

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**VÍAS MOLECULARES EN LA ONCOGÉNESIS  
COLORRECTAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Isabel López Villar**

Bajo la dirección del doctor  
Joaquín Martínez López

**Madrid, 2012**

©Isabel López Villar, 2012

# Vías Moleculares en la Oncogénesis Colorrectal

Tesis presentada  
por

Isabel López Villar

en el  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III  
Facultad de Medicina  
para optar al grado de  
Doctor por la Universidad Complutense

Madrid. 2011



El Dr. Joaquín Martínez López  
del Hospital Universitario 12 de Octubre,

Certifica:

Que el trabajo titulado "Vías Moleculares en la Oncogénesis Colorrectal" que presenta Isabel López Villar para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital 12 de Octubre.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid a 11 de noviembre de 2011.

Fdo. Dr. Joaquín Martínez López



Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de las siguientes ayudas:

01/02/2007-31/12/2009, Proyecto de Investigación de la Comunidad de Madrid:

“Convenio para el desarrollo del plan de calidad para el sistema nacional de salud.

Evaluación del rediseño del proceso diagnóstico en el cáncer colorrectal”, 015/06-04

desarrollado en el Hospital Universitario 12 de Octubre, Agencia Laín Entralgo.

01/01/2010-31/12/2010, Beca Marcos Fernández, Fundación Vistare y Fundación

Leucemia Linfoma.



‘Para ver claro, basta con cambiar  
la dirección de la mirada’  
Antoine de Saint-Exupery



Autor

**Isabel López Villar**

## **Vías Moleculares en la Oncogénesis Colorrectal**

### **Resumen**

El cáncer colorrectal (CCR) comienza como un pólipo adenomatoso (tumor epitelial benigno) que evoluciona a adenoma avanzado con alto grado de displasia (crecimiento celular desordenado) y posteriormente a cáncer invasivo: adenocarcinoma (tumor epitelial glandular maligno). La dinámica del proceso supone la interacción de influencias ambientales, germinales y de cambios somáticos acumulados en el epitelio colorrectal. En esta tesis, evaluaremos individualmente, las variantes genéticas encontradas, en línea germinal, en pacientes con fenotipos sugestivos de patologías familiares en relación al CCR:

1. Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP): donde evaluamos el gen *hMSH2*.
2. y Poliposis Familiares: Poliposis asociada a MUTYH (PAM): donde evaluamos el gen *MUTYH*.

Comenzamos por definir dos diferentes vías de estudio: por un lado secuenciación directa y por otro cribado mutacional por High Resolution Melting (HRM).

Nuestro estudio está motivado por la necesidad de encontrar las mejores herramientas moleculares para caracterizar a este grupo de pacientes.

De acuerdo a estos experimentos, encontramos en el gen *hMSH2*, entre otras, siete nuevas variantes no descritas hasta la fecha. Estas mutaciones las registramos en la base de datos LOVD (Leiden Open Variation Database): [www.insight-group.org](http://www.insight-group.org) (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours).

Además presentamos un nuevo modelo de cribado mutacional por HRM, para el gen *MUTYH*, con gran aplicabilidad y beneficio coste-efectividad. Este modelo lo hemos publicado como artículo de investigación en la revista científica *BMC Cancer* (factor impacto 2.74 (año 2010)) Pub Med indexed for MEDLINE).

Concluimos finalmente que los hallazgos encontrados van en la línea de traducir el conocimiento de la genómica del CCR a pruebas predictivas y pronósticas aplicables.

Author

**Isabel López Villar**

## **Molecular Pathways in Colorectal Oncogenesis**

### **Abstract**

Colorectal cancer (CRC) begins as a benign adenomatous polyp (benign epithelial tumor), which progresses into an advanced adenoma with high-grade dysplasia (disordered cell growth) and subsequently become invasive cancer: adenocarcinoma (glandular epithelial malignant tumor). In this process interacts germ-line agents, environmental factors and accumulated somatic changes in the colorectal epithelium.

In this thesis, we will look individual genetic variants found in selected patients with phenotype suggestive of family pathology relation to CRC, as:

1. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HPNCC): *hMSH2* gene.
2. And Familial Polyposis: *MUTYH* associated polyposis (MAP): *MUTYH* gene.

We begin by setting out two different frameworks: first direct sequencing and the other method mutational screening by high resolution melting (HRM).

Our study is motivated by the desire to find the best molecular tools to characterize this group of patients. In agreement with these experiments we find, in *hMSH2* gene, among other variants, seven new variants not described to date. We submitted these mutations in the LOVD (Leiden Open Variation Database): [www.insight-group.org](http://www.insight-group.org) (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours).

We present a novel model of mutational screening in *MUTYH* gene, with successful applicability and cost-effective benefit. We published this model as a research article in the scientific journal *BMC Cancer* (impact factor 2.74 in 2010 Pub Med indexed for MEDLINE).

Finally, we consider the challenge is to translate the knowledge regarding colorectal-cancer genomics into predictive and prognosis tests.

## Índice

Página	Título	-1-
Resumen		-9-
Índice		-13-
Lista de Figuras y Tablas		-15-
Abreviaturas		-18-
Agradecimientos		-21-
<b>1</b>	<b>Introducción a la Genómica y Técnicas Moleculares</b>	<b>-23-</b>
1.1	Regulación de la expresión genética	-24-
1.2	Herencia	-24-
1.3	Mutación y polimorfismo	-25-
1.4	Genómica del Càncer	-27-
<b>2</b>	<b>Introducción al Càncer Colorrectal (CCR)</b>	<b>-31-</b>
2.1	Clasificación	-32-
2.2	Alteraciones genéticas	-32-
2.3	Síndromes hereditarios relacionados:	-34-
2.3.1	Càncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP)	-34-
2.3.2	Poliposis asociada a <i>MUTYH</i> (PAM)	-36-
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>-39-</b>
<b>4</b>	<b>Métodos para estudio del gen <i>hMSH2</i> en Pacientes con fenotipo de Càncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP)</b>	<b>-41-</b>
4.1	Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de sangre periférica (sp) y de tumor	-41-
4.2	Análisis de fragmentos de ADN: inestabilidad de microsátélites (IMS)	-41-
4.3	Análisis de fragmentos de ADN: multiple ligation probe amplification (MLPA)	-44-
4.4	Amplificación del ADN por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	-48-
4.5	Secuenciación del ADN	-51-
4.6	Bases de datos bioinformáticos	-51-

**5 Métodos para el estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo de Poliposis asociada al gen *MUTYH* (PAM) -53-**

5.1 Extracción de ADN a partir de sp -54-

5.2 Cribado mutacional del ADN por high resolution melting (HRM) -55-

5.3 Secuenciación del ADN -59-

5.4 Análisis estadístico de los resultados obtenidos -60-

**6 Resultados del estudio del gen *hMSH2* en pacientes con fenotipo CCHNP -61-**

Mutaciones germinales detectadas en el gen *MSH2*

Descubrimiento de 7 nuevas mutaciones

**7 Resultados del estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo PAM -65-**

Mutaciones germinales en el gen *MUTYH*

Validación de un nuevo método para el cribado mutacional por HRM

**8 Discusión sobre descubrimiento de 7 nuevas mutaciones en el gen *hMSH2* -71-**

**9 Discusión sobre el cribado mutacional HRM en el gen *MUTYH* -72-**

**10 Conclusiones -75-**

**11 Bibliografía -77-**

**12 Anexo -81-**

12.1 Publicación derivada de esta tesis:

Simplifying the detection of *MUTYH* mutations by high resolution melting analysis

Research article

*BMC Cancer* 2010, 10:408 (Pub Med indexed for MEDLINE Impact Factor 2.74)

12.2 Publicación derivada de esta tesis:

Seven novel mutations of the *hMSH2* gene in hereditary non-polyposis colorectal cancers (HNPCC)

En tramitación

## Lista de Figuras y Tablas

Figura 1. **Contenido nuclear.** ADN y proteínas asociadas.

Figura 2. **Mutación** (de Vries, 1901) fenómeno por el que un gen sufre un cambio brusco y discontinuo que da origen a diferentes alelos de ese gen.

Figura 3. **Cáncer.** Marcas distintivas.

Figura 4. **Cáncer colorrectal.** Bases moleculares.

Figura 5. **Cáncer colorrectal hereditario no polipósico CCHNP.**

Figura 6. **MAP. Poliposis asociada al gen *MUTYH*.**

Figura 7. **Bases de datos bioinformáticas consultadas.**

Figura 8. **Mutaciones detectadas por MLPA en el gen *hMSH2*.**

Figura 9. **Mutaciones detectadas por secuenciación en el gen *hMSH2*.**

Figura 10. **Diagrama diferencial y secuencias correspondientes al exón 7 del gen *MUTYH*.**

Figura 11. **Diagrama diferencial y secuencias correspondientes al exón 13 del gen *MUTYH*.**

Figura 12. **Diagrama diferencial y secuencias correspondientes al exón 12 del gen *MUTYH*.**

Figura 13. **Registro de 7 mutaciones no descritas hasta la fecha en el gen *hMSH2*, en la base de datos LOVD.**

Tabla 1. **Inestabilidad de Microsatélites (IMS).** Marcadores para su estudio.

Tabla 2. **Multiple Ligation Probe Amplification (MLPA).** Componentes.

Tabla 3. **Primers para el estudio del gen *hMSH2*.**

Tabla 4. **Fenotipo de los 82 pacientes para estudio del gen *MUTYH*.**

Tabla 5. **Primers para secuenciación y HRM del gen *MUTYH*, exones 7, 12 y 13.**

Tabla 6. **Primers para la secuenciación de todos los exones del gen *MUTYH*.**

Tabla 7. **Prevalencia de mutaciones *MUTYH*** en los 82 pacientes con múltiples adenomas ( $\geq 10$ ), via HRM-PCR y via secuenciación.

Tabla 8. **Características fenotípicas y genotípicas de los 7 pacientes portadores de mutación germinal bialélica en el gen *MUTYH*.**

Tabla 9. **Características fenotípicas y genotípicas de los 6 pacientes portadores de mutación germinal monoalélica en el gen *MUTYH*.**

Tabla 10. **Características fenotípicas y genotípicas de los 19 pacientes portadores del polimorfismo G338H (exon 12).**

## Abreviaturas

A adenina base nitrogenada

A Ala alanina aminoácido

aa aminoácido

ADN ácido desoxirribonucleico

ADN<sub>ds</sub> ADN doble hebra (double strand)

ADNg ADN genómico

APC adenomatous polyposis coli

ARN ácido ribonucleico

C citosina base nitrogenada

°C grados centígrados

C Cys cisteína aminoácido

Cdk quinasas dependientes de ciclinas

CCHNP Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico

CCR cáncer colorrectal

D Asp ácido aspártico

dA desoxiadenina

dC desoxicitosina

ddNTP didesoxinucleótidos trifosfato

Del deleción

dG desoxiguanina

dT desoxitimina

E Glu ácido glutámico

F Phe fenilalanina

Fs *frame shift* cambio de marco de lectura

G guanina base nitrogenada

G Gly glicina aminoácido

H His histidina

*hMSH2* mutS homolog 2

HRM High Resolution Melting

I Ile isoleucina

IHQ inmunohistoquímica

IMS inestabilidad de microsatélites

IMS-H inestabilidad de microsatélites alta

InSiGHT Internacional Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours

K Lys lisina  
Kv kilovoltaje  
L Leu leucina  
L litro  
LOVD Leiden Open Variation Database  
M Met metionina  
MgCl<sub>2</sub> cloruro de magnesio  
μL microlitros  
min minutos  
ml mililitro  
MLPA multiple ligation probe amplification  
MMR protooncogenes reparadores de mismatch del ADN  
*MUTYH* mutY homolog (E. Coli)  
N Asn asparragina  
ng nanogramos  
NTPs nucleótidos trifosfato NTPs  
PAF poliposis adenomatosa familiar  
PAM Poliposis asociada a MUTYH  
pb pares de bases  
PCR Reacción en cadena de la polimerasa  
pH potencial de hidrógeno  
PolyPhen *Polymorphism Phenotyping*  
POP polímero  
P Pro prolina  
Q Gln glutamina  
R Arg arginina  
S Ser serina  
sgs segundos  
SNP single nucleotide polymorphism  
sp sangre periférica  
T Thr treonina  
T timina  
T<sup>a</sup><sub>m</sub> Temperatura de *melting*  
TE  
TNM Tumor, Número de ganglios y Metástasis

3D tridimensionales

V Val valina

W Trp triptófano

X stop codón

Y Tyr tirosina

A mi familia y amigos,  
en especial a mi padre.  
A todos los que han contribuido  
en esta tesis.  
Gracias.



# 1 Introducción a la Genómica y Técnicas Moleculares

El genoma humano es la secuencia de ADN contenida en los 23 pares de cromosomas de cada célula diploide humana.

Las secuencias de ADN se denominan genes. Cada gen codifica una macromolécula con función celular específica. En los organismos diploides hay dos copias de cada gen, con un alelo paterno y un alelo materno.

El número exacto de genes humanos no se conoce con exactitud.

La estructura típica de la secuencia de ADN de un gen consta de:

\_5' promotor

\_ Exón (codificante)- intrón (no codificante)- exón- intrón...

\_Poliadenilación en 3'.

El ADN es una doble cadena de nucleótidos.

Cada nucleótido está formado por:

\_Desoxirribosa,

\_Base nitrogenada: purinas: adenina A , guanina G

pirimidinas: timina T, citosina C.

\_y grupo fosfato.

La doble cadena de ADN es complementaria y antiparalela, se establecen puentes de hidrógeno entre las bases: G con C y A con T.

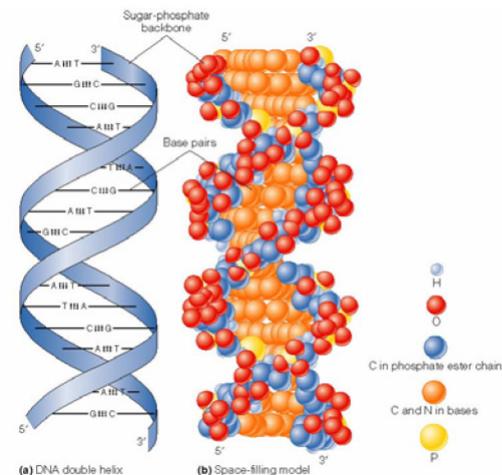
La genómica es el conjunto de ciencias y técnicas para el estudio integral de dicha información genética.

## 1.1 Regulación de la Expresión Génica

La regulación de los genes se realiza a nivel de:

- Transcripción de ADN a ácido ribonucleico (ARN),
- Traducción del ARN mensajero a una proteína, cada triplete de nucleótidos (codón) codifica para un aminoácido.
- Epigenética: modificación del ADN ó cromatina.

La regulación afecta por tanto a la funcionalidad de los genes.



Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings

**Figura 1**

**Contenido nuclear.** ADN y proteínas asociadas.

## 1.2 Herencia

La herencia es la transmisión de la información genética de un ser vivo a sus descendientes. Las células germinales contienen el material genético que se va a transmitir a la siguiente generación. En la formación de los gametos (haploides) a

partir de las células germinales (diploides), por medio de la meiosis se produce la recombinación genética entre cromosomas homólogos de los progenitores, a través de un entrecruzamiento (*crossing over*) de cromosomas.

Cada célula germinal es distinta por dicha recombinación genética.

A diferencia de las células anteriores, las células somáticas se dividen por mitosis y son las que forman el crecimiento de tejidos y órganos. Las células somáticas son genéticamente iguales entre sí, aunque luego expresen distintos genes.

### 1.3 Mutación y Polimorfismo

Mutación: *mutare* en latín significa cambiar, es el cambio de la información genética.

El alelo recesivo de un gen suele producirse por una mutación que inactiva y produce pérdida de función. Para que se manifieste fenotípicamente dicha mutación recesiva los dos alelos del gen deben estar mutados.

El alelo dominante de un gen suele producirse por una mutación que provoca ganancia de función. Para que se manifieste fenotípicamente la mutación dominante tan sólo es necesario que uno de los dos alelos del gen esté alterado.

A los alelos de un gen idénticos se les denomina homocigotos y los alelos distintos de un gen: heterocigotos.

Mutación germinal: afecta a la célula germinal productora de gametos, por tanto se transmite a la siguiente generación y la mutación estará en todas las células del organismo.

Mutación somática: afecta a la célula somática.

Las células somáticas, se dividen por mitosis, son las que forman el crecimiento de tejidos y órganos. Son genéticamente iguales entre sí, aunque luego expresen distintos genes.

Por tanto, la mutación somática no es heredable, ya que aparece sólo en las células derivadas de la inicial originando mosaicismo: dos líneas celulares distintas.

Tipos de mutación:

A. Mutación génica/molecular: afecta a un gen. Subtipos: inserción, delección y sustitución (transición ó transversión) de bases nitrogenadas.

Las consecuencias de estas mutaciones:

Inserción y delección suelen llevar a cambio de marco de lectura *frame-shift*.

Si se produce cambio de aminoácido (aa): sin sentido/ *missense*.

Si se forma un codón de terminación: terminadora/ *nonsense*.

Si se forma un codón sinónimo: silenciosa.

Si hay cambio de estructura pero no de función: neutral.

Puede haber a su vez, pérdida ó ganancia de la función del gen. Ó bien tratarse de una mutación letal.

B. Mutación cromosómica: afecta a estructura ó número de cromosomas.

Subtipos: Si afecta a estructura: delección, duplicación, inversión ó translocación.

Si afecta al número se denominan genómicas/ cariotípicas: eu-ploidías (número completo) ó aneu-ploidías.

Polimorfismo: es la existencia de múltiples alelos de un gen en una población, debe aparecer dicha población al menos en el 1% de la población. Puede tratarse de una sustitución ó de la repetición de determinada secuencia de ADN.

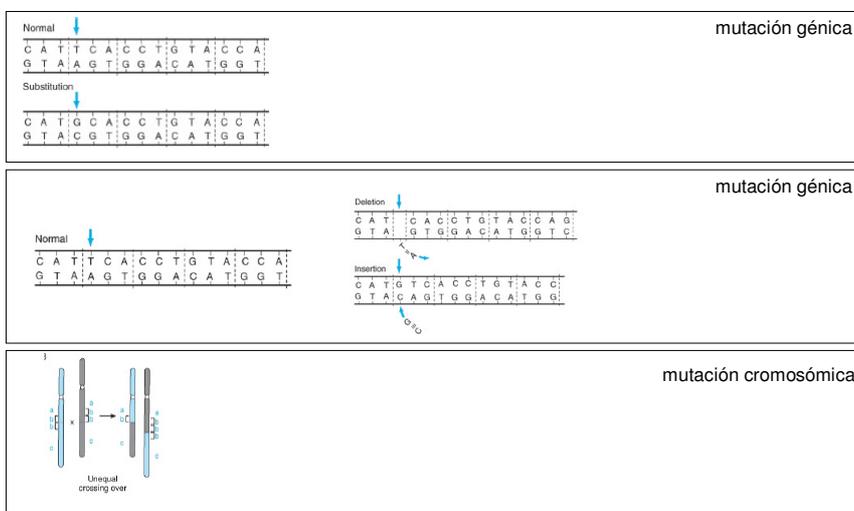


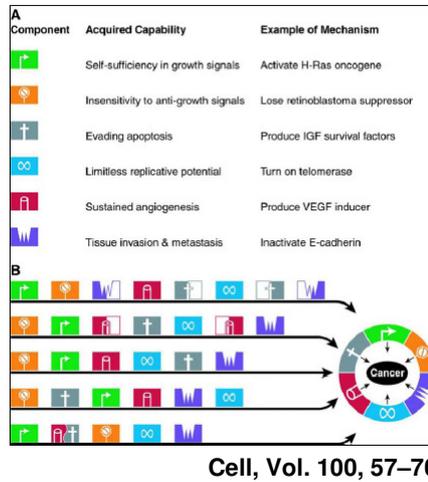
Figura 2

**Mutación** (de Vries, 1901) fenómeno por el que un gen sufre un cambio brusco y discontinuo que da origen a diferentes alelos de ese gen.

## 1.4 Genómica del Càncer

El càncer es una enfermedad genética producida por varias mutaciones en determinados genes en una célula determinada [1,2]

Esto conlleva la transformación maligna de la célula normal, que al no responder a los mecanismos antitumorales, dará lugar a un clon de células malignas: tumor.



**Figura 2**  
**Cáncer.** Marcas distintivas.

Ahora bien, si se hereda en línea germinal una mutación, serán necesarias menos mutaciones somáticas para que se desarrolle el tumor maligno y la persona tendrá mayor predisposición al cáncer.

Los protooncogenes están implicados en la regulación del crecimiento celular; cuando están mutados se denominan oncogenes y se relacionan con cáncer.

El ciclo celular está marcado por los puntos de control, regulados quinasas dependientes de ciclinas (Cdk). Los genes que controlan el ciclo celular suelen estar mutados en las células cancerosas.

Los genes supresores tumorales se encargan de detener la división celular y provocar la apoptosis. Cuando se mutan estos genes la célula se divide sin control.

Cuando el sistema de reparación del ADN [3] es defectuoso como resultado de una mutación somática/adquirida ó heredada, la tasa de acumulación de mutaciones en el genoma se eleva a medida que se producen divisiones celulares. Según el grado en que estas mutaciones afecten a protooncogenes, genes supresores tumorales y otros genes que contribuyen a la proliferación celular, aumentará la probabilidad de padecer neoplasias malignas.

Los telómeros son secuencias en los extremos de los cromosomas. Las células somáticas se dividen un número limitado de veces ya que en cada división celular los telómeros se acortan, no se replican. En condiciones normales no se expresa telomerasa en células somáticas. Sin embargo en células cancerígenas se ha demostrado expresión de telomerasa.

En relación a la epigenética: cambios reversibles en la metilación del ADN, la hipometilación se relaciona con represión de expresión génica y la hipermetilación con silenciamiento de genes supresores de tumores.



## 2 Introducción al Cáncer Colorrectal (CCR)

En términos absolutos el cáncer colorrectal es el cáncer más frecuente en España (Ministerio de Sanidad y Consumo). Es un adenocarcinoma de células epiteliales de la mucosa glandular de colon ó de recto. El colon está dividido en cuatro segmentos: ascendente, transverso, descendente y sigmoide. Está compuesto por millones de invaginaciones, criptas de Lieberkhühn. La renovación celular en el epitelio intestinal se mantiene gracias a un pequeño grupo de células madre que residen en la base de cada cripta. Por otro lado, en el borde superior de las criptas, las células detienen el ciclo celular, se diferencian y tras unos días son exfoliadas del lumen y sustituidas.

La enfermedad comienza como un pólipo adenomatoso benigno, que evoluciona a adenoma avanzado con alto grado de displasia y finalmente a cáncer invasor [4]

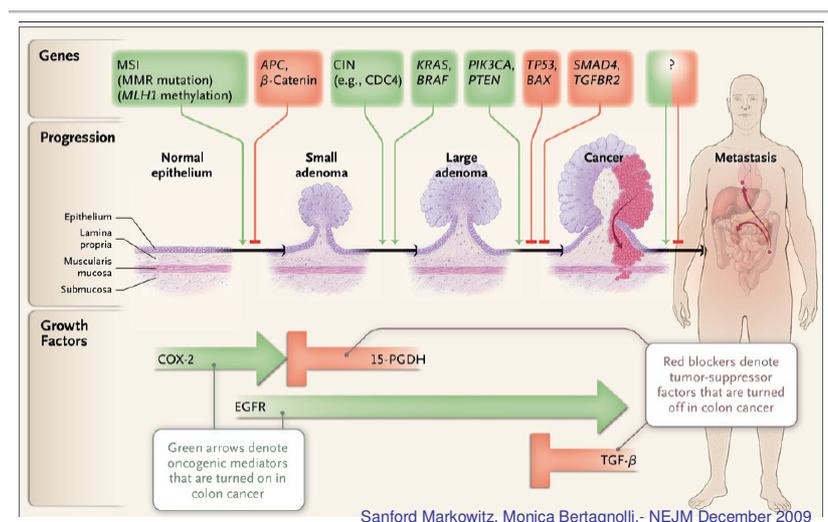


Figura 4

Cáncer colorrectal. Bases moleculares.

El adenoma ó pólipo es fundamental para que se desarrolle cáncer. Los pólipos con mayor potencial de malignidad son los de histología vellosa y morfología sésil.

## 2.1 Clasificación del CCR

El estadiaje del CCR según la clasificación TNM (Tumor, Número de ganglios y Metástasis) es el siguiente:

-Estadio I (N0, M0): localizado en mucosa (T1) ó submucosa (T2). Tienen una supervivencia global a los 5 años del 85-95%.

-Estadio II (N0, M0): afectación más en profundidad, llega a la serosa ó tejidos (IIA: T3) u órganos locales (IIB: T4). Tienen una supervivencia del 70%.

-Estadio III (N1) afectación ganglionar, la supervivencia es del 30-60%.

-Estadio IV: (M1) con metástasis. La supervivencia es menor del 5 %.

## 2.2 Alteraciones genéticas en el CCR

La base patogénica fundamental del CCR es la acumulación de mutaciones genéticas.

Los primeros genes que se alteran son los protooncogenes reparadores de mismatch del ADN (MMR): *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* ó *hPMS2* [5,6]; a

continuación el gen supresor de tumores *APC* que condiciona el cambio de epitelio normal a hiperplásico. En la vía de señalización celular *Wnt*, una de las vías moduladoras de proliferación celular en el intestino, la proteína *APC* actúa como regulador. En las células portadoras de mutación inactivadora de *APC* hay una activación constitutiva de la ruta *Wnt*/ $\beta$  catenina con la consiguiente activación de la proliferación celular. Algunos de los protooncogenes alterados en CCR son: *MMR*, *CIN*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN*, *COX2* y *EGFR*. De entre los genes supresores de tumores mutados en CCR destacan: *APC*, *TP53*, *BAX*, *SMAD4*, *TGFBR2*, *5-PGDH* y *TGF- $\beta$* .

Se han definido dos tipos de CCR, el esporádico y el familiar. El más frecuente es el esporádico (85% de los CCRs) que presenta alteraciones por la vía de la inestabilidad cromosómica (aneuploidía). Estos tumores están originados por activación de determinados oncogenes e inhibición de genes supresores y se denomina a esta vía, supresora.

El 15% de los tumores esporádicos de CCR, así como los CCR hereditario no polipósico (HPNCC), presentan inestabilidad de microsatélites (IMS). [5,6] La disfunción de los genes reparadores *MMR*, genera una hipermutabilidad en todos los genes de la célula, los tumores que presentan inestabilidad de microsatélites tienen una secuencia adenoma-carcinoma de forma acelerada. Sin embargo, tienen menor grado de metástasis por lo que tienen mejor pronóstico [7]. Esta vía oncogénica en la –

que se altera el sistema MMR del ADN, y por tanto tendrán cientos de mutaciones en secuencias altamente repetitivas denominadas microsatélites (IMS), se la denomina vía reparadora ó fenotipo mutador. [8]

La gran mayoría de tumores con IMS son esporádicos (83%) y el 17% restante se da en pacientes con CCHNP.

El cáncer familiar, evaluado en esta tesis, tiene componente hereditario, de modo que la mutación inicial está presente en línea germinal en todas las células del organismo.

## **2.3 Síndromes hereditarios en relación al CCR**

El cáncer familiar tiene componente hereditario, de modo que la mutación que genera la neoplasia está presente en línea germinal y está presente en todas las células del organismo. Los síndromes hereditarios [9] en relación al CCR evaluados en esta tesis son (ver Figura 9):

- A. CCR Hereditario No Polipósico (CCHPNC)
- B. Poliposis asociada a MUTYH (MAP)

### A. CCR Hereditario No Polipósico (CCHPNC)

El CCHNP ó también llamado síndrome de Lynch supone el 5-10% de todos los CCR [10] En este síndrome hay una mutación germinal y por tanto heredada en alguno de

los genes reparadores de *mismatch* del ADN MMR (*hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* ó *hPMS2*).

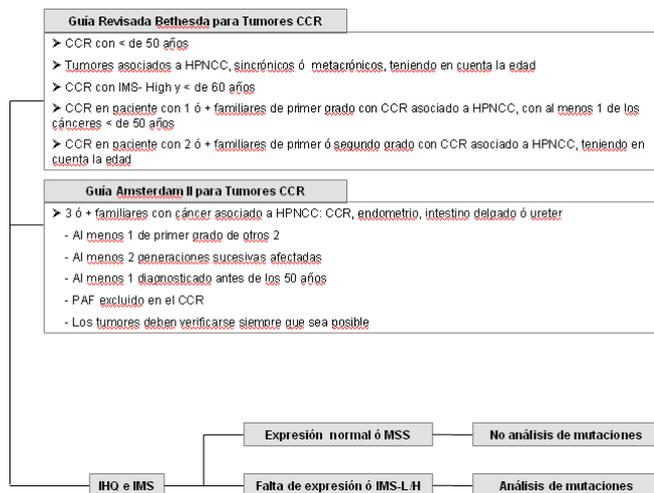
Es la variante mas común de CCR hereditario, se trata de un síndrome autosómico dominante caracterizado por la presencia de CCR a edades jóvenes (habitualmente antes de los 45 años), múltiples neoplasias (sincrónicas ó metacrónicas), preferentemente en colon derecho, con carcinogénesis acelerada y un mayor riesgo de neoplasias extracolónicas. Suelen ser tumores indiferenciados, con infiltración linfocitaria, componente mucinoso y/ó células en anillo en sello. Las mutaciones germinales que afectan a genes MMR causan lo que se ha denominado fenotipo mutador, caracterizado por una elevada frecuencia de mutaciones especialmente en zonas de ADN con secuencias repetitivas (microsatélites), donde la ADN polimerasa tiende a cometer errores con frecuencia. Las mutaciones en *hMLH1* y *hMSH2* son responsables de la mayoría de CCHNP (34% y 42% respectivamente); [11] mientras que *hMSH6* es responsable de una proporción menor de casos, asociándose con frecuencia a neoplasias endometriales.

Las mutaciones en *hPMS2* son excepcionales[12]. La penetrancia del CCR es del 60-80% aproximadamente.[6] Las mutaciones germinales de los genes reparadores de ADN tienen dos consecuencias somáticas detectables por tanto en el tumor de los pacientes: la presencia de inestabilidad de microsatélites (IMS) y la pérdida de la expresión de la proteína (detectable por inmunohistoquímica):

El tumor puede ser analizado por inmunohistoquímica para las proteínas del sistema de reparación y según el patrón de expresión nos indicará si es susceptible de estudio

de mutación germinal. De una forma similar a la inestabilidad de microsatélites, la inmunohistoquímica de las proteínas del sistema de reparación del ADN ha demostrado ser una técnica efectiva para la detección de individuos portadores de mutaciones, con la ventaja de dar información sobre qué gen está mutado.

Los criterios clínicos para la selección de pacientes con fenotipo de CCHNP son los de Bethesda revisados y Amsterdam II, como ayuda para indicar o excluir al enfermo para consejo y diagnóstico genético.



**Figura 5**  
**Cáncer colorrectal hereditario no polipósico CCHNP.**

**B. Poliposis asociada a MUTYH (MAP)**

Enfermedad autosómica recesiva caracterizada por mutaciones bialélicas en el gen *MUTYH* (gen de reparación de escisión de bases) [13,14,15] y múltiples adenomas colorrectales. Fenotípicamente es similar a la poliposis adenomatosa familiar atenuada.[16]

Las mutaciones se distribuyen a lo largo de todo el locus del gen *MUTYH*, la mayoría son mutaciones del tipo *missense*, de las cuales Y179C y G396D localizadas en los exones 7 y 13 respectivamente, suponen aproximadamente el 73% de las mutaciones en los población occidental.[17,18]

<b>Poliposis asociada a <i>MUTYH</i> (MAP)</b>
> Adenomas duodenales son infrecuentes
> Autosómica recesiva
> Menos de 100 adenomas (rango de 0-100, raramente > de 1000)
> Adenomas y CCR a edades mayores que PAF poliposis adenomatosa clásica, edad media CCR mayores 50 años

**Figura 6**

**MAP. Poliposis asociada al gen *MUTYH*.**

En esta tesis se ha evaluado una cohorte seleccionada de 82 pacientes por medio de HRM-PCR y de secuenciación. El fin es identificar mutaciones en los exones 7, 12 y 13 del gen *MUTYH*. También se analiza la prevalencia de un polimorfismo no patogénico, localizado en el exon 12: G338H.[19] Se estudió la habilidad de HRM para genotipar en posiciones específicas y también para detectar mutaciones desconocidas. HRM se ha convertido en una alternativa para el cribado en el diagnóstico molecular. En la aplicación normal de HRM-PCR, se discriminan los heteroduplex, que tienen una Temperatura de *melting* ( $T^a_m$ ) menor a la de los

homoduplex. Sin embargo, las mutaciones en homocigosis [18] han sido descritas en línea germinal del gen *MUTYH*. [17]

La importancia de identificar estas mutaciones se basa en el hecho que MAP representa un síndrome con predisposición de CCR con un patrón autosómico recesivo. [20] De hecho, estas mutaciones son responsables de hasta un 40% de los casos con poliposis familiar atenuada sin mutación en el gen *APC*. En este aspecto, esta aplicación proporciona una plataforma para la detección de mutaciones germinales en el gen *MUTYH*. [21] HRM-PCR se evaluó en experimentos sucesivos con *primers* específicos: los primeros experimentos para la discriminación entre heteroduplex y homoduplex y los experimentos siguientes para refinar las estrictas condiciones. Las mutaciones bialélicas en el gen *MUTYH* se ha descrito en la literatura [22,23], aumentan hasta 93 veces el riesgo de CCR, con una penetrancia prácticamente completa a los 60 años de edad. [17]

### 3 Objetivos

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se plantearon dos objetivos:

1. Estudio molecular del gen *hMSH2*, en 20 casos seleccionados con fenotipo de CCHNP (cáncer colorrectal hereditario no polipósico). Análisis de las variantes encontradas y correlación biológica con el tumor.
2. Optimización del método High Resolution Melting (HRM) para el cribado mutacional del gen *MUTYH* mediante el estudio de 82 pacientes seleccionados con fenotipo de PAM (Poliposis Asociada a MUTYH)



## **4. Métodos para estudio del gen *hMSH2* en Pacientes con fenotipo de Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP)**

Se seleccionaron 20 pacientes con fenotipo de CCHNP que cumplían criterios

Bethesda revisados ó Amsterdam II.

Las técnicas moleculares se emplean para ubicar, analizar y estudiar secuencias de ADN. Sirven para el diagnóstico de enfermedades.

### **4.1 Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de sangre periférica (sp) y de tumor**

A partir de sangre y tumor de los 20 pacientes, se extrajo el ADN nuclear por la técnica de partículas paramagnéticas Maxwell®16. Las partículas se unen al ADN genómico (ADNg) y la solución se eluye en condiciones de baja salinidad. El rendimiento total depende del volumen de sangre y del número de leucocitos por mililitro (ml). Se siguió el protocolo Maxwell®16.

### **4.2 Análisis de fragmentos de ADN: inestabilidad de microsatélites (IMS)**

Hay distintos mecanismos de reparación del ADN según el tipo de daño de la doble hebra.

Los fallos en la replicación del ADN se solucionan por el sistema de reparación de

4. Métodos para estudio del gen *hMSH2* en Pacientes con fenotipo de CCHNP

errores de apareamiento, *mismatch repair genes* (MMR genes). Las enzimas codificadas por MMR genes son *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* y *hPMS2*.

Si el sistema MMR falla se origina inestabilidad de microsatélites (IMS). Los microsatélites son secuencias repetidas de nucleótidos del ADN, distribuidas por todo el genoma humano. Si falla el sistema reparador habrá un cambio en la longitud del microsatélite y esto es detectable por análisis molecular de fragmentos.

En cada caso se compara las muestras sin tumor y con tumor pertenecientes al mismo individuo. Para su estudio se incluyen primers marcados con fluorescencia para la co-amplificación de 7 microsatélites, de los cuales 5 son marcadores mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y MONO-27) y 2 marcadores pentanucleótidos (PentaC y PentaD).

Marcador	Ubicación en Gen Bank	Secuencia	Pares de bases	Marcador
NR-21	XM_033393	(A) <sub>21</sub>	101	JOE
BAT-26	U41210	(A) <sub>26</sub>	113	FL
BAT-25	L04143	(A) <sub>25</sub>	122	JOE
NR-24	X60152	(A) <sub>24</sub>	130	TMR
MONO-27	AC007684	(A) <sub>27</sub>	150	JOE
Penta C	AL138752	(AAAAG) <sub>3-15</sub>	164, 174	TMR
Penta D	AC000014	(AAAAG) <sub>2-17</sub>	168, 187	FL

**Tabla 1**

**Inestabilidad de Microsatélites (IMS).** Marcadores para su estudio.

4. Métodos para estudio del gen *hMSH2* en Pacientes con fenotipo de CCHNP

Se prepara la siguiente mezcla: H<sub>2</sub>O 5,85 µL, Buffer 1 µL, Primers 1 µL, AmpliTaq Gold DNA polimerasa 0,15 µL y DNA (1-2 ng) 2 µL. Hay que incluir controles positivo y negativo.

Condiciones de la PCR en el termociclador: 95°C durante 11 min; 96°C durante 1 min; 10 ciclos de 94°C durante 30 sgs, 58°C durante 30 sgs (ramp 68sgs) y 70°C durante 1 min (ramp 50 sgs). Luego 20 ciclos de 90°C durante 30 sgs, 58°C durante 30 sgs (ramp 60 sgs) y 70°C durante 1 min (ramp 50 sgs). Finalizar con 60°C durante 30 min y *hold* a 4°C.

Una vez realizada la PCR de amplificación, preparar la siguiente mezcla: ILS600 0,5 µL, Hi-DiFormamida 9,5 µL y 1 µL de cada muestra amplificada en su pocillo correspondiente. Tapar la placa, centrifugarla y colocarla en el termociclador 95°C durante 3 min y luego enfriarla en hielo. Se programa el analizador genético ABI3100 para el análisis de fragmentos. El control interno de tamaño es ILS600.

Los productos de PCR son separados por electroforesis capilar usando el analizador genético ABI PRISM 3100, y los tamaños (en pares de bases) de los microsatélites amplificados son analizados con el software *GeneMapper*. Los marcadores mononucleótidos incluidos tienen alta sensibilidad y especificidad en la detección de defectos de MMR. Estos marcadores mononucleótidos son cuasimonomórficos.

Los marcadores pentanucleótidos han sido seleccionados por su alto nivel de polimorfismos y bajo grado de MSI, de modo que ayudan a confirmar, para mayor seguridad, si las muestras pertenecen al mismo individuo.

4. Métodos para estudio del gen *hMSH2* en Pacientes con fenotipo de CCHNP

Un cambio en el tamaño del alelo de 3 pares de bases ó más en la muestra tumor en comparación con la muestra normal, se considera MSI-positiva para ese marcador.

La guía Bethesda recomienda que las muestras de tumor con 2 ó más microsátélites alterados, se clasifican como IMS-H (inestabilidad alta). Las muestras de tumor con 1 ó menos marcadores alterados se clasifican como NO MSI-H. Este software permite el análisis manual y automático de los datos crudos y genera electroferogramas con una tabla de datos en la que se muestra la longitud (en pb) de los fragmentos de la PCR y la cuantificación de la altura de los picos (en RFU)

### **4.3 Análisis de fragmentos de ADN: multiple ligation probe amplification (MLPA)**

La técnica MLPA consiste en el cribado de determinadas regiones del ADN mediante el estudio de en torno a 40 sondas que hibridarán en diferentes puntos del gen de interés *hMSH2* (situado en el cromosoma 2 y con 16 exones), se ligarán 2 a 2 y posteriormente se amplificarán utilizando el mismo par de primers. Mediante un análisis de fragmentos y aprovechando la diferencia de tamaño de cada una de las sondas debido a un fragmento cebador de tamaño, se podrán identificar pérdidas ó ganancias de material genético, atendiendo a la normalización de las áreas de cada pico con respecto a tres controles sin reordenamiento. Por tanto MLPA se emplea para detectar grandes reordenamientos (deleciones ó inserciones mayores de 60 pb).

1º) Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas (en termociclador):

4. Métodos para estudio del gen *hMSH2* en Pacientes con fenotipo de CCHNP

Utilizar aproximadamente 100ng (20-500 ng) de DNA en un volumen de 5  $\mu$ L

Para diluir el ADN emplear TE ó bien H<sub>2</sub>O.

Desnaturalización del ADN: programa termociclador 98°C 5 min.

SALSA Probe-mix sondas
MLPA buffer
Ligase-65 buffer A
Ligase-65 buffer B
Ligase-65
SALSA PCR-primers
SALSA Enzyme Dilution buffer
SALSA Polymerase

**Tabla 2**

**Multiple Ligation Probe Amplification (MLPA).** Componentes.

A continuación a los 5  $\mu$ L de DNA agregar por cada muestra:

1,5  $\mu$ L de SALSA Probe-mix (son las sondas)

y 1,5  $\mu$ L de MLPA buffer por cada muestra. Total 3  $\mu$ L por cada muestra

Mezclar con cuidado. (No centrifugar para evitar que las sondas más largas precipiten). El buffer es viscoso y no se mezcla fácilmente.

Introducir en termociclador con el programa: 95°C durante 1 min y 60°C durante 16 horas.

Reacción de ligación de las sondas al ADN (en termociclador):

Preparar la mezcla de ligación, para cada muestra:

*4. Métodos para estudio del gen hMSH2 en Pacientes con fenotipo de CCHNP*

25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O,

3  $\mu$ L de buffer A de ligase

3  $\mu$ L de buffer B de ligase

y 1  $\mu$ L de ligase-65

Total 32  $\mu$ L por cada muestra

Colocar los tubos que contienen el ADN con las sondas de hibridación(1°) en termociclador a 54°C.

A la T<sup>a</sup> de 54°C añadir 32  $\mu$ L de la mezcla de ligación a cada muestra y mezclar.

Programa de termociclador: 54°C durante 15 min y 98°C durante 5 min.

[Después de calentar a 98°C las muestras para inactivar la ligasa, las muestras se pueden almacenar hasta una semana a 4°C. Para periodos más largos, almacenar a -20°C]

3°) Reacción de PCR (en termociclador):

Por otro lado a 10 $\mu$ L de la reacción de ligación (2°) de cada muestra añadir:

26  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O

y 4  $\mu$ L de 10XSALSA PCR buffer . Total 30  $\mu$ L por cada muestra

Preparar la mezcla de la polimerasa, por cada muestra:

5,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O

2  $\mu$ L de SALSA PCR-primers

2  $\mu$ L de SALSA Enzyme Dilution buffer

0,5  $\mu$ L de de SALSA Polimerasa mezclar bien

*4. Métodos para estudio del gen hMSH2 en Pacientes con fenotipo de CCHNP*

Total 10  $\mu$ L por cada muestra

Colocar los tubos con los 40  $\mu$ L en el termociclador a 60°C; agregar 10  $\mu$ L de la mezcla de la polimerasa a cada tubo y empezar la reacción de PCR.

Condiciones de PCR: 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos; 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. Terminar con 20 minutos a 72°C.

[Los productos de PCR se pueden almacenar a 4°C protegidos de la luz por lo menos una semana]

4º) Electroforesis capilar para la separación y cuantificación relativa de los productos de la amplificación (en analizador genético ABI-3100 Avant (4 capilares)):

Preparar la siguiente mezcla:

8,5  $\mu$ L de formamida desionizada (es desnaturalizante)

0,5  $\mu$ L del estándar interno de tamaño (ROX-500Genescan). Total 9  $\mu$ L por cada muestra. Pipetear los 9  $\mu$ L de mezcla en la placa; en tantos pocillos como muestras vayamos a analizar.

Añadir a cada pocillo 1  $\mu$ L de cada una de las muestras.

Termociclador: 98°C 5 min y luego enfriar en hielo.

Introducir la placa en el analizador genético y programar la electroforesis.

[Capilares:36 cm. Polímero: POP-4 ó POP-6. Temperatura ejecución 60°C. Cap fill volumen: 184 pasos. Voltaje preejecución: 15 KV. Tiempo pre-ejecución: 180 seg.

Voltaje de inyección: 3.0 Kv. Tiempo de inyección: 10-30 seg. Voltaje ejecución: 15 Kv.

Delay time: 1 sec. Tiempo ejecución: 1500 seg.]

## 4.4 Amplificación del ADN por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Método enzimático in vitro para la replicación rápida del ADN. Se amplifica un fragmento de ADN diana localizado entre dos oligonucleótidos cebadores. Estos cebadores están diseñados de forma complementaria a las cadenas de ADN y sus extremos 3' están dirigidos hacia la secuencia diana a amplificar.

En cada ciclo de PCR se produce desnaturalización por calor de las dos hebras, hibridación de cebadores y síntesis de dos nuevas cadenas de ADN por la ADN polimerasa. En cada ciclo se duplica la cantidad de ADN.

De modo que la amplificación es exponencial 2,4,6,8,16... copias.

Componentes de la PCR: ADN, nucleótidos trifosfato NTPs (dA, dC, dG, dT), ADN polimerasa, cofactor ión divalente generalmente en forma de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) y buffer tampón para mantener pH adecuado.

Se realiza en termociclador y en pocas horas se obtienen billones de copias a partir de una molécula de ADN.

Tipos de PCR:

B.1. PCR clásica cualitativa. Para su posterior visualización se realiza electroforesis (migración según carga y masa) en gel de agarosa y tinción específica de ácidos nucleicos con bromuro de etidio ó sybr safe.

B.2. PCR en tiempo real cuantitativa: se hace un seguimiento de la cantidad de ADN sintetizado inicialmente. Como se duplica el ADN en cada ciclo se obtiene una línea recta en una gráfica semilogarítmica. El número de ciclos para

*4. Métodos para estudio del gen hMSH2 en Pacientes con fenotipo de CCHNP*

alcanzar un umbral arbitrario será la medida de la cantidad de partida. Es importante que sea comparable la eficiencia de la reacción, es decir, los dos segmentos lineales deben ser paralelos.

4. Métodos para estudio del gen *hMSH2* en Pacientes con fenotipo de CCHNP

1f	TCGCGCATTTCCTTCAACC
1r	GTCCTCCCCAGCACGC
2f	GAAGTCCAGCTAATACAGTGC
2r	CTTCACATTTTTATTTTCTACTC
3f	GCTTATAAAATTTTAAAGTATGTTC
3r	GCCTTTCCTAGGCCTGGAATCTCC
4f	TTCATTTTTGCTTTTCTTATTCC
4r	ATATGACAGAAATATCCTTC
5f	CCAGTGGTATAGAAATCTTCG
5r	CCATTCAACATTTTAAACCC
6f	GTTTTCACTAATGAGCTTGCC
6r	GTGGTATAATCATGTGGG
7f	GACTTACGTGCTTAGTTG
7r	GTATATATTGTATGAGTTGAAGG
8f	GATTTGTATTCTGTAAAATGAGATC
8r	GGCCTTGCTTTTTAAAAATAAC
9f	GTCTTTACCCATTATTTATAGG
9r	GTATAGACAAAAGAATTATTCC
10f	GGTAGTAGGTATTTATGGAATAC
10r	CATGTTAGAGCATTTAGGG
11f	CACATTGCTTCTAGTACAC
11r	CCAGGTGACATTCAGAAC
12f	ATTCAGTATTCCTGTGTAC
12r	CGTTACCCCCACAAAGC
13f	CGCGATTAATCATCAGTG
13r	GGACAGAGACATACATACATTTCTATC
14f	TACCACATTTTATGTGATGG
14r	GGGTAGTAAGTTTCCC
15f	CTCTTCTCATGCTGTCCC
15r	ATAGAGAAGCTAAGTTAAAC
16f	TAATTAATAATGGGACATTC
16r	TACCTTCATTCCATTACTGG

**Tabla 3. Primers para el estudio del gen *hMSH2*.**

## 4.5 Secuenciación del ADN

Por el método de Sanger se emplean análogos químicos didesoxinucleótidos trifosfato ddNTP (ddA, ddC, ddG, ddT) para interrumpir la síntesis de ADN en bases específicas. Se emplea en la reacción: fragmento de ADN amplificado, ADN polimerasa, ddNTPs marcados con fluorocromos distintos y NTPs. Se originan fragmentos de ADN de distintas longitudes que son separados por electroforesis capilar. Cada análogo ddNTP está marcado con un colorante fluorescente distinto.

## 4.6 Bases de datos bioinformáticos

La bioinformática crea bases de datos con secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas, además de proporcionar herramientas para el análisis de secuencias.

Las bases consultadas para esta tesis han sido:

GenBank para secuencias de ADN

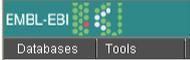
EMBL-Bank para secuencias de ADN y ARN

MMDB para modelos moleculares tridimensionales (3D)

UniProt para secuencias de proteínas y análisis funcional

PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) para predicción del fenotipo por sustitución de aminoácido.

4. Métodos para estudio del gen *hMSH2* en Pacientes con fenotipo de CCHNP

	GenBank secuencias de ADN
	EMBL-EBI secuencias de ADN
	MMDB modelos 3D
	PolyPhen predicción efecto funcional de nsSNPs

**Figura 7**

**Bases de datos bioinformáticas consultadas.**

## **5. Métodos para el estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo de Poliposis asociada al gen *MUTYH* (PAM)**

Este estudio fue una colaboración entre tres departamentos de investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre: Gastroenterología, Oncología Médica y Biología Molecular. En este estudio, se analizaron los datos de fenotipo y genotipo de 82 pacientes, con múltiples adenomas ( $\geq 10$ ) sincrónicos (19/82) y metacrónicos (63/82) y estudio negativo de *APC* (excepto un caso). Los pacientes, que figuran en la Tabla 1 se analizaron para detectar la posible presencia de mutaciones en el gen *MUTYH* (situado en el cromosoma 1 y con 16 exones). Se incluyeron las edades promedio en la presentación de los pólipos (entre 17 y 88 años), el tipo de pólipos ( $\geq 10$ ): metacrónicos (63/82) o sincrónicos (19/82), la historia familiar y, en su caso, la localización, el estadio y la edad de presentación del CCR. En los casos con CCR se clasificó de acuerdo a la guía modificada Astler-Coller y se realizó inmunohistoquímica (IHQ) para descartar deficiencia MMR proteínas: *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* y *hPMS2*. Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado previamente a la extracción de muestras de sangre. Este estudio fue aprobado por el Comité Interno de Ética del hospital 12 de Octubre.

5. Métodos para el estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo de PAM

Phenotypic features of 82 patients					
Type of Adenomas		CRC		Family history	
Patients with multiple $\geq 10$ polyps synchronous	Patients with multiple ( $\geq 10$ ) polyps metachronous	Yes	No	Yes	No
23.2% 19/82	76.8% 63/82	48.8% 40/82	51.2% 42/82	34.1% 28/82	65.9% 54/82
Mean age at presentation 63.7 years	Mean age at presentation 61.0 years	Mean age at presentation 57.1 years			

**Tabla 4**

**Fenotipo de los 82 pacientes para estudio del gen *MUTYH*.**

## 5.1 Extracción de ADN a partir de sp

Se extrajo ADN genómico de sangre periférica de 82 pacientes seleccionados en el Departamento de Endoscopia del Hospital 12 de Octubre. Se aisló el ADN genómico con el kit automático de extracción de sangre basado en la tecnología de partículas magnéticas, siguiendo las instrucciones indicadas en el protocolo del fabricante (Masswell Promega, Madison, WI EE.UU.). Se midió la concentración de ADN con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, EE.UU.) y se diluyó las muestras a una concentración final de 10 nanogramos por litro (ng / l).

## 5.2 Cribado mutacional del ADN por high resolution

### melting (HRM)

El sistema Light Cycler® 480 permite realizar una PCR, replicación de ADN en tiempo real. La detección del fragmento de ácido nucleico a estudiar, se lleva a cabo con un intercalante de ADN High Resolution Melting dye. La detección se lleva a cabo añadiendo este marcador fluorescente específico de ADN de doble hebra (ADN<sub>ds</sub>), con secuencia-independiente.

La temperatura de *melting* del ADN ( $T^a_m$ ) es la  $T^a$  de fusión a la cual el 50% de las bases del ADN están apareadas y el otro 50% están desapareadas.

El análisis de la curva de *melting* permite genotipar.

Se amplifican por PCR los alelos paterno y materno del ADN a estudiar, de modo que las posibles combinaciones resultantes en la PCR serán:

A. Homoduplex será ADN<sub>ds</sub>, en el que sus bases hayan hibridado perfectamente. Esto indica que el ADN puede ser de 2 tipos:

A.1 *wild type*, homocigoto no mutado.

A.2 ó mutación en homocigosis ó polimorfismo en homocigosis.

B. Heteroduplex será DNA<sub>ds</sub> en los que sus bases no hayan hibridado perfectamente.

Esto indica un ADN con mutación ó polimorfismo en heterocigosis.

5. Métodos para el estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo de PAM

Después de la PCR el software LC480 *gene scanning* analiza los productos. HRM Dye sólo se une al DNAs y es cuando emite fluorescencia. Para detectar las posibles variaciones de secuencia, se analizan las curvas de *melting* de los amplicones a estudiar. Así los DNAs heterocigotos amplificados (heteroduplex) tendrán una T<sup>a</sup> de melting ligeramente más baja que los DNAs homocigotos (homoduplex).

Los cebadores ó *primers* empleados están recogidos en la Tabla 5, así como el tamaño del amplicón.

Los *primers* se diseñaron para una T<sup>a</sup> de *annealing* de 60°C, mediante el programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) para el cálculo la temperatura de *melting* (T<sup>a</sup><sub>m</sub>). Los cebadores utilizados para la amplificación de los exones restantes figuran en la Tabla 6.

MUTYH HRM and sequencing primer sequences			
Exon	Primer name	Sequence	Amplicon size (base pairs)
7	7F	5'-GGGACTGACGGGTGATCTCT-3'	186 bp
	7R	5'-TTGGAGTGCAAGACTCAAGATT-3'	
12	12F	5'-AGCCCTCTTGGCTTGAGTA-3'	297 bp
	12R	5'-TGCCGATTCCCTCCATTCT-3'	
13	13F	5'-AGGGCAGTGGCATGAGTAAC-3'	296 bp
	13R	5'-GGGTCAAGGGTTCAAATAG-3'	

**Tabla 5**

**Primers para secuenciación y HRM del gen *MUTYH*, exones 7, 12 y 13.**

5. Métodos para el estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo de PAM

Exon	Primer name	Sequence	Amplicon size (base pairs)
1	1F	5'-GCGGTGTACAACGGAAGCTTG-3'	292 bp
	1R	5'-ATCCCCGACTGCCTGAACC-3'	
2	2F	5'-CTGCTTTGGCTGGGTCTTT-3'	262 bp
	2R	5'-CGCACCTGGCCCTTAGTAAG-3'	
3	3F	5'-CTGCTGTGTCCCAAGACC-3'	299 bp
	3R	5'-CAACCCAGATGAGGAGTTAGG-3'	
4	4F	5'-GACCTACCATGGAGAAGACG-3'	252 bp
	4R	5'-GGGTTGGCATGAGGACACTG-3'	
5	5F	5'-GGGCAGGTCAGCAGTGTC-3'	189 bp
	5R	5'-TACACCCACCCCAAAGTAGA-3'	
6	6F	5'-TACTTTGGGGTGGGTGTAGA-3'	185 bp
	6R	5'-AAGAGATCACCCGTCAGTCC-3'	
8	8F	5'-CCAGGAGTCTTGGGTGTCTT-3'	240 bp
	8R	5'-AGAGGGGCCAAAGAGTTAGC-3'	
9	9F	5'-AACTCTTTGGCCCCTCTGTG-3'	196 bp
	9R	5'-GAAGGGAACACTGCTGTGAAG-3'	
10	10F	5'-GTGCTTCAGGGGTGTCTGC-3'	262 bp
	10R	5'-TGTCATAGGGCAGAGTCACTCC-3'	
11	11F	5'-TAAGGAGTGAAGTCTGCCCTATG-3'	251 bp
	11R	5'-GCCAAGAGGGCTTTAGGG-3'	
14	14F	5'-TTGGCTTTTGAGGCTATATCC-3'	256 bp
	14R	5'-CATGTAGGAAACACAAGGAAGTA-3'	
15	15F	5'-TGAAGTTAAGGGCAGAACACC-3'	207 bp
	15R	5'-GTTACCCAGACATTCGTTAGT-3'	
16	16F	5'-AGGACAAGGAGAGGATTCTCTG-3'	298 bp
	16R	5'-AGACCCCATCTCAAAAA-3'	

**Tabla 6.**

**Primers para la secuenciación de todos los exones del gen *MUTYH*.**

5. Métodos para el estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo de PAM

Primero diseñamos los cebadores que flanqueasen las regiones codificantes de los exones del gen *MUTYH*, se analizó cada amplicón separadamente para garantizar que tuviesen un único dominio de fusión por medio del programa <http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/polandPolonia.html>. Se incluyeron zonas intrónicas susceptibles de SNP (single nucleotide polymorphism) cerca del inicio y fin de cada exón, respetando siempre la condición de amplicones menores de 300 pb. Esto fue posible ya que el tamaño de los exones *MUTYH* permitió este diseño. Todas estas secuencias se analizaron por <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>. para disminuir la probabilidad de coamplificación de interferencias. El proceso se realizó en un Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania). Se hicieron una serie de experimentos para la optimización, el primero para la discriminación entre patrones heterodúplex y homodúplex. En el primer *round* se amplificó los fragmentos de ADN correspondientes a los exones 7, 12 y 13 con una cantidad de 5 a 10 ng de ADN genómico. Las concentraciones finales de los reactivos fueron: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.12 μM de primers forward y reverse (que figuran en la tabla Tabla 5), 2X HRM(que contiene ResoLight) y el ADN. Las condiciones establecidas para el experimento fueron: 95 ° C 10 min, 40 ciclos de (95 ° C, 10 sg; 60 ° C la lectura de fluorescencia 10 s; 72 ° C 15 s) a continuación, melting de ( 95 ° C 1 min, 40 ° C 1 min, 60 ° C 1 sg; 95 ° C 25 adquisiciones por ° C). Se realizaron varios experimentos en cada exón, con reextracciones de ADN y las mismas condiciones previamente referidas. Para la reproducibilidad, se repitieron los experimentos en tres días diferentes.

El análisis se realizó con el software versión 1.5 y los resultados fueron validados con la posterior secuenciación. Las curvas de melting se normalizaron, para permitir la comparación de las muestras. De modo que diferencias significativas en la fluorescencia con respecto a la línea de base horizontal, previamente establecida, son indicativos de mutaciones.

La probabilidad de la temperatura de melting observado ( $T_m$ ) en la separación de los homocigotos se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Comenzamos el análisis con una sensibilidad de 0.3 y se fue ajustando en los experimentos siguientes.

En portadores de la mutación monoalélica, se evaluó todo el gen *MUTYH* en busca de otra posible alteración. Para el análisis del resto de los exones se emplearon las siguientes concentraciones finales de reactivos: 2 mM  $MgCl_2$ , 0.12  $\mu M$  de primers *forward* y *reverse* (Tabla 6), 2 $\times$  HRM (que contiene ResoLight). Las condiciones *melting* fueron los siguientes: 95 ° C 10 min, 40 ciclos de (95 ° C 10 s; (de 65 ° C a 58 ° C en pasos de 0,5 ° C, 10sg; 72 ° C 15sg) después melting (95° C 1 min, 40 ° C 1 min, 60 ° C 1 sg; 95 ° C 25 adquisiciones por °C). Este análisis se repitió en tres días diferentes.

### 5.3 Secuenciación del ADN

Se secuenciaron todas las muestras, para evaluar la detección de mutaciones en el gen *MUTYH* y correlacionar estos resultados con los de HRM. Se amplificaron fragmentos de ADN de 50 a 100 ng. Las concentraciones finales de los reactivos

*5. Métodos para el estudio del gen MUTYH en pacientes con fenotipo de PAM*

empleados fueron: 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,7 μM de primers *forward* y *reverse* que figuran en las tablas 5 y 6, 1 × Taq polimerasa fast start (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania) y el ADN. Los ciclos de PCR y las condiciones establecidas fueron: 95 ° C 10 min, 35 ciclos de (95 ° C 30 sg; 60 ° C 30 sg; 72 ° C 30 sg) y 72 ° C 10 min. Los productos PCR fueron purificados con ExosapIT (GE Healthcare), seguida de la secuenciación con Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los productos de secuenciación fueron purificados mediante AutoSeq G-50 Dye Terminator (GE Healthcare). Finalmente se analizó en el Analizador Genético 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## **5.4 Análisis estadístico de los resultados obtenidos**

El programa estadístico utilizado para el análisis fue SPSS versión 15.0. La asociación entre variables categóricas se realizó mediante la prueba de  $\chi^2$  y la prueba exacta de Fisher y la razón de probabilidad fue utilizada para medir la fuerza de la asociación. La asociación entre las variables continuas se realizó mediante la comparación de medias usando la prueba T de Student o U de Mann-Whitney. El nivel de significación fue  $\leq 0,05$ .

## **6 Resultados del estudio del gen *hMSH2* en pacientes con fenotipo CCHNP**

Se analizaron 20 muestras de pacientes con fenotipo de CCHNP. Se realizó inmunohistoquímica e inestabilidad de microsatélites en los 20 casos. El análisis inmunohistoquímico se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica y el estudio de IMS en el Laboratorio de Biología Molecular. Los resultados de IHQ e IMS fueron concordantes, con 11/20 (55.0%) resultados de IHQ con pérdida de expresión para las proteínas *hMSH2* y *hMSH6*. En estos mismos 11/20 casos los resultados fueron de IMS-H. En los 9/20 (45.0%) casos restantes los resultados fueron de expresión normal para las proteínas MMR y MSS.

En los 11 casos con IMS-H e IHQ alterada se detectó mutación en 11/11 (100%): 5/11 casos se detectaron grandes reordenamientos por MLPA (45.4%) y 6/11 casos se detecta alteración por secuenciación (55.6%).

De las 11 mutaciones detectadas 7 de ellas no habían sido descritas previamente en la literatura y se registraron en la base de datos internacional LOVD. [24]

A partir de las 11 muestras de ADN con IHQ alterada e IMS-H, se realizó en primer lugar el estudio por MLPA [25] para el estudio de posibles reordenamientos en los genes *hMSH2* y *hMSH6*. Los grandes reordenamientos detectados por MLPA fueron:

1. Deleción de 7 exones del 1 al 7 en el gen *hMSH2* que supone una pérdida de 54 Kb (kilobases). Esta mutación ya se había descrito previamente en la literatura. De hecho la gran mayoría de las mutaciones en el gen *hMSH2* son deleciones. Las repeticiones Alu son secuencias de aproximadamente 300 pb que suponen el

*6. Resultados del estudio del gen hMSH2 en pacientes con fenotipo de CCHNP*

45% del genoma y se desplazan a lo largo de sucesivas generaciones en el genoma humano. En el gen hMSH2, una mayor densidad de repeticiones Alu corresponde a una mayor incidencia de reordenamiento en comparación con el resto de los genes de reparación MMR.

2. Deleción del exón 8 p.Lys427GlyfsX4, esta mutación también ya estaba descrita previamente. El exón 8 se sitúa entre dos grandes intrones. Esta mutación supone un cambio en el marco de lectura que concluye con un stop codon.

3. Deleción del exón 7, mutación que también supone un cambio de lectura y que también había sido descrita previamente en otros pacientes.

4. Deleción de 2 exones 1 y 2. c.1-366del. p.Met1Lys122del. Esta mutación no había sido descrita previamente en la literatura, por lo que la registramos en la base de datos internacional LOVD Leiden Open Variation Database. Se trataba de una mujer con síndrome de Muir-Torre. A partir de este caso índice se hizo el estudio familiar y se confirmó la misma mutación en el padre, por lo tanto el alelo mutado en heterocigosis lo heredó por esta vía. Y también se detectó la misma variante en sus dos hijas.

5. La quinta variante detectada por MLPA tampoco había sido previamente recogida en la literatura por lo que se registró en la base de datos LOVD.[24] Se trataba de la pérdida de cuatro exones del 3 al 6. c.367\_1076del. p. Ala123Arg359del. El afecto era un varón, a partir de este caso índice se estudió a los dos hijos resultando la hija ser portadora y el hijo no portador.

6. Resultados del estudio del gen *hMSH2* en pacientes con fenotipo de CCHNP

Por tanto de los 11 casos a analizar 5/11(45.4%) de ellos presentaron alteración por MLPA. A los 6/11 casos restantes se les realizó el análisis de la región codificante del gen *hMSH2* por secuenciación.

En los 6/11 (55.6%) casos secuenciados fueron: en todos ellos se detectó mutación, 1 de las cuales ya estaba recogida en la literatura y 5 casos se trataba de mutaciones no descritas hasta la fecha. Las 6 variantes son:

6. Exón 11. c.1705delGA. p. Glu569Ile fsX2. Esta mutación se trata de una pérdida de GA que supone un cambio en el marco de lectura que deriva en una proteína truncada.

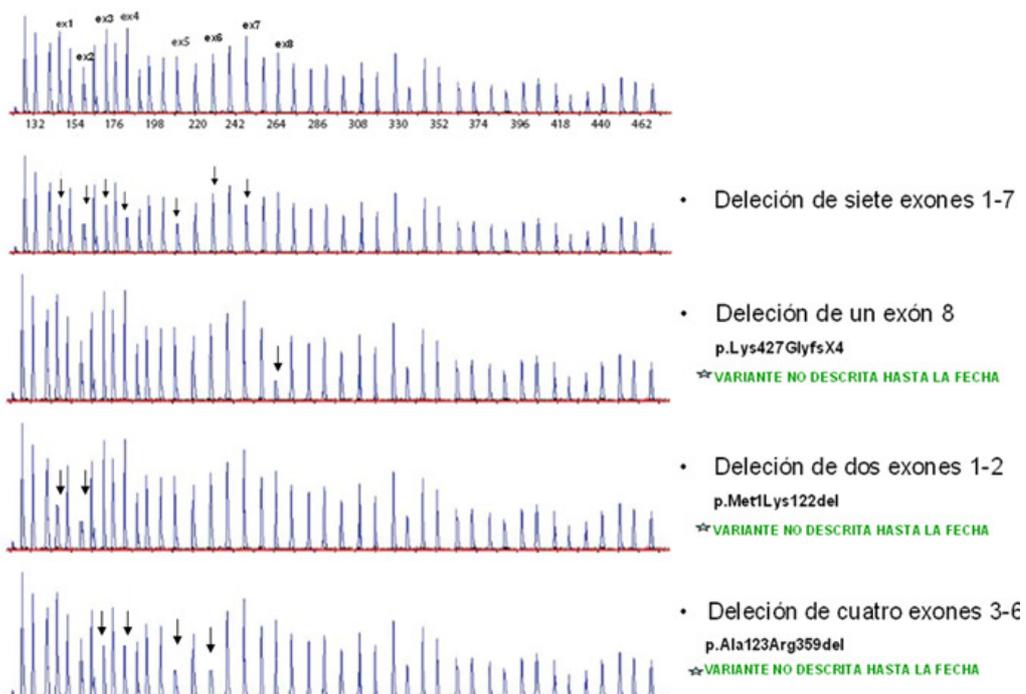


Figura 8

Mutaciones detectadas por MLPA en el gen *hMSH2*.

6. Resultados del estudio del gen hMSH2 en pacientes con fenotipo de CCHNP

- 7. Exón 4 c.691delG p. Asp231ThrfsX4. Mutación no descrita hasta la fecha.
- 8. Exón 9 c.1399G>T p.Glu467X nonsense por predicción de polyphen.
- 9. Exón 4. c.761delA p.Asn255fsX. Mujer hija portadora. Mutación no descrita
- 10. Exón 5 c.929T>G p.Leu310Arg Estudio Polyphen. Se trataba de una mutación de novo, ninguno de los padres era portador de la alteración.[26]
- 11. Exón 11 c.1726 G>C p.Ala576Pro Se trataba de un caso interesante ya que además de HPNCC tuvo un linfoma. Mutación no descrita.[27,28]

A partir de estas mutaciones no descritas se deja una puerta abierta para el estudio funcional mas profundo y su correlación biológica con el tumor.

Todos estos pacientes en los que se detectó mutación, tenían antecedentes familiares de CCR 8Bethesda y/o Amsterdam II).

• Exón 4 c.691delG p.Asp231ThrfsX4 ★ VARIANTE NO DESCRITA HASTA LA FECHA	c.691delG p.Asp231ThrfsX4 p.D231W	AAGAAAAAAGCTGACTTTTCCACAAAAGACATTTATCAGGACCTCAACCGGTTGTTGAA --R--K--K--A--D--F--S--T--K--D--I--Y--Q--D--L--N--R--L--L--K--
• Exón 4 c.761delA p.Asn255fsX ★ VARIANTE NO DESCRITA HASTA LA FECHA	c.760delA p.Asn255fsX p.N255X	AGGCRAAAAGGGAGAGCAGATGATAGTGCTGTATTGCCAGAAATGGAGAATCAGGTTGC --G--K--K--G--E--Q--M--N--S--A--V--L--P--E--M--E--N--Q--V--A--
• Exón 5 c.929T>G p.Leu310Arg ★ VARIANTE NO DESCRITA HASTA LA FECHA	c.929T>G p.Leu310Arg p.L310R	AGTCAGAGCCCTTAAOCTTTTTTCAGGGTTCGTGTTGAAGATACCACTGGCTCTCAGTCTCT --V--R--A--L--N--L--F--Q--G--S--V--E--D--T--T--G--S--Q--S--
• Exón 9 c.1399G>T p.Glu467X ★ VARIANTE NO DESCRITA HASTA LA FECHA	c.1399G>T p.Glu467X p.Q467X	TGAATTCCTTGTAACACCTTCATTTGATCCTAATCTCAGTGAATTAAGAGAAATAATGAA --Q--F--L--V--K--P--S--F--D--P--N--L--S--E--L--R--E--I--M--N--
• Exón 11 c.1705delGA p.Glu569IlefsX2 p.Q569I	c.1705delGA p.Glu569IlefsX2 p.Q569I	TAAAACAATATGAAGAAGCCAGGATGCCATTGTTAAAGAAATTGTCAATATTTCTTC --K--T--E--Y--E--E--A--Q--D--A--I--V--K--E--I--V--N--I--S--S--
• Exón 11 c.1726G>C p.Ala576Pro ★ VARIANTE NO DESCRITA HASTA LA FECHA	c.1726G>C p.Ala576Pro p.A576P	TAAAACAGAATATGAAGAAGCCAGGATGCCATTGTTAAAGAAATTGTCAATATTTCTTC --K--T--E--Y--E--E--A--Q--D--A--I--V--K--E--I--V--N--I--S--S--

Figura 9  
Mutaciones detectadas por secuenciación en el gen hMSH2.

## 7. Resultados del estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo PAM

Se encontraron mutaciones en línea germinal del gen *MUTYH* en un 15,8 por ciento, es decir, 13/82 de los pacientes. De las cuales eran mutaciones bialélicas el 8,5%, es decir, 7 / 82, con un fenotipo de poliposis atenuada. Las mutaciones monoalélica se encontraron en el 7,3% es decir, 6 / 82 de los pacientes. En portadores de la mutación monoalélica, se realizó HRM-PCR y secuenciación de todo el gen *MUTYH* en busca de otra posible alteración: se detectó otra mutación en dos casos (2/8 en los que se realizó estudio completo del gen).

		Wild type (%)	Homozygous (%)	Heterozygous (%)
Mutations founded	Y179C (exon 7)	96.4 (79/82)	1.2 (1/82)	2.4 (2/82)
	G396D (exon 13)	92.7 (76/82)	1.2 (1/82)	6.1 (5/82)
	E410GfsX43 (exon 13)	95.1 (78/82)	0.0 (0/82)	4.9 (4/82)
	R426C (exon 13)	97.6 (80/82)	0.0 (0/82)	2.4 (2/82)
	V232F (exon 9)	98.8 (81/82)	0.0 (0/82)	1.2 (1/82)
	V22M (exon 2)	98.8 (81/82)	0.0 (0/82)	1.2 (1/82)
	R354GfsX40 (exon 12)	98.8 (81/82)	0.0 (0/82)	1.2 (1/82)
Polymorphism tested	G338H (exon 12)	76.8 (63/82)	0.0 (0/82)	23.2 (19/82)

**Tabla 7**

**Prevalencia de mutaciones *MUTYH* en los 82 pacientes con múltiples adenomas (≥10), via HRM-PCR y via secuenciación.**

Las mutaciones más prevalentes Y179C (exón 7) y G396D (exón 13) [23] fueron detectadas, así como las cinco mutaciones siguientes: E410GfsX43 (exón 13), R426C (exón 13), R354GfsX40 (exón 12), V232F (exón 9) y V22M (exón 2). En relación al polimorfismo G338H (exón 12) también se analizó en la cohorte de 82

7. Resultados del estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo de PAM

sujetos y se encontró estaba presente en el 23,1%, es decir, 19/82. Las dos mutaciones *hot spots* (Y179C y G396D) representan el 61,5% de los casos mutados, es decir, 8 / 13. [29] Entre las otras mutaciones destaca E410GfsX43 (exón 13) que representa el 23,0%, 3 / 13 de los alelos mutados (Tabla 7).

	Patients with biallelic germline mutations	Number of adenomas (≥10) synchronous or metachronous	CRC	Family history	Polymorphism G338H
Patient 1	Y179C (exon 7) homozygous	Polyps synchronous Age 58	No	No	No
Patient 2	V22M (exon 2) E410GfsX43 (exon 13) double heterozygote	Polyps synchronous Age 42	No	Yes	No
Patient 3	R426C (exon 13) E410GfsX43 (exon 13) double heterozygote	Polyps synchronous	Yes Age diagnosis Astler-Coller A	Yes 50	No
Patient 4	R426C (exon 13) R354GfsX40 (exon 12) double heterozygote	Polyps metachronous Age 67	No	No	Yes
Patient 5	Y179C (exon 7) E410GfsX43 (exon 13) double heterozygote	Polyps synchronous	Yes Age diagnosis Astler-Coller B1	No 63	No
Patient 6	G396D (exon 13) V232F (exon 9) double heterozygote	Polyps synchronous Age 82	No	No	No
Patient 7	G396D (exon 13) homozygous	Polyps synchronous Age 58	No	No	No

Tabla 8

**Características fenotípicas y genotípicas de los 7 pacientes portadores de mutación germinal bialélica en el gen *MUTYH*.**

Las características fenotípicas y genotípicas en los 7 pacientes portadores de mutaciones de línea germinal bialélicas se muestran en la tabla 8, en donde se recogen las variables siguientes: tipo de mutación detectada, tipo de adenomas, historia familiar, el análisis de polimorfismo G338H no patógeno y, en el caso del cáncer colorrectal (CCR), el estadio y la edad de presentación. En nuestro estudio la mutación bialélica se asocia con ser portador de 10 ó mas pólipos sincrónicos ( $p =$

7. Resultados del estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo de PAM

0,05) y no existe una asociación entre la mutación bialélica y el cáncer colorrectal ( $p = 0,39$ ) ni con la historia familiar ( $p = 0,63$ ).

Las características fenotípicas y genotípicas en los 6 pacientes portadores de mutaciones monoalélicas en línea germinal del gen *MUTYH* muestran que la mutación monoalélica no tiene ninguna relación con ser portador de 10 ó mas pólipos sincrónicos ( $p = 0,66$ ) ni con cáncer colorrectal ( $p = 0,79$ ) y tampoco se detectó asociación entre la mutación monoalélica y la historia familiar ( $p = 0,38$ ) (tabla 9).

	<b>Patients with monolellic germline mutations</b>	<b>Number of adenomas (<math>\geq 10</math>) synchronous or metachronous</b>	<b>CRC</b>	<b>Family history</b>	<b>Polymorphism G338H</b>
<b>Patient 1</b>	Y179C (exon 7) heterozygote	Polyps synchronous Age 43	No	Yes	No
<b>Patient 2</b>	G396D (exon 13) heterozygote	Polyps metachronous Age 42	Yes Age diagnosis Astler-Coller A 40	Yes	No
<b>Patient 3</b>	R426C (exon 13) heterozygote	Polyps synchronous Age 74	No	No	No
<b>Patient 4</b>	G396D (exon 13) heterozygote ( <i>MUTYH</i> and <i>APC</i> genes are mutated) In <i>APC</i> gene L126S heterozygous	Polyps synchronous Age 51	No	Yes	Yes
<b>Patient 5</b>	G396D (exon 13) heterozygote	Polyps metachronous Age 70	No	Yes	No
<b>Patient 6</b>	E410GfsX43 (exon 13) heterozygote	Polyps metachronous Age 39	No	Yes	No

**Tabla 9**

**Características fenotípicas y genotípicas de los 6 pacientes portadores de mutación germinal monoalélica en el gen *MUTYH*.**

7. Resultados del estudio del gen MUTYH en pacientes con fenotipo de PAM

Type of adenomas		CRC		Family history In 9 cases no information was available	
		Yes	No	Yes	No
Patients with multiple ( $\geq 10$ ) polyps synchronous	Patients with multiple ( $\geq 10$ ) polyps metachronous				
31,6% 6/19	68,4% 13/19	52,6% 10/19	47,4% 9/19	26,3% 5/19	26,3% 5/19

**Tabla 10**

**Características fenotípicas y genotípicas de los 19 pacientes portadores del polimorfismo G338H (exon 12).**

En relación con los 19 portadores del polimorfismo G338H no se encontró asociación con ninguna de las siguientes variables: adenomas sincrónicos ( $p = 0,76$ ), CCR ( $p = 0,79$ ) ó la historia familiar ( $p = 0,11$ ) en este grupo seleccionado de pacientes. (Tabla 10).

Para evaluar la capacidad de distinguir entre los alelos, mediante la técnica HRM [30,31,32], los productos de PCR (en los sucesivos experimentos) se analizaron con el software (versión 1.5) y los resultados se cotejaron con los resultados de la secuenciación. [33,34,35] La primera ronda de experimentos con HRM-PCR para el exón 7 se realizó con sensibilidad de 0,3 y para el exón 13 con sensibilidad de 0,45 de modo que se distinguía entre heterodúplex, homodúplex no mutados y homodúplex mutados. Se realizaron varios experimentos sucesivos para la confirmación de resultados y para optimizar la sensibilidad más adecuada de cada

7. Resultados del estudio del gen *MUTYH* en pacientes con fenotipo de PAM

exón. Para la reproducibilidad, se repitió el procedimiento en tres días diferentes, con resultados equivalentes. No hubo falsos positivos ni negativos. En relación con el exón 7 del gen *MUTYH*, los resultados se muestran en la figura 10, las mutaciones se aprecian claramente distintas de los no mutados en la primera ronda. Las curvas de *melting* de las mutaciones heterocigota y homocigota se distinguen en el diagrama diferencial frente a los no mutados.

Similar al análisis previo, la figura 11 incluye el diagrama diferencial y las secuencias en relación al exón 13 del gen *MUTYH*. En la primera ronda de experimentos las mutaciones se distinguen claramente de los homocigotos no mutados, sin embargo R426C heterocigoto y G396C heterocigoto tienen patrones de *melting* idénticos (esta diferencia se detectó por la posterior secuenciación).

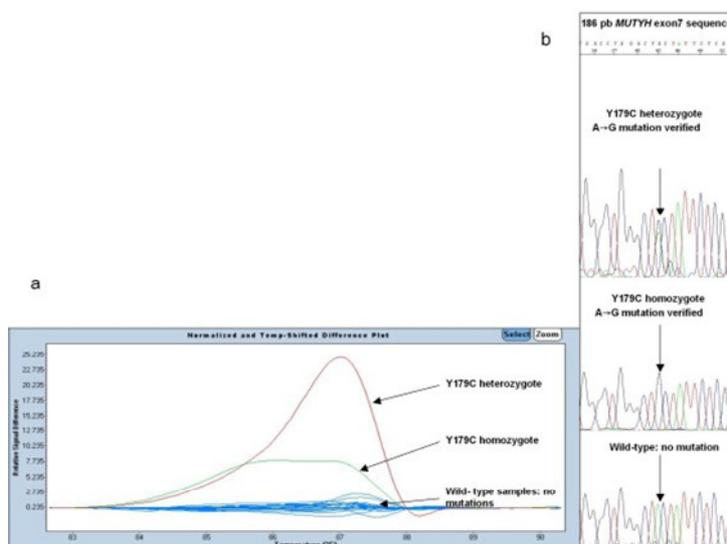


Figura 10

**Diagrama diferencial y secuencias correspondientes al exón 7 del gen *MUTYH*.** (a) Perfil de *melting* con sensibilidad 0.3. La figura muestra que las mutaciones son claramente diferenciadas frente a los controles no mutados salvajes. Las curvas de *melting* de cada mutación (rojo: Y176C heterocigoto, verde: Y179C homocigoto frente a los no mutados (azul). (b) Los electroferogramas de secuenciación muestran una mutación Y179C heterocigota, una mutación Y179C homocigota y un no mutado.

7.Resultados del estudio del gen MUTYH en pacientes con fenotipo de PAM

En la figura 12 se recogen el diagrama diferencial y las secuencias correspondientes al exón 12 del gen *MUTYH*. En todos los casos hubo concordancia entre los datos obtenidos por HRM y por secuenciación (Figuras 10,11 y 12).

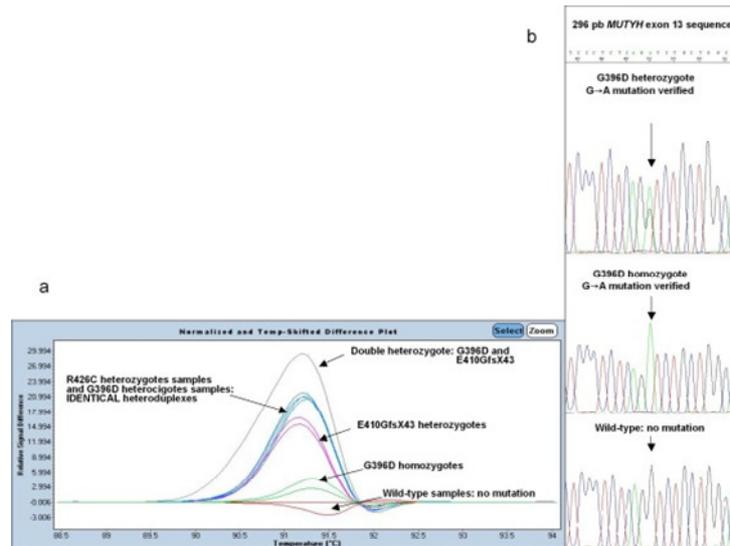


Figura 11

**Diagrama diferencial y secuencias correspondientes al exón 13 del gen *MUTYH*.** (a) Perfil de *melting* con sensibilidad 0.45. La figura muestra que las mutaciones son claramente diferenciadas frente a los controles no mutados salvajes. R426C heterocigoto y G396D heterocigoto tienen idéntico heteroduplex en *melting*. Las curvas de *melting* de cada mutación (verde: G396D homocigoto, rosa: E410GfsX43 heterocigoto, azul: R426C heterocigoto y G396D heterocigoto frente a los no mutados (rojo). (b) Los electroferogramas de secuenciación muestran una mutación G396D heterocigota, una mutación G396D homocigota y un no mutado.

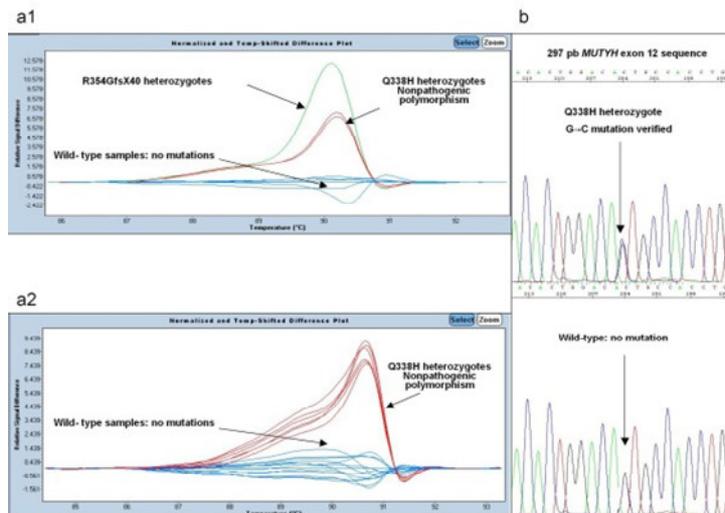


Figura 12

**Diagrama diferencial y secuencias correspondientes al exón 12 del gen *MUTYH*.** (a1) (a2) Perfil de *melting* con sensibilidad 0.3. La figura muestra que las mutaciones son claramente diferenciadas frente a los controles no mutados salvajes. Las curvas de *melting* de cada mutación (verde: R354GfsX40 heterocigotos, rojo: polimorfismo no patológico G338H heterocigoto frente a los no mutados (azul). (b) Los electroferogramas de secuenciación muestran el polimorfismo heterocigoto G338H y un no mutado.

## 8 Discusión sobre descubrimiento de 7 nuevas mutaciones en el gen *hMSH2*

En esta tesis incluimos 7 mutaciones no descritas hasta la fecha, las cuales las hemos incluido en la base de datos Insight-group.org. (Figura13)



International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours

Colon cancer gene variant databases

LOVD  
Leading Open Variation Database

Home Variants Submitters Submit Documentation

Public list of submitters Register as submitter Variant listings

LOVD - Variant listings per submitter

Mutations

Madrid, Spain  
Isabel López Villar  
Hospital 12 de Octubre Madrid Spain

Hospital 12 de Octubre  
Ctra. de Andalucía, Km 5,400  
28041-Madrid  
Spain

[Unhide all columns](#) | [Hide Specific Columns](#) | [Hide all columns](#)

9 public entries in MSH2

Path.	Exon	DNA change	DNA reported	Protein	DB-ID
+/?	01	c.1-366 del	del Ex1_2	-	MSH2_00840
+/?	01	c.1-?_366+?del	del Ex1_2	-	MSH2_00862
+/?	1-2	c.1-?_366+?del	del Ex1_2	p.Met1_Lys122del	MSH2_01334
+/?	02i	c.367-1076 del	del Ex3_6	p.Ala123_Arg359del	MSH2_00837
+/?	03_06	c.367-?_1076+?del	Submitter described this as c.367-1076 del p.Ala123_Arg359del. del A at 769	p.Ala123IlefsX29	MSH2_01336
+/?	04	c.769delA	del A at 769	p.Asn254fsX	MSH2_00838
+/?	05	c.929T>G	T>G at 929	p.Leu310Arg	MSH2_00841
+/?	09	c.1399G>T	G>T at 1399	p.Glu467X	MSH2_00839

Figura 13. Registro de 7 mutaciones no descritas hasta la fecha en el gen *hMSH2*, en la base de datos LOVD.

En el futuro próximo la detección de mutaciones, en países según distinta etnia, estará enfocado en mutaciones específicas que ocurran con alta frecuencia en la población respectiva.

La naturaleza y frecuencia de mutaciones constitucionales heredadas son objetivo sobre funcionalidad de proteínas y sobre el valor clínico potencial de fenotipo-genotipo.

La recopilación sistemática de datos del espectro de mutaciones[24], como se ha hecho al incluir estas 7 variantes, debe mejorar significativamente la eficiencia del diagnóstico molecular. De modo que dicho espectro mundial será base de la prevención eficiente y tratamiento de pacientes CCHNP.[9]

## 9 Discusión sobre el cribado mutacional HRM en el gen *MUTYH*

Encontramos mutaciones germinales del gen *MUTYH* en el 15.8 %, 13/82 pacientes con múltiples adenomas. Este porcentaje se obtiene del análisis de tres exones 7,12 y 13 en los 82 casos y el posterior análisis del gen completo en los casos en los que se detectó una mutación monoalélica. Creemos este % se vería ligeramente aumentado en el caso del análisis del gen completo en los 82 casos. [17] Sin embargo, nuestra intención era obtener información de la prevalencia de los *hot spots* en España.

La media de edad de diagnóstico de CCR en las familias estudiadas fue 57 años (en un rango de 24 a 86 años).

En contraste, los pacientes con poliposis adenomatosa familiar clásica (PAF), como está descrito en la literatura [16,17,18], muestran CCR en torno a 10 años antes que los pacientes con MAP (edad media de presentación 39 *versus* 53 respectivamente).[36]

Los síntomas en los 7 pacientes con MAP no son tan severos como en los portadores de mutación en *APC* y por tanto con PAF. Las mutaciones encontradas a lo largo del [37,38] gen *MUTYH* fueron las siguientes: los *hot spots* Y179C y G396D; así como las cinco mutaciones previamente referidas. La mayor prevalencia de mutaciones corresponde a dichos *hot spots*.

En el estudio del polimorfismo no patogénico G338H (exon 12) nuestros datos indican que no hay asociación con MAP en el grupo seleccionado de pacientes.

Mediante la discriminación individual basada en las características de las curvas de *melting*, [31] uno de los mayores retos era la discriminación entre amplicones de los distintos tipos de homoduplex. HRM es una herramienta rápida e informativa, pero en

9. *Discusión sobre el cribado mutacional HRM en el gen MUTYH*

el caso de la discriminación entre homoduplex requiere *primers* específicos y refinar la sensibilidad en el análisis post-PCR. Nosotros demostramos que esta técnica, HRM, puede ser empleada también en la detección de mutaciones en homocigosis en pacientes con PAM.

De modo que, mutaciones en homocigosis muestran un homoduplex mutado por HRM que es perfectamente discriminado frente a los homoduplex no mutados y frente a los heteroduplex mutados (Figuras 10,11y 12)

El screening por HRM de los exones 7, 12 y 13 puede ser integrado en la rutina del laboratorio, por lo que un gran número de muestras pueden ser cribadas para el estudio de las muestras de interés.

Nosotros estimamos que usando el método HRM como cribado, el número de reacciones de secuenciación necesarias para la detección de mutaciones en el gen *MUTYH* se puede reducir en algo mas del 80% lo que resulta en un ahorro sustancial del tiempo y dinero. [33] La secuenciación puede ser reducida, porque una vez optimizado HRM-PCR para este gen, sólo los patrones anómalos son secuenciados. Esto nos muestra el alto poder de resolución de HRM comparado con la secuenciación directa.[34] Además HRM se puede emplear en la detección de mutaciones desconocidas ya que el intercalante de ADN es secuencia independiente. En esta tesis refinamos las capacidades de HRM-PCR y lo aplicamos a un gen todavía no analizado por este método hasta ahora. [35,39,40]. La combinación de PCR en tiempo real y el análisis por alta resolución de la curva de *melting* supone un exitoso análisis de los exones 7,12 y 13 del gen *MUTYH* para estas mutaciones frecuentes y clínicamente importantes.. En la aplicación de esta técnica HRM para el gen *MUTYH*,

recomendamos incluir controles de homocigotos mutados (si el laboratorio dispone ó pedirlos a otro laboratorio).

## 10 Conclusiones

De acuerdo los experimentos previos encontramos en el gen *hMSH2*, 7 nuevas variantes no descritas hasta la fecha y 4 ya descritas. Las nuevas mutaciones las registramos en la base de datos LOVD (Leiden Open Variation Database): [www.insight-group.org](http://www.insight-group.org) (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours). Es cada vez más necesaria la recopilación sistemática del espectro de nuevas mutaciones en pacientes con CCHNP. Esta información mejorará la eficiencia del diagnóstico molecular.

En relación al cribado mutacional, describimos un método HRM, para detectar mutaciones en homocigosis y heterocigosis en el gen *MUTYH* en muestras seleccionadas de pacientes con fenotipo de PAM. Debido a que las decisiones clínicas se basarán cada vez más en la medicina molecular, los métodos para identificar mutaciones germinales deben ser continuamente evaluados y mejorados.



## 11 Bibliografia

1. Filipe B, Baltazar C, Albuquerque C, Fragoso S, Lage P, Vitoriano I, Mão de Ferro S, Claro I, Rodrigues P, Fidalgo P, Chaves P, Cravo M, Nobre Leitão C. APC or MUTYH mutations account for the majority of clinically well-characterized families with FAP and AFAP phenotype and patients with more than 30 adenomas. *Clin Genet.* 2009;**76**:242–55.
2. Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, French AJ, Laurie JA, Goldberg RM, Thibodeau SN, Witzig TE. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology.* 2006;**131**:729–37.
3. Marcowitz S, Bertagnolli M. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2009; **361(25)**:2449-60.
4. Payá A, Alenda C, Jover R, Aranda FI. Mismatch-repair deficiency colorrectal carcinoma. Identification keys and clinical relevance. *Rev Esp Patol.*2006; **39(4)**: 201-08.
5. Sheng JQ, Fu L, Sun ZQ, Huang JS, Han M, Mu H, Zhang H, Zhang YZ, Zhang MZ, Li AQ, Wu ZT, Han Y, Li SR. Mismatch repair gene mutations in Chinese HPNCC patients. *Cytogenet Genome Res.*2008; **122**:22-27.
6. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Stomaa K, Prior TW, Westran J, Panescu J, Fix D, Lockman J, Corneras I, De la Chapelle A. Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). *N Engl J Med.* 2005; **352**:1851-60. 67
7. Kurzawski G, Suchy J, Lener M, Kłujczo-Grabowska E, Kładny J, Safranow K, Jakubowska K, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Debniak T, Cybulski C, Gronwald J, Oszurek O, Oszutowska D, Kowalska E, Gózdź S, Niepsuj S, Słomski R, Pławski A, Łacka-Wojciechowska A, Rozmiarek A, Fiszer-Maliszewska Ł, Bebenek M, Sorokin D, Sasiadek MM, Stembalska A, Grzebieniak Z, Kilar E, Stawicka M, Godlewski D, Richter P, Brozek I, Wysocka B, Limon J, Jawień A, Banaszkiwicz Z, Janiszewska H, Kowalczyk J, Czudowska D, Scott RJ, Lubiński. Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum including large rearrangements in HPNCC families from Poland (update study). *J. Clin Genet.* 2006; **69(1)**:40-7.
8. Rusu C, Sireteanu A, Puiu M, Skrypnyk C, Tomescu E, Csep K, Creț V, Barbarii L. [MLPA technique--principles and use in practice]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2007;**111(4)**:1001-4.
9. Nielsen M, Morreau H, Vasen HF, Hes FJ. MUTYH-associated polyposis (MAP). *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011;**79(1)**:1-16.
10. Mastrocola AS, Heinen CD. Lynch syndrome-associated mutations in MSH2 alter DNA repair and checkpoint response functions in vivo. *Hum Mutat.*2010; **31(10)**:1699-708.

11. Kosinski J, Hinrichsen I, Bujnicki JM, Friedhoff P, Plotz G. Identification of Lynch syndrome mutations in the MLH1-PMS2 interface that disturb dimerization and mismatch repair. *Hum Mutat.* 2010; **31(8)**:975-82.
12. Drescher KM, Sharma P, Lynch HT. Current hypotheses on how microsatellite instability leads to enhanced survival of Lynch Syndrome patients. *Clin Dev Immunol.* 2010;170432.
13. Boland CR, Shike M. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;**138(7)**:2197.
14. Menéndez M, Castellví-Bel S, Pineda M, de Cid R, Muñoz J, González S, Teulé A, Balaguer F, Ramón y Cajal T, Reñé JM, Blanco I, Castells A, Capellà G. Founder effect of a pathogenic MSH2 mutation identified in Spanish families with Lynch syndrome. *Clin Genet.* 2010;**78(2)**:186-90.
15. Castells A, Castellví-Bel S, Balaguer F. Concepts in familial colorectal cancer: where do we stand and what is the future?. *Gastroenterology.* 2009;**137(2)**:404-9. Epub 2009 Jun 21.
16. Giráldez MD, Balaguer F, Caldés T, Sanchez-de-Abajo A, Gómez-Fernández N, Ruiz-Ponte C, Muñoz J, Garre P, Gonzalo V, Moreira L, Ocaña T, Clofent J, Carracedo A, Andreu M, Jover R, Llor X, Castells A, Castellví-Bel S. Association of MUTYH and MSH6 germline mutations in colorectal cancer patients. *Fam Cancer.* 2009;**8(4)**:525-31.
17. Lynch HT, Lanspa SJ. Colorectal cancer survival advantage in MUTYH-associated polyposis and Lynch syndrome families. *J Natl Cancer Inst.* 2010;**102(22)**:1687-9.
18. Tricarico R, Crucianelli F, Alvau A, Orlando C, Sestini R, Tonelli F, Valanzano R, Genuardi M. High resolution melting analysis for a rapid identification of heterozygous and homozygous sequence changes in the MUTYH gene. *BMC Cancer.* 2011 21;**11**:305.
19. Lubbe SJ, Di Bernardo MC, Chandler IP, Houlston RS. Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with MUTYH mutation. *J Clin Onco.* 2009;**24**:3975–80.
20. Fuster O, Barragán E, Bolufer P, Cervera J, Larráyoiz MJ, Jiménez-Velasco A, Martínez-López J, Valencia A, Moscardó F, Sanz MA. Rapid detection of KIT mutations in core-binding factor acute myeloid leukaemia using high-resolution melting analysis. *J Mol Diagn.* 2009;**5**:458–63.
21. Sampson JR, Jones N. MUTYH-associated polyposis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2009;**23**:209–18.
22. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat.* 2009;**30**:857–59.

23. Whitehall V, Tran K, Umopathy A, Grieu F, Hewitt C, Evans TJ, Ismail T, Li WQ, Collins P, Ravetto P, Leggett B, Salto-Tellez M, Soong R, Fox S, Scott RJ, Dobrovic A, Iacopetta B. A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting. *J Mol Diagn*. 2009;**11**:543–52.
24. Gómez-Fernández N, Castellví-Bel S, Fernández-Rozadilla C, Balaguer F, Muñoz J, Madrigal I, Milà M, Graña B, Vega A, Castells A, Carracedo A, Ruiz-Ponte C. Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations. *BMC Med Genet*. 2009;**10**:57–68.
25. Taylor CF. Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochem Soc Tran*. 2009;**37**:433–7.
26. Tao H, Shinmura K, Suzuki M, Kono S, Mibu R, Tanaka M, Kakeji Y, Maehara Y, Okamura T, Ikejiri K, Futami K, Yasunami Y, Maekawa T, Takenaka K, Ichimiya H, Imaizumi N, Sugimura H. Association between genetic polymorphisms of the base excision repair gene MUTYH and increased colorectal cancer risk in a Japanese population. *Cancer Sci*. 2008;**99**:355–60.
27. Isidro G, Laranjeira F, Pires A, Leite J, Regateiro F, Castro e Sousa F, Soares J, Castro C, Giria J, Brito MJ, Medeira A, Teixeira R, Morna H, Gaspar I, Marinho C, Jorge R, Brehm A, Ramos JS, Boavida MG. Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum Mutat*. 2004;**24**:353.
28. Pino MS, Chung DC. The chromosomal onstability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;**138**(6):2059-72.
29. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; **144**(5):646-74.
30. Thodi G, Fostira F, Sandaltzopoulos R, Nasioulas G, Grivas A, Boukovinas I, Mylonaki M, Panopoulos C, Magic MB, Fountzilias G, Yannoukakos D. Screening of the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2 and MSH6 in a Greek cohort of Lynch syndrome suspected families. *BMC Cancer*. 2010; **10**:544.
31. Ma ES, Wong CL, Law FB, Chan WK, Siu D. Detection of KRAS mutations in colorectal cancer by high resolution melting analysis. *J Clin Pathol*. 2009;**10**:886–91.
32. Bouguen G, Manfredi S, Blayau M, Dugast C, Buecher B, Bonneau D, Siproudhis L, David V, Bretagne JF. Colorectal adenomatous polyposis Associated with MYH mutations: genotype and phenotype characteristics. *Dis Colon Rectum*. 2007;**50**:1612–7.
33. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;**100**(1): 57-70.
34. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010; **138**(6):2073-87.

35. Jenkins MA, Croitoru ME, Monga N, Cleary SP, Cotterchio M, Hopper JL, Gallinger S. Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;**15**:312–14.
36. Doi Y. High-resolution melting analysis for a reliable and two-step scanning of mutations in the tyrosine kinase domain of the chimerical bcr-abl gene. *Int J Hematol.* 2009;**90**:37–43.
37. Yanaru-Fujisawa R, Matsumoto T, Ushijima Y, Esaki M, Hirahashi M, Gushima M, Yao T, Nakabeppu Y, Iida M. Genomic and functional analyses of MUTYH in Japanese patients with adenomatous polyposis. *Clin Genet.* 2008;**73**:545–53.
38. Oka S, Nakabeppu Y. DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis. *Cancer Sci.* 2011; **102(4)**:677-82.
39. Heideman DA. A panel of high resolution melting (HRM) technology-based assays with direct sequencing possibility for effective mutation screening of EGFR and K-ras genes. *Cell Oncol.* 2009;**31**:329–33.
40. Jiménez Ide J, Esteban Cardeñosa E, Palanca Suela S, González EB, Bolufer Gilabert P. Advantages of the high resolution melting in the detection of BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Clin Biochem.* 2009;**42**:1572–6.

## 12 Anexo

a. Publicación derivada de esta tesis:

Simplifying the detection of *MUTYH* mutations by high resolution melting analysis

Research article

*BMC Cancer* 2010, 10:408 (Pub Med indexed for MEDLINE Impact Factor 2.74)

b. Publicación derivada de esta tesis:

Seven novel mutations of the *hMSH2* gene in hereditary non-polyposis colorectal cancers (HNPCC)

En tramitación

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Simplifying the detection of *MUTYH* mutations by high resolution melting analysis

Isabel López-Villar<sup>1\*</sup>, Rosa Ayala<sup>1</sup>, Jan Wesselink<sup>2</sup>, Juan Diego Morillas<sup>3</sup>, Elena López<sup>4</sup>, José Carlos Marín<sup>3</sup>, José Díaz-Tasende<sup>3</sup>, Sara González<sup>5</sup>, Luis Robles<sup>6</sup>, Joaquín Martínez-López<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** *MUTYH*-associated polyposis (MAP) is a disorder caused by bi-allelic germline *MUTYH* mutation, characterized by multiple colorectal adenomas. In order to identify mutations in *MUTYH* gene we applied High Resolution Melting (HRM) genotyping. HRM analysis is extensively employed as a scanning method for the detection of heterozygous mutations. Therefore, we applied HRM to show effectiveness in detecting homozygous mutations for these clinically important and frequent patients.

**Methods:** In this study, we analyzed phenotype and genotype data from 82 patients, with multiple ( $\geq 10$ ) synchronous (19/82) or metachronous (63/82) adenomas and negative *APC* study (except one case). Analysis was performed by HRM-PCR and direct sequencing, in order to identify mutations in *MUTYH* exons 7, 12 and 13, where the most prevalent mutations are located. In monoallelic mutation carriers, we evaluated entire *MUTYH* gene in search of another possible alteration. HRM-PCR was performed with strict conditions in several rounds: the first one to discriminate the heteroduplex patterns and homoduplex patterns and the next ones, in order to refine and confirm parameters. The genotypes obtained were correlated to phenotypic features (number of adenomas (synchronous or metachronous), colorectal cancer (CRC) and family history).

**Results:** *MUTYH* germline mutations were found in 15.8% (13/82) of patients. The hot spots, Y179C (exon 7) and G396D (exon 13), were readily identified and other mutations were also detected. Each mutation had a reproducible melting profile by HRM, both heterozygous mutations and homozygous mutations. In our study of 82 patients, biallelic mutation is associated with being a carrier of  $\geq 10$  synchronous polyps ( $p = 0.05$ ) and there is no association between biallelic mutation and CRC ( $p = 0.39$ ) nor family history ( $p = 0.63$ ). G338H non-pathogenic polymorphism (exon 12) was found in 23.1% (19/82) of patients. In all cases there was concordance between HRM (first and subsequent rounds) and sequencing data.

**Conclusions:** Here, we describe a screening method, HRM, for the detection of both heterozygous and homozygous mutations in the gene encoding *MUTYH* in selected samples of patients with phenotype of MAP. We refine the capabilities of HRM-PCR and apply it to a gene not yet analyzed by this tool. As clinical decisions will increasingly rely on molecular medicine, the power of identifying germline mutations must be continuously evaluated and improved.

## Background

MAP is a disorder caused by bi-allelic germline *MUTYH* mutations, characterized by multiple colorectal adenomas. Mutations are distributed over the *MUTYH* locus, most of the changes found are missense mutations, of which Y179C and G396D, located in *MUTYH* exons

7 and 13 respectively, pose approximately 73% of mutations found in western populations [1,2]. Analysis of 82 selected patients was performed by HRM-PCR and direct sequencing, in order to identify mutations in *MUTYH* exons 7, 12 and 13. We also analyzed the prevalence of a non-pathogenic polymorphism, located in exon 12: G338H [3]. We evaluated the ability of HRM [2] for genotype at specific positions and also unknown mutations. HRM has become an alternative for screening for molecular diagnosis. In normal application

\* Correspondence: isabellv2004@yahoo.es

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, 12 De Octubre University Hospital, Madrid, E-28041, Spain

Full list of author information is available at the end of the article