

## DIAGNOSTICO POR MUTAGENESIS DIRIGIDA DE UNA MUTACION EN EL GEN hMSH2 VINCULADA A CANCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPOSO

MARIA ROQUE<sup>1</sup>, EDUARDO PUSIOL<sup>2</sup>, GABRIELA GIRIBET<sup>2</sup>, HECTOR PERINETTI<sup>2</sup>, LUIS S. MAYORGA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Celular y Molecular, IHEM-CONICET e <sup>2</sup> Instituto de la Patología de la Tiroides, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

**Resumen** El cáncer colorrectal hereditario no poliposo (HNPCC) es la forma más común de cáncer de colon hereditario, y una de las afecciones autosómicas dominantes más frecuentes. Clínicamente se caracteriza por su temprana aparición (< 50 años), la localización proximal de los tumores colónicos y un alto riesgo de desarrollar tumores colorrectales primarios múltiples y extracolónicos. La enfermedad es causada por diferentes mutaciones en alguno de los por lo menos cuatro genes reparadores de discordancias del ADN (genes MMR: hMSH2, hMLH1, hPMS1 y hPMS2). Se calcula que afecta a 1:200-1:2 000 personas de la población occidental. La identificación de estos genes responsables de HNPCC ha permitido la búsqueda de mutaciones germinales en individuos afectados. En una familia mendocina con cáncer de colon hereditario se realizó la búsqueda del gen afectado a través de un centro holandés de diagnóstico de HNPCC donde detectaron una mutación en el exón 13 del gen hMSH2. La mutación introduce un codón de finalización temprano lo que provoca la expresión de una proteína truncada. Esta mutación en particular no estaba registrada en la base de datos de mutaciones relacionadas con HNPCC. Luego de la detección en el paciente índice, desarrollamos en nuestro laboratorio un procedimiento rápido y eficiente para detectar mutaciones en el resto de los familiares. La metodología consistió en la amplificación del exón 13 del gen hMSH2 mediante un cebador para el extremo 5' que linda con el sitio de la mutación puntual e introduce parte de la secuencia de corte para la enzima HaeIII que es completada sólo en el alelo sano. Este análisis genético nos permitió hasta la fecha diagnosticar 17 individuos de los cuales 9 resultaron afectados y están entrando en un programa de seguimiento clínico y consultoría genética.

**Abstract** *Diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer by site directed mutagenesis in a family with a mutation at the hMSH2 gene.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) is the most common form of inherited colon cancer and one of the most frequent autosomal dominant disorders. HNPCC presents an early onset of colorectal cancer (< 50 years), proximal localization of the colonic tumors, and high risk of developing multiple primary colorectal tumors as well as extracolonic tumors. This disease is caused by mutations in at least four DNA mismatch repair genes, (hMSH2, hMLH1, hPMS1 and hPMS2) and estimations indicate that it affects 1:200-1:2 000 people in the Western populations. The identification of the genes responsible for HNPCC has prompted the search for mutations in affected individuals. DNA from an affected member of a family was sent to a Dutch HNPCC Diagnosis Centre. This Centre reported a germinal mutation, which introduces a premature stopcodon and causes the production of a truncated protein. This particular mutation has not been previously registered in the database of mutations related to this disease. After the identification of the mutation in the index patient, we have developed a quick and efficient procedure for detecting mutations in the rest of the family. The methodology is based on the amplification of the exon 13 in the hMSH2 gene using a forward primer that abuts the mutation site and introduces the cutting sequence of the enzyme HaeIII only in the wild type allele. At present, seventeen members of the family have been diagnosed and nine have been found to be affected. The methodology is simple, specific, sensitive, inexpensive and applicable in low complexity laboratories.

**Key words:** hereditary cancer, colon cancer, autosomal dominant disorder, PCR diagnosis

En un gran número de países occidentales, la incidencia del cáncer colorrectal (CRC) está en segundo lugar entre las mujeres (después del cáncer de mama) y en tercer lugar entre los hombres (después del cáncer de pulmón y próstata). Las estimaciones realizadas por

varios investigadores indican que afecta a 1:200-1:2 000 personas en la población occidental<sup>1</sup>. La mayoría de los CRC son esporádicos afectando a un solo miembro de una familia. Sin embargo, entre el 5 y el 10% de los casos son hereditarios y se los denomina cáncer colorrectal hereditario (HCC). El HCC se divide en dos tipos: poliposo (una menor parte) y no-poliposo (la mayoría restante). El llamado HNPCC (Cáncer de Colon Hereditario No-Poliposo) es por lo tanto la condición genética más común que determina la susceptibilidad a la formación de tumores colorrectales. Se caracteriza

Recibido: 22-VII-1999

Aceptado: 20-X-1999

**Dirección postal:** Dra. María Roqué, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Parque General San Martín, 5500 Mendoza  
Fax: (54-0261) 4494117 e-mail: mroque@fmed2.uncu.edu.ar

genéticamente por un patrón de herencia autosómico dominante y una alta penetrancia<sup>2</sup>. Clínicamente sus rasgos preponderantes son la temprana aparición del cáncer colorrectal (< 50 años), la localización proximal de los tumores colónicos, y un alto riesgo de desarrollar tumores colorrectales primarios múltiples como también tumores extracolónicos<sup>1</sup>.

Hace pocos años se ha demostrado que HNPCC se debe a mutaciones germinales en uno de los por lo menos cuatro genes reparadores de discordancias del ADN (genes MMR: hMSH2, hMLH1, hPMS1 y hPMS2)<sup>2</sup>. La inactivación de estos genes lleva a una inestabilidad genómica caracterizada por la contracción o expansión de los microsatélites, y es esta forma de inestabilidad la que resulta en una rápida acumulación de mutaciones somáticas en diferentes oncogenes y genes supresores de tumores, que juegan un papel crucial en la iniciación y progresión de los tumores<sup>3</sup>. La mayoría de las mutaciones se han detectado en hMSH2 y hMLH1. El gen hMSH2 se encuentra en el cromosoma 2p16 y tiene una extensión de aproximadamente 73 kb; se han determinado todas las secuencias de las uniones intrón-exón y se han encontrado 16 exones; su espectro de mutaciones es muy heterogéneo, no encontrándose aún una relación entre el sitio de la mutación y el tipo de tumor. Se ha creado hace unos años una base de datos donde están registradas gen por gen, exón por exón, todas las mutaciones detectadas hasta el momento, relacionadas con HNPCC.

Para la orientación del diagnóstico clínico se puede utilizar el Criterio de Amsterdam, establecido por el International Collaborative Group on HNPCC, y que satisfacen la mayoría de los linajes HNPCC; esto es: i) por lo menos 3 parientes afectados en sucesivas generaciones, siendo uno de ellos pariente en primer grado de los otros dos; ii) por lo menos uno de estos parientes con diagnóstico de cáncer de colon previo a los 50 años de edad; iii) CRC poliposo ausente en todos los miembros en riesgo de la familia<sup>2</sup>. Sin embargo, cada vez más se confirma la necesidad de considerar criterios clínicos más amplios para detectar casos de HNPCC.

En este estudio mostramos los análisis genéticos efectuados a una familia mendocina con antecedentes sospechosos de cáncer colorrectal hereditario. A pesar de tener inicialmente sólo información clínica de una generación, la sospecha se basó en la cantidad de afectados existentes y la edad de manifestación menor de 50 años. Se confirmó la presencia de una mutación en el exón 13 del gen hMSH2 que no había sido descripta ni registrada anteriormente en HNPCC. El conocimiento de la familia completa, permitió verificar que satisfacían el criterio de Amsterdam. A continuación se desarrolló una técnica rápida y sencilla para la detección de esta mutación en el resto de los familiares utilizando mutagénesis dirigida por PCR. Este método ha servido hasta la fecha para diagnosticar 17 individuos de la familia en estudio.

## Materiales y métodos

### *Detección de la mutación en el paciente índice*

Se obtuvo ADN genómico del paciente índice a partir de sangre entera extraída con EDTA por el método de extracción salina<sup>4</sup>, y se envió la muestra al Department of Human Genetics del Medical Genetics Centre de Leiden en Holanda, para su análisis por Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).

### *Selección de pacientes*

De un total de 37 integrantes de la familia mencionada (Fig. 3) sólo 17 individuos aceptaron colaborar con el estudio. Se les realizó un interrogatorio cuidadoso a la mayor cantidad posible de miembros, teniendo en cuenta la posibilidad de confusión u ocultamiento de lazos de consanguinidad. De las personas ya afectadas se recolectó información respecto al tipo y localización del cáncer, los diagnósticos histopatológicos de los tumores individuales, y la edad de manifestación. A su vez se documentaron los datos personales de cada uno de los parientes a riesgo incluidos en el estudio.

### *Extracción de ADN*

Luego de obtener el consentimiento de los pacientes, se obtuvo ADN genómico de los mismos por el método ya mencionado. Cada ensayo se hizo por duplicado a partir de dos muestras de sangre independientes.

### *Mutagénesis dirigida y corte enzimático*

El ADN resuspendido en agua fue amplificado mediante los siguientes cebadores: para el extremo 5', 'ttgtgactgcatcttaggc y para el extremo 3', 'ttctatctcaaggcctaggag, o agttccaacattcagcta. Para ambos pares de cebadores el programa de amplificación se comenzó con una incubación de 3 minutos a 92°C, se prosiguió primero con 3 ciclos de 92°C-30 segundos, 55°C-120 segundos y 74°C-30 segundos, para introducir la mutación. A continuación 22 ciclos de 92°C-30 segundos, 64°C-30 segundos y 74°C-30 segundos, para amplificar el producto anterior. Se cerró la amplificación con una incubación de 3 minutos a 74°C.

Para la digestión enzimática, una alícuota de 10 µl del producto de amplificación se incubó con 3.5 µl de agua miliQ, 1 µl de buffer 10X correspondiente a la enzima y 0.5 µl de enzima de restricción HaellI (10 U/µl, GIBCO SRL) bajo una gota de aceite mineral a 37°C por 2 hs. Como control se realizó la misma incubación reemplazando la enzima por 0.5 µl de agua miliQ. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida no desnaturante al 10% con una diferencia de potencial de 120 V durante 60 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio por 10 minutos y observados bajo luz ultravioleta.

## Resultados

El Department of Human Genetics del Medical Genetics Centre de la Universidad de Leiden en Holanda informó una mutación en el exón 13 del gen hMSH2, donde en el codón 711 una Arginina (CGA) había cambiado a un codón de terminación (TGA). Esta mutación produce un producto proteico truncado y por lo tanto inactivo. La mutación fue registrada por nuestro grupo en la base de datos de mutaciones patogénicas relacionadas con HNPCC ([www.nfdht.nl/database/mdbchoice.htm](http://www.nfdht.nl/database/mdbchoice.htm)).

Después de conocer el sitio de la mutación en el caso índice y con el objeto de extender el estudio hacia el resto de los familiares en riesgo, se diseñó una estrategia de mutagénesis dirigida que consistió en introducir durante la PCR una mutación en el producto de amplificación del exón 13 mediante el cebador del extremo 5'. Este cambio de base introducido, junto con los nucleótidos que lindan con el extremo 3' del cebador, genera un sitio de restricción para la enzima Hae III en el alelo sano (5'GGCC3'). En el alelo mutado los nucleótidos que lindan con el extremo 3' del cebador son diferentes, y por lo tanto no se forma el sitio de restricción (5'GGCT3') (Fig. 1).

Para el diseño del cebador 3', en una primera instancia, se lo ubicó en el intrón lindante y se buscó crear mediante el mismo un sitio de corte en ambos alelos para que sirviera como control interno de la actividad de la enzima de restricción. Se trataron de determinar las

condiciones óptimas del ensayo utilizando curvas de magnesio para la reacción de PCR, curvas de temperaturas de annealing, tiempo de annealing, agregado de la Taq polimerasa luego de la temperatura de desnaturalización, disminución de la cantidad de cebadores y nucleótidos libres, etc. A su vez, rediseñamos el programa de amplificación, dividiéndolo en dos partes: los primeros 3 ciclos con una temperatura de annealing más baja (55°C) para introducir la mutación, y los siguientes 22 ciclos, con una temperatura de annealing más alta (64°C) para reducir las posibles amplificaciones inespecíficas. A pesar de los esfuerzos realizados no se logró eliminar dos bandas contaminantes que entorpecían el análisis dado que tenían también sitios de corte para HaeIII (Fig. 2a). De todos modos se pudo identificar la banda de 117 pb que está presente en el individuo índice y no en los normales (Fig. 2 a y c). En la Fig. 2 c se puede observar que el producto de amplificación de

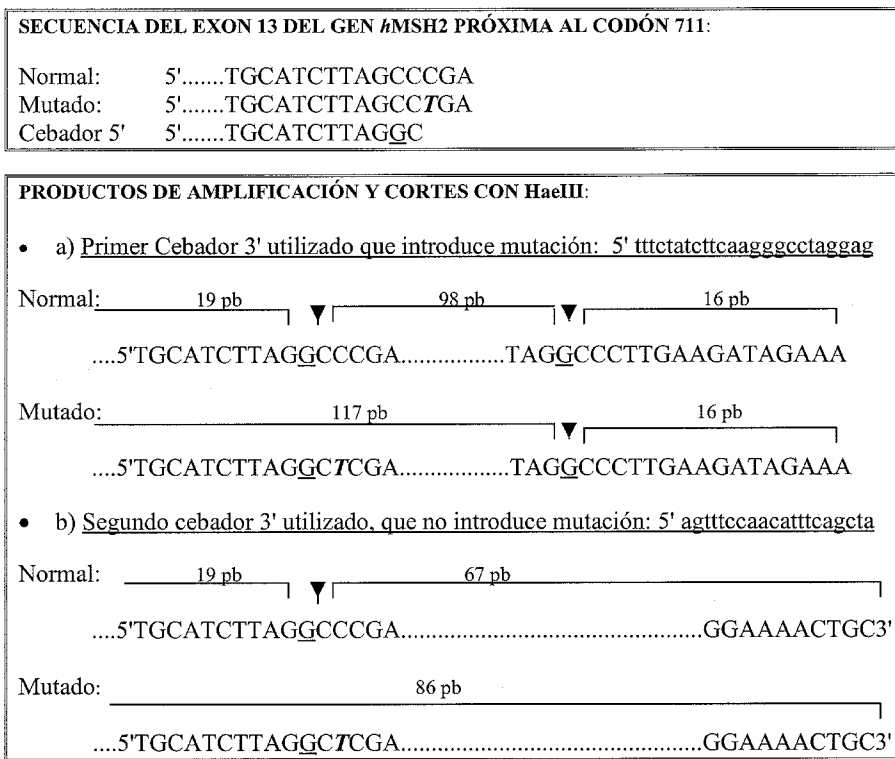


Fig. 1.- a. Esquema de la metodología utilizada inicialmente para la detección de la mutación 711 en el gen hMSH2. El método introduce un sitio de corte mediante el cebador del extremo 5' para la enzima HaeIII en el alelo sano, y otro sitio de corte para la misma enzima mediante el cebador del extremo 3' en ambos alelos. Esta diferencia hace que el producto de amplificación de 133 pb luego del corte con la enzima sea 19 pb más pequeño en el alelo sano que en el enfermo. El control de corte de la enzima, libera un segmento de 16 pb. Las letras subrayadas indican mutaciones introducidas mediante cebadores. b. Esquema de la metodología utilizada en segunda instancia para la detección de la mutación 711 en el gen hMSH2. Esta vez el método sólo introduce un sitio de corte mediante el cebador del extremo 5' para la enzima HaeIII en el alelo sano. Esta diferencia hace que el producto de amplificación de 86 pb luego del corte con la enzima sea 19 pb más pequeño en el alelo sano que en el enfermo.

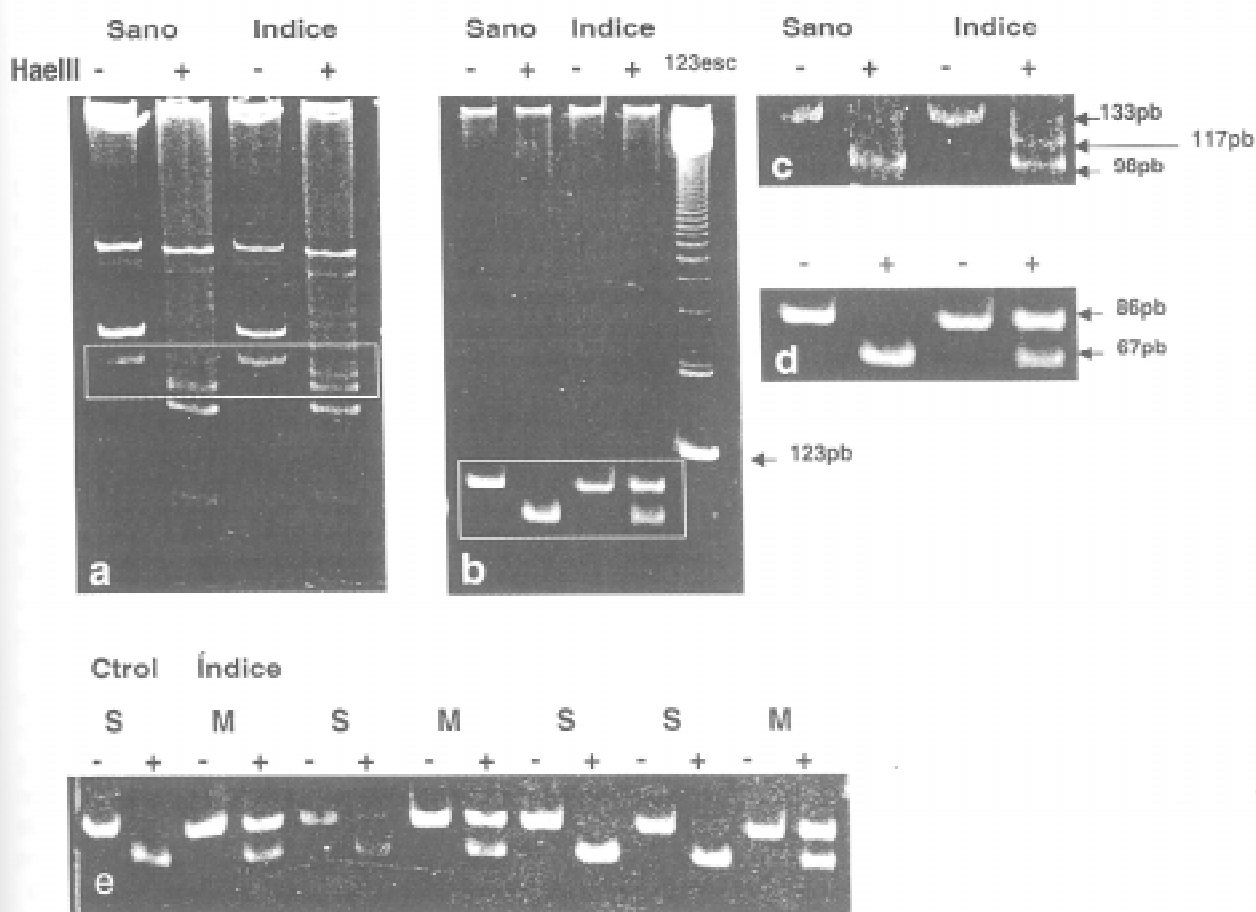


Fig. 2.- Resultados del análisis mediante mutagénesis dirigida con dos pares de cebadores diferentes. Geles a y c: resultados con cebador para el extremo 3' que introduce mutación; Geles b y d: resultados con cebador para el extremo 3' sin introducir mutación. El control es un individuo sano; el índice es el paciente con cáncer colorrectal. Cada muestra de producto de PCR fue incubada con (+) y sin (-) la enzima HaeIII, y se sembraron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 10%. Gel e: Resultados de geles diagnóstico de una familia con HNPCC. Calles -: producto de amplificación sin HaeIII. Calles +: producto de amplificación con HaeIII. S = pacientes sanos; M = pacientes mutados. Ctrol = control sano. Índice = paciente 1 con cáncer colorrectal.

133 pb es cortado en ambos alelos por HaeIII dado que el cebador para el extremo 3' introduce un sitio de reconocimiento para la enzima (Fig. 1a). Este sitio sirve de control interno para la actividad de la enzima. El alelo sano presenta un segundo sitio de corte que hace que se diferencie del mutado (bandas de 98 pb y 117 pb, respectivamente). Los resultados obtenidos con este ensayo eran coherentes con el árbol familiar y con el patrón de herencia dominante, sin embargo no eran lo suficientemente confiables como para establecer un diagnóstico definitivo. La cantidad de bandas inespecíficas no permitía una clara interpretación de los resultados.

Sospechamos que lo que imposibilitaba mejorar la definición del ensayo era debido a uno de los cebadores. Por esta razón decidimos rediseñar el cebador para el extremo 3', ubicándolo adentro del exón 13, y sin introdu-

cir ningún cambio de base. Con estos cambios obtuvimos una única banda de amplificación que daba un patrón característico de corte que permitía fácilmente distinguir entre homocigotas sanos y el paciente índice heterocigota (Fig. 2 b y d). Con este conjunto de cebadores no existe un corte que sirva como control interno de la actividad de HaeIII. Para el diagnóstico de 17 pacientes, se amplificó el exón 13 con el segundo conjunto de cebadores. Los productos fueron incubados con la enzima de restricción HaeIII y los fragmentos fueron analizados en un gel de poliacrilamida al 10% (Fig. 2 e). Se puede observar un producto de amplificación de 86 pb, que es cortado en su totalidad en los individuos sanos (pacientes S) a un producto de 67 pb. En los individuos heterocigotas se ve claramente la diferencia de 19 pb entre el alelo sano cortado y el mutado sin cortes (pacientes

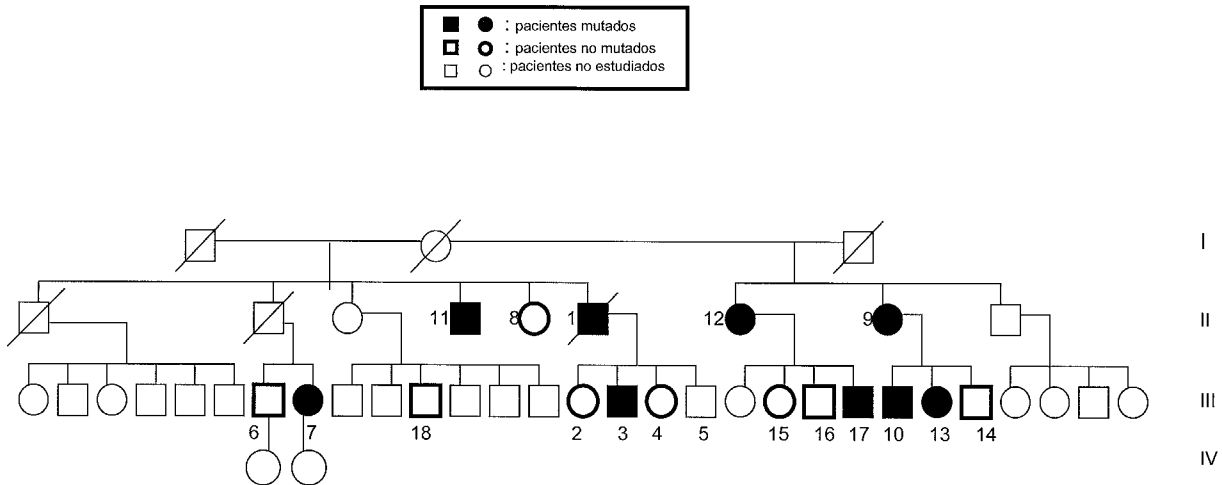
FAMILIA CON HNPCC - MUTACION EN EL GEN *hMSH2* CODON 711

Fig. 3.- Familia de cuatro generaciones con HNPCC. Los pacientes están numerados, según el orden en que se fueron haciendo los estudios. Símbolos sombreados indican portadores de la mutación, y símbolos en negrita indican los pacientes que fueron diagnosticados.

M). La muestra Ctról corresponde a un individuo sano y la muestra Índice es el paciente índice. Hubo una total coincidencia entre los resultados obtenidos por los dos conjuntos de cebadores, pero el diagnóstico con el segundo conjunto fue incomparablemente más seguro.

La familia (Fig. 3), muestra el patrón de herencia dominante característico de mutaciones en el *hMSH2*. Se puede observar que la descendencia (generación II) de ambos progenitores masculinos de la generación I está afectada, de lo cual dedujimos que la portadora de la mutación había sido su madre. En la generación III, se incluyó en los análisis a los hijos de los pacientes fallecidos antes de comenzar este estudio. Según la información recolectada, todos habían fallecido de algún tipo de cáncer, algunos de cáncer colorrectal.

Los miembros de la generación IV cuyos padres están afectados, no han podido ser estudiados hasta el presente. Los padres han tomado la decisión de esperar dado el bajo riesgo que esto implica para niños menores de 20 años. Asimismo, varios de los integrantes de la familia no han demostrado interés en realizarse el estudio. Se está trabajando sobre la manera de informarles sobre los beneficios del diagnóstico presintomático tanto en los casos positivos como en los negativos.

## Discusión

De los cuatro genes conocidos relacionados con el síndrome HNPCC, los genes *hMLH1* y *hMSH2* son los que con más frecuencia parecen mutar. Estudios mutacio-

nales indican que más de un 40% de los linajes con HNPCC se deben a mutaciones en el gen *hMSH2* en el cromosoma 2p16. Un tema de importancia práctica con respecto a la patogenicidad de HNPCC es la naturaleza de mutaciones individuales y su correlación con el espectro tumoral observado. Se ha visto que mutaciones independientes en un determinado exón se relacionan con diferentes variantes clínicas. Esto sugiere que otros genes, junto con factores ambientales podrían estar jugando un rol importante en determinar el fenotipo clínico en el paciente individual con HNPCC. Recientes estudios<sup>5</sup> han demostrado que la mayoría de las mutaciones en el gen *hMSH2* llevan al truncamiento de la proteína y están dispersas a lo largo de toda la secuencia codificante de una manera heterogénea.

En nuestro caso, la mutación hallada produce una proteína truncada al introducirse una señal de finalización prematuramente en el codón 711. Esta mutación es nueva en cuanto a su relación con la enfermedad, y fue registrada por nuestro grupo en la base de datos correspondiente. Si bien esta mutación no estaba registrada en familias con HNPCC, ha sido encontrada en la línea celular Jurkat originada de células T de una leucemia humana<sup>6</sup>. La mutación más cercana y del mismo tipo registrada para HNPCC es el cambio de la arginina 680 por un codón de terminación registrada por Wijnen et al.<sup>2</sup> Otra mutación registrada por Wijnen et al.<sup>5</sup> en el exón siguiente introduce un codón de terminación y se relaciona fenotípicamente con tumores en colon y endometrio principalmente. En la familia en estudio, una de las mujeres mutadas presenta también un cáncer de

útero. Con el screening de nuevas familias se podría comenzar a formar una base de datos del país, comparando el tipo de mutación con las registradas hasta el momento en el extranjero.

Para el diagnóstico clínico de HNPCC hasta hace un tiempo se contaba tan sólo con el detalle de una historia familiar. De este modo, los pacientes que tenían uno o más parientes en primer grado afectados con el síndrome de HNPCC, eran sólo informados de poseer un 50% de riesgo de ser portadores de una mutación. Con el descubrimiento de los genes MMR en 1993-1994, y el inmediato desarrollo de técnicas de diagnóstico a partir de ADN, se puede lograr una identificación de los individuos afectados mucho antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas, posibilitando el seguimiento y tratamiento muy precoz, lo que amplía las posibilidades de éxito terapéutico. Por otra parte se puede informar a los individuos no afectados y a sus descendientes de tener un riesgo de desarrollar esta neoplasia, igual al de la población general.

El análisis genético no sólo beneficia directamente a las familias afectadas, sino que comienza a aportar conocimientos al entendimiento de la compleja relación genotipo-fenotipo en HNPCC. La caracterización de las mutaciones y su correlación con la fisiopatología de la enfermedad va abriendo poco a poco un panorama de posible pronóstico clínico según el tipo de mutación.

El análisis por DGGE de segmentos individuales de ADN genómico, garantiza un método completo de detección mutacional, pero requiere un alto número de cebadores y reacciones de PCR individuales<sup>7</sup>. Por otro lado, otros métodos como el test de la proteína truncada (PTT)<sup>8</sup> que son sugeridos para la caracterización de mutaciones, debido a que prácticamente todas las alteraciones en el gen hMSH2 llevan a un producto proteico truncado, son igualmente de elevado costo.

En Argentina todavía no se pueden aplicar análisis de esta envergadura dado que el servicio diagnóstico debería montarse en un laboratorio de alta complejidad y con muchos recursos. La alternativa nuestra a esta realidad fue la de mandar a analizar el ADN a un centro de diagnóstico de HNPCC en Holanda, y luego sobre la base de esos resultados diseñar una estrategia sencilla, rápida y eficiente como lo es la mutagénesis dirigida por PCR, para rastrear la mutación en el resto de la familia. Este método fue utilizado por Haliassos et al.<sup>9</sup> para detectar rápidamente mutaciones en el oncogen *ras* y nuestro laboratorio ya la había utilizado para detectar mutaciones en el gen CFTR de la Fibrosis Quística. El método es de bajo costo, de alta sensibilidad y especificidad y con baja probabilidad de falsos positivos y falsos negativos. El desarrollo de una estrategia diagnóstica simple nos ha permitido realizar el diagnóstico presintomáti-

camente a los familiares del paciente índice que no hubiera sido factible hacerlo a la distancia, no sólo por lo complejo del manejo de las muestras, sino por lo costoso que hubiera resultado para una familia tan grande. Con la metodología aplicada, todo el diagnóstico familiar, la consultoría genética y el seguimiento clínico se pudo comenzar a hacer en el país.

A los individuos sin mutación (muchos de ellos ya con hijos) se les puede dar la tranquilidad de que no desarrollarán el tumor ni ellos ni su descendencia. Los pacientes con la mutación presente deben realizarse una colonoscopia cada 1-3 años, comenzando entre los 20-25 años y hasta los 60-75 años a fin de permitir un diagnóstico precoz. El diagnóstico presintomático brinda una mayor posibilidad de cura pues permite una intervención terapéutica eficaz en la mayoría de los casos<sup>10</sup>. Para dar estos beneficios a la familia, se está formando un equipo de interacción con médicos genetistas, médicos gastroenterólogos y médicos cirujanos, que facilite que los individuos portadores de la mutación se incorporen a un programa de seguimiento clínico.

A pesar de los beneficios indiscutibles para los individuos analizados, se debe ser consciente de que la información genética debe ser siempre confidencial, no sólo para evitar posibles futuras discriminaciones, sino también para respetar la intimidad de cada familia. Las consecuencias de estos diagnósticos genéticos pueden impactar en una variedad de aspectos clínicos, legales, éticos y psicosociales. Pero si los portadores de mutaciones son sometidos a seguimiento clínico, tratamiento profiláctico y consultoría genética, las expectativas y la calidad de vida aumentan, y los costos médicos disminuyen<sup>11</sup>.

**Agradecimientos:** El médico cirujano P. Omelanczuk del Hospital Lagomaggiore de la Ciudad de Mendoza ha sido quien aportó el caso índice. El Dr. Riccardo Fodde y el Dr. Juul Wijnen del Department of Human Genetics, Medical Genetics Centre de la Universidad de Leiden en Holanda realizaron la detección de la mutación germinal en el paciente índice, así como también brindaron su asesoramiento profesional posterior. La Dra. Ana Lía Vargas del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Cuyo, revisó detalladamente el manuscrito. Este trabajo fue realizado con un subsidio del Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Cuyo de Mendoza.

## Bibliografía

1. Tops C. Genetic Changes During Colorectal Oncogenesis. *En: Presymptomatic DNA Diagnosis of Familial Adenomatous Polyposis*. Tesis doctoral. Leiden, 1996, p. 10.
2. Wijnen J, Khan M, Vasen H, et al. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Families not complying with the Amsterdam Criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 329-35.

3. Aaltonen L, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
4. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215-20.
5. Wijnen J, Vasen H, Khan M, et al. Seven new mutations in hMSH2, and HNPCC gene, identified by denaturing gradient gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1060-6.
6. Levati L, Marra G, Lettieri T, et al. Mutation of the mismatch repair gene hMSH2 and hMSH6 in a human T-cell leukemia line tolerant to methylating agents. *Genes chromosomes cancer* 1998; 23: 159-66.
7. Fodde R, Losekoot M. Mutation Detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Mut* 1994; 3: 83-94.
8. Van der Luijt R, Khan M, Vasen H, et al. Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test. *Genomics* 1994; 20: 1-4.
9. Haliassos A, Chomel JC, Tesson L, et al. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 3606.
10. Menko FH, Wijnen JT, Vasen HF, Sijmons RH, Khan M. Familial and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: issues relevant for surgical practice. *Cancer Res* 1998; 146: 20-3110.
11. Vasen H, Van Balleoijen M, Buskens E, et al. A cost effectiveness analysis of colorectal screening of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma gene carriers. *Cancer* 1998; 1: 1632-7.

-----

Las ciencias, ha dicho un escritor, son la imagen del movimiento: querer estacionarlas, es pretender apagarlas, para que este movimiento continúe, es indispensable que muchos hombres reunidos la sostengan, y que juntando en un solo foco su saber, valoren con justicia los hechos y los pensamientos nuevos, los estudien bajo todas sus relaciones, y los sometan a discusiones imparciales y detenidas con genio y con opiniones diferentes.

[Francisco] Cosme Argerich y Juan Antonio Fernández  
[1779-1849] [1758-1872]

*Medicina. Origen y estado de esta ciencia en Buenos Aires.* En *La Abeja Argentina*, N° 1, 15 de abril de 1822, p 24. Tomado de la reproducción símil tipográfica de la Biblioteca de Mayo, Tomo VI, Senado de la Nación, Buenos Aires, 1960, p 5261

[La Abeja Argentina fue la primera revista argentina; era mensual y órgano de la Sociedad Literaria. El primer número apareció el 15 de abril de 1822, el último —el décimo quinto— el 15 de julio de 1823. Este periódico estaba dedicado a "objetos políticos, científicos, y de industria, y contendrá, además traducciones selectas, los descubrimientos recientes de los pueblos civilizados; las observaciones meteorológicas del país; las medidas sobre la constitución de los años, de las estaciones, y un resumen de las enfermedades de cada mes; un sumario de los adelantamientos de la provincia". **JAB**]