

ARTICULO ORIGINAL

FACTOR DE RIESGO POBLACIONAL EN CANCER DE VESICULA BILIAR: EVALUACION BASADA EN EL ANALISIS DE HAPLOTIPO B DE DNA mt

POPULATION RISK FACTOR IN GALLBLADER CANCER: EVALUATION BASED IN THE ANALYSIS OF THE HAPLOTYPE B OF DNA mt

Dra. Ximena Adelina Aguilar Mercado*, Dr. Gonzalo Taboada López*, Dra. Ana Rada Tarifa*
Dra. María del Pilar Navia Bueno** Dr. German Arrieta***

RESUMEN

Pregunta de investigación

¿Estará relacionado al cáncer de vesícula biliar con el haplotipo B mitocondrial como factor poblacional, en sujetos de ambos sexos, habitantes de la ciudad de La Paz?

Objetivos

Determinar si el factor poblacional, es un factor genético de riesgo relacionado con cáncer de vesícula biliar (CAVB). Evaluar el comportamiento del haplotipo B en relación con el CAVB.

Diseño

Casos y controles.

Lugar

Instituto de Genética. Facultad de Medicina – UMSA.

Población

52 pacientes en total, divididos en dos grupos, de ambos sexos: casos 17 y controles 35, en ambos sexos y grupo étnico diverso, siendo los casos pacientes con CAVB y controles pacientes con CCL.

Métodos

Se realizó la evaluación clínica, ecográfica y de anatomía patológica. Se analizó el DNA mt de linfocitos de sangre periférica mediante la técnica de la PCR. Se utilizó estadística descriptiva,

test de significancia, t de student, χ^2 , odds ratio y regresión logística.

Resultados

Se clasificó a la población en dos grupos fenotípicamente y genotípicamente mediante el haplotipo B, se compararon ambas clasificaciones los resultados fueron: 12 (23.8%) de los 52 (100%) individuos del estudio no coincidieron en la clasificación de aymará por los dos métodos con $p > 0.677$. La asociación entre el grupo control y/o CAVB con el sexo fue significativa con un valor de $p > 0.41$. Dentro de las variables la edad en el grupo control y el grupo de casos, fue diferente con un valor de $p \sim 0,00$. Al realizar la regresión logística para observar interacción entre CAVB y el Haplotipo B, controlado por sexo, edad, idioma materno, lugar de nacimiento, facie y dieta, observamos que no son modificadores, excepto la edad.

Conclusiones

El haplotipo B no está asociado a la enfermedad, ni es modificado por ninguna otra variable del estudio, análisis que ha permitido verificar la ausencia de confundentes. Se encontró diferencia entre la clasificación poblacional aymará tanto en genotipo 23.52% y fenotipo 88.23%.

Palabras Clave

Cáncer de Vesícula Biliar. DNA mitocondrial. Factor de riesgo poblacional. PCR.

ABSTRACT

Research Question

Is there any relation between gallbladder cancer (GBCA) and the population risk factor (haplotype B), in inhabitants of both sexes in La Paz city?

Objectives

To determine if the haplotype B is a genetic factor of risk related to GBCA. To evaluate the behaviour of the haplotype B in connection with the GBCA.

* Instituto de Genética, Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, UMSA, Av. Saavedra No.2246. E mail: agmerx@hotmail.com

** Epidemiología Clínica, INSAD Instituto de Investigaciones en Salud y Desarrollo, Facultad de Medicina, UMSA

*** Servicio de Cirugía del Hospital Obrero N° 1.

Design

Cases and controls

Place

Genetic Institute, School of Medicine. UMSA

Population

A total of 52 patients divided in two groups of both sexes: 17 cases with GBCA and 35 control cases with gallstones and chronic cholecystitis of different ages.

Methods

We undertook a clinical, ultrasound and pathological evaluation. The mt DNA of lymphocytes was analyzed, using the PCR tech-

nique . The data was calculated applying descriptive statistics, significance test, student test, chi2 and logistical regression.

Results

The population risk was classified in two groups, according to the phenotype and genotype using the haplotype B. Comparison results were: 12 (23.8%) of the 52 (100%) individuals were different in the aymara classification by both methods with a $p > 0,677$. The relation between the group control and the GBCA cases and sex was significant with a $p > 0,41$. The age in both groups was

INTRODUCCION

En La Paz, Bolivia, se destaca el cáncer de vesícula biliar (CAVB) por su alta incidencia. El año 1992, el CAVB representa el tercero en importancia en la población femenina y el cuarto en la población masculina⁽¹⁻¹⁴⁾, cifras que son importantes comparadas con otros países⁽¹²⁾.

El CAVB es más frecuente en mujeres que en varones (2:1) el riesgo de desarrollar CAVB incrementa con la edad^(1- 6, 13- 14, 19, 31, 61- 69). Varios autores han relacionado esta neoplasia con factores poblacionales, entre los grupos poblacionales involucrados se encuentran: amerindios, México americanos, aymaras^(1,2,3,5,52,53). Actualmente el CAVB constituye un problema que concierne a la Salud Pública y atañe a la población local por su elevada incidencia. Entre otros factores de riesgo, tenemos a la litiasis crónica de vesícula biliar^(1-5, 9,16,52-53).

El CAVB se caracteriza por su detección tardía, con una supervivencia de cinco años⁽⁵⁴⁾. Es considerado poco frecuente en población caucásica,^(1-5,19,61-69). Entre los factores de riesgo se destaca las diferencias poblacionales respecto a su relación

different with a p value of 0,00. The logistical regression to observe the relation between GBCA and the haplotype controlled by sex, age, maternal language, facie, place of birth and diet, modified nothing but the age factor.

Conclusions

The haplotype B is neither associated to the disease nor is modified by any other variables in the study. The only difference it made was in the genotype (23,52%) and the phenotype (88,23%) classification.

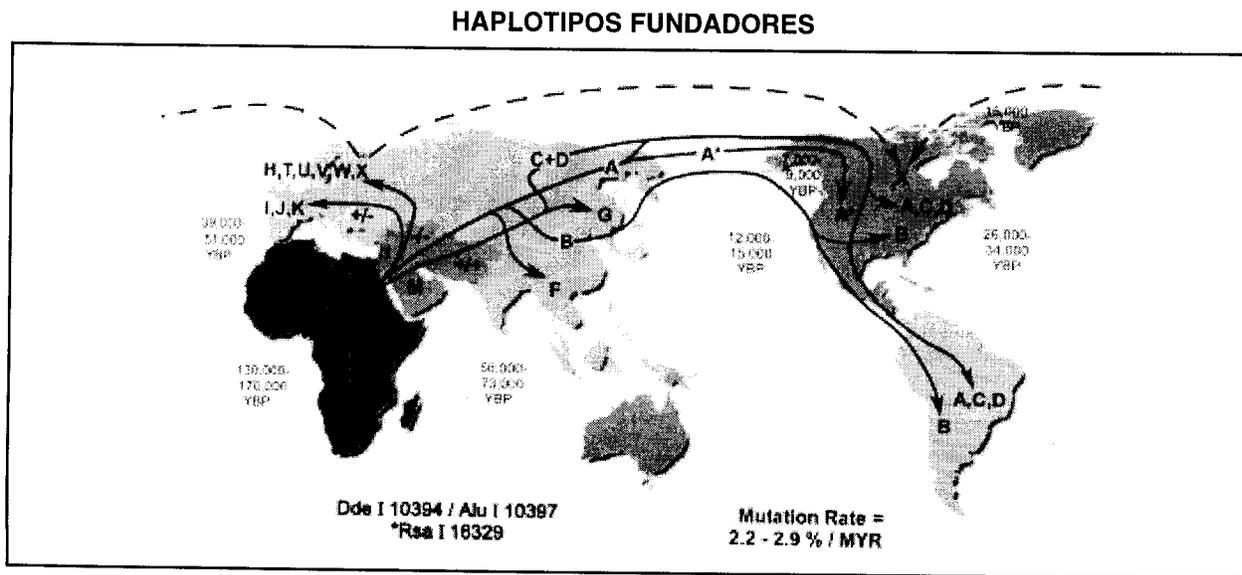
genética y características ambientales. No responde a radioterapia, ni a quimioterapia, sin embargo existen estudios moleculares realizados en Japón en 1994, Shuko y cols.⁽¹⁹⁾ que reportaron las mutaciones del gen p53 en el CAVB^(19,40), cuya presencia o ausencia, se utilizan como factor pronóstico en cuanto a la respuesta a tratamiento con quimioterapia y radioterapia⁽⁵⁴⁾.

El crecimiento silente del CAVB debido a mecanismos de evasión de la respuesta inmune como: La inmuno-selección de células variantes, la modulación antigénica, los factores bloqueadores que inhiben la citotoxicidad y finalmente niveles de p53 normal o mutada (50%)⁽⁵³⁾. La proteína normal es ignorada por el sistema inmune, probablemente por su baja expresión^(37- 48).

HAPLOTIPO B mt Y SU RELACION CON LA POBLACION AYMARA

El patrón de prevalencia de esta enfermedad presenta una asociación geográfica con la distribución de los haplotipos fundadores que dieron origen al poblamiento americano Figura N° 1.

FIGURA N° 1



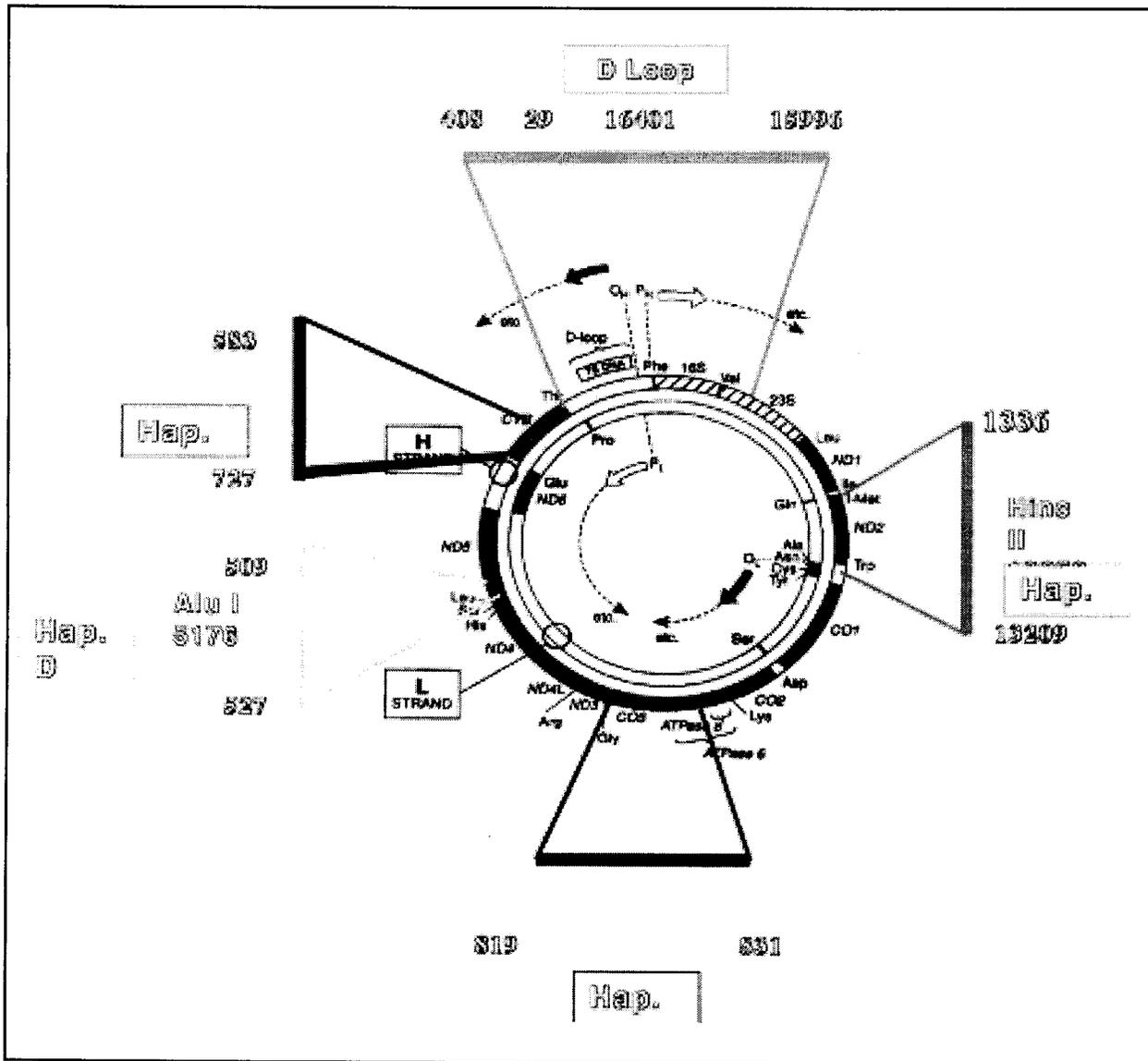
Estos haplotipos son marcadores moleculares empleados cuando se cuenta con enfoques previos que han agotado los datos morfológicos comparativos, fisiológicos y otro tipo de herramientas fenotípicas (7-11, 30,50-57).

La mitocondria contiene material genético circular con tamaño de 16,569 pb (o 16,560pb en algunos Asiáticos y Amerindios)⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾. La herencia es por línea materna⁽⁵⁹⁾. Este genoma contribuye con el 0.5 % del total del DNA humano^(58,70). Codifica para: dos genes de RNA ribosómico, 22 para RNA de transferencia y 13 proteínas componentes de la cadena de transporte de electrones (fosforilación oxidativa). Figura No 2.

El análisis de polimorfismos de restricción en el DNAm^(11,18), mediante la técnica de la PCR, establece una identificación biológica sobre el origen de grupos poblacionales⁽⁹⁾. Debido a que la carga genética mitocondrial solo evalúa la herencia materna se considera un buen marcador molecular para el estudio de CAVB, debido a que el sexo femenino presenta mayor riesgo⁽¹³⁾. Los datos históricos del poblamiento de Bolivia⁽¹⁵⁾, establecen que la mayoría de los colonizadores eran de sexo masculino, factor que dio origen al fenómeno del mestizaje, echo que brinda un factor más para utilizar este marcador molecular.

FIGURA N° 2

GENOMA

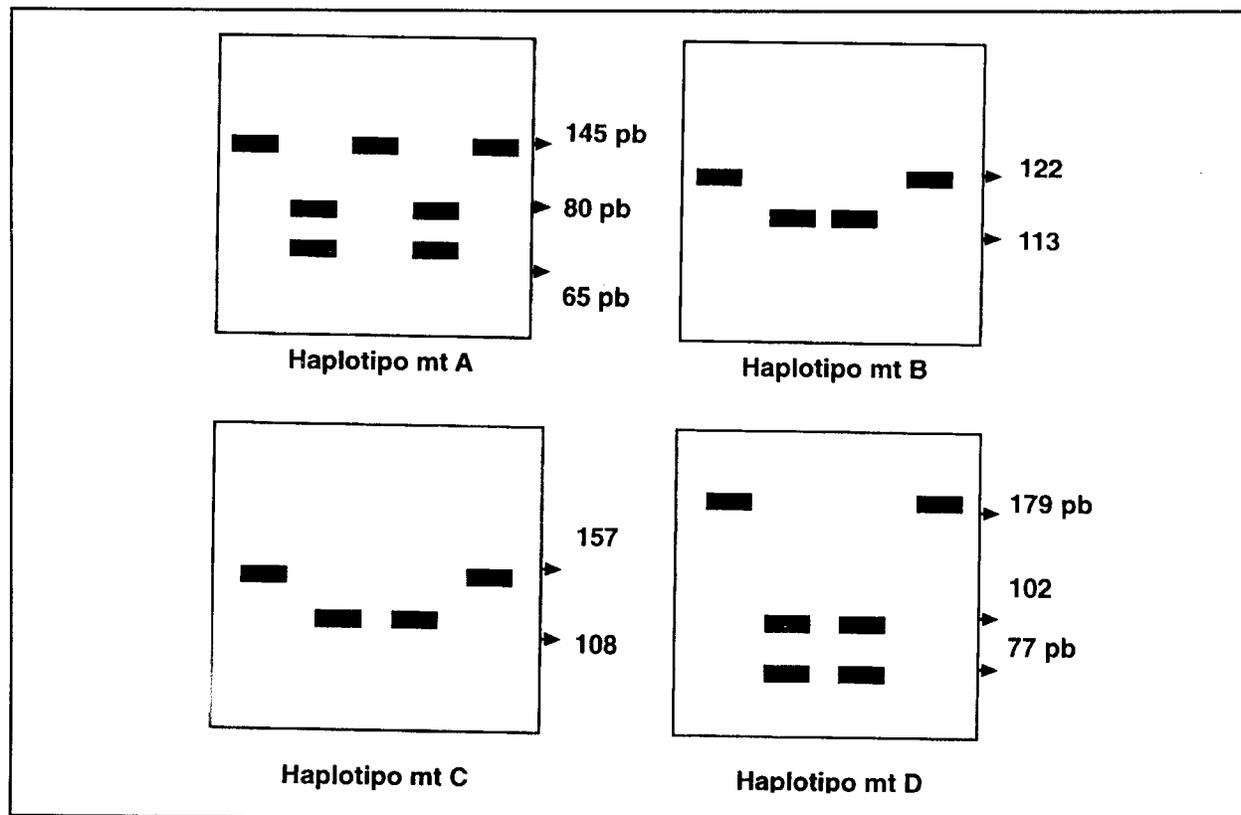


Los sitios de restricción polimórficos propios de cada uno de los grupos de individuos, corresponden a cuatro grandes haplotipos, mismos que están altamente representados en las poblaciones amerindias y están ausentes en las poblaciones europeas y africanas. Figura No 3.

Los cuatro haplotipos fundadores se designan como A, B, C y D. El haplotipo B por su parte corresponde a la delección de un fragmento de 9 pb. en la región intergénica COII/tRNA^{Lys}; esta delección comprende una de dos repeticiones ubicadas entre las posiciones 8272 y 8289. También se asocia al

FIGURA N° 3

ESQUEMA DE LOS CUATRO HAPLOTIPOS FUNDADORES (A,B,C,D,)



haplotipo B la ganancia de un sitio Hae III en la posición 16517.

El haplotipo B se encuentra ausente en los aborígenes del noreste de América del Norte, se vuelve frecuente entre los pueblos y altioplánicos Figura N°1⁽²³⁾, en los últimos años se ha establecido una frecuencia del 80 - 100% en las poblaciones rurales del Altiplano paceño por Godinot y cols. (comunicación personal).

El presente un estudio de casos y controles que buscó la magnitud de asociación del Factor Poblacional (FP) y el CAVB. Se evaluó el FP (análisis de Haplotipo B de DNA mt), que permitió un análisis genotípico y se evaluó el fenotipo por examen clínico. Se estudiaron 52 pacientes del Servicio de Cirugía del Hospital Obrero N°1, de la ciudad de La Paz, desde octubre de 1997 a marzo de 1999. El univers

muestral se dividió en dos grupos: Pacientes con CAVB (grupo de estudio 17 pacientes) y con Colecistitis Crónica Litiasica CCL (grupo control 35 pacientes); se realizó una Historia Clínica dirigida (HC), en todos los casos se evaluó el Haplo B, previo consentimiento informado.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio de casos y controles, cuyo tamaño fue calculado con la variable de exposición a ser analizada, Haplo B que en estudios previos se identificó como haplotipo poblacional fundador. Además se tomó en cuenta la incidencia del CAVB en nuestra población, este proceso fue definido a través del programa EPI INFO versión 6.0 con un Intervalo de confianza estimado 95%, se aceptará un error tipo I (alfa) de un 5%. Error Beta estimado 0.20. Potencia estimada del estudio (1-B): 0.80.

Relación entre casos y controles: 1:2. La prevalencia en la ciudad de La Paz de CAVB: 13 en mujeres y 7.0 en varones tasas estandarizadas (1:100.000 habitantes). Se tomó en cuenta la posibilidad de encontrar Odds Ratio.

Se denominó casos a aquellos pacientes de ambos sexos diagnosticados con CAVB clínicamente y ecográficamente, con estudios de anatomía patológica, con el requisito de cumplir los criterios de inclusión y exclusión, se realizó el examen clínico y la toma de muestra de sangre periférica, previo consentimiento informado.

Se consideraron controles a pacientes con Colecistitis Crónica Litiásica (CCL) que no eran afectados por ningún proceso neoplásico aparente.

Para identificar a los individuos pertenecientes al grupo poblacional de riesgo, se utilizó el haplo B, mediante la PCR.

METODOS

Para la obtención de DNAm, se extrajo de 3 a 5 ml. de sangre periférica, utilizando el método de Hutz (modificado por nosotros). Con esta técnica se obtiene de 40 a 50 ug. de DNA genómico por 1 ml de sangre. Se cuantifico el material genético total DNA genómico y DNA mt.

ANALISIS DE HAPLOTIPO B MITOCONDRIAL POR PCR

Este protocolo de amplifica el haplotipo B, solamente con la utilización de dos partidores específicos (técnica utilizada por M. Moranga). Para realizar la PCR se utilizó el termociclador Amplitron I, solución Buffer suministrado junto con la taq Polimerasa, 50mM K Cl, 10 mM de Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, para haplotipo B 1.5 mM MgCl₂, dNTPs 25 p moles de cada uno. HAP B 8195 FOR (5' a 3'): CAC AGT TTC ATG CCC ATC GTC., HAP B 8316 REV (5' a 3'): ATG CTA AGT TAG CTT TAC AGT GGG, agua destilada, Taq Polimerasa, aceite mineral. Se amplificó los distintos fragmentos de DNAm, en un volumen final de 50 ul en tubos de propileno de 0.5 ml. La mezcla contuvo los cuatro desoxinucleótidos en una concentración de 200 mM. Se utilizó 25 p moles de cada uno de los oligonucleótidos como partidores 200 a 500 ug. de DNA genómico o 20 a 100 ng de DNA y una unidad de taq DNA Polimerasa. Los componentes de la mezcla de la reacción fueron

centrifugados por 1 min. a 1000 g y cubiertos con una gota de aceite mineral. Las condiciones de la amplificación fueron: Desnaturalización inicial, 5 min. a 95°C, 30 ciclos consistentes en 95°C por 45 s., 55°C por 1 min. 72°C por 1 min. y una elongación final a 72°C por 5min.

Los resultados de PCR obtenidos se resolvieron por electroforesis en gel de NuSieve-Agarosa al 3% (o agarosa Multipurpose 3% Appligen). Se utilizó como estándar el tamaño molecular del plásmido pBR322 digerido con la enzima de restricción Hin I. La electroforesis se realizó en tampón TBE 1X, a un voltaje constante de 100 voltios, por espacio de 2 a 4 horas. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5mg/mL).

RESULTADOS

En este estudio de casos y controles (1:2). Se analizaron a 52 pacientes que constituían la muestra de estudio, 17 (casos) CAVB y 15 CCL (controles). Población que se clasificó como aymará fenotípicamente mediante la HC, resultados que fueron contrastados con los de haplo B. La clasificación fenotípica tomó en cuenta: Idioma materno aymará, lugar de nacimiento, facies. Encontramos que por fenotipo 32 (61.54%) de los individuos pertenecían al grupo aymará y 20 (38.46%) no pertenecían al grupo aymará. De donde obtuvimos que de los 35 pacientes controles, 18 fueron clasificados como no pertenecientes al grupo aymará (51,43%), 17 fueron clasificados como pertenecientes al grupo aymará (48,57%). De los individuos con CAVB, 2 fueron clasificados como no pertenecientes al grupo aymará (11,76%) y 15 fueron clasificados como pertenecientes al grupo aymará (88,24%). A los datos anteriores aplicamos la prueba de chi² obtuvimos el valor p ~ 0,00.

Para la clasificación genotípica evaluación del Haplotipo B. Se obtuvieron: 12 (23,08%) pertenecían al haplotipo B mitocondrial y 40 (76.92%) correspondían a otros haplotipos. De los 35 controles 8 resultaron positivos para haplotipo B (22,85%) y 27 pertenecían a otros haplotipos (77,14%). En el grupo de pacientes con CAVB 4 pertenecían al Haplotipo B (23,52%) y 13 (76.47%) correspondían a otros haplotipos. En la fase de analítica al aplicar el chi², encontramos que el haplotipo B no es un factor asociado a CAVB (p> 0,96).

Se comparó la clasificación fenotípica y genotípica, donde 12 (23.8%) de los 52 (100%) individuos del

estudio coincidieron en la clasificación poblacional por los dos métodos con $p > 0.677$.

Del universo de estudio, 43 eran mujeres (82.7%) y 9 varones (17.3%). En los casos CAVB 13*eran mujeres (76,5%) y 4 varones (23,5%) de las 35 personas del grupo control 30 eran mujeres (85.7%) y 5 varones (14,3%). En el el cálculo de χ^2 para ver si existe asociación entre el grupo control y/o CAVB con el sexo el resultado no fue significativo con un valor de $p > 0,41$.

Dentro de las variables de control estudiadas, entre las que tenemos a la edad, donde el promedio fue de 57,38 años, siendo la menor edad 18 y la mayor 77, con una desviación standard (SD) de 15.52 y un intervalo de confianza del 95% (IC95%) (53-62 años). En el grupo con CCL de 35 personas el promedio de edad fue de 53 años, siendo la menor edad 18 y la mayor 75 años, con SD de 16, IC95% (47-58 años). En el grupo con CAVB de 17 personas, el promedio de edad fue de 67 años IC95% (61-72 años). Cuadro N°1

CUADRO N° 1

INDICES DE CORRELACION Y REGRESION

REGRESION LOGISTICA: Haplotipo, aymara, sexo, edad					
	Odds Ratio	Err.Std.	z	P> z	Interval. Conf. 95%
Haplo B	146.588	1,30346	0,43	0,667	,2565728 8,375029
Aymara	13,92592	14,1223	2,597	0,009	1,908179 101,6316
Sexo	2,397614	2,412293	0,869	0,385	,3337077 17,22631
Edad	1,09743	0,0371088	2,749	0,006	1,027056 1,172626

Se analizó si las variables de control y/o la variable de exposición, modificaban a la variable resultado (CAVB). En el cálculo de odds ratio, no se encontró asociación ni modificación de efecto en la estratificación. Un dato relevante es el Haplotipo B con un OR 1.46, no mostró asociación, ni modificación de efecto con el CAVB. Cuadro N°1.

Al realizar la regresión logística para observar interacción entre Cáncer de Vesícula Biliar y el Haplotipo B mitocondrial. Controlado por sexo, edad, idioma materno, lugar de nacimiento, facie y dieta, ninguna resultó modificadora de efecto, con excepción de la edad, sobre el CAVB.

DISCUSION

En las últimas décadas los científicos han concentrado su atención a la búsqueda de las

La prueba de "t" de student, demostró que el promedio de edad es diferente en ambos grupos con un valor de $p \sim 0,00$. En el grupo de pacientes control la edad varió entre 47,471 y 58,414 con una media de 53 años y en el grupo de pacientes con CAVB la edad vario entre 61.468 y 71.590 con un promedio de edad de 53 años. Por tanto se comprobó que la edad esta asociada con el CAVB con $p \sim 0,00$.

Otra variable de control: el tipo de dieta que se dividió en tres tipos: a predominio de hidratos de carbono, a predominio proteico y variada. En el grupo de pacientes con CCL 17 (48,57 %) de los individuos tenían una dieta a predominio de hidratos de carbono, 16 (45,71 %) tenían una dieta variada y 2 (5,7 %) en base a proteínas. De los sujetos con CAVB 12 (70,58 %) su dieta era a predominio de hidratos de carbono, 4 (23,52%) tenían una dieta variada, y 1 (5,8 %) tenía dieta a predominio de proteínas. En el análisis de datos obtuvimos un valor de ($p > 0,29$).

diferentes causas y factores de riesgo que llevan al desarrollo de los diferentes tipos de cáncer. Varios de ellos Soloway, Strom, Weiss, Ferrell, Wiggis, Wallace, identificaron factores de riesgo para el desarrollo del CAVB, entre los cuales están la edad, sexo, tipo de dieta, y el denominado factor poblacional ⁽¹⁻⁶¹⁻⁶⁹⁾.

El evaluar objetivamente la posible influencia del factor de riesgo poblacional en nuestra región, donde el CAVB es un problema de salud, es relevante. Además al ser una población de descendencia aymará, se incrementaría el riesgo de ocurrencia de CAVB, sumándose, nuestra predisposición a desarrollar enfermedades de vías biliares como reportan H. Reyes, G. Taboada, J. Ribalta⁽²⁾. Este estudio pretende aportar conocimiento sobre uno de los factores de riesgo ^(4-6, 16, 18, 31-32, 34, 48), evaluando, si el desarrollo de CAVB está influido por el factor

poblacional que fue cuantificado de manera objetiva a través del haplo B que según Merriwether y cols., tiene una frecuencia de 65-100 %, y reportes de Godinot y cols de 80 –100% (7- 18, 25- 29, 35-36, 46,50-52).

Los datos encontrados en nuestro estudio sugieren que pertenecer a la población aymará per se, no representa un factor de riesgo para el desarrollo de Cáncer de Vesícula Biliar.

Es importante considerar que nuestros resultados por el hecho de ser objetivos, nos dan la confianza y validez adecuada para proponer que el factor poblacional evaluado por haplotipo B en este estudio no jugaría un papel determinante para el desarrollo de CAVB ($p < 0.667$), claro esta que no negamos su participación, cuyo porcentaje no nos aventuramos a especular, sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que participe coadyuvando un fenómeno de "sinergismo de suma", entre los diferentes factores de riesgo, como pasa en la mayoría de las enfermedades de origen multifactorial.

Se verifico una vez más la asociación que existe entre el desarrollo de CAVB y grupos etáreos de edad avanzada ($p < 0.006$), (1- 6, 13,18- 34)

En todos los casos se confirmo el diagnóstico tanto de CAVB como de CCL por estudios de anatomía patológica. En el grupo de casos el tipo histopatológico de CAVB preponderante fue adenocarcinoma de vesícula biliar indiferenciado.

Los datos registrados en este trabajo referentes a las variables de control con relación al CAVB presentan diferencias respecto a otros estudios, como por ejemplo sexo, pues el tamaño de muestra fue calculado a partir de la incidencia de CAVB en la ciudad de La Paz, Bolivia, y en base a la frecuencia del Haplotipo B mitocondrial en poblaciones aymarás, por tanto estamos consientes de que para concluir sobre las otras variables de forma individual, el universo de estudio puede ser insuficiente.

Se recomienda utilizar la técnica de extracción de DNA mitocondrial por diferencia de gradiente de concentración, debido a que el DNA mt se degrada rápidamente por el método de extracción salina, aunque este método tiene el bajo costo como ventaja.

La evaluación poblacional fenotípicamente es definitivamente subjetiva, pues la características físicas manifiestas de las diferencias de aspecto

entre poblaciones que habitan en diferentes regiones del mundo, están determinadas frecuentemente por diferencias de las mismas frecuencias génicas, modificadas por: la selección natural, que tiende a una adaptación al medio; las mutaciones al azar, modificaciones causales de la frecuencia de caracteres cualitativos, cuyo grado de probabilidad depende de la magnitud de la población, entre otras y a las que finalmente se suma la influencia ambiental.

Por tanto, concluimos, que cuando nos referimos a predisposición genética poblacional, no es pertinente considerar solamente las características fenotípicas, en particular cuando se estudia una enfermedad de origen multifactorial.

Nuestros resultados concluyen que el haplo B no esta asociado a la enfermedad, ni es modificado por ninguna otra variable del estudio, análisis que ha permitido verificar la ausencia de confundentes. Es relevante la diferencia encontrada entre la evaluación fenotípica y la genotípica, pues cuando se cruzaron los datos, 6 de los 12 individuos que resultaron pertenecer al Haplo B coincidieron con la clasificación fenotípica de aymarás, de los cuales cuatro tenían CAVB y 2 CCL. Existen diferencias entre la clasificación poblacional aymará desde el punto de vista genotípico 23.52% y fenotípica 88.23% en la población estudiada. Se encontró similar frecuencia del marcador genético Haplo B tanto en el grupo de pacientes con CAVB 23.52% como en los pacientes con CCL 22.8%, donde el cálculo del Error Standard para obtener el valor p, se obtuvo $p > 0.5$ por tanto la diferencia estadísticamente no es significativa. La clasificación fenotípica es diferente en el grupo de pacientes con CAVB 88.23% que en los pacientes con CCL 51.43%, con un valor $p \sim 0,001$ siendo las diferencias estadísticamente significativas. La diferencia entre la frecuencia de la clasificación en pacientes con CAVB y CCL basada en el fenotipo se debe a la subjetividad que este tipo de análisis lleva. La edad es un factor de riesgo determinante para el desarrollo de CAVB, que se confirma por la diferencia entre el grupo de pacientes control y el de casos con un valor $p \sim 0,00$

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los pacientes sin los cuales este estudio no habría sido factible, al Servicio de cirugía del Hospital Obrero N°1 a cargo del Dr. Raul Urquiza y a todo el personal de ese nosocomio, al Dr. Jaime Rios Dalenz por su valiosa colaboración, a la Dra. Eva Harris y a la Dra. Catherine Godinot por su colaboración en la parte experimental de genética molecular.

REFERENCIAS

1. Strom BL, Soloway RD, Rios J Risk factors for gallbladder cancer. *CANCER* 1995; 76: 1747 -56.
2. Reyes H, Taboada G, Ribalta J. Prevalence of intrahepatic cholestasis of pregnancy in La Paz, Bolivia. *J Cron Dis* 1979;32: 499 - 504.
3. Weiss K.M., R.E. Ferrell, Hanis CL, Styne P.N. Genetics and epidemiology of gallbladder disease in new world native peoples. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 1259 - 278.
4. Wiggins CL, Becker TM, Key CR, Samet JM. Cancer mortality among New Mexico's Hispanics, American Indians and non-Hispanic Whites. *J Natl Cancer Inst* 1993. 85 (20):1670-8.
5. Trapido EJ, Chen F, Davis K, Lewis N, Mackinnon J A. Cancer among hispanic males in south Florida, Nine years of incidence data. *Arch Intern Med* 1994. 154 (2): 177-85.
6. Malcolm K, Hayes KC, Colditz GA. Weight, diet, and the risk of symptomatic gallstones in middle-aged women. *N Engl J Med.* 1989; 321: 563-8.
7. Reynolds R, Sensa Baugh G, Blake E. Analysis of Genetic Markers in Forensic DNA Samples Using the Polymerase Chain Reaction. *Anal Chem* 1991;63:1-7.
8. Decorte R, Cassiman J.J. Forensic medicine and the polymerase chain reaction technique. *J Med Genet* 1993; 30: 625-33.
9. Masatoshi N, Naoko T. The root of the phylogenetic tree of Human Populations. *Mol. Biol. Evol.* 1996; 13(1): 170 -7.
10. Torroni A, Wallace DC. Mitochondrial DNA Variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *J of Bioener Biomed* 1994; 6:3-9.
11. Takayuki O. Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases. *Expl Geron* 1995; Vol. 30: 3/4:269-90.
12. Sanz P. Aberraciones Cromosómicas y Citometría de Flujo en Adenocarcinoma de Vesícula Biliar. Acta de conferencia. IV Congreso de ALAMCTA. Viña del Mar-Chile. 1996.p. 64.
13. Rios J. Registro de Cáncer en La Paz. Min. de Salud y Previsión Social. 1994
14. Registros de la Sociedad de Cáncer. Ministerio de Salud y Previsión Social. 1998
15. Finot E. Nueva Historia de Bolivia. Editorial Gisbert y Cía .S.A.;1972. Cap. III.p. 80-7
16. James G. Fox. Hepatic Helicobacter Species Identified in Bile and Gallbladder Tissue From Chilians With Chronic Cholecystitis. *Gastroenterology* 1998;114:755-63.
17. Moranga M L. Análisis de Polimorfismos de Restricción y de secuencia en el DNA Mitocondrial de dos poblaciones Aborígenes Chilenas. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina Norte Departamento de Bioquímica. Tesis de pregrado.
18. Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell RE. Genetic variation in New World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia* 50 (1994), Birkhauser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland.
19. Takagi, S., Naito, E., Yamanouchi, H., and col. Mutation of the p53 Gene in Gallbladder Cancer. *Tohoku J.Exp.Med.*, 1994; 172: 283-9.
20. Fletcher R H, Fletcher S W, Wagner E H. *Clin Epid* 1996;145:708.
21. Hennekens C H & Buring J E. *Epidemiology in Medicine.* Boston: Little, Brown and Company, 1987, 64-72.
22. Hulley S B, Cummings S R. *Designing Clinical Research.* Baltimore: Williams & Wilkins;1988.
23. Pagano M, Gauvreau K. *Principles of Biostatistics.* Belmont, CA: Duxbury Press; 1993.
24. Sackett D L, Haynes R B, Guyatt G H, Tugwell P. *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine.* Baltimore: Boston: Little, Brown and Company;1991.
25. Schurr T G, Ballinger S W, Gan Y , y cols. Amerindian Mitochondrial DNAs Have Rare Asian Mutations at High Frequencies, Suggesting They Derived From Four Primary Maternal Lineages. *AM. J. Hum. Genet* 1990; 46: 613-23.
26. Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell R E. Genetic variation in the New World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia* 1994; 50: 592-601.
27. Ferrell R E, Bertin T, Young R, Barton S A, Murillo F, Schull W J. The aymara of western Bolivia. IV. Gene Frequencies for eight blood groups and 19 protein and erythrocyte enzyme systems. *Am J Hum Genet* 1978;30: 539-49.
28. Carreón JC, Rodríguez C, Flores E. Composición química de cálculos biliares obtenidos a 3.650 metros de altitud. *Acta Gastroenterol* 1982; Bol. 2:89-93.
29. Nei M, Takezaki N. The root of the phylogenetic tree of human populations. *Mol. Biol. Evol.* 1996; 13(1): 170-7.
30. Ayala FJ, Escalante A, O'Huigin C, Klein J. Molecular genetics of speciation and human origins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*1994; 91:6787-94.
31. Johzaki H, Iwasaki H, Nishida T, Isayama T, Kikuchi M. A human gallbladder adenocarcinoma cell line. *Cancer* 1989; 64(11): 2262-8.
32. Sato Y, Tanaka J, Yoshioka H, Koyama K. Evaluation of the malignancy in gallbladder cancer assessed by nuclear DNA contents and mitotic indices, with special reference to the prognosis of the patients with cancer involvement to the subserosal layer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1991; 92(1): 46-51.
33. Suto T, Sasaki K, Sugai T, Kanno S, Saito K. Heterogeneity in the nuclear DNA content of cells in carcinomas of biliary tract and pancreas. *Cancer* 1993; 72(10): 2920-8.
34. Chao T, Greager J A. Primary carcinoma of the gallbladder. *Journal of Surgical Oncology* 1991; 46 (4): 215- 21.
35. Wyszynski DF. La epidemiología genética: disciplina en expansión. *Rev Panam Salud Pública* 1998; 3 (1): 26-34.

36. Penchaszadeh V, Beiguelman B. Medical genetic services in Latin America: report of a meeting of experts. *Rev Panam Salud Publica* 1998; 3(6): 409-20.
37. Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456- 62..
38. Wyllie a H, Curdner P J, Clarke A R, Cripps K J, Gledhill S, Greaves M F, & cols. Apoptosis in carcinogenesis: The role of p53. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1994; Volume LIX: 403- 9.
39. Canman C E, Chen C Y, Lee M H, & Kastan. DNA Damage responses: p53 inducción, cell cycle perturbations, and apoptosis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1994; Volume LIX: 277- 286.
40. Lowe S W, Bodis S. Apoptosis the prognostic significance of p53 mutation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1994; Volume LIX: 219- 26.
41. Pardoll DM. New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors. *Curr Op Immunol* 1993; 5: 719-25.
42. Klein G, Boon T. Tumor immunology: present perspectives. *Curr Op Immunol* 1993; 5: 687-92.
43. Srivastava P K. Protein tumor antigens. *Curr Op Immunol* 1991; 3: 654-8.
44. Blankenstein T, Rowley D A, Schreiber H. Citokines and cancer: experimental systems. *Curr Op Immunol* 1991; 3: 694-98.
45. Lin J, Wu X, Chen J, Chang A, and Levine A J. Funtions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1994; Volume LIX: 215- 223.
46. Lauwrence I, Grossman and Shoubridge. Mitochondrial genetics and human disease. *BioEssays* 1996; 18 (12): 983-91.
47. Rettig W F. Immunogenetics of cell surface antigens of human cancer. *Curr Op Immunol* 1992;4: 630-40.
48. Tlsty T D, White A, Livanos E. Genomic integrity and the genetics of cancer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1994; Volume LIX: 265- 275.
49. Harley C B, Kim N W, Prowse K R, Weinrich S L. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1994; Volume LIX: 307- 315.
50. Groen A K. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J Biolog Chemistry* 1982; 357(6): 2754-57.
51. Wilkinson JA, Matsui M, and Terachi T. Geographic variation in Rhacophorus aboreus analysis of mt DNA. *J herpetology* 1996; 30 (3): 418-23.
52. Kocher T D, Thomas W K. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86: 6196-200.
53. What you need to know about cancer. *Scientific American* 1996; 275 (3):1-167.
54. Robbins S, Cotran R. *Patología Estructural y Funcional*. 6ta ed. Bs As: Editorial Interamericana; 1996.
55. D M. Hillis., C Moritz., B. K. Mable. *Molecular Systematics*. 2nd ed. New York : Sinauer Associates, Inc. Publishers; 1999; 347-411.
56. *Current Protocols in Human Genetics. Development of Genetics Markers*. John Wiley & Sons Inc. Supplement: 2.5.1. - 2.5.14. 1997.
57. Avise J C. *Molecular markers, Natural History an Evolution*. London: Chapman & Hall; 1994.p.5-9.
58. István Raskó and C. Stephen Doenes. *Genes in Medicine*. London: Alden Press, Osney Mead, Oxford; 1995p.p 76 - 7.
59. Darnel. J. *Molecular Cell Biology*. 3d ed. Scientific American books. Chapter 19.p.809-30.
60. Strachan. T. *Human Molecular Genetics*. Bios Scientific Publishers. 1996 : 147-82..
61. Rios J . Morales C . Estudio clínico-patológico del cáncer de vesícula biliar. *Acta Gastroenterol Bol.* 1:102-107.1981.
62. Rios J, Montaña S. El cáncer en la zona andina de Bolivia. *Patología* 29:123-127.1991.
63. J. Rios. S. Casablanca. Alteraciones epiteliales en colecistopatías. *Patología* 1990; 28:147-9.
64. Rios J. Carballo S. Incidencia de litiasis biliar y cáncer del tracto biliar extra hepático en autopsias. *Acta Gastroenterol Bol* 1983; 3:12-4.
65. Rios J. Casablanca S P. El cáncer en una población urbana de altura. *Acta Andina* 1995; 4: 65-70.
66. J. Rios. A. Takabayashi y cols. Cancer of the gallbladder in Bolivia: suggestions concerning etiology. *Am J of Gastroenterol* 80; 5:371-375.1985.
67. Rios J. Morbidity from Cancer in La Paz, Bolivia. *Int. J Cancer* 1981; 28: 307-14.
68. Rios J. The epidemiology of cancer of the extra-hepatic biliary trac in Bolivia. *Internat J Epidemiol* 1983; 12; 156-60.
69. B. L. Strom, R.D. Soloway. J. Rios. Biochemical epidemioly of gallbladder cancer. *Hepatology* 1983; 23; 1412-17.
70. L. B. Jorde, J. C. Carey, M J. Bamshad, R. L. White. *Medical Genetics*. 2 ed. Baltimore: . Mosby-Year Book; 2000.p.221-23.