

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Determinación de las frecuencias alélicas de las variantes
polimórficas: intrón 3, intrón 6 y codón 72 del gen
supresor de tumores tp53 en dos muestras poblacionales
del departamento de Lima- Perú**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista

AUTOR

Francisco José Melchor Sánchez Pinto

ASESORA

Margarita Velásquez Reinoso

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

A Dios, por ser la luz hacia un camino prometedor; a mis padres y hermanos por todo su cariño y apoyo en mi vida

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Investigación fue realizado en el Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, gracias al Financiamiento del Vicerrectorado de Investigación de esta casa de estudio a través de los proyectos Con N° 141001191 y N° 151001271.

Quiero agradecer a mi asesora de tesis, Margarita Velásquez Reinoso, por los consejos, asesoría y el tiempo otorgado durante el proceso de este trabajo. Al M.Sc. Jaime Descailleaux, Jefe del Laboratorio de Genética Humana por permitirme formar parte del área que me apasiona y las respuestas precisas ante las incertidumbres.

A los compañeros del Laboratorio de Genética Humana, especialmente a Karina Milla y Nataly Marruffo por enseñarme las técnicas básicas de la Biología Molecular.

A los miembros del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, en especial a la doctora Ana Protzel, los biólogos Mariela, Gladys, Merita, Doris, y los licenciados Anita, Luis y Edwin del Servicio de Genética por sus consejos y comprensión que han tenido para la redacción de la tesis; a los doctores Ausberto Chunga y Percy Ortiz, así como a los licenciados Elmer, Carolina, Arturo, Alejandro, César, Luz y Lucy, encargados del servicio de Banco de Órganos y Biología Molecular, por su ayuda constante en mi aprendizaje profesional.

A los donantes de muestra, estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM y de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión de la ciudad de Huacho, quienes con su participación hicieron posible que este estudio se lleve a cabo.

A mi familia por el cariño y comprensión, y a todas las personas que participaron con su desinteresado apoyo.

ABREVIATURAS

APS	Ammonium persulfate (Persulfato de amonio)
Bcl-2	B – cell lymphoma 2 (Células B de linfoma tipo 2)
bp	Base pairs (Pares de bases)
CTRD	C-terminal regulator domain (Dominio regulador C – terminal)
DBD	DNA binding domain (Dominio de unión al DNA)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates (Desoxinucleótidos trifosfatos)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
HCD	Highly conserved domain (Dominio altamente conservado)
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MDM 2	Mouse double minute 2 (Miniatura doble de ratón tipo 2)
NES	Nuclear export signal (Señal de exportación nuclear)
NLS	Nuclear localization sequence (Secuencia de localización nuclear)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de nucleótido simple)
TBE	Tris/Borate/EDTA (Tris / Borato / EDTA)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (N,N,N'-Tetrametiletildiamina)
TET	Tetraciclina estable transfectada

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Transformación neoplásica y la progresión tumoral	
2.2 Oncogenes	5
2.3 Genes supresores de tumores.....	6
2.4 Gen <i>TP53</i>	6
2.5 Estructura y función de la proteína p53	7
2.6 Alteraciones de la secuencia del gen <i>TP53</i>	9
2.6.1 Mutaciones asociadas a tumores.....	9
2.6.2 Mutaciones en la línea germinal <i>TP53</i>	10
2.6.3 Polimorfismos de la línea germinal <i>TP53</i>	10
2.7 Regulación y activación de la proteína p53.....	11
2.8 Polimorfismos del gen <i>TP53</i>	13
2.9 Polimorfismos en secuencias no codificantes del gen <i>TP53</i>	14
2.10 Polimorfismos sinónimos y no sinónimos en secuencias codificantes del gen <i>TP53</i>	16
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Material biológico.....	20

5.1.1 Población analizada.....	20
5.1.2 Tamaño de la muestra.....	20
5.1.3 Recolección de datos.....	21
5.1.4 Toma de muestra.....	21
5.2 Materiales de laboratorio	22
5.2.1 Reactivos.....	22
5.2.2 Equipos	23
5.4.3 Insumos.....	23
5.3 Metodología experimental	24
5.3.1 Extracción y purificación del DNA	24
5.3.2 Cuantificación del DNA.....	24
5.3.3 Calidad del DNA	25
5.3.4 Amplificación del DNA	25
5.3.5 Digestión del DNA	26
5.3.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida de los amplificados y productos de digestión y coloración de geles.....	27
5.3.7 Análisis de los geles de poliacrilamida.....	28
5.3.8 Determinación de las frecuencias alélicas en cada muestra poblacional ...	29
5.3.9 Análisis de equilibrio genético y heterocigocidad	30
5.3.10 Diferenciación poblacional	30
6. RESULTADOS.....	31
6.1 Banco de muestras del DNA.....	31
6.2 Estandarización de las condiciones de amplificación.....	34

6.3 Identificación de alelos	35
6.4 Genotipos	37
6.5 Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio genético	41
6.6 Diferenciación poblacional	44
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	53
9. RECOMENDACIONES	54
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
11. ANEXOS	67

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. Nº 1. Vías y genes implicados en el cáncer.....	5
Fig. Nº 2. Estructura de la proteína p53.....	8
Fig. Nº 3. Vía de regulación de la proteína p53.....	12
Fig. Nº 4. SNPs del gen <i>TP53</i>	14
Fig. Nº 5. Determinación de la calidad del DNA.....	34
Fig. Nº 6. Amplicón de la variante intrón 3 del gen <i>TP53</i>	35
Fig. Nº 7. RFLPs de la variante intrón 6 del gen <i>TP53</i>	36
Fig. Nº 8. RFLPs de la variante codón 72 del gen <i>TP53</i>	36

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA N° 1. Secuencia de cebadores del intrón 3, intrón 6 y codón 72 del gen <i>TP53</i>	22
TABLA N° 2. Composición de los geles de poliacrilamida al 6 %.....	28
TABLA N° 3. Composición y cantidades de las soluciones empleadas para realizar la tinción del gel de poliacrilamida al 6 %.....	28
TABLA N° 4. Pureza (260/280) y concentración de las 58 muestras del DNA de la muestra de Lima.....	32
TABLA N° 5. Pureza (260/280) y concentración de las 37 muestras del DNA de la muestra de Huacho.....	33
TABLA N° 6. Genotipos para la variante intrón 3 del gen <i>TP53</i> de la muestra de Lima.....	37
TABLA N° 7. Genotipos para la variante intrón 6 del gen <i>TP53</i> de la muestra de Lima.....	38
TABLA N° 8. Genotipos para la variante codón 72 del gen <i>TP53</i> de la muestra de Lima.....	39
TABLA N° 9. Genotipos para la variante intrón 3 del gen <i>TP53</i> de la muestra de Huacho.....	40
TABLA N°10. Genotipos para la variante intrón 6 del gen <i>TP53</i> de la muestra de Huacho.....	40
TABLA N°11. Genotipos para la variante codón 72 del gen <i>TP53</i> de la muestra de Huacho.....	41
TABLA N°12. Frecuencias alélicas para las variantes intrón 3, intrón 6 y codón 72, en las muestras de Lima y Huacho.....	42
TABLA N° 13. Heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e) de las tres variantes del gen <i>TP53</i> en las muestras de Lima y Huacho.....	42

TABLA Nº 14. Frecuencias genotípicas e individuos observados y esperados para las variantes del intrón 3, intrón 6 y codón 72 de la muestra de Lima.....	43
TABLA Nº 15. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para las variantes del intrón 3, intrón 6 y codón 72 de la muestra de Huacho.....	44
TABLA Nº16. Diferenciación genética entre las muestras de Lima y Huacho	44
TABLA Nº 17. Diferenciación poblacional de la muestra de Lima y Huacho para las tres variantes polimórficas.....	45

RESUMEN

El gen *TP53* codifica una proteína de 53 kDa con importante función reguladora en procesos celulares como la proliferación, muerte celular y preservación del material genético. Polimorfismos de este gen presentan una alta diversidad en la distribución de las frecuencias alélicas entre grupos étnicos y han sido relacionados con la susceptibilidad al cáncer. Utilizando la técnica de PCR-RFLP, se determinó las frecuencias alélicas de los polimorfismos intrón 3, intrón 6 y codón 72 en 58 estudiantes de la UNMSM (Lima) y 37 de la Universidad José Faustino Sánchez Carrión (Huacho). Se estimó la frecuencia génica y genotípica con el programa estadístico SPSS 11.5; y con el programa Arlequín versión 3.5, a través del índice de Nei, se estableció el grado de diferenciación genética entre ambas poblaciones al considerar el intrón 3, intrón 6 y codón 72, que resultó 1.793, 1.141 y 0.323 respectivamente. Ambas poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$) para los tres polimorfismos. En el codón 72, la frecuencia alélica para prolina resultó 30.1 % en la muestra de Lima y 29.7 % en la muestra de Huacho. La frecuencia del alelo para la arginina fue 69,8% para Lima y 70,2% en la de Huacho. Con relación al intrón 6, la frecuencia alélica para W en la de Lima fue 98.2 % y 81 % en la de Huacho. En contraste con el alelo M se obtuvo una frecuencia alélica de 1.7 % para la población estudiada de Lima y 18.9 % en la de Huacho. De otro lado, para el intrón 3 la frecuencia alélica W fue 94.6 % para Lima y 90 % para Huacho. En cambio la frecuencia alélica para M en los de Lima fue de 5.3 % y 10 % en los de Huacho. Se destaca el predominio del alelo Arg en el codón 72 para ambas poblaciones analizadas; así como el alelo W tanto en el intrón 6 como en el intrón 3. La comparación con las frecuencias alélicas de origen africano y asiático reveló diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.001$); sin embargo, se observó una similitud con las poblaciones amerindias y caucásicas.

PALABRAS CLAVE: gen *TP53*, polimorfismo Arg72Pro, intrón 6, intrón 3, poblaciones peruanas

ABSTRACT

The *TP53* gene encodes a protein of 53 kDa with important regulatory role in cellular processes such as proliferation, cell death and preservation of genetic material. Polymorphisms of this gene have a high diversity in the distribution of allele frequencies between ethnic groups and have been linked to cancer susceptibility. By studying PCR-RFLP, was determined the allele frequencies of the polymorphisms, intron 3, intron 6 and codon 72 in 58 students of the University of UNMSM (Lima) and 37 at the University of Jose Faustino Sanchez Carrion. The Allelic and genotypic frequency was measured with the SPSS 11.5 statistical program; and with the Arlequin program ver. 3.5, through Nei index, was established the degree of genetic differentiation between the two populations by considering the intron 3, intron 6 and codon 72, which resulted in 1.793, 1.141 and 0.323 respectively. Both populations are in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$) for the three polymorphisms. At codon 72, the allele frequency for proline was 30.1 % in the sample of Lima and 29.7 % in the sample of Huacho. The allele frequency for arginine was 69.8 % for Lima and 70.2 % in Huacho. Regarding the intron 6, the allele frequency for W in Lima was 98.2 % and 81 % in Huacho. In contrast for the M was obtained an allelic frequency of 1.7 % for the studied population of Lima and 18.9 % in Huacho. On the other hand, for the intron 3 the allele frequency for W was 94.6 % for Lima and 90 % in Huacho. In contrast, the allele frequency for M in Lima was 5.3 % and 10 % in Huacho. The dominance of the Arg allele at codon 72 for both populations analyzed is highlighted; and the W allele both intron 6 and intron 3; and the W allele both intron 6 and intron 3. The comparison of allele frequencies of African and Asian descent revealed statistically significant differences ($p < 0.001$); however, was observed a similarity with American and Caucasian populations.

KEY WORDS: *TP53* gene polymorphism Arg72Pro, intron 6, intron 3, Peruvian populations

1. INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares son las evidencias de un cambio o mutación ocurrido en el material hereditario y que son utilizados en muchos campos de la biología como evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de diversidad; para localizar y aislar genes de interés (Simpson, 1997). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante. En la actualidad existen varios marcadores moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales, sea de manera indirecta con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de DNA (Pérez de la Vega, 1993).

El análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) fue la primera herramienta molecular utilizada por biólogos poblacionales (Parker *et al.*, 1998). A través de esta metodología se expresa diferencias específicas del DNA que fueron reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Cada una de las endonucleasas (de origen bacteriano), reconoce y corta solamente una secuencia determinada de bases nitrogenadas en el DNA, siempre y cuando éstas no estén protegidas (metiladas). Por consiguiente cualquier DNA que no esté metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez y Kahl, 2000). Estos RFLPs, han sido extensamente estudiados y utilizados como marcadores pronósticos y predictivos, por lo que la presencia o ausencia de un marcador puede ser útil para la selección de pacientes para un tratamiento (Botstein *et al.*, 1980).

Desde años atrás, se está investigando sobre algunas proteínas en la predisposición a desarrollar diferentes tipos de cáncer (Ponder, 1991). Una de las proteínas predilectas es la p53, considerada como “el guardián del genoma”, la cual es codificada por el gen *TP53*, debido a su papel en la conservación de la estabilidad del genoma mediante el control del ciclo celular (Bourdon *et al.*, 2005). Una proteína p53 defectuosa podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado el cáncer, donde alrededor de un 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en esta proteína (Kumar *et al.*, 2009).

El gen *TP53* posee principalmente tres polimorfismos: el intrón 3, el intrón 6 (Khaliq *et al.*, 2000) y el codón 72 del exón 4 (Bonafe *et al.*, 2003), que han sido asociados con el riesgo de desarrollo de cáncer.

En el presente trabajo de investigación se determinó la distribución de las frecuencias alélicas de los tres marcadores del gen *TP53* en dos muestras poblacionales del departamento de Lima, 58 estudiantes de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) y 37 estudiantes de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión (UNJFSC) de Huacho. Se estimó las variantes génicas y genotípicas de los polimorfismos de gen *TP53* con la finalidad de determinar la incidencia del alelo más frecuente para el intrón 3, intrón 6 y el codón 72, y así relacionarlo con otras poblaciones estudiadas mundialmente, la cual nos va permitir establecer una base de datos para ser utilizadas posteriormente como herramientas preventivas en la predisposición al riesgo del cáncer.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Transformación neoplásica y la progresión tumoral

Cuando la estabilidad normal de la organización de tejidos y órganos se altera, pueden surgir diversos estados de enfermedad. Un tumor o neoplasia es un ejemplo de tal tejido en el que el control del crecimiento se vuelve defectuoso. Las neoplasias se pueden definir como benignas o malignas basándose en su probabilidad de propagación. Los tumores malignos a menudo invaden los tejidos vecinos e incluso otras partes del cuerpo, y por lo tanto pueden llegar a ser letales (Cooper, 1992).

En la mayoría de casos, los tumores malignos se desarrollan a partir de una única célula progenitora, cuando ésta ha sufrido una serie de cambios acumulativos irreversibles (permanentes y hereditarios) en un proceso denominado transformación neoplásica. Hay dos características generales de las células transformadas: un crecimiento incontrolado y su extensión. La propagación de las células cancerosas a los tejidos vecinos se llama invasión; la propagación a órganos distantes se designa con el nombre de metástasis. El término metástasis es utilizado para referirse a los nódulos tumorales que se implantan en sitios distantes del tumor original (Becker *et al.*, 1996).

El cáncer es una enfermedad genética que resulta de mutaciones en células somáticas (Alberts *et al.*, 2002). Varias líneas de investigación sobre el cáncer evidencian que la inestabilidad genómica que causa la carcinogénesis en los seres humanos tiene múltiples pasos (Schmitt *et al.*, 2012), generadas por las alteraciones genéticas que impulsan la progresiva transformación de células humanas normales en derivados altamente malignos (Hanahan *et al.*, 2000).

Algunas células cancerosas son defectuosas en la capacidad de reparar el daño del DNA local o para corregir errores de replicación que afectan nucleótidos individuales. Estas células tienden a acumular más mutaciones puntuales con el propósito de convertirlas en células normales (Facista *et al.*, 2012). Otras células cancerosas no pueden mantener la integridad de sus cromosomas adecuadamente y por consiguiente muestran anormalidades graves en su genoma (Alberts *et al.*, 2002).

Las células deben proteger la integridad de su genoma para evitar la transmisión de mutaciones deletéreas por las células hijas y la acumulación de mutaciones de los genes de las células de control en la proliferación desmedida. Aunque hay muchas estrategias en las células para proteger la integridad genómica, el DNA celular es constantemente expuesto por sustancias mutagénicas de fuentes endógenas y exógenas (Huang *et al.*, 2003). La replicación del DNA, la transcripción de genes, el sistema de reparación del DNA y puntos de control del ciclo celular, deben estar interconectados para promover la supervivencia celular después del daño en el DNA y proteger la integridad de los cromosomas. Una muy coordinada respuesta al daño en el DNA es la activación de las vías apropiadas de reparación y la detención reversible en puntos de control del ciclo celular. La interrupción del ciclo celular otorga el tiempo para que la reparación se complete (Levitt *et al.*, 2002).

Todos los genes cuya mutación puede conducir al cáncer son genes cancerígenos críticos (Alberts *et al.*, 2002). Estos genes se clasifican en dos grupos de acuerdo a que si la mutación causa la pérdida de la función o si conduce al aumento de la función: oncogenes y genes supresores de tumores respectivamente. En la Figura 1 se resume las vías y genes implicados en el cáncer.

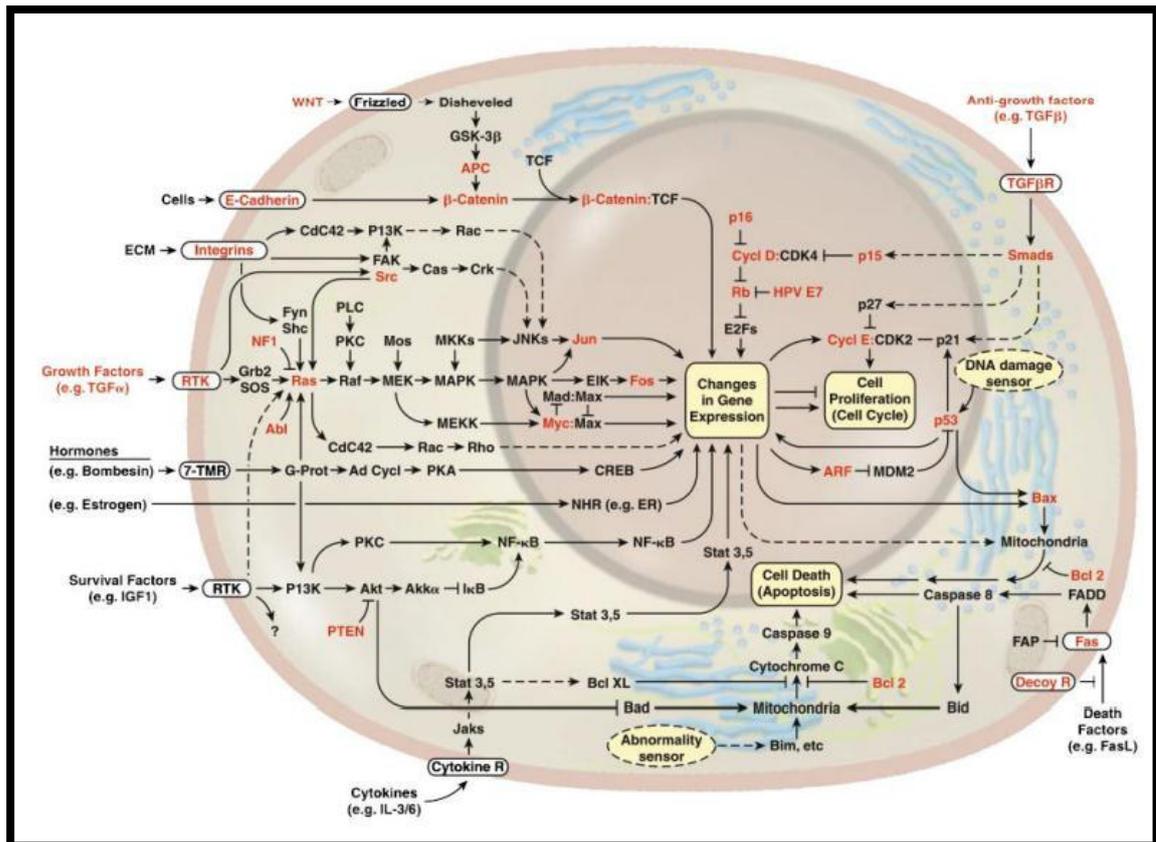


Figura 1. Vías y genes implicados en el cáncer. El progreso de las vías de señalización del cáncer está diseñado por circuitos integrados de proteínas como factores de transcripción, hormonas, quinasas y fosfatasas; como también de un espectro de señales extracelulares. Algunos de los genes (resaltados en rojo), que están alterados funcionalmente; como la proteína supresora de tumores p53, conduce a un rápido crecimiento de las células tumorales. Tomado de Hanahan *et al.*, 2000

2.2 Oncogenes

Un oncogén es un gen que tiene el potencial de causar cáncer y en las células tumorales a menudo es expresado en niveles altos (Wilbur, 2009). En cambio, los genes que por mutaciones son susceptibles al aumento de su capacidad para proliferar, extender y dividirse cuando no deberían, son denominados proto-oncogenes (Weinstein y Joe, 2006), la cual por variaciones perjudiciales de un alelo de un gen normal activan el oncogén (Alberts *et al.*, 2002). Hay diferentes tipos de alteraciones genéticas que pueden activar proto-oncogenes para convertirse en oncogenes. El gen puede ser alterado por un pequeño cambio en la secuencia tal como una mutación

puntual, o por un cambio a gran escala tales como delección parcial, o translocación cromosómica que implica el quiebre posterior del cromosoma. Estos cambios pueden ocurrir en la región codificante de la proteína originando un producto hiperactivo o en regiones de control adyacentes, de manera que el gen es simplemente expresado en concentraciones mayores de lo normal. Alternativamente, el gen crítico del cáncer puede ser sobreexpresado porque están presentes copias adicionales debido a eventos de amplificación de genes causados por errores en la replicación del DNA (Lewin *et al.*, 2004).

2.3 Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores protegen a las células de un crecimiento y división desregulada. Hay dos tipos de genes supresores de tumores, los denominados '*gatekeepers*' y los '*caretakers*' (Levitt *et al.*, 2002). Los genes *gatekeepers* actúan directamente para regular la proliferación celular y son limitantes de la velocidad en la carcinogénesis. Los genes *caretakers* no regulan directamente la proliferación, solo cuando la mutación conduce a la transformación acelerada de una célula normal a una célula neoplásica (Oesterreich *et al.* 1999).

El supresor de tumores más importante es el gen *TP53* que codifica la proteína p53, considerado el guardián celular (*gatekeeper*) para el crecimiento y división. Más de la mitad de todos los cánceres humanos han perdido esta proteína p53 o tienen células con mutaciones en el gen *TP53* (Lewin *et al.*, 2004).

2.4 Gen *TP53*

En los seres humanos, el gen *TP53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1) y abarca 20 kb (Matlashewski *et al.*, 1984). El gen proporciona instrucciones

para desarrollar una proteína llamada p53, que actúa como un supresor de tumores, regulando la división celular, con la finalidad que las células crezcan y se dividan de manera controlada (McBride *et al.*, 1986).

2.5 Estructura y función de la proteína p53

La proteína humana p53 está involucrada en un amplio espectro de eventos celulares que van desde la regulación de glicólisis y autofagia, reparación del daño del DNA, supervivencia celular y regulación del estrés oxidativo, angiogénesis, diferenciación, proliferación, muerte y senescencia celular, hasta la remodelación ósea (Bensaad *et al.*, 2007). Para ello, interactúa directamente con el DNA (como factor de transcripción) conjuntamente con una variedad de proteínas; además de ser el blanco de diversas vías de señalización, a través de las cuales se regula su actividad.

La proteína p53 tiene cinco dominios (Figura 2):

1. Dominio de transactivación, entre los aminoácidos 1 y 42 del extremo amino-terminal, a través del cual interactúa con la proteína diana de ubiquitinación (MDM2). Contiene un dominio (I), de alta conservación evolutiva (HCD).
2. Dominio rico en prolina, conservado en la mayoría de las especies. Localizado entre los aminoácidos 40 y 92, contiene a su vez un segundo dominio de transactivación.
3. Dominio de unión al DNA (DBD), entre los aminoácidos 101 y 300. Comprende las regiones de alta conservación evolutiva (HCD) II, III, IV y V, lo que explica similitud de funciones entre especies. Es el sitio de ocurrencia del 90 % de las mutaciones halladas en los tumores cancerosos humanos.
4. Dominio de oligomerización, entre los aminoácidos 301 y 355. Contiene una región de tetramerización (TET), con secuencias aminoácidos señalizadoras de la localización nuclear (NLS) o citosólica (NES) de la proteína. Su estructura secundaria corresponde a una lámina β , seguida por una α -hélice, necesaria para la dimerización de p53.

5. Dominio carboxi-terminal, extendido entre los aminoácidos 356 y 393. Con tres señales NLS y un dominio que reconoce sitios de daño del DNA, este dominio también está implicado en la actividad de regulación negativa del dominio de unión con el DNA localizado entre los aminoácidos 101 y 300.

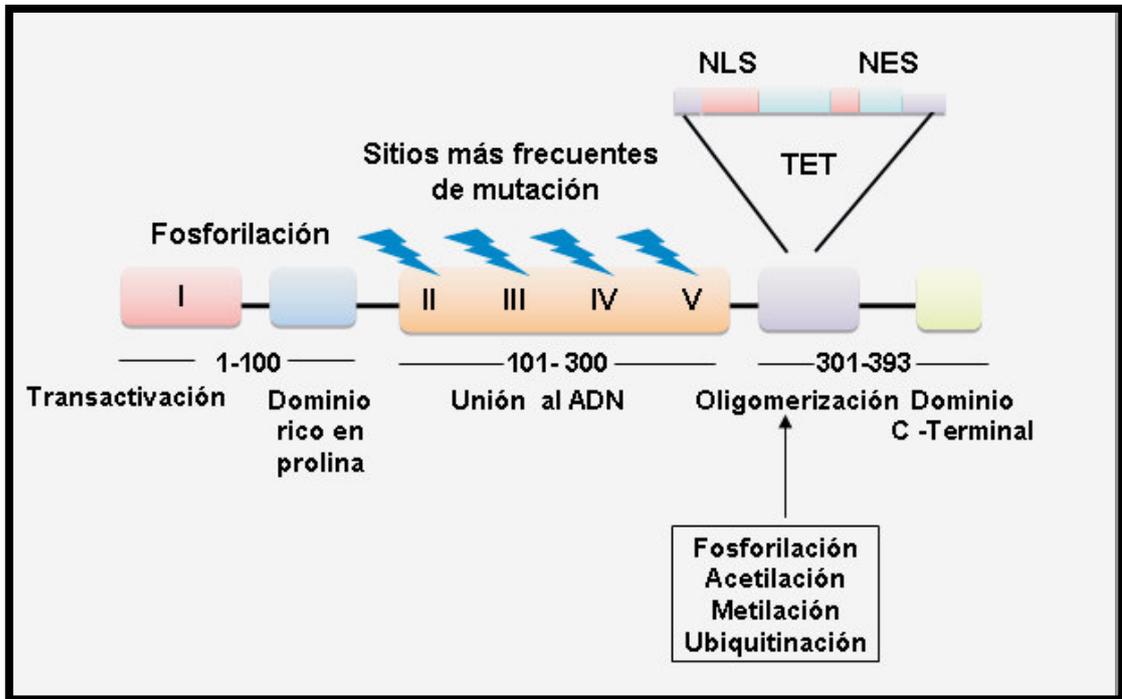


Figura 2. Estructura de la proteína p53. Las regiones I, II, III, IV y V son consideradas dominios de alta conservación evolutiva (HCD). Tomado de Chuaire *et. al* 2008.

El mecanismo mejor documentado por el cual p53 ejerce su función de protección es un factor de transcripción. Mediante la unión a elementos de respuesta específicos en el DNA, p53 modula la transcripción de genes que gobiernan las principales defensas contra el crecimiento del tumor, que incluyen la detención del ciclo celular, apoptosis, mantenimiento de la integridad genética, la inhibición de la angiogénesis y la senescencia celular (Vogelstein *et al.*, 2004). La proteína p53 también interactúa con numerosas proteínas celulares, incluyendo varias que controlan la muerte celular

programada, y estas interacciones moleculares podrían contribuir al papel inhibidor de p53 en la carcinogénesis (Erster *et al.*, 2004).

El mal funcionamiento de la vía p53 es un sello distintivo casi universal de tumores humanos (Vousden *et al.*, 2007). La mutación somática del gen *TP53* que se traduce en la ausencia o disfunción de la proteína p53 es uno de los mecanismos más comunes por los que la vía de p53 se daña durante la tumorigénesis. La pérdida directa de la funcionalidad correcta de p53 también se asocia con un pronóstico desfavorable en algunos tipos de cáncer (Petitjean, *et al.*, 2007).

2.6 Alteraciones de la secuencia del gen *TP53*

Existen tres grupos distintos de alteraciones de la secuencia en el locus *TP53* las cuales se denominan como mutaciones asociadas a tumores, mutaciones de la línea germinal Li-Fraumeni y polimorfismos de la línea germinal.

2.6.1 Mutaciones asociadas a tumores

Las mutaciones asociadas a tumores en los cánceres esporádicos surgen en las células somáticas, tanto de forma espontánea, como por consecuencia de daños en el DNA. Las mutaciones encontradas en la carcinogénesis, son por lo general, sustituciones de una sola base que dan lugar a cambio de aminoácidos en el dominio de unión al DNA de p53 (mutaciones de sentido erróneo). Típicamente, las proteínas p53 asociadas a tumores mutantes han perdido la mayor parte o la totalidad de las funciones de p53 normales. Aunque la mutación en *TP53* es un mecanismo frecuente por el cual la función de p53 se pierde en la tumorigénesis, en algunos tipos de cáncer otras rutas prevalecen, tales como la amplificación de genes de reguladores negativos claves de la p53 (Whibley *et al.*, 2009).

2.6.2 Mutaciones en la línea germinal *TP53*

Las mutaciones en la línea germinal *TP53* se encuentran en las personas con síndrome de Li-Fraumeni, que confiere un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer, incluyendo sarcomas, cáncer de mamas y cerebrales así como tumores adrenocorticales, a una edad temprana de inicio (Malkin *et al.*, 1993).

Como en el caso de mutaciones asociadas a tumores somáticos, las mutaciones de Li-Fraumeni son más a menudo base de sustituciones silenciosas en el DBD, y codifican proteínas defectuosas (Whibley *et al.*, 2009).

2.6.3 Polimorfismos de la línea germinal *TP53*

A diferencia de las mutaciones asociadas con el síndrome de Li-Fraumeni o mutaciones somáticas asociados a tumores, ciertas variantes polimórficas de la línea germinal *TP53*, las cuales están representadas por un cambio nucleotídico de un fragmento influyente en la actividad del gen, afectan sus propiedades estructurales o bioquímicas para convertirse en proteínas mutantes p53 (Thomas *et al.*, 1999), aumentando la posibilidad de que la variación pueda causar directamente susceptibilidad individual al cáncer, aunque los efectos de estas variantes son probablemente más sutiles que los de las mutaciones de p53 asociados con el cáncer o el síndrome de Li-Fraumeni (Bougeard, *et al.*, 2006).

Dependiendo de la mutación, diferentes elementos de respuestas mediadas por p53 normales se pueden perder y algunos mutantes pueden obtener nuevas funciones de tipo no silvestre. Las propiedades oncogénicas de las proteínas p53 mutantes con ganancia de función están actualmente bajo investigación intensiva debido a una comprensión en profundidad de los mecanismos moleculares que podría en última instancia, tener beneficios en la medicina clínica (Olivier, *et al.*, 2008).

Una lección importante de las bases de datos de mutaciones de p53 asociados a tumores humanos es que *TP53* es inusualmente vulnerable a una amplia gama de

alteraciones de nucleótidos individuales que comprometen la función de la proteína de tipo silvestre y puede incluso conferir nuevas actividades oncogénicas. Esto plantea la posibilidad de que al menos algunos de los polimorfismos de la línea germinal de *TP53*, en poblaciones sanas, también podrían afectar la función de la p53. A pesar del hecho de que sólo una pequeña fracción de las muchas variaciones de las secuencias polimórfica en los loci de genes en el genoma humano (la mayoría de los cuales son intrónica) son propensos a tener alguna de las manifestaciones fenotípicas asociadas al cáncer. Características que sugieren una potencial consecuencia fenotípica, son los polimorfismos en la secuencia de codificación que alteran la secuencia de aminoácidos, o variantes que afectan los niveles de expresión; por ejemplo, los polimorfismos en promotores, sitios de empalme, regiones no traducidas (UTRs) o elementos de unión a proteínas. La identificación de polimorfismos que tienen un pequeño efecto sobre el riesgo de cáncer requiere un enfoque multidisciplinario, que incluye los estudios moleculares e investigaciones basadas en la población mediante secuenciación de alto rendimiento y la cartografía SNP de alta resolución (Whibley *et al.*, 2009).

2.7 Regulación y activación de la proteína p53

Los niveles de p53 son la clave para su actividad y están estrechamente controlados en la célula, en gran medida por modificaciones covalentes (Kruse *et al.*, 2008). Al menos 50 enzimas diferentes pueden modificar a través de la fosforilación, acetilación, ubiquitinación y la metilación de residuos específicos, la actividad de la proteína p53 (Appella *et al.*, 2001). En condiciones celulares normales, la MDM 2 reprime la p53 mediante la unión de secuestro y por ubiquitinación de p53, dirigido por la degradación; por lo que el daño en el DNA, el estrés oxidativo y la activación de oncogenes son algunos de los procesos que pueden activar la p53 por una gama de reguladores. Los niveles basales de p53 en las células que están experimentando

bajos niveles de estrés también pueden afectar a la fisiología celular (Figura 3). En altos niveles de estrés, las interacciones entre MDM2, p53 y MDM4 son interrumpidas por modificaciones post-traduccionales de estas proteínas. Esto permite la activación de la p53 para actuar como un factor de transcripción, activando o reprimiendo genes implicados en la apoptosis, la detención del ciclo celular y la senescencia. La proteína p53 también se puede mover a la mitocondria, donde interactúa físicamente con los miembros de la familia Bcl-2 para formar poros en la membrana mitocondrial, lo que conduce a la liberación de citocromo *c* y la posterior apoptosis (Di Agostino *et al.*, 2006).

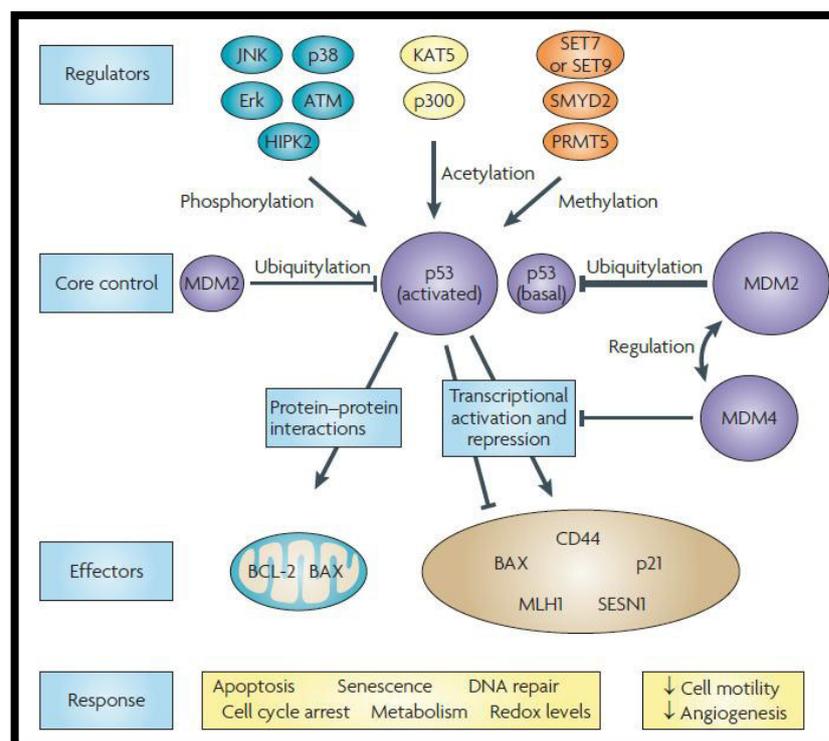


Figura 3. Vía de regulación de la proteína p53. En condiciones normales, el regulador negativo MDM 2, se une al dominio transactivación de la proteína p53 y la ubiquitina para su degradación. El daño del DNA o la activación de oncogenes provocan un aumento de los niveles de la p53, la cual actúa como un factor de transcripción. La proteína p53 también puede desplazarse hacia la mitocondria, donde interactúa con los miembros de la Bcl -2 para formar poros en la membrana mitocondrial, lo que conduce a la liberación de la citocromo *c* y la posterior apoptosis.. Algunos de los más intensamente estudiados activadores, reguladores y efectores de p53 se muestran en la figura. ATM, ataxia-telangiectasia; BAX, Bcl-2-asociado a la proteína X; HIPK2, homeodominio de interacción de la proteína quinasa 2; JNK, quinasa Jun N-terminal; KAT5, K (lisina) acetiltransferasa 5; MLH1, Mutl proteína homóloga 1; PRMT5, proteína arginina metiltransferasa 5; SESN1, Sestrina tipo 1; SMYD2, dominio SET y MYND tipo 2. Tomada de Frazer *et al.*, 2007.

2.8 Polimorfismos del gen *TP53*

En el genoma humano, en el que más de 3,1 millones de variaciones de la secuencia han sido asignadas, y que representan entre el 25-35% de los SNPs totales estimados (Frazer *et al.*, 2007), numerosos SNPs y otras variaciones de la secuencia han sido encontrados en el gen *TP53*, las cuales se encuentran en el dominio de transactivación, dominio rico en prolina, dominio de unión al DNA, dominio de oligomerización y dominio C-terminal (CTRD).

Los polimorfismos exónicos son indicados en la proteína estructural, como polimorfismos no sinónimos que en la Figura 4 están representados en color rojo y las regiones intrónicas se encuentran debajo de la estructura de la proteína. La mayoría de estas variaciones son intrónicas y se puede presumir que no hay consecuencias biológicas relacionadas con el cáncer. Algunos del total de polimorfismos p53 han sido evaluados para la función bioquímica y/o biológica alterada, o por sus efectos sobre el riesgo de cáncer en estudios de población (Kato *et al.*, 2003).

Es un desafío permanente encontrar criterios adecuados para la selección de variantes que son dignas de evaluación en estudios de laboratorio o de idear métodos para detectar elementos de asociación genética que influyen en la actividad funcional de la proteína p53 (Whibley *et al.*, 2009).

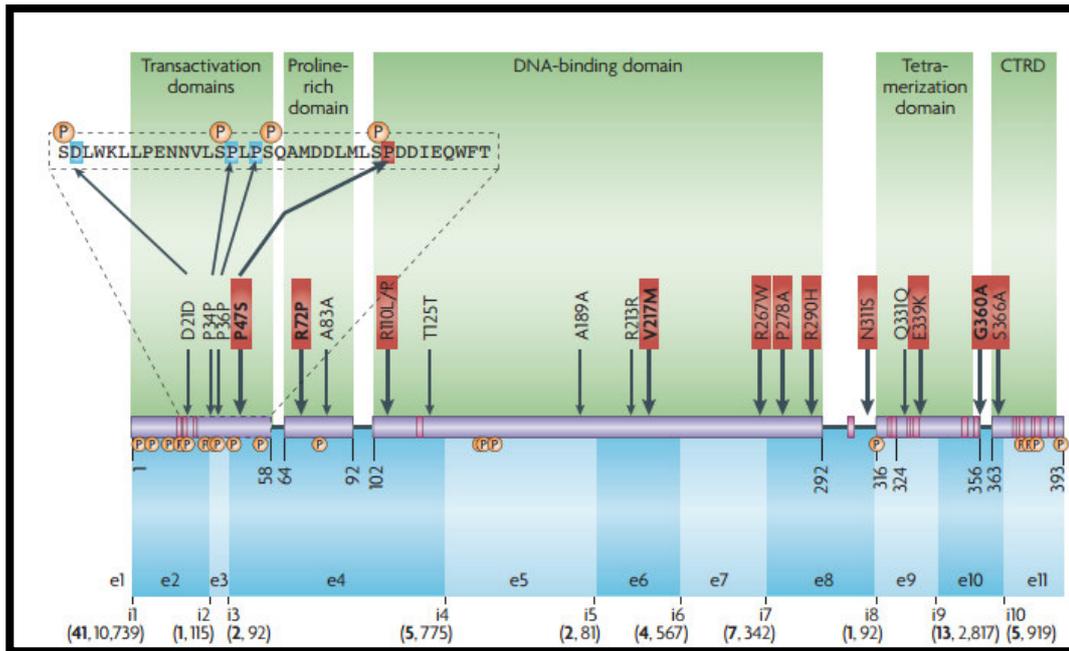


Figura 4. SNPs del gen *TP53*. Localización en la proteína p53 y del DNA. La proteína p53, la cual posee 5 dominios; dominio de transactivación, dominio rico en prolina, dominio de unión al DNA, dominio de tetramerización y dominio C – terminal; poseen sitios de modificación post-traduccionales que alteran la estabilidad y actividad de la p53, que se encuentran mayoritariamente en el dominio de transactivación y de tetramerización. Los círculos amarillos (P) indican sitios en los que se produce la fosforilación y los rectángulos de color rosado indican otros sitios de modificación post-traduccionales, incluyendo acetilación, sumoilación, metilación y nedeilación. Los polimorfismos exónicos se indican en la estructura de la proteína, con polimorfismos no sinónimos en rojo. La región en recuadro muestra la secuencia de aminoácidos que abarca el sitio de fosforilación en el dominio de transactivación. Las regiones intrónicas (i) y exónicas (e) del DNA, se muestran por debajo de la estructura de la proteína, la cual contiene algunos de los polimorfismos identificados. Tomada de Frazer *et al.*, 2007.

2.9 Polimorfismos en secuencias no codificantes del gen *TP53*

Los polimorfismos también se encuentran fuera de los genes, en la gran cantidad de DNA que no codifica para la proteína. De hecho, las regiones de DNA que no codifican para proteínas tienden a tener más polimorfismos. Esto se debe a cambios en las secuencias de DNA que codifican proteínas que pueden tener un efecto perjudicial sobre el individuo que la lleva. Los polimorfismos que no tienen ningún efecto sobre el organismo se dice que son selectivamente neutros, ya que no afectan a su capacidad de sobrevivir y reproducirse (Peller *et al.*, 1995). En el caso del gen *TP53*, se ha

encontrado más de 90 % de polimorfismos que se producen en las secuencias no codificantes. Entre ellas se tienen las siguientes:

Intrón 3

La secuencia intrónica mejor caracterizada del *TP53* es un polimorfismo de inserción / deleción de 16 pares de bases en el intrón 3 (Lazar, *et al.*, 1993). Este es un polimorfismo simple de una porción intrónica que se ha asociado con un aumento en el riesgo de varios tipos de cáncer (Wang-Gohrke, *et al.*, 1999); sin embargo, la proximidad de este polimorfismo al codón 72 en el exón 4 podría explicar en parte la razón de la asociación propuesta de este alelo con cáncer. Un estudio mostró que esta inserción de 16 pares de bases, se asoció con niveles más bajos de transcripciones del *TP53*, lo que sugiere que el polimorfismo causa una alteración en el procesamiento del ARNm, proporcionando una posible base molecular para el aumento asociado en el riesgo de desarrollar cáncer (Gemignani *et al.*, 2004).

Intrón 6

De otro lado, se reportó una asociación entre el polimorfismo del intrón 6 y predisposición al cáncer de mama y colon en un pequeño número de casos en Israel (Peller *et al.*, 1995). Este polimorfismo es una transición de guanina (G) a adenina (A) que se sitúa a 61 nucleótidos desde el extremo final del exón 6 y suprime un sitio de endonucleasa de restricción *MspI* (CCGG a CCAG). Es posible que la transición G a A interrumpe una estructura *hairpin-like* formada por la hibridación de la citosina y guanina. La interrupción de esta estructura secundaria del alelo A puede proporcionar un impacto negativo en el mecanismo de la función del gen *TP53* (Peller *et al.*, 1995).

2.10 Polimorfismos sinónimos y no sinónimos en secuencias codificantes del gen *TP53*

De las 19 variantes polimórficas exónicas que han sido reportados en *TP53*, 8 son sinónimos, es decir que el cambio de nucleótido no altera o cambia el aminoácido. Aunque estos polimorfismos no cambian la secuencia de aminoácidos o estructura de la proteína, en teoría, los cambios en la secuencia de bases y el uso de codones podrían modificar la expresión de proteínas, plegamiento y función, o provocar nuevos eventos de corte y empalme. El hallazgo que MDM 2 se une y facilita la traducción del ARN del *TP53* y que esta interacción es suprimida por mutaciones silenciosas en la región N-terminal sugiere otro mecanismo por el cual los polimorfismos sinónimos podrían afectar la función de p53. Se demostró que una mutación silenciosa en el codón 36 (CCG a CCI) reduce la capacidad de p53 para activar la apoptosis mediante la disminución de la afinidad del ARNm del *TP53* con el MDM 2 y por lo tanto el decaimiento de los niveles de p53 (Candeias *et al.*, 2008).

Los 11 polimorfismos restantes en *TP53* son no sinónimos, lo que resulta en un cambio de aminoácido en la proteína. Los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden alterar la capacidad de p53 para unirse a elementos de respuesta de los genes diana (Menendez *et al.*, 2006), así como afectar motivos de reconocimiento para las modificaciones post-traduccionales, o modificar la estabilidad de la proteína y las interacciones con otras proteínas (Courtois *et al.*, 2004). Dentro de éstos, resalta la del codón 72.

Codón 72

En las poblaciones humanas, el codón 72 de p53 tiene la secuencia CCC, que codifica prolina (p53-P72) o CGC, que codifica arginina (p53-R72). El análisis comparativo de secuencias en los primates no humanos sugieren que p53-P72 es la forma ancestral,

aunque p53-R72 se produce a una frecuencia alta (> 50 %) en algunas poblaciones (Puente *et al.*, 2006).

El codón 72 está en el exón 4 en el segmento de *TP53* que codifica el dominio poliprolina, que se encuentra entre el dominio de transactivación N-terminal y el DBD, donde se encuentran la mayoría de las mutaciones asociadas a tumores (Hu *et al.*, 2008). La contribución precisa del dominio poliprolina a la regulación y la función de p53 aún no está clara. A diferencia de la DBD, el dominio poliprolina es menos conservado a través de especies y no es una ubicación común de mutaciones asociadas a tumores. Estudios de delección en células fibroblásticas de embriones en ratones de la cepa *129/SvJae* apoyan la opinión de que el dominio poliprolina es esencial para p53 a fin de otorgar una respuesta apoptótica completa al estrés e inhibir la carcinogénesis (Sakamuro *et al.*, 1997). Sin embargo, existen diferentes interpretaciones de que si otros motivos de unión a proteínas en este dominio son cruciales para la estabilidad y función de p53 (Toledo *et al.*, 2007).

El consenso actual es que la p53-R72 es más eficaz en la inducción de la apoptosis y la protección de las células estresadas de desarrollo neoplásico que p53-P72 (Bergamaschi *et al.*, 2006). No obstante, no está entendido cómo estas diferencias funcionales entre p53-R72 y p53-P72 podrían estar en diferentes tipos de células o si son relevantes *in vivo* (Sullivan *et al.*, 2004). Los estudios que utilizan diversas técnicas de cultivo celular, tales como experimentos de transfección en líneas celulares tumorales, evidenciaron en la localización mitocondrial; que en la apoptosis, progresión del ciclo celular y reparación del DNA, ocurrió la detención de la proliferación y transactivación transcripcional (Mantovani *et al.*, 2007).

3. HIPÓTESIS

Ho: Existe diferencia significativa en la distribución de las variantes alélicas y genotípicas en el intrón 3, intrón 6 y codón 72 del gen *TP53*, entre las muestras de Lima y de Huacho pertenecientes al departamento de Lima – Perú.

H1: No existe diferencia significativa en la distribución de las variantes alélicas y genotípicas en el intrón 3, intrón 6 y codón 72 del gen *TP53* entre las muestras de Lima y de Huacho pertenecientes al departamento de Lima – Perú.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar las frecuencias alélicas de las variantes del intrón 3, intrón 6 y codón 72 del gen *TP53* en dos muestras poblacionales del departamento de Lima.

4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar la metodología para el análisis de las tres variantes del gen *TP53*: intrón 3, intrón 6 y codón 72, mediante PCR convencional.
- Establecer una base de datos de las frecuencias alélicas de los marcadores polimórficos: intrón 3, intrón 6 y codón 72 del gen *TP53*, de las dos muestras poblacionales del departamento de Lima.
- Determinar si las muestras se encuentran en equilibrio genético con respecto a las tres variantes del gen *TP53* a evaluar.
- Estimar el grado de diferenciación genética entre las dos muestras poblacionales del departamento de Lima, a través de las frecuencias alélicas de las tres variantes del gen *TP53*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

5.1.1 Población analizada

La población en estudio estuvo constituida por dos muestras poblacionales del departamento de Lima, una que pertenece a estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) de la provincia de Lima (distrito de Lima) a la cual se denominará muestra de Lima; y la otra muestra que pertenece a estudiantes de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión (UNJFSC) de la provincia de Huaura (distrito de Huacho) a la cual se denominará muestra de Huacho. A todos los participantes se les proporcionó información acerca de los alcances y objetivos del presente estudio. Así mismo, se les invitó a participar de manera voluntaria y firmaron el consentimiento informado de participación (Anexo II).

5.1.2 Tamaño de la muestra

Se trabajó con 58 muestras de Lima y 37 muestras de Huacho, con edades entre 18 y 25 años. La elección de los elementos muestrales no dependió de la probabilidad, sino de las características de cada individuo que se necesitan para cumplir con el objetivo trazado en la presente investigación.

Criterios de inclusión

- Personas cuya ascendencia por dos generaciones atrás hayan nacido en una de las provincias del departamento de Lima
- Personas de ambos sexos mayores de 18 años y no emparentadas entre sí.

- Personas que accedan a participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.
- Personas aparentemente sanas.

Criterios de exclusión

- Personas cuya ascendencia por dos generaciones atrás no hayan nacido en una de las provincias del departamento de Lima.
- Personas menores de 18 años y emparentadas entre sí.
- Personas que no accedan a participar en el estudio.
- Personas con problemas de salud.

5.1.3 Recolección de datos

A las personas que aceptaron participar en este estudio, se les solicitaron que firmen una hoja de consentimiento informado (Anexo II), con el cual aceptó formar parte de la investigación de manera voluntaria y libre, luego se les aplicó una encuesta a fin de llenar una ficha de datos, como el lugar de nacimiento, información familiar, ascendencia o zona de origen de los participantes, etc (Anexo III). Seguidamente se continuó con el procedimiento de la toma de muestra.

5.1.4 Toma de muestra

En condiciones de asepsia, se tomó muestra de sangre periférica (3 mL) a través de punción intravenosa, con ayuda de una hipodérmica descartable. La muestra sanguínea se recepcionó en un tubo tipo Vacutainer con el anticoagulante EDTA.

5.2 Materiales de laboratorio

5.2.1 Reactivos

- Kit de extracción del DNA (High Pure PCR Template Preparation de Roche).
- Insumos para la amplificación de PCR convencional: $MgCl_2$ (GeneOn), Buffer de la enzima (GeneOn), Enzima Taq Polimerase (GeneOn), dNTPs (GeneOn), Agua de grado molecular libre de DNasas y RNasas.
- *Primers* o cebadores (GeneOn) para los tres variantes del gen *TP53* (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de cebadores del intrón 3, intrón 6 y codón 72 del gen *TP53*.

Marcador	Secuencia de cebadores (5' - 3')
Intrón 3	5'- TGGGACTGACTTTCTGCTCTT-3' 5'- TCAAATCCATCCATTGCTTGG -3'
Intrón 6	5'- TGGCCATCTACAAGCAGTCA - 3' 5'- TTGCACATCTCATGGGGTTA - 3'
Codón 72	5' - TTCACCCATCTACAGTCC - 3' 5' - CTCAGGGCAACTGACCGT -3'

- Enzimas de Restricción: *Bst*UI (Bsh1236I), *Msp*I (Fermentas).
- Insumos para la electroforesis: Acrilamida (Promega), Bisacrilamida (Promega), Buffer TBE 10X pH: 8.2, Tris Base (Roche), Ácido Bórico (Merck), EDTA 0.5 M pH: 8 (Calbiochem), Dyer (Fermentas), APS (Promega), Marcador de 10 bp y 100 bp (Fermentas).

5.2.2 Equipos

- Termociclador de PCR convencional (Eppendorf AG22331).
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO Serie: DO54056).
- Microcentrífuga (USA-Scientific).
- Microespectrofotómetro AmpliQuant (AQ-07)
- Cámara electroforética (Clever Scientific VS10S1).
- Fuente de poder (CleaverScientific MP-300N).
- Agitador magnético (MAG - MIX 65905).
- Balanza analítica (Dakota mod.3102).
- Baño María (LAB LINE - MH8516)
- Vórtex (RVM-101)
- Cámara fotográfica Canon Powershot Elph

5.4.3 Insumos

- Microtubos 0.2 mL, 0.6 mL, 1.5 mL (Eppendorf).
- Tips 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L (Axigen).
- Micropipetas 10 μ L , 200 μ L, 1000 μ L (Axygpet).

5.3 Metodología experimental

5.3.1 Extracción y purificación del DNA

La extracción de DNA se realizó con el kit High Pure PCR Template Preparation de Roche y se siguió las especificaciones de la versión 18 - catálogo N°11 796 828 001. Para la lisis celular y degradación de la fracción proteica, se tomó 200 μL de sangre total en un tubo de microcentrifuga y se añadió 200 μL de Tampón de unión y 40 μL de Proteinasa K, inmediatamente se mezcló con la ayuda del vórtex e incubó por 10 minutos a 70 °C. Para la purificación del DNA se agregó 100 μL de alcohol isopropanol, se mezcló suavemente y se llevó una columna de sílice de alta pureza, en donde se retiene el DNA, el cual se le colocó su tubo colector; luego se centrifugó por 1 minuto a 12 000 rpm y se descartó el tubo colector. Para la remoción de inhibidores de PCR se agregó 500 μL de Tampón de remoción de inhibidores, se centrifugó por 1 minuto a 12 000 rpm y luego se descartó el tubo colector. Para la purificación del lavado de la muestra, se agregó 500 μL de Tampón de Lavado, se centrifugó por 1 minuto a 12 000 rpm y se descartó el tubo colector; este paso se realizó 2 veces. Para la recuperación del DNA, se colocó la columna de sílice de alta pureza en un tubo de microcentrifuga y se agregó 150 μL de Tampón de elución que previamente se mantuvo a temperatura de 70 °C, se centrifugó por 1 minuto a 12 000 rpm y así el DNA extraído queda precipitado en el tubo microcentrifuga.

5.3.2 Cuantificación del DNA

El DNA genómico se cuantificó utilizando el microespectrofotómetro; para lo cual se tomó una alícuota de 10 μL del DNA. Se obtuvo el valor de la concentración del DNA de doble cadena ($\mu\text{L}/\text{mL}$) y también la pureza del DNA. Este procedimiento se realizó para todas las muestras trabajadas.

Dependiendo de la lectura, cada muestra se llevó a una concentración final de 20 ng/ μ L, procedimiento que consistió en disminuir o aumentar la concentración del DNA, variando el volumen de la muestra y/o reduciendo las cantidades de los otros reactivos, calculado a través de una regla de tres simple; con la finalidad de poder continuar con los siguientes pasos.

5.3.3 Calidad del DNA

Para evaluar la calidad de DNA, 5 μ L de cada muestra fue mezclada con 2 μ L de buffer de muestra y se sembró en su pocillo respectivo del gel de poliacrilamida al 6 %. La electroforesis se realizó a 100 voltios constante durante 1 hora a temperatura ambiente. Los carriles que presentan bandas muy intensas, nos indica que tienen una elevada concentración de DNA y en los que se observa bandas tenues es debido a que están muy diluidas; es decir, presentan una baja concentración de DNA.

5.3.4 Amplificación del DNA

Intrón 3

Se utilizó los cebadores (Tabla 1), reportados por Wu *et al.*, (2002), con las siguientes concentraciones: 2 mM de MgCl₂, 0.5 mM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerasa y 0.2 μ M de cada cebador para 25 μ L de volumen final por reacción. El programa de amplificación usado fue el siguiente: denaturación inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos, y una elongación final a 72 °C por 5 minutos.

Intrón 6

Se utilizó los cebadores (Tabla 1), reportados por Wu *et al.*, (2002), en presencia de 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 U de Taq DNA polimerasa y 0.5 μM de cada cebador para un volumen final de 15 μl por reacción. El programa de amplificación usado fue el siguiente: denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de denaturación a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos, y una elongación final a 72 °C por 7 minutos.

Codón 72

Se trabajó con la técnica de PCR con los cebadores reportados por Lakshmi *et al.*, 2012 (Tabla 1), en presencia de 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 U de Taq DNA polimerasa y 0.5 μM de cada cebador para un total de 15 μL de reacción. Se utilizó la siguiente programación: denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos y 30 ciclos de denaturación a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos; elongación final a 72 °C por 7 minutos.

5.3.5 Digestión del DNA

Según la metodología de Wu *et al.*, (2002) y Lakshmi *et al.*, (2012); se procedió a la digestión para el intrón 6 y el codón 72 respectivamente.

Para el intrón 6, se utilizó 5 μL del amplicón al cual se añadió 0.2 μL de la enzima de restricción *MspI* (10 U/μL), 0.4 μL de Buffer Tango y 3.6 μL de H₂O, en un volumen final de 9.2 μL; se incubó a 37 °C por 16 horas.

En el caso del codón 72, del producto de la PCR, se utilizó 5 μL al cual se añadió 0.2 μL de la enzima de restricción *Bst*UI (10 U/ μL), 0.4 μL de Buffer R y 3.6 μL de H_2O , en un volumen final de 9.2 μL y se incubó a 37 °C por 16 horas.

5.3.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida de los amplificados y productos de digestión y coloración de geles

La separación de fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en los geles de poliacrilamida al 6 %, utilizando un stock de acrilamida-bisacrilamida 20:1 (20 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida (Barton, 1994) (Tabla 2). La cámara vertical utilizada fue de 21 cm de largo y 13 cm de ancho. En los respectivos pocillos se cargó 4 μL de amplificado de los productos de digestión y 2 μL de buffer de muestra formamida (sucrosa 10 %, azul de bromofenol 0.02 %, xilencianol 0.02 %). La corrida electroforética se realizó en buffer TBE 1X, a 100 voltios por 65 minutos.

La tinción de los geles se realizó con tres soluciones (Tabla 3), basados en el protocolo descrito por Sanguinetti *et al.*, (1994), modificado en el laboratorio de Genética Humana (FCCBB-UNMSM). Se procedió con los siguientes pasos: Primero, se expuso el gel a la solución fijadora/detenedora (Solución A) por 2 minutos, al finalizar el tiempo, se retiró la solución. Segundo, se expuso el gel a la Solución B (tinción de nitrato de plata) por 50 segundos, concluido el tiempo, se retiró la solución. Tercero, se realizó un lavado rápido, por unos 10 segundos como máximo, con la solución C (reveladora); se descartó e inmediatamente se agregó nueva solución reveladora, agitando suavemente el gel hasta observar las bandas de los amplificados. Luego de ello, se retiró la solución; finalmente se adicionó agua destilada con el propósito de detener la reacción. Se colocó el gel en un pedazo de plástico y con un marcador indeleble se colocó los códigos de cada paciente. Inmediatamente se tomó

la fotografía del gel y las fotos se archivaron en un computador, en una carpeta debidamente codificada.

Tabla 2. Composición de los geles de poliacrilamida al 6 %. Se indica los volúmenes de la solución de acrilamida: bisacrilamida, TBE 10X, ddH₂O, Temed y APS 10 %.

Volumen del Gel	[]	Stock 20:1 (mL)	TBE 10X (mL)	ddH ₂ O (mL)	Temed (μL)	APS 10% (μL)
10 mL	6 %	2.85	1	6.15	12	120

Tabla 3. Composición y cantidades de las soluciones empleadas para realizar la tinción del gel de poliacrilamida al 6 %.

Soluciones	Composición	Cantidades
A (150 mL)	Etanol Absoluto	13.5 mL
	Ácido Acético	0.75 mL
	Agua destilada	135.5 mL
B (150 mL)	Nitrato de plata	0.3 g
	Agua destilada	149.7 mL
C (150 mL)	Hidróxido de Sodio	3 g
	Agua destilada	146.55 mL
	Formaldehido 37 %	450 μL

5.3.7 Análisis de los geles de poliacrilamida

La lectura de los geles de poliacrilamida al 6 %, se realizó mediante la observación de las respectivas bandas para los 3 polimorfismos del gen *TP53*; determinándose así el genotipo de cada individuo.

Intrón 3.-

La presencia de una banda de 180 bp representa al homocigoto silvestre W/W, mientras que la inserción de 16 bp se detectó mediante la observación de una banda de 196 bp (homocigoto mutante M/M) individuos heterocigotos presentan ambas bandas de 196 bp y 180 bp (heterocigoto W/M).

Intrón 6.-

La presencia de dos bandas, 336 bp y 68 bp, corresponde al genotipo G/G (homocigoto silvestre W/W), mientras que la presencia de una banda de 404 bp pertenecen al genotipo A/A (homocigoto mutante M/M). Los individuos heterocigotos, (W/M) presentan las tres bandas (404 bp, 336 bp y 68 bp).

Codón 72.-

La presencia de un fragmento de 309 bp, corresponde al genotipo Pro/Pro (homocigoto silvestre); mientras que si se observa dos fragmentos equivalentes a 175 bp y 134 bp, corresponde al genotipo Arg/Arg (homocigoto mutante). El genotipo heterocigoto Pro/Arg se evidencia con la existencia de 3 fragmentos (309 bp 175 bp y 134 bp).

5.3.8 Determinación de las frecuencias alélicas en cada muestra poblacional

Se trabajó con el software SPSS versión 22.0 para la determinación de la frecuencia alélica en cada marcador.

5.3.9 Análisis de equilibrio genético y heterocigocidad

La heterocigosidad esperada (H_e) en situación de equilibrio genético para cada locus se calculó con la fórmula de Nei *et al.*, 1987, así mismo, también se determinó la heterocigosidad observada (H_o). Mediante la prueba de Chi-Cuadrado, se analizó si las muestras poblacionales se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (Hardy, 1908), a un nivel de significancia de 0.05. Para calcular este estadístico, era necesario conocer los genotipos esperados de cada polimorfismo estudiado.

La frecuencia genotípica esperada para las tres variantes estudiadas del gen *TP53*, se obtuvo elevando al cuadrado cada una de las frecuencias alélicas y multiplicándolas por el número de individuos de la población para los genotipos homocigotos. Por ejemplo para el caso del genotipo Pro/Pro del codón 72 en la muestra de Lima, se elevó al cuadrado su frecuencia (0.0910) y el producto se multiplicó por $n = 58$, resultando una frecuencia genotípica esperada de 5.2802. Para el caso de los genotipos heterocigotos, se multiplicó el número de individuos de la población por el doble del producto de la frecuencia de cada uno de los alelos. Por ejemplo, para el genotipo Pro/Arg del codón 72 de la muestra de Lima, se multiplicó $2 \times 0.297 \times 0.702 \times 58$, resultando una frecuencia de 24.4396.

5.3.10 Diferenciación poblacional

Para el análisis de comparación de las frecuencias alélicas entre las dos muestras poblacionales del departamento de Lima, se empleó el software Arlequín ver 3.5 (Excoffier, 2011). Así mismo, se utilizó el estadístico de Fisher a un nivel de significancia de 0.05 (Fisher, 1935).

6. RESULTADOS

6.1 Banco de muestras del DNA

El DNA aislado de las muestras de sangre resultó con concentraciones que van de 1.702 a 39.448 ng/ μ L . En la Tabla 4 y Tabla 5 se consignan las concentraciones y porcentajes de pureza de las muestras de DNA de ambas poblaciones en estudio. En ellas se pueden observar que la muestra L24 y la muestra H14 presentaron las concentraciones más altas, siendo de 39.448 ng/ μ L y 14.741 ng/ μ L en la muestra de Lima y Huacho respectivamente. En cambio, la muestra L21 y la muestra H13 presentaron las concentraciones más bajas: de 1.702 ng/ μ L y 8.455 ng/ μ L, que corresponde a la muestra de Lima y Huacho respectivamente. En todas las muestras estudiadas (Lima y Huacho) fue necesario trabajar con una concentración final de 20 ng/ μ L , para evitar la presencia de productos inespecíficos.

La calidad del DNA, se muestra en la Figura 5, donde se observa un gel de poliacrilamida al 6 %, teñido con nitrado de plata, que presenta algunas muestras de DNA de los individuos de Lima y Huacho. Las diferentes intensidades de las bandas de cada muestra significan diferentes concentraciones de DNA.

Tabla 4. Pureza (260/280) y concentración de las 58 muestras del DNA de la muestra de Lima.

Muestra	260/280	ng/μL	Muestra	260/280	ng/μL
L01	1.23	4.858	L30	0.986	4.581
L02	0.838	2.383	L31	1.437	4.684
L03	1.535	15.664	L32	1.571	9.563
L04	1.53	3.659	L33	1.749	11.382
L05	1.507	16.126	L34	1.438	3.785
L06	1.399	13.428	L35	1.384	5.347
L07	2.088	8.73	L36	1.493	8.536
L08	1.882	14.201	L37	1.371	4.809
L09	1.744	2.135	L38	1.592	12.472
L10	1.518	16.097	L39	1.402	9.364
L11	1.646	4.66	L40	1.370	5.870
L12	1.844	10.474	L41	1.461	8.734
L13	0.883	14.527	L42	1.674	8.112
L14	1.787	12.065	L43	1.477	6.212
L15	1.800	5.847	L44	1.521	8.704
L16	1.206	9.873	L45	1.336	3.455
L17	1.83	7.017	L46	1.245	4.563
L18	0.187	2.728	L47	1.632	10.102
L19	0.806	20.326	L48	1.488	7.631
L20	0.787	29.01	L49	1.633	5.313
L21	1.073	1.702	L50	1.281	4.890
L22	0.816	13.892	L51	1.344	5.823
L23	0.967	9.867	052	1.499	6.988
L24	0.749	39.448	L53	1.533	8.241
L25	1.000	4.184	L54	1.458	7.344
L26	1.456	8.475	L55	1.399	7.563
L27	1.387	7.492	L56	1.482	11.392
L28	1.479	8.991	L57	1.745	9.443
L29	1.565	6.782	L58	1.563	7.302

Tabla 5. Pureza (260/280) y concentración de las 37 muestras del DNA de la muestra de Huacho.

Muestra	260/280	ng/μL	Muestra	260/280	ng/μL
H01	1.534	12.932	H20	1.450	13.349
H02	1.443	10.202	H21	1.375	12.513
H03	1.501	10.341	H22	1.643	11.453
H04	1.439	8.853	H23	1.505	10.483
H05	1.515	11.438	H24	1.531	9.411
H06	1.457	13.751	H25	1.383	9.841
H07	1.388	10.354	H26	1.452	11.344
H08	1.522	12.394	H26	1.364	10.431
H09	1.534	9.442	H28	1.522	9.315
H10	1.573	14.331	H29	1.429	8.993
H11	1.383	11.377	H30	1.533	12.483
H12	1.402	12.336	H31	1.473	13.341
H13	1.479	8.455	H32	1.349	12.935
H14	1.542	14.741	H33	1.403	9.238
H15	1.531	11.944	H34	1.487	11.263
H16	1.402	10.451	H35	1.521	10.849
H17	1.503	9.305	H36	1.426	12.451
H18	1.583	12.833	H37	1.536	11.944
H19	1.470	10.431			

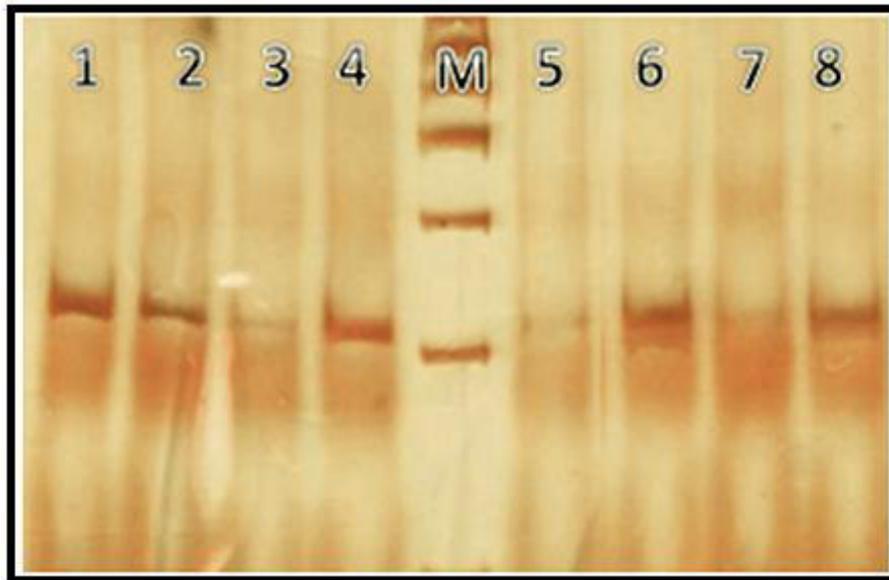


Figura 5. Determinación de la calidad del DNA. Gel de poliacrilamida al 6 % y coloreado con nitrato de plata. Los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 pertenecen a individuos de las muestras estudiadas. Se observa que las bandas de las muestras 1, 2, 4, 6 y 8 presentan una gran nitidez que implica la presencia de una mayor concentración de DNA, caso contrario ocurre en las muestras 3, 5 y 7. M = Ladder de 100 bp.

6.2 Estandarización de las condiciones de amplificación

Para la amplificación del polimorfismo del codón 72 e intrón 6, las concentraciones óptimas fueron: 1.5 mM de $MgCl_2$ 0.5 μM de cada cebador y 20 ng de DNA. La temperatura óptima de alineamiento fue de 55 °C y el número de ciclos óptimos fue de 30. Estas condiciones originaron un amplificado de buena calidad y baja cantidad de productos inespecíficos.

En relación al intrón 3, las concentraciones óptimas fueron: 2 mM de $MgCl_2$, 0.5 mM de cada primer y 20 ng de DNA. La temperatura óptima de alineamiento fue de 55 °C y el número de ciclos óptimos fue de 30. Con estas condiciones se obtuvo una buena calidad del amplificado y baja cantidad de productos inespecíficos.

6.3 Identificación de alelos

La identificación de los alelos en las muestras de Lima y Huacho para las tres variantes del gen *TP53*, se realizó en los geles de poliacrilamida al 6 % (Figuras 6, 7 y 8). Para el caso del codón 72, e intrón 6, (PCR-RFLP) se utilizó un *ladder* de 100 bp. En cambio, para la identificación de la variante intrón 3 (PCR), se utilizó un marcador de 10 bp.

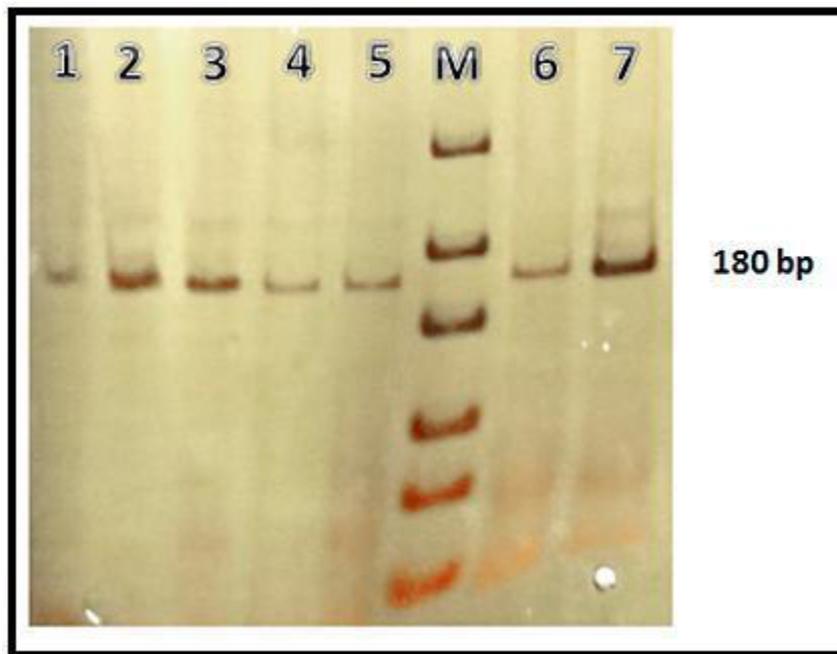


Figura 6. Amplicón de la variante intrón 3 del gen *TP53*: los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden al Genotipo W/W. M: Ladder de 10 bp.

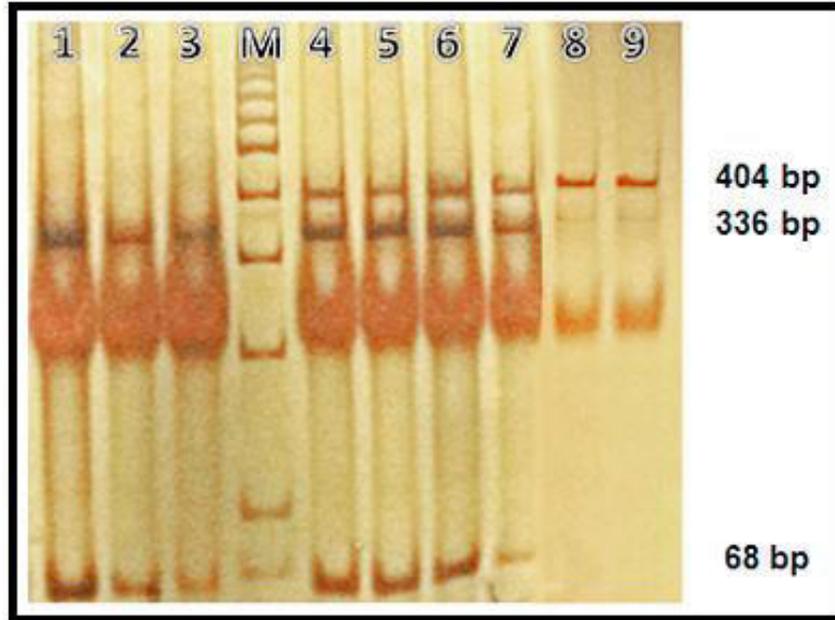


Figura 7. RFLPs de la variante intrón 6 del gen *TP53*: En el Carril 1, 2 y 3 se observa el Genotipo W/W; los carriles 4, 5, 6 y 7 pertenecen al Genotipo W/M; y el 8 y 9 corresponden al Genotipo M/M; M: Ladder de 100 bp.

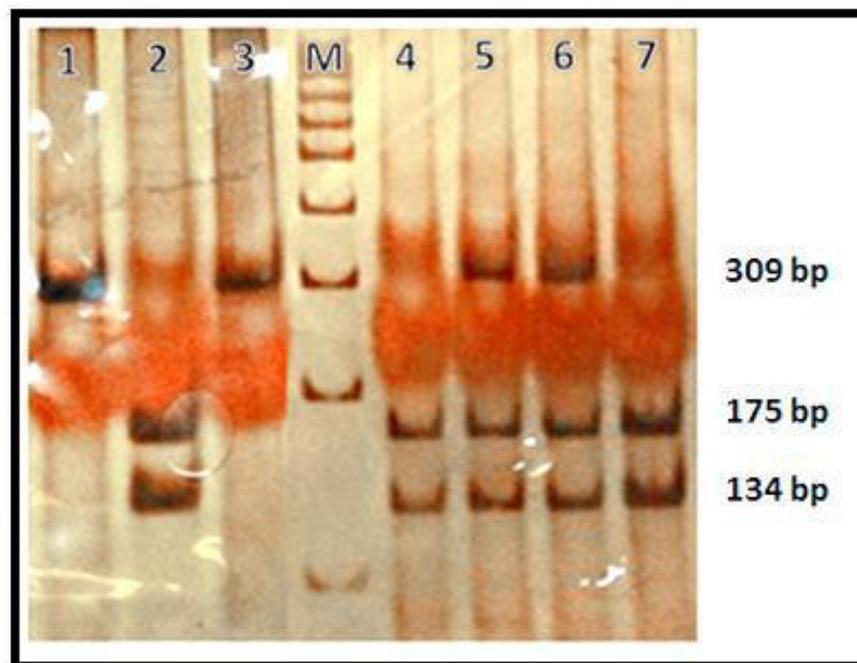


Figura 8. RFLPs de la variante codón 72 del gen *TP53*. En el carril 1 y 3 se observa el Genotipo Pro/Pro (homocigota); los carriles 2, 4 y 7 pertenecen al Genotipo Arg/Arg (Homocigota) y el 5 y 6 corresponden al Genotipo Pro/Arg (heterocigoto). M = Ladder de 100 bp

6.4 Genotipos

En la Tablas 6, 7 y 8 se muestra el genotipo de los individuos que constituyen las muestras de Lima, para el intrón 3, intrón 6 y codón 72 respectivamente; de igual modo en la Tablas 9, 10 y 11 se presentan los genotipos de la cohorte de Huacho para el intrón 3, intrón 6 y codón 72 respectivamente. Las muestras L31 y L51 de Lima (Tabla 6) y las 27 muestras restantes de Huacho (Tabla 9); no se pudieron amplificar debido a una contaminación de los cebadores para el intrón 3.

Tabla 6. Genotipos para la variante intrón 3 del gen *TP53* de la muestra de Lima.

MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO
L01	WW	L21	WW	L41	WM
L02	WW	L22	WW	L42	WW
L03	WW	L23	WW	L43	WM
L04	WM	L24	WW	L44	WW
L05	WW	L25	WW	L45	WM
L06	WW	L26	WW	L46	WW
L07	WW	L27	WW	L47	WW
L08	WW	L28	WW	L48	WM
L09	WW	L29	WW	L49	WW
L10	WW	L30	WW	L50	WW
L11	WW	L31	*	L51	*
L12	WW	L32	WW	L52	WW
L13	WW	L33	WW	L53	WM
L14	WW	L34	WW	L54	WW
L15	WW	L35	WW	L55	WW
L16	WW	L36	WW	L56	WW
L17	WW	L37	WW	L57	WW
L18	WW	L38	WW	L58	WW
L19	WW	L39	WW		
L20	WW	L40	WW		

* No Amplificó

Tabla 7. Genotipos para la variante intrón 6 del gen *TP53* de la muestra de Lima.

MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO
L01	WW	L21	WW	L41	WM
L02	WW	L22	WW	L42	WW
L03	WW	L23	WW	L43	WW
L04	WM	L24	WW	L44	WW
L05	WW	L25	WW	L45	WW
L06	WW	L26	WW	L46	WW
L07	WW	L27	WW	L47	WW
L08	WW	L28	WW	L48	WW
L09	WW	L29	WW	L49	WW
L10	WW	L30	WW	L50	WW
L11	WW	L31	WW	L51	WW
L12	WW	L32	WW	L52	WW
L13	WW	L33	WW	L53	WW
L14	WW	L34	WW	L54	WW
L15	WW	L35	WW	L55	WW
L16	WW	L36	WW	L56	WW
L17	WW	L37	WW	L57	WW
L18	WW	L38	WW	L58	WW
L19	WW	L39	WW		
L20	WW	L40	WW		

Tabla 8. Genotipos para la variante codón 72 del gen *TP53* de la muestra de Lima.

MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO
L01	Pro/Arg	L21	Arg/Arg	L41	Arg/Arg
L02	Pro/Arg	L22	Arg/Arg	L42	Arg/Arg
L03	Pro/Arg	L23	Pro/Arg	L43	Pro/Arg
L04	Pro/Arg	L24	Arg/Arg	L44	Arg/Arg
L05	Pro/Arg	L25	Pro/Arg	L45	Arg/Arg
L06	Arg/Arg	L26	Arg/Arg	L46	Arg/Arg
L07	Arg/Arg	L27	Arg/Arg	L47	Arg/Arg
L08	Pro/Arg	L28	Pro/Arg	L48	Arg/Arg
L09	Arg/Arg	L29	Pro/Arg	L49	Arg/Arg
L10	Pro/Arg	L30	Pro/Arg	L50	Pro/Arg
L11	Pro/Arg	L31	Pro/Pro	L51	Pro/Arg
L12	Arg/Arg	L32	Arg/Arg	L52	Pro/Arg
L13	Pro/Arg	L33	Pro/Arg	L53	Pro/Arg
L14	Arg/Arg	L34	Arg/Arg	L54	Pro/Pro
L15	Pro/Arg	L35	Arg/Arg	L55	Arg/Arg
L16	Arg/Arg	L36	Pro/Pro	L56	Pro/Arg
L17	Pro/Pro	L37	Arg/Arg	L57	Arg/Arg
L18	Pro/Arg	L38	Pro/Arg	L58	Pro/Arg
L19	Pro/Arg	L39	Arg/Arg		
L20	Pro/Arg	L40	Arg/Arg		

Tabla 9. Genotipos para el marcador intrón 3 del gen TP53 de la muestra de Huacho.

MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO
H01	WW	H06	WM
H02	WM	H07	WW
H03	WW	H08	WW
H04	WW	H09	WW
H05	WW	H10	WW

Tabla 10. Genotipos para la variante intrón 6 del gen TP53 de la muestra de Huacho.

MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO
H01	WW	H20	WM
H02	WW	H21	WM
H03	WW	H22	MM
H04	WW	H23	WW
H05	WW	H24	MM
H06	WW	H25	WW
H07	WW	H26	WW
H08	WW	H27	WM
H09	WW	H28	MM
H10	WW	H29	WW
H11	WW	H30	WW
H12	WM	H31	WM
H13	WW	H32	WW
H14	WW	H33	WM
H15	WW	H34	WW
H16	WW	H35	WW
H17	WM	H36	WW
H18	WM	H37	WW
H19	WW		

Tabla 11. Genotipos para la variante codón 72 del gen *TP53* de la muestra de Huacho.

MUESTRA	GENOTIPO	MUESTRA	GENOTIPO
H01	Arg/Arg	H20	Arg/Arg
H02	Pro/Arg	H21	Arg/Arg
H03	Pro/Arg	H22	Pro/Arg
H04	Arg/Arg	H23	Pro/Arg
H05	Arg/Arg	H24	Arg/Arg
H06	Pro/Arg	H25	Arg/Arg
H07	Arg/Arg	H26	Arg/Arg
H08	Arg/Arg	H27	Pro/Arg
H09	Pro/Arg	H28	Pro/Arg
H10	Arg/Arg	H29	Arg/Arg
H11	Arg/Arg	H30	Pro/Arg
H12	Arg/Arg	H31	Arg/Arg
H13	Pro/Arg	H32	Pro/Pro
H14	Pro/Arg	H33	Pro/Arg
H15	Arg/Arg	H34	Arg/Arg
H16	Pro/Pro	H35	Arg/Arg
H17	Arg/Arg	H36	Pro/Pro
H18	Pro/Pro	H37	Pro/Pro
H19	Arg/Arg		

6.5 Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio genético

Los valores de las frecuencias alélicas y genotípicas se obtuvieron aplicando el software GenePop versión 4.0 (Rousset, 2007). En la Tabla 12 se indica las frecuencias alélicas en las muestras de Lima y Huacho, observándose en ambas poblaciones la presencia de los alelos W y M para el intrón 3, W y M para el intrón 6 y Pro y Arg para el codón 72.

Tabla 12. Frecuencias alélicas para las variantes intrón 3, intrón 6 y codón 72, en las muestras de Lima y Huacho.

Variante	Lima		Huacho	
	Alelos	Frecuencia	Alelos	Frecuencia
Intrón 3	W	0.946	W	0.900
	M	0.053	M	0.100
Intrón 6	W	0.982	W	0.810
	M	0.017	M	0.189
Codón 72	Pro	0.301	Pro	0.297
	Arg	0.698	Arg	0.702

En relación a los resultados de la heterocigosidad se observa que para la muestra de Lima, la heterocigosidad observada (H_o) en el intrón 3, intrón 6 y codón 72 resultó de 0.107; 0.034 y 0.431 respectivamente; y la heterocigosidad esperada (H_e) en el codón 72, intrón 6 e Intrón 3 fue de 0.101; 0.033 y 0.421 respectivamente (Tabla 13). Para la muestra de Huacho, la heterocigosidad observada (H_o) en el intrón 3, Intrón 6 y codón 72 fue de 0.200, 0.216 y 0.324 respectivamente; y la heterocigosidad esperada (H_e) en el intrón 3, intrón 6 y codón 72 fue de 0.180, 0.306 y 0.417 respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) de las tres variantes del gen *TP53* en las muestras de Lima y Huacho.

Variante	Lima		Huacho	
	H_o	H_e	H_o	H_e
Intrón 3	0.107	0.101	0.200	0.180
Intrón 6	0.034	0.033	0.216	0.306
Codón 72	0.431	0.421	0.324	0.417

En la Tabla 14 y 15 se detalla la distribución de las frecuencias genotípicas de las tres variantes del gen *TP53* en las dos muestras poblacionales. En ambas poblaciones se encontró las 3 clases genotípicas que corresponden a los 2 alelos codominantes.

Para verificar si el número de individuos observados por genotipo se desvían del número esperado en situación de equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó la prueba de Chi-cuadrado (X^2) para las tres variantes. Se obtuvieron valores de X^2 iguales a 0.1794, 0.0180 y 0.6364 para el intrón 3, intrón 6 y codón 72 respectivamente en la muestra de Lima (Tabla 14). Para la muestra de Huacho, se obtuvo valores de X^2 iguales a 0.1234, 3.2251 y 1.8528 para el intrón 3, intrón 6 y codón 72 respectivamente (Tabla 15); con grado de libertad igual a 1. Por lo tanto, ambas muestras poblacionales del departamento de Lima se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg para los tres marcadores, al disponerse que las diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas no son significativas, mediante la prueba de Chi-cuadrado (X^2) con valores de probabilidad (p) mayores al nivel de significancia de $p = 0.05$.

Tabla 14. Frecuencias genotípicas e individuos observados y esperados para las variantes del intrón 3, intrón 6 y codón 72 de la muestra de Lima.

Variante	Genotipo	Frecuencia genotípica	Individuos observados	Individuos esperados	$\frac{(O - E)^2}{E}$	P-valor
Intrón 3	W / W	0.892	50	50.1608	0.0005	0.671*
	W / M	0.107	6	5.6785	0.0182	
	M / M	0.000	0	0.1607	0.1607	
	Total	1.000	56	56	$X^2=0.1794$	
Intrón 6	W / W	0.965	56	56.0172	5.307E	0.893*
	W / M	0.034	2	1.9655	0.0006	
	M / M	0.000	0	0.0173	0.0172	
	Total	1.000	58	58.0000	$X^2=0.0180$	
Codón 72	Pro / Pro	0.068	4	5.2802	0.3103	0.424*
	Pro / Arg	0.431	27	24.4396	0.2682	
	Arg / Arg	0.509	27	28.2802	0.0579	
	Total	1.000	58	58.0000	$X^2=0.6364$	

* $p > 0.05$

Tabla 15. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para las variantes del intrón 3, intrón 6 y codón 72 de la muestra de Huacho.

Variante	Genotipo	Frecuencia genotípica	Individuos observados	Individuos esperados	$\frac{(O - E)^2}{E}$	P-valor
Intrón 3	W / W	0.800	8	8.1	0.0012	0.725*
	W / M	0.200	2	1.8	0.0222	
	M / M	0.000	0	0.1	0.1000	
	Total	1.000	10	10	$X^2=0.1234$	
Intrón 6	W / W	0.702	26	24.3243	0.1154	0.072*
	W / M	0.216	8	11.3513	0.9894	
	M / M	0.081	3	1.3244	2.1202	
	Total	1.000	37	37.0000	$X^2=3.2251$	
Codón 72	Pro / Pro	0.135	5	3.2703	0.9148	0.173*
	Pro / Arg	0.324	12	15.4594	0.7742	
	Arg / Arg	0.540	20	18.2703	0.1638	
	Total	1.000	37	37.0000	$X^2=1.8528$	

* $p > 0.05$

6.6 Diferenciación poblacional

Utilizando el programa Arlequín versión 3.5 opción: índice de Nei, (1987) se pudo obtener el grado de diferenciación genética entre las dos poblaciones analizadas respecto a cada uno de las tres variantes (intrón 3, intrón 6 y codón 72) como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Diferenciación genética entre las muestras de Lima y Huacho.

Variante	Identidad Genética (I) Lima - Huacho	Distancia Genética (D) Lima - Huacho
Intrón 3	0.1663	1.7933
Intrón 6	0.2438	1.1411
Codón 72	0.7233	0.323

Si las frecuencias alélicas son las mismas, comparando dos poblaciones, la identidad genética equivaldría a 1, mientras que si no comparten ninguno de los alelos la

identidad genética equivaldría a cero. Del mismo modo, la distancia genética (D) toma el valor 0 si son poblaciones idénticas y va hacia el infinito si son poblaciones completamente diferentes (Excoffier y Lisher, 2011).

Asimismo, se realizó el test estadístico de Fisher para hallar la diferenciación poblacional entre ambas muestras trabajadas, para cada uno de las tres variantes del gen *TP53*; se empleó el software Arlequín (Excoffier, 2011), obteniendo como resultado para el intrón 3 un valor de $p=0.7831 \pm 0.0031$; para el intrón 6 un valor de $p=0.8634 \pm 0.0017$ y para el codón 72 un valor de $p=0.04183 \pm 0.0591$ (Tabla 17), en todos los casos con un nivel de significancia de 0.05. Estos resultados indican que para el intrón 3 e intrón 6, existe una diferencia significativa para las muestras de Lima y Huacho; en cambio para el codón 72 no existió una diferencia genética significativa entre las frecuencias alélicas de las dos muestras poblacionales del departamento de Lima.

Tabla 17. Diferenciación poblacional de la muestra de Lima y Huacho para las tres variantes polimórficas.

Variante	P- valor *
Intrón 3	0.7831 +/- 0.0031
Intrón 6	0.8634 +/- 0.001
Codón 72	0.04183 +/- 0.0591

* $p>0.05$

7. DISCUSIÓN

Se eligió los marcadores codón 72, intrón 6 e intrón 3 del gen *TP53* porque son los más frecuentemente asociados a un amplio rango de enfermedades cancerígenas (Khaliq *et al.*, 2000). Mediante la técnica de PCR-RFLP para el codón 72 e intrón 6 del gen *TP53*, se observó la presencia de 2 variantes alélicas; Pro, Arg y W, M respectivamente, reportadas para estos polimorfismos en la mayoría de las poblaciones estudiadas (Wu *et al.*, 2002; Buyru *et al.*, 2003). Así mismo, para el Intrón 3 mediante PCR, se identificaron 2 alelos: W y M, que coincide con las investigaciones previas de Gemignani *et al.*, (2004).

Para el codón 72, la variante alélica con mayor valor fue Arg para ambas poblaciones, siendo la frecuencia de 69.8 % (0.698) en la muestra de Lima y 70,2 % (0.702) en la muestra de Huacho. Estos resultados son similares a los reportados para la mayoría de las poblaciones europeas y americanas donde indican el 68 % del alelo Arg para la población de España (Soto, 2008) y 69 % para Brasil (Pinto *et al.*, 2008), Argentina con 64.7 % (Pérez *et al.*, 2006), Colombia con 67 % (Pinto *et al.*, 2007) o Costa Rica con 65.7 % (Alpizar *et al.*, 2005). Se puede presumir que la distribución del polimorfismo varía según las regiones geográficas y el origen étnico, donde se evidencia que las poblaciones de países de Europa y América exhiben altas frecuencias del alelo Arg, comparadas con las del alelo Pro, mientras que en poblaciones africanas y asiáticas se encuentra una baja prevalencia del alelo Arg con un 36.9 % para la población de Nigeria y 29.5 % para la japonesa (Beckman *et al.*, 1994; Ojeda *et al.*, 2003).

Se tienen evidencias que el alelo prolina es menos efectivo en la inducción de apoptosis que el alelo arginina. La proteína codificada por el alelo arginina se une a MDM-2 con mayor afinidad, y produce un aumento del transporte de la proteína p53 a la

mitocondria (Dumont *et al.*, 2003). Por otra parte, el alelo prolina puede ser menos activo al momento de producir la parada del ciclo celular, propia del gen *TP53*, como respuesta al daño producido en el DNA (Su *et al.*, 2003).

Varios estudios han sugerido que el alelo arginina del codón 72 se encuentra mutado con más frecuencia en las formas heterocigóticas Arg/Pro que en las homocigóticas Arg/Arg, adquiriendo una mayor ventaja de crecimiento en función de la proporción de alelos arginina y prolina mutados en el tumor (Tada *et al.*, 2001; Langerod *et al.*, 2002).

Igualmente, diversos estudios han investigado la implicación de este polimorfismo y el riesgo para desarrollar diferentes tipos de cáncer. Así, hay estudios en los que se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre la variante arginina de este polimorfismo y el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Liu *et al.*, 1998; Langerod *et al.*, 2002; Kalemi *et al.*, 2005). De otro lado, existen reportes en los que este riesgo se ha visto asociado a la variante prolina (Huang *et al.*, 2003; Mabrouk *et al.*, 2003). En relación a otros tumores, como el cáncer de próstata, hay estudios en los que se sugiere que la variante prolina confiere un mayor riesgo de desarrollar dicho tumor (Wu *et al.*, 2004) y otros en los que no se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa (Huang *et al.*, 2004). Lo mismo ocurre con otros tumores genitourinarios, como el cáncer de vejiga (Furihata *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004) y el carcinoma de cérvix (Kucera *et al.*, 2000; Sifuentes *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004) el carcinoma de endometrio (Roh *et al.*, 2004), y el de ovario (Hogdall *et al.*, 2002; Pegoraro *et al.*, 2003). En el cáncer de pulmón, al igual que en el resto de tumores, la mayoría de los estudios epidemiológicos han sido de casos-contróles, observándose una asociación positiva, incrementando el riesgo, tanto para el genotipo homocigoto prolina (Weston *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2003), como para el genotipo heterocigoto arginina/prolina (Miller *et al.*, 2002). Igualmente se han publicado estudios en los que no se ha demostrado un incremento del riesgo de

desarrollar cáncer de pulmón con dichas variantes genotípicas (Birgander *et al.*, 1995; Malcolm *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), ver Anexo I.

Otro punto importante es que se ha investigado sobre una correlación entre la variabilidad del codón 72 de *TP53* y la latitud, en la cual el alelo codificante para prolina se hace más prevalente a medida que se está más próximo a la línea ecuatorial sugiriendo que la distribución mundial de este polimorfismo refleja una adaptación a la exposición de la radiación UV. Sin embargo, la población amerindia de Warao (Venezuela), localizada entre los 8 °N y la población de Aché (Paraguay), localizada en los 24 °S presentan frecuencias para el alelo prolina entre 6,8 % y 36,6 %, sin que exista correlación con la latitud (Beckman *et al.*, 1994; Sjölander *et al.*, 1995).

En este sentido, las frecuencias alélicas encontradas en el presente estudio y en otros reportes para poblaciones amerindias contrastan de manera significativa con poblaciones autóctonas de África, Asia y Oceanía en las cuales predomina el alelo prolina aunque habitan en latitudes similares.

Las poblaciones mixtas del Nuevo Mundo son únicas al representar la repentina confluencia de genomas geográficamente divergentes con nuevos retos medioambientales, producto de la migración intercontinental. Este tipo de presión selectiva puede ser muy diferente a la que puedan enfrentar poblaciones estacionarias, en las cuales los cambios ambientales locales pueden ocurrir gradualmente, permitiendo el incremento de la frecuencia de alelos poco comunes (Tang *et al.*, 2007). Por lo tanto, nuestra diversidad genética puede ser el producto del patrón de mezcla de genomas más que del efecto de la selección natural ante el medio ambiente. Ojeda *et al.* (2003) sugieren que la distribución mundial del polimorfismo del codón 72 de *TP53* en poblaciones autóctonas refleja las antiguas

rutas migratorias humanas, específicamente aquellas que dispersaron al *Homo sapiens* moderno desde África hace 100 000 - 150 000 años. Considerando que el poblamiento de América data de unos 20 000 – 30 000 años (Fagundes *et al.*, 2008) y que la hipótesis más aceptada es que se dio por grupos humanos provenientes de Asia y Europa. Es posible que el efecto de selección natural no haya favorecido el incremento de las frecuencias del alelo prolina en poblaciones ubicadas en áreas geográficas con alta irradiación solar en el continente americano. Sin embargo, no es descartable el efecto que ha podido tener la exposición a condiciones ambientales o ecológicas producto del contacto con otros grupos humanos.

En relación al intrón 6, el alelo más frecuente resultó W (silvestre) con una frecuencia de 0.982 para la muestra de Lima y 0.810 para la muestra de Huacho. Estos resultados son similares con los reportados en la población de ascendencia mexicana (Wu *et al.*, 2002) donde indican para el alelo W una frecuencia de 0.9 y para la población caucásica una frecuencia alélica para la variante W de 0.88. De la misma manera en un estudio en la población de Inglaterra, se encontró que el alelo W tiene una frecuencia alélica de 0.901 (Mavridou *et al.*, 1998), y para una muestra poblacional africana, una frecuencia alélica de 0.88 (Wu *et al.*, 2002).

Con respecto a los estudios de asociación genética y susceptibilidad del cáncer; varios trabajos se han realizado con la finalidad de dilucidar la existencia de riesgo hacia un tipo de cáncer y presencia de este marcador. Así se tiene el trabajo de Wu *et al.*, (2002), donde reportó para el intrón 6, que la frecuencia del alelo M se relaciona estadísticamente con la susceptibilidad al cáncer de pulmón con una frecuencia de 0.12 y 0.10 en las poblaciones caucásicas y americanas respectivamente. En cambio nuestros resultados indican que el alelo M (ausencia del sitio de restricción), con una frecuencia de 0.017 y 0.189 para la muestra de Lima y Huacho respectivamente, presentan una frecuencia baja, semejante a los resultados de la población africana

estudiada por Madeiros *et al.*, (2007), con una frecuencia para el alelo M de 0.05. En cambio, en un estudio de caucásicos del sureste de Inglaterra (Mavridou *et al.*, 1998), reveló un incremento significativo en la prevalencia del alelo M en los pacientes con cáncer de ovario, con una frecuencia del alelo M de 0.164. Es posible que la transición G a A interrumpa una estructura *hairpin-like* formada por la hibridación de la citosina y guanina (Peller *et al.*, 1995). La interrupción de esta estructura secundaria del alelo W puede proporcionar un impacto negativo en el mecanismo de la función del gen *TP53*.

En el caso del intrón 3, la inserción de 16 bp del gen *TP53*, se describió por primera vez en 1993, en la población caucásica, observándose un 28 % de heterocigosidad en los 82 pacientes estudiados (Lazar *et al.*, 1993). Para la muestra de Lima, la variante alélica más frecuente fue W con 94.6 % (0.946), así como en la muestra de Huacho, donde se obtuvo un valor de 90 % (0.900), por lo que la variante alélica W tiene una mayor frecuencia de incidencia, en cambio para el alelo M, se obtuvo una frecuencia génica baja, con 5.4 % (0.053) y 10 % (0.100) para las muestras de Lima y Huacho, respectivamente.

Estos resultados coinciden con estudios de asociación de esta variante y el riesgo hacia la susceptibilidad de cáncer donde se notó un incremento de riesgo de cáncer de pulmón para los homocigotos (M/M) y para los heterocigotos (W/M) en una población de origen caucásica e hispano-americanos (Wu *et al.*, 2003). Sin embargo, esta asociación no se observó en la raza afroamericana (Wu *et al.*, 2002). Este polimorfismo ha sido también estudiado en otros tipos de tumores. En el cáncer de ovario, un estudio encontró un mayor riesgo de desarrollar el cáncer en los pacientes con la variante mutante (M) (Runnebaum *et al.*, 1995). Sin embargo otros dos estudios no han encontrado dicha asociación (Campbell *et al.*, 1996; Lancaster *et al.*, 1995). La proximidad de este polimorfismo al codón 72 en el exón 4 podría explicar en parte la asociación propuesta de este alelo con cáncer. Un estudio en la población de

España (Gemignani *et al.*, 2004), mostró que esta inserción de 16 pares de bases, se asoció con niveles más bajos de transcripciones del *TP53*, lo que sugiere que el polimorfismo causa una alteración en el procesamiento del ARNm, proporcionando una posible base molecular para el aumento asociado en el riesgo de desarrollar cáncer, la cual para los resultados obtenidos en el presente estudio, no mostró un valor significativo.

Con respecto a la heterocigosidad observada en comparación con los tres marcadores estudiados para la muestra de Lima y de Huacho, se observa que la mayor se encuentra para el codón 72 con un 0.431 y 0.324 respectivamente, pero presenta un valor relativamente bajo y similar con los valores obtenidos con una población de Lima Metropolitana donde se obtuvo un valor de 0.354 (Klug *et al.*, 2001). Se considera que principalmente se debe a la presencia de un alelo con una frecuencia alta, en este caso el alelo Arginina, con un valor al 50 % del total esperado en ambos loci del gen *TP53*. Por otro lado, el intrón 6 presenta una heterocigosidad muy baja de 0.034 para la muestra de Lima y 0.216 para la de Huacho, la cual se aproxima a la mayoría de las poblaciones reportadas (Mavridou *et al.*, 1998; Madeiros *et al.*, 2007). Se asume que estos resultados se deben principalmente por la alta frecuencia del alelo W y su contraste del alelo M, donde se ha encontrado que el alelo M presenta una frecuencia alélica muy baja en los estudios de asociación genética de los individuos controles (Wu *et al.*, 2002). De igual manera ocurre con el intrón 3, donde la heterocigosidad es 0.107 y 0.200 en la muestra de Lima y de Huacho respectivamente; estos resultados se aproximan con las poblaciones mexicanas americanas y caucásicas; pero no así con las africanas (Wu *et al.*, 2002), ver Anexo I.

Cuando se realizó la prueba de diferenciación poblacional, se evaluó si la frecuencia alélica es semejante o diferente genéticamente entre las dos muestras poblacionales estudiadas. El valor de la prueba de F_{st} se obtuvo empleando la varianza de las

frecuencias alélicas de las poblaciones, dividida entre el promedio de las frecuencias alélicas por uno, menos el promedio de las frecuencias alélicas (Guido, 2000). Sin embargo, el software Arlequín genera un valor de F_{st} corregido, es decir más cercano a lo que ocurre en poblaciones naturales debido a que se emplea el algoritmo matemático de las Cadenas de Markov. Es así que con el software Arlequín (Stefan *et al.*, 2000), se obtuvo para el codón 72, el valor de $p=0.05183 \pm 0.0591$ que al no ser significativo se rechaza la hipótesis, por consiguiente se concluye que no existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas para el codón 72 del gen *TP53* entre las dos muestras poblacionales estudiadas del departamento de Lima. En cambio para el intrón 6 e intrón 3 se obtuvo un valor de $p= 0.8634 \pm 0.0017$ y $p= 0.7831 \pm 0.0031$ respectivamente; que al ser significativos se acepta la hipótesis; es decir, sí existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de estos dos marcadores para ambas muestras poblacionales estudiadas. Esto se debe principalmente, a que las secuencias intrónicas al ser regiones no codificantes, suelen tener una tasa de mutación relativamente alta, la cual va variando en las poblaciones. Por lo que, en la secuencia no codificante del DNA es probable que se acumule mutaciones deletéreas (Lynch y Conery, 2003), lo cual hace que ambas muestras estudiadas se diferencien genéticamente, respecto a la variante polimórfica del intrón 6 e intrón 3.

De acuerdo con el principio de la genética de poblaciones, la eficiencia de la selección en la eliminación de mutaciones deletéreas ligeramente depende en gran medida del tamaño efectivo de la población (N_e) y el flujo génico de la población (Lynch y Conery, 2003). Por lo que, al ser el intrón 3 y 6 los polimorfismos incluidos en las dos muestras poblaciones analizadas, se esperaría que a través del tiempo, la alta tasa de sustituciones nucleotídicas influya significativamente en estas secuencias no codificantes.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó la frecuencia alélica de las tres variantes polimórficas del gen *TP53*, donde la frecuencia alélica con mayor valor fue W (silvestre) con 0.946 y 0.900 para intrón 3; el alelo W (silvestre) con 0.982 y 0.810 para el intrón 6 y para el codón 72, el alelo Arg con 0.698 y 0.702 para las muestras de Lima y Huacho respectivamente.
- La estandarización y las metodologías para el procesamiento de las muestras del DNA resultó ser la adecuada para la identificación de los alelos.
- Se logró establecer una base de datos de las frecuencias alélicas para las tres variantes polimórficas: codón 72, intrón 6 e intrón 3 del gen *TP53* para un futuro estudio de casos y controles.
- Se determinó que ambas muestras poblacionales estudiadas se encuentran en equilibrio de Hardy – Weinberg.
- Según la prueba del test estadístico de Fisher, no existe diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre ambas muestras estudiadas en relación al codón 72, En cambio para las frecuencias alélicas del intrón 3 y 6, si existió diferencias significativas.

9. RECOMENDACIONES

- Evaluar un mayor número de individuos en la muestra poblacional, para que los resultados permitan proporcionar un análisis más amplio y preciso.
- Trabajar con casos (población con algún tipo de cáncer), permitiría una evaluación de asociación de riesgo, utilizando los datos controles proporcionados en este trabajo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York. ISBN-10: 0-8153-4072-9.
2. Alpízar, W., Sierra, R., Cuenca, P., Une, C., Mena. F., & Pérez G. (2005). Asociación del polimorfismo del codón 72 del gen p53 con el riesgo de cáncer gástrico en una población de alto riesgo de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 53, n° 4, p. 317 - 324.
3. Appella, E. & Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Biochem*, Vol.268, n°. 10, p. 2764-2772.
4. Barton, E., & Albrigh, L. (1994). DNA sequencing. *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts General Hospital & Harvard Medical School, vol. I, n°. 7, p. 1 - 7.
5. Becker, W., M., Reece, J. B., & Poenie, M. F. (1996). *The World of the Cell*. 3 rd ed. New York. ISBN-13: 978-0805308808.
6. Beckman, G., Birgander, R., Själander, A., Saha, N., Holmberg, P., Kivelä, A., & Beckman L. (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Human Hered.* Vol. 44, n°. 5, p. 266 - 270.
7. Bensaad, K., & Vousden K. (2007). p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol.* Vol. 17, n°. 6, p. 286 - 291.
8. Bergamaschi, D., Samuels, Y., Sullivan, A., Zvelebil, M., Breysens, H., Bisso, A., *et al.* (2006). iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nature Genet.* Vol. 38, n°. 10, p. 1133 - 1141.
9. Birgander. R., Sjalander. A., Rannug, A., Alexandrie, A., Sundberg, M., Seidegard, J. (1995). p53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis.* Vol. 16, n°. 9, p. 2233 - 6.

10. Bonafe, M., Ceccarelli, C., Arabegoli, F., Santini, D., Taffurelli, M., Barbi, C., & Marzi, E. (2003). Retention of the p53 codón 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clin Cancer*. Vol. 9, n°. 13, p. 4860-4864.
11. Bougeard, G., Baert, S., Tournier, I., Vasseur, S., Martin, C., Brugieres, A., *et al.* (2006). Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li–Fraumeni syndrome. *J. Med. Genet.* Vol 43, n°. 6, p. 531 - 533.
12. Botstein, D., White, R., Skolnick, M., Davis, R. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. Vol. 32: n°. 3, p. 314 - 331.
13. Bourdon, J., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D., Saville, M., & Lane, D. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & Development*. Vol. 19, n°. 18, p. 2122 - 2137.
14. Buyru, N., Tigli, H., Dalay, N. (2003). p53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep*. Vol. 10, n°. 3, p. 711-714.
15. Campbell, I., Eccles, D., Dunn, B., Davis, M., & Leake, V. (1996). p53 polymorphism in ovarian and breast cancer. *Lancet*. Vol. 347, n°. 8998, p. 393 - 394.
16. Candeias, M. *et al.* (2008). p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nature Cell Biol.* Vol. 10, n°. 9, p. 1098–1105.
17. Chen, Y., Xu, L., Guo, Y., Su, H., Smith, T., & Ryan, L. (2004). Polymorphisms in GSTT1 and p53 and urinary transitional cell carcinoma in south-western Taiwan: a preliminary study. *Biomarkers*. Vol.9, n°. 4, p. 386-94.
18. Chuaire, L., Sánchez, M., & Ramírez, S. (2008). p53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. Revisión. *Invest Clin*. Vol. 49, n°. 4, p. 561 – 593.
19. Cooper, G. (1992). Elements of human cancer. Boston: Ed.Jones and Bartlett Publishers. ISBN: 0-86720-191-6.

20. Courtois, S., De Fromentel, C., & Hainaut, P. (2004). p53 variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms. *Oncogene*. Vol. 23, n°. 3, p. 631–638.
21. Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolese, M., Sacchi, A., *et al.* (2006). Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycleregulation. *Cancer Cell*. Vol. 10, n°. 3, p. 191–202.
22. Dumont, P., Leu, J., Della Pietra, A., George, D., & Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*. Vol. 33, n°. 3, p. 357-65.
23. Erster, S., Mihara, M., Kim, R. H., & Petrenko, O. (2004). In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol*. Vol. 24, n°. 15, p. 6728 – 6741.
24. Excoffier, L., & Lisher, H. (2011). Arlequin ver 3.5 An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Population Genetics Lab (CMPG) Institute of Ecology and Evolution University of Berne Baltzerstrasse 6 3012 Bern Switzerland. Free program distributed by the authors over the internet from <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.
25. Facista, A., Nguyen, H., Lewis, C., Prasad, A., Ramsey, L., Zaitlin, Bl., Nfonsam, V., Krouse, Robert S., Bernstein, Harris., Payne, Claire M., Stern, Stephen., Oatman, Nicole., Banerjee, Bhaskar., Bernstein, Carol. (2012). Deficient expressions of DNA repair enzymes in early progression to sporadic colon cancer. *Genome Integrity*. Vol. 3, n°, 1, p. 3.
26. Fagundes, N., Kanitz, R., & Bonatto, S. (2008). A reevaluation of the Native American mtDNA genome diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia. *PLOS ONE*. Vol.3, n°. 9, p. 3157

27. Fisher, R. A. (1935). The fiducial argument in statistical inference. *Annals of Eugenics*. Vol. 8, n°. 5, p. 391–398.
28. Frazer, K., A. *et al.* (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. Vol. 449, n°. 7164, p. 851–861.
29. Furihata, M., Takeuchi T, Matsumoto M, Kurabayashi A, Ohtsuki Y, Terao N. (2002). p53 mutation arising in Arg72 allele in the tumorigenesis and development of carcinoma of the urinary tract. *Clin Cancer Res*. Vol. 8, n°. 5, p. 1192-1195.
30. Gemignani, F., Moreno, V., Landi, S., Moullan, N., Chabrier, A., Gutierrez, S., Hall, J., *et al.* (2004). A *TP53* polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*. Vol. 23, n°. 10, p. 1954 -1956.
31. Guido Barbujani. (2000). Geographic Patterns: How to Identify Them and Why? *Human Biology*. Vol. 72, n°. 12, p. 133 – 153.
32. Hanahan, D., & Weinberg, R., A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*. Vol. 100, n°. 1, p. 157-70.
33. Hardy, H.(1908). Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. Vol. 28, n°. 706, p. 49 – 50.
34. Hogdall, E., Hogdall, C., Christensen, L., Glud, E., Blaakaer, J., & Bock, J. (2002). Distribution of p53 codon 72 polymorphisms in ovarian tumour patients and their prognostic significance in ovarian cancer patients. *Anticancer Res*. Vol. 22, n°. 3, p. 1859 - 64.
35. Hu, W., Feng, Z., Atwal, G., & Levine, A. (2008). p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle*. Vol. 7, n°. 7, p. 848 - 852.
36. Huang, L., Snyder, A. R., & Morgan, W. (2003a). Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene*. Vol. 22, n°. 37, p. 5848 - 5854.
37. Huang, X., Hamajima, N., Katsuda, N., Matsuo, K., Hirose, K., & Mizutani, M. (2003). Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2

- genetic polymorphisms with the risk of Japanese breast cancer. *Breast Cancer*. Vol. 10, n°. 4, p. 307-11.
38. Huang, S., Wu, W., Chang, W., Wu, M., & Chen, Y. (2004). p53 Codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms in prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Vol. 13, n°. 12, p. 2217- 2224.
 39. Kalemi, T., Lambropoulos, A., Gueorguiev, M., Chrisafi, S., Papazisis, K., & Kotsis, A. (2005). The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Lett*. Vol. 222, n°. 1, p. 57-65.
 40. Kato, S., Han, S., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., *et al.* (2003). Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Acad. Sci*. Vol. 100, n°. 14, p. 8424 - 8429.
 41. Khaliq, S., Hameed, A., Khaliq, T., Ayub, Q., Qamar, R., Mohyuddin, A., *et al.* (2000). p53 mutations, polymorphisms, and haplotypes in Pakistani ethnic groups and breast cancer patients. *Genet Test*. Vol. 4, n°. 1, p. 23-29.
 42. Klug, S., Wilmotte, R., Santos, C., Almonte, M., Herrero, R., Guerrero, I., Cáceres, E., Peixoto, D., Lenoir, G., Hainaut, P., Walboomers, J., & Muñoz, N. (2001). TP53 polymorphism HPV infection and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. Vol. 10, n°. 1, p. 1009 -1012.
 43. Kucera, E., Tong, D., Reinthaller, A., Leodolter, S., Zeillinger, R., & Sliutz, G. (2000). p53 polymorphism at codon 72--does it constitute a risk for squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the cervix in Central Europeans? *Wien KlinWochenschr*. Vol.112, n°. 18, p. 817- 20.
 44. Kumar, M., Abul, K., Abbas, M., Nelson, F., & Aster, J. (2009). Molecular basis of cancer». En Saunders (Elsevier). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease* (8th edición)

45. Kruse, J., & Gu, W. (2008). p53 posttranslational modifications. *Cell*. Vol.133, n°. 1, p. 930–930.
46. Lakshmi, I., Kalyan, K., Mohan, R., Anjaneyulu, V., & Sadanani, M. (2012). p53 Codon 72 Gene Polymorphism and Risk of Oral Squamous Cell Carcinoma in South Indian Population: A Case-Control Study”. *Cancer*. Vol. 4
47. Langerod, A., Bukholm, I., Bregard, A., Lonning, P., Andersen, I., & Rognum, T. (2002). The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Vol. 11, n°. 12, p.1684-8.
48. Lancaster, J., Brownlee, H., Wiseman, R., & Taylor, J. (1995). p53 polymorphism in ovarian and bladder cancer. *Lancet*. Vol. 346, n°. 8968, p. 182.
49. Lazar, V., Hazzar, F., Bertin, F., Janin, N., Bellet, D., Bressac, B., *et al.* (1993). Simple sequence repeats polymorphism within the p53 gene. *Oncogene*. Vol. 8, n°. 6, p. 1703–1705.
50. Levitt, N., & Hickson, I. (2002). Caretaker tumor suppressor genes that defend genome integrity. *Trends in Molecular Medicine*. Vol. 8, n°. 4, p. 179-186.
51. Lewin, B. (2004). *Genes VIII*, Oxford University Press Inc., NY. p. 917- 918
52. Liu, B., Peto, R., Chen, Z., Boreham, J., Wu, Y., & Li, J. (1998). Emerging tobacco hazards in China: 1. Retrospective proportional mortality study of one million deaths. *BMJ*. Vol. 317 n°. 7170, p. 1411-22.
53. Lynch, M., Conery, J. (2003). The origins of genome complexity. *Science*. Vol. 302, n°. 5649, p 1401 –1404.
54. Mabrouk, I., Baccouche, S., El-Abed, R., Mokdad-Gargouri, R., Mosbah, A., Said, S. (2003). No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Acad Sci*. Vol. 1010, n°. 1, p. 764-70.

55. McBride, O., Merry, D., Givol, D. (1986). The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 83, nº. 1, p. 130–134.
56. Madeiros, T., Allyrio, T., Medeiros, C., & De Vasconcellos, R. (2007). Análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição para MspI no íntron 6 do TP53 em pacientes com câncer do colo do útero. *RBAC*. Vol. 39, nº. 4, p. 251-253.
57. Malcolm, E., Baber, G., Boyd, J., & Stoler, M. (2000). Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Mod Pathol*. Vol. 13, nº. 4, p. 373-8.
58. Malkin, D. (1993). p53 and the Li-Fraumeni syndrome cancer genet. *Cytogenet.* Vol. 66, nº. 3, p. 83–92.
59. Mantovani, F., Tocco, F., Girardini, J., Smith, P., Gasco, M., Lu, X., *et al.* (2007). The prolylisomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nature Struct.Mol. Biol.* Vol. 14, nº. 10, p. 912 - 920.
60. Matlashewski, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L., Benchimol, S., (1984). Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.* Vol. 3, nº. 13, p. 3257- 3261.
61. Mavridou, D., Gornall, R., & Campbell, G. (1998). TP53 intron 6 polymorphism and the risk of ovarian and breast cancer. *Journal of Cancer*. Vol. 77, nº. 4, p. 676 - 678.
62. Menendez, D., Inga, A., & Resnick, M. (2006). The biological impact of the human master regulator p53 can be altered by mutations that change the spectrum and expression of its target genes. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 26, nº. 6, p. 2297–2308.
63. Miller, D., Liu, G., De Vivo, I., Lynch, T., Wain, J., & Su, L. (2002). Combinations of the variant genotypes of GSTP1, GSTM1, and p53 are associated with an increased lung cancer risk. *Cancer Res*. Vol. 62, nº.10, p. 2819-23.
64. Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.

65. Oesterreich, S. & Fuqua, S. (1999). Tumor suppressor genes in breast cancer. *Cancer*. Vol. 6, n°. 4, p. 405-419.
66. Ojeda, J., Ampuero, S., Rojas, P., Prado, R., Allende, J., Barton, S., Chakraborty, R., & Rothhammer, F. (2003). p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer. *Biol. Res*. Vol. 36, n°.2, p. 279-283.
67. Olivier, M., Petitjean, A., Marcel, V., Petre, A., Mounawar, M., Plymoth, A., *et al.* (2008). Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene*. Vol. 16, n°. 1, p. 1-12.
68. Parker, P., Snow, M., Schug, G., & Booton, P. (1998). What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. Vol. 79, n°. 2, p. 361-382.
69. Pegoraro, R., Moodley, M., Rom, L., Chetty, R., & Moodley, J. (2003). p53 codon 72 polymorphism and BRCA 1 and 2 mutations in ovarian epithelial malignancies in black South Africans. *Gynecol Cancer*. Vol. 13, n°. 4, p. 444-9.
70. Peller, S., Kopilova, Y., Slutzki, S., Halevy, A., Kvitko, K., & Rotter, V. (1995). A novel polymorphism in intron 6 of the human p53 gene: a possible association with cancer predisposition and susceptibility. *Cell Biol*. Vol. 14, n°. 12, p. 983–90.
71. Pérez de la Vega, M. (1993). Biochemical characterization of populations. *Chapman & Hall*. London. p.184 - 200.
72. Pérez, L., Abba, M., Dulout, F., & Golijow, C. (2006). Evaluation of p53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina. *World J. Gastroenterol*. Vol. 12, n°. 9, p. 1426-1429.
73. Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S., Hainaut, P., *et al.* (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat*. Vol. 28, n°. 6, p. 622–629.

74. Pinto, Y., Ibáñez, M., Rangel, N., Ramírez, S., Sánchez, W., & Vanegas D. (2007). Polimorfismos del gen p53 en cáncer mamario familiar en una población colombiana *Rev. Col. Cir. Vol. 22*, n°. 3, p. 17-26.
75. Pinto, G., Yoshioka, F., Silva, R., Clara, C., Santos, M., Almeida., *et al.* (2008). Prognostic value of *TP53* Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. *Genet.Mol. Res.Vol. 7*, n°. 12, p. 207-216.
76. Ponder, B. (1991). Genetic predisposition to cancer. *Cancer*. Vol. 61, n°. 4, p. 203-204.
77. Puente, X., Velasco, G., Gutierrez, A., Bertranpetit, J., King, M., Lopez, C., *et al.* (2006). Comparative analysis of cancer genes in the human and chimpanzee genomes. *BMC Genomics. Vol. 7*, n°. 4, p.15.
78. Roh, J., Kim, J., Park, N., Song, Y., Park, I., Park, S., *et al.* (2004). p53 and p21 genetic polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* Vol. 93, n°. 2, p. 499-505.
79. Rouseet F. (2007). GenePop version 4. A complete reimplementación of the GenePop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol.*
80. Runnebaum, I., Tong, X., Konig Zhao, H., Korner, K., Atkinson E, (1995). p53 based blood test for p53PIN3 and risk for sporadic ovarian cancer. *Lancet.* Vol. 345, n°. 8955, p. 994.
81. Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., & Prendergast, C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene.* Vol.15, n°. 14, p. 887–898.
82. Sanguinetti, C., Dias, N., Simpson, A. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* Vol. 17, n°. 5, p. 914– 921.

83. Schmitt, M., Prindle, M., & Loeb, L. (2012). Implications of genetic heterogeneity in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1267, n°. 14, p. 110 – 116
84. Simpson, J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* Vol. 60, n°. 4, p. 73-76.
85. Sifuentes, A., & Reyes, M. (2003). Risk factors for cervico-uterine cancer associated to HPV: p53 codon 72 polymorphism in women attending hospital care. *Ginecol Obstet*. Vol. 71, n°. 4, p. 12-5.
86. Sjölander, A., Birgander, R., Kivela, A., & Beckman, G. (1995). p53 polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups. *Human Hered.* Vol. 45, n°. 3, p. 144-149.
87. Soto de Prado Otero. (2008). "Estudio de los polimorfismos de genes reparadores en población fumadora con y sin cáncer de pulmón. Universidad de Salamanca". Facultad de Medicina. España. Tesis Doctoral
88. Stefan, S., David, R., & Laurent E. (2000). Arlequín ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
89. Su, L., Sai, Y., Fan, R., Thurston, S., Miller, D., & Zhou, W. (2003). P53 (codon 72) and P21 (codon 31) polymorphisms alter in vivo mRNA expression of p21. *Lung Cancer*. Vol. 40, n°. 3, p. 259-66.
90. Sullivan, A., Syed, N., Gasco, M., Bergama, D., Trigiant, G., Attard, M., *et al.* (2004). Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*. Vol. 23, n°. 14, p. 3328–3337.
91. Tada, M., Furuuchi, K., Kaneda, M., Matsumoto, J., Takahashi, M., & Hirai A. (2001). Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis*. Vol. 22, n°. 3, p. 515-7.

92. Tang, H., Choudhury, S., Mei, R., Morgan, M., Rodríguez-Cintrón, W., Burchard, E., & Risch, N. (2007). Recent genetic selection in the ancestral admixture of Puerto Ricans. *Human Genet.* Vol. 81, n°. 3, p. 626-633.
93. Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L. & Matlashewski, G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and cellular biology.* Vol. 19, n°. 2, p. 1092 – 1100.
94. Toledo, F., Lee, C., Krummel, K., Rodewald, L., Ciu, C., Wahl, G., *et al.* (2007). Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 27, n°. 4, p.1425–1432.
95. Ueda, M., Hung, Y., Terai, Y., Kanda, K., Takehara, M., & Yamashita, H. (2003). Glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and p53 codon 72 polymorphisms in human tumor cells. *Hum Cell.* Vol. 16, n°. 4, p. 241-51.
96. Valadez, E., & Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México.
97. Vogelstein, B., & Kinzler, K. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med.* Vol. 10, n°. 4, p. 789–799.
98. Vousden, K., Lane, D. (2007). p53 in health and disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 8, n°. 4, p. 275–283.
99. Wang-Gohrke, S., Weikel, W., rish, H., Vesprini, D., Abraham, J., Lerman, C., *et al.* (1999). Intron variants of the p53 gene are associated with increased risk for ovarian cancer but not in carriers of *BRCA1* or *BRCA2*germline mutations. *Br. J. Cancer.* Vol. 81, n°. 5, p. 179–183.
100. Weston, A., Perrin, L., Forrester K, Hoover R, Trump B, Harris C. (1992). Allelic frequency of a p53 polymorphism in human lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Vol. 1, n°. 6, p. 481-3.

101. Weinstein, I., & Joe, A. (2006). Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature oncology*. Vol. 3, n°. 4, p. 448-457.
102. Whibley, C., Pharoah, P., & Hollstein, M. (2009). p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature*. Vol. 9, n°. 2, p. 95 – 107.
103. Wilbur, Beth. (2009). *El mundo de la Célula*. 7ª ed. San Francisco.
104. Wu, H., Chang, C., Chen, H., Tsai, F., Tsai, J., & Chen, W. (2004). p53 gene codon 72 polymorphism but not tumor necrosis factor-alpha gene is associated with prostate cancer. *UrolInt*. Vol. 73, n°. 1, p. 41-6.
105. Wu, M., Liu, C., Ho, C., & Wu, T. (2004). Genetic polymorphism of p53 and XRCC1 in cervical intraepithelial neoplasm in Taiwanese women. *Formos Med Assoc*. Vol. 103, n°. 5, p. 337-43.
106. Wu, X., Zhao, H., Amos, C., Shete, S., Maman, N., & Hong, W., *et al.* (2002). p53 Genotypes and Haplotypes Associated with Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *Cancer Inst*. Vol. 94, n°. 9, p. 681-90.
107. Bergamasch, J., Li, Y., Wang, R., Wen, D., Wu, M., & He, M. (2003). p53 gene polymorphism with susceptibility to esophageal cancer and lung cancer in Chinese population. *Liu ZaZhi*. Vol. 25, n°. 4, p. 365-7.

11. ANEXOS

ANEXO I.

Cuadro comparativo de las frecuencias alélicas y heterocigosidad observada del codón 72 en el gen *TP53*, con respecto a varias poblaciones.

País	N	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica		Referencia
		Pro / Pro	Pro / Arg	Arg / Arg	Pro	Arg	
Perú (Lima)	58	0.068	0.431	0.509	0.302	0.698	En este Trabajo
Perú (Huacho)	37	0.135	0.324	0.540	0.297	0.703	En este Trabajo
Perú	127	0.126	0.354	0.520	0.303	0.696	Klug <i>et al.</i> , 2001
Argentina	109	0.11	0.48	0.40	0.35	0.64	Pérez <i>et al.</i> , 2006
Colombia	186	0.10	0.45	0.44	0.33	0.67	Pinto <i>et al.</i> , 2007
Chile	133	0.15	0.44	0.41	0.36	0.63	Irrázabal <i>et al.</i> , 2003
Inglaterra	277	0.08	0.41	0.45	0.31	0.69	Zhang <i>et al.</i> , 2003
Italia	174	0.04	0.35	0.61	0.22	0.78	Bergamaschi <i>et al.</i> , 2004
España	90	0.10	0.44	0.46	0.32	0.68	Beckman <i>et al.</i> , 1994
Japón	110	0.18	0.46	0.36	0.41	0.59	Minaguchi <i>et al.</i> , 1998
Tailandia	100	0.25	0.53	0.22	0.52	0.48	Settheetham <i>et al.</i> , 2005
India	112	0.22	0.51	0.27	0.48	0.52	Acharya <i>et al.</i> , 2002
Nigeria	122	0.39	0.49	0.12	0.63	0.37	Beckman <i>et al.</i> , 1994
Uganda	115	0.47	0.48	0.05	0.71	0.29	Tornesello <i>et al.</i> , 2005
Sudáfrica	340	0.47	0.44	0.09	0.69	0.31	Pegoraro <i>et al.</i> , 2002

Cuadro comparativo de la heterocigosidad observada del Intrón 3 y 6 en el gen *TP53*, con respecto a varias poblaciones.

Intrón 3				Intrón 6			
País	N	He	Referencia	País	N	He	Referencia
Perú (Lima)	58	0.107	En este Trabajo	Perú (Lima)	58	0.034	En este Trabajo
Perú (Huacho)	37	0.200	En este Trabajo	Perú (Huacho)	37	0.216	En este Trabajo
Colombia	186	0.115	Pinto <i>et al.</i> , 2007	Colombia	186	0.155	Pinto <i>et al.</i> , 2007
Caucásicas	541	0.181	Wu <i>et al.</i> , 2002	Inglaterra	277	0.165	Mavridou <i>et al.</i> , 1998
Africanas	127	0.374	Wu <i>et al.</i> , 2002	Sudáfrica	154	0.152	Wu <i>et al.</i> , 2002

ANEXO II
CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUESTRA DE DNA CON FINES DE DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS MOLECULARES EN LOS PROYECTOS TITULADOS: “DETERMINACION DE LAS VARIABLES GÉNICAS DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES (TP53) EN POBLACIONES PERUANAS”, “DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES GENOTÍPICAS DEL GEN MANNOSE-BINDING LECTIN (MBL2) EN POBLACIONES PERUANAS” y DETERMINACION DEL POLIMORFISMO INDEL(I/D) DEL GEN ECA EN MUESTRAS DE POBLACIONES PERUANAS”

LAB GENÉTICA HUMANA- FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS- UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS -2014

Presentación del Equipo de Trabajo

- Somos el equipo del Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con dirección: Calle Germán Amezaga 375 – Cercado de Lima, teléfono 619 7000.
- Margarita Rosa Eugenia VELASQUEZ REINOSO (Bióloga).
- Ricardo JaimeDESCAILLEAUX DULANTO (M. Sc. Jefe del laboratorio)
- Jesús CORDOVA SANTA GADEA, (Biólogo).

En el trabajo diario del laboratorio, nos guiamos por la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de la UNESCO, aprobada en 1997; la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de la UNESCO, aprobada el 16 de Octubre del 2003; el Informe de la Secretaría de la Organización Mundial de la Salud sobre Control de las Enfermedades Genéticas, Documento EB116/3 del 21 de Abril de 2005 y la Comunicación (2008) 679 de la Comisión de las Comunidades Europeas sobre las Enfermedades Raras: un Reto para Europa del 11 de Noviembre del 2008. Igualmente, todos los integrantes del Servicio firmamos una Declaración de Confidencialidad, con respecto a los datos que manejamos durante nuestro trabajo.

Utilidad de este Consentimiento

El propósito de este documento es proporcionarle la información necesaria para que libremente decida si desea o no donar una muestra de sangre para su posterior extracción de DNA. Lea por favor la información que sigue y pregúntenos todo aquello que no le quede claro. Una vez que esté seguro de haber entendido cómo se toma la muestra de DNA y lo que se va a hacer con ella, decida si desea tomarse la muestra.

¿Qué le estamos solicitando?

Que Ud. nos proporcione una muestra de sangre periférica de una vena del brazo o mano, de la cual nosotros obtendremos su DNA, para que sea empleado en procedimientos o análisis de genética molecular con fines de investigación. Le pedimos que nos proporcione una muestra de su sangre, que luego haremos anónima, es decir, se retirará la identificación correspondiente a su nombre y sólo registraremos el género, sexo y año de nacimiento.

¿En qué consiste la toma de muestra de sangre?

El DNA se encuentra en todas nuestras células y por lo tanto en las células blancas de la sangre. Por ello es obtenido a partir de una muestra de sangre periférica, es decir, de una de

las venas del brazo. Si Ud. está de acuerdo, se le tomará una muestra de sangre. Para tener una idea, las personas tenemos alrededor de 3,500 mililitros de sangre, por ejemplo, en una donación de sangre se extrae una o dos bolsas de 250 mililitros. A usted se le tomará una muestra que corresponde a tres cucharadas de sopa o 15 mililitros. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Es de uso exclusivo para estandarizar pruebas moleculares y para investigación en genética molecular. Recuerde **que** la muestra va a ser anónima luego de tomada y no se podrá identificar la suya de entre las otras.

¿Se requiere información clínica?

Sí, se le preguntará por antecedentes personales, antecedentes familiares y aspectos clínicos relacionados con dificultades intelectuales y otras enfermedades crónicas.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud.?

Las molestias que Ud. sentirá son algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por un personal de la institución sin costo adicional.

¿Cuáles son los beneficios?

Usted contribuirá al desarrollo y estandarización de técnicas de genética molecular que nos permitirán realizar diagnóstico de enfermedades e investigación. No hay compensación económica por su participación en este estudio.

¿Es confidencial mi participación en este estudio?

Sí, su participación es confidencial, las muestras pasan a ser anónimas, no se entregan resultados ya que estas muestras serán utilizadas para estandarizar técnicas y no son para diagnóstico específico de enfermedad alguna. Sus datos personales (año de nacimiento y sexo) así como la muestra de sangre tendrán un código y no su nombre. Cuando los resultados de los trabajos se presentan para análisis estadístico u otros aspectos administrativos de la Universidad, son manejados por personal institucional, conscientes de la confidencialidad. Si los resultados de estos estudios son publicados o presentados en ambientes científicos, su nombre no aparecerá.

En caso de preguntas adicionales ¿con quién podría contactar?

Ud. puede contactar:

Al M Sc. Ricardo Jaime Descailleaux Dulanto, Jefe del laboratorio de Genética Humana al número 998 541 980

Una vez que esté seguro de haber entendido todo lo anterior y no tenga más preguntas, firme por favor la autorización o consentimiento informado para tomar la muestra de sangre, poder guardar su DNA y emplearlo en los procedimientos explicados. La firma del consentimiento informado deberá realizarse en presencia de un testigo. Ud. recibirá una copia de este documento y consentimiento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUESTRA DE DNA CON FINES DE DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS MOLECULARES EN LOS PROYECTOS TITULADOS: "DETERMINACION DE LAS VARIABLES GÉNICAS DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES (TP53) EN POBLACIONES PERUANAS" , "DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES GENOTÍPICAS DEL GEN MANNOSE-BINDING LECTIN (MBL2) EN POBLACIONES PERUANAS" Y DETERMINACION DEL POLIMORFISMO INDEL(I/D) DEL GEN ECA EN MUESTRAS DE POBLACIONES PERUANAS"

LAB GENÉTICA HUMANA- FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS- UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS -2014

Yo, _____, con DNI N° _____ declaro que he sido informado(a) por el Mg. Ricardo Jaime DescailleauxDulanto acerca de mi participación para desarrollar procedimientos moleculares para investigación en el laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de La Universidad Nacional Mayor de San Marcos y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias; estoy satisfecho (a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra de sangre para la implementación de procedimientos de Genética Molecular del Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM.

Firma:

Impresión digital

2. Que _____ (SI/NO) se almacene mi muestra en el Banco de DNA del Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM.

Firma:

Impresión digital

Dirección o correo para informar conclusiones generales:

3. Profesional que toma Consentimiento:

_____ DNI: _____

Firma:

Impresión digital

4. Testigo: _____ DNI: _____

Firma:

Impresión digital

ANEXO III
FICHA DE DATOS DE LOS VOLUNTARIOS

FICHA DE DATOS DE LOS PARTICIPANTES VOLUNTARIOS DEL PROYECTO

PROYECTOS: "DETERMINACION DE LAS VARIABLES GENICAS DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES (TP53) EN POBLACIONES PERUANAS", "DETERMINACION DE LAS VARIABLES GENOTIPICAS DEL GEN *MANNANOSE-BINDING LECTIN (MBL2)* EN POBLACIONES PERUANAS" Y DETERMINACION DEL POLIMORFISMO INDEL(I/D) DEL GEN ECA EN MUESTRAS DE POBLACIONES PERUANAS" Y DETERMINACION DEL POLIMORFISMO INDEL(I/D) DEL GEN ECA EN MUESTRAS DE POBLACIONES PERUANAS"

Fecha: _____ Código: _____

N° de consentimiento informado: _____ N° de clave: _____

I. INFORMACION GENERAL

Apellidos: _____

Nombres: _____

Fecha y lugar de nacimiento: _____ Edad: _____

Provincia: _____ Departamento: _____

N° de orden de la hermandad: _____ Estatura: _____ Peso: _____

Estado civil: _____ N de hijos según sexo: Mujer _____ Varón _____

Nivel de educación: _____ Ocupación: _____

Enfermedades que ha sufrido y fecha de ocurrencia: _____

II. INFORMACION FAMILIAR:

Nombre del padre: _____ Edad: _____

Fecha y lugar de nacimiento: _____

Ocupación: _____

Nombre de la madre: _____ Edad: _____

Fecha y lugar de nacimiento: _____

Ocupación: _____

N° de hijos: _____ Varones: _____ Mujeres: _____ Embarazos: _____ Abortos: _____