



ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis genético en *APC*, *KRAS* y *TP53* en pacientes con cáncer de estómago y colon



K.A. Palacio-Rúa^a, L.F. Isaza-Jiménez^b, E. Ahumada-Rodríguez^c,
H. Ceballos-García^a y C.M. Muñeton-Peña^{a,*}

^a Unidad de Genética Médica, Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^b Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Hospital San Vicente de Paúl, Medellín, Colombia

^c Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Recibido el 31 de octubre de 2013; aceptado el 10 de marzo de 2014

Disponible en Internet el 24 de mayo de 2014

PALABRAS CLAVE

Cáncer de estómago;
Cáncer colorrectal;
Heterogeneidad genética;
Polimorfismo;
Inestabilidad genética

Resumen

Antecedentes: El cáncer de estómago (CE) y colorrectal (CCR) presentan altas tasas de incidencia y mortalidad en la población mundial. Estas 2 neoplasias se caracterizan por tener una gran heterogeneidad genética. Hasta el momento, no existen estudios moleculares que analicen las mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en población colombiana/latinoamericana.

Objetivo: Analizar mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en 59 pacientes con CE y CCR mediante el secuenciamiento directo.

Pacientes y métodos: Se estudió a 29 pacientes con CE y 30 con CCR. Se realizó un análisis de mutaciones en los 3 genes por las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y secuenciamiento directo.

Resultados: Se encontró una frecuencia total de mutaciones del 30.5%. El gen más frecuentemente mutado fue *APC* (15.3%), seguido de *KRAS* (10.1%) y *TP53* (5.1%). Las muestras de CCR presentaron una frecuencia de mutaciones del 46,7% y las CE del 13.3% ($p=0.006$). No se encontraron mutaciones simultáneas en los 3 genes. En solo 6 muestras de tumores (10%) se detectaron mutaciones en 2 genes. Adicionalmente, se obtuvo una alta frecuencia de polimorfismos en ambos tipos de cáncer, el más común fue el rs41115 localizado en el gen *APC*.

Conclusión: Las mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* fueron más comunes en el CCR que en el CE; nuestros resultados indican la existencia de diferentes vías genéticas en la carcinogénesis del CE y del CCR, y revelan una frecuencia de mutaciones particular en los pacientes colombianos estudiados, que podría estar influida por factores ambientales y étnicos, y el estilo de vida de esta población.

© 2013 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia: Carlos Mario Muñeton Peña. Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Unidad de Genética Médica, Departamento de Pediatría, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Carrera 51D No. 62-29. Teléfono: +(574) 2196930; fax: +(574) 2106932.

Correo electrónico: cmuneton@gmail.com (C.M. Muñeton-Peña).

KEYWORDS

Stomach cancer;
Colorectal cancer;
Genetic
heterogeneity;
Polymorphism;
Genetic instability

Genetic analysis in APC, KRAS, and TP53 in patients with stomach and colon cancer**Abstract**

Background: Stomach cancer (SC) and colorectal cancer (CRC) present with high rates of incidence and mortality in the worldwide population. These 2 tumors are characterized by great genetic heterogeneity. Up to now, there have been no molecular studies that analyze the mutations in the APC, KRAS, and TP53 genes in the Colombian/Latin American population.

Objectives: To analyze mutations in the APC, KRAS, and TP53 genes through direct sequencing in 59 patients with SC and CRC.

Patients and methods: Twenty-nine patients with SC and 30 with CRC were studied. An analysis of the mutations of the 3 genes was carried out using polymerase chain reaction and direct sequencing techniques.

Results: A 30.5% total mutation frequency was found. The most frequently mutated gene was APC (15.3%), followed by KRAS (10.1%) and TP53 (5.1%). The CRC samples had a mutation frequency of 46.7% and it was 13.3% in the SC samples ($P = .006$). No mutations occurred simultaneously in the 3 genes. Mutations in 2 genes were found in only 6 tumor samples (10%). There was also a high frequency of polymorphisms in both types of cancer, the most common of which was the rs41115 polymorphism, located on the APC gene.

Conclusion: The APC, KRAS, and TP53 gene mutations were more common in CRC than in SC. Our results suggest the existence of different genetic pathways in the carcinogenesis of SC and CRC and they also reveal a particular mutation frequency in the Colombian patients studied; this could be influenced by factors related to the environment, ethnicity, and lifestyle of this population.

© 2013 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. All rights reserved.

Introducción

Los cánceres de estómago (CE) y colorrectal (CCR) presentan altas tasas de incidencia y mortalidad en la población mundial¹⁻³. La situación es más preocupante en países en vía de desarrollo, porque la mortalidad para ambas malignidades tiene una tendencia al aumento y en la mayoría de los casos son diagnosticados en estadios avanzados con un mal pronóstico⁴. El CE es la cuarta causa de cáncer y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo; es más frecuente en hombre que en mujeres¹. La incidencia del CE varía geográficamente, con una alta incidencia en países asiáticos, como Corea, Japón y China, y en algunos países de Latinoamérica¹. En Colombia, el CE ocupa el segundo lugar en incidencia en hombres y mujeres, y es la primera causa de muerte por cáncer¹. Más del 90% de los casos de CE son adenocarcinomas y se clasifican histológicamente en 2 tipos: difuso e intestinal^{5,6}. La patogénesis del CE ocurre por múltiples factores etiológicos, que incluyen los genéticos, ambientales, dietarios, estilo de vida y la infección con la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)⁷⁻⁹.

Por otra parte, el CCR es la tercera neoplasia más frecuente en hombres y mujeres en el mundo; los países desarrollados presentan las mayores tasas de incidencia¹. En Colombia, el CCR, en ambos sexos, ocupa el sexto puesto en incidencia y el cuarto en mortalidad¹. Similar a lo observado en el CE, el CCR presenta una distribución geográfica variable, diversos factores están involucrados en la etiología del CCR, como son los genéticos, los ambientales, la raza y el estilo de vida, entre otros¹⁰. La mayoría de los casos de CCR son esporádicos y un bajo porcentaje se relaciona con la historia familiar^{11,12}.

En Colombia, el CE y el CCR presentan una distribución geográfica variable, con altas incidencias en la región central, noroeste, sur occidente, oriente y sur del país, mientras que bajas incidencias se observan en las regiones del Caribe (norte) y pacífica del país. Esta disparidad podría deberse a los hábitos en la dieta y a las preparaciones caseras de alimentos con alto contenido de nitritos típicos de cada región, así como a una alta ingesta de carnes rojas ahumadas, alcohol y al tabaquismo⁶.

El CE y el CCR son enfermedades muy heterogéneas que se originan por diversas vías genéticas; son comunes las alteraciones cromosómicas, las mutaciones en oncogenes, los genes supresores de tumores, los genes de reparación y la metilación en genes que controlan el ciclo celular¹³⁻¹⁵. Particularmente en el CCR, Fearon y Vogelstein propusieron un modelo molecular que describe la secuencia de la carcinogénesis colorrectal a partir de adenoma a carcinoma y en el que ocurren mutaciones en diversos oncogenes y genes supresores de tumores¹⁴.

De otro lado, estudios genéticos en CE y CCR reportan que alteraciones en los genes APC, KRAS, TP53, CDH1, MLH1 y ERBB2 están entre los cambios moleculares más comunes, adquiridos en la carcinogénesis de estas 2 malignidades^{2,16-20}. Por lo anterior, se propone que estos genes son esenciales para la transformación de las células normales hacia carcinoma. De esta manera, la caracterización molecular de las vías genéticas del CE y CCR es de gran importancia para su posterior correlación con las características clínico-patológicas y con el pronóstico de los pacientes²¹⁻²³.

En este trabajo, se formuló la hipótesis de que la frecuencia de mutaciones en los genes APC, KRAS y TP53 en las

muestras de CE y CCR de pacientes colombianos es diferente de la de otras poblaciones.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar las mutaciones somáticas en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en pacientes colombianos con cáncer de estómago y colorrectal, mediante el secuenciamiento directo.

Materiales y métodos

Población y muestra

Se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal. La población de estudio estuvo constituida por 59 pacientes, 29 con CE y 30 con CCR, todos de tipo esporádico. El estudio incluyó a 27 mujeres y 32 hombres. Ninguno de los pacientes tenía antecedentes de cáncer y no recibieron tratamiento antineoplásico previo a la cirugía. Todos los casos de CE y CCR fueron confirmados por el estudio histopatológico. A los pacientes se les solicitó la participación voluntaria en el estudio y la firma del consentimiento informado. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética para experimentación en humanos de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Las muestras de los tejidos tumorales primarios fueron obtenidos por los cirujanos mediante resección quirúrgica en 2 instituciones de la ciudad de Medellín, Colombia: el Hospital Universitario San Vicente Fundación y la Clínica León XIII, durante los años 2010 al 2011. Cada una de las muestras tumorales se dividieron en 2 porciones, una para el estudio histopatológico, realizado por un patólogo experto, y la otra porción se almacenó a -80°C para el posterior análisis genético.

Extracción de ADN

La extracción del ADN del tejido tumoral primario se realizó utilizando el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Posteriormente, el ADN se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, EE. UU.) y se determinó su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ADN extraído se almacenó a -20°C .

Amplificación del ADN y análisis de mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53*

El ADN aislado se amplificó por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EE. UU.), utilizando cebadores específicos para cada gen; en el gen *APC* se amplificó la región «*Mutation Cluster Region*» (*MCR*) ubicada en el exón 15; para del gen *KRAS* se amplificó el exón 2 (codones 12 y 13) y los exones 5 al 8 de *TP53*. Brevemente, la PCR se realizó en un volumen de $35\ \mu\text{l}$ que contenía $300\ \text{ng}$ del ADN tumoral en una mezcla de reacción con las siguientes concentraciones: 1X para el buffer de reacción 10X, $200\ \mu\text{M}$ de dNTPs, $0.4\ \mu\text{M}$ de cada primer y 1.4 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, EE. UU.). Las concentraciones de MgCl_2 fueron $1.05\ \text{mM}$ para *APC* y *KRAS*, y $1.5\ \text{mM}$

para *TP53*. Los productos amplificados por PCR se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, se colorearon con bromuro de etidio y se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar el secuenciamiento.

Secuenciamiento

Todas las muestras amplificadas se purificaron y secuenciaron directamente por ambas cadenas. El secuenciamiento se realizó en un analizador genético automático 3730xl DNA Analyzer de Applied Biosystems.

Análisis de resultados

Los cromatogramas obtenidos se editaron con el programa Chromas Pro y se alinearon con las secuencias de referencia publicadas en el GenBank (NCBI), cuyos códigos de acceso son: NT_034772.6 (*APC*), NT_009714.17 (*KRAS*) y NT_010718.16 (*TP53*).

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante el programa SPSS versión 18. En la estadística descriptiva para variables cuantitativas se utilizaron la media y el rango; las variables categóricas se presentaron en frecuencias y porcentajes. Para la comparación de variables categóricas, como género y frecuencia de mutación, se realizó la prueba de la χ^2 de Pearson, cuando los valores esperados eran inferiores a 5 se utilizó la corrección de Yates. La comparación entre las variables cuantitativas continuas como la edad se realizó mediante la prueba de la t de Student de muestras independientes. Todos los valores de p calculados son bilaterales y se consideró significativo un valor $p < 0.05$.

Resultados

Se estudió a un total de 59 pacientes, con una media de edad de 64.1 años (rango 12-94). Los pacientes con CCR y CE fueron estratificados por edad y género, para el primer grupo la edad promedio fue 62,1 años (rango 12-84) y para el segundo grupo fue de 66,1 años (rango 36-94); no se observó diferencia entre ambos grupos ($p=0.332$). Con relación al género, el 63.3% de los pacientes con CCR eran mujeres y el 36.7 eran hombres, mientras que en el CE el 27.6% eran mujeres y el 72.4% eran hombres, con una diferencia entre los 2 grupos estadísticamente significativa ($p=0.005$).

Entre los síntomas y signos más comunes que presentaron los pacientes con CE se encuentran: epigastralgia, emesis, astenia, adinamia, anorexia, náuseas, anemia, sangrado, pérdida de peso y obstrucción. En cuanto a los síntomas de los pacientes con CCR, los más frecuentes fueron: sangrado rectal, pérdida de peso, obstrucción del colon, estreñimiento, dolor abdominal difuso, melenas y distensión abdominal.

La frecuencia total de mutaciones en las 59 muestras analizadas fue del 30.5% (18/59) (tabla 1). Adicionalmente, se encontró una alta frecuencia de polimorfismos en los 3 genes; en total, se identificaron 7 polimorfismos diferentes en las 59 muestras; el más frecuente fue el rs41115

Tabla 1 Mutaciones identificadas en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en las muestras de CE y CCR analizadas

Tumor	Gen	Caso N.º	Exón	Codón	Posición	Mutación	Cambio de aminoácido	% mutación
Estómago	<i>APC</i>	08	15	1465	c.4393_4394 delAG	AGAGAG→AGAG	p.Ser1465TrpfsX3	3.3
	<i>KRAS</i>	04	2	12	c.35G > A	GGT→GAT	p.Gly12Asp	6.7
		08	2	13	c.38G > A	GGC→GAC	p.Gly13Asp	
Colorrectal	<i>TP53</i>	017	5	173	c.517G > A	GTG→ATG	p.Val173Met	3.5
	<i>APC</i>	031	15	1465	c.4393_4394dupAG	AGAG→AGAGAG	p.Ser1465ArgfsX9	26.7
		032	15	1367	c.4099C > T	CAG→TAG	p.Gln1367X	
		037, 039	15	1556	c.4666dupA	AAC→AAAC	p.Thr1556AsnfsX3	
		38	15	1443	c.4329T > A	CCA→CCT	p.Pro1443Pro	
			15	1474	c.4420A > G	ACT→GCT	p. Ala1474Thr	
		052	15	1306	c.3916G > T	GAA→TAA	p.Glu1306X	
		053	15	1309	c.3927_3931delAAAGA	AAAAGAAAAGA→AAAAGA	p.Glu1309AspfsX4	
	<i>KRAS</i>	031, 037	2	12	c.35G > A	GGT→GAT	p.Gly12Asp	13.3
		033	2	12	c.35G > T	GGT→GTT	p.Gly12Val	
		053	2	13	c.38G > A	GGC→GAC	p.Gly13Asp	
<i>TP53</i>	032	6	188	c.562C > T c.563T > A	CTG→TAG	p.Leu188X	6.7	
	039	6	199	c.595G > T	GGA→TGA	p.Gly199X		

Al comparar la frecuencia de mutaciones de *APC* entre el CE y CCR ($p=0.006$).

Al comparar la frecuencia de mutaciones de *KRAS* entre el CE y CCR ($p=0.06$).

Al comparar la frecuencia de mutaciones de *TP53* entre el CE y CCR ($p=0.98$).

Tabla 2 Polimorfismos identificados en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en las 59 muestras de pacientes con CE y CCR evaluados

Gen	Exón/intrón	Código SNP	Cambio en la proteína	cADN	CCR		CE		p
					n	%	n	%	
<i>APC</i>	Exón 15	rs41115	p.T1493T	c.4479G > A	18	60	25	86.2	0.008 ^a
		rs1801166	p.Glu1317Gln	c.3949G > C	1	3.3	-	-	
<i>KRAS</i>	Intrón 2	rs61759635	-	c.111+116_111+120delAGTTA	1	3.3	1	3.5	0.4 ^b
		rs12228277	-	c.111+190A > T	11	37	8	27.6	
<i>TP53</i>	Exón 6	rs1800372	p.Arg213Arg	c.639A > G	-	-	1	3.5	0.69 ^c
	Intrón 7	rs12947788	-	c.782+72C > T	5	17	5	17.2	
		rs12951053	-	c.782+92T > G	5	17	5	17.2	
Total	41	-	45	-					

CCR: cáncer colorrectal; CE: cáncer de estómago; SNP: single nucleotide polymorphism.

^a Al comparar la frecuencia de polimorfismos de *APC* entre el CE y CCR.

^b Al comparar la frecuencia de polimorfismos de *KRAS* entre el CE y CCR.

^c Al comparar la frecuencia de polimorfismos de *TP53* entre el CE y CCR.

(c.4479G > A, p.Thr1493Thr) ubicado en el exón 15 del gen *APC*. Todos los polimorfismos identificados en este estudio están reportados en la base de datos de SNP²⁴.

En las muestras de CE, se encontró una sola mutación en el gen *APC* (3.5%); esta mutación fue una delección de 2 nucleótidos (AG) en la posición c.4393_4394delAG, la cual genera un codón de parada prematuro en la proteína (p.Ser1465ArgfsX9) (tabla 1). En estas mismas muestras, también se identificó el polimorfismo rs41115 con una alta frecuencia del 86.2% (25/29) (tabla 2) (fig. 1). Por el contrario, en las muestras de CCR, la frecuencia de mutaciones identificadas en *APC* fue del 26.6% (8/30). Cuatro de estas mutaciones son de tipo de cambio en el marco de lectura y las otras 4 fueron del tipo de sustitución de bases; en la tabla 1 se describen con mayor información las mutaciones detectadas (fig. 1). Al comparar la frecuencia de mutaciones en *APC*, se encontró una tendencia a una mayor frecuencia en CCR que en CE ($p=0.06$). Por otro lado, en estas muestras se identificaron 2 polimorfismos, el rs41115 con una frecuencia del 56.7% (17/30) y el rs1801166 (c.3949G > C, p.Glu1317Gln) con el 3.3% (1/30) (tabla 2).

Por otra parte, la frecuencia de mutaciones del gen *KRAS* en las muestras de CE fue del 6.9% (2/29) (tabla 1). Las mutaciones fueron 2 sustituciones de bases que ocurrieron en los codones 12 y 13; ambas mutaciones generan un cambio en la secuencia de la proteína: c.35G > A (p.Gly12Asp) y c.38G > A (p.Gly13Asp) (tabla 1, fig. 1). Además, se identificaron 2 polimorfismos en el intrón 2; el más frecuente fue el rs12228277 (c.111+190 A > T), en el 27.6% de las muestras (8/29) (tabla 2). El otro polimorfismo fue el rs61759635 (c.111+116_111+120delTAACT); se identificó en una sola muestra (3.5%) y consistió de una delección de 5 nucleótidos. La frecuencia de mutaciones de *KRAS* en las muestras del CCR fue del 13.3% (4/30) (tabla 1); todas las mutaciones detectadas fueron sustituciones de base, 3 en el codón 12 y una en el codón 13 (tabla 1). Al comparar la frecuencia de mutaciones en *KRAS* entre el CE y el CCR, no se encontraron diferencias ($p=0.69$). Al igual que en el análisis genético de *KRAS* en las muestras de CE, en el CCR se identificaron 2 polimorfismos con una alta frecuencia, del 40% (12/30); el polimorfismo más frecuente fue el rs12228277 con el 36.7% (11/30), mientras que el

polimorfismo rs61759635 se presentó en el 3.3% (1/30) (tabla 2).

Por último, en las muestras de CE se encontró una frecuencia de mutación para el gen *TP53* del 3.5% (1/29) (fig. 1). La mutación c.517G > A (p.Val173Met) se detectó en el exón 5 (tabla 1). Además, se identificaron 3 polimorfismos: uno en el exón 6, rs1800372 (c.639A > G, p.Arg213Arg) en el 3.5% y 2 polimorfismos, rs12947788 (c.782+72C > T) y rs12951053 (c.782+92T > G) en el intrón 7 que cosegregan juntos, con una frecuencia del 17.2% (5/29) (tabla 2). De forma similar a lo encontrado en las muestras de CE, en las de CCR se identificaron 2 (6.6%) mutaciones en este gen ($p=0.98$); ambas mutaciones fueron sustituciones de bases en el exón 6 y generaron un codón de parada prematuro (tabla 1). Nuevamente, se identificaron 2 polimorfismos en el intrón 7 en el 16.7% (5/30) de los casos (tabla 2).

Con relación a la histología de los casos de CE, se observó que el tipo intestinal fue el más común, con el 48.3% (14/29), seguido del difuso, 41.4% (12/29); se encontró que la mitad de los casos presentaban un estadio avanzado del cáncer (III y IV), con mayor proporción en el estadio III. De este grupo de pacientes, el 20.7% tenía metástasis. Las 4 mutaciones identificadas en CE se presentaron en los adenocarcinomas de tipo intestinal, los cuales tenían un estado avanzado de malignidad (estadio IV). La localización de los casos de CE fue principalmente en el antro, el 58.6% (17/29) (tabla 3).

En cuanto a los casos de CCR, se observó que cerca de la mitad tenían un estado avanzado del cáncer, la mayoría correspondían al estadio IV. De los 13 casos con mutaciones en los 3 genes, un alto porcentaje, 77% (10/13), fueron identificadas en adenocarcinomas bien diferenciados. En estos casos, el estadio IV fue el más común (7/13). Las mutaciones se localizaron con mayor frecuencia en el colon descendente (9/13), seguido del ascendente (3/13) (tabla 4).

En resumen, los resultados mostraron una frecuencia total de mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* mayor en el CCR (46.7%) que en la obtenida en las muestras de CE (13.3%) ($p=0.006$). En las 59 muestras tumorales analizadas no se identificaron mutaciones simultáneas en los 3 genes; solo 6 tumores (10%) contenían mutaciones en 2 genes, distribuidas así: en las muestras de CCR 3 tumores tenían mutaciones simultáneas en *APC-KRAS* y 2 tumores en

Tabla 3 Descripción general de las características clínico-patológicas y de las frecuencias de mutaciones en los 29 pacientes con CE analizados

	Total, n (%)	APC		KRAS		TP53	
		Normal, n (%)	Mutado, n (%)	Normal, n (%)	Mutado, n (%)	Normal, n (%)	Mutado, n (%)
<i>Número de pacientes</i>	29	28 (96.6)	1 (3.4)	28 (93.3)	2 (6.7)	28 (93.3)	2 (6.7)
<i>Edad (media)</i>	65.5	66.1	64	67.8	70	66.5	65
<i>Género</i>							
Femenino	8 (27.5)	7 (24.1)	1 (3.4)	7 (24.1)	1 (3.4)	8 (26.7)	-
Masculino	21 (72.4)	21 (72.4)	-	20 (69)	1 (3.4)	20 (69)	1 (3.4)
<i>Estadio del CE</i>							
I	2 (6.9)	2 (6.9)	-	2 (6.9)	-	2 (6.9)	-
II	12 (41.4)	12 (40)	-	12 (40)	-	12 (40)	-
III	9 (31)	9 (31)	-	8 (27.6)	1 (3.4)	8 (27.6)	1 (3.4)
IV	5 (17.2)	4 (13.8)	1 (3.4)	5 (16.7)	1 (3.4)	5 (16.7)	1 (3.4)
No clasificados	1 (3.3)	1 (3.3)	-	1 (3.3)	-	1 (3.3)	-
<i>Tipo histológico</i>							
Adenocarcinoma tipo intestinal	14 (48.3)	13 (44.8)	1 (3.4)	12 (41.4)	2 (6.9)	13 (44.8)	1 (3.4)
Adenocarcinoma tipo difuso	12 (41.4)	12 (41.4)	-	12 (41.4)	-	12 (41.4)	-
Adenocarcinoma tipo mixto	3 (10.35)	3 (10.35)	-	3 (10.35)	-	3 (10.35)	-
<i>Localización del tumor</i>							
Fondo	3 (10.35)	3 (10.35)	-	3 (10.35)	-	2 (6.9)	1 (3.4)
Cuerpo	9 (31)	9 (31)	-	9 (31)	-	9 (31)	-
Antro	17 (58.6)	16 (55.2)	1 (3.4)	15 (51.7)	2 (6.9)	17 (58.6)	-
<i>Metástasis</i>							
Sí	6 (20.7)	5 (16.7)	1 (3.4)	5 (16.7)	1 (3.4)	6 (20.7)	-
No	22 (75.9)	22 (75.9)	-	21 (72.4)	1 (3.4)	21 (72.4)	1 (3.4)
No determinada	1 (3.4)	1 (3.4)	-	1 (3.4)	-	1 (3.3)	-

CE: cáncer de estómago.

Tabla 4 Descripción general de las características clínico-patológicas y de las frecuencias de mutaciones en los 30 pacientes con CCR esporádico analizados

	n (%)	APC		KRAS		TP53	
		Normal, n (%)	Mutado, n (%)	Normal, n (%)	Mutado, n (%)	Normal, n (%)	Mutado, n (%)
<i>Número de pacientes</i>	30	23 (76.7)	7 (23.3)	26 (86.7)	4 (13.3)	28 (93.3)	2 (6.6)
<i>Edad, años (media)</i>	62	56	56	63	59	62.5	53
<i>Género</i>							
Femenino	19 (63.3)	12 (40)	7 (23.3)	15 (50)	4 (13.3)	17 (56.7)	2 (6.6)
Masculino	11 (36.7)	11 (36.7)	-	11 (36.7)	-	11 (36.7)	-
<i>Estadio del CCR</i>							
I	3 (10)	2 (6.6)	1 (3.3)	3 (10)	-	3 (10)	-
II	10 (33.3)	8 (26.7)	2 (6.6)	8 (26.7)	2 (6.6)	10 (33.3)	-
III	2 (6.6)	2 (6.6)	-	2 (6.6)	-	2 (6.6)	-
IV	10 (33.3)	6 (20)	4 (13.3)	9 (30)	1 (3.3)	8 (26.7)	2 (6.6)
No clasificados	5 (16.7)	5 (16.7)	-	4 (13.3)	1 (3.3)	5 (16.7)	-
<i>Tipo histológico</i>							
Adenocarcinoma bien diferenciado	17 (56.7)	12 (40)	5 (16.7)	13 (43.3)	4 (13.3)	16 (53.3)	1 (3.3)
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	7 (23.3)	6 (20)	1 (3.3)	7 (23.3)	-	6 (20)	1 (3.3)
Adenocarcinoma mucinoso	2 (6.6)	2 (6.6)	-	2 (6.6)	-	2 (6.6)	-
Carcinoma neuroendocrino	2 (6.6)	1 (3.3)	1 (3.3)	2 (6.6)	-	2 (6.6)	-
Otro	2 (6.6)	2 (6.6)	-	2 (6.6)	-	2 (6.6)	-
<i>Localización del tumor</i>							
Ascendente	6 (20)	4 (13.3)	2 (6.6)	5 (16.7)	1 (3.3)	6 (20)	-
Transverso	3 (10)	3 (10)	-	2 (6.6)	1 (3.3)	3 (10)	-
Descendente	16 (53.3)	11 (36.7)	5 (16.7)	14 (46.7)	2 (6.6)	14 (46.7)	2 (6.6)
Recto	4 (13.3)	4 (13.3)	-	4 (13.3)	-	4 (13.3)	-
Sin clasificar	1 (3.3)	1 (3.3)	-	1 (3.3)	-	1 (3.3)	-
<i>Metástasis</i>							
Sí	12 (40)	8 (26.7)	4 (13.3)	11 (36.7)	1 (3.3)	10 (33.3)	2 (6.6)
No	15 (50)	12 (40)	3 (10)	12 (40)	3 (10)	15 (50)	-
No determinada	2 (6.6)	-	2 (6.6)	-	2 (6.6)	2 (6.6)	-

CCE: cáncer colorrectal.

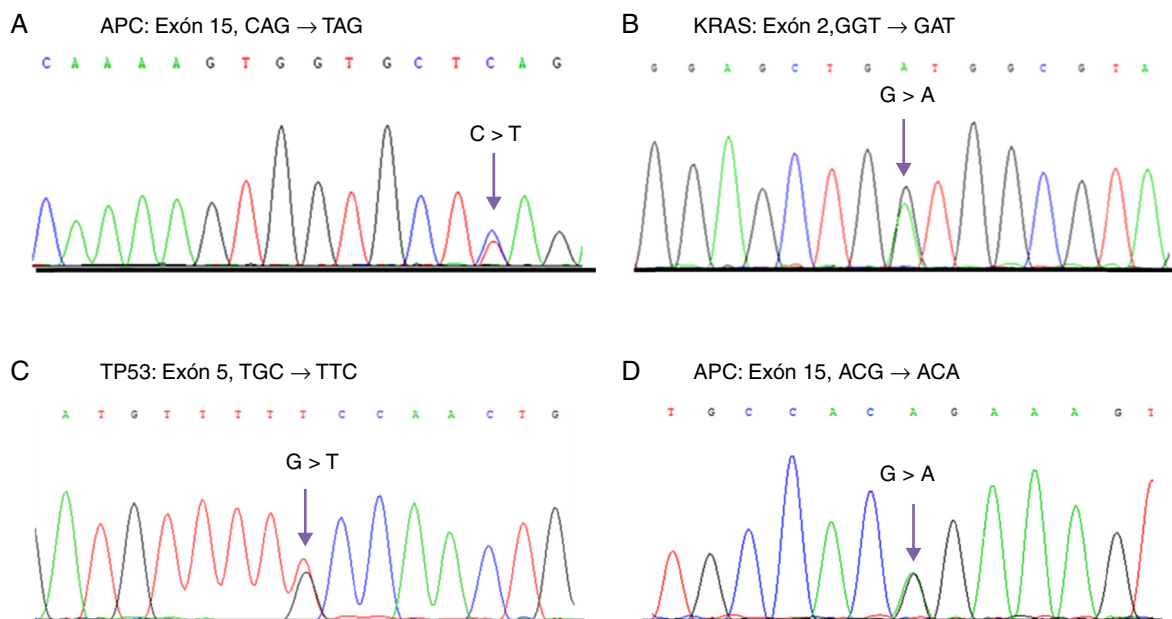


Figura 1 Cromatogramas obtenidos del secuenciamiento directo que muestra diferentes mutaciones identificadas. A) Mutación en *APC* detectada en una muestra de CCR. B) Mutación en *KRAS* identificada en muestras de CE y CCR. C) Mutación en *TP53* encontrada en un caso de CE. D) Polimorfismo p.T1493T en *APC* detectado con una alta frecuencia en pacientes con CE y CCR. Las flechas muestran el sitio del cambio de base.

APC-TP53, mientras que solo se encontró un caso de CE con mutaciones en *APC-KRAS*.

Por último, en este estudio se encontró una alta frecuencia de polimorfismos sin diferencias entre los pacientes con CE y CCR ($p=0.108$). La frecuencia total de polimorfismos para los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en las 59 muestras tumorales fue del 74.6, el 35.6 y el 35.6%, respectivamente (tabla 2).

Discusión

Este es el primer estudio de análisis de mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* que se realiza en 59 pacientes con cáncer de estómago y colorrectal en Latinoamérica. En total, se encontró que 18 (30.5%) de las 59 muestras tenían mutaciones.

En las muestras de CCR se encontró una mayor frecuencia de mutaciones de los 3 genes analizados, comparadas con las muestras de CE. Estos resultados son consistentes con los informados por otros autores^{11,25}, en los que se informan que las mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* se presentan con mayor frecuencia en CCR, de acuerdo con el modelo propuesto por Fearon y Vogelstein en la secuencia de adenoma-carcinoma^{13,21}. Por el contrario, nuestros resultados en las muestras de CE mostraron que mutaciones en estos 3 genes fueron poco comunes, similar a lo informado en otros estudios^{3,5,26,27}. De lo anterior, podría sugerirse que el CE y el CCR se desarrollan por vías genéticas diferentes, como son las alteraciones cromosómicas, la inestabilidad microsatelital y la metilación en promotores de diferentes genes y alteraciones en otros genes que están relacionados directamente con un mayor riesgo de CE.

En este estudio, el gen *APC* fue el más frecuentemente mutado de todos los genes analizados en las muestras de CCR, mientras que en las muestras de CE se encontró una baja frecuencia de mutaciones en este gen; sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa; este hallazgo es similar a los reportados por Lee et al., quienes encontraron una frecuencia del 2.5% analizando 237 muestras de CE en pacientes de Corea²⁸, y con los de Horii et al. y Yamashita et al., quienes obtuvieron unas frecuencias del 6.8 y 3.4%, respectivamente^{3,29}. Estos resultados en conjunto indican que mutaciones en el gen *APC* no son comunes en el CE; así mismo, estos trabajos indican una relación negativa entre mutaciones en *APC* y el desarrollo del CE, lo que concuerda con otros estudios en los que se informa que mutaciones en *APC* son raras en neoplasias extracolónicas. Dentro de la carcinogénesis del CE se han descrito diversas vías genéticas, como son la inestabilidad cromosómica (CIN), la inestabilidad microsatelital (MSI, que ocurre entre un 30 y 40%), mutaciones en *β-catenina* y la metilación de los genes *APC*, *MLH1* y *RPRM*^{3,6,14,15,30}. Por otro lado, en la carcinogénesis del CE se deben tener en cuenta otros factores no genéticos, como la dieta como el alto consumo de carnes rojas, alimentos ahumados y preservados con sal; la exposición a ciertos agentes medioambientales e infecciones con *H. pylori*, dado que la población colombiana presenta una alta prevalencia de infección por esta bacteria de hasta un 85%¹⁰.

Por otro lado, en las muestras de CCR, se encontró una mayor frecuencia de mutación en *APC*. Sin embargo, la frecuencia reportada en este estudio (26.7%) es menor comparada con las informadas por otros autores, que reportan mutaciones hasta del 60% cuando se analiza toda la región codificante del gen^{11,19,31,32}. En nuestro estudio, solo se analizó en exón 15 de *APC*, en el que se encuentra

la región *MCR*, y en la que ocurren con mayor frecuencia las mutaciones. También debe tenerse en cuenta que se han reportado diferencias poblacionales en la frecuencia de mutaciones de *APC*, posiblemente por la composición étnica, el tamaño de la muestra, las mutaciones por fuera de la región *MCR* y otras alteraciones genéticas en *APC*, como grandes deleciones y LOH en la región 5q21^{2,11,33,34}.

Por otra parte, en las muestras de CE y CCR analizadas se encontró una baja frecuencia de mutaciones en el gen *KRAS*. La frecuencia reportada para CE concuerda con las informadas en la literatura, que están en el rango de 0 al 10%³⁵⁻³⁷. En la población asiática, que tiene una alta incidencia de CE, también se reportan bajas frecuencias de mutación para *KRAS*³⁵. Por lo anterior, se considera que mutaciones en *KRAS* son muy raras en el CE. En las muestras de CCR, la frecuencia de mutaciones encontrada fue menor de la esperada (13.3%); en la literatura se informa de una frecuencia de mutaciones desde el 26 hasta el 50%^{31,38,39}. Sin embargo, la frecuencia de mutaciones reportada en este estudio es similar a la encontrada por Akkiprik et al. en 43 muestras de CCR esporádico, la cual fue del 12%¹⁸. En el CCR se ha observado una alta frecuencia de mutaciones de *KRAS* en adenomas colorrectales; además, se ha encontrado que las mutaciones podrían perderse a través de la selección en las células que progresan de adenoma hacia carcinoma^{31,40}.

Con respecto a las mutaciones en *TP53*, en el CCR y el CE se encontró una baja frecuencia de mutaciones, la cual está en el rango reportado en la literatura⁴¹. Sin embargo, en las muestras de CCR la frecuencia reportada en este estudio fue sorprendentemente baja comparada con las informadas en otras poblaciones, las cuales son de hasta un 50%⁴², cuando analizan toda la región codificante del gen. Nosotros evaluamos solamente los exones 5 al 8, que es la región en la que se ha identificado el mayor porcentaje de mutaciones⁴³. No obstante, no se podría excluir la presencia de mutaciones en los exones no evaluados. La diferencia en las frecuencias informadas podrían explicarse, también, por la exposición a determinados agentes carcinogénicos que inducen determinadas mutaciones puntuales en *TP53* y a otras alteraciones genéticas comunes en este gen, como son las microdeleciones y LOH en el locus 17p.13.1^{3,20,42,44-46}.

En este estudio, el análisis genético de las muestras de CCR (25 de colon y 4 de recto) reveló que todas las mutaciones detectadas ocurrieron en el colon y se presentaron con una mayor frecuencia en el colon descendente. Por el contrario, en las muestras de cáncer de recto no se encontraron mutaciones, debido posiblemente al bajo número de tumores analizados.

Por otro lado, en el presente estudio no se encontraron mutaciones simultáneas en los 3 genes analizados en las muestras de CE y CC; este resultado concuerda con otros estudios^{11,12,47}. Lo anterior se considera un evento infrecuente, especialmente en los casos de CCR esporádico, en los cuales se ha estudiado ampliamente estos genes, y en los que se reporta una frecuencia de mutación para los 3 genes menor del 7%^{11,12,47}. En solo 6 (10.2%) casos se encontraron mutaciones concomitantes en 2 genes, siendo la combinación *APC* y *KRAS* la más frecuente; estos resultados son similares con los reportados en otros estudios¹². Lo anterior, podría indicar que las mutaciones en los genes *APC* y *KRAS* ocurren en estadios tempranos del CCR y favorezcan la progresión del cáncer¹². En relación con el modelo

de la carcinogénesis del CCR esporádico, se sugiere que la acumulación de mutaciones en estos 3 genes no es un prerrequisito para el desarrollo de muchos CCR esporádicos, como lo muestra nuestro estudio y los de otros autores, y que al menos una tercera parte de los CCR no siguen este modelo secuencial^{11,12,47}. Por tal razón, se propone que las mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* ocurren por vías genéticas independientes^{12,18,19}.

Finalmente, de forma contraria a las bajas frecuencias de mutaciones encontradas en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en las muestras de CE y CCR, en este estudio encontramos una alta frecuencia de polimorfismos en los 3 genes analizados. De los 7 polimorfismos identificados en las 59 muestras analizadas, el de mayor frecuencia fue el rs41115 en el gen *APC*. Las altas frecuencias de este polimorfismo encontradas en las muestras de CE (86.2%) y de CCR (60%) podrían ser las más altas reportadas hasta el presente en estos 2 tipos de cáncer. Todos los polimorfismos identificados en este trabajo están reportados en la literatura y en la base de datos de SNP del NCBI^{24,48-52}. La asociación de estos polimorfismos con el riesgo de desarrollar cáncer aún no está bien definida⁵³.

El polimorfismo rs41115 se ha identificado en diversos tumores^{48,49,54-57}; particularmente en familias con poliposis adenomatosa familiar (FAP), se ha observado que este polimorfismo cosegrega con mutaciones germinales en *APC*, por lo que se indica que los individuos de familias con FAP podrían tener un mayor riesgo de desarrollar CCR⁵⁰. En primer lugar, es importante conocer las variantes genéticas de nuestra población, las cuales no se conocían. Por otra parte, se ha informado la asociación de estas variantes con el riesgo de desarrollar cáncer. Esta población es considerada históricamente como un aislado genético compuesto por una mezcla étnica de europeos, que constituye la mayor proporción, seguida de africanos y en menor proporción de amerindios⁵⁸; por tanto, estas variantes genéticas harían parte de la composición genética propia de esta población. Son necesarios futuros estudios para validar estos resultados con un mayor número de muestras, como también para esclarecer la asociación de los polimorfismos identificados con el riesgo de desarrollar CE y CCR.

En resumen, este es el primer estudio de análisis de mutaciones en los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* en pacientes con CE y CCR realizado en Latinoamérica. Nuestros resultados aportan información importante para el componente genético de la población colombiana, del patrón de mutaciones y polimorfismos en estos 3 genes. Los resultados de este estudio confirman datos previos de las frecuencias de mutaciones reportadas en CE, pero difieren notablemente con las encontradas en CCR, especialmente con las del *TP53*. Por último, en la carcinogénesis del CE y del CCR se describen diferentes vías genéticas, como son la *MSI*, la *CIN* y la *vía epigenética*^{3,6,14,15,30}.

Conclusión

Las frecuencias de mutaciones de los genes *APC*, *KRAS* y *TP53* fueron mayores en las muestras de CCR que en las de CE; nuestros resultados indican la existencia de diferentes vías genéticas en la carcinogénesis del CE y del CCR, y revelan un patrón de mutaciones y polimorfismos particular en los pacientes colombianos estudiados.

Financiación

Este trabajo de investigación fue financiado por la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Programa de sostenibilidad de grupos 2009-2011 Genética Médica, CPT-0917.

Conflicto de intereses

Los autores no tienen conflicto de interés en relación con el artículo que se remite para publicación.

Agradecimientos

A los pacientes, por su voluntaria participación en este trabajo, y al Hospital Universitario San Vicente Fundación y la Clínica León XIII de la ciudad de Medellín, Colombia; instituciones en las que se recolectaron las muestras de este estudio. Al Dr. Jorge Botero Garcés, por su asesoría en los análisis estadísticos.

Bibliografía

1. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, DM P. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC 2008 [consultado Oct 2013]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>
2. Bougatef K, Ouerhani S, Moussa A, et al. Prevalence of mutations in APC, CTNNB1, and BRAF in Tunisian patients with sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;187:12–8.
3. Yamashita K, Sakuramoto S, Watanabe M, et al. Genomic and epigenetic profiles of gastric cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Surg Today.* 2010;41:24–38.
4. Jemal A, Bray F, Center MM D, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69–90.
5. Smith MG, Hold GL, Tahara E, et al. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006;21:2979–90.
6. Correa P. Gastric cancer: Overview. *Gastroenterol Clin North Am.* 2013;42:211–7.
7. Catalano V, Labianca R, Beretta GD, et al. Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009;71:127–64.
8. Milne AN, Carneiro F, O'Morain C, et al. Nature meets nurture: Molecular genetics of gastric cancer. *Hum Genet.* 2009;126:615–28.
9. Bonequi P, Meneses-Gonzalez F, Correa P, et al. Risk factors for gastric cancer in Latin America: A meta-analysis. *Cancer Causes Control.* 2013;24:217–31.
10. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138:2029–43, e10.
11. Vasovcak P, Pavlikova K, Sedlacek Z, et al. Molecular genetic analysis of 103 sporadic colorectal tumours in Czech patients. *PLoS One.* 2011;6:e24114.
12. Smith G, Carey FA, Beattie J, et al. Mutations in APC, Kirstenras, and p53 —alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:9433–8.
13. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319:525–32.
14. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;361:2449–60.
15. Schneider BG, Peng DF, Camargo MC, et al. Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int J Cancer.* 2010;127:2588–97.
16. Fearhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 2001;10:721–33.
17. Jancik S, Drabek J, Radziach D, et al. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:150960.
18. Akkiprik M, Ataizi-Celikel C, Dusunceli F, et al. Clinical significance of p53, K-ras and DCC gene alterations in the stage I–II colorectal cancers. *J Gastrointest Liver Dis.* 2007;16:11–7.
19. Conlin A, Smith G, Carey FA, et al. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut.* 2005;54:1283–6.
20. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: Origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001008.
21. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61:759–67.
22. Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006;20:651–74.
23. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: The multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:675–84.
24. National Center for Biotechnology Information USNLoM, 8600 Rockville Pike BM, 20894 USA [consultado Oct 2013]. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/
25. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ.* 2004;157:327–49.
26. Lee JH, Abraham SC, Kim HS, et al. Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 2002;161:611–8.
27. Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006;12:192–8.
28. Lee J, van Hummelen P, Go C, et al. High-throughput mutation profiling identifies frequent somatic mutations in advanced gastric adenocarcinoma. *PLoS One.* 2012;7:e38892.
29. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, et al. The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Res.* 1992;52:3231–3.
30. Kawauchi S, Furuay T, Uchiyama T, et al. Genomic instability and DNA ploidy are linked to DNA copy number aberrations of 8p23 and 22q11.23 in gastric cancers. *Int J Mol Med.* 2010;26:333–9.
31. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: Molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev.* 2010;31:31–8.
32. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: Mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet.* 1992;1:229–33.
33. De la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:769–80.
34. Kim DW, Kim IJ, Kang HC, et al. Mutation spectrum of the APC gene in 83 Korean FAP families. *Hum Mutat.* 2005;26:281.
35. Lee SH, Lee JW, Soung YH, et al. BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene.* 2003;22:6942–5.
36. Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: Clinical implications. *Cancer Lett.* 2008;266:99–115.
37. Mita H, Toyota M, Aoki F, et al. A novel method, digital genome scanning detects KRAS gene amplification in gastric cancers: involvement of overexpressed wild-type KRAS in downstream signaling and cancer cell growth. *BMC Cancer.* 2009;9:198.
38. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut.* 2011;60:116–29.
39. Patil DT, Fraser CR, Plessec TP. KRAS testing and its importance in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep.* 2010;12:160–7.
40. Lawrence A, Loeb KRL, Jon P. Anderson. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;100:776–81.

41. Oki E, Zhao Y, Yoshida R, et al. The difference in p53 mutations between cancers of the upper and lower gastrointestinal tract. *Digestion*. 2009;79 Suppl 1:33–9.
42. De Moura Gallo CV, Azevedo ESMG, de Moraes E, et al. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: Current knowledge and perspectives. *Mutat Res*. 2005;589:192–207.
43. Nobili S, Bruno L, Landini I, et al. Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2011;17:290–9.
44. Herrera J, Isaza L, Ramírez J, et al. Detección de aneuploidías del cromosoma 17 y delección del gen TP53 en una amplia variedad de tumores sólidos mediante hibridación in situ fluorescente bicolor. *Biomedica*. 2010;30:390–400.
45. Ramírez G, Herrera J, Muñetón C, et al. Análisis de las aneuploidías del cromosoma 17 y delección del gen TP53 en tumores gastrointestinales por FISH-bicolor. *Rev Col Gastroenterol*. 2008;23:333–42.
46. Montenegro Y, Ramirez-Castro JL, Isaza LF, et al. [Microsatellite instability among patients with colorectal cancer]. *Rev Med Chil*. 2006;134:1221–9.
47. Samowitz WS, Slattery ML, Sweeney C, et al. APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Mol Cancer Res*. 2007;5:165–70.
48. Rocco A, Caruso R, Toracchio S, et al. Gastric adenomas: relationship between clinicopathological findings, Helicobacter pylori infection, APC mutations and COX-2 expression. *Ann Oncol*. 2006;17 Suppl 7:vii103–8.
49. Zhou XL, Eriksson U, Werelius B, et al. Definition of candidate low risk APC alleles in a Swedish population. *Int J Cancer*. 2004;110:550–7.
50. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, et al. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2044–58.
51. Berggren P, Hemminki K, Steineck G. p53 intron 7 polymorphisms in urinary bladder cancer patients and controls. *Stockholm Bladder Cancer. Group Mutagenesis*. 2000;15:57–60.
52. Phang BH, Chua HW, Li H, et al. Characterization of novel and uncharacterized p53 SNPs in the Chinese population —intron 2 SNP co-segregates with the common codon 72 polymorphism. *PLoS One*. 2011;6:e15320.
53. Wong HL, Peters U, Hayes RB, et al. Polymorphisms in the adenomatous polyposis coli (APC) gene and advanced colorectal adenoma risk. *Eur J Cancer*. 2010;46:2457–66.
54. Pizzi S, Azzoni C, Tamburini E, et al. Adenomatous polyposis coli alteration in digestive endocrine tumours: Correlation with nuclear translocation of beta-catenin and chromosomal instability. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15:1013–24.
55. Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A, et al. APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol*. 2000;156:433–7.
56. Huang SP, Ting WC, Chen LM, et al. Association analysis of Wnt pathway genes on prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:312–22.
57. Chen SP, Tsai ST, Jao SW, et al. Single nucleotide polymorphisms of the APC gene and colorectal cancer risk: A case-control study in Taiwan. *BMC Cancer*. 2006;6:83.
58. Carvajal L SI, Pineda N, Ortiz D, et al. Strong amerind/white sex bias and a possible sephardic contribution among the founders of a population in Northwest Colombia. *Am J Hum Genet*. 2000;67:1287–95.