



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LOS NIVELES DE ANCESTRÍA EN
PACIENTES ECUATORIANOS AFECTADOS CON MIELOMA MÚLTIPLE.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía

Ph.D. Paola Elizabeth Leone Campo

Autora

Andrea Nathaly Barrionuevo Guerra

Año

2016

DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Paola Elizabeth Leone Campo
Doctora en Ciencias Biológicas
C.I. 1710265834

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Andrea Nathaly Barrionuevo Guerra
C.I. 1723263446

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y familia, por ser el regalo más hermoso y mi pilar de apoyo durante este proceso; a David Rueda por brindarme paz y comprensión durante esta etapa de mi vida; a mis mejores amigas Andre y Liz y a mi mejor amigo Santy por ser mis cómplices de aventuras, darme su cariño y ser mi gran soporte para el cumplimiento de mis sueños; a las Ph.D. Margherita Badin y Alina Aguirre por su apoyo incondicional, confianza, dedicación, motivación y por ser el mejor ejemplo a seguir; a mi Pavi, Carmita, Xava, Anita, Ari, Angelito, Marce, Balti y Santy por ser unas personas con un corazón de oro y ser mi apoyo fundamenta en esta etapa. A los decanos José Martinod y Tomás Villón por ser unos profesionales intachables en su deber y siempre brindarme una mano amiga.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi Padre del Cielo, quien me ha colmado de bendiciones y es el motor de mi vida. A mis padres, Raúl y Nuria, quienes son mi felicidad y mi más grande orgullo: a mi ñaña Nancita, quien además de ser mi otra mamá, es mi mejor amiga y quien siempre está ahí para mí; a mis abuelitas Rosarito y mamita Judit, quienes me llenan de sabiduría y han cuidado de mí desde mis primeros pasos. A mis primos que han llenado mi vida de risas y alegrías; a mis tíos y tías por enseñarme y corregirme con amor para hacer de mí una mejor persona. Y finalmente a mis tres angelitos que me cuidan desde el cielo, quienes me guían en cada paso que doy.

RESUMEN

El mieloma múltiple es un tipo de cáncer que se origina por la degeneración y proliferación de las células plasmáticas malignas. Esta enfermedad tiene una incidencia a nivel mundial de 0,8% y en Ecuador su ocurrencia es de 0,1% menor que el que presenta a nivel global. Esta patología representa el 1% de todas las neoplasias y del 10 al 15% de todas las de naturaleza hematopoyéticas.

El presente estudio se enmarca en la evaluación preliminar de los niveles de ancestría de una muestra de 64 pacientes ecuatorianos afectados por mieloma múltiple. El análisis se realizó mediante 46 marcadores genéticos (AIMs-INDELS). Los pacientes evaluados se agrupan en dos clusters principales, que se asocian a un componente ancestral americano (52,7%) y europeo (42,3%). La ancestría africana sólo está representada en un 3,9%. La evaluación del parámetro estadístico F_{ST} estimó que existe una distancia moderada entre los pacientes evaluados y las poblaciones americanas (0,08) y europea (0,11). Mientras que, la comparación con el grupo de descendencia africana tuvo una diferenciación mayor (0,34). Adicionalmente, se evidenció que los pacientes se encontraban mayoritariamente en un rango de edades que correspondió a un valor medio de 65 ± 12 años (p total= 0,4916). En el caso de la población masculina ($N = 36$) la edad promedio fue 63 ± 13 años y para las mujeres ($N = 28$) involucradas en el estudio 65 ± 11 años. Finalmente, al realizar el análisis estadístico relacionando la ancestría con la historia clínica de los individuos no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre las dos poblaciones predominantes. Sin embargo, se demostró que el 50% de la población conformada por los pacientes con mayor ancestría americana y el 52% con ascendencia europea presenta hipocalcemia.

Palabras clave: mieloma múltiple, AIMs-INDELS, población ecuatoriana, ancestría, hipocalcémicos.

ABSTRACT

Multiple myeloma is a type of cancer characterized for degeneration and proliferation of maligns plasmatic cells. This disease has a worldwide incidence of approximately 0.8%; however for Ecuadorian population is 0.1% less than the global reported value. This neoplasia represents 1% of all kind of these pathologies and between 10-15% of hematopoietic cancer. In this study, the presence of multiple myeloma in Ecuadorian patients was correlated with 46 genetic markers (AIMs-INDELS). The results showed that main ancestry corresponded to Europeans (42.3%) and Americans (52.7%) predecessor. African ascendants were poorly represented in the evaluated population (3.9%). When patients with Americans and Europeans ancestry were analyzed with F_{ST} statistic, they showed a moderate separation in their genetic distance (0.08 and 0.11, respectively). Nevertheless, patients of African predecessors were highly differentiated from their control subjects ($F_{ST} = 0.34$). In addition, it was noticed that most of the patients ($N = 64$) were aged between (65 ± 12 year old; $p = 0.4916$). Male ($N = 36$) were 63 ± 13 while female were ($N = 28$) 65 ± 11 years old. Finally, when comparing ancestry with clinical history the statistical analysis revealed no significant differences between the two predominant populations. However, it was shown that the 50% of mainly American ancestry patients and the 52% of European ancestry patients are hypocalcemics

Keywords: multiple myeloma, AIMs-INDELS, Ecuadorian population, ancestry, hypocalcemic.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
2. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 El cáncer: generalidades, biología molecular y oncogénesis..	5
2.1.1 El origen del cáncer	5
2.1.2 Bases moleculares del cáncer	6
2.1.3 Protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumor	8
2.2 Biología y patogenia del mieloma múltiple.....	9
2.2.1 Origen y características de las células mieloides y linfoides.....	9
2.2.2 Biología del mieloma múltiple	11
2.2.3 Clasificación cromosómica	13
2.2.4 Etapas del mieloma múltiple	15
2.2.5 Factores de riesgo	17
2.3 Características clínicas y diagnósticas del mieloma múltiple .	18
2.3.1 Manifestaciones clínicas	18
2.3.2 Exámenes de laboratorio.....	19
2.3.2.1 Detección de la proteína M.....	19
2.3.2.2 Ensayo de cadenas ligeras libres en suero (Freelite®).....	20
2.3.2.3 Pruebas genéticas	21
2.4 Estudio de la estructura de poblaciones humanas.....	22
2.4.1 Estructura genética	22
2.4.2 Marcadores uniparentales	23
2.4.3 Marcadores autosómicos.....	24
2.5 Marcadores de ADN empleados en la evaluación de la diversidad genética	25

2.5.1	Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs)	25
2.5.2	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	25
2.5.3	Marcadores informativos de ancestría (AIMs)	26
2.5.4	PCR Múltiplex	26
2.5.5	Ancestría	27
3.	CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	28
3.1	Recolección de muestras	28
3.2	Extracción de ADN	28
3.2.1	Extracción de ADN a partir de sangre periférica	28
3.2.2	Extracción de ADN a partir de médula ósea	29
3.3	Cuantificación de ADN	29
3.4	Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
3.5	Secuenciación, análisis de fragmentos y visualización de datos	30
3.6	Análisis estadístico	30
3.6.1	Análisis de la estructura poblacional	30
3.6.2	Procesamiento estadístico	31
4.	CAPÍTULO IV: RESULTADOS	32
4.1	Historias Clínicas	32
4.2	Extracción de ADN de muestras	33
4.3	Amplificación por PCR	33
4.4	Análisis de la diversidad genética y ancestral	36
4.5	Análisis de la estructura de la población de los pacientes afectados por mieloma múltiple	37
4.6	Análisis de la estructura de la población de los pacientes afectados por mieloma múltiple en el contexto de poblaciones de referencia	41
4.7	Relación de la estructura poblacional con parámetros clínicos	45

5. CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	48
6. CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
6.1 Conclusiones.....	53
6.2 Recomendaciones	54
7.REFERENCIAS	55
8.ANEXOS	75

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El cáncer es una de las patologías más nocivas de las que afectan la salud de los seres humanos. En este tipo de padecimiento la función y viabilidad celular, así como la integridad funcional y estructural de los órganos y tejidos son susceptibles a fallas, debido a los daños ocasionados a nivel anatómico y funcional (DeBerardinis, Lum, Hatzivassiliou y Thompson, 2008). Esta enfermedad se caracteriza por una gran variedad de tumores malignos procedentes del crecimiento descontrolado de las células que conforman determinados tejidos. La proliferación de este tipo de células malignas genera un conglomerado que puede invadir otros tejidos u órganos adyacentes o generar metástasis en lugares más lejanos al sitio del tumor primario. El desencadenamiento de este trastorno es esencialmente autónomo, creciente y letal, si no es tratado adecuadamente y en estadios tempranos (Fleuren, Zhang, Wu y Daly, 2016).

El mieloma múltiple (MM) o enfermedad de Kahler es un tipo de cáncer caracterizado por el crecimiento descontrolado de células plasmáticas. Este padecimiento fue diagnosticado por primera vez en el año de 1845 mediante un estudio retrospectivo ejecutado en Centroamérica, puesto que anteriormente esta patogenia era confundida con otro tipo de enfermedad (Estrada, 2012).

Este tipo de cáncer forma parte de las enfermedades hematológicas y está caracterizado por una proliferación de células plasmáticas en la médula ósea, productoras de una proteína homogénea monoclonal (Guinan, Kenny y Gatenby, 1989). El MM constituye aproximadamente del 10 al 15% de las neoplasias hematopoyéticas, el 1% de todos los cánceres y el 2% de las muertes por cáncer (Fantl *et al.*, 2010). A nivel mundial se reporta que el mieloma múltiple representa el 0,8% del total de casos de cáncer (McCormack, Znaor y Santos, 2012). Sin embargo, en Ecuador su incidencia es del 0,1%,

valor que es marcadamente menor que los datos reportados a nivel mundial (Cueva y Yépez, 2014).

El origen del MM está asociado a una población de células B maduras que ha pasado por el centro germinal del folículo linfoide y sufre un proceso de hipermutación somática y una variación en el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) que condiciona el cambio de isotipo de la IgH. Generalmente, el mieloma múltiple es precedido por una condición premaligna conocida como gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), que puede permanecer estable durante años y que progresa a MM con una tasa anual del 1% (Kyle y Rajkumar, 2008). También se han evidenciado casos donde el MM progresa como un proceso con múltiples etapas cuya manifestación inicial es la GMSI (Greenberg, Vachon y Rajkumar, 2012).

Aunque existen avances en el tratamiento de los pacientes con MM, esta sigue siendo una enfermedad incurable con una supervivencia media de 2-3 años y de 10 años en el 10-15% de los individuos afectados (Phekoo *et al.*, 2004). También se ha descrito que los grupos más afectados están conformados por individuos entre 60-70 años. La aparición de esta enfermedad es mucho más frecuente en el género masculino, y los individuos con ancestría afroamericana tienen un riesgo de padecerla que los otros grupos étnicos (García-Sanz, Mateos y San Miguel, 2007).

Las causas que se relacionan con el desarrollo de MM, pueden estar influenciadas por diferentes factores tales como: genéticos, estilo de vida, la disfunción inmune, las exposiciones ambientales, las radiaciones ionizantes, los insecticidas y pesticidas (Eriksson y Karlsson 1992). El MM se clasifica citogenéticamente en dos grupos: (1) hiperdiploides, en los cuales se visualizan ganancias de cromosomas impares, donde el pronóstico para el paciente es mejor y (2) no-hiperdiploides, en los que se evidencian principalmente translocaciones que afectan al locus de la inmunoglobulina de cadena pesada, con un peor pronóstico para el paciente (Debes-Marun, Dewald y Bryant, 2003). En un estudio multicéntrico realizado desde 1984 hasta 2013 se

encontró una mayor proporción de casos no-hiperdiploides en Ecuador (Leone *et al.*, 2013).

El desarrollo y evolución en el desarrollo de las tecnologías de última generación ha permitido avanzar en los estudios de perfiles de expresión génica. Aunque los resultados parecen ser prometedores, es necesario desarrollar métodos de diagnóstico más eficientes (Fumagalli, Desmedt, Ignatiadis y Loi, 2011). Una alternativa pudiera estar asociada a los análisis de ancestría genética de una población, que permiten analizar e identificar las regiones genómicas que muestran una relación de ancestría relacionada con la enfermedad. En estas regiones puede encontrarse el gen asociado a dicho padecimiento, con lo cual se pretende realizar este tipo de estudio para estimar las frecuencias alélicas de las poblaciones ancestrales. De esta forma se puede incrementar el alcance del análisis con vistas a la predicción y tratamiento de la patogenia (Tang, Coram, Wang, Zhu y Risch, 2006). Entre los genes asociados a la ancestría de una población determinada se encuentran los AIMs-INDELS (Pereira *et al.*, 2012). El presente trabajo pretende caracterizar de forma preliminar los niveles de ancestría en pacientes ecuatorianos afectados por MM.

1.2 Justificación

El presente trabajo experimental se propone estudiar la composición genética de un grupo de individuos ecuatorianos afectados con mieloma múltiple para evaluar los datos de frecuencias alélicas de la población afectada, mediante el análisis de una colección de 46 marcadores informativos de ancestría (AIMs-INDELS). Teniendo en cuenta que en el Ecuador existen frecuencias genéticas diferentes a otros grupos poblacionales podrían encontrarse niveles de ancestría que se relacionen con diferentes patologías. Por lo tanto, un estudio en este sentido implicaría la identificación ancestral y su relación con la incidencia del MM en individuos ecuatorianos. La implementación de estas técnicas y su correlación con los datos clínicos patológicos de los pacientes facilitará el diagnóstico y tratamiento de esta patología. Así mismo, el proyecto

se ajusta a las directrices del Plan Nacional del Buen Vivir (PNBV), en relación con la salud de los ciudadanos ecuatorianos; estableciendo un referente para investigaciones futuras, y creando un vínculo permanente con los centros de salud que apoyan este proyecto.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar los niveles de ancestría en pacientes ecuatorianos afectados con mieloma múltiple.

1.3.2 Objetivos específicos

- Estandarizar el sistema de PCR multiplex en mieloma múltiple para 46 marcadores de AIMS-INDELS.
- Establecer la relación ancestral de los pacientes ecuatorianos afectados con mieloma múltiple en el contexto de poblaciones de referencia.
- Relacionar la ancestría de los individuos con mieloma múltiple con los parámetros clínicos obtenidos del historial médico de los pacientes.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 El cáncer: generalidades, biología molecular y oncogénesis

2.1.1 El origen del cáncer

El cáncer se caracteriza por ser una patología degenerativa y de alto índice de mortalidad. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha logrado identificar alrededor de 931 agentes que se relacionan con el desarrollo de esta enfermedad (Partanen, Monge y Wesseling, 2009), mediante evaluaciones continuas a nivel mundial con el objetivo de mejorar el entendimiento de la enfermedad, su desarrollo y tratamiento. El origen del cáncer inicia con el crecimiento celular anormal debido a la propagación descontrolada de células oncogénicas, las que invaden tejidos próximos. Posteriormente pueden diseminarse hacia órganos aledaños, en un proceso conocido como metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

La fase de propagación de la enfermedad cuenta con diferentes estadios que culminan con un desarrollo de un tumor. En estas etapas se despliegan nuevas estructuras celulares minoritarias que se convierten en unidades dominantes semejantes a una célula madre cancerígena (Lodish *et al.*, 2005). Estas modificaciones ocasionan inestabilidad genética y heterogeneidad de las células cancerosas, evidenciadas en amplificaciones, pérdidas y reordenamientos cromosómicos. En estos estados el ADN se encuentra vulnerable a modificaciones en los mecanismos de control epigenético, alteraciones del ciclo de vida celular, disfunción en el proceso de reparación de los telómeros y la variación en la estructura de los mismos (Massagué, 2009). La mayoría de cánceres en humanos presenta una mutación en el gen supresor tumoral *p53*, lo cual permite a la célula con el gen mutado sobrevivir y propagarse. La diseminación del cáncer es mediada por la capacidad de propagación de las células tumorales. La adhesión celular disminuye debido a la pérdida de la proteína de anclaje conocida como E-cadherina (Hanahan y

Weinberg, 2011). Dicha pérdida se suscita por varios mecanismos como las mutaciones genéticas o el silenciamiento del gen codificante de la proteína *p53*. También puede ocurrir como parte de la transformación de las células cancerosas epiteliales a un tipo celular con mayor movilidad, proceso conocido como la transición epitelial-mesenquimal (EMT). Varias proteínas se encuentran involucradas en el cambio estructural de las células tumorales, entre las que se encuentran NEDD9 y RhoC, sobreexpresadas en células cancerígenas metastásicas (Muñoz, 1997).

Los implantes tumorales a distancia son conocidos como metástasis. En estos casos el tumor tiene naturaleza maligna, ya que las neoplasias benignas no metastatizan. Debido a la severidad característica de esta patología, las células cancerígenas son capaces de penetrar los vasos linfáticos, sanguíneos, y las cavidades corporales generando una alta posibilidad de propagación por el resto del organismo (Werner, Mills y Ram, 2014). El 99% de todos los tumores malignos pueden metastatizar, sin embargo, existen unas pocas excepciones como las neoplasias malignas de células gliales y los carcinomas de células basales de la piel (Werner, Mills y Ram, 2014).

La severidad y dimensiones de la neoplasia primaria son elementos asociados a una mayor posibilidad de inicio y propagación del proceso de metástasis (Pierce, 2006). La comparación entre la diferenciación, velocidad de crecimiento, invasión local y metástasis asociados a tumores malignos y benignos ha sido estudiada por Robbins y Contran (2010).

2.1.2 Bases moleculares del cáncer

El cáncer se inicia con un daño genético o mutación no letal que puede ser adquirida por acción de la radiación, de agentes ambientales, de sustancias químicas o por la herencia, lo que está asociado a una alteración del metabolismo celular (DeBerardinis, Lum, Hatzivassiliou y Thompson, 2008).

La formación del tumor se desencadena con la expansión clonal de una sola célula oncogénica precursora, donde las principales dianas afectadas se

dividen en cuatro clases de genes reguladores normales: (1) protooncogenes, (2) genes supresores tumorales, (3) genes reguladores de la apoptosis y (4) genes involucrados en la reparación del ADN. Las mutaciones en estos genes provocan una pérdida en la función genética conocida como haplo-insuficiencia (Werner, Mills y Ram, 2014).

En el 2012 estudios realizados por Díaz de la Guardia y colaboradores contribuyeron a esclarecer las bases moleculares del mieloma múltiple, planteando la importancia de genes que codifican para los telómeros y su asociación con una familia de genes vinculada con la apoptosis. Estos genes se sobreexpresaba en el mieloma múltiple. En el estudio se dilucidaron los mecanismos por los cuales las células plasmáticas tumorales tienen una tasa de supervivencia mayor que las células plasmáticas normales. Los investigadores llegaron a la conclusión de que las células del MM son capaces de mantener longitudes cortas de los telómeros sin exceder la longitud crítica mínima, permitiendo que las divisiones celulares continúen, y por lo tanto, contribuye a la expansión de las células del MM en la médula ósea.

La carcinogénesis es un proceso de acumulación de múltiples mutaciones seguido de una serie de cambios a nivel genético y fenotípico. La malignidad de esta patología es adquirida de forma gradual de modo que las células tumorales son sometidas a presiones de selección no inmunitaria e inmunitaria.

El primer paso del desarrollo y evolución tumoral inicia con la autosuficiencia en las señales de crecimiento. En esta etapa, la proliferación celular se activa por acción de los oncogenes. Posteriormente ocurre la insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento donde participan los inhibidores directos de las quinasas dependientes de ciclina (CdK) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Seguidamente, la evasión de la apoptosis torna o convierte al tumor resistente a la muerte celular programada (Laubenbacher *et al.*, 2010; Califano, 2014). Posteriormente, se activa el potencial replicativo ilimitado, permitiendo la proliferación indefinida de las células malignas. Más tarde, los tumores son inducidos a la angiogénesis mantenida, seguido de la invasión y metástasis

tumoral. Finalmente ocurren daños en los mecanismos de reparación del ADN causados por los carcinógenos, mutaciones de los protooncogenes, la inestabilidad genómica, entre otros procesos. (Sprouffske *et al.*, 2012; Robbins y Contran, 2010).

2.1.3 Protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumor

Los oncogenes están asociados al crecimiento de las células cancerosas, proceden de la activación de los protooncogenes y codifican productos denominados oncoproteínas. Estos polipéptidos actúan como transductores de señales, componentes del ciclo celular, factores de crecimiento y transcripcionales (Brendan, Juaristi y Aguirre, 2002). Las oncoproteínas codificadas por los oncogenes cumplen funciones muy semejantes a sus homólogas normales. A pesar de esto, las alteraciones transforman a los protooncogenes en oncogenes celulares activos ya que las oncoproteínas dotan de autosuficiencia de crecimiento a las células donde se originan (Meng, Zhong, Liu, Murray y Gonzalez-Angulo, 2012).

La actividad biológica del producto de los protooncogenes se produce en varios pasos, y se inicia con la intervención sobre los factores de crecimiento, que actúan sobre una célula vecina para incitar su expansión. La mayoría de las células oncogénicas presentan una capacidad especial en la síntesis de los factores de crecimiento lo que resulta en un ciclo autocrino (Hernández y Ríos, 1999).

Adicionalmente, algunos factores como los de la familia de proteínas denominadas Ras, producen una sobreexpresión de los genes del factor de crecimiento, lo que implica que la célula secrete la proteína TGF- α . Esta citoquina está asociada a la proliferación del fenotipo maligno mediante la generación de mutaciones espontáneas inducidas (Robbins y Contran, 2010).

Los genes supresores tumorales o también conocidos como antioncogenes tienen como función limitar la proliferación o inducir a la apoptosis. Algunos supresores tumorales se encuentran vinculados con la diferenciación celular,

conllevarlo a la célula a un estado diferenciado posreplicativo posmitótico, que las imposibilita realizar el proceso de replicación (Pierce, 2006).

Los productos proteicos de antiaoncogenes actúan en diferentes puntos de las rutas de señalización del control del ciclo celular y la apoptosis. Estas proteínas constituyen factores inhibidores del crecimiento celular, receptores de estos factores inhibidores o de hormonas limitantes del crecimiento celular, moléculas de transducción de señales, factores de transcripción y proteínas que disminuyen la velocidad del ciclo celular o desencadenan la apoptosis (Robbins y Contran, 2010).

2.2 Biología y patogenia del mieloma múltiple

2.2.1 Origen y características de las células mieloides y linfoides

El sistema inmunológico juega un papel de vital importancia en la protección del organismo mediante la generación de respuestas ante agentes patógenos. Esta respuesta puede ser humoral, en la que participan estructuras entre las que se pueden citar a los anticuerpos (Abbas, Lichtman y Pillai, 2011). Adicionalmente también puede ser una defensa mediada por células o sistemas celulares (Murphy, 2012). Estas células se pueden clasificar en dos grupos: (1) células mieloides, compuestas por células granulocíticas (eosinófilos, basófilos y neutrófilos), células dendríticas y macrófagos (2) células linfoides, entre las que se encuentran los linfocitos T y los linfocitos B (Arnaiz, Regueiro y López, 1995).

Uno de los elementos involucrados en la respuesta inmune ante un agente foráneo patógeno son los anticuerpos. Estas proteínas son las encargadas de la activación de las células mieloides y linfoides (Geha y Notarangelo, 2012).

Los anticuerpos son estructuras que presentan elevada especificidad y tienen una estructura común de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras idénticas no glicosiladas de 24 kDa nombradas con la letra L y conformadas por un dominio variable (VL) y uno constante (CL) y dos cadenas pesadas

idénticas de 55-70 kDa designadas con la letra H, formadas por un dominio variable (VH) y tres constantes (CH1, CH2 y CH3). Estas cadenas se mantienen unidas por puentes de disulfuro así como otras uniones de tipo no covalentes. Adicionalmente en su configuración estructural existe una región conocida como “bisagra” que proporciona gran flexibilidad a estas moléculas. Los fragmentos que conforman estas estructuras pueden ser obtenidos por la acción de la enzima papaína, con la que se obtienen los siguientes fragmentos: (1) Fragmento de unión al antígeno (Fab) con regiones de determinación de complementariedad y (2) los fragmentos cristalinos (Fc) responsables de las funciones efectoras (Abbas, Lichtman y Pillai, 2011).

Las moléculas de los anticuerpos pueden dividirse en distintas clases y subclases, atendiendo a las diferencias en la estructura de sus regiones C de la cadena pesada: α , δ , ϵ , γ y μ para cada una de las inmunoglobulinas IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. Las cadenas ligeras son la cadena lambda (λ) y la cadena kappa (κ) (Abbas, Lichtman y Pillai, 2011).

En el torrente sanguíneo predomina la clase IgG, mientras que en las secreciones (saliva, lágrimas, secreción bronquial, así como en el líquido cefalorraquídeo y mucosas) la IgA se encuentra en mayor proporción. Al considerar (1) el número, (2) la posición de los puentes disulfuros intracatenarios y (3) la secuencia aminoacídica de la región constante, las inmunoglobulinas se pueden agrupar en diferentes subclases. Las IgG humanas se subdividen en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, las IgA en las subclases IgA1 e IgA2, y la IgM en IgM1 e IgM2. El cambio de isotipo se basa en una recombinación del ADN, en donde se produce un intercambio de segmentos genéticos en la región constante y la región variable permanece sin cambios (Murphy, 2012; Abbas, Lichtman y Pillai, 2011).

Los linfocitos T (LT) vírgenes se encuentran en los órganos linfáticos secundarios, donde interactúan con el antígeno en un proceso que propicia su activación. Este evento genera la expansión clonal de linfocitos específicos de antígeno y la diferenciación de estas células en linfocitos efectoras y de

memoria. Por otra parte la activación de los linfocitos B (LB) se encuentra relacionada con la naturaleza del antígeno presentado por una APC (célula presentadora de antígeno) (Abbas, Lichtman y Pillai, 2011).

El origen del mieloma múltiple se encuentra vinculado con la proliferación incontrolada de células B plasmáticas anormales procedentes de la médula ósea (Conte *et al.*, 2007). Este tipo de cáncer se caracteriza por la alteración en la secreción de inmunoglobulinas, principalmente de las clases IgG, IgA, IgD, IgM e IgE. La determinación genética de estas modificaciones está basada en la detección de alteraciones cromosómicas en regiones específicas (Conte, Braggio, Figueroa y Fonseca, 2009).

2.2.2 Biología del mieloma múltiple

La enfermedad de Kahler o mieloma múltiple (MM) es una patología perteneciente a las neoplasias de células B cuya fase premaligna puede desarrollarse a partir de la gammopatía monoclonal de significado clínico incierto (GMSI), que puede progresar a mieloma quiescente y finalmente a mieloma sintomático o activo (Conte, Braggio, Figueroa y Fonseca, 2009; Leone *et al.*, 2008). Esta enfermedad está caracterizada por la proliferación y expansión de células plasmáticas malignas dentro de la médula ósea (Kyle y Rajkumar, 2009). La modificación de las células plasmáticas en una neoplasia maligna está asociada a: diversas mutaciones genéticas, al estilo de vida, a la disfunción inmune, a exposiciones ambientales, a radiaciones ionizantes, exposición a insecticidas, sustancias químicas y pesticidas (Fonseca *et al.*, 2004).

El MM al ser un tumor maligno de células plasmáticas, se caracteriza por presentar mutaciones en las regiones variables de las cadenas ligeras (L) y pesadas (H) de las inmunoglobulinas. De tal forma en las células del tumor se presenta un cambio de isotipo en la cadena L y se visualiza un incremento de IgG e IgA. Por otra parte, las frecuencias de IgD e IgE son muy bajas. Sin embargo, la expresión de IgM es de un 1% y solo en el 15% de los casos se presenta en las cadenas livianas (Menoni y Da Silva, 2010). En Ecuador se ha

evidenciado que las inmunoglobulinas presentes en los pacientes con MM son de tipo IgG, IgA e IgM como las más frecuentes seguidas del tipo IgE y las modificaciones en las cadenas ligeras (Leone *et al.*, 2013).

Uno de los cambios genéticos más notorios asociados al MM son las translocaciones cromosómicas primarias desarrolladas de forma precoz en el locus de IgH 14 (q32.33) que más comúnmente se yuxtapone a las modificaciones de los cromosomas en el que se encuentra la familia de oncogenes MAF [t(14;16) (q32.33; 23)] y el fragmento génico MMSET, localizado en el cromosoma 4p16.3 o pueden presentarse en uno de los *loci* de IgL. Dichas translocaciones suelen ser causadas por tres procesos: (1) la recombinación VDJ, (2) la hipermutación somática y (3) cambio de isotipo de IgH (Menoni y Da Silva, 2010). Estas modificaciones en el patrimonio genético de las células resultan en una desregulación del proceso o un aumento de la expresión del oncogén localizado cerca de uno o más segmentos reguladores de los genes de la inmunoglobulina (Palumbo y Anderson, 2011; Conte, Braggio, Figueroa y Fonseca, 2009). El aumento de alteraciones en IgH e IgL, se caracteriza por presentar lesiones genéticas tempranas que puede aparecer desde la condición de GMSI, las que pueden evolucionar a diferentes estadios de malignidad como: el mieloma múltiple asintomático (MMA), el mieloma múltiple sintomático (MMS) y la leucemia de células plasmáticas (LCP) (Fonseca *et al.*, 2004).

En varios casos de MM se han observado alteraciones estructurales, tales como la modificación en el locus 14q32, que aparece con mayor frecuencia y afecta al gen de la cadena pesada de la IgH. Esta translocación puede yuxtaponerse a cualquier cromosoma siendo las más frecuentes: t(11;14)(q13;q32), t(6;14)(p21.1;q32.3), t(4;14)(p16.3;q32) y t(14;16)(q32;q23) (Chesi y Bergsagel, 2013). La t(11;14)(q13;q32), afecta la regulación de la ciclina D1, la t(6;14)(p21.1;q32.3) está asociada con la actividad de la ciclina D3, la t(4;14)(p16.3;q32) provoca la desregulación de FGFR3 y por último la t(14;16)(q32;q23) afecta a la ruta c-maf. Sin embargo, también se han evidenciado translocaciones secundarias que se caracterizan por ser

anomalías genéticas y otras mutaciones en el genoma que influyen en la expresión de microRNAs y afectan la metilación de los genes (Prideaux, O'brien y Chevassut, 2014).

En la mayoría de los afectados se ha identificado la existencia de múltiples trisomías, comúnmente localizadas en los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21. Se ha reportado que un elemento clave para el desarrollo del MM es la sobreexpresión de ciclina D (Walker *et al.*, 2006; Conte, Braggio, Figueroa y Fonseca, 2009).

La progresión de la enfermedad implica una sucesión de eventos como son: las mutaciones, deleciones o translocaciones que generan una inestabilidad genética en las células. Entre estas modificaciones se pueden citar como las más importantes las monosomias y las deleciones del cromosoma 13 y 17, además de amplificaciones del cromosoma 1. Sin embargo, otros acontecimientos como las translocaciones secundarias comúnmente ubicadas en la región 8q24 del gen MYC también se encuentran vinculadas, al igual que las mutaciones de p53, FGFR3, NRAS y KRAS, al desarrollo de esta patología (Ortiz, 2011; Conte *et al.*, 2007).

2.2.3 Clasificación cromosómica

Los estudios citogenéticos y la técnica de hibridación genómica como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) han permitido clasificar al MM en dos grupos. Esta clasificación se realiza según las alteraciones a nivel numérico y estructural de los cromosomas (Medina y Martínez, 2009). Aunque, la implementación de la tecnología de *arrays* ha permitido plantear una nueva clasificación de los individuos afectados con MM, en dos grandes grupos (hiperdiploides y no hiperdiploides), que se han asociado a pronósticos diferentes. Además la tecnología de los *arrays* también ha permitido la identificación de una serie de genes asociados a la patogénesis de la enfermedad (Walker *et al.*, 2006). La expresión diferencial de distintos genes en individuos afectados por GMSI y MM en comparación con los controles

sanos es uno de los elementos fundamentales asociados a la prognosis y evolución de esta enfermedad.

El grupo hiperdiploide está conformado por los cariotipos hiperdiploides de ganancia cromosómica. Las modificaciones más frecuentes son las trisomías en los cromosomas impares 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21 con una menor alteración estructural (Zhan *et al.*, 2006). Los individuos que conforman este grupo presentan mejor pronóstico en relación a la progresión de la enfermedad.

El segundo grupo está constituido por los cariotipos no hiperdiploides. En este grupo pueden observarse; reestructuraciones cromosómicas, variables hipodiploides, pseudodiploides, tetraploides y pérdida en los cromosomas 13, 14, 16, 18. Los individuos que componen este grupo tienen un pronóstico menos favorable a nivel clínico y diagnóstico (Kenneth, 2011). Este grupo se ve afectado por la presencia de translocaciones cromosómicas en el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH), localizado en la posición 14q32. Sin embargo, uno de los genes de las cadenas livianas puede translocarse con diferentes oncogenes en la zona lambda ubicada en la localización 22q11 o en la región kappa ubicada en 2p12 (Smadja *et al.*, 2001).

Ambos grupos presentan dos vías distintas del desarrollo del mieloma múltiple, diferenciándose por los genes participantes, las anomalías, su frecuencia y las características clínicas (Fantl *et al.*, 2010).

Existen otras alteraciones vinculadas con el desarrollo y proliferación de esta patogenia en un 45% de los casos. Entre estas alteraciones las más importantes son las alteraciones en la estructura del cromosoma 1, sobresaliendo la pérdida de 1p o la ganancia de 1q (Leone *et al.*, 2008). Entre el 8 y 10% de estas modificaciones corresponden a las deleciones en la región 17p13. Por otra parte, la existencia de un cariotipo complejo como el que presenta más de tres alteraciones asociadas al cromosoma 13, generan un deterioro clínico (Chesi y Bergsagel, 2011).

El cromosoma 16q presenta algunos elementos estrechamente vinculados al desarrollo y progresión del MM. Por ejemplo se han identificado 60 genes localizados en este cromosoma los cuales son subexpresados en los pacientes con esta patología. Entre los candidatos a genes supresores de tumor CYLD y WWOX, que han sido identificados con la patogénesis en el MM (Walker *et al.*, 2006). Los pacientes que presentan delección del cromosoma 16q presentan un peor pronóstico para esta enfermedad. (Jenner *et al.*, 2007).

También se ha identificado un conjunto de genes en los que ocurre delección homocigótica (Dickens *et al.*, 2010). Este tipo de modificación se ha identificado mediante un algoritmo basado en dChip, con el que se han detectado dichas modificaciones de este tipo (de al menos 100 kb) en 114 pacientes afectados con mieloma múltiple. De un total de 783 genes identificados, 170 presentaron una disminución de sus niveles de expresión, lo que representa verdaderas delecciones homocigóticas. Estas alteraciones del material genético se han encontrado fundamentalmente en los cromosomas 1p, 6q, 8p, 12p, 13q, 14q, 16q, 20p, y 22. También se han identificado en el cromosoma 11, donde no se han reportado delecciones por pérdida de heterocigocidad. Uno de los principales sitios donde se ha identificado este tipo de delección (homocigótica) ha sido en el cromosoma 13 (48% de los pacientes). Por lo tanto la identificación de los genes diana de delecciones homocigóticas puede ser una herramienta para la evaluación de la prognosis y del tratamiento de esta enfermedad.

De acuerdo con las alteraciones genómicas asociadas al MM se pueden encontrar tres grupos de riesgo: (1) bajo, (2) intermedio y (3) alto. A cada uno de estos grupos se asocian aproximadamente el 65%, 15% y 20% de los pacientes, respectivamente (Fantl *et al.*, 2010).

2.2.4 Etapas del mieloma múltiple

La estadificación del mieloma múltiple se realiza tras confirmar el diagnóstico y permite efectuar un pronóstico adecuado así como implementar un tratamiento más efectivo para el individuo afectado. En 1975, Durie y Salmon

(1975) elaboraron el primer sistema de estratificación de individuos afectados por MM. Este sistema se fundamenta en cuatro factores:

(1) La cantidad de inmunoglobulina monoclonal anormal presente en la orina o en la sangre, donde las grandes cantidades constituyen un indicativo de la existencia de un gran número de células plasmáticas oncogénicas rojas. (2) La cantidad de calcio en la sangre, dado que niveles de calcio muy elevados pueden estar asociados con un daño óseo avanzado, el cual es uno de los signos característicos del MM. (3) La gravedad del daño en los huesos. (4) La cantidad de hemoglobina presente en la sangre, los bajos niveles significan que el individuo se encuentra anémico y esta condición puede estar relacionada con un abundante almacenamiento de células plasmáticas malignas en la médula ósea que impide la suficiente producción de glóbulos rojos (Durie y Salmon, 1975).

Otra estrategia para la estadificación de esta enfermedad fue elaborada por Greipp y colaboradores en el año 2005, desarrollando el “Sistema de Estratificación Internacional” (ISS) que divide al mieloma en tres estadios basados en los niveles de beta-2-microglobulina sérica (B2M) y albúmina sérica (Greipp *et al.*, 2005). Sin embargo, en la actualidad, debido a algunas falencias observadas en los sistemas de estratificación antes mencionados se ha diseñado un nuevo sistema, el que se denomina “*Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy*” (mSMART). Este consiste en un algoritmo terapéutico que clasifica a los pacientes por grupos de riesgo según la alteración genética. Dicha técnica se fundamenta en tres ensayos: (1) el resultado de la proliferación de células plasmáticas, (2) el análisis cromosómico convencional y (3) la técnica de FISH, que generan un mejor enfoque a la hora de valorar el tratamiento a emplearse, asegurando de tal forma la implementación de una terapia efectiva y que minimice de los efectos tóxicos para el paciente (Mikhael *et al.*, 2013).

2.2.5 Factores de riesgo

El mieloma múltiple es un trastorno del cual actualmente se desconoce la causa principal de su etiología. Al estar relacionado con otras patologías, puede presentar varios factores que incrementen la posibilidad de que un individuo desarrolle este tipo de cáncer. Entre estos factores se encuentran: la edad, el estilo de vida, el grupo étnico, el sexo, la genética familiar, la exposición a genotóxicos y la vinculación con otras enfermedades (Kelley, 1992).

Las personas con edades de 50 años en adelante, presentan una mayor predisposición para desarrollar mieloma múltiple. Varios de los estudios realizados en función de la estratificación por edad han demostrado que solo el 1% de casos diagnosticados son menores de 35 años. La probabilidad incrementa según el grupo étnico y el sexo, evidenciándose mayor afección en hombres que en mujeres. La población negra está dentro de los individuos que presentan mayor predisposición para este padecimiento en comparación con otros grupos étnicos. Asimismo, la relación del desarrollo del mieloma múltiple con otras enfermedades como la diabetes y el VIH facilitan el desencadenamiento de esta patología (Collins, 2010).

Por otro lado, la probabilidad relacionada con la genética familiar es cuatro veces mayor para aquellos individuos que hayan tenido algún pariente cercano afectado por esta patología. De igual manera, la exposición a genotóxicos empleados en el área laboral tanto agrícola como industrial predispone al individuo a ser susceptible a este tipo de cáncer (Calvo-Villas *et al.*, 2009). En el caso de la población ecuatoriana este es un factor de riesgo importante al presentar una exposición repetida a sustancias químicas como los pesticidas, el benceno y otros aerosoles empleados mayoritariamente en la agricultura, se ha encontrado que el 14% de los pacientes ecuatorianos con mieloma múltiple se dedicaban a la agricultura (Leone *et al.*, 2013)

2.3 Características clínicas y diagnósticas del mieloma múltiple

2.3.1 Manifestaciones clínicas

El mieloma múltiple constituye una patología que en sus primeras etapas puede ser asintomático: solo un tercio de los individuos afectados son diagnosticados antes de que aparezcan los síntomas. Por tal razón es necesario realizar pruebas y exámenes de rutina que permitan el diagnóstico temprano de la enfermedad (Kyle *et al.*, 2003).

Algunos de los indicios que comprenden el cuadro clínico de los pacientes son la presencia de dolores óseos ubicados usualmente en el tórax y en la espalda. Sin embargo, también pueden presentar dolor en el esternón, extremidades, costillas, cráneo, entre otros (Estrada, 2012). Estos signos clínicos están asociados a la alteración ósea causada por la acción de células mielomatosas, las cuales son activadas por un estímulo de las células del estroma, que a su vez estimulan a los osteoclastos a inducir un desgaste de la estructura esquelética de los huesos. Estas modificaciones además pueden generar fracturas espontáneas u osteoporosis (Zepeda y Leyva., 2007).

Otro de los signos comunes del MM son los bajos recuentos sanguíneos. Los elementos más afectados son los glóbulos blancos, plaquetas y glóbulos rojos. Este estado también es conocido como mielosupresión. La insuficiencia de glóbulos rojos en la sangre conocida como anemia, ocasiona mareos, debilidad, fatiga al momento de realizar actividad física y problemas al respirar. La disminución de glóbulos blancos (o leucopenias) perjudica la resistencia a infecciones, lo que está estrechamente vinculado a la propensión al desarrollo de neumonía. Por otra parte, si se origina una condición de trombocitopenia (descenso en el número de plaquetas presentes en el torrente sanguíneo), se produce un aumento de la probabilidad de ocurrencia de sangrados profusos (Collins, 2010).

La hipercalcemia evidenciada en aproximadamente el 25% de los pacientes afectados es otra de las manifestaciones del mieloma múltiple. Este aumento

de iones de calcio está originado por la incitación de la actividad osteolítica por parte de las células oncogénicas. Este desequilibrio de los niveles de calcio puede causar deshidratación, confusión, somnolencia y debilidad (Chesi y Bergsagel, 2013).

El incremento de la producción de la inmunoglobulina monoclonal del MM (o proteína M) puede generar daño en los riñones, el cual se evidencia mediante un análisis de sangre u orina. Las alteraciones funcionales en el riñón conllevan a un deterioro en la capacidad de excreción del exceso de sales, líquidos y residuos corporales y síntomas como la picazón, hinchazón de piernas, debilidad y dificultad para respirar (Fantl, 2003; Manciola y Stemberg, 2013). Por otro lado, la alta concentración de proteína M en la sangre provoca que esta se vuelva más densa, lo que se conoce como el síndrome de hiperviscosidad. También, puede suscitarse una crioglobulinemia como resultado de la solidificación de la IgM monoclonal, que genera lesiones en la piel, dolor en articulaciones y problemas renales (García-Sanz, Mateos y San Miguel, 2007).

Algunos pacientes resultan de la progresión del GMSI (1% a nivel mundial) (Therneau *et al.*, 2012). Sin embargo, en Ecuador ninguno de los pacientes analizados en el período 1984-2012 presentó una incidencia de esta gammapatía. Este resultado se encuentra en correspondencia con la ancestría mestiza de los pacientes del Ecuador, la que es muy similar a la característica de la población mexicana (Ruiz y Gómez, 2004). En los estudios realizados por estos autores se determinó la existencia de una baja incidencia de GMSI en la población mestiza que fue objeto de este estudio (Leone *et al.*, 2013).

2.3.2 Exámenes de laboratorio

2.3.2.1 Detección de la proteína M

La electroforesis de proteínas es la técnica empleada para determinar la presencia de anticuerpos, paraproteína o proteína M en diferentes fluidos corporales (sangre, orina) de pacientes afectados por mieloma múltiple

(Stewart y Fonseca, 2005). Este método se fundamenta en la separación de los analitos mediante la exposición a un campo eléctrico. Los principios que se emplean en esta técnica son: el peso y carga. Dicha metodología comprende dos tipos de análisis: (1) la electroforesis de proteínas séricas (SPEP) y (2) la electroforesis de proteínas urinarias (UPEP), (albúmina, Alfa 1, Alfa 2, Beta y Gamma), donde la proteína monoclonal migrará como un pico estrecho (George y Sadovsky, 1999; Menoni y Da Silva, 2010).

Otra de las estrategias empleadas para la detección de la proteína M es la inmunofijación. Esta metodología se basa en el estudio cualitativo de las inmunoglobulinas. Se realiza tras el proceso de separación mediante electroforesis de las proteínas del fluido analizado. Esta técnica permite determinar la clase de inmunoglobulina que se encuentra en exceso y su carácter monoclonal, mediante el uso de antígenos específicos que revelan por una reacción colorimétrica la formación del complejo (Molinas, 2009).

2.3.2.2 Ensayo de cadenas ligeras libres en suero (Freelite®)

Este inmunoensayo específico usa como reactivo a los anticuerpos policlonales que reaccionan con los epítomos de la cadena ligera que se encuentran expuestos cuando esta cadena no se encuentra unida a la cadena pesada (Bradwell *et al.*, 2001). La reacción puede ser evidenciada mediante determinaciones turbidimétricas o nefelométricas. Esta técnica permite la cuantificación de las estructuras monoméricas y diméricas con un límite de detección inferior a 1mg/L. Además, facilita el cálculo de la relación κ/λ cuya variación distingue monoclonalidad y presenta un rol importante en el diagnóstico de discrasias de células B (Katzmann *et al.*, 2002).

La combinación de esta técnica con la electroforesis permite la identificación de las proteínas de Bence-Jones, cuya concentración se ve regulada según la secreción de la masa tumoral o de la función renal (Bradwell *et al.*, 2001). La prueba de Bence-Jones ayuda a evaluar en qué estadio se encuentra la enfermedad, además de su progresión y facilita el diagnóstico de los individuos

afectados por mieloma múltiple no secretor (MMNS) y amiloidosis (Campos, Barbosa y Martin, 2012).

2.3.2.3 Pruebas genéticas

Las metodologías más empleadas en la determinación de variaciones estructurales y numéricas de los cromosomas en el mieloma múltiple son: (1) la citogenética convencional (2) la hibridación genómica comparada (CGH) (3) la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y (4) el análisis molecular del *array*.

La citogenética convencional se basa en la tinción de los cromosomas de forma uniforme, lo que hace posible diferenciar las parejas cromosomales según su tamaño y parecido morfológico. De esta técnica se deriva otra metodología conocida como tinción de bandas G, la cual nos permite identificar las bandas C, Ag-NOR (*Nucleolar organiser regions* que son afines por los iones argénticos), alteraciones, metafases y cariotipos (Martínez-Fernández, Sánchez-Izquierdo y Martínez-Frías, 2010; Hastings, Cavani, Bricarelli, Patsalis y Kristoffersson, 2007). Mientras que, la CGH se caracteriza por la realización de una confrontación entre un control sano y la muestra de ADN del paciente para lograr determinar ya sea pérdidas o ganancias en el material genético. Esta técnica emplea como marcador un fluoróforo de un color que marcará al ADN y otro fluoróforo de diferente color que estará con el ADN control (Cigudosa *et al.*, 1998; Avet-Loiseau *et al.*, 1997; Gutiérrez *et al.*, 2001).

Por otra parte el método FISH emplea sondas fluorescentes especializadas que se unen a regiones específicas de los cromosomas, en donde se pueden localizar cambios cromosómicos como deleciones o translocaciones (Yuregir *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2007). El principio de funcionamiento de esta técnica radica en la hibridación de la sonda con la región de interés en el contexto de los cromosomas de las muestras provenientes de pacientes. Si hay hibridación, se emitirá una señal fluorescente para la detección de las anomalías de interés (Cunningham, 2011). Finalmente, los análisis moleculares de *arrays* nos permiten determinar los genes activados cuya expresión facilita la distinción en

el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad (Walker *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2010).

2.4 Estudio de la estructura de poblaciones humanas

2.4.1 Estructura genética

Los patrones globales de la diversidad genética humana actual se originaron por la migración de las poblaciones ancestrales africanas, las que se desplazaron desde ese continente, alrededor de 100 mil años atrás (Campbell y Tishkoff, 2008). El resto de las poblaciones del mundo son de procedencia no africana, distribuidas en los continentes asiático, oceánico, antártico, europeo y americano. Estos individuos en su gran mayoría tienen un origen ancestral proveniente de una mezcla entre nativo americano, afrodescendientes, caucásico e indígena (Jorde *et al.*, 2001).

La relación entre los valores de heterocigocidad y la distancia geográfica, demuestran que los valores más altos se dan en África y van disminuyendo en América, Asia y Oceanía (Ramachandran *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Mediante estudios de estructura genética humana realizados a nivel mundial por Rosenberg y colaboradores (2002), se ha logrado descubrir una conexión génica entre el patrón de frecuencias alélicas y la afiliación geográfica.

La estructura genética de las poblaciones latinoamericanas se caracteriza por presentar una heterogeneidad en sus habitantes, debido a la gran diversidad étnica generada por la mezcla europea (caucásica) con la indígena y africana. Esta mezcla está asociada a una pérdida sustancial de la población nativa y a la desaparición de muchos grupos indígenas e inserción de otras etnias como las africanas (Mulligan *et al.*, 2004). De tal modo, las poblaciones latinoamericanas están conformadas fundamentalmente por tres orígenes ancestrales: africano, europeo o caucásico y nativo americano (Salzano y Bortolini, 2002).

Como en varios países de América, la historia ancestral del Ecuador, se inicia en la época colonial con la mezcla entre los españoles con predominancia caucásica y los indígenas, lo cual da como resultado un grupo étnico intermedio conocido como mestizos (Ayala, 2003). Posteriormente se introdujo una población nativa del continente africano para la realización de trabajos forzados, en sustitución de la población nativa americana (Li *et al.*, 2008).

2.4.2 Marcadores uniparentales

Estos marcadores genéticos conformados por el ADN mitocondrial y del cromosoma Y, tienen la función de reconocer la ancestría evolutiva mediante linajes paternos y maternos (Geduld, 2010; Martínez, 2011). La información genética contenida en el cromosoma Y, es una herramienta muy útil para la evaluación humana y el estudio hereditario desde una visión de la herencia de padre a hijo (Geduld, 2010). Por otra parte el ADN mitocondrial se fundamenta en definir la relación ancestral de la madre a sus descendientes (Martínez, 2011).

En la población mestiza las mayores frecuencias del cromosoma Y son pertenecientes a una herencia ancestral europea en comparación con el ADN mitocondrial. Contrariamente las poblaciones amerindias y africanas, presentan una mayor frecuencia alélica en el ADN mitocondrial respecto al cromosoma Y (Merriwether, 2003). Sin embargo, pese a la gran utilidad de este tipo de marcadores solo generan una perspectiva específica para la construcción de la historia genética poblacional.

En el Ecuador, los estudios realizados por Paz y Miño y colaboradores (2008) determinaron que la ancestría analizada en el ADN mitocondrial de la población presenta una frecuencia de 0,57 para individuos indoeuropeos (mestizos), 0,32 para indígenas (otavalo), 0,06 para afroecuatorianos y 0,05 en cholos. Por otro lado, las investigaciones realizadas por Gaviria y colaboradores (2013), establecieron que los *short tandem repeat* (STR) del cromosoma Y están compuestos principalmente por una población mestiza (60%), la cual a su vez, se integra de un origen ancestral europeo (70%), amerindios (28%) y

afrodescendientes (2%). Estos resultados demuestran que la población ecuatoriana es resultado de una mezcla ancestral.

2.4.3 Marcadores autosómicos

Se caracterizan por facilitar el entendimiento de la estructura genética de las poblaciones mediante la información de la ancestría a nivel demográfico así como la relación con los genes defectuosos causantes de una enfermedad. Además propicia una mejor visualización de los procesos de adaptación (Jarve, 2012).

Los estudios de ancestría conjuntamente con los modelos de migración, y análisis de poblaciones aisladas son fuentes de información en función de las frecuencias asociadas a endogamia. El análisis generalmente implica la elección de un grupo de marcadores que se logren adaptar eficientemente al cálculo poblacional, donde se consideran varios parámetros mediante comparaciones con ancestros evolutivos. Este análisis permite la obtención de sub-estructuras dentro de poblaciones aparentemente homogéneas desde el punto de vista étnico (Campbell y Tishkoff, 2008; DiGiorgio *et al.*, 2009; Majumder, 2010; Kosoy *et al.*, 2009; Fagundes *et al.*, 2008; Hellenthal, Auton y Falush, 2008; Plagnol y Wall, 2006; Stefflova *et al.*, 2011; Drineas, Lewis y Paschou, 2010).

Otro estudio en el que se relacionan elementos ancestrales con la incidencia de una enfermedad determinada implicó la asociación entre los grados de intolerancia a la lactosa y el porcentaje de ancestría en la población ecuatoriana (Cabrera *et al.*, 2016). En este estudio se observó que la prevalencia de la intolerancia a la lactosa (LP), es predominante en el alelo polimórfico T-13910, el que está asociado a la sobreexpresión del gen de la lactosa (LCT). En la población ecuatoriana, la LP fue un rasgo introducido por la migración europea y la herencia generada por la mezcla durante la colonización de América del Sur, la que se caracterizó por la aparición de una población de mestizos conformada por elementos ancestrales provenientes de Europa y América (Ayala, 2003).

2.5 Marcadores de ADN empleados en la evaluación de la diversidad genética

2.5.1 Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs)

Los SNPs son variaciones producidas por un cambio de nucleótidos, cuya frecuencia es de 600-1.000pb con una tasa de ocurrencia de 90% entre los polimorfismos encontrados en el genoma humano (Guerra y Yu, 2005). Su localización y diversidad abarca grandes longitudes de las regiones promotoras, las que incluyen exones e intrones. Las áreas no codificantes, son en las que se encuentran en mayor cantidad, en relación a las zonas codificantes. Por este motivo aproximadamente dos tercios de los SNPs son sustituciones de tipo C/T (Kwok y Chen, 2003; Jehan y Lakhanpaul, 2006).

El uso de esta técnica es muy favorable como una herramienta de genotipado, para estudios de mapeo de alta densidad e identificación de caracteres complejos ligados a funciones genéticas (Wakeley *et al.*, 2001; Twyman, 2005; Kwok, 2001).

2.5.2 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

Son un tipo de marcadores moleculares basados en la digestión con enzimas del ADN genómico y la amplificación de los fragmentos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica combina la resolución, especificidad y el poder de muestreo de la digestión enzimática, sin necesidad de tener información previa del genoma analizar (Vos *et al.*, 1995).

La aplicabilidad de esta metodología se fundamenta en el ámbito de la genética poblacional. Esto es debido a la alta capacidad de encontrar secuencias funcionales y la identificación de diferencias morfológicas que se encuentran ligadas a los rasgos filogenéticos (Althoff, Gitzendanner y Segraves 2007).

2.5.3 Marcadores informativos de ancestría (AIMs)

Los AIMs son loci empleados para potencializar la diferencia entre frecuencias alélicas entre dos poblaciones ancestrales, con el objetivo de hallar los grupos nativos puros, mixtos o el grado de mestizaje en una población determinada. El AIMs idóneo es monomórfico o aquel que no se encuentre en una población pero es abundante en la otra. La selección de varias colecciones de marcadores que cumplan esta función es de suma importancia para lograr discriminar las poblaciones ancestrales (Enoch *et al.*, 2006; Campbell y Tishkoff, 2008; Tian *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2008).

Un ejemplo de ello son los marcadores AIMs-INDELS, al ser una herramienta potente para el análisis de varios polimorfismos dentro del genoma humano, por su baja tasa de mutación, gran versatilidad y fácil identificación. Su utilidad principal radica en la determinación del grado de mezcla o subestructuración mediante la técnica estadística de asociación estructurada. Se relaciona la población de origen ancestral desconocida con los grupos étnicos, donde los marcadores empleados son capaces de distinguir por segregación las frecuencias alélicas (Pereira *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2009).

2.5.4 PCR Múltiplex

El principio de esta técnica se basa en la amplificación de un alto número de secuencias consecutivas con el uso de múltiples pares de cebadores, los que deben tener una temperatura de hibridación similar. La técnica emplea tampones a los cuales se les ha adicionado la polimerasa Taq, que permite disminuir la competencia entre los amplicones. Este análisis implica la amplificación de forma específica de regiones que están delimitadas por las secuencias complementarias de los cebadores. Esto permite la identificación de los genes en el contexto del material genético analizado de forma específica en función de la complementariedad del ADN con los cebadores y de la especificidad de la polimerasa empleada en el análisis (Markoulatus, Siafakas y Moncany, 2002).

El funcionamiento de esta técnica consiste en la amplificación de dos o más regiones en una misma área genómica con el fin de optimizar recursos, tiempo y disminuir los errores de repetición (Xu *et al.*, 2012). En Ecuador se ha empleado para el estudio de la Distrofia Muscular de Duchenne amplificando gran cantidad de exones en una sola reacción de PCR (Paz y Miño *et al.*, 1999).

2.5.5 Ancestría

La ancestría es un parámetro de estudio que identifica, como su nombre lo indica, el origen ancestral de las poblaciones mediante la frecuencia alélica de los individuos y el factor ancestral. Los grupos étnicos provenientes de la mezcla, generan fenotipos que pueden tener una mayor predisposición para desarrollar una enfermedad determinada (Enoch *et al.*, 2006).

Es por ello que es de suma importancia el estudio de los factores genéticos, los errores o variaciones que se encuentran ligadas a un locus y el enmascaramiento de las asociaciones entre los genes. En base a estos elementos se puede incrementar la eficacia del análisis, mejorar en el diagnóstico, pronóstico y el tratamiento de una enfermedad dada (Väli *et al.*, 2008).

El Ecuador al ser un país pluricultural presenta una gran variedad étnica. El último censo realizado a la población ecuatoriana en el año 2010 demostró que el 7,2% de la población es de procedencia afrodescendiente, el 7% constituye al grupo étnico indígena, el 7,4% a los montubios, 6,1% a blancos, 0,4% sin pertenencia étnica específica y la mayor parte poblacional se encuentra representada por mestizos ocupando un 71,9% de la población ecuatoriana. El mestizaje está asociado fundamentalmente a los ancestros europeos y amerindios (López, 2010).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Recolección de muestras

Se recolectaron 64 muestras (60 de médula ósea y 4 de sangre periférica) de 60 pacientes ecuatorianos afectados por mieloma múltiple del Hospital Oncológico Solón Espinosa Ayala Núcleo de Quito (SOLCA) y del Hospital Carlos Andrade Marín de Quito (HCAM). Los individuos se encontraban en un rango de edad superior a los 32 años.

3.2 Extracción de ADN

3.2.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica

El ADN genómico se obtuvo empleando el kit PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen, Alemania). Se colocó 200 µl de sangre periférica conservada con EDTA en un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL en un bloque térmico Accublock™ *Digital Dry Bath* (Labnet, USA) a una temperatura de 55°C. Seguidamente, se añadieron 20 µL de proteinasa K (Invitrogen, Alemania) y se mezcló mediante agitación en un vórtex (Fisher Scientific, USA) por 1 minuto. Posteriormente, se agregaron 20 µL de ARNasa a la mezcla y se agitó en un vórtex (Fisher Scientific, USA). La mezcla obtenida se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente (T=23°C). Luego se adicionaron 200 µL de buffer de lisis celular del kit (*Genomic Lysis Binding Buffer*) y 200 µL de etanol al 95% y se agitó hasta conseguir una muestra homogénea.

El proceso de purificación se realizó en una columna PureLink™ la que luego del proceso de carga de la muestra fue lavada con 500 µL de cada uno de los tampones (*Wash Buffer 1* y *Wash Buffer 2*). En cada caso la fase móvil se hizo pasar a través de la columna en un proceso facilitado por centrifugación a 10.000 g durante 1 minuto (Rotofix 32 A-Hettich, Alemania). Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad (40 RPM/RCF x 100) por 3 minutos y se eliminó el tubo de colección y la columna de purificación fue trasladada a un tubo

ependor de 1,5 mL estéril. Finalmente, se añadieron 50 µL de buffer de elución (PureLink™) a la columna, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente (23°C), se centrifugó a máxima velocidad (40 RPM/RCF x 100) por 3 minutos y se desechó la columna. El tubo que contenía el ADN genómico se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.2.2 Extracción de ADN a partir de médula ósea

La extracción de ADN genómico se realizó con el sistema High Pure PCR Product Purification Kit (Invitrogen, Alemania). La muestra conservada en EDTA, fue centrifugada a 14.500 rpm (Rotofix 32 A-Hettich, Alemania) por 5 minutos. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y al tubo con el pellet se le realizaron lavados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Mientras que al tubo que contenía el botón celular, se le adicionaron 600 µL de PBS al 1X. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 14.500 rpm (Rotofix 32 A-Hettich, Alemania) por 5 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se repitió tres veces el procedimiento con PBS 1X, donde el material insoluble se encontraba resuspendido. Al concluir con los lavados, se prosiguió con el mismo proceso de extracción de ADN empleando el kit PureLink® Genomic DNA Kits de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Invitrogen, Alemania).

3.3 Cuantificación de ADN

La cantidad de ADN presente en la muestra se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm (Nanodrop™ 2000, Thermo Scientific, USA). El grado de pureza de las preparaciones de ADN fue expresado en función de la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} .

3.4 Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de cada uno de los genes asociados con ancestría (Pereira *et al.*, 2012) fue realizada en un volumen final de 5 µL, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante con modificaciones mínimas (kit Multiplex PCR, QUIAGEN, Alemania). Se añadieron 0,5 µL de cada uno de los primers

AIMs-InDels (Pereira *et al.*, 2012), y adicionalmente 1 μ L del cebador 196, 0,5 μ L del cebador 659, 2,5 μ L de Quiagen multiplex PCR master mix y 0,5 μ L de ADN a una concentración de 4 ng/ μ L.

El programa de PCR (Agilent, USA) se diseñó de acuerdo al procedimiento descrito por Pereira (Pereira *et al.*, 2012). La temperatura inicial se mantuvo en 95°C por 15 minutos para la activación de la enzima (hot start), 28 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto y 30 segundos y 72°C por 45 segundos. La extensión final del proceso fue de 60 minutos a 72°C.

3.5 Secuenciación, análisis de fragmentos y visualización de datos

Los fragmentos amplificados se secuenciaron empleando, Liz 600 como marcador fluorescente (Pereira *et al.*, 2012) en un secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystem, USA). Al final del estudio se determinó el número de repeticiones y la frecuencia de todas las muestras.

Los resultados fueron visualizados con el programa GeneMapper v3.2 (Applied Biosystem, USA). El alelo corto al que se le asignó el número 1 es característico de las deleciones mientras que el alelo largo al que se le asignó el número 2 es característico de las inserciones (Pereira *et al.*, 2012).

3.6 Análisis estadístico

3.6.1 Análisis de la estructura poblacional

El programa STRUCTURE 2.3.4 (Falush *et al.*, 2003; Pritchard, Stephens y Donnelly, 2000) se usó para evaluar la estructura poblacional y establecer la asignación de cada individuo a un grupo genético. Para esto, se usó el modelo de correlación de frecuencias alélicas. Se identificaron entre 1 y 10 poblaciones (K) con 10 réplicas en cada uno de los casos. Cada evaluación se realizó con 100.000 réplicas de calentamiento (burn-in) y la aplicación de 100.000 MCMC (Monte Carlo de cadenas de Markov). El análisis se realizó asumiendo correlación entre la frecuencia alélica y el grado de mezcla de la población fue inferido de los datos. La relación entre cada una de las poblaciones evaluadas

se estimó con el programa Genepop (Raymond y Rousset, 1995; Rousset, 2008).

El valor del número de clústeres (K) más probable fue estimado usando la prueba estadística basada en la determinación del valor de probabilidad Ln estimada de los datos (Estimated Ln Probability of Data) (Rosenberg *et al.*, 2001) o ΔK (Evanno, Regnaut y Goudet, 2005). Las herramientas empleadas fueron STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012) y CLUMPAK (Kopelman, Mayzel, Jakobsson, Rosenberg y Mayrose, 2015).

3.6.2 Procesamiento estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa Prisma v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Todos los resultados fueron expresados como la media \pm STD-DEV. Los resultados de los estadísticos descriptivos implicaron los valores mínimos y máximos, así como los cuartiles a 25 y 75%. La significación estadística empleada implicó $p < 0,05$ en el test de Student para una muestra en comparación con el valor promedio determinado para la muestra poblacional. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó sin considerar el pareamiento de los datos mediante el test de Dunnet. Se realizaron comparaciones múltiples de cada uno de los rangos de edades predeterminados en relación al grupo total de pacientes y se asumió una distribución normal de los datos. Adicionalmente se realizó un análisis de varianza con el test de Kruskal-Wallis, el cual asume que los datos no tienen una distribución normal. Las pruebas de normalidad de los datos fueron realizadas con los test de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirn.

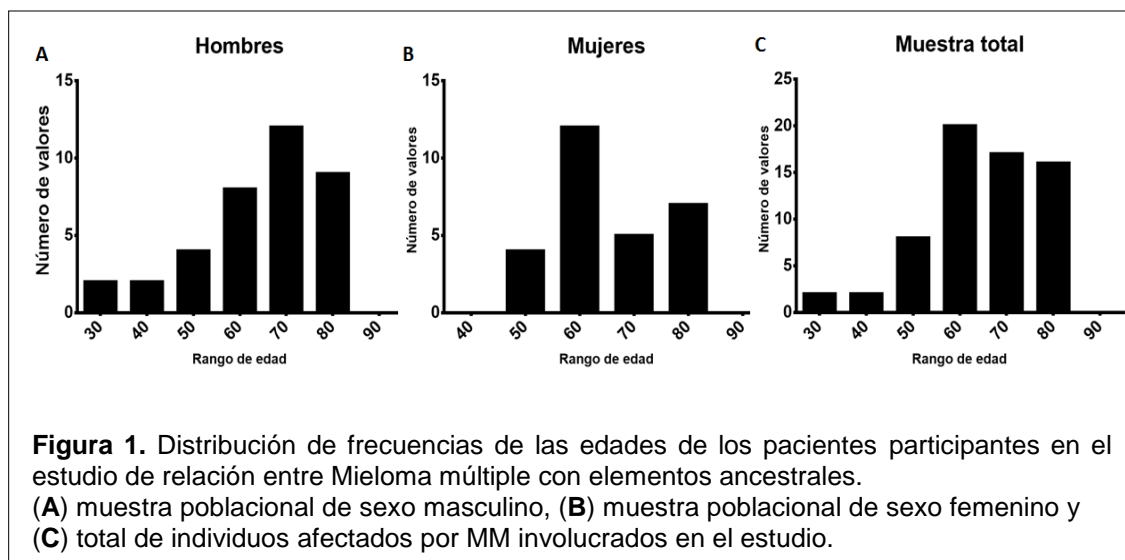
CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Historias Clínicas

La evaluación de los elementos ancestrales asociados al MM se realizó con una muestra poblacional conformada por 64 pacientes que se encontraban vinculados al servicio del Hospital Oncológico Solón Espinosa Ayala Núcleo de Quito (SOLCA) y del Hospital Carlos Andrade Marín de Quito (HCAM). La información clínica obtenida de los pacientes contiene datos de edad, género y pruebas sanguíneas (plaquetas, creatinina y calcio).

Esta muestra de pacientes estuvo conformada por 36 hombres (56,92%) con un rango de edades comprendidos entre 32 y 83 años. El número de mujeres fue 28 (43,08%), con edades entre 45 y 83 años. El rango de edades considerando todos los pacientes fue entre 32 y 83 años (Anexo 1). La distribución de la edad de los pacientes involucrados en el estudio de correlación ancestral implicó una un valor promedio de 63 años en el género masculino (Figura 1A) y 65 años en el femenino (Figura 1B). La edad promedio característica de la muestra poblacional evaluada fue de 65 años (Figura 1C).



El rango de este parámetro estuvo comprendido entre los 32 y 83 años. Sin embargo, los pacientes se concentraron principalmente en un rango de edad comprendido entre 60-80 años. De un total de 64 individuos, 53 estuvieron en

este rango, de los cuales 20, 17 y 16 pertenecían a los rangos 60-70, 70-80 y 80-83, respectivamente. En el grupo de los hombres la mayor cantidad de individuos estaba comprendido en el rango de edades entre 70-80 años mientras que para las mujeres este valor fue menor (60-70 años). Cada grupo estuvo comprendido por 12 individuos.

El análisis de las edades de los pacientes involucrados en el estudio implicó la comparación mediante un test t de Student con diferentes promedios (Anexo 2). El objetivo fue evaluar qué rango de este parámetro es más representativo en el contexto de la enfermedad evaluada. En todos los casos se observaron diferencias estadísticamente significativa a excepción del promedio de 65 años ($p = 0,05$). Los datos de edades también se analizaron en función del tipo de distribución a los que estos se ajustaban (Anexo 3), para la realización de un análisis de varianza (ANOVA). Independientemente de la prueba realizada (Dunnet o Dunn) no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el total de los pacientes y el grupo conformado por los individuos con edades comprendidas entre los 60-70 años (Anexo 4).

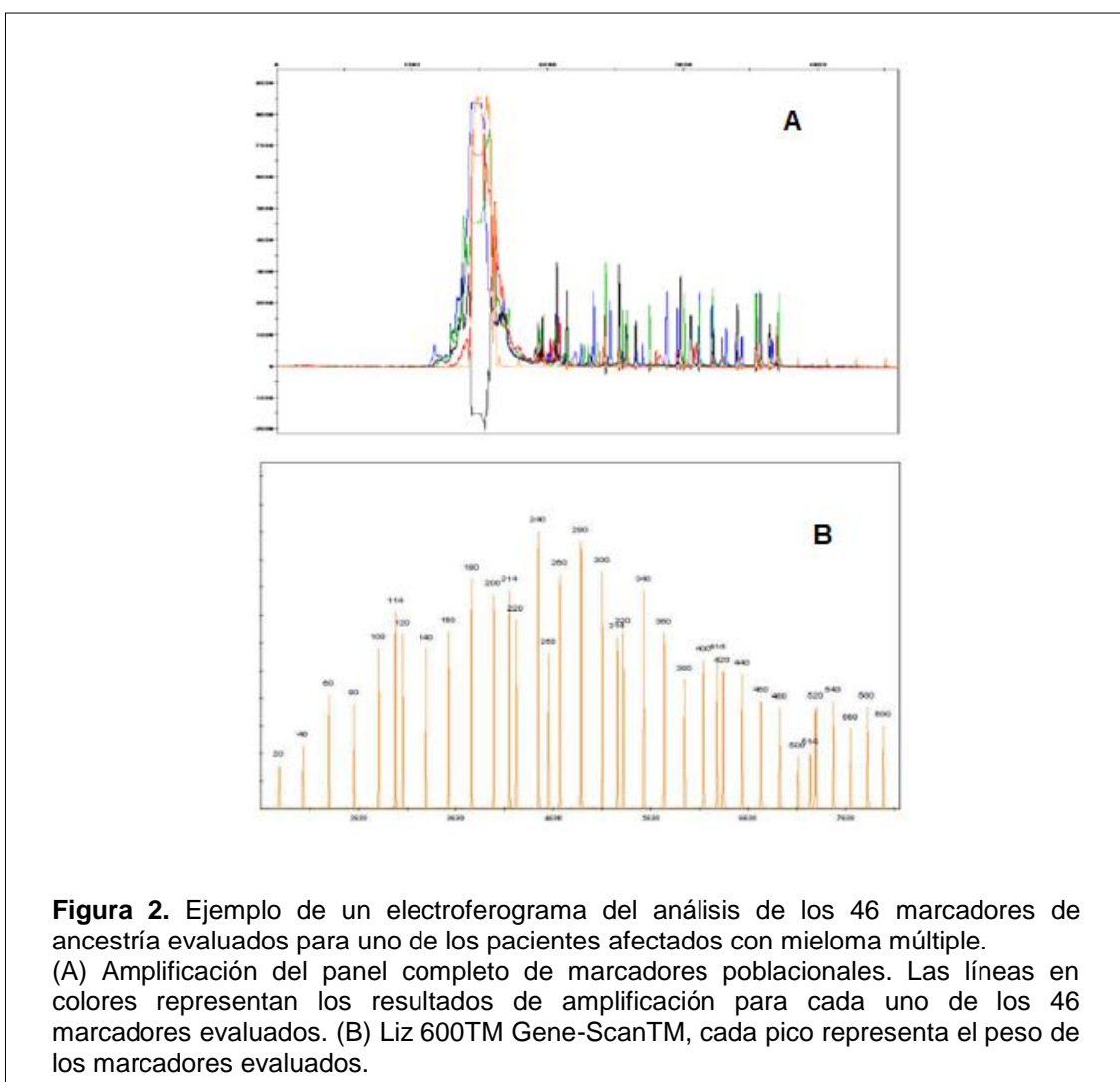
4.2 Extracción de ADN de muestras

A través de los protocolos ya establecidos se obtuvieron 64 muestras procedentes de pacientes ecuatorianos con mieloma múltiple. Cada una de las muestras originales fue diluida hasta alcanzar una concentración de ADN de 20 ng/ μ L y posteriormente hasta una concentración de 4 ng/ μ L. Esta cantidad de ADN (4 ng/ μ L) fue la óptima para una correcta amplificación y el posterior análisis de fragmentos correspondiente. Las muestras analizadas tuvieron que encontrarse en el rango de absorbancia A_{260}/A_{280} de 1,8-2 para que el ADN no presentara contaminantes o inhibidores que afecten en el proceso (Van Pelt-Verkuil, Van Belkum y Hays, 2008).

4.3 Amplificación por PCR

El análisis del electroferograma generado por el programa GeneMapper 3130 proporciona una visión de la amplificación por PCR de los fragmentos de cada una de las muestras evaluadas (Figura 2A) La lectura al emplear como

marcador molecular de fluorescencia Liz 600 diseñado para fragmentos de: 20, 40, 60, 80, 100, 114, 120, 140, 160, 180, 200, 214, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 314, 320, 340, 360, 380, 400, 414, 420, 440, 460, 480, 500, 514, 520, 540, 560, 580, y 600 nucleótidos, es utilizada con la finalidad de marcar cada uno de los fragmentos con el fluoróforo y de esta manera obtener una señal única en forma de pico. Además, el marcador Liz 600 nos permite automatizar el análisis de datos con una alta ejecución, como control en el proceso de análisis de los fragmentos de ADN (Applied Biosystems, 2006) (Figura 2B).



Los picos a lo largo del panel nos dan una representación gráfica de la amplificación de los marcadores poblacionales. El electroferograma de cada marcador informativo de ancestría se encuentra conformado por dos bins, donde las barras horizontales en la parte superior representan los 46

marcadores informativos de ancestría, las barras verticales son los *bines* y el número que aparece debajo del pico corresponde al alelo corto asignado como 1 mientras que el alelo largo se encuentra asignado con el número 2 (Pereira *et al.*, 2012). Los picos 1 y 2 localizados en cada alelo, son la demostración de correcta amplificación de los 46 marcadores poblacionales (Figura 3).

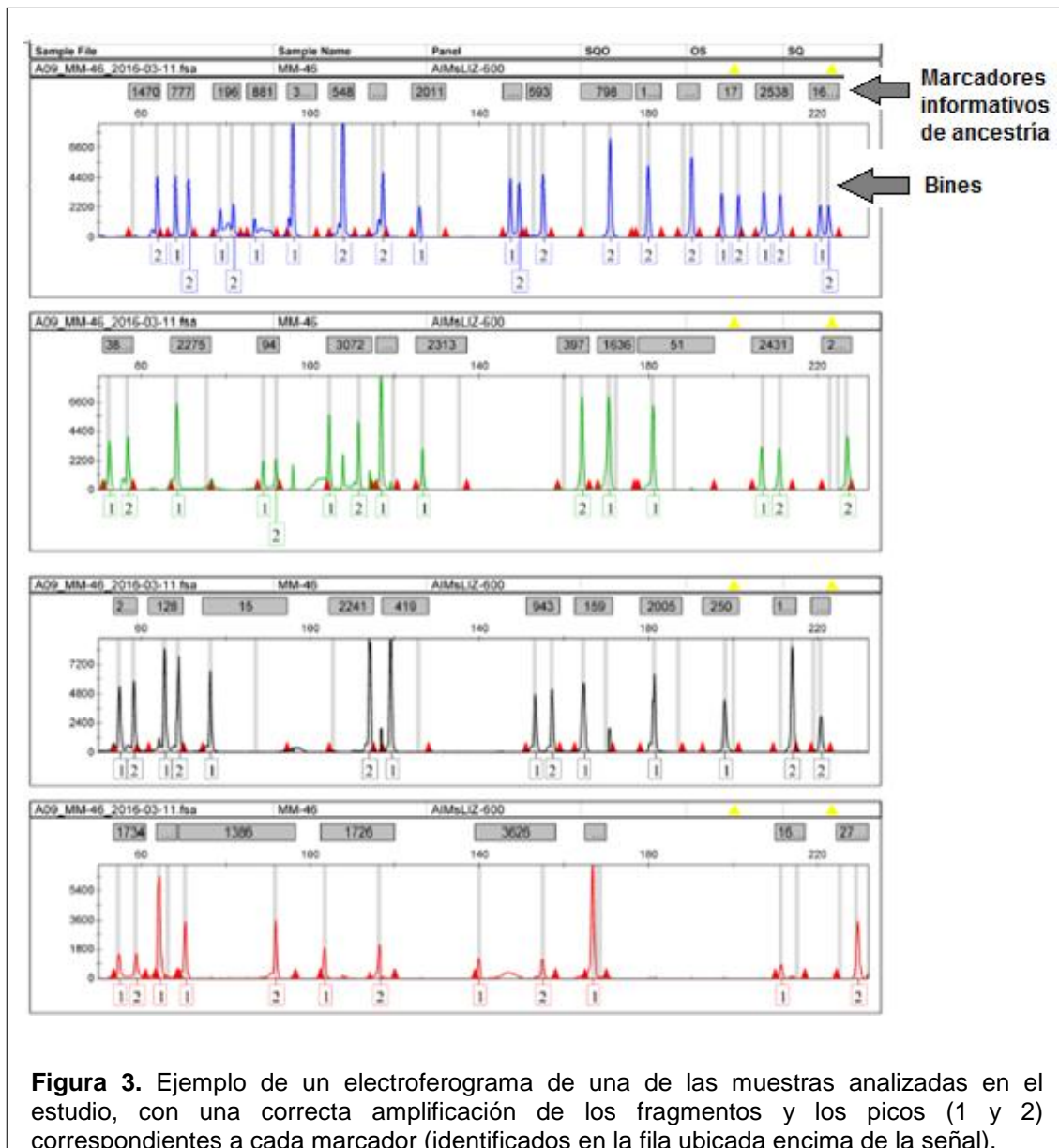
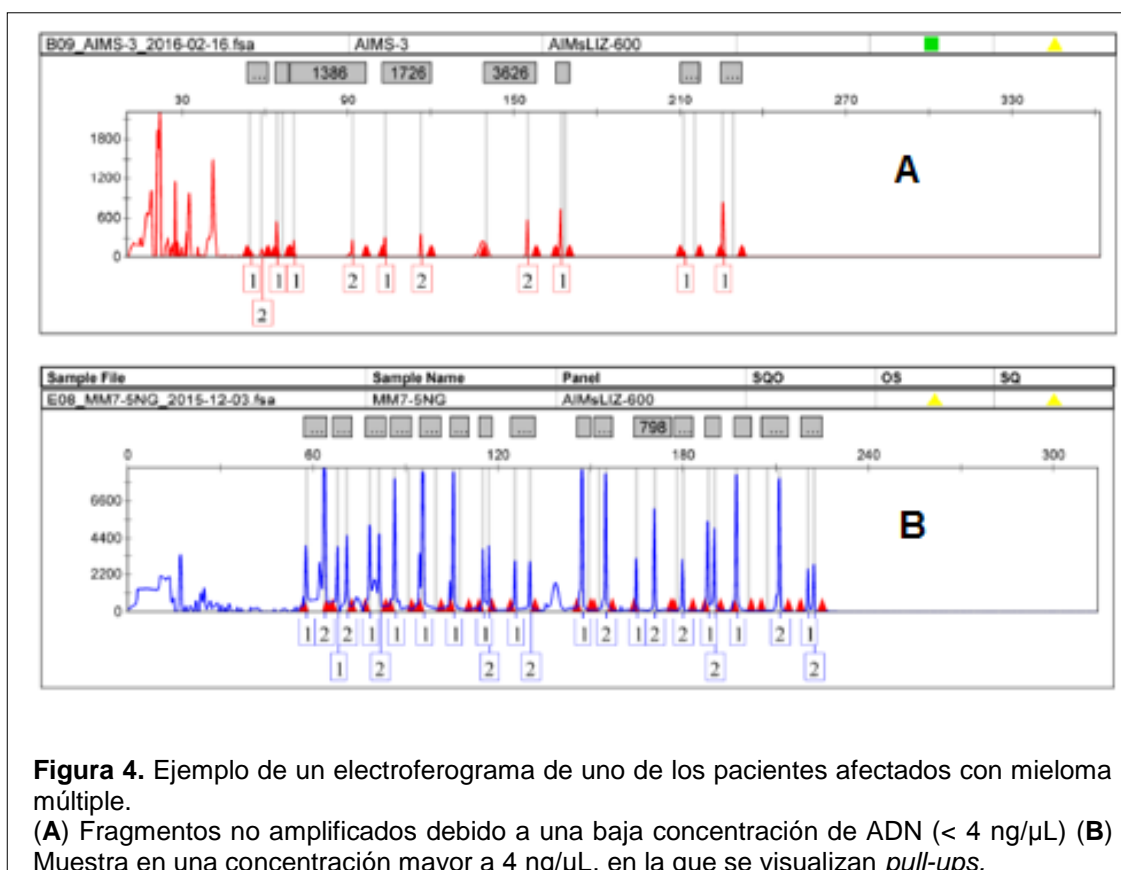


Figura 3. Ejemplo de un electroferograma de una de las muestras analizadas en el estudio, con una correcta amplificación de los fragmentos y los picos (1 y 2) correspondientes a cada marcador (identificados en la fila ubicada encima de la señal).

En la PCR se probaron diferentes parámetros para determinar cuáles eran las condiciones óptimas de ADN. La primera prueba se realizó con el número de ciclos de PCR de 28 a 30 y con concentraciones de ADN de 2, 4, 10 y 20 ng/μL. Los resultados de las pruebas indicaron que la concentración más eficiente a la

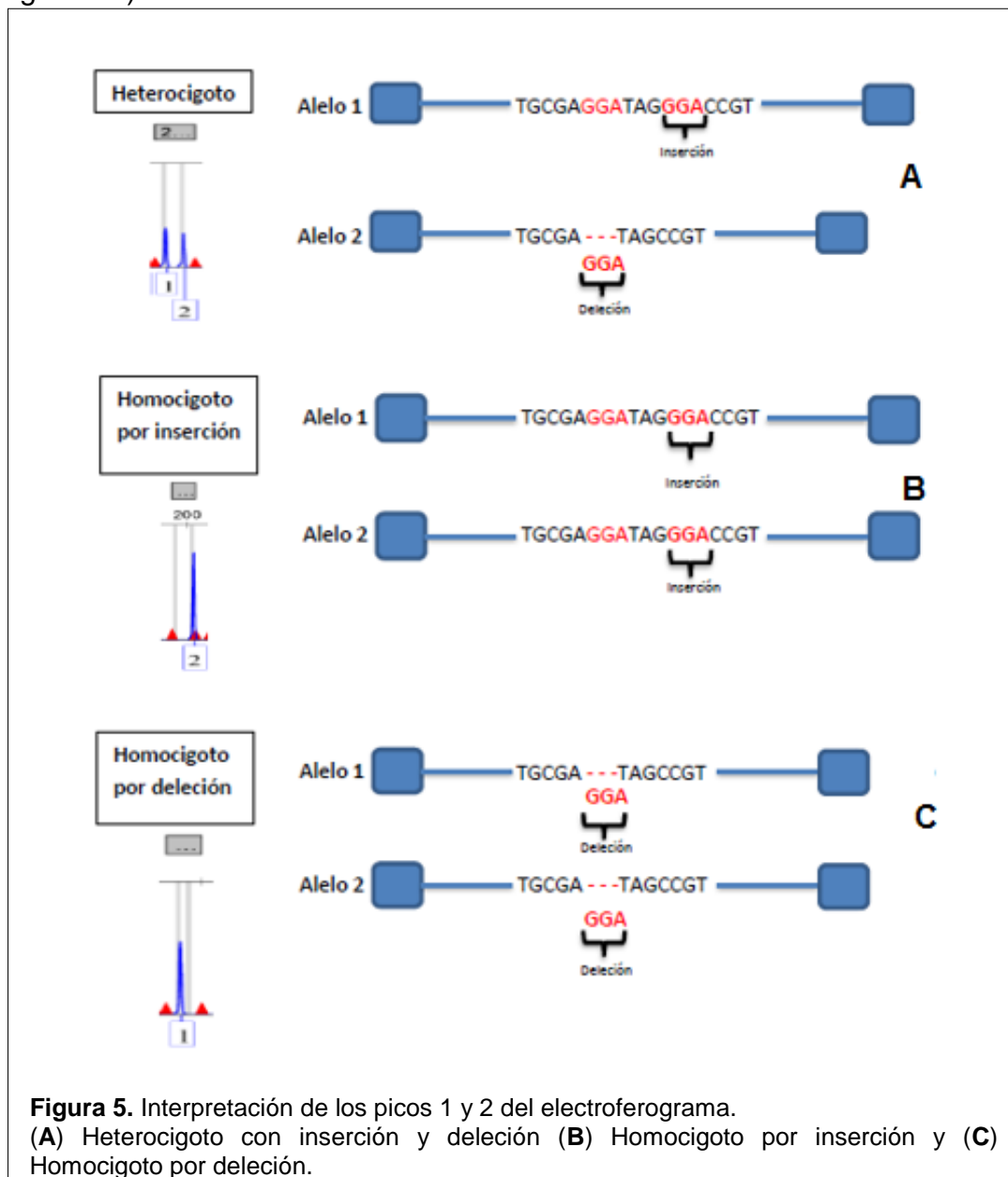
que se lograba la amplificación más eficiente era de 4 ng/μL. Los valores de concentración de ADN menor que 4 ng/μL implicaron que algunos de los alelos no se amplificaran (Figura 4A). Por otra parte, cuando la concentración fue mayor se generaban *pull-ups*, los cuales se superponían con las señales de los otros marcadores, causando una distorsión en la lectura (Figura 4B).



4.4 Análisis de la diversidad genética y ancestral

La diversidad genética de las poblaciones fue establecida mediante los resultados de las frecuencias alélicas obtenidas del electroferograma de cada muestra. El marcador poblacional al contar con dos alelos en cada uno de los *bines*, nos indicaba que si los picos aparecían en ambos alelos el individuo era heterocigoto para dicho marcador y existía una delección e inserción en cada alelo del cromosoma (Figura 5A). El otro caso se suscitaba cuando solo aparecía un pico en el alelo 2, que demostraba que el individuo era un homocigoto para dicho marcador, donde existía una inserción en el *bine* (Figura 5B). Mientras que, si el pico solo aparecía en el alelo 1, demostraba que

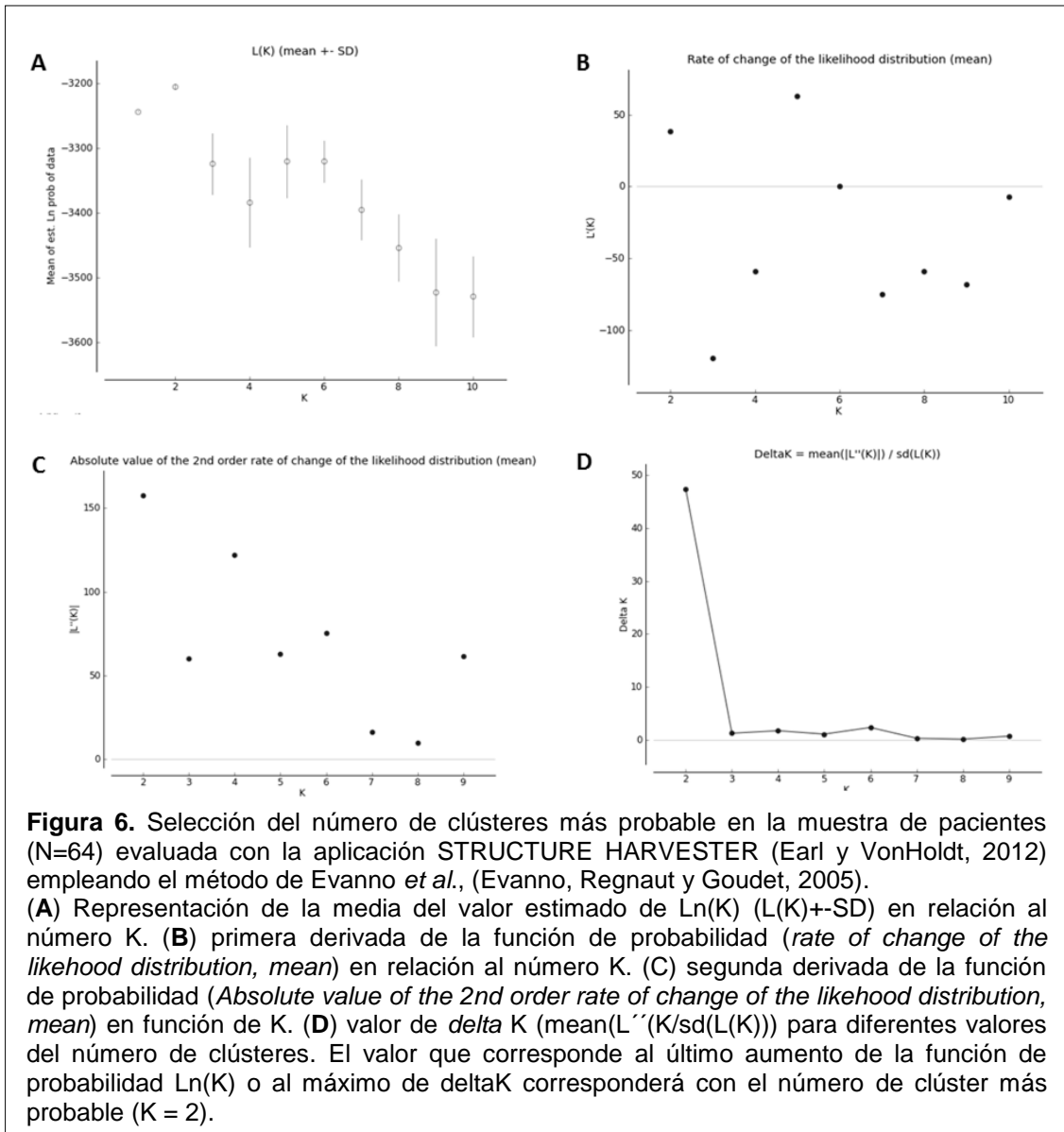
también era un individuo homocigoto pero existía una deleción en el *bine* (Figura 5C).



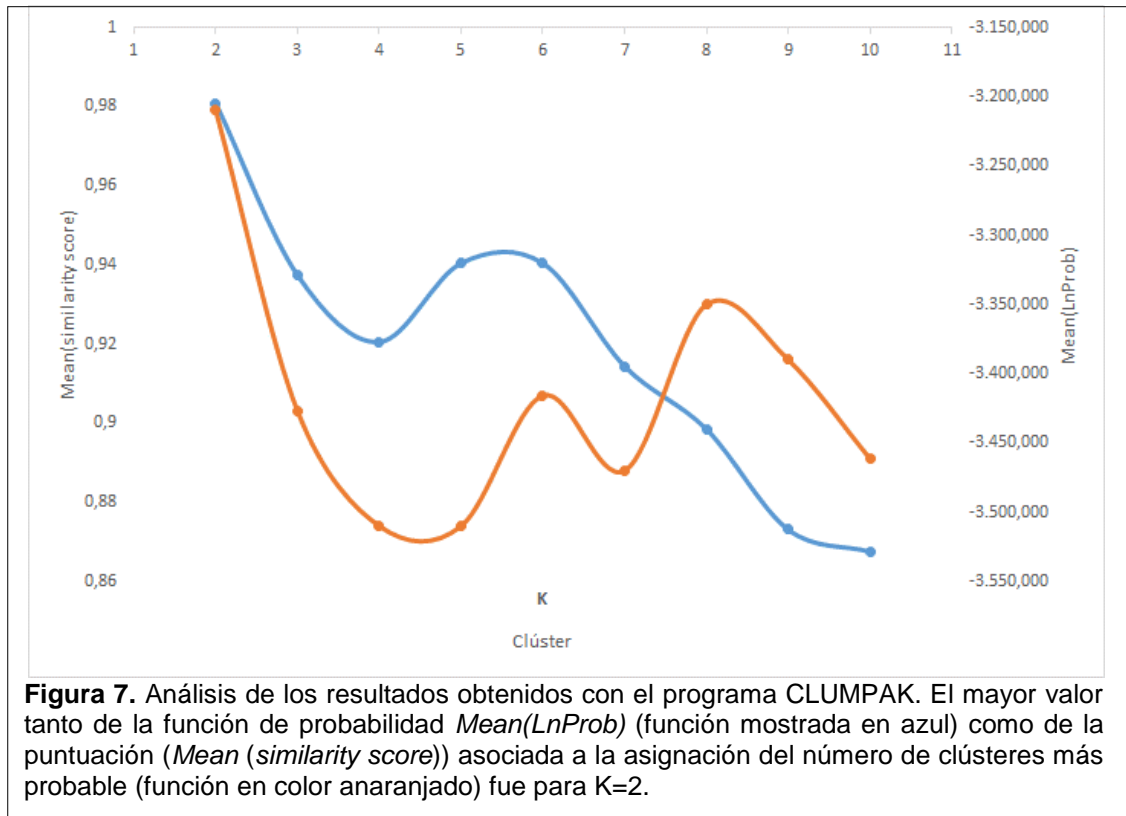
4.5 Análisis de la estructura de la población de los pacientes afectados por mieloma múltiple

La estructura poblacional de los pacientes con mieloma múltiple (MM) fue analizada con el programa STRUCTURE (Falush *et al.*, 2003; Pritchard, Stephens y Donnelly, 2000) y la representación de los resultados se realizó con la herramienta STRUCTURE HARVESTER, la que emplea como algoritmo para la determinación del número de subpoblaciones más probable el método

de Evanno (Earl y VonHoldt, 2012; Evanno, Regnauty Goudet, 2005). De acuerdo con esta aplicación se estimó que los individuos analizados fueron agrupados de modo más probable dentro de dos clústeres, $K=2$ (Figura 6).

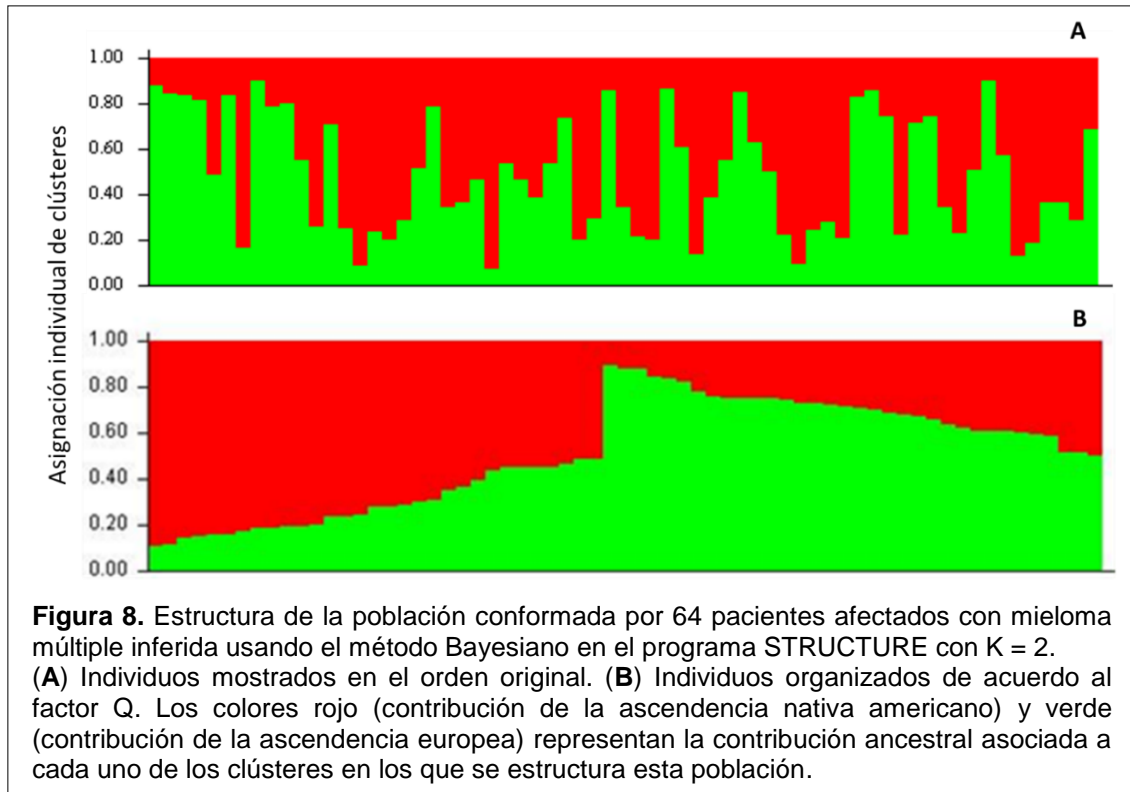


Al igual que el STRUCTURE HARVESTER, el CLUMPAK es otra de las herramientas empleadas para el análisis de las simulaciones de estructura poblacional generadas en el STRUCTURE. Los resultados obtenidos con esta herramienta también corroboran que el valor de subpoblaciones más probables ($K = 2$) fue el más adecuado para explicar la estructura de la población de los pacientes afectados con mieloma múltiple (Figura 7).

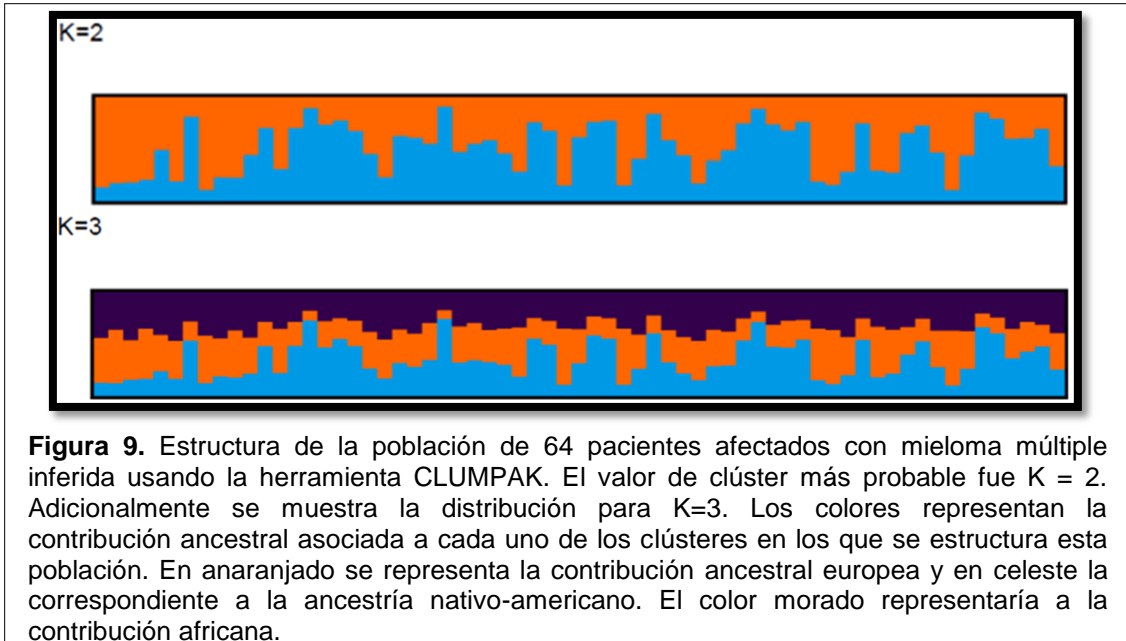


La consistencia entre los resultados obtenidos por las herramientas “STRUCTURE HARVESTER” y CLUMPAK son una medida de la correcta asignación del número de clústeres ($K=2$) en el contexto de la población conformada por los 64 pacientes que fue objeto de este análisis.

En cada una de las 10 simulaciones realizadas con el STRUCTURE se obtuvo el mismo número de individuos formando parte de cada uno de los dos clústeres estimados con mayor probabilidad (Figura 8).



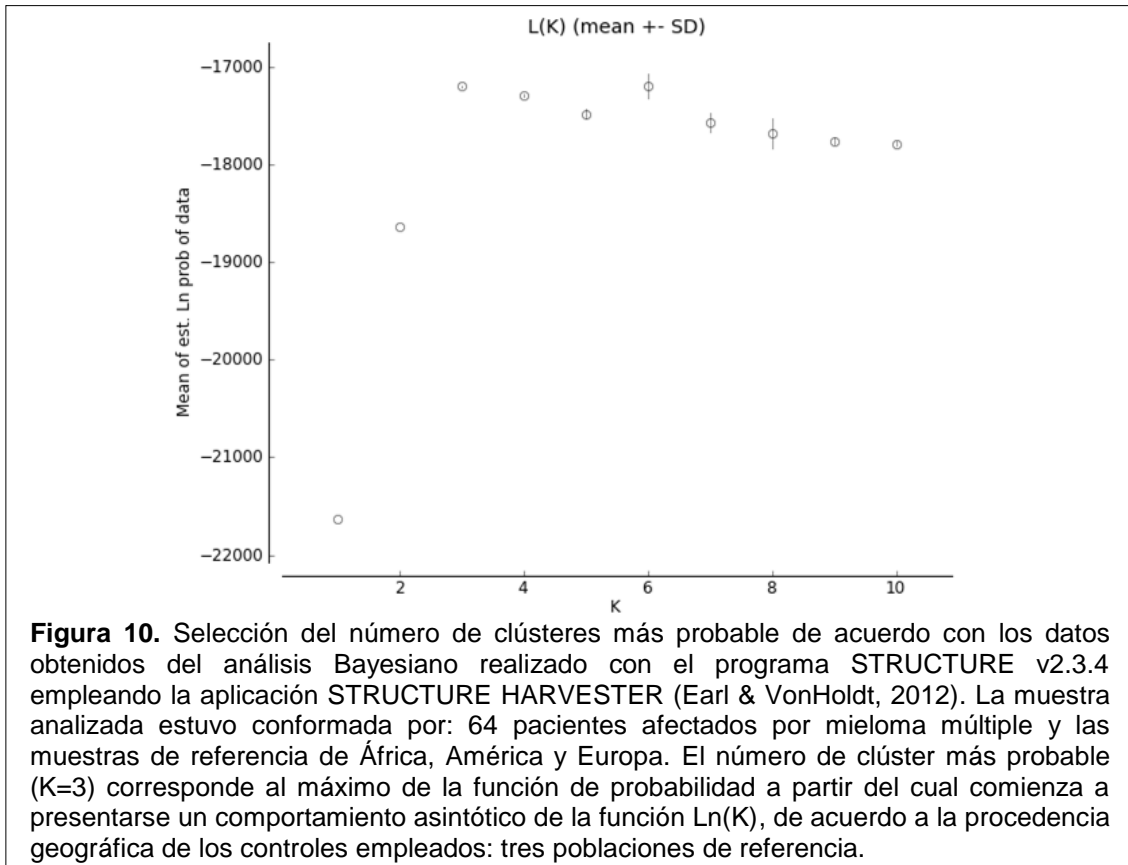
La información relacionada con las representaciones en barras para los números de subpoblaciones $K=2-3$ también fueron obtenidas con la herramienta CLUMPAK (Figura 9). Esta aplicación permite evaluar los números más probables de K en función de la maximización de la función de probabilidad $\ln(K)$ así como de la puntuación asociada a cada uno de estos valores probables de subpoblaciones. En base a la ascendencia de la población ecuatoriana también se tuvo en cuenta el posible componente ancestral proveniente de África (Figura 9, $K=3$). Sin embargo, se determinó que los componentes de ancestría relacionados con esta población fueron semejantes a los valores de ancestría americana y europea. Por tal motivo también se debe proceder al análisis con la aplicación STRUCTURE de la muestra poblacional constituida por los pacientes afectados con MM en el contexto de las tres poblaciones de referencia que constituyen los componentes ancestrales de la población ecuatoriana: americana, europea y africana (epígrafe 4.6).



De acuerdo con el análisis realizado con el programa STRUCTURE en cada uno de los dos clústeres más probables que conforman la población de los pacientes estudiados ($N=64$) se encuentran contenidos el 50,2% y el 49,8% de los individuos analizados. En el primer caso están agrupados los individuos que tienen mayor ancestría europea mientras que en el segundo los que tienen mayor ancestría americana.

4.6 Análisis de la estructura de la población de los pacientes afectados por mieloma múltiple en el contexto de poblaciones de referencia

Los resultados del análisis de la función de probabilidad $L(K)$ obtenida de la simulación con varios valores de posibles clúster (Figura 10) indican que la población original puede ser agrupada en tres fracciones (Figura 11). Los valores de la función de probabilidad alcanza un valor máximo alrededor de $K=3$, además en esta región aún son pequeños los errores asociados a las simulaciones para la determinación de la estructura poblacional.

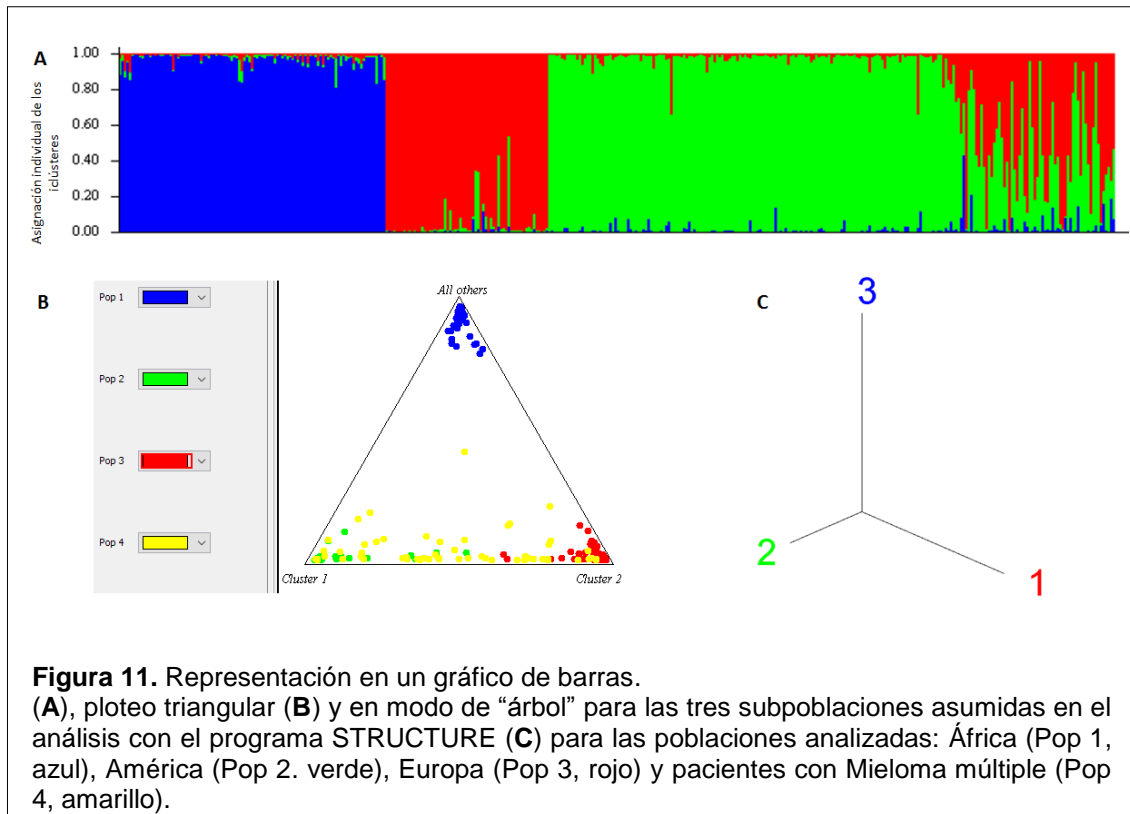


Entre los tres clústeres relacionados con las poblaciones de referencia, el primero está asociado a la población de origen americano (94,9%), el segundo clúster lo constituyen los individuos europeos (96,3%) y el tercero de los grupos identificados corresponde a la población africana. La estructura de la población de pacientes afectados con Mieloma múltiple en el contexto de las poblaciones de referencias empleadas está enmarcada principalmente en dos de las poblaciones de referencias asumidas: 52,7% en el clúster 1 y 43,4% en el clúster 2 (Tabla 1).

Tabla 1. Proporción de cada una de las poblaciones predeterminadas en cada uno de los clústeres obtenidos.

Poblaciones	Clústeres inferidos			Número de individuos
	1	2	3	
África	0,016	0,018	0,967	105
América	0,949	0,042	0,009	64
Europa	0,023	0,963	0,013	158
Pacientes Mieloma múltiple	0,527	0,434	0,039	64

El clúster 1 está conformado mayoritariamente por la población nativa americana, el clúster 2 por la europea y el clúster 3 por la población nativa de África. De acuerdo con este modelo en el que se asumen tres poblaciones fundamentales, se obtiene un ordenamiento en el que los pacientes con Mieloma múltiple se distribuyen fundamentalmente entre las poblaciones de referencia con origen americano y europeo (Figura 11).



Las tres poblaciones definidas como controles de este análisis son identificadas en el contexto del análisis de ancestría realizado. Se muestra en la representación “triangular” que la población 1, 2 y 3 están ubicadas alrededor de cada uno de los vértices. Sin embargo, los individuos que componen la población de pacientes se encuentran distribuidos cercanos a la base del triángulo (Figura 11B).

El análisis de la distribución de ancestría de cada uno de los individuos integrantes de las poblaciones analizadas indica que los pacientes tienen un elevado componente ancestral de las poblaciones originarias de América y Europa (Figura 12).

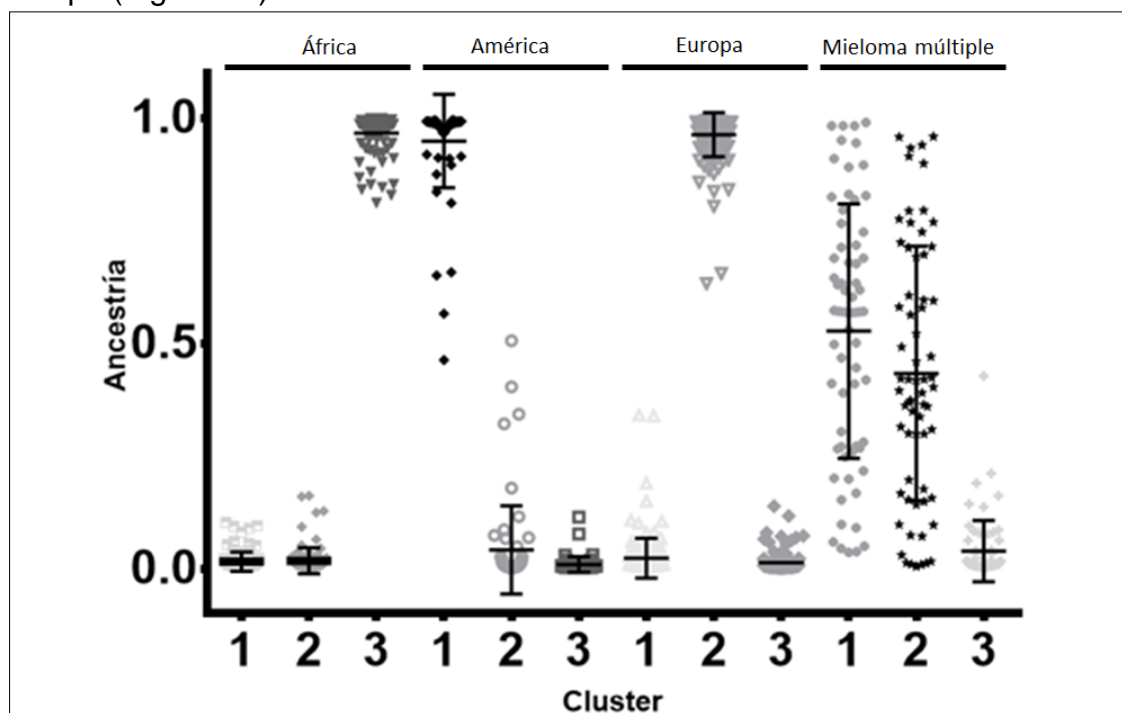


Figura 12. Representación de la ancestría de la muestra poblacional de pacientes afectados con mieloma múltiple del Ecuador. Para cada una de las poblaciones analizadas se muestra la contribución de ancestría en los clusters asumidos en el análisis (K=3). Los clusters 1, 2 y 3 están representados fundamentalmente por las poblaciones de referencia de América, Europa y África, respectivamente.

El análisis de la distancia entre la población de los pacientes evaluados y las tres poblaciones de referencia evidenció que la población ecuatoriana de pacientes afectados por mieloma múltiple se encuentra más cercana a las referencias de América y Europa (Figura 13).

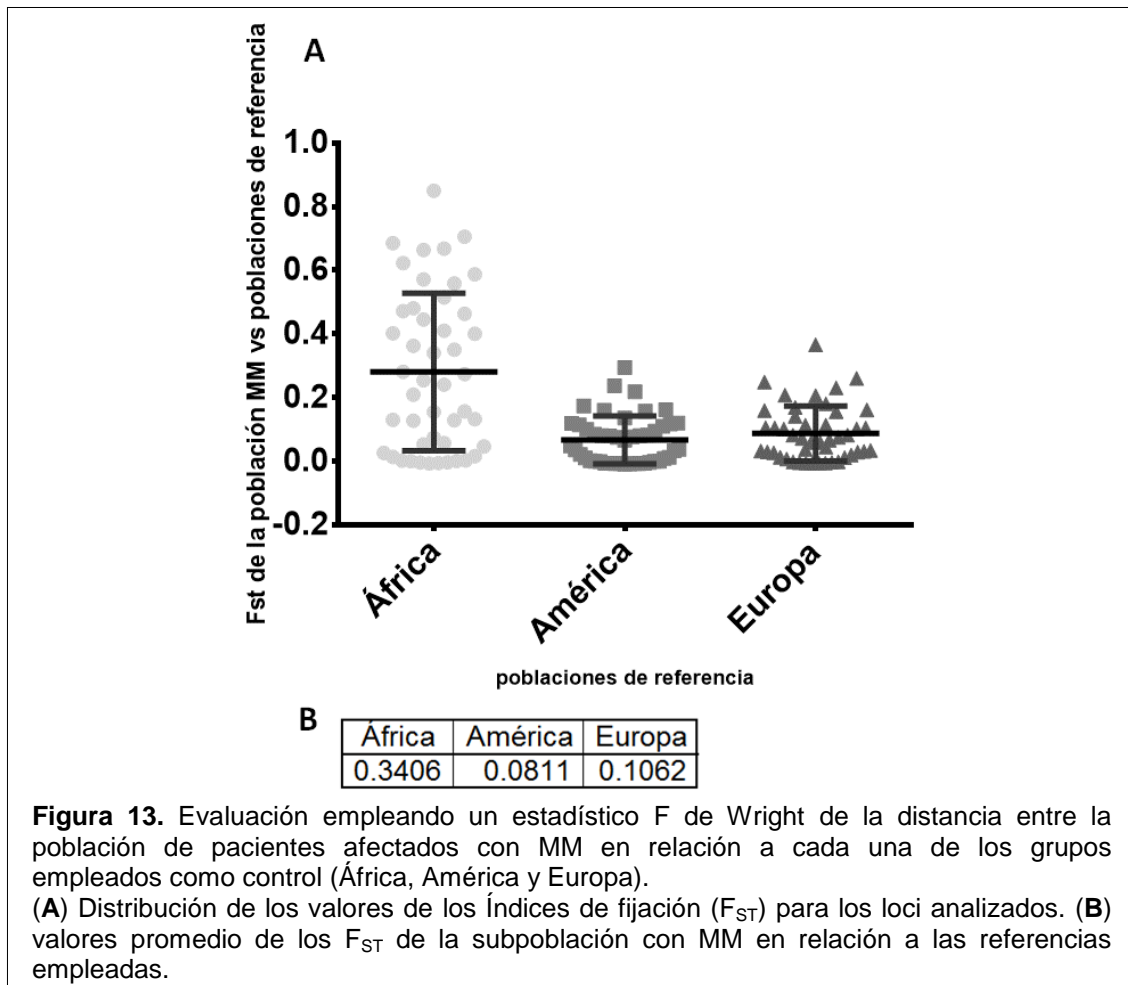
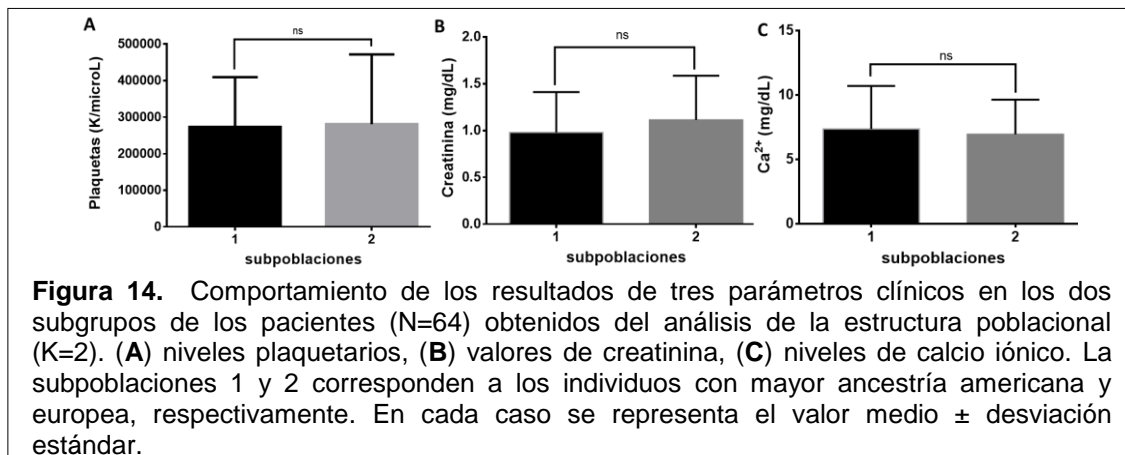


Figura 13. Evaluación empleando un estadístico F de Wright de la distancia entre la población de pacientes afectados con MM en relación a cada una de los grupos empleados como control (África, América y Europa). **(A)** Distribución de los valores de los Índices de fijación (F_{ST}) para los loci analizados. **(B)** valores promedio de los F_{ST} de la subpoblación con MM en relación a las referencias empleadas.

Los valores de F_{ST} obtenidos de la asimilación de las poblaciones de referencia en comparación con la población conformada por los pacientes (Figura 13A) confirma la subdivisión de la muestra en dos subpoblaciones. Los componentes ancestrales más representados en los pacientes analizados en este estudio son los de origen europeo y americano, de acuerdo a los valores medios de F_{ST} (Figura 13B). Por otra parte el componente asociado a la referencia de África es el menos representado (F_{ST} mayor) entre los individuos afectados por mieloma múltiple en la muestra analizada.

4.7 Relación de la estructura poblacional con parámetros clínicos

El análisis de los parámetros clínicos (Figura 14) arrojó que en ninguno de los parámetros hubo diferencia estadísticamente significativa ($p=0,05$) entre las dos subpoblaciones inferidas de los 64 pacientes afectados con mieloma múltiple.



Tampoco fueron detectadas diferencias entre las variancias de los parámetros clínicos entre las subpoblaciones evaluadas (Anexo 5). Para el grupo de los pacientes con mayor ascendencia americana el 6% de los pacientes presentó valores de los niveles plaquetarios (Figura 14A) ligeramente mayor que lo reportado para el rango normal: 414.000 – 442.000 K/microL. Sin embargo, el 3% de los pacientes presentaron un nivel plaquetario de alrededor de 726.353 K/microL. En el subgrupo conformado por los pacientes con mayor ascendencia europea estos valores estuvieron fuera de rango (406.000 – 989.600 K/microL) para el 14% de los individuos.

En relación a los valores de creatinina (Figura 14B), sólo en el 8% (subgrupo 1) y en el 7% (subgrupo 2) de los individuos se detectaron valores por encima de los normales para este parámetro.

En el caso de los niveles de iones cálcicos en los pacientes analizados (Figura 14C) no se evidenció diferencias estadísticamente significativas en los valores de este parámetro clínico. Adicionalmente se determinó que en ambos subgrupos evaluados, en alrededor del 50% de los individuos los valores de calcio iónico fueron menores que los valores reportados como normales (Figura 15). Los pacientes hipocalcémicos en la subpoblación 1 constituyeron el 50% de este grupo (Figura 15A) y en la subpoblación 2 este valor fue de un 52% (Figura 15B). Por otra parte en el subgrupo 1 la cantidad de pacientes hipercalcémicos fue mayor (15% del subgrupo 1, Figura 15A) en relación a la subpoblación 2 (5% del subgrupo 2, Figura 15B).

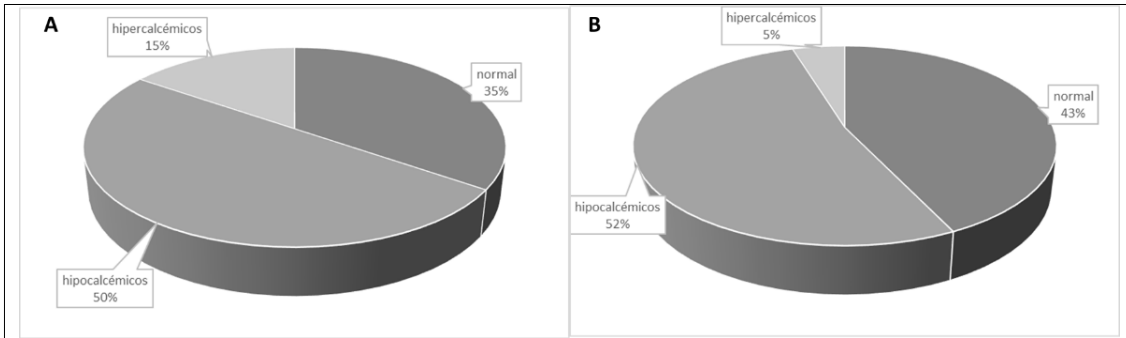


Figura 15. Distribución de los porcentajes de pacientes en relación a los niveles de Ca^{2+} presentes a nivel plasmático.

(A) individuos correspondientes al subgrupo 1, conformado por los pacientes con mayor ascendencia americana, (B) individuos correspondientes al subgrupo 2, conformado por los pacientes con mayor ascendencia europea.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El mieloma múltiple es un tipo de cáncer poco frecuente a nivel mundial con una incidencia de 0,8% y alrededor de 114.000 casos anuales (Waxman *et al.*, 2016). Esta patología representa el 1% de todos los tipos de cáncer, el 2% de las muertes por cáncer y del 10 al 15% de las neoplasias hematopoyéticas (Fantl *et al.*, 2010).

En el Ecuador, la frecuencia de esta enfermedad es 0,1% menor en relación con los datos reportados a nivel mundial (McCormack, Znaor y Santos, 2012; Cueva y Yépez, 2014). Los Hospitales Solca y Carlos Andrade Marín de Quito, fueron las instituciones que proporcionaron las muestras y la historia clínica de los pacientes involucrados en esta investigación. La edad de los individuos objeto de estudio tuvo un valor promedio de 64 años. Estos resultados se encuentran en correspondencia con los obtenidos por Dispenzier *et al.* (2008) y Dimopoulos *et al.* (2012), los que determinaron que este tipo de neoplasia está asociada a individuos con una edad avanzada. Adicionalmente la composición en género de la muestra de pacientes analizada está en correspondencia con los reportes del SEER (2015), los que sugieren que el género masculino presenta una mayor incidencia de esta patología.

Aunque existen reportes de que la incidencia de esta enfermedad es mayor en los afrodescendientes (Greenberg, Vachon y Rajkumar, 2012), el grupo étnico más representado en la población estudiada de pacientes ecuatorianos fue el mestizo. Estos resultados están asociados a que el Ecuador es un país pluricultural y multicultural como lo afirma el Art. 1 de la constitución vigente caracterizado por un 77,4% de población mestiza (Aguirre, 2012).

A pesar de los diversos estudios realizados en MM, la estructura de la genética poblacional sigue siendo un punto primordial para el entendimiento de esta enfermedad. Es por ello que, pese a no tener clara la relación del contacto europeo antes y después de la colonización, ni de saber si ocurrió un remplazo

de patrones de diversidad nativos o si existe continuidad de los mismos, es necesario comprender la vinculación ancestral y los patrones genéticos así como elementos hereditarios que pudiesen estar asociados con el desarrollo de esta enfermedad (González y Barreto, 2013). Por esta razón se realizó un estudio preliminar con pacientes ecuatorianos afectados con mieloma múltiple, donde la caracterización poblacional se realizó empleando los 46 marcadores de ancestría recomendados por Pereira y colaboradores (2012). Estos marcadores moleculares permiten la separación de la población analizada en subestructuras en función de la composición ancestral así como la corrección de falsos positivos en el análisis (Kosoy *et al.*, 2009).

El principal objetivo de este trabajo estuvo enmarcado en el análisis de la estructura poblacional de una muestra de pacientes afectados con mieloma múltiple. Los marcadores de ancestría empleados en este estudio implicaron 46 locus, que diferencian entre las tres etnias de las que se origina la población ecuatoriana. La cantidad de ADN y el número de ciclos para el análisis de los 46 locus en el estudio fue de 4 ng/μL con 28 ciclos, debido a que se obtenían óptimos resultados en el análisis y procesamiento de las muestras. La estandarización se fundamentó en las recomendaciones del kit (QIAGEN Multiplex PCR) y los estudios realizados por Pereira y colaboradores (2012) que emplearon un rango de 0,3-5 ng/μL de ADN y 30 ciclos al emplear ADN genómico con una eficacia significativa de análisis.

La estructura genética de la población de pacientes afectados con mieloma múltiple fue analizada mediante el programa STRUCTURE (Falush *et al.*, 2003; Pritchard *et al.*, 2000). Esta aplicación está basada en un algoritmo del tipo Bayesiano, que implica la subdivisión de la muestra poblacional objeto de estudio en varias subpoblaciones o clústeres, las que deben satisfacer el equilibrio de Hardy-Weinberg (Hardy, 1908; Wagner, 1999; McKeigue, Carpenter, Parra, y Shriver, 2000).

La estructura de una población determinada se puede inferir en función de su historia ancestral, sin embargo, el número de subpoblaciones podría obtenerse

con mayor exactitud mediante un análisis con marcadores genéticos, los que darán un estimado de este parámetro de modo menos subjetivo. La determinación de las subpoblaciones generalmente se realiza mediante algoritmos implementados en varios programas computacionales. Estas estrategias implican el uso de los valores de probabilidad $\ln(K)$ (Rosenberg *et al.*, 2001) o de ΔK (Evanno *et al.*, 2005) y están disponibles en varias herramientas que pueden ser utilizadas de forma libre y online (Earl y VonHoldt, 2012; Kopelman, Mayzel, Jakobsson, Rosenberg y Mayrose, 2015).

El análisis de la estructura de la población conformada por 64 pacientes afectados con mieloma múltiple se realizó con la herramienta STRUCTURE y la estimación del número de subpoblaciones más probables se basó en los métodos de Rosenberg (Rosenberg *et al.*, 2001) y Evanno (Evanno *et al.*, 2005). La representación de la función obtenida de la matriz Q de cada uno de los individuos del grupo analizado en el contexto del orden de los pacientes u ordenado en función de Q evidencia que el número de clústeres más probables para la explicación de los datos fue $K=2$. Este resultado está en correspondencia con los obtenidos mediante el método gráfico de Evanno *et al.*, (Figura 6) empleando la aplicación gráfica STRUCTURE HARVESTER (Earl & VonHoldt, 2012). El análisis también fue corroborado con la aplicación CLUMPAK (Kopelman *et al.*, 2015), con la que obtiene un máximo tanto en la función de probabilidad $\ln Prob$ así como en la función de puntuación de similitud.

Por otra parte si esta población (pacientes afectados con mieloma múltiple) hubiese sido dividida en tres clústeres ($K=3$), la composición en cada subpoblación hubiese correspondido a valores de 32,5%, 35,2% y 32,3%. Estos resultados estarían asociados a una estructura poblacional con tres grupos ancestrales diferentes. Por tal motivo se procedió al análisis de la estructura poblacional en el contexto de tres poblaciones de referencia (americana, europea y africana), las que corresponden con los orígenes de la población ecuatoriana (González-Andrade, Sánchez, González-Solórzano, Gascón y Martínez-Jarreta, 2007). Aunque el análisis implicó estos tres grupos

ancestrales como referencia (Pereira *et al.*, 2012), la identificación del número de clústeres ($K=3$) también fue estimada mediante el método de Rosenberg (Rosenberg *et al.*, 2001).

El análisis de la estructura de cada una de las poblaciones teniendo en cuenta la matriz Q (representación triangular) de los individuos que conformaron cada uno de los grupos contemplados en el análisis evidenció que en las poblaciones de referencia, los niveles de ancestría están concentrados fundamentalmente en cada uno de los clústeres predefinidos. Sin embargo, en la población de pacientes con Mieloma múltiple existe una mayor dispersión enmarcada en los clústeres 1 y 2, correspondientes a las poblaciones de referencia de América y Europa, respectivamente. El componente africano tiene poca contribución al grupo de los individuos afectados con Mieloma múltiple.

El índice de fijación F_{ST} es uno de los “estadísticos F” de Wright que permite estimar la diferenciación entre subpoblaciones (Wright, 1931). Este operador puede tener valores comprendidos entre cero (no hay estructura en la población) hasta uno (poblaciones independientes o separadas desde el punto de vista genético). De acuerdo a los rangos definidos por Wright (Powell y Wright, 1979; Wright, 1931) el análisis de la diferenciación genética en términos de frecuencias alélicas de la población de pacientes, en relación a los grupos ancestrales de referencia empleados, evidenció que sólo hubo diferenciación elevada con la población ancestral africana (F_{ST} 0,3406). La distancia en relación con las poblaciones americanas y europea indicó una diferenciación genética moderada (F_{ST} 0,0811 y 0,1062, respectivamente).

Estos resultados pudiesen estar en contradicción con los obtenidos por otros trabajos en los que la ancestría de África está estrechamente relacionada con la aparición y evolución del mieloma múltiple (Lewis *et al.*, 1994). Sin embargo, se debe también considerar la existencia de otros factores de riesgo como la obesidad, factores genéticos (HLAs), así como la historia médica (infecciones del tracto urinario) en el desarrollo de esta enfermedad (Benjamin, Reddy y

Brawley, 2003). Adicionalmente, se debe tener en cuenta la composición de la muestra de pacientes analizadas, la cual pudiera no ser representativa de toda la población afectada con esta enfermedad en el país. Por otra parte, se debe considerar la contribución de cada uno de los elementos ancestrales de la población ecuatoriana (González-Andrade *et al.*, 2007). En función de la conformación de esta muestra poblacional de pacientes ecuatorianos se debe valorar la dificultad relacionada con el diagnóstico de este tipo de cáncer, sobre todo en el contexto nuestro país (Borja, Bravo y Morales, 2014; Rajkumar y Kyle, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo constituyen una evidencia preliminar para el estudio del mieloma múltiple relacionado con la ancestría en el contexto de la población ecuatoriana.

Otro de los elementos evaluados fue la posible relación de algunos parámetros clínicos (niveles plaquetarios, de creatinina y de calcemia) y la ancestría de la población evaluada. Aunque este análisis está relacionado con los elementos clínicos asociados a la prognosis de esta enfermedad (Kyle *et al.*, 2003), no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$) entre las dos subpoblaciones evaluadas. En los pacientes evaluados en este estudio sólo en cinco casos (8% del total) se encontraron niveles plaquetarios por encima de los valores normales reportados para este parámetro. En el caso de los niveles de creatinina, alrededor del 8% de los individuos del subgrupo 1 y 7% de los del subgrupo 2 presentaron valores por encima de los normales. Para este parámetro, la mayoría de los pacientes evaluados presentarían poco daño renal, por lo que se puede inducir una mejor prognosis en función de este parámetro para los individuos integrantes del estudio (Knudsen, Hjorth, & Hippe, 2000). Por el contrario, alrededor del 50 % de los pacientes de cada uno de los subgrupos presentaron hipocalcemia. Los valores de calcemia fueron menores a los 5 mg/dL en un 27% de los individuos del subgrupo 1 y en un 32% de los del subgrupo 2. De acuerdo con estos valores de concentración de ion calcio se evidenció una peor prognosis de la enfermedad, ya que este elemento pudiera estar asociado a fracturas y daños de la estructura ósea (García-Sanz *et al.*, 2007).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- La edad promedio de los pacientes involucrados en el estudio tuvo un valor medio de 65 años, cuya población mayormente afectada fue la mestiza.
- Las condiciones óptimas para la amplificación de cada uno de los 46 locus evaluados fueron: concentración de ADN, 4 ng/ μ L y 28 ciclos.
- El análisis de la estructura poblacional de los pacientes afectados con MM estuvo asociado a una división ancestral que se encontró alrededor del 50% de ancestría europea y 50% de ancestría americana.
- La ancestría africana estuvo poco representada en la muestra de pacientes ecuatorianos afectados con mieloma múltiple.
- La población conformada por pacientes con MM estuvo más alejada ancestralmente de la población de referencia africana ($F_{ST} = 0,34$). La distancia poblacional en relación a las referencias poblacionales de América ($F_{ST} = 0,08$) y Europa ($F_{ST} = 0,1$) en ambos casos fue moderada.

6.2 Recomendaciones

- Se recomienda analizar una muestra poblacional mayor que pueda redundar en resultados estadísticos más exactos en relación a la estructura de la población afectada con mieloma múltiple y la evaluación de su relación ancestral.
- Incrementar la heterogeneidad de la muestra poblacional con respecto a la etnia de los individuos involucrados en el estudio.
- Aumentar la recolección de muestras procedentes de otras instituciones de salud que ayuden abarcar las diversas etnias que conforman el país.

REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A., y Pillai S. (2011). *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
- Aguirre, Z. (2012). *Diversidad Étnica - Cultural del Ecuador*. Loja: Universidad Nacional de Loja.
- Althoff, D., Gitzendanner, M., y Segraves, K. (2007). *The Utility of Amplified Fragment Length Polymorphisms in Phylogenetics: A Comparison of Homology within and between Genomes*. *Systematic Biology*. 56(3):477-48. Recuperado el 20 de febrero del 2016 de: <http://sysbio.oxfordjournals.org/content/56/3/477.full.pdf>
- Arnaiz, A., Regueiro, J. y López, C. (1995). *Inmunología*. Madrid, España: Editorial Complutense.
- Avet-Loiseau, H., Andree-Ashley, L.E., Moore, D., Mellerin, M.P., Feusner, J., Bataille, R., y Pallavicini, M.G. (1997). *Molecular cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and plasma cell leukemia measured using comparative genomic hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer*; 19: 124-133
- Ayala, E. (2003). *Resumen de Historia del Ecuador*. Corporación Editora Nacional. Biblioteca General Cultural. Quito-Ecuador
- Benjamin, M., Reddy, S., y Brawley, O.W. (2003). *Myeloma and race: A review of the literature*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 22(1), 87–93.
- Borja, J.N., Bravo, R.C., y Morales, R.E. (2014). *Mieloma múltiple: aspectos biológicos, clínicos, diagnóstico, tratamiento con nuevos agentes y estidificación. Revisión de dos casos clínicos*. 2, 87–94. Recuperado el 24 de febrero del 2016 de: <http://editorial.ucsg.edu.ec/medicina/article/viewFile/582/532>

- Bradwell A.R., Carr-Smith H. D., Mead G.P., Tang L. X., Showell P.J., Drayson M. T., Drew R. (2001). *Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine*. *Clinical Chemistry*; 47(4):673-80.
- Brendan, N., Juaristi, J., y Victoria Aguirre, M.R. (2002). *Oncogenes y Genes Supresores de Tumores*. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste.
- Cabrera- Andrade, A., Burgos, G., López-Cortés, A., Herrera, C., Gaviria, A., Tejera, E., y Paz-y-Miño, C. (2016). *A study of the molecular variants associated with lactase persistence in different Ecuadorian ethnic groups*. *American Journal of Human Biology*. [Aceptado]
- Califano, A. (2014). *Cancer Systems Biology: The Future*. In *The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition*. Elsevier Inc.
- Calvo–Villas, J.M., Alegre, A., Alvarez, I., De Arriba, F., Blanes, M., Casado, L., Fisac, R.M., García, J., García, R., Gómez-Rial, J., Gutiérrez, N.C., Hernández, M.T., Hernández, J.M., Jover, R., Lahuerta, J.J., Lourido, D., Martínez, R., Mateos, M., Molero, T., Oliver, C., Del Prado, M., Ríos, P., De la Rubia, J., Rubio, F., Sureda, A., Tapia, M., y Villar, L. (2009). *Mieloma Múltiple Actualización, Momento médico Iberoamericana*. Madrid-España
- Campbell, S. y Tishkoff, M. (2008). *African Genetic Diversity: Implications for Human Demographic History, Modern Human Origins, and Complex Disease Mapping*. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2008; 9: 403–433.
- Campos, L., Barbosa, N. y Martin, G. (2012). *Valor del ensayo de las cadenas ligeras libres en suero para los pacientes de gammapatías monoclonales e insuficiencia renal*. *Nefrología*, 32(1), 15-9.
- Chesi, M. y Bergsagel, P. (2011). *Many Multiple Myelomas: Making more of the molecular mayhem*. *American Society of Hematology (ASH)*.

- Chesi, M. y Bergsagel, P. (2013). *Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates*. International Journal of Hematology, 97, 313–323.
- Cigudosa, J.C., Rao, P.H., Calasanz, M.J., Odero, M.D., Michaeli, J., Jhanwar, S.C. y Chaganti, R.S. (1998). *Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization*. Blood; 91: 3007-3010
- Collins, C. D. (2010). *Multiple myeloma*. Cancer Imaging, 10(1), 20–31.
- Conte, G., Figueroa, G., Lois, V., Cabrera, M.E., León, A., García, H., y Rojas, H. (2007). *Clinical features and survival of Chilean patients with multiple myeloma*. Revista Médica Chile, 135, 1111–1117.
- Conte, G., Braggio, E., Figueroa, G. y Fonseca, R. (2009). *La genética como factor pronóstico y terapéutico en el mieloma múltiple*. Revista Médica Chile, 137(4), 552-558.
- Cueva, P. y Yépez, J. (2014). *Epidemiología del Cáncer en Quito 2006-2010*. Quito, Ecuador: Solca Núcleo Quito.
- Cunningham, F. (2011). *Williams: Obstetricia. (23.a ed)*. México D.F., México: Editorial McGraw-Hill.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., y Thompson, C.B. (2008). *The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation*. Cell Metabolism, 7(1), 11–20.
- Debes-Marun, C., Dewald, G. y Bryant, S. (2003). *Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma*. Leukemia, 17, 427-436.
- DeGiorgio, M., Jakobsson, J. y Rosenberg, N. (2009). *Explaining worldwide patterns of human genetic variation using a coalescent-based serial*

founder model of migration outward from Africa. Proceedings of the National Academy of Sciences. 106(38): 16057-16062

Díaz De la Guardia, R., Catalina, P., Panero, J., Elosua, C., Pulgarin, A., López, M. B., Ayllón, V., Ligeró, G., Slavutsky, I. y Leone, P.E. (2012). *Expression profile of telomere-associated genes in multiple myeloma*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 16(12), 3009–3021.

Dickens, N.J., Walker, B.A., Leone, P. E., Johnson, D.C., Brito, J. L., Zeisig, A., ... Morgan, G.J. (2010). *Homozygous Deletion Mapping in Myeloma Samples Identifies Genes and an Expression Signature Relevant to Pathogenesis and Outcome*. Clinical Cancer 16(6), 1856–1864.

Dimopoulos, M., Richardson, P., Brandenburg, N., Yu, Z., Weber, D., Niesvizky, R. y Morgan, G. (2012). *A review of second primary malignancy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide*. Blood, 119(12), 2764-2767.

Dispenzieri, A., Kyle, R., Katzmann, J., Therneau, T., Larson, D., Benson, J., Clark, R., Melton, J., Gertz, M., Kumar, S., Fonseca, G., Jelinek, D. y Rajkumar, V. (2008). *Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma*. Blood, 111(2), 785-789.

Drineas, P., Lewis, J., y Paschou, P. (2010). *Inferring Geographic Coordinates of Origin for Europeans Using Small Panels of Ancestry Informative Markers*. Public Library of Science ONE 5(8): e11892.

Durie, B. y Salmon, S. (1975). *A clinical staging system for Multiple Myeloma*. Cancer; 36 (9):842-854.

Earl, D.A., y VonHoldt, B.M. (2012). *STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method*. Conservation Genetics Resources, 4(2), 359–361.

- Elosua, C., Purification, C., Walker, B.A., Dickens, N.J., Avramidou, A., Brito, L., Davenport E., Jenner, M.W., González, D., Davies, F.E, Morgan, G.J y Leone, P.E. (2008). *Molecular characterization of Human Multiple Myeloma Cell Lines by Genome-Wide Profiling identifies Kinase Pathway alterations*. Blood, 112(11), 1694.
- Enoch, M., Shen, P., Xu, K., Hodgkinson, C. y Goldman, D. (2006). *Using ancestry-informative markers to define populations and detect population stratification*. Journal of Psychopharmacology. 20: 19.
- Eriksson, M. y Karlsson, M. (1992). *Occupational and other environmental factors and multiple myeloma: a population based case-control study*. British Journal of Industrial Medicine, 49, 95-103.
- Estrada, N.W. (2012). *Revisión de fisiopatología, clínica y diagnóstico de mieloma múltiple*. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica, 69(603), 343-349.
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). *Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study*. Molecular Ecology, 14(8), 2611–2620.
- Fagundes, N.J.R., Kanitz, R. y Bonatto, S.L. (2008). *A Reevaluation of the Native American MtDNA Genome Diversity and Its Bearing on the Models of Early Colonization of Beringia*. Public Library of Science ONE 3(9): e3157.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J. K., Stephens, M., Kidd, M., ... Suerbaum, S. (2003). *Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations*. Science (New York, N.Y.), 299(5612), 1582–5.
- Fantl, D. (2003). *Conceptos breves sobre la enfermedad y las opciones terapéuticas: Mieloma múltiple*. North Hollywood, California: International Myeloma Foundation.

- Fantl, D., Curutchet, M., Kusminsky, G., Labanca, V., Quiroga, L., Sánchez, J.C., y Slavutsky, I. (2010). *Guía Diagnóstica Terapéutica*. Buenos Aires-Argentina.
- Fleuren, E.D.G., Zhang, L., Wu, J., y Daly, R.J. (2016). *The kinome “at large” in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 16(2), 83–98.
- Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P., Chesi, M., Davies, F., Drach, J., Greipp, R., Kirsch, I., Kuehl, M., Hernández, J., Minvielle, S., Pilarski, L., Shaughnessy, J., Stewart, K. y Avet-Loiseau, H. (2004). *Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report*. *Cancer Research*, 64, 1546–1558.
- Fumagalli, D., Desmedt, C., Ignatiadis, M., y Loi, S. (2011). *Gene profiling assay and application: the predictive role in primary therapy*. *Journal National Cancer Institute Monographs*, 2011(43), 124-7.
- García-Sanz, R., Mateos, M.V., San Miguel, J. (2007). *Mieloma múltiple*. *Medicina Clínica Barcelona*, 129(3), 104–115.
- Gaviria, A., Sánchez, M.E., Morejón, G., Vela, M., Aguirre, V., Burgos, G., ... Paz-y-Miño, C. (2013). *Characterization and Haplotype analysis of 11 Y-STR loci in Ecuadorian population*. *Forensic Science International. Genetics Supplement Series*, 4(1), 310–311.
- Geduld, T. (2010). *Reconstruction of major male and female lineages of the Strand Muslim community*. MSc Thesis, Department of Biotechnology, University of the Western.
- Geha, R., y Notarangelo, L. (2012). *Case Studies in Immunology*. Nueva York, Estados Unidos: Garland Science.
- George, E.D., y Sadosky R. (1999). *Multiple Myeloma: Recognition and Management*. State University of New York Health Science Center, Brooklyn, New York. *American Family Physician*. 59(7):1885-1892.

McCormack, V., Znaor, A. y Santos, M.O. (2012). *Population Fact Sheets*. Globocan. Recuperado el 29 de febrero del 2016 de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx

González, F., y Barreto, G. (2013). *Estructura genética, ancestralidad y su relación con los estudios en salud humana*. Revista de los estudiantes de medicina de la universidad industrial de santander. Bucaramanga-Santander-Colombia

González-Andrade, F., Sánchez, D., González-Solórzano, J., Gascón, S., y Martínez-Jarreta, B. (2007). *Sex-specific genetic admixture of Mestizos, Amerindian Kichwas, and Afro-Ecuadorans from Ecuador*. Human Biology; an International Record of Research, 79(1), 51–77.

Greenberg, A.J., Vachon, C.M., y Rajkumar, S.V. (2012). *Disparities in the prevalence, pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma between blacks and whites*. Leukemia. (4): 609–614.

Greipp, P.R., Miguel, J.S., Dune, B.G.M., Crowley, J.J., Barlogie, B., Blade, J., ... Westin, J. (2005). *International staging system for multiple myeloma*. Journal of Clinical Oncology, 23(15), 3412–3420.

Guerra, R. y Yu, X. (2005). *Single Nucleotide Polymorphism and Applications*. Computational Genomics. University of Houston. USA. Ch 16: 309-348: Recuperado el 3 de marzo del 2016 de: http://www.ics.uci.edu/~zhaoxia/publications/other1_Yuzx_comp_genomics_snp_edits.pdf

Guinan, J.E.C., Kenny, D.F., y Gatenby, P. (1989). *Detection and typing of paraproteins: comparison of different methods in a routine diagnostic laboratory*. Pathology 21, 35-41.

Gutiérrez, N.C., Castellanos, M.V, Martín, M. L., Mateos, M.V, Hernández, J.M., Fernández, M., Carrera, D., Rosiñol, L., Ribera, J.M., Ojanguren,

- J.M., Palomera, L., Gardella, S., Escoda, L., Hernández-Boluda, J.C., Bello, J.L., De-La-Ribua, J., Lahuerta, J.J., y San Miguel, J.F. (2007). *Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis*. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Foundation, U.K*, 21, 143–150.
- Gutiérrez, N.C., Hernández, J.M., García, J.L., Cañizo, M.C., González, M., Hernández, J., González, M.B., García-Marcos, M.A., San-Miguel, J.F. (2001). *Differences in genetic changes between multiple myeloma and plasma cell leukemia demonstrated by comparative genomic hybridization*. *Leukemia*;15:840-845.
- Hanahan, D., y Weinberg, R.A. (2011). *Hallmarks of cancer: The next generation*. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hardy, G.H. (1908). *Mendelian Proportions in a Mixed Population*. *Science*, 28(706), 49–50.
- Hellenthal, G., Auton, A., y Falush, D. (2008). *Inferring Human Colonization History Using a Copying Model*. *Public Library of Science Genetics* 4(5): e1000078.
- Hernández, M., y Ríos M. (1999). *Oncogenes y cáncer*. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. *Revista Cubana de Oncología* 15(2), 131–139.
- López, G. (2010). *Censo general a la población ecuatoriana 2010*. Instituto nacional de estadística y censos (INEC). Recuperado el 19 de Marzo de 2016 de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/informacion-censal-cantonal/>
- Jarve, M. (2012). *Different genetic perspectives on human history in Europe and the Caucasus: the stories told by uniparental and autosomal markers*. Tesis para obtención del título PhD. en Biología Molecular. Tartu University

Press. International Standard Book Number, 978–9949–19–988–4.
Recuperado el 23 de marzo del 2016 de:
http://dspace.utlib.ee/dspace/bitstream/handle/10062/25366/jarve_mari.pdf?sequence=1

Jehan, T. y Lakhanpaul, S. (2006). *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Methods and Applications in Plant Genetics. A review*. Indian Journal of Biotechnology. 5: 435-459. Recuperado el 30 de marzo del 2016 de:[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5608/1/IJBT%205\(4\)%20435-459.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5608/1/IJBT%205(4)%20435-459.pdf)

Jenner, M.W., Leone, P.E., Walker, B.A., Ross, F.M., Johnson, D. C., Gonzalez, D., ... Morgan, G.J. (2007). *Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma*. Blood, 110(9), 3291–3300.

Jorde, L., Watkins, W., y Bamshad, N. (2001). *Population Genomics: A bridge from Evolutionary History to genetic medicine*. Human molecular genetics. 10 (20): 2199-2207.

Katzmann, J.A., Clark, R.J., Abraham, R.S., Bryant, S., Lymp, J.F., Bradwell, A.R., y Kyle, R.A. (2002). *Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains*. Clinical Chemistry 48(9):1437-44.

Kelley, W.N. (1992). *Medicina Interna. Segunda edición*. Madrid, España: PANAMERICANA S.A.

Kenneth, A. (2011). *Multiple Myeloma: A Clinical Overview*. Oncology, 25(2), 3-9.

- Knudsen, L.M., Hjorth, M., y Hippe, E. (2000). *Renal failure in multiple myeloma: reversibility and impact on the prognosis*. Nordic Myeloma Study Group. *European Journal of Haematology*, 65(8), 175–181.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., y Mayrose, I. (2015). *Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K*. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179–91.
- Kosoy, R., Nassir, R., Tian, C., White, W., Butler, W., Silva, W., Kittles, R., Alarcon-Riquelme, M., Gregersen, P., Belmont, J., De La Vega, F., y Seldin, M. (2009). *Ancestry Informative Marker Sets for Determining Continental Origin and Admixture Proportions in Common Populations in America*. *Human Mutation*. January; 30(1): 69–78.
- Kumar, S., Mikhael, J., Buadi, F., Dingli, D., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Gertz, P.R., Hayman, S.R., Kyle, R.A., Lacy M.Q., Lust, J.A., Reeder, C.B., Roy, V., Russell, S.J., Short, K.E., Stewart, A.K., Witziq, T.E., Zeldenrust, S.R., Dalton, R.J., Rajkumar, S.V., Bergsagel, P.L. (2009). *Management of newly diagnosed symptomatic Multiple Myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines*. *Mayo Clinic Proceedings*. 84(12):1095-1110.
- Kwok, P. (2001). *Methods For Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms*. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2:235–58. Recuperado el 3 de abril del 2016 de: <http://shop.perkinelmer.co.uk/content/snps/pdfs/reviewkwok.pdf>
- Kwok, P. y Chen, X. (2003). *Detection of Single Nucleotide Polymorphisms*. *Current Issues in Molecular Biology* 5: 43-60. Recuperado el 9 de abril del 2016 de: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&ved=0CDsQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F10718782_Detection_of_single_nucleotide_polymorphism

s%2Ffile%2F50463513f5ce05f36c.pdf&ei=ExqRUYbINsSX0QHa6IDQAg&usg=AFQjCNFsLYQ-3yGImQ8yzAtFkM9Oms_Olw&sig2=Brjcqw2qYavOllrf9erZPg&bvm=bv.46340616,d.dmQ

- Kyle, R.A., Gertz, M. a, Witzig, T.E., Lust, J. a, Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., ... Greipp, P. R. (2003). *Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic, 78(1), 21–33.
- Kyle, R.A., y Rajkumar, S.V. (2008). *Multiple myeloma ASH 50th anniversary review Multiple myeloma*. Blood 2008, 111(6), 2962–2972.
- Kyle, R. y Rajkumar, S. (2009). *Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma*. Leukemia, 23, 3-9.
- Laubenbacher, R., Hower, V., Jarrah, A., Torti, S. V, Mendes, P., Torti, F. M., y Akman, S. (2010). *A Systems Biology View of Cancer*. 1796(2), 129–139.
- Leone, P.E., Walker, B.A., Jenner, M.W., Chiecchio, L., Dagrada, G.P., Protheroe, R.K.M., Johnson, D., Brito, J.L., Else, M., Gonzalez, D., Ross, F.M., Chen-Kiang, S., Davies, F.E. y Morgan, G.J. (2008). *Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: Biological and clinical implications*. Clinical Cancer Research, 14(19), 6033-6041.
- Leone, P.E., Montesdeoca, B., Chiluzza, D., Morales, I., Sánchez, M.E., Buenaño, M.E., Cevallos, F., Espín, H., Ocampo, L. y Paz-y-Miño, C. (2013). *Datos de Ecuador en la red iberoamericana para la investigación de mieloma múltiple*. Revista Oncológica Ecuatoriana Volumen 23(1), 7–16.
- Lewis, D.R., Pottern, L.M., Brown, L.M., Silverman, D.T., Hayes, R.B., Schoenberg, J.B., ... Hoover, R.N. (1994). *Multiple myeloma among Blacks and Whites in the United States: the role of chronic antigenic stimulation*. Cancer Causes and Control, 5, 529–539.

- Li, J.Z., Absher, D.M., Tang, H., Southwick, A.M., Casto, A.M., Ramachandran, S., . . . Myers, R.M. (2008). *Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation*. *Science*, 319(5866), 1100-1104.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. y Scott, M.P. (2005). *Biología celular y molecular (Quinta ed.)*. Buenos Aires: Panamericana.
- Lonial, S. (2007). *Designing risk-adapted therapy for Multiple Myeloma: the Mayo perspective*. *Mayo Clinic Proceedings*. 82 (3):279-281.
- López-Corral, L., García-Sanz, R., y San Miguel, J. F. (2010). *Aplicaciones del test sérico de cadenas ligeras libres en las gammopatías monoclonales*. *Medicina Clínica*, 135(8), 368–374.
- Majumder, P. (2010). *The Human Genetic History of South Asia*. *Review Current Biology* 20, R184–R187.
- Manciola, F. y Stemberg, E. (2013). *Mieloma Múltiple e injuria renal*. *Hematología*, 17(3), 256-265.
- Markoulatus, J., Siafakas, N., y Moncany, M. (2002). *Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach*. Greece.
- Martinez, L. (2011). *Estructura Genética de la Población de Guatemala. Aplicaciones en el campo antropológico y forense*. Tesis Doctoral: Universidad de Granada. Guatemala. Recuperado el 16 de abril del 2016 de: <http://hera.ugr.es/tesisugr/20353716.pdf>
- Martínez-Fernández, M.L., Sánchez-Izquierdo, M.D., y Martínez-Frías, M.L. (2010). *Resumen de la evolución de las técnicas de citogenética y genética molecular para la identificación de las alteraciones genéticas del desarrollo embrionario*. *Semergen*, 36(9), 520–525. <http://doi.org/10.1016/j.semerng.2010.09.002>

- Massagué, J. (2009). *Evolución y metástasis del cáncer*. 22–25. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM).
- McKeigue, P., Carpenter, J., Parra, E., y Shriver, M. (2000). *Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: application to African-American populations*. *Annals of Human Genetics*.
- Medina-Villaseñor, E.A., Martínez-Macías, R. (2009). *Fundamentos de Oncología*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, D.F., México. 611 pp.
- Meng, X., Zhong, J., Liu, S., Murray, M., y Gonzalez-Angulo, A. M. (2012). *A new hypothesis for the cancer mechanism*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1-2), 247–268.
- Menoni, B. y Da Silva, A. (2010). *Mieloma Múltiple: Translocaciones más importantes y sus implicaciones en el pronóstico de la enfermedad*. *Acta Científica Estudiantil*, 8(1), 15-22.
- Merriwether, A. (2003). *The evolution and genetics of Latin American populations*. *American Journal of Human Biology*, 15(4), 595–596.
- Mikhael, J.R., Dingli, D., Roy, V., Reeder, C.B., Buadi, F.K., Hayman, S.R., ... Lacy, M.Q. (2013). *Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: Updated mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (msmart) consensus guidelines 2013*. *Mayo Clinic Proceedings*, 88(4), 360–376.
- Molinas, F. (2009). *Mieloma múltiple*. Recuperado el 17 de diciembre del 2015 de: <http://es.slideshare.net/FERPY/mieloma-mltiple>
- Mulligan, C., Hunley, K., Cole, S., y Long, J. (2004). *Population genetics, history, and health patterns in native Americans*. *Annual Review of Genomics and human Genetics*, 5, 295-315.

- Muñoz A., (1997). *Cáncer, Genes y Nuevas Terapias*. Madrid, España: Editorial Hélice.
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology*. New York, NY: Garland Science.
- National Cancer Institute. (2015). *Plasma Cell Neoplasms (Including Multiple Myeloma)-Patient Version*. Recuperado el 12 de marzo del 2016 de: <http://www.cancer.gov/types/myeloma>
- Ortiz, C. (2011). *De las células plasmáticas al mieloma múltiple. Una breve perspectiva histórica*. *Patología*; 49(2):120-131
- Palumbo, A., Anderson, K. (2011). *Multiple Myeloma*. *The New England Journal of Medicine (N Engl J Med)*. 36410461060.
- Partanen, T., Monge, P., y Wesseling, C. (2009). *Revisión Causas y prevención del cáncer ocupacional (Causes and Prevention of Occupational Cancer)*, (1), 195–205.
- Paz-y-Miño, C., Saltos, J.C, Sánchez, M.E., Burgos, R., Pérez, C., Dávalos, V., y Leone, P.E. (1999). *Distrofia Muscular de Duchenne: Detección de mutaciones del gen de la distrofia a través de la utilización de la PCR-multiplex*. *Revista MetroCiencia* 8(1), 5-8.
- Paz-y-Miño, C., Burgos, R., Morillo, S.A., Santos J. C., Fiallo, B.F. y Leone, P.E. (2002). *BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador South America*. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 132:65–67.
- Paz-y-Miño, C., Tapia, A., Arévalo, M., Muñoz, M.J., Llumipanta, W., Oleas de la Carrera, G. y Sánchez, M.E. (2008). *Polymorphic variants of the mitochondrial cytochrome b gene (CYB) in the Ecuadorian population*. *Revista Española de Antropología Física* 28:95–101.

- Paz-y-Miño, C. (2014). *La historia del Ecuador contada por los genes. En: Historia de las Ciencias en el Ecuador*. Academia Nacional de Historia y Yachay. Quito. pp. 29-44.
- Pereira, R., Phillips, C., Pinto, N., Santos, C., Santos, S.E.Bd., Amorim, A., Carracedo, Á. y Gusmão, L. (2012). *Straightforward Inference of Ancestry and Admixture Proportions through Ancestry-Informative Insertion Deletion Multiplexing*. Public Library of Science ONE 7(1): e29684.
- Phekoo, K. J., Schey, S. A., Richards, M. A., Bevan, D. H., Bell, S., Gillett, D., y Møller, H. (2004). *A population study to define the incidence and survival of multiple myeloma in a National Health Service Region in UK*. British Journal of Haematology, 127(3), 299–304.
- Pierce B.A. (2006). *Genética: Un enfoque conceptual (Segunda ed.)*. Barcelona, España: Panamericana. 9788479038892
- Plagnol, V., y Wall, J.D. (2006). *Possible ancestral structure in human populations*. Public Library of Science Genetic 2(7): e105.
- Powell, J.R., y Wright, S. (1979). *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4: Variability within and among Natural Populations*. JSTOR. Recuperado el 30 de marzo del 2016 de: https://books.google.com.ec/books?id=q0RDJf3K_aUC&pg=PA5&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q&f=false
- Prideaux, S., O'brien. E. y Chevassut, T. (2014). *The Genetic Architecture of Multiple Myeloma*. Advances in Hematology, 2014, 1-16.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). *Inference of population structure using multilocus genotype data*. Genetics, 155(2), 945–59. Recuperado el 23 de enero del 2016 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835412>

- Rajkumar, S.V., y Kyle, R.A. (2005). *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment*. Mayo Clinic Proceedings, 80(10), 1371–1382.
- Ramachandran, S., Deshpande, O., Roseman, C. C., Rosenberg, N., Feldman, M. W., y Cavalli-Sforza, L.L. (2005). *Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(44), 15942-15947.
- Raymond, M. y Rousset, F. (1995). *GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism*. J. Heredity, 86, 248–248. Recuperado el 21 de abril del 2016 de: <http://jhered.oxfordjournals.org/content/86/3/248.full.pdf+html>
- Robbins y Contran. (2010). *Patología estructural y funcional (Octava ed.)*. Barcelona, España: Elsevier. 9788480866606.
- Rosenberg, N.A., Burke, T., Elo, K., Feldman, M.W., Freidlin, P. J., Groenen, M.A., ... Weigend, S. (2001). *Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds*. Genetics, 159(2), 699–713. Recuperado el 25 de enero del 2016 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606545>
- Rosenberg, N., Pritchard, J., Weber, J., Cann, H., Kidd, K., Zhivotovsky, L., y Feldman, M.W. (2002). *Genetic Structure of Human Populations*. Science, 298, 2381-2385.
- Rousset, F. (2008). *genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux*. Molecular Ecology Resources, 8(1), 103–106.
- Ruiz-Delgado, G., Gómez, J. (2004) *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) in Mexican mestizo: one institution's experience*. Gaceta Médica de México; 140(4):275-9.

- Salzano, F., y Bortolini, M. (2002). *The Evolution and Genetics of Latin American Populations*. Cambridge University Press
- Santos, N., Ribeiro-Rodrigues, E., Ribeiro-dos-Santos, K., Pereira, R., Gusmao, L., Amorim, A., Guerreiro, J., Zago, M., Matte, C., Hutz, M. y Santos, S. (2009). *Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48-Insertion-Deletion (INSEL) Ancestry-Informative Marker (AIM) Panel*. *Human Mutation*, 31(2), 184–190.
- Smadja, N.V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D. y Fruchart, C. (2001). *Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma*. *Blood*, 12(5), 344–353. Recuperado el 17 de febrero del 2016 de: <http://bloodjournal.org/content/bloodjournal/98/7/2229>
- Sprouffske, K., Merlo, L.M.F., Gerrish, P.J., Maley, C.C. y Sniegowski, P.D. (2012). *Cancer in Light of Experimental Evolution*. National Institute of Health. *Current Biology*. 2012 September 11; 22(17): R762–R771.
- Stefflova, K., Dulik, M.C., Barnholtz-Sloan, J.S., Pai, A.A., Walker, A.H. y Rebbeck, T.R. (2011). *Dissecting the Within-Africa Ancestry of Populations of African Descent in the Americas*. *Public Library of Science ONE* 6(1): e14495.
- Stewart, A.K. y Fonseca, R. (2005). *Prognostic and therapeutic significance of myeloma genetics and gene expression profiling*. *Journal of Clinical Oncology*; 23: 6339-43
- Tang, H., Coram, M., Wang, P., Zhu, X., y Risch, N. (2006). *Reconstructing genetic ancestry blocks in admixed individuals*. *American Journal of Human Genetics*, 79(1), 1–12.
- Therneau, T. M., Kyle, R.A., Melton, L.J., Larson, D. R., Benson, J.T., Colby, C.L., ... Rajkumar, S.V. (2012). *Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition*. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(11), 1071–1079.

- Tian, C., Kosoy, R., Lee, A., Ransom, M., Belmont, J.W., Gregersen, P. y Seldin, M. (2008). *Analysis of East Asia Genetic Substructure Using Genome-Wide SNP Arrays*. Public Library of Science ONE 3(12): e3862.
- Tian, C., Kosoy, R., Nassir, R., Lee, A., Villoslada, P., Klareskog, L., Hammarström, L., Garchon, H., Pulver, A., Ransom, R., Gregersen, P. y Seldin, M. (2009). *European Population Genetic Substructure: Further Definition of Ancestry Informative Markers for Distinguishing among Diverse European Ethnic Groups*. Molecular medicine 15 (11-12) 371-383.
- Twyman, R. (2005). *Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Techniques—An Overview*. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. Marcel Dekker, Inc. Recuperado el 21 de marzo del 2016 de: <http://www.writescience.com/RMT%20PDFs/Elsevier/Twyman%2005%20EMGP.pdf>
- Väli, U., Brandström, M., Johansson, M. y Ellegren, H. (2008). *Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations*. BMC Genetics 2008, 9:8. Recuperado el 1 de mayo del 2016 de: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/9/8>
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A. y Hays J. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Ámsterdam, Países Bajos: Springer Science & Business Media.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van-de-Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kulper, M., y Zabeau, M. (1995). *A new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research, 44(21), 388–396
- Wagner, R.P. (1999). *Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics. Rudolph Virchow and the genetic basis of somatic ecology*. Genetics, 151(3), 917–20. Recuperado el 27 de abril del 2016 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049910>

- Wakeley, J., Nielsen, R., Liu-Cordero, S.N. y Ardlie, K. (2001). *The Discovery of Single-Nucleotide Polymorphisms—and Inferences about Human Demographic History*. *American Journal of Human Genetics*, 69:1332–1347
Recuperado el 3 de febrero del 2016 de:
<http://www.oeb.harvard.edu/faculty/wakeley/john/Reprints/WakeleyEtAl01.pdf>
- Walker, B.A., Leone, P.E., Jenner, M.W., Li, C., Gonzalez, D., Johnson, D.C., Ross, F.M., Davies, F.E., Morgan, G. J. (2006). *Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma*. *Blood*, 108(5), 1733–1743.
- Walker, B.A., Leone, P.E., Chiecchio, L., Dickens, N.J., Jenner, M.W., Boyd, K.D., Johnson, D.C., Gonzalez, D., Dagrada, G.P., Protheroe, R.K.M., Konn Z.J., Stockley, D.M., Gregory, W.M., Davies, F.E., Ross, F.M., y Morgan, G.J. (2010). *A compendium of myeloma associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value*. *Blood* 116(15), e56-65
- Waxman, A. J., Mink, P. J., Devesa, S. S., Anderson, W. F., Weiss, B. M., Kristinsson, S. Y., ... Landgren, O. (2016). *Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study*. *Blood* 116(25), 5501–5507.
- Werner, H., Mills, G.B., y Ram, P.T. (2014). *Cancer Systems Biology: a peak into the future of patient care ?*. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 11(3), 167–176.
- Wright, S. (1931). *Evolution in Mendelian Populations*. *Genetics*, 16(2), 97–159.
Recuperado el 21 de enero del 2016 de:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1201091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Xu, W., Zhai, Z., Huang, K., Zhang, N., Yuan, Y., Shang, Y., y Luo, Y. (2012). *A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis*. Public Library of Science ONE, 7(1).
- Yuregir, O.O., Sahin, F.I., Yilmaz, Z., Kizilkilic, E., Karakus, S., y Ozdogu, H. (2009). *Fluorescent in situ hybridization studies in multiple myeloma*. Hematology (Amsterdam, Netherlands), 14(2), 90–4.
- Zepeda, V.H.J., y Leyva, E.M. (2007). *Enfermedad ósea en mieloma múltiple: Biología y tratamiento*. Medicina Interna de México, 23(2), 126–132.
- Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., Anaissie, E., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Tricot, G., Van-Rhee, F., Walker, R., Zangari, M., Crowley, J., Barlogie, B., y Shaughnessy, J. (2006). *The molecular classification of Multiple Myeloma*. Blood;108(6):2020-8.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico de la edad de los pacientes involucrados en el estudio de relación de ancestría con mieloma múltiple.

	Pacientes masculinos	Pacientes femeninos	Pacientes totales
Número total	36	28	64
Número de valores agrupados	36	28	65
Mínimo	32	45	32
Percentil al 25%	58	57	57
Mediana	65	61	65
Percentil al 75%	74,5	74,75	74,5
Máximo	83	83	83
Media	63,2162	64,8571	63,9231
Desviación estándar	12,8455	11,191	12,0964
Error estándar de la media	2,11179	2,1149	1,50037
Mínimo de la media con un intervalo de confianza de 95%	58,9333	60,5177	60,9258
Máximo de la media con un intervalo de confianza de 95%	67,4992	69,1966	66,9204

Anexo 3. Pruebas de normalidad realizadas a los datos de las edades de los pacientes involucrados en el estudio.

	Muestra total	grupo 1 (30-40 años)	grupo 2 (40-50 años)	grupo 3 (50-60 años)	grupo 4 (60-70 años)	grupo 5 (70-80 años)	grupo 6 (80-90 años)
D'Agostino y Pearson prueba de normalidad ómnibus							
K2	3,919	N muy pequeña	N muy pequeña	5,446	1,42	1,278	N muy pequeña
Valor P	0,141			0,0657	0,4916	0,5279	
Prueba de normalidad (alfa=0.05)	Si			Si	Si	Si	
Resumen del valor P	ns			ns	ns	ns	
Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk							
W	0,9613	N muy pequeña	N muy pequeña	0,8338	0,9414	0,9266	N muy pequeña
Valor P	0,0402			0,0135	0,2551	0,1691	
Prueba de normalidad (alfa=0.05)	No			No	Si	Si	
Resumen del valor P	*			*	ns	ns	
Prueba de normalidad KS							
Distancia KS	0,08116	N muy pequeña	0,2271	0,2416	0,1479	0,1995	0,3302
Valor P	0,2		0,2	0,0261	0,2	0,0564	0,0788
Prueba de normalidad (alfa=0.05)	Si		Si	No	Si	Si	Si
Resumen del valor P	ns		ns	*	ns	ns	ns
Suma	4155	102	230	783	1281	1348	411

Anexo 4. Análisis de varianza (ANOVA) de las edades de la población total en relación a diferentes rangos de edades para los pacientes involucrados en el estudio.

Prueba estadística	Total de edades vs Rango de edades	Mean Diff	Significancia (p=0,05)	Summary
Prueba de comparación múltiple de Dunnett	Muestra total vs. grupo 1 (30-40 años)	29,92	Si	****
	Muestra total vs. grupo 2 (40-50 años)	17,92	Si	***
	Muestra total vs. grupo 3 (50-60 años)	7,995	Si	*
	Muestra total vs. grupo 4 (60-70 años)	-	No	ns
		0,1269		
		-10,97	Si	****
Prueba de comparación múltiple de Dunn	Muestra total vs. grupo 6 (80-90 años)	-18,28	Si	***
	Muestra total vs. grupo 1 (30-40 años)	62	Si	*
	Muestra total vs. grupo 2 (40-50 años)	54	Si	*
	Muestra total vs. grupo 3 (50-60 años)	35	Si	**
	Muestra total vs. grupo 4 (60-70 años)	1	No	ns
	Muestra total vs. grupo 5 (70-80 años)	-37	Si	**
	Muestra total vs. grupo 6 (80-90 años)	-60	Si	**

Anexo 5. Resultados del análisis estadístico de los parámetros clínicos en relación a la estructura poblacional de los pacientes afectados con mieloma múltiple. La “columna A” corresponde a los pacientes con mayor ancestría americana y la “columna B” con los de mayor ancestría europea.

	Plaquetas	Creatinina	Ca ²⁺
Media ± SEM de la columna A	273084 ± 25296	0,9798 ± 0,08151	7,367 ± 0,6414
Media ± SEM de la columna B	280646 ± 38170	1,113 ± 0,09454	6,954 ± 0,5738
Diferencia entre medias	7563 ± 44680	0,1335 ± 0,1242	-0,4133 ± 0,8797
Intervalo de confianza al 99%	-111901 to 127026	-0,1987 to 0,4658	-2,775 to 1,948
R cuadrado	0,0005506	0,02218	0,004675
Prueba F para comparar varianzas			
F,DFn, Dfd	1,963, 24, 28	1,201, 24, 27	1,534, 26, 21
Valor P	0,0879	0,6414	0,3204
Resumen del valor P	ns	ns	ns
Significativamente diferentes (P < 0.05)	No	No	No