anormal, y que por lo tanto desarrollarán PAF. Entonces este tipo de investigaciones moleculares en conjunto con estudios clínicos conducen al avance de dos aspectos muy importantes en este tipo de enfermedades 1. Un mejor entendimiento de la etiología del CA colorrectal y por lo tanto de la carcinogénesis. 2. La aplicación de estos conocimientos y tecnología al diagnóstico presintomático de la PAF, así como perspectivas muy importantes para el diagnóstico temprano, pronóstico y tratamiento del CA de colon esporádico.

Con el establecimiento de la metodología de PCR y SSCP para el análisis del gen APC se puede llegar a detectar mutaciones de este gen, y estos métodos también se pueden aplicar al análisis de otros genes que participan en el desarrollo de enfermedades específicas como fibrosis quística.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Para establecer las condiciones óptimas del método PCR y SCP, que se utilizó en el análisis de mutaciones del gen APC, fue necesario conocer y analizar los factores que participan en las propiedades físicoquímicas y procesos de amplificación de ácidos nucleicos como son:
 - 1) En el proceso de amplificación del gen APC:
 - Efecto en la cantidad de producto amplificado, especificidad y sensibilidad que tienen los componentes de la mezcla de reacción, así como la concentración de éstos (MgCl₂, oligonucleótidos, dNTPs, ADN blanco y Taq Polimerasa)
 - Efecto que tienen el número de ciclos y temperatura en la especificidad del producto amplificado (Tablas 11 y 12).
 - 2) En el proceso de SSCP del gen APC:
 - Influencia de los componentes del gel de poliacrilamida (acrilamida, fuerza iónica, agentes estabilizantes) en la capacidad de resolución y separación de las hebras de ADN amplificado.
 - Efecto de variaciones en las condiciones de corrida (tiempo, temperatura y voltaje) en la resolución y separación de las hebras de ADN amplificado (Tabla 13).
2. Con el análisis PCR-SSCP de un grupo de personas que incluye tanto personas con PAF como no afectadas se logró identificar una alteración estructural en el exón 11 del gen APC en una paciente con diagnóstico clínico de PAF.
3. Con la estandarización de este método, se establece una herramienta muy útil para el diagnóstico molecular de este tipo de padecimientos, ya que se puede aplicar además del análisis mutacional del gen APC, al análisis de otros genes.

REFERENCIAS

REFERENCIAS:

1. Kogans S, Doherty M and J Gitschier. An improved method for prenatal diagnosis for genetic diseases by Analysis of amplified DNA sequences. *N Eng J of Med* 1987;317:16;985-990.
2. Dean M, White M, Amos J, Gerrard B, Stewart C, Khaw K-J and M Leppert. Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell* 1990;61;863-870.
3. Salki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H and N Arnheim. Enzymatic Amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.
4. 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.
5. 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;238:1411-4.
6. Flavell RA, Kooter JM, De Boer E, Littler P, Williamson R. Analysis of the human β - δ -globin gene loci in normal and Hb Lepore DNA: direct determination of gene linkage and intergene distance. *Cell* 1978;15:25-41
7. Lathrop GM, Lalovel J, Julier C, Ott J. Multilocus linkage analysis in humans: Detection of linkage and estimation of recombination. *Am J Hum Genet* 1985;37:482-498.
8. Lathrop G, Lalovel J, Julier C, Otto J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3443-3446.
9. Villalobos JJ, Anzures ME, Rodriguez 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.
10. González Carbajal E: Diagnóstico de la salud en México, México: Trillas, 1988.
11. Groden J, Thlivers A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Sterens J, Spino L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt R, Hughes J, Warrington J, McPherson J, Wasmuth J, Le Paslier D, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M. and White R. Identification and Characterization of the Familial

Adenomatous Polyposis Coll Gene. University of Utah Health Irvine France. 1991;66:589-600.

12. Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, Albertson H, Gelbert L, Samowitz W, Groden J, Sterens J, Spino L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt R, Hughes J, Warrington J, McPherson J, Le Paslier D, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M, and White R. Identification of Deletion Mutations and Three New Genes at the Familial Polyposis Locus. University of Utah Irvine, France. 1991;66:601-613.

13. Kinzler K, Nilbert M, Su L, Vogelstein B, Bryan T, Levy D, Smith K, Preisinger A, Hedge P, McKechnie D, Finnear R, Markham A, Groffon J, Boguski M, Atshol S, Horli A, Ando H, Miyoshi Y, Miki Y, Nishisho I, and Nakamura Y. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. Science 1991;253:661-665.

14. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horli A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hdge P, Markham A, Krush A, Petersen G, Hamilton S, Nilbert M, Levy D, Bryan T, Preisinger A, Smith K, Su L, Kinzler K, and Vogelstein B. Mutations of Chromosome 5q21 Genes in FAP and Colorectal Cancer Patients. Science 1991;253:665-669.

15. Gardner EJ, Burt RW, Freston JW. Gastrointestinal polyposis: syndrome and genetic mechanisms. West J Med 1989;132:488-99.

16. 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;323:1664-72.

17. Willet WC, Stampfer MJ, Golditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. N Engl J Med 1990; 323:1664-72.

18. Bussey HJR, Veale M, Morson BC. Genetics of gastrointestinal polyposis. Gastroenterology 1978;74: 1325-30.

19. 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

20. Naylor EW, Gardner EJ. Penetrance and expressivity of the gene responsible for the Gardner syndrome. Clin Genet 1977; 11:381-93.

21. 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.

22. Jagelman DG. Clinical management of familial adenomatous polyposis. *Cancer Surv* 1989;8: 159-67.
23. Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables and colon cancer: critical review and metaanalyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:650-61.
24. Levin B. Nutrition and Colorectal Cancer. *Cancer Supplement* 1992;70:6:1723-1726.
25. Cho K.R, Vogelstein B. Genetic Alterations in the Adenoma-Carcinoma Sequence. *Cancer Supplement* 1992;70:6:1727-1731.
26. Hamilton S.R. Molecular Genetics of Colorectal Carcinoma. *Cancer Supplement* 1992;70:5:1216-1221.
27. Ashton-Rickardt PG, Dunlop MG, Nakamura Y, Morris RG, Purdie CA, Steel CM, et al. High frequency of APC loss in sporadic colorectal carcinoma due to breaks clustered in 5q21-22. *Oncogene* 1989;4:1169-74.
28. Sasaki M, Okomato M, Sato C, Surgio K, Soejima J-I, Iwama 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.
29. Lynch HT, Guirgis HT, Albert S. Familial breast cancer in a normal population. *Cancer*. 1974;34:2080-5.
30. Lynch HT, Kinberling WS, Albano WA. Herediatry nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1985;56:834.
31. Burt RW, Bishop DT, Cannon La. Dominant inheritance of adenomatous colonic polyposis and colorectal cancer. *N Engl J Med* 1985;312:1540-4.
32. Bussey HJR, Beale ANO, Morson BC. Genetics of gastrointestinal polyposis. *Gastroenterology* 1978;74:1325-30.
33. Naylor E, Gardner E. Penetrance and expressivity of the gene responsible for the Gardner syndrome. *Clin Genet* 1977;11:381-393.
34. Lewis J, Ginsberg A, Toomey K. Turcot's syndrome. *Cancer* 1983;51:524-528.

35. 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.
36. Woolf CM, Richards RC, Gardner EJ. Occasional discreet polyps of the colon and rectum showing an inherited tendency in a kindred *Cancer* 1955;8: 403-8.
37. Marx, J. Many genes changes found in cancer. *Science* 1989;246:1386-8.
38. Fearon E.R, Jones P.A. Progress toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J.* 1992;6:2783-2790.
39. Feldman M. Molecular Genetics and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993;104:1223-1231.
40. Burt R. W. and Groden J. The Genetic and Molecular Diagnosis of Adenomatous Polyposis Coll. *Gastroenterology* 1993;104:6:1211-1213
41. Bodmer W, Bishop T, Karran P. Genetic steps in colorectal cancer. *Nature Genetics* 1994;6:217-219.
42. Utsunomiya J, Lynch HT. Hereditary colorectal Cancer. Berlin: Springer 1990.
43. Burt R.W, Bishop T, Cannon L. A. A.L. Dowdle M.A. Lee R.G. Skolnic M. Dominant inheritance of Adenomatous Colonic Polyps and Colorectal Cancer. *N Engl J of Med* 1985;312:24.1540-1544.
44. Cannon-Albright L.A, Skolnick M.H, Bishop T, Lee R.G, and Burt R.W. Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N Engl J Med* 1988;319:9,533-537.
45. Hagitt R, Reid B, Hereditary gastrointestinal polyposis syndromes. *Am J Surg Pathol.* 1986;10:871-887.
46. Solomon E, Voss R, Hall V, Bodner WF, Jasse Jr, Jeffreys AJ, Lucibello FC. et al. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987;328:616-9.
47. 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.

48. Sasaki M, Okomato 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;49:4402-4406.
49. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg M. Gardner's syndrome in a man with interstitial deletion of 5q1. *Am J Med Genet* 1986;25:473-6.
50. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A, Gorman P, et al. Localization of the gene for familial polyposis coli on chromosome 5. *Nature* 1987;328:614-6.
51. Nakamura Y, Lathrop M, Leppert M, Dobbs M, Wasmuth J, Wolff E, Carlson M, Fujimoto E, Krapcho K, Sears T, Woodward S, Hughes J, Burt R, Gardner E, Lalouel J-M, and White R. Localization of the Genetic Defect in Familial Adenomatous Polyposis within a Small Region of Chromosome 5. *Am J. Hum. Genet* 1988;43:638-644.
52. Gordon D. Stewart. An anonymous DNA segment (11227) maps to the long arm of human chromosome 5 and identifies a BstXI polymorphism (D5S26). *Nucl Ac Res* 1987;15:9:3939.
53. Powell S.M, Petersen G.M, Krush AnJ, Booker S, Jen J, Giardiello F.M, Hamilton S.R, Vogelstein B, Kinzler K.W. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;329:27,1982-1987.
54. Paul P, Jagelman D.G, Fazio V.W, McGannon E. Evaluation of Polymorphic Genetic Markers for Linkage to the Familial Adenomatous Polyposis locus in Chromosome 5. *Dis. Colon Rectum*. 1990;33:740-744.
55. Sprio L, Nelson L, Ward K, Burt R, White R, Leppert M. A CA-Repeat Polymorphism Close to the Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gene Offers Improved Diagnostic Testing for Familial APC. *Am J. Hum Genet* 1993;52:286-296.
56. Ichii S, Nagase H, Mori T, Baba S, Nakamura Y. A novel mutation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene in a familial adenomatous polyposis (FAP) patient and presymptomatic diagnosis using PCR. *Hum M Genet* 1993;2:5,597.
57. Cornelia K. and Balhausen W. G. DNA variants. Two intragenic polymorphisms of the APC-gene detected by PCR and enzymatic digestion. *Hum Genet* 1992;88:705-706.
58. Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, Mori T, Utsunomiya J, Baba S, Petersen G, Hamilton S.R, Kinzler K.W, Vogelstein B, Nakamura Y. Germ-

- line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4452-4456.
59. Powell S.M, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan T.M, Hamilton S.R, Thibodeau S.N, Vogelstein B, Kinzler K.W. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359:235-237.
60. 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.
61. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum M Genet* 1992;1:4,229-233.
62. Paul P, Letteboer T, Gelbert L, Groden J, White R, Coppes M.J. Identical APC exon 15 mutations result in a variable phenotype in familial adenomatous polyposis. *Hum M Genet* 1993;2:7,925-931.
63. Mandel M, Paffenholz R, Friedl W, Caspar R, Sengteller M, Propping P. Frequency of common and novel inactivating APC mutations in 202 families with familial adenomatous polyposis. *Hum M Genet* 1994;3:1,181-184.
64. Varesco L, Gismondi V, Presciuttini S, Groden J, Spirio L, Sala P, Rossetti C, De Benedetti L, Bafico A, Heouaine A, Grammatico P, Del Porto G, White R, Bertario L, Ferrara G.B. Mutation in a splice-donor site of the APC gene in a family with polyposis and late age of colonic cancer death. *Hum Genet* 1994;93:281-286.
65. Varesco L, Gismondi V, James R, Robertson M, Grammatico P, Groden J, Casarino L, De Benedetti L, Bafico A, Bertario L, Sala P, Sassatelli R, Ponz de Leon M, Blasco G, Allegretti A, Aste H, De Sanctis S, Rossetti C, Illeni M.T, Sciarra A, Del Porto G, White R, Ferrara G.B. Identification of APC Gene Mutations in Italian Adenomatous Polyposis Coli Patients by PCR-SSCP Analysis. *Am J. Hum Genet.* 1993;52:280-285.
66. Olschwang S, Laurent-Puig P, Groden J, White R, Thomas G. Germ-Line Mutations in the First 14 Exons of the Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1993;52:273-279.
67. Groden J, Gelbert L, Thilveris A, Nelson L, Robertson M, Joslyn G, Samowitz W, Spirio L, Carlson M, Burt R, Leppert M, White R. Mutational Analysis of Patients with Adenomatous Polyposis: Identical Inactivating Mutations in Unrelated Individuals. *Am. J. Hum Genet.* 1993;52:263-272.

68. Thliveris A, Samowitz W, Matsunami N, Groden J, White R. Demonstration of Promoter Activity and Alternative Splicing in the Region 5' to Exon 1 of the APC Gene (1). *Cancer Research* 1994;54:2991-2995.
- 68a. Su L-K, Johnson K, Vogelstein B and Kinzler K. Association between wild type and mutant APC gen products. *Cancer Res.*1993;53:2728-2731.
69. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977;74:5463-7.
70. Kary B Mullis and F. Faloona. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. 1987;155:335-350.
71. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K and H Erlich. Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a thermoestable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
72. Erlich H, Gelfand D and Slnsky J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991;252:1643-1650.
73. Innis M, Gelfand D. Optimization of PCR's. *PCR Protocols: A guide to methods and Applications*. Innis M, Gelfand D and J Scrinsky (Eds).Academic Press, INC, 1990. USA Cap 1 pp.3-12.
74. Saiki R, Gelfand D, Oste E, y R Huguchi. Part One: Basic Methodology, Erlich H, (2Ed) *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. Strockton Press NY Cap I,,II,III y IV 1989 p.1-38.
75. Gibbs R, *Polymerase Chain Reaction: Techniques Current Op in Biotech* 1991;2:69-75.
76. Stryer L,, *Exploring genes: Analyzing constructing and Cloning DNA*. Stryer L (Ed) *Biochemistry* W.H. Freeman and company NY Cap.6,1988 p. 117-140.
77. Chamberlain J, Gibbs R, Ranler J, Nguyen P, and Caskey T. Deletion screening of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus via multiples DNA amplification. *Nucl Ac. Res* 1988 (16);234-238.
78. Higuchi R, Dollinger G, Walsh P and R Griffith. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotech* 1992;10:413-417.
79. Van Brunt J. *Amplifying Genes:PCR and Its alternatives*. *Biotech* 1990;8:291-294.
80. Cotton RGH. Current methods of mutation detection. *Mutat Res.*1993;285:125-144.

81. Prosser J. Detection single base mutations. TIB Tech 1993;11:238-246.
82. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, and Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:2766-2770.
83. Orita m, Susuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection de point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 1989;5:874-879.
84. Hayashi K. PCR-SSCP: A Method for Detection of Mutations. GATA 1992;9(3): 73-79.
85. Leren T,P, Solberg K, Rødningen O,K, Ose L, Tonstad S, and Berg K. Evaluation of Running Conditions for SSCP Analysis: Application of SSCP for Detection of Point Mutations in the LDL Receptor Gene. PCR Methods and Applications: 1993;3:159-162.
86. Hayashi K,Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP. Hum Mutat (USA) 1993;2:5:338-346.
87. Oto M, Miyake S. Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislab gel electrophoresis apparatus. Anal Biochem. 1993 1993;213(1):19-22.
88. Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand confirmation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. Hum Mutat (USA) 1993;2:5:404-414.
89. Gait MJ, Oligonucleotide synthesis: A Practical Approach. IRL Oxford 1991.USA
90. Letsinger RL, Finnan JL, Heaver GA and WP Lunsford. Oligonucleotide synthesis. J Amer Chem Soc.1975;97:3278-3279.
91. Blin N and DW Stafford. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eucaryotes.Nucl Acids Res.1976;3:2303-2308.
92. SambrookJ., E.F. Fritsch and T. Maniatis.:1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
93. Plieth J, Riningland F, Schlosser M, Cooper DN and J Reiss. Single -strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of exon 11 of the CFTR gene reliably detects more than one third of non-AF508 mutations in german cystic patients. Hum Genet 1992;88:283-287.

94. Dean M, White MB, Amos J, Gerard B, Stewart C, Khaw KT and M Leppert. Multiple mutations in highly conserved residues are found in Mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell* 1990;61:863-870.
95. Reiss J, Lenz V, rininsland F, Ballhausen P, Drews D, Posselt HG. A novel CFTR mutation 4035 del A, detected by non-radioactive SSCP analysis. *Hum Genet* 1992;90:303-304.
96. Tops CM, Breukel C, Vanderklift H, Leeuwen IS, Wijnen JT, Griffioen G, Vasen HF, Hartog J and P Meera Khan. "A new deletion polymorphism at D5S71 raises the linkage informations on adenomatous polyposis coli: implications for presymptomatic diagnosis. *Hum Genet* 1991;86:365-368.
97. Baker SJ, Presinger AC, Jessup JM, Paraskera C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S and Vogelstein B. p53 gene mutations occurs in combinations with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.*1990;50:7717-7722.
98. Kanazawa H, Noumi T, Futai M. *Methods Enzymol* 126:595-603.
99. Lambertz S, Ballhausen W.G. Identification of an alternative 5' untranslated region of the adenomatous polyposis coli gene. *Hum Genet* 1993;90:650-652.
100. Horii A, Nakatsuru S, Ichii S, Nagase H, Nakamura Y. Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression. *Hum M Genet* 1993;2:3, 283-287