

Polimorfismo del codón 72 de TP53 y riesgo de cáncer gástrico: estudio caso-control en individuos de la región centroccidental de Venezuela.

Miryam Cañas¹, Yeinmy Morán¹, María Eugenia Camaró¹, María Belén Rivero¹, Adolfo Bohórquez², Venus Villegas², Eddy Ramírez², Yanet Rendón², Alfredo Suárez², Luis Morales², Emerson Useche², Sandra Salazar², Amado Zambrano², Álvaro Ramírez², Elvis Valderrama³, Zuly Briceño⁴ y Miguel Ángel Chiurillo¹.

¹Laboratorio de Genética Molecular “Dr. Jorge Yunis-Turbay”, Decanato de Ciencias de la Salud. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA),

²Servicio de Gastroenterología, Hospital Antonio María Pineda (HAMP-UCLA),

³Departamento de Anatomía Patológica (HAMP-UCLA) y

⁴Decanato de Ciencia y Tecnología (UCLA). Barquisimeto, Venezuela.

Palabras clave: Cáncer gástrico, codón 72 de TP53, polimorfismo genético.

Resumen. El polimorfismo del codón 72 del gen TP53 ha sido asociado con un riesgo elevado para el desarrollo de cáncer. Este polimorfismo origina dos variantes de la proteína, una con un residuo de Arginina (CGC), y otra con Prolina (CCC). El objetivo del estudio fue analizar la asociación de este polimorfismo con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico en individuos procedentes de la región centroccidental de Venezuela, considerada de alto riesgo para esta neoplasia maligna. El ADN fue extraído de biopsias de adenocarcinoma gástrico incluídas en parafina ($n = 65$) y biopsias endoscópicas de pacientes con gastritis crónica ($n = 87$). El polimorfismo del codón 72 de TP53 fue determinado por PCR-RFLP. Se observó un incremento significativo de la frecuencia del alelo Arg en los pacientes con cáncer gástrico ($P = 0,037$), originando un riesgo 4,6 veces mayor (95% IC 1,0-21,3) de desarrollar esta enfermedad. Se evidenció un incremento del genotipo Arg/Arg en adenocarcinoma gástrico poco diferenciado (OR: 3,1; 95% IC 1,0-9,2), y del genotipo Arg/Pro en adenocarcinoma de moderado/buen grado de diferenciación (OR: 3,5; 95% IC 1,1-11,0) al comparar con el grupo de cáncer gástrico, y este último también al contrastar con los individuos con gastritis crónica (OR: 2,4; 95% IC 1,1-5,2). Los resultados de este estudio sugieren que la condición de portador del alelo Arg podría estar asociado con el desarrollo de cáncer gástrico en esta región de Venezuela.

TP53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk: a case-control study in individuals from the central-western region of Venezuela.

Invest Clin 2009; 50(2): 153 - 161

Key words: Gastric cancer, TP53 codon 72, genetic polymorphism.

Abstract. Codon 72 polymorphism of the tumor suppressor gene *TP53* has been associated with a higher risk in the development of several types of cancer. The polymorphism results in a variant protein with either an arginine (CGC) or a proline residue (CCC). The aim of this study was to analyze the association of the *TP53* codon 72 polymorphism with the risk of developing gastric cancer in a high-risk population from the central-western region of Venezuela. DNA was extracted from paraffin-embedded gastric adenocarcinoma biopsies ($n = 65$) and endoscopic biopsies from chronic gastritis patients ($n = 87$). *TP53* codon 72 polymorphism was determined by PCR-RFLP from all samples. Patients with gastric cancer had a significantly higher frequency ($P = 0.037$) of the *Arg* allele than those with chronic gastritis. A logistic regression analysis suggested that *Arg* carrier individuals had a 4.6-fold higher risk (95% CI 1.0-21.3) of developing gastric cancer. An increment of the *Arg/Arg* genotype was observed in poor-differentiated gastric adenocarcinoma (OR: 3.1; 95% CI 1.0-9.2), and of the *Arg/Pro* genotype in well/moderate-differentiated adenocarcinoma samples (OR: 3.5; 95% CI 1.1-11.0), when comparing within the gastric cancer samples; and the last group also when contrasting it with chronic gastritis patients (OR: 2.4; 95% CI 1.1-5.2). The results of this study suggest that the carriage of the *Arg* allele could be associated with the development of gastric cancer in this Venezuelan population.

Recibido: 06-06-2008. *Aceptado:* 11-09-2008.

INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico ocupa el segundo lugar a nivel mundial como causa de muerte por cáncer, solamente superado por el cáncer de pulmón (1). Aunque la incidencia general ha estado decreciendo en las últimas décadas, la aparición de adenocarcinoma de la región proximal del estómago y distal del esófago ha presentado un incremento, particularmente en el mundo occidental (2). La infección crónica por *Helicobacter pylori* y factores dietarios, tales como los altos niveles de sal o nitratos, y deficiencias nutricionales, han sido asociados con cáncer gástri-

co (3). La carcinogénesis gástrica es un proceso complejo, multifactorial y de múltiples pasos. Se cree que la mayoría de las neoplasias malignas del estómago son causadas por factores ambientales que originan un daño en la mucosa e inhiben su capacidad de autoreparación. Esta respuesta es regulada, en parte, por factores estimuladores e inhibitorios que son producto de proto-oncogenes y genes supresores de tumor (4). Polimorfismos de líneas germinales de genes involucrados en múltiples pasos de la carcinogénesis pueden también explicar las diferencias individuales en la susceptibilidad al cáncer de estómago.

El gen supresor de tumores *TP53*, localizado en el cromosoma 17p13, es uno de los más comúnmente mutados en todos los tipos de cáncer (5). El gen está constituido por 11 exones y codifica para una fosfoproteína de 53 kDa que actúa como un factor de transcripción de genes que promueven la detención del ciclo celular en la fase de transición de G1 a S, y desempeña un papel determinante en el proceso de apoptosis, por lo que mutaciones que originen la pérdida de su función pueden inducir la formación de tumores (6).

Han sido descritos polimorfismos del exón 4 de *TP53* en los codones 36, 47 y 72 (7, 8). De éstos, el polimorfismo del codón 72 es el más común, dando origen a dos variantes de la proteína p53, atribuidas al reemplazo del aminoácido codificado en dicha posición, de arginina (CGC) por prolina (CCC). Recientemente, este polimorfismo ha sido asociado con cáncer gástrico (8-12), así como con otras neoplasias malignas, como el cáncer de pulmón (13-15), esófago (16), colon-recto (17), mama (18), vejiga (19) y cuello uterino (20).

Se han reportado diferencias entre las variantes de p53 y su habilidad de unir componentes de la maquinaria transcripcional, activar la transcripción, inducir apoptosis, y reprimir la transformación celular (21). En algunos estudios, los pacientes con el genotipo *Pro/Pro*, especialmente en fumadores, resultaron con más riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (13, 22). En contraste, los no fumadores con cáncer de pulmón presentan un incremento del genotipo *Arg* homocigoto (23). Aun cuando se han reportado hallazgos controversiales en la relación entre este polimorfismo y cáncer de cuello uterino (24, 25), estudios *in vitro* sugieren que la variante *Arg* de p53 fue significativamente más susceptible a la degradación mediada por la oncoproteína E6 derivada del virus de papiloma humano que la forma *Pro* (24). Por lo tanto, las variantes

de p53 pueden servir como factores de riesgo para las principales neoplasias humanas y pueden jugar un papel en la modulación de los agentes de riesgo ambientales.

En Venezuela, para el año 2005, el cáncer de estómago representó la segunda causa de decesos por neoplasias malignas, luego del cáncer de pulmón, mientras que en el estado Lara, así como en otras entidades de la región centrooccidental de Venezuela (Portuguesa y Yaracuy), el cáncer gástrico constituyó la primera causa de muerte por neoplasia (26). Varios factores pudiesen explicar las altas tasas de cáncer gástrico en Venezuela, entre ellos, la infección por *H. pylori*, así como el tipo de cepa y la respuesta del hospedero ante la infección por dicha bacteria, hábitos dietarios y la susceptibilidad genética. Con el fin de contribuir a la comprensión de la génesis del cáncer gástrico en Venezuela, en este trabajo se analizó la asociación del polimorfismo del codón 72 del gen *TP53* con el riesgo de cáncer gástrico.

MATERIALES Y METODOS

Muestra

El estudio incluyó dos grupos de muestras, obtenidas de pacientes provenientes de alguno de los estados de la región centrooccidental del país: Lara, Portuguesa o Yaracuy. 1) Grupo testigo: biopsias de 87 individuos sin evidencias de cáncer gástrico y con diagnóstico histopatológico de gastritis crónica, obtenidas por endoscopia superior en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Antonio María Pineda (HAMP) de Barquisimeto. De cada paciente se obtuvieron dos muestras del antro y dos del cuerpo gástrico, las cuales fueron preservadas hasta la extracción del ADN en tampón PBS estéril. Se tomó una muestra de cada región para el estudio histopatológico y las restantes se destinaron a la extracción de ADN. 2) Cáncer gástrico: 65 biopsias incluidas en

parafina con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico seleccionadas del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del HAMP (años 2005-2008).

El diagnóstico histopatológico de todas las biopsias consideradas en este estudio fue confirmado en el Servicio de Anatomía Patológica del HAMP. En 59 de las biopsias de cáncer gástrico se determinó el tipo histológico y se clasificaron según el grado de diferenciación del adenocarcinoma gástrico. Las mismas fueron agrupadas en adenocarcinoma bien/moderadamente diferenciado ($n = 36$) y poco diferenciado ($n = 23$). De ellas, 48 (81%) fueron clasificadas como adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal y 11 (19%) como de tipo difuso.

Este estudio fue aprobado por la comisión de Bioética del Departamento de Ciencias Funcionales del Decanato de Medicina de la Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado (UCLA). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los individuos incluidos en la muestra.

Extracción de ADN

Biopsias por endoscopia: se extrajo ADN mediante el *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), según las instrucciones del fabricante.

Biopsias incluidas en parafina: Previa desparafinación de las muestras con Xilol, se extrajo ADN genómico a partir de 3-6 cortes ($3 \mu\text{m}$) por micrótopo, empleando

el *DNeasy Tissue Kit* (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración del ADN fue estimada por espectrofotometría a 260/280 nm empleando un equipo *GeneQuant pro* (Amersham-Pharmacia).

Análisis de polimorfismos del codón 72 de TP53

Los polimorfismos fueron determinados por PCR-RFLP utilizando los iniciadores especificados en la Tabla I (14, 27). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de $30 \mu\text{L}$ que contenía 1,8 mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTPs, 1 μM de cada primer, 1X tampón de PCR y 1,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de amplificación por PCR fueron: un ciclo de 3'(4') a 94°C ; 35 (40) ciclos de 45'' (1') a 94°C , 45'' (1'30'') a 57°C y 45'' (1'30'') a 72°C ; un ciclo de 7' a 72°C . Para el análisis de las biopsias incluidas en parafina fue necesario emplear en algunos casos los oligonucleótidos P53ex72F/R, e incrementar los tiempos de cada etapa y del número de ciclos de la reacción de PCR (indicados entre paréntesis) para asegurar una amplificación más eficiente al disminuir el tamaño del producto. Previamente se verificó la calidad del ADN obtenido de estas muestras mediante la amplificación de una región del gen de β -globina humana de 268 pb (28), empleando iguales condiciones de PCR utilizadas en el análisis de los polimorfismos de TP53.

TABLA I
INICIADORES EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO DEL CODÓN 72 DE TP53

| Iniciador | Secuencia | Tamaño del producto de PCR y definición del alelo |
|-----------|----------------------------|---|
| P53_72F | 5'-CTGGTAAGGACAAGGGTTGG-3' | 396 pb (26) |
| P53_72R | 5'-ACTGACCGTGCAAGTCACAG-3' | CGC (Arg): 165 y 231 pb; CCC (Pro): 396 pb |
| P53ex72F | 5'-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG-3' | 296 pb (13) |
| P53ex72R | 5'-GCAACTGACCGTGCAAGTCA-3' | CGC (Arg): 169 y 127 pb; CCC (Pro): 296 pb |

Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos P53_72 y P53ex72 fueron digeridos con la enzima de restricción *Bst*UI que determina el genotipo del codón 72 de *TP53* (Tabla I). Las reacciones se llevaron a cabo con 10 U de *Bst*UI (New England Biolabs) incubando por 6 horas a 60°C. La separación electroforética de los productos de PCR fue realizada en geles de agarosa de 1,2%, y de 2% para resolver los fragmentos originados con la digestión con *Bst*UI (Fig. 1). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV.

Análisis estadístico

Para determinar si los polimorfismos detectados en el grupo testigo se presentan en la población bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, se empleó el programa Arlequín ver. 2.000 (29). Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para comparar las frecuencias genotípicas entre los grupos estudiados. Se calcularon los valores de Odds Ratio (OR) con el fin de determinar el riesgo de cáncer gástrico. Para estos dos análisis se utilizó el paquete estadístico SSPS 11.0. En todas las pruebas calculadas, las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Características de la muestra

La edad promedio entre los individuos del grupo testigo fue 58,3 años (18-88 años), y 60,4 años (19-95 años) para los individuos con cáncer gástrico. La relación hombre/mujer fue 56/44 y 59/41 para los testigos y los individuos con cáncer gástrico, respectivamente. Debido al alto porcentaje de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (81%), no se consideró el tipo histológico de las muestras de cáncer gástrico en los análisis estadísticos llevados a cabo. El polimorfismo de *TP53* se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg.

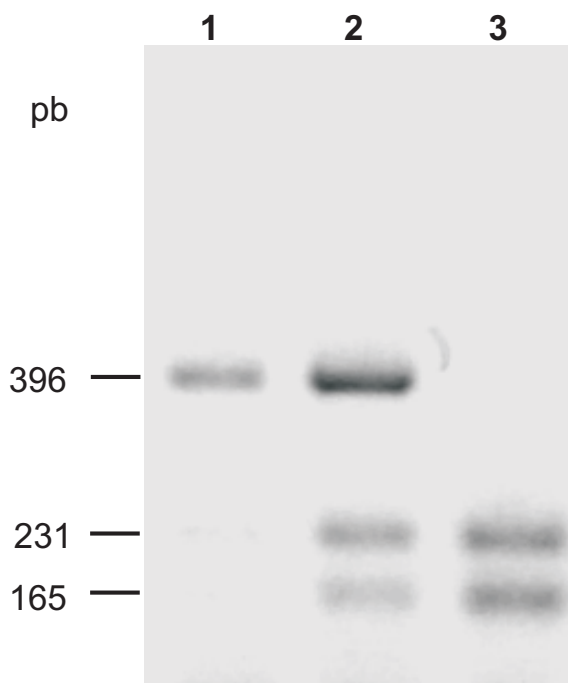


Fig. 1. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de los productos de PCR obtenidos con los iniciadores P53_72F/R al ser incubados con *Bst*UI. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, genotipo *Pro/Pro*; carril 2, genotipo *Arg/Pro*; carril 3, genotipo *Arg/Arg*. Se indican los pesos moleculares de los fragmentos generados en pares de bases (pb).

Distribución de los tres genotipos del gen *TP53*

La distribución de las frecuencias de los genotipos del codón 72 de *TP53* en los grupos estudiados en este trabajo se presenta en la Tabla II.

No se encontró asociación entre el polimorfismo del codón 72 de *TP53* y el género y/o edad de los individuos de la muestra. Sin embargo, la frecuencia del genotipo portador del alelo *Arg* (*Arg/Arg* + *Arg/Pro*) presentó un incremento de 87,4% a 96,9% en el grupo con cáncer gástrico ($P = 0,037$) (Tabla II). El análisis de regresión logística reveló para este alelo un

TABLA II
DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL CODÓN 72 DE *TP53* Y DE LA CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA SEGÚN GRADO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

| Condición de la muestra (n) | Genotipos % (n) | | | | | | | |
|---|-----------------|-------------------|---------|---------------------|---------|------|--------------|-------------------|
| | Arg/Arg | | Arg/Pro | | Pro/Pro | | Portador Arg | |
| Gastritis Crónica (87) | 51,7 | (45) | 35,6 | (31) | 12,7 | (11) | 87,4 | (76) |
| Adenocarcinoma (65) | 52,3 | (34) | 44,6 | (29) | 3,1 | (2) | 96,9 | (62) ^a |
| ADC por grados de diferenciación histológica* | | | | | | | | |
| Poco diferenciado (23) | 65,2 | (15) ^b | 30,4 | (7) | 4,3 | (1) | 95,7 | (22) |
| Moderado + Bien diferenciado (36) | 41,7 | (15) | 55,5 | (20) ^{c,d} | 2,8 | (1) | 97,2 | (35) |

^a GC vs ADC: $P = 0,037$; OR: 4,6 (95% IC 1,0-21,3).

^b ADC vs ADC poco diferenciado: $P = 0,040$; OR: 3,1 (95% IC 1,0-9,2).

^c GC vs ADC moderado + bien diferenciado: $P = 0,029$; OR: 2,4 (95% IC 1,1-5,2).

^d ADC vs ADC moderado + bien diferenciado: $P = 0,028$; OR: 3,5 (95% IC 1,1-11,0).

ADC: adenocarcinoma. GC: gastritis crónica. * $n = 59$.

incremento del riesgo de cáncer gástrico de 4,6 veces (95% IC 1,0-21,3).

Polimorfismo de *TP53* y grados de diferenciación del cáncer gástrico

Se examinó la frecuencia de cada genotipo en el grupo de muestras con cáncer gástrico considerando el grado de diferenciación histológica de las mismas (Tabla II). Dependiendo de la composición glandular, de las formas variadas de las células y de la secreción de la mucosa, el adenocarcinoma puede presentar 3 grados de diferenciación: bien, moderado y poco diferenciado. Se encontró una asociación significativa del genotipo Arg/Arg con adenocarcinoma poco diferenciado ($P = 0,040$) al compararse con el resto de la muestra de cáncer gástrico. En este caso se observó un incremento de la frecuencia de 41,7% a 65,2% (OR: 3,1; 95% IC 1,0-9,2).

Por otra parte, el grupo de biopsias con diagnóstico de adenocarcinoma moderado/bien diferenciado (Tabla II) presentó un incremento en la frecuencia del genotipo Arg/Pro de 35,6% a 55,5% ($P = 0,029$;

OR: 2,4; 95% IC 1,1-5,2) con respecto a los pacientes con gastritis crónica, mientras que al contrastar con el resto del grupo de cáncer gástrico, la frecuencia del genotipo heterocigoto en este grupo aumentó de 30,4% a 55,5% ($P = 0,028$; OR: 3,5; 95% IC 1,1-11,0).

DISCUSIÓN

Los polimorfismos de nucleótido único pueden ser empleados como una herramienta en la búsqueda de variaciones en genes involucrados en la susceptibilidad individual en procesos relevantes para la génesis del cáncer gástrico, cuyos mecanismos son todavía relativamente desconocidos (30). En este estudio, los resultados obtenidos al contrastar las frecuencias de los grupos testigo y con cáncer gástrico, sugieren que la presencia del alelo Arg en el codón 72 de *TP53* implica un riesgo mayor de desarrollar adenocarcinoma gástrico, con un OR: 4,6 (95% IC 1,0-21,3). La asociación del alelo Arg en pacientes con cáncer gástrico también fue reportada en un estudio

en individuos británicos, en donde la frecuencia del genotipo *Arg/Arg* pasó de 41,5% en el grupo testigo con lesiones gástricas benignas, a 48,6% en pacientes con cáncer gástrico (11). Igualmente, Pérez-Pérez y col. (31), muestran que la condición de homocigoto para el alelo *Arg* incrementa el riesgo (OR: 2,29) de cáncer gástrico distal en la población mexicana.

En contraste, Hiyama y col. (9) reportan que el genotipo *Pro/Pro* estuvo asociado con el incremento del riesgo de desarrollar cáncer gástrico en pacientes con gastritis crónica asociada a *H. pylori*. Ha sido planteado que las diferencias entre las frecuencias alélicas del polimorfismo del codón 72 de *TP53* y el riesgo de cáncer gástrico pueden deberse a variaciones étnicas, y de la localización y diferenciación histológica del tumor (32).

En el presente estudio, cuando se consideró el grado de diferenciación de los tumores, se observó un incremento de la frecuencia del genotipo homocigoto *Arg/Arg* en el grupo de cáncer gástrico poco diferenciado al compararla con la presentada por el resto de la muestra de adenocarcinoma ($P = 0,040$). Los resultados sugieren que la doble carga del alelo *Arg* podría condicionar a formas más agresivas del tumor. A esto se suma el hallazgo de un incremento del genotipo heterocigoto *Arg/Pro* en individuos con cáncer gástrico moderado/bien diferenciado en comparación con gastritis crónica o el resto de la muestra de cáncer gástrico. De este modo, el genotipo *Arg/Pro* podría favorecer el desarrollo de un adenocarcinoma de mejor grado de diferenciación.

Adicionalmente, en estudios previos el genotipo homocigoto para *Arg* ha sido asociado con la susceptibilidad genética a otros tipos de cáncer, como el adenocarcinoma de pulmón en no fumadores (23). De igual manera, en un estudio reciente, el genotipo *Arg/Arg* en el codón 72, sumado a otros dos polimorfismos en los intrones 3 y

6 de *TP53*, se encontró asociado con un riesgo mayor de cáncer colorectal avanzado poco diferenciado (33). Similar al presente estudio, Chung y col. (34), describen en pacientes coreanos que mientras menos diferenciado es el cáncer gástrico la frecuencia del alelo *Arg* se incrementa. En contraste, en otros reportes el genotipo *Arg/Arg* del codón 72 de *TP53* ha sido involucrado con la supervivencia de pacientes con cáncer gástrico, aunque no se ha definido una clara asociación (11, 12).

La asociación encontrada con el grado histopatológico de diferenciación puede sugerir que el polimorfismo de línea germinal de *TP53* está involucrado en la supervivencia, como un factor que determina el pronóstico clínico, así como en la susceptibilidad al cáncer. Entre las explicaciones acerca del papel de los diferentes genotipos de este gen, se ha demostrado que las variantes *Arg/Arg* y *Pro/Pro* difieren en la capacidad de unión al ADN para activar la transcripción, y para inducir la apoptosis o detención del ciclo celular (21). La variante *Arg/Arg* de p53 es un mejor inductor de la transcripción, y promueve la apoptosis más eficientemente que la variante *Pro/Pro* (11).

Aunque las conclusiones de este trabajo pueden sugerir que el polimorfismo del codón 72 de *TP53* puede ser un factor de riesgo o contribuir al desarrollo de cáncer gástrico, es evidente que son necesarios trabajos adicionales con un mayor número de muestras, e implicando otras variables y/o características del cáncer gástrico para confirmar estos hallazgos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CDCHT-UCLA 025-ME-2005. A la Histotecnólogo Lolymar Mendoza del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Antonio María Pineda de Barquisimeto por el manejo de las biopsias de archivo.

REFERENCIAS

1. **Parkin M, Bray F, Devesa S.** Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Europ J Cancer* 2001; 37:S4-S66.
2. **Devesa SS, Fraumeni JF Jr.** The rising incidence of gastric cardia cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:747-749.
3. **Stadtlander CT, Waterbor JW.** Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 1999; 20:2195-2208.
4. **Tahara E.** Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119:265-272.
5. **Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.** p53 Mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
6. **Levine AJ.** p53, The cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-331.
7. **Pinto GR, Yoshioka FKN, Silva RLL, Clara CA, Santos MJ, Almeida JRW, Burbano RR, Rey JA, Casartelli C.** Prognostic value of TP53 Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. *Genet Mol Res* 2008; 7:207-216.
8. **Shepherd T, Tolbert D, Benedetti J, Macdonald J, Stemmermann G, Wiest J, DeVoe G, Miller MA, Wang J, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C.** Alterations in exon 4 of the p53 gene in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000; 118:1039-1044.
9. **Hiyama T, Tanaka S, Kitadai Y, Ito M, Sumii M, Yoshihara M, Shimamoto F, Haruma K, Chayama K.** p53 codon polymorphism in gastric cancer susceptibility in patients with *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Int J Cancer* 2002; 100:304-308.
10. **Sul J, Yu GP, Lu QY, Lu ML, Setiawan VW, Wang MR, Guo CH, Yu SZ, Mu L, Cai L, Kurtz RC, Zhang ZF.** p53 codon 72 polymorphisms: A case-control study of gastric cancer and potential interactions. *Cancer Letters* 2006; 238:210-223.
11. **Zhang ZW, Newcomb P, Hollowood A, Feakins R, Moorghen M, Storey A, Farthing M, Alderson D, Holly J.** Age-associated increase of codon 72 arginine p53 frequency in gastric cardia and non-cardia adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2151-2156.
12. **Zhang ZW, Laurence N, Hollowood A, Newcomb P, Moorghen M, Gupta J, Feakins R, Farthing M, Alderson D, Holly J.** Prognostic value of TP53 codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:131-135.
13. **Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P.** p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: Association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5:129-134.
14. **Pierce LM, Sivaraman L, Chang W, Lum A, Donlon T, Seifried A, Wilkens LR, Lau AF, Le Marchand L.** Relationships of TP53 Codon 72 and HRAS1 Polymorphisms with Lung Cancer Risk in an Ethnically Diverse Population. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000; 9:1199-1204.
15. **Matakidou A, Eisen T, Houlston RS.** TP53 polymorphisms and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Mutagenesis* 2003; 18:377-385.
16. **Lee JM, Shun CT, Wu MT, Chen YY, Yang SY, Hung HI, Chen JS, Hsu HH, Huang PM, Kuo SW, Lee YC.** The associations of p53 overexpression with p53 codon 72 genetic polymorphism in esophageal cancer. *Mutat Res* 2006; 594:181-188.
17. **Koushik A, Tranah GJ, Ma J, Stampfer MJ, Sesso HD, Fuchs CS, Giovannucci EL, Hunter DJ.** p53 Arg72Pro polymorphism and risk of colorectal adenoma and cancer. *Int J Cancer* 2006; 119:1863-1868.
18. **Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M, Tallila J, Ristimaki A, von Smitten K, Aittomaki K, Heikkila P, Blomqvist C, Nevanlinna H.** Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11:5098-5103.
19. **Soulitzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA.** p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett* 2002; 179:175-183.
20. **Koushik A, Platt RW, Franco EL.** p53 codon 72 polymorphism and cervical neo-

- plasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:11-22.
21. **Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G.** Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999; 19:1092-1100.
 22. **Jin X, Wu X, Roth JA, Amos CI, King TM, Branch C, Honn SE, Spitz MR.** Higher lung cancer risk for younger African-Americans with the Pro/Pro p53 genotype. *Carcinogenesis* 1995; 16:2205-2208.
 23. **Murata M, Tagawa M, Kimura M, Kimura H, Watanabe S, Saisho H.** Analysis of a germ line polymorphism of the p53 gene in lung cancer patients; discrete results with smoking history. *Carcinogenesis* 1996; 17:261-264.
 24. **Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L.** Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 393:229-234.
 25. **Tenti P, Vesentini N, Rondo-Spaudo M, Zappatore R, Migliora P, Carnevali L, Ranzani GN.** p53 codon 72 polymorphism does not affect the risk of cervical cancer in patients from northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000; 9:435-438.
 26. **Ministerio del Poder Popular para la Salud.** República Bolivariana de Venezuela. Anuario de Mortalidad 2005. 2006; <http://www.mpps.gob.ve>.
 27. **Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, WK Hong, Kadlubar FF, Spitz MR.** p53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:681-690.
 28. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.
 29. **Schenieder S, Roessli D, Excoffier L.** Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics analysis. Genetics ad Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland (2000).
 30. **Dutt A, Beroukhim R.** Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer. *Curr Opin Oncol* 2007; 19:43-49.
 31. **Pérez-Pérez GI, Bosques-Padilla FJ, Crosatti ML, Tijerina-Menchaca R, Garza-González E.** Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40:56-60.
 32. **Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X, Du L, Wei ML, Wu XT.** p53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: A meta-analysis of the literature. *Int J Cancer* 2007; 121:1481-1486.
 33. **Mammano E, Belluco C, Bonafé M, Olivieri F, Mugianesi E, Barbi C, Mishto M, Cosci M, Franceschi C, Lise M, Nitti D.** Association of p53 polymorphisms and colorectal cancer: modulation of risk and progression. *Eur J Surg Oncol.* 2009; 35: 415-419.
 34. **Chung WC, Lee KM, Lee BI, Chun JS, Lee SY, Chang UI, Park SH, Yang JM, Choi KY, Chung IS.** p53 genetic polymorphism of gastric cancer in Korea. *Korean J Intern Med* 2006; 21:28-32.