

## TÍTULO

**“Determinación de la pérdida de heterocigosidad en cáncer colorrectal esporádico mediante análisis de repeticiones de dinucleótidos.”**

**“Lost of heterocigosity determination in sporadic colorrectal cancer by dinucleotide repeat analysis ”**

## AUTORES

Díaz-Flores Estévez F<sup>1</sup>., González-Aguilera J.J<sup>2</sup>., Medina Arana V<sup>3</sup>., Hernández Calzadilla C<sup>4</sup>.

1. Sección de Diagnóstico Molecular. Laboratorio Central. Hospital Universitario de Canarias.
2. Unidad de Genética. Universidad Autónoma de Madrid.
3. Departamento de Cirugía. Hospital Universitario de Canarias.

### La correspondencia se dirigirá a:

Felicitas Díaz-Flores Estévez  
Laboratorio Central. Hospital Universitario de Canarias.  
Ofra s/n. La Laguna. CP 38320  
Santa cruz de Tenerife  
TF: 922 678656  
Fax: 922 651757  
E-mail: [felicitas@comtf.es](mailto:felicitas@comtf.es)

Nota: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto FIS 96/0453, en el cual C. H. C. es coinvestigador.

## RESUMEN

En el desarrollo del cáncer colorrectal están implicados numerosos genes. Los estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH) constituyen el método más ampliamente usado, desde el punto de vista molecular, para determinar la pérdida de material genético.

El uso del análisis de las repeticiones de dinucleótidos (CA)<sub>n</sub> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y tinción con plata, proporciona una serie de ventajas, como el elevado polimorfismo, la posibilidad de su uso, tanto para tejido fresco como parafinado, resultados en menos de 48 horas y obvia el empleo de isótopos radioactivos.

Con el fin de valorar el uso de las repeticiones de dinucleótidos en el estudio de la Pérdida de Heterocigosidad (LOH), se emplearon tres marcadores diferentes, el

D2S123 (2p16), Mfd27 (5q11.2-13.3) y el TP53 (17p13.1) en 18 pacientes afectados de cáncer de colon esporádico.

Se probaron diferentes condiciones de PCR, distintos sistemas electroforéticos y de tinción, así como un programa de análisis densitométrico para aminorar las dificultades en la interpretación de los resultados producida por las bandas "stutter".

Siete de los 18 pacientes estudiados presentaron pérdida de heterocigosidad para al menos uno de los marcadores estudiados (38,8%). La proporción según marcadores fue de 7,14 % utilizando el marcador D2S123, 30,7% con el Mfd27 y 33,3 % con el TP53. Se detectó una tendencia a la localización en el lado derecho del colon en los pacientes que presentaron pérdida de heterocigosidad frente al grupo de los que no lo hicieron.

### **Palabras clave.**

Pérdida de Heterozigosidad (LOH), Repeticiones de dinucleótidos (CA)<sub>n</sub>, PCR, Cáncer, Análisis densitométrico.

### **SUMMARY**

Colorectal cancer development, involve a variety of genes with different implications. Allelotypic detection of loss of heterozygosity (LOH) analysis using the microsatellites, as a tool, is the method, under a molecular point of view, more widely used to study lost of genetic material.

The analysis of short tandem repeat as (CA)<sub>n</sub>, by PCR, electrophoresis and silver staining shows some advantages: high polymorphism, possibility of using fresh or paraffin wax-embedded tissue, non radioactive material and results in less than 48 hours.

To evaluate the (CA)<sub>n</sub> analysis in asses LOH, three different markers were used, D2S123 (2p16), Mfd27 (5q11.2-13.3) and TP53 (17p13.1) in 18 affected patients with sporadic colorectal carcinoma (CCR). Different PCR conditions, electrophoretic separation and staining were carry out and a densitometric analysis program to facilitate the interpretation of the results due to presence of stutter bands.

In our series the proportion of LOH at D2S123 marker was 7.14%, at Mfd27 30.7 and at TP53 38.88%. There was a marked preponderance of right side localization in LOH patients. Clinicopathological features and LOH comparison suggest that these alterations were predominantly a characteristic of proximal tumor.

### **Keywords:**

Lost of heterozygosity (LOH), Dinucleotides repeat (CA)<sub>n</sub>, PCR, Cancer, Densitometric analysis.

## INTRODUCCION

La inactivación de un gen supresor tumoral, tanto por mutación, delección o pérdida se ha demostrado como crucial en la génesis de una gran variedad de tumores malignos, por ello la búsqueda de patrones característicos de pérdida cromosómica constituye un objetivo en el estudio tumoral.

El desarrollo de un cáncer colorrectal (CCR), es un proceso multiestadio que implica numerosos oncogenes y genes supresores de tumor (1). Se ha demostrado que existen gran variedad de genes involucrados en su origen y progresión, tanto genes supresores como el APC y el MCC (localizados en el cromosoma 5), DCC (en el 18) y P53 (en el 17), como algunos oncogenes, K-ras, N-ras y c-Mic (2). Además algún tipo de CCR (Cáncer colorrectal hereditario no polipósico, HPNCC), está correlacionado etiológicamente con los genes encargados de la reparación durante la replicación, especialmente el hMSH<sub>2</sub> (2).

Entre un 20 y un 40% de los casos de CCR, presentan pérdida alélica para el gen APC (5q21), en los adenomas la cifra es del 25%, lo cual apunta a esta alteración como un hecho temprano en el desarrollo del CCR (1,2,3).

Pérdidas de material genético en 17p se han descrito en aproximadamente un 75% de los CCR (2). En la región con mayor tasa de pérdida alélica se ha localizado el gen TP53, que codifica la proteína p53. En un 50% de los CCR se detectan mutaciones sin sentido en una zona altamente conservada de la proteína. Estas mutaciones son infrecuentes en adenomas, sugiriendo que alteraciones en estos genes son un evento tardío en el desarrollo del carcinoma colorrectal.

El método más ampliamente empleado, desde el punto de vista molecular, para determinar pérdida del material genético lo constituyen los estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH) (4,5,6). Estos estudios se basan en la detección de diferencias entre los alelos normales, maternos y paternos, en el DNA constitucional con sus homónimos en tejido tumoral. Si un locus cromosómico se ha perdido en un tumor, uno de los alelos normales estará ausente en DNA tumoral, cuando lo comparamos con DNA constitucional (7,8).

La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite el empleo de nuevos sistemas polimórficos útiles para distinguir alelos maternos y paternos. Uno de estos sistemas se basa en un número variable de secuencias de dinucleótidos, tales como (CA)<sub>n</sub> donde 'n' puede oscilar entre 10 y 60 copias, que se repiten en tandem a lo largo del genoma (Microsatélites). Se estima que existen aproximadamente 50.000 a 100.000 sitios de repetición. Las variaciones de las repeticiones CA se pueden identificar fácilmente y ser usadas para análisis de ligamiento (5).

La variabilidad en el tamaño, proporciona a estas sondas un gran polimorfismo e informatividad. Las diferencias en el número de repeticiones de dinucleótidos en tandem entre los alelos maternos y paternos se pueden detectar, tras amplificación con cebadores específicos, en geles de poliacrilamida. Empleamos esta técnica en los estudios de pérdida de heterocigosidad, poniendo de manifiesto la posible ausencia de uno de los alelos en tejido tumoral. Además estos análisis, tienen la ventaja de poderse realizar en piezas de pequeño tamaño o parafinadas.

Un problema intrínseco al uso de repeticiones de dinucleótidos son los fallos de la Taq polimerasa en su lectura sobre las zonas de repetición, generando pequeños

fragmentos que dificultan la interpretación de los resultados, denominados bandas “stutter” (3,8,9).

El análisis densitométrico de las bandas usando el programa de análisis de imagen UTHSCSA (desarrollado en el Health Science Center de la Universidad de Texas, San Antonio) permite establecer la relación entre las distintas densidades de los productos alélicos, objetivando el estudio (8).

Con el fin de valorar el uso de las repeticiones de dinucleótidos utilizamos tres marcadores de microsátélites, D2S123 (2p16), cercano a hMSH<sub>2</sub>, Mfd27 (5q11.2-13.3), cercano a APC y MCC, y TP53 (17p13.1), en el estudio de la LOH, en 18 pacientes afectos de carcinoma colorrectal esporádico.

En todos los casos se compararon los resultados moleculares obtenidos con las variables clínico-anatomopatológicas, edad, sexo, antecedentes personales y familiares de la enfermedad, localización del tumor en el colon, estadio anatomopatológico y existencia de metástasis en el momento del diagnóstico.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Muestras**

Se analizaron un total de 18 muestras frescas procedentes de carcinomas colorrectales, extraídos durante cirugía. También se obtuvo tejido fresco normal de los mismos pacientes, lo más lejano a la zona tumoral posible. Se congelaron ambos tejidos en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

Estimamos visualmente, antes de la extracción del DNA, la posible contaminación de tejido tumoral por tejido normal (tendencia habitual en muchos tumores especialmente los colorrectales). En ningún caso fue superior al 50%.

### **Extracción del DNA**

La extracción de DNA de tejido se realizó mediante el método descrito por Blin y Stafford (10).

Se pulveriza el tejido añadiéndole 5 mL de tampón de extracción de DNA (Tris HCl (Merck, Darmstadt Alemania) 10 mM, EDTA (Merck, Darmstadt Alemania) 100 mM, RNAasa libre de DNAasa (Boëhringer Mannheim, Alemania) 20 µg/mL, 0.5 % SDS (Merck, Darmstadt Alemania)). Tras una hora a 37 °C se añade proteinasa K (Boëhringer Mannheim, Alemania) a una concentración de 100 µg/mL y se incuba el lisado celular a 50 °C durante tres horas como mínimo. Se procede posteriormente a la extracción fenólica con fenol-cloroformo-isoamílico (Merck, Darmstadt Alemania) (25:24:1) dos veces y con cloroformo-isoamílico (Merck, Darmstadt Alemania) (24:1) una vez. Tras precipitación con etanol (Merck, Darmstadt Alemania), el DNA se secó y resuspendió en agua.

El DNA se cuantificó a 260 nm en un espectrofotómetro Lambda II UV/VIS de Perkin-Elmer, Connecticut USA.

### **Cebadores**

Se usaron tres marcadores, D2S123 (2p16), Mfd27 (5q11.2-13.3) y TP53 (17p13.1). Las secuencias de los cebadores (TABLA I) fueron recogidas de los trabajos

de Gyapay y cols 1994, Weissenbach y cols 1992, Webber y cols 1992 y Jones y cols 1992 (11,12,13,14).

Fueron sintetizados en un PCR-Mate Model 391 DNA Synthesizer de Applied Biosystems, Connecticut USA.

## **PCR**

Las secuencias de DNA diana fueron amplificadas por PCR en una reacción a un volumen final de 25  $\mu$ L para los tres marcadores.

En el caso de D2S123 y Mfd27, se utilizaron concentraciones de 1  $\mu$ M de cada cebador, dos unidades de Taq polimerasa (Promega),  $CL_2Mg$  (Promega) 2,5 mM, dNTP (Boehringer Mannheim, Alemania) a 200  $\mu$ M y 200 ng de la muestra de DNA. Para el marcador TP53 las condiciones fueron las mismas salvo la cantidad de muestra que fue de 300 ng. La mezcla de la reacción se cubrió con aceite mineral.

La amplificación se realizó en un termociclador DNA Thermal Cycler de Perkin-Elmer modelo 480. Las condiciones de la reacción para los tres marcadores fueron: para D2S123, 30 segundos a 94 °C, 2 minutos a 55 °C y 15 segundos a 72°C, todo durante 27 ciclos; para Mfd27, un ciclo a 94 °C durante 10 minutos seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 50 segundos y 58 °C 40 segundos; Por último TP53, 27 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 65 °C durante 2 minutos y 72 °C 15 segundos.

## **Electroforesis**

Los productos de amplificación por PCR se analizaron mediante electroforesis horizontal y vertical en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 8 % según el método descrito por Sambrook (15).

Los tamaños de los productos alélicos para cada marcador oscilan entre 227-197 bp para D2S123, 135-103 bp para TP53 y 155-133 bp para Mfd27.

Los geles fueron teñidos posteriormente con bromuro de etidio y con nitrato de plata según método Pharmacia (16) y fotografiados (en el caso del bromuro) o registrados por densitometría y conservados (en el caso de la plata) con posterioridad.

## **Criterios de Pérdida de heterocigosidad**

El carácter de homocigosidad de la muestra fue determinado a priori por la presencia de una sola banda en la electroforesis o un solo pico en el análisis densitométrico tanto en tejido normal como tumoral.

El DNA de las muestras normales fue usado como ayuda para el correcto apareamiento alélico, siendo comparado con posterioridad con su correspondiente tejido tumoral. La ausencia o disminución de intensidad de al menos un 50% de un alelo en tejido tumoral al compararlo con su homónimo en tejido normal fue considerado como LOH. (FIGURA I)

## **Análisis densitométrico**

Se usó un programa de análisis de imagen para el estudio densitométrico, UTHSCSA Image Tool (University of Texas Health Science Center, San Antonio), de los productos de amplificación obtenidos. Se barrieron cuatro zonas distintas de cada banda, obteniendo resultados en términos de altura de pico para cada una de ellas. La media de las alturas para el alelo correspondiente a tejido tumoral se comparó con su homónimo en tejido normal. (FIGURA II)

### **Cálculo del Cociente Alélico.**

El cociente alélico se calculó para cada muestra tanto de tejido normal como de tejido tumoral y se calculó posteriormente el cociente tumoral, dividiendo el cociente del tumor por el cociente de la mucosa normal:  $T1:T2 / N1:N2$ , donde T1 y N1 son los valores de altura de pico para los productos alélicos de mayor peso molecular en tumor y mucosa sana respectivamente y T2 y N2 los de menor peso molecular.

En los casos en que el cociente tumoral calculado con esta fórmula fue superior a 1, se convirtió usando  $1 / (T1:T2 : N1/N2)$ , con el fin de dar siempre un resultado en el intervalo 0.00-1.00 (3,17).

Antes de empezar el estudio establecimos que aquellos cocientes  $\leq 0.50$  serían indicativos de pérdida alélica basándonos en el hecho de que como en el peor de los casos la contaminación en tejido tumoral por tejido normal fue del 50 %, en estos casos una pérdida alélica total daría un cociente de 0.50.

### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico fue realizado mediante tablas de contingencia, determinando en cada caso la  $\chi^2$ ,  $\chi^2$  con corrección de Yates y el test exacto de Fisher.

## **RESULTADOS**

De los 18 cánceres de colon estudiados el porcentaje de muestras informativas (entendemos por muestras no informativas aquellas que presentaron una sola banda en la electroforesis y un solo pico en el análisis densitométrico, tanto en tejido normal como en tumoral) fue de 77.77% para el marcador D2S123, de 81.25% para Mfd27 y del 100% para TP53.

Se obtuvo información a cerca de pérdida alélica en la región 2p16, en un 7.14% de los casos informativos, en la región 5q11.2-q13.3, en un 30.70% y en la región 17p13.1 en un 33.33%.

Se detectó concurrencia de pérdida alélica para las regiones 2p16 y 17p13.1 en un caso y para las regiones 5q11.2q13.3 y 17p13.1 en tres casos. No se presentó pérdida alélica simultáneamente en las tres regiones estudiadas.

De los 18 pacientes estudiados, siete presentaron pérdida de heterocigosidad en al menos uno de los marcadores empleados (grupo LOH), en 4 de estos casos se presentó pérdida alélica en más de un marcador.

Las diferencias en cuanto a las variables anatómo-clínicas estudiadas, en los grupos LOH y no LOH están recogidas en la tabla II.

El análisis estadístico conjunto de los parámetros anatómo-clínicos estudiados no muestra diferencias significativas entre ambos grupos (LOH y no LOH) ( $p=0.1017$ ). El estudio de cada parámetro independientemente confirma este hecho, (media de edad,  $p=0.906$ ; antecedentes personales,  $p=0.384$ ; estadio anatomopatológico (Dukes),  $p=1$ ; metástasis en el momento del diagnóstico,  $p=1$ ), sin embargo en el grupo de pacientes que presentaron pérdida de heterocigosidad para alguno de los marcadores estudiados, existe una marcada tendencia a la localización en el lado derecho del colon.

Todos los resultados se confirmaron tras el análisis densitométrico.

## DISCUSION

Existe una tendencia, especialmente en los tumores colorrectales, a contener una proporción variable de células no malignas. En nuestra serie, así como en las de otros autores consultados (3,18), siempre fue inferior al 50% (entre un 20 y 40%). Esta fracción de células normales es realmente útil por el hecho de que los alelos normales presentes en el DNA constitucional son también evidentes en el DNA tumoral y permite el correcto apareamiento entre DNA normal y tumoral y nos indica presencia de nuevos alelos o la ausencia (LOH) de un alelo.

La consideración de esta posible "contaminación" es también tenida en cuenta, al inicio del estudio, por los diferentes autores consultados (3,8,9). Cawkwell (18), no sólo intenta diseccionar única y lo más finamente posible la zona tumoral sino que además hace una tinción con hematoxilina eosina para estimar a priori el número de células malignas presentes.

Por otra parte también podemos hablar de contaminación de la mucosa sana reseca con células tumorales, lo cual intentamos obviar realizando la resección lo más lejos posible del tumor. Además contamos también con DNA de la sangre del paciente como segunda alternativa de tejido sano.

Al usar tres marcadores situados en tres cromosomas diferentes tenemos un abanico más amplio de lo que ocurre a nivel genómico, a mayor número de microsatélites usados y lo más separados posible la información obtenida será mayor.

Los tres cebadores empleados flanquean zonas de repetición de dinucleótidos con un tamaño de  $20 \pm 2$  bp y con un porcentaje de dinucleótidos GC entre 30 y 35% tal y como recomiendan los trabajos de Litt (19).

La tinción con plata para visualizar los productos de amplificación ofrece mayor sensibilidad y posibilidad en el estudio cualitativo de las bandas alélicas, aunque también presenta diversos inconvenientes como presencia de fondo variable y disposición no lineal de la plata.

Una fuente de complejidad radica en que la intensidad de los dos alelos constitucionales puede ser diferente, lo cual es común en los estudios de repeticiones CA y en otros sistemas polimórficos basados en PCR, y probablemente representa una amplificación preferencial de uno de uno de los alelos constitucionales. El cociente de los valores densitométricos de ambos alelos en mucosa normal forma parte de la fórmula aplicada por el programa de análisis de imagen con el fin de corregir este hecho.

Otra fuente de confusión es la presencia de bandas débiles en el lugar de la posible pérdida alélica, lo cual normalmente representa, tal y como reseñamos, presencia variable de pequeñas cantidades de genotipo constitucional procedente de células endoteliales o inflamatorias en el tumor. También se ha relacionado la presencia de estas bandas débiles a la existencia dentro del tumor de subclones que todavía tienen ambas copias del alelo hipotéticamente perdido.

Al registro de los geles teñidos con plata hemos acoplado un método densitométrico, el cual nos permite de manera objetiva calcular la altura de pico correspondiente a cada uno de los productos y la comparación entre tejido constitucional y tumoral. Es un método rápido y proporciona un tamaño bastante exacto del alelo, que permite detectar y analizar las repeticiones CA, haciendo más fácil su identificación y posterior cuantificación entre las bandas "stutter" no específicas.

El uso de PCR y microsatélites proporciona numerosas ventajas como un elevado polimorfismo, el uso tanto de tejido fresco como parafinado y resultados en menos de 48 horas. Por otra parte, podemos obviar el uso de isótopos radioactivos, tiñendo con plata.

Consideramos como pérdida de heterocigocidad la pérdida total o por lo menos de un 50% de un alelo en el tejido tumoral en comparación con el constitucional. Este criterio es muy restrictivo con respecto a aquellos descrito por otros autores (3,20,21,22). A pesar de esto, encontramos una proporción de casos de LOH para los marcadores D2S123 de 7,14% para Mfd27 de 30,7% y para TP53 de 38,8%, similar a los datos publicados por otros autores (3,17,18,21). Estos autores muestran que no hay deleciones en el locus D2S123 en los pacientes con (HPNCC) y la proporción es mínima en los pacientes con carcinoma colorrectal esporádico, dato concordante con la baja proporción encontrada en nuestros casos. Alteraciones en el gen supresor de tumores P53, hecho tardío en la tumorigénesis, se encontraron en algunos estudios (25), en aproximadamente la misma proporción en los tumores colorectales esporádicos y familiares. En el gen APC Powell (26) y Altoonon (27) describen una proporción de mutaciones similar tanto en el cáncer colorrectal esporádico como en el familiar.

Los resultados de la pérdida alélica por análisis densitométrico revelan una distribución en tres zonas(figura). La primera, con cocientes entre 0.0 y 0.49 representa a los tumores con pérdida alélica, la tercera entre 0.6 y 0.99 representa a aquellos sin pérdida alélica, en ambos casos el análisis densitométrico confirmó el diagnóstico de LOH. En la zona central, cocientes entre 0.49 y 0.6 (aquellos tumores en que el análisis visual fue difícil) el análisis densitométrico constituyó una ayuda importante en el diagnóstico.

Si se analizan independientemente las variables edad, historia clínica personal, estado anatomopatológico y metástasis el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre el grupo con LOH y el grupo sin LOH. Estos datos muestran que en el cáncer colorrectal esporádico la pérdida de heterocigocidad en estos marcadores no se pueden utilizar como indicador pronóstico de la agresividad del tumor.

En nuestra serie, Las alteraciones de LOH fueron una característica predominante de los tumores proximales, encontrándose una tendencia a la asociación entre pérdida alélica y localización del tumor en el lado derecho del colon.

Podríamos concluir que la técnica empleada, amplificación de repeticiones de dinucleótidos por PCR y posterior tinción de los geles con plata, es adecuada para el estudio de la LOH en pacientes afectos de diferentes neoplasias, pues reúne características que la hacen idónea como, alto grado de polimorfismo, elevada sensibilidad, fácil y rápida ejecución.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N. Engl. J. Med 1988; 319: 525-32.
2. González-Aguilera JJ, Fernández Peralta AM, Moreno Azcoita M. La genética del cáncer colorrectal (I). Síndromes polipósicos. Cirugía Española 1996; 60: 213-21.

3. Cawkwell L, Bell SM, Lewis FA, Dixon MF, Taylor GR, Quirke P. Rapid detection of allele loss in colorectal tumours using microsatellite and fluorescent DNA technology. *Br. J. Cancer* 1993; 67: 1262-7.
4. Diamandis EP. Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer. *Clin. Chim. Acta* 1997; 257: 157-80.
5. Koreth J, O'Leary JJ, OD McGee J. Microsatellites and PCR genomic analysis. *J. Pathol.* 1996; 178: 239-48.
6. Weimberg R. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254: 1138-46.
7. Bianchi AB, Navone NM<sup>o</sup>, Conti CJ. Detection of loss of heterozygosity in formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens by polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 1991; 138: 279-84.
8. Louis DN, Von Deimling A, Seizinger BR. A (CA)<sub>n</sub> dinucleotide repeat assay for evaluating loss of allelic heterozygosity in small and archival human brain tumor specimens. *Am. J. Pathol.* 1992; 141: 777-82.
9. Bethwaite PB, Koreth J, Herrington CS, O'D McGee J. Loss of heterozygosity occurs at the D11S29 locus on chromosome 11q23 in invasive cervical carcinoma. *Br. J. Cancer* 1995; 71: 814-18.
10. Blind and Sttaford. A general method for isolation of a high molecular weight DNA from eukariotes. *Nucleic. Acids Res.* 1976; 3: 2303.
11. Gyapay G. Genethon human genetic linkage map. *Nat. Genet.* 1994; 7: 246-339.
12. Jones MH. Detection of loss of heterozigocity at the human TP 53 locus using a dinucleotide repeats polymorphism. *Genes Chromosomes cancer* 1992; 5: 89-90.
13. Weber JL, Kwitek AE, May PE, Wallace MR, Collins FS, Ledbetter DH. Dinucleotide repeat polymorphisms at the D17S250 and D17S261 loci. *Nucleic. Acids Res.* 1990; 18: 4640.
14. Weissenbach JA, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G. Second generate map of human genome. *Nature* 1992; 359: 794- 801.
15. Sambroock J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor;1989.
16. Willoughby EW, Lambert A. *Anal Biochem.* 1983; 130: 353-8.
17. Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer F, Jas JR, Jeffreys AJ, et al. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987; 328: 616-9.
18. Cawkwell L, Bell SM, Lewis FA, Dixon MF, Taylor GR, Quirke P. Microsatellite instability in colorectal cancer: Improved assessment using fluorescent polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 1995; 109: 465-71.
19. Litt M, McPherson MJ, Quirque P, Taylor GR. PCR of TG microsatellites. PCR a practical approach. New York: Oxford University Press. 1991; 85-99.
20. Willers CP, Siebert R, Bardenheuer W, Lux A, Michaelis S, Seeber S, et al. Genetic instability of 3p12-p21 specific microsatellite sequences in renal cell carcinoma. *Br. J. Urol.* 1996; 77: 524-9-
21. Trapman J, Sleddens HF, Van der Weiden MM, Dinjens WNM, Koning J. J., Schroder FH. Lost of heterozigosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate tumor suppressor gene between the loci D8S87 and D8S133 in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1994; 54: 6061-4.
22. D'Errico M, Calganile A, Corona R, Fucci M, Annessi G, Baliva G, et al. P53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late stage. *Cancer Res.* 1997; 57: 742-52.

23. Mizunuma H, Takita K, Ooki S, Ando Y, Yoshida T, Tsuchiya A, et al. Analysis of microsatellite alterations in colorectal cancer. *Gan to Kagaku Ryoho* 1998; 3: 443-9.
24. Ogunbiyi OA, Goodfellow EH, Herfarth K, Gagliardi O, Swanson PE, Bimbaum EH, et al. Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colorectal cancer is a prognostic indicator. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 427-33.
25. Rodrigues NR. P53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 7555-9.
26. Powell S, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan T, Hamilton S, Thibodeau S, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-7.
27. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach F, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.

## TABLA I

MICROSATELITE	SECUENCIA	LOCALIZACION	AMPLICON
D2S123	5' AAACAggATgCCTgCCTTTA <sub>3</sub> ' 5' ggACTTTCCACCTATgggAC <sub>3</sub> '	2p16	227-197 bp
TP53	5' ACTgCCACTCCTTgCCCCATTC <sub>3</sub> ' 5' AqqqATACATTTCAqCCCaAqqTq <sub>3</sub> '	17p 13.1	103-135 bp
Mfd27	5' GatccactttaacCCAAATAC <sub>3</sub> ' 5' qqqATCAACTTqAACAqCAT <sub>3</sub> '	5q11.2-q13.3	155-133 bp

Secuencias de los cebadores empleados

## TABLA II

	HISTORIA CLINICA	DUKES£A	METASTASIS	LADO DCHO
<b><u>LOH</u></b> (n=7)	57.1%	14.2%	25.7%	42.8%
<b><u>No LOH</u></b> (n=11)	72.6%	9.09%	27%	18.1%

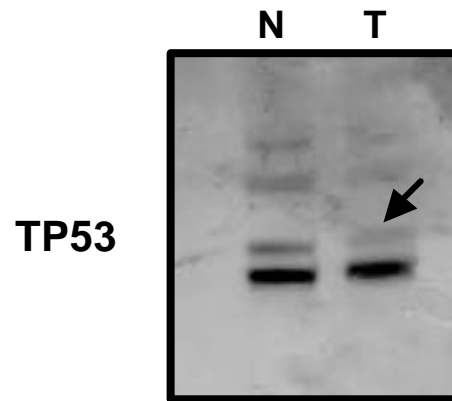
Diferencias entre los grupos LOH y no LOH respecto a las variables clínico anatomopatológicas estudiadas

en CANCER DE COLON esporadico

**LOH**: Grupo con pérdida de heterocigosidad

**No LOH**: Grupo sin pérdida de heterocigosidad

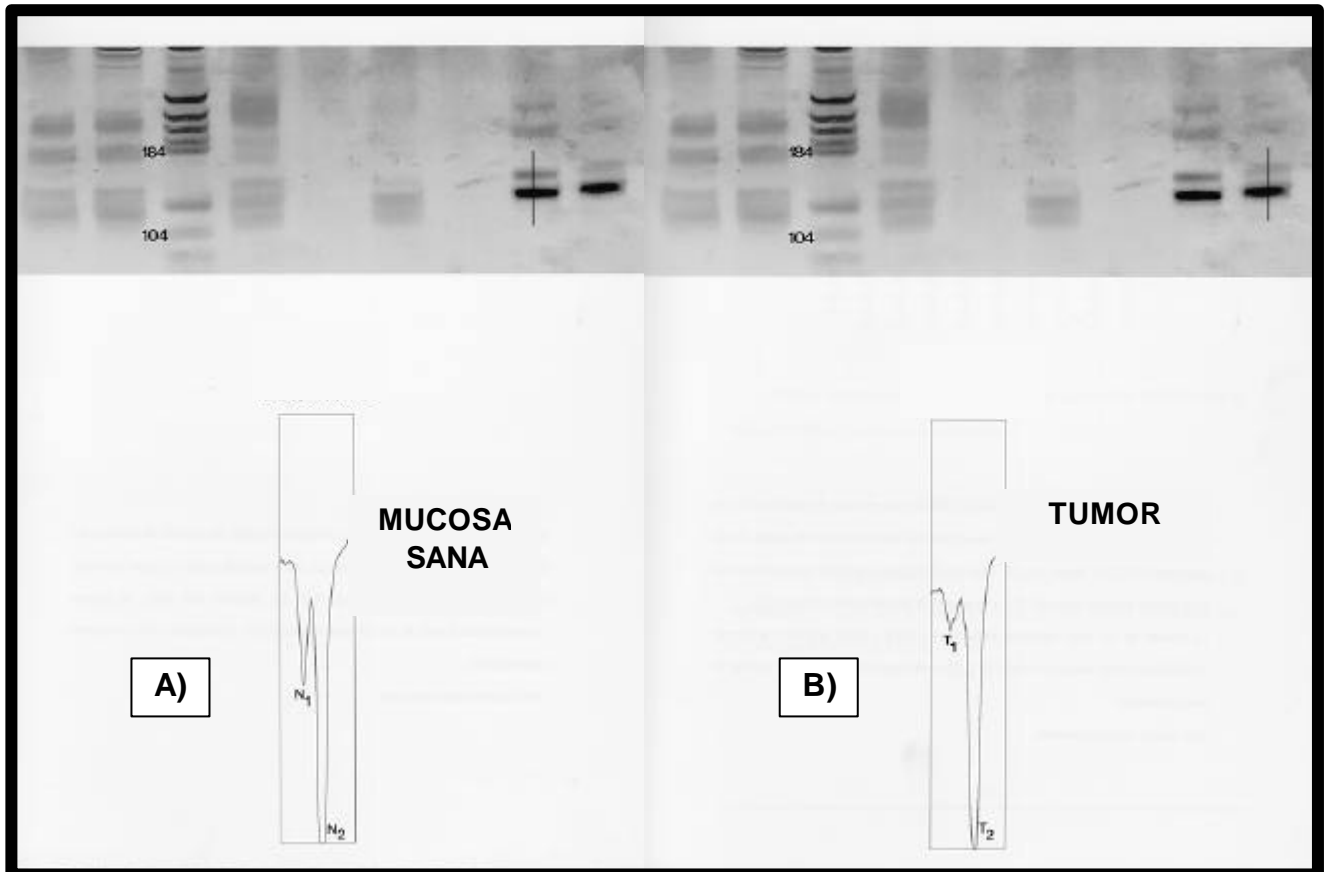
## FIGURA I



**Figura I:** Patrón de bandas de una pérdida alélica (LOH), para el marcador TP53.

T= tumor N= mucosa sana

## FIGURA II



**Figura II:** Estudio densitométrico utilizando el programa de análisis de imagen UTHSCSA

Image Tool.