

Distribución del polimorfismo del codón 72 del gen *p53* en lesiones de cuello uterino

Profs. Jhon Fredy Cruz Gómez*, Militza Quintero Vega *, Liliana Fernández **, Gabriela Condezo ***, Marco Bastidas*, Juan Puig Pons****

RESUMEN

Objetivo: Determinar la distribución del polimorfismo del codón 72 del gen *p53* en pacientes que presentan lesiones cervicales asociadas a infección por VPH.

Métodos: Estudio descriptivo de corte transversal donde se procesaron 118 muestras del área genital femenina, de 59 mujeres sanas (controles) y 59 con lesiones cervicales NICI-NICII-NICIII y Ca in situ (casos), para la extracción y purificación del ADN. Se amplificó el exón 4 del gen *p53*, para la genotipificación del codón 72 mediante la técnica PCR-SSCP.

Ambiente: Facultad de Ciencias, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX, Universidad de Los Andes. Mérida, Estado Mérida, Venezuela.

Resultados: La PCR-SSCP permitió determinar la frecuencia de los genotipos homocigotos arginina (Arg/Arg), prolina (Pro/Pro) y heterocigoto prolina/arginina (Pro/Arg). Para los casos el genotipo Arg/Arg tuvo una frecuencia de 32,20 % y para los controles de 50,85 %. El genotipo Pro/Pro se encontró en 5,09 % de los casos y 11,86 % para los controles. El genotipo Pro/Arg tuvo una distribución de 62,71 % para los casos y 37,29 % para los controles.

Conclusión: En este estudio no se encontró una relación estadísticamente significativa entre la presencia del genotipo Arg/Arg y el desarrollo de lesiones cervicales.

Palabras clave: VPH, P53, Codón 72, PCR-SSCP

SUMMARY

Objective: To determine the distribution of the polymorphism of the codon 72 of the gene *p53* in patients that present cervical lesions associated to infection by VPH.

Method: Descriptive and transversal study through assessment of 118 samples of the genital feminine area were processed, of 59 healthy (control) women and 59 with cervical lesions NICI-NICII-NICIII and Ca in situ (cases), for the extraction and purification of the DNA. The exon 4 of the gene *p53* was amplified, for the genotyping of the codon 72 by means of technical PCR-SSCP.

Setting: Facultad de Ciencias, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX, Universidad de Los Andes. Merida, Estado Merida, Venezuela.

Results: PCR-SSCP allowed determining the frequency of the homozygotes genotypes arginine (Arg/Arg), proline (Pro/Pro) and heterozygotes proline /arginine (Pro/Arg). For the cases the genotype Arg / Arg had a frequency of 32.20 % and for the controls of 50.85 %. The genotype Pro/Pro was in 5.09 % of the cases and 11.86 % for the controls. The genotype Pro/Arg had a distribution of 62.71 % for the cases and 37.29 % for the controls.

Conclusion: In this investigation there was not a statistically significant relationship among the presence of the genotype Arg/Arg and the development of cervical lesions.

Key words: HPV, P53, Codon 72, PCR-SSCP.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de la actividad del gen supresor de tumores *p53* causada por alteraciones genómicas

como mutaciones o por interacciones con productos virales, ha sido asociada con la inmortalización o la transformación celular in vitro y con el desarrollo del cáncer in situ (1-2,3). Un ejemplo de estas

*Magister Scientiae en Biología Molecular, Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental.

**Licenciada en Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX-ULA).

*** Licenciada en Biología. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX-ULA).

****Doctor en Ciencias Naturales, Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental.

interacciones con productos virales, la constituye la degradación de la proteína TP53 inducida por la proteína E6 del Virus del Papiloma Humano (VPH). Además, se ha demostrado que la proteína E6 del VPH tiene mayor afinidad por una variante polimorfa presente en el codón 72 del exón 4 del gen *p53*, específicamente por el alelo *p53Arg72* (Arg), y no por la forma *p53Pro72* (Pro). Esto es de gran importancia ya que se ha relacionado de forma directa la presencia de este alelo con el desarrollo del cáncer cervical asociado al VPH (4). Por otra parte, el gen supresor de tumores *p53* se encuentra mutado en más del 50 % de los cánceres humanos, principalmente en el dominio de unión al ADN que involucra al codón 249 del exón 7, lo que trae como consecuencia la pérdida de su actividad biológica (5). Thomas y col. (1999) (6) reportaron que mujeres homocigotas para la variante arginina (Arg/Arg) eran siete veces más susceptibles a la tumorigénesis asociada al VPH que las mujeres heterocigotas (Pro/Arg). Por tanto, el genotipo (Arg/Arg) se podría considerar un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer asociado con el VPH. De igual forma Zehebe y col. (1999) (7), corroboraron los trabajos de Storey (1996) (4), en un estudio realizado en mujeres italianas y suecas. Así mismo, Ojeda y col. 2003 (8), encontraron que las mujeres eran 2,6 veces más susceptibles al desarrollo de cáncer cervical cuando presentaban el genotipo homocigoto Arg/Arg. Otros estudios epidemiológicos muestran resultados controversiales, en los que no se encuentra ninguna relación significativa entre la forma homocigota Arg/Arg y el riesgo a desarrollar cáncer cervical inducido por el VPH, tal es el caso de estudios realizados en mujeres coreanas (9), suecas (10) y peruanas (11), entre otros. Recientemente, Koushik y col. 2004 (12), realizaron un estudio estadístico de 50 artículos con resultados contradictorios, concluyendo que no existe una relación significativa entre la forma polimorfa Arg/Arg y el desarrollo de cáncer cervical. Evidentemente, existe una gran discrepancia entre la asociación del polimorfismo del codón 72 y el riesgo a desarrollar cáncer asociada al VPH. Makni y col. (2000) (13), señalan que unas de las posibles causas de estas controversias radica en la falta de validación de protocolos confiables para la detección del polimorfismo y en la elección de grupos control no representativos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la distribución del polimorfismo del codón 72 del gen *p53* en pacientes infectadas con VPH y lesiones NICI, NICII, NICIII y CA *in situ*, en una población femenina de los andes venezolanos.

MÉTODOS

Entre el mes de abril del año 2004 y febrero de 2006, se realizó un estudio descriptivo preliminar de corte transversal donde se analizaron 118 muestras del área genital de mujeres del Estado Mérida, Venezuela, con edades comprendidas entre 21 y 63 años, que iniciaron su actividad sexual, y que acudieron voluntariamente a la consulta privada o pública para realizarse un control citológico y una prueba molecular mediante PCR MY09 MY11 (14) para determinación de infección por VPH. A las pacientes se les informó de la posibilidad de genotipificar el codón 72 del gen *p53*, se les invitó a participar en el estudio y se obtuvo el consentimiento informado. Del total, se seleccionaron 59 muestras negativas para infección por VPH y lesiones cervicales que conformaron el grupo control. El grupo experimental quedó conformado por 59 muestras de pacientes que presentaron infección por VPH y lesiones NIC-I, II, III o CA *in situ* establecido por estudio previo (15).

Procesamiento de las muestras

Las muestras obtenidas como hisopados, cepillados y biopsias se procesaron para extraer el ADN mediante el método clásico de precipitación con fenol-cloroformo (16) con algunas modificaciones. A los hisopados/cepillados, se les añadió solución salina al 0,8 % y se incubó por 2 horas a 37°C y luego se retiró el hisopo o cepillo cervical. Después de centrifugar a alta velocidad, al sedimento celular se le añadió 400 µL de tampón de extracción (Tris-HCl 0,2 M pH 8; EDTA 0,025 M; NaCl 0,1 M; y SDS 0,2 %), proteinasa K 0,2 mg (20 mg/mL) y 20 µL de SDS 10 %. Se incubó toda la noche a 55°C. Posteriormente se añadió 100 µL de Chelex-100 al 5 % y se calentó por 10 minutos a 95°C (17). A continuación se añadió un volumen de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (24:23:1) y se agitó en vórtex, a la fase acuosa separada se le añadieron dos volúmenes de etanol absoluto y 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10 M. Se dejó precipitar el ADN por 48 horas a -20°C, y se procedió a centrifugar para bajar el precipitado. El ADN se resuspendió en 50 µL de tampón TE 10 mM pH 8. Las muestras de ADN fueron sometidas a una PCR que amplifica un fragmento del gen de la β-globina, para determinar la calidad del ADN utilizando los iniciadores PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' y GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' que producen un fragmento de 268 pb (18).

Análisis del polimorfismo del codón 72 del gen p53 por PCR-SSCP

El análisis de polimorfismo se realizó utilizando los iniciadores COD72F1 5'-GGACTGACTTTCTGCTCTTG-3' y COD72R15'-GAAGTCTCATGGAAGCCAG-3' con un programa de PCR propuesto por Chosdol y col. (2000) (19) obteniéndose un amplificado de 306 pares de bases. Los amplificados obtenidos fueron sometidos a análisis conformacional de cadena simple de ADN (SSCP). Para ello fueron desnaturalizados a 95°C de temperatura en un volumen de buffer de carga, compuesto por formamida al 90 % y xilencyanol al 0,001 % por 10 minutos, se enfriaron rápidamente en hielo por 5 minutos. Las muestras desnaturalizadas fueron cargadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida 29:1 al 6 %, en buffer TBE 0,1 M pH 8, con un tamaño de 18 x16 cm. Se utilizó un aparato de electroforesis vertical Thermo con refrigeración a 4°C a una potencia de 30W y un voltaje 1200V durante 4 horas. Una vez finalizada la corrida el gel fue teñido con la técnica del nitrato de plata (Silver Sequence Promega), finalmente fueron fotografiados en un equipo documentador de imágenes Singene Ingenius para su análisis posterior. Las isoformas encontradas en el análisis PCR-SSCP fueron comparadas con los resultados del análisis de restricción (RFLP) al que fueron sometidos los amplificados utilizando la enzima BstU1 según el protocolo de Smith (1997) (20).

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el programa SPSS 12.0 para Windows, para generar frecuencias y calcular el parámetro χ^2 .

RESULTADOS

Se estudió un grupo de 59 mujeres de entre 21 y 65 años de edad con un promedio de 27 años que presentaban lesiones de cuello uterino de tipo neoplásica cervical interepitelial (NIC) con la siguiente distribución: 1,6% presentaron NIC-I, 41,3 % NIC-II, 49,2 % NIC-III y 1,6 % cáncer *in situ*. Como grupo control se utilizaron 59 muestras provenientes de mujeres con el mismo promedio etario que no presentaron ningún tipo de alteración anatomopatológica y fueron negativas para la presencia del VPH por análisis molecular (Cuadro 1).

Todos los ADN purificados, permitieron la amplificación de un fragmento del gen de la β -globina, y se demostró que eran adecuados para la PCR (18). Se realizó la amplificación del exon 4 del gen p53,

dando como resultado amplificadas, con un tamaño de 309 pb, se incluyó un control negativo sin ADN. Los controles para la determinación exacta de los genotipos fueron realizados por la técnica PCR-RFLP con la enzima de restricción BstU1. Con esta técnica se puede determinar el genotipo ya que por el cambio de una base en el codón p53Pro72 (CCC) se genera el codón

Cuadro 1

Resultados anatomopatológicos del grupo de casos			
Diagnóstico	N	Porcentaje	Porcentaje acumulado
NIC-I	1	1,69	1,69
NIC-II	26	44,06	45,76
NIC-III	31	52,54	98,30
CA <i>in situ</i>	1	1,69	100,00
Total	59	100	

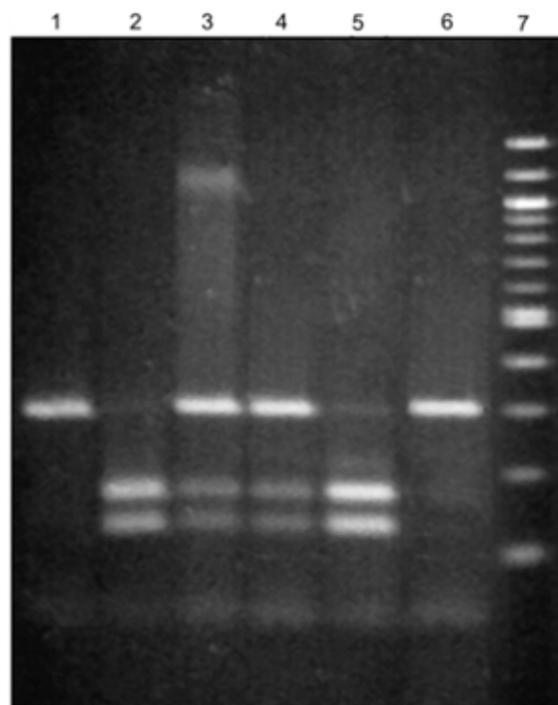


Figura 1. Gel de agarosa 1 % con el producto de la digestión del amplificado del exon 4 de p53 con la enzima BstU1, para el análisis polimórfico del codon 72. Carril 1 genotipo homocigoto Pro/ Pro. Carriles 2 y 5 genotipo homocigoto Arg/ Arg. Carriles 3 y 4 Genotipo heterocigoto Arg/ Pro. Carril 6 control sin digerir. Carril 7 escalera de peso molecular de 100 pb.

p53arg72 (CGC) el cual es reconocido por la enzima BstU1 y genera un corte que produce dos fragmentos de ADN de 175 pb y 134 pb (19). Una vez establecido los genotipos del grupo control por PCR-RFLP, los amplificados de ADN fueron sometidos a PCR-SSCP para corroborar la presencia de los genotipos polimórficos, Arg/Arg, Pro/Pro y Pro/Arg del codón 72. Se caracterizaron tres patrones electroforéticos, de cadenas simples de ADN (SSCP), que correspondieron a cada una de las combinaciones alelicas posibles. El genotipo heterocigoto Pro/Arg se caracterizó por la presencia de cuatro bandas reproducibles en el gel de poliacrilamida, por su parte el genotipo Pro/Pro presentó dos bandas comparables en su migración a las dos bandas inferiores presentes en el genotipo Pro/Arg. El genotipo homocigoto Arg/Arg se pudo caracterizar por presentar dos bandas comparables a las dos bandas superiores del genotipo heterocigoto. Todos los amplificados tanto del grupo de casos como los del grupo control fueron sometidos a PCR-SSCP

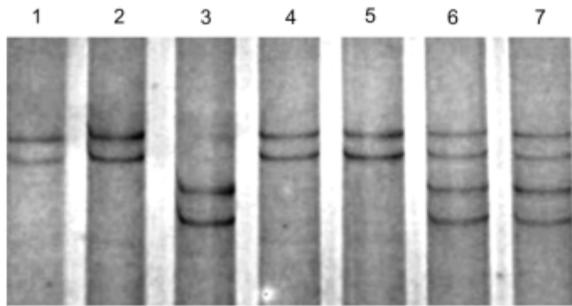


Figura 2. Gel SSCP para el análisis polimórfico del codon 72 del gen P53. Carriles 1, 2, 4 y 5 genotipo homocigoto Arg/Arg. Carril 3 genotipo homocigoto Pro/Pro. Carriles 6 y 7 genotipo heterocigoto Arg/Pro.

Cuadro 2

Tabla de distribución genotípica

Genotipo	Control		Pacientes	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia
Arg/Arg	30	50,85	19	32,20
Arg/Pro	22	37,29	37	62,71
Pro/Pro	7	11,86	3	5,09
Total	59	100	59	100

para la genotipificación del codón 72. En las Figuras 1 y 2 se presentan los gels de PCR-RFLP y PCR-SSCP respectivamente. En el Cuadro 2 se presentan los resultados del análisis polimórfico realizado y la frecuencia de cada combinación alelica. Se realizó un análisis de χ^2 para probar si existe relación entre la presencia del genotipo susceptible (Arg/Arg) y el desarrollo de lesiones en las pacientes infectadas por VPH. El valor de χ^2 fue de 1,748 para un grado de libertad de $P=0,186$, tomando $\alpha=0,05$. Se realizó un análisis de porcentaje alélico con la finalidad de conocer la distribución porcentual de cada alelo de forma individual y poder relacionar la presencia de alguno de ellos con la frecuencia de lesiones en el grupo correspondiente, los resultados se presentan en la Figura 3.

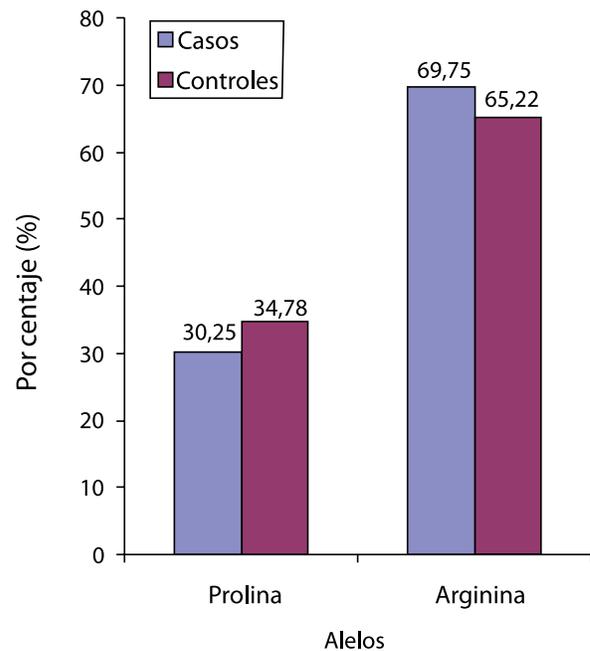


Figura 3. Distribución alelica porcentual.

DISCUSIÓN

La asociación del polimorfismo del codón 72 del exón 4 con la predisposición a desarrollar cáncer de cuello uterino ha sido motivo de una gran controversia entre distintos autores (21), muchos estudios han intentado reproducir los resultados del trabajo de Storey y col. (1998) (4), en el cual se propuso que el potencial para la degradación de

p53 mediada por la oncoproteína viral E6 podría colaborar considerablemente con el desarrollo de cáncer cervical (22). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican una falta de relación entre la presencia del genotipo homocigoto Arg/Arg del codón 72 del gen p53 y un aumento en la susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de cuello uterino. Se han publicado varios artículos sobre la frecuencia del polimorfismo del codón 72 exon 4 del gen p53 entre varios grupos étnicos (23). En varias poblaciones de Europa Occidental (Francia, Suecia, Noruega), Norte América, Central y Sur América (México, Costa Rica, Perú) y Japón, el alelo más común es el alelo arginina con una frecuencia que va desde 0,60 a 0,83 (12). En el presente estudio hemos encontrado que la frecuencia de aparición del alelo Arg en la población control es de 0,69 aproximadamente.

De la misma manera otros trabajos (24,25) no muestran diferencias significativas entre la frecuencia del genotipo Arg/Arg en muestra de pacientes infectadas con VPH y muestras de población no infectada. Igualmente no se encontró asociación entre el grado de la lesión y el polimorfismo estudiado. Es interesante hacer notar la existencia de trabajos en donde se establece relación entre el alelo Arg y el desarrollo de cáncer de colon, endometrio, urotelial entre otros (26-29). El desarrollo del cáncer no es un evento único y requiere de sucesivas mutaciones e interacciones con factores de riesgo ambientales. Distintos polimorfismos presentes en los genes involucrados en la regulación del ciclo celular o la apoptosis puedan estar relacionados con un aumento de la susceptibilidad a desarrollar lesiones en el cuello uterino una vez establecida la infección por VPH. En el presente trabajo no se pudo encontrar relación entre la presencia del alelo Arg en el codón 72 de p53 y el aumento de la susceptibilidad al desarrollo de lesiones NIC I II III y CA *in situ* en una población de mujeres en Venezuela. No obstante la ampliación del número de muestras pudiera poner en evidencia la relación propuesta. El análisis de los genes de otras proteínas como p21, RB, Myc, podrían mostrar una relación más clara entre el desarrollo de la lesión preneoplásica con la presencia de polimorfismos que confieran susceptibilidad. El papel de los polimorfismos y mutaciones de TP53 en el desarrollo de la lesión de cuello uterino y su interacción con la proteína oncogénica E6 del VPH está aun por ser comprendido completamente.

REFERENCIAS

1. Makni H, Franco E, Kaiano J, Villa L, Labrecque S, Dudley R, et al. P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papilloma virus-induced cervical cancer: Effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer*. 2000;87:528-533.
2. Peralta O, Bahema M, Diaz C, Madrid V. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública de México*. 1997;39(5):451-462.
3. Yu MW, Yang SY, Chiu YH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. Ap53 genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma risk in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology*. 1999;29(3):697-702.
4. Storey A, Thomas M, Kalita A, Marwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer. *Nature*. 1998;393:229-234.
5. Mendoza C, Cerbón M. El gen supresor de tumores p53: mecanismos de acción en la proliferación y muerte celular. *Revista de Investigación Científica*. 2001;53(3):266-273.
6. 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(2):1092-1100.
7. Zehebe I, Volgino G, Wilander E, Genta F, Tommasino M. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *The Lancet*. 1999;354:218-219.
8. Ojeda J, Ampuero S, Rojas P, Allende J, Bartos S, Chakkaborty R, et al. P53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer. *Biol Resv*. 2003;36(2).
9. Baek W, Cho J, Suh S, Shu M, Shin D, Cho C, et al. P53 codon 72 polymorphisms and risk of cervical carcinoma in Korean women. *J Korean Med Sci*. 2000;15:65-67.
10. Gustafsson A, Guo Z, Hu X, Ahmadian A, Brodin B, Nilsson A, et al. HPV-related cancer susceptibility and p53 codon 72 polymorphism. *Acta Derm Venerol*. 2001;81:125-129.
11. Klug S, Wilmote R, Santos C, Almonte M, Herrero R, Guerrero I, et al. Tp53 polymorphism, HPV Infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2001;10:1009-1012.
12. Koushik A, Platt R, Franco E. p53 Codon 72 Polymorphism and Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. 2004;13:11-22.
13. Makni H, Franco E, Kaiano J, Villa L, Labrecque S, Dudley R, et al. P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papilloma virus-induced cervical cancer: Effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer*. 2000;87:528-533.
14. Manos M, Ting Y, Wright D, Lewis A, Broker T, Wolinsky S. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human

- papillomaviruses. *Cancer Cells*. 1989;7:209-214.
15. Quintero M, Cruz J, Bastidas M, Márquez L, Puig J. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR- RFLP. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2008;68(1):25-31.
 16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2ª edición. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
 17. García L, Rodrigo J, Sánchez P, Ramos S, Suárez C. Extracción de ADN con resina Chelex en el análisis de la amplificación oncogénica en carcinoma de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2004;55:139-144.
 18. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230:1350-1354.
 19. Chosdol K, Ahuja A, Rathore A, Misra A, Hussain S, Chattopadhyay, et al. Study of p53 codon 72 polymorphism in various ethnic groups of North India. *Current Science*. 2002;82(10):1253-1255.
 20. Smith D. *Agarose Gel Electrophoresis. Methods in molecular biology basic DNA and RNA protocols*. Ed, Harwood A. Humana Press INC., Totowa, NJ. 1997;58
 21. Abba M, Villaverde M, Gómez, M. The p53 codon 72 in HPV infection and cervical disease. *Obstet Gynecol*. 2003;109:63-66.
 22. Walboomers J, Muñoz N. Tp53 polymorphism, HPV Infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol, Biomark Prevent*. 2001;10:1009-1012.
 23. Beckman G, Birgander R, Sjalander A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered*. 1994;44:266-270.
 24. Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale AL. P53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*. 1998;396:530-531.
 25. Klug S, Wilmotte R, Santos C. TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent*. 2001;10:1009-1012.
 26. Erich M, Margaret R, Qingyi W. P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: A case-control study. *Cancer Letters*. 2002;183:123-130.
 27. Kuroda H, Hiroyuki N, Hirohisa I, Takahiko K. P53 codon 72 polymorphism and urothelial cancer risk *Cancer Letters*. 2003;189:77-83.
 28. Papadakis E, Dokianakis D, Spandidos D. P53 Codon 72 Polymorphism as a Risk Factor in the Development of Breast Cancer *Molecular Cell Biology Research Communications*. 2000;3:389-392.
 29. Ju W, Jae W, Noh H, Yong S, In A, Sang-Yoon P, et al. P53 and p21 genetic polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2004;93:499-505.

Agradecimientos

A todos los médicos que contribuyeron con la recolección de las muestras en sus respectivas consultas, al personal técnico y obrero de LABIOMEX por su valiosísima colaboración y apoyo. A los estudiantes del Posgrado en Biología Molecular de la ULA por su valiosa colaboración.

Este trabajo fue financiado por el CDCHT-ULA a través del proyecto número C-1053-00-03C bajo la coordinación del M.Sc. Jhon Fredy Cruz Gómez.

Correspondencia: Jhon Fredy Cruz Gómez, Avenida Tulio Febres Cordero, Facultad de Medicina, Edificio de Fisiopatología, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX). Mérida, Estado Mérida, Venezuela.

La Biblioteca “Dr. M. A. Sánchez Carvajal”

Si requiere algún artículo de la revistas que componen nuestra colección, envíenos un correo electrónico a bibliotecasogvzla@yahoo.com, y pronto atenderemos su solicitud.

Nuestro personal realizará la localización de los artículos y a vuelta de correo electrónico se le indicará el monto por las fotocopias y el número de nuestra cuenta bancaria para que usted realice el

depósito correspondiente. Debe enviarnos con copia del baucher al No. De fax 0212 451 08 95.

Se enviará el paquete con sus fotocopias solicitadas a una dirección indicada por Ud. por correo especial con cobro a destino.

Revise nuestra página web a través de www.sogvzla.org