



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS E319G, P388T Y D32E DEL GEN
AKT1 EN LA POBLACIÓN ECUATORIANA CON MIELOMA MÚLTIPLE.

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

Profesora Guía

PhD Paola Elizabeth Leone Campo

Autora

Grace Estefanía Zavala Viteri

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”.

Grace Estefanía Zavala Viteri

C.I. 1722484456

AGRADECIMIENTOS

Aprovecho esta oportunidad para agradecer al Instituto de Investigaciones Biomédicas por abrirme las puertas para trabajar en este proyecto. A mi tutora Paola por sus enseñanzas y dedicación durante todo este tiempo.

Gracias a todas las personas que estuvieron durante el desarrollo de este proceso, en el que pude sentir su incondicional apoyo y ánimos para culminar de la mejor manera esta faceta.

DEDICATORIA

A Dios por renovar mis fuerzas cada día para poder enfrentar las adversidades y darme sabiduría en las situaciones difíciles.

A mis padres por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años. Gracias por impulsarme a seguir adelante y no desmayar nunca. Gracias por ser mi guía y soporte en cada momento.

A mi hermano por estar siempre a mi lado y alentarme a alcanzar mis sueños.

RESUMEN

El mieloma múltiple es una enfermedad causada por la degeneración maligna de las células plasmáticas, originando una proliferación anormal de las mismas. Actualmente, esta enfermedad representa el 1% de todas las neoplasias y la incidencia mundial es de 0,2 a 5,1 casos por 100.000 habitantes por año. En un estudio previo, se evidenció alteraciones en el grupo de proteínas quinasas. Se conoce que el gen *AKT1* codifica una serina-treonina quinasa, la cual está implicada en el crecimiento, proliferación y supervivencia celular, por lo que es de alta importancia a nivel oncológico. A pesar de esto, hasta el momento no se han reportado mutaciones de forma masiva para este gen en mieloma múltiple. Razón por la cual se correlacionó la presencia de los polimorfismos E319G, P388T, D32E del gen *AKT1* con datos clínicos, clasificación cromosómica y supervivencia en pacientes ecuatorianos con mieloma múltiple en el presente estudio. Sin embargo, se encontró que no existen los SNPs antes mencionados en pacientes con la enfermedad y controles de diferentes grupos étnicos. No obstante, se evidenció la presencia de otros polimorfismos durante la amplificación de estos fragmentos, estos fueron rs2494732, rs3803304 y rs35622471. Adicionalmente se identificaron 3 nuevas variantes aún no registradas en el NCBI, en las posiciones 104.772.763, 104.772.762 y 104.772.760. Después de realizar el análisis estadístico relacionando la frecuencia de los polimorfismos entre el grupo afecto y control, se determinó que rs2494732 y 104.772.763 arrojan una distribución distinta entre ambos grupos ($p < 0,05$). Asimismo, se evidenció que rs2494732 y 104.772.763 no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg dentro de la población investigada. También, los genotipos C/C y C/C+C/G del polimorfismo 104.772.763 presentan una relación con el riesgo de desarrollar mieloma múltiple. De igual manera al correlacionar los polimorfismos con los historiales clínicos se encontraron valores significativos para albúmina y beta-2-microglobulina en los SNPs 104.772.763 y rs2494732 respectivamente, por lo que estos podrían estar implicados la progresión de la enfermedad. Los resultados del presente estudio sirven de base para poder profundizar sobre este gen y comprender su rol en el mieloma múltiple y la población ecuatoriana.

Palabras clave: mieloma múltiple, gen *AKT1*, polimorfismos, población ecuatoriana

ABSTRACT

Multiple myeloma is a malignant disease caused by degeneration of plasma cells, facilitating an abnormal proliferation of them. Actually, this disease represents 1% of all cancer malignancies and the global incidence is 0.2 to 5.1 cases per 100,000 men and women per year. In a previous study, changes were evident in the group of protein kinases. It is known that the *AKT1* gene encodes a serine-threonine kinase, which is involved in growth, proliferation and cell survival, so it is really important in cancer. Despite this, at the moment there have not been reported mutations for this gene in multiple myeloma massively. That is why the presence of the polymorphisms of *AKT1* gene E319G, P388T, D32E were correlated with clinical data, chromosome classification and survival in Ecuadorian patients with multiple myeloma in this study. However, the SNPs previously mentioned were not present in patients with the disease and controls of different ethnic groups. But during the amplification of these fragments, the presence of other polymorphisms was evidenced, these were rs2494732, rs3803304 and rs35622471. Additionally, three new variants that are not registered in the NCBI were identified on 104.772.763, 104.772.762 and 104.772.760 positions. After performing statistical analysis relating the frequency of polymorphisms between affect and control groups, it was determined that rs2494732 and 104772763 show a different distribution between the two groups ($p < 0.05$). It was also found that rs2494732 and 104,772,763 are not in Hardy-Weinberg equilibrium within the researched population. Moreover, genotypes C/C and C/C+C/G of 104.772.763 polymorphism have a relationship with the risk of developing multiple myeloma. Similarly, in the correlation of polymorphisms with clinical histories there were found significant values for albumin and beta-2-microglobulin with the SNPs rs2494732 and 104 772 763 respectively, so these could be implicated in disease progression. The results of this study provide the basis to understand this gene and its role in multiple myeloma and Ecuadorian population.

Keywords: multiple myeloma, *AKT1* gene, polymorphisms, Ecuadorian population

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 Biología y patogenia del mieloma múltiple	5
2.1.1 Origen y características de la célula mielomatosa	5
2.1.2 Patogenia del mieloma múltiple	9
2.1.3 Clasificación cromosómica	11
2.1.4 Estadaje del mieloma múltiple	12
2.1.5 Factores de riesgo	13
2.2 Diagnóstico clínico del mieloma múltiple y de sus complicaciones.....	15
2.2.1 Manifestaciones clínicas	15
2.2.2 Complicaciones infecciosas.....	17
2.2.3 Exámenes de laboratorio	18
2.3 Genética molecular del mieloma múltiple.....	23
2.3.1 Ruta PI3K/AKT1/mTOR	23
2.3.2 Gen <i>AKT1</i>	25
2.3.3 Polimorfismos de nucleótido simple de <i>AKT1</i>	26
3.CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	28
3.1 Recolección de muestras patológicas y controles.....	28
3.2 Extracción de ADN.....	29
3.2.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica.....	29
3.2.2 Extracción de ADN a partir de médula ósea	30
3.3 Cuantificación de ADN	30

3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
3.4.1 Diseño de cebadores específicos para los polimorfismos E319G, P388T, y D32E	31
3.4.2 Amplificación de los polimorfismos del gen <i>AKT1</i>	32
3.5 Electroforesis horizontal convencional	34
3.6 Secuenciación de ADN mediante electroforesis capilar	35
3.6.1 Purificación de producto de PCR mediante método AMPure	36
3.6.2 Reacción en Cadena de la polimerasa de secuenciación.....	37
3.7 Alineamiento de secuencias	39
3.8 Análisis estadístico.....	39
4.CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	41
4.1 Historias Clínicas.....	41
4.1.1 Edad	41
4.1.2 Género.....	42
4.1.3 Clasificación citogenética.....	42
4.1.4 Estadio de la enfermedad	43
4.1.5 Tiempo de supervivencia	44
4.1.6 Características inmunológicas	45
4.1.7 Parámetros hematológicos	46
4.2 Extracción de ADN de muestras patológicas y controles	48
4.3 Amplificación de los polimorfismos	48
4.4 Secuenciación de ADN mediante electroforesis capilar	50
4.5 Alineamiento de secuencias	53
4.6 Determinación de haplotipos	67
4.7 Análisis estadístico.....	69
4.7.1 Equilibrio Hardy-Weinberg en la población	69
4.7.2 Prueba de odds-ratio entre grupo afecto y control.....	70
4.7.3 Análisis estadístico entre polimorfismos e historias clínicas	71
4.7.4 Análisis estadístico entre haplotipos e historias clínicas.....	72
5.CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....	73

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
6.1 Conclusiones	85
6.2 Recomendaciones	86
7. REFERENCIAS	88
8. ANEXOS	99

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Según un estudio retrospectivo realizado en Centroamérica se identificó que el primer caso de mieloma múltiple había sido diagnosticado en el año de 1845, ya que este era confundido con otro tipo de enfermedades (Estrada, 2012, p. 343). Esta enfermedad representa el 1% de todos los tumores malignos, el 10% de las neoplasias hematológicas y el 2% de las muertes a razón de cáncer (Sabín, 2013). La incidencia reportada a nivel mundial oscila entre aproximadamente 114.000 casos nuevos anualmente (Globocan, 2012). Sin embargo, en el Ecuador su incidencia es de 91 casos nuevos para hombres y 64 para mujeres por cada 100.000 habitantes (Cueva y Yépez, 2014, p. 43).

Este tipo de cáncer se presenta principalmente en la población adulta, en un rango de edad de 65 y 70 años, con una supervivencia media de tan solo tres años. Es una enfermedad con una alta morbilidad y mortalidad causada por las infecciones. Sin embargo, se ha podido determinar que existe una mayor frecuencia en la raza negra y en el sexo masculino (Ries, Eisner y Kosary, 2005).

Actualmente, se desconoce el origen de esta enfermedad, pero se ha podido determinar que existe mayor susceptibilidad a contraer la misma según el oficio al que cada persona se dedica. Se ha visto que la exposición a genotóxicos (insecticidas, herbicidas, y metales pesados) puede aumentar el riesgo de contraer cáncer (Alavanja, Ross y Bonner, 2013, p. 122). De acuerdo a Eriksson y Karlsson (1992, p. 100), los agricultores tienen una mayor vulnerabilidad ante esta enfermedad debido a la exposición prolongada a sustancias químicas como pesticidas. No obstante, no se encontró una relación entre la exposición a solventes orgánicos y la factibilidad de adquirir mieloma múltiple.

Los estudios epidemiológicos y/o genéticos en mieloma múltiple son escasos en Latinoamérica, únicamente Argentina, Brasil, Chile y México presentan información perteneciente a esta enfermedad y a nivel nacional hay pocos datos (Leone *et al.*, 2013, p. 9; Paz y Miño *et al.*, 2013, p. 109).

A nivel mundial se han realizado un sin número de investigaciones genéticas en esta enfermedad debido a su relevancia en la salud, lo que ha permitido clasificar a los casos con mieloma múltiple (MM) en dos grupos basados en la distribución del número cromosómico: hiperdiploides y no hiperdiploides. Estas alteraciones guardan relación con el pronóstico de los enfermos, siendo el grupo con translocaciones cromosómicas o no hiperdiploides el de peor evolución (Debes-Marun, Dewald y Bryant, 2003, pp. 427-436).

La introducción de tecnologías de alta resolución han permitido avanzar en el conocimiento de las alteraciones genéticas del MM. Así, en un estudio previo realizado en líneas celulares por arrays de mapeo genético, se evidenció alteraciones en el grupo de proteínas quinasas (Elosua *et al.*, 2008, p. 1694; Leone *et al.*, 2009, p. 942).

Se conoce que el gen *AKT1* codifica una serina-treonina quinasa la cual está implicada en el crecimiento, proliferación y supervivencia celular, por lo que es de alta importancia a nivel oncológico. Es por ello que hoy en día se están desarrollando fármacos específicos para la regulación de *AKT*, presentando así un posible tratamiento para esta enfermedad incurable (Vivanco y Sawyers, 2002, p. 490).

De acuerdo a análisis informáticos se ha reportado alrededor de 22 mutaciones puntuales del gen antes mencionado, donde las más destacadas son: E17K, E319G, L357P, P388T, D32E, T479M, A399T, R69Q, R406H, H143Y y E17S. Siendo en su mayoría perjudiciales para el ADN, alterando la función y estabilidad de ciertas proteínas, y a su vez desencadenando enfermedades terminales como el cáncer. Específicamente los polimorfismos E319G, P388T y

D32E exhiben características de potencial daño en la estabilidad y función de la proteína para la que codifica, y por lo tanto mayor susceptibilidad de causar enfermedades (Shanthi, Rajasekaran y Ramanathan, 2014, pp. 959-961).

En el presente trabajo se plantea contribuir al conocimiento científico mundial con la descripción del estado del MM en el Ecuador, a través de establecer el papel de los polimorfismos E319G, D32E, P388T del gen *AKT1* mediante la asociación con datos clínicos y citogenéticos.

1.2 Justificación

El mieloma múltiple al ser una enfermedad muy agresiva tiene un pronóstico de vida muy bajo, alrededor de 3 años (Neira, Morán, Correa y Estrada, 2014, p. 88). Esta patología es muy frecuente en otros países, sin embargo, datos preliminares de Globocan (2012) indican que la incidencia en Ecuador es ligeramente menor que la reportada mundialmente.

A pesar de la aparición de importantes avances terapéuticos, la enfermedad continúa siendo incurable, razón por la cual la mayoría de pacientes fallece rápidamente después del diagnóstico. A nivel mundial existen estudios realizados en líneas celulares con MM para evaluar la influencia del gen *AKT1*, perteneciente al grupo de proteínas quinasas. Sin embargo, en estas investigaciones no se ha considerado el rol de los polimorfismos de este gen en el desarrollo de la enfermedad. Es por ello que la presente investigación pretende caracterizar clínica y genéticamente a los pacientes ecuatorianos mediante la evaluación de los polimorfismos E319G, P388T y D32E del gen *AKT1*. Esta investigación brindará conocimiento netamente teórico para que posteriormente pueda ser aplicado de manera práctica.

Es así que la socialización de los resultados beneficiará a la comunidad científica ya que servirá como base para futuras investigaciones, así como el diseño de medicamentos de acuerdo a las diferencias genéticas. Esto permitirá

mejorar la calidad de vida de los pacientes y a su vez aumentar la tasa de supervivencia. Adicionalmente, los datos obtenidos podrán entrar a una base de datos a nivel nacional e internacional con el fin de comprender mejor el mecanismo de acción de este cáncer y poder establecer diferencias patológicas según la situación geográfica y étnica.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Correlacionar la presencia de los polimorfismos E319G, P388T, D32E del gen *AKT1* con datos clínicos, clasificación cromosómica y supervivencia en pacientes ecuatorianos con mieloma múltiple.

1.3.2 Objetivos específicos

Asociar cada polimorfismo con los historiales clínicos.

Asociar el gen *AKT1* en función de cada polimorfismo con la clasificación cromosómica.

Comparar la frecuencia de los polimorfismos presentes en pacientes con mieloma múltiple y casos controles.

Evaluar la relación existente entre la presencia de los polimorfismos y las curvas de supervivencia en pacientes diagnosticados con mieloma múltiple.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

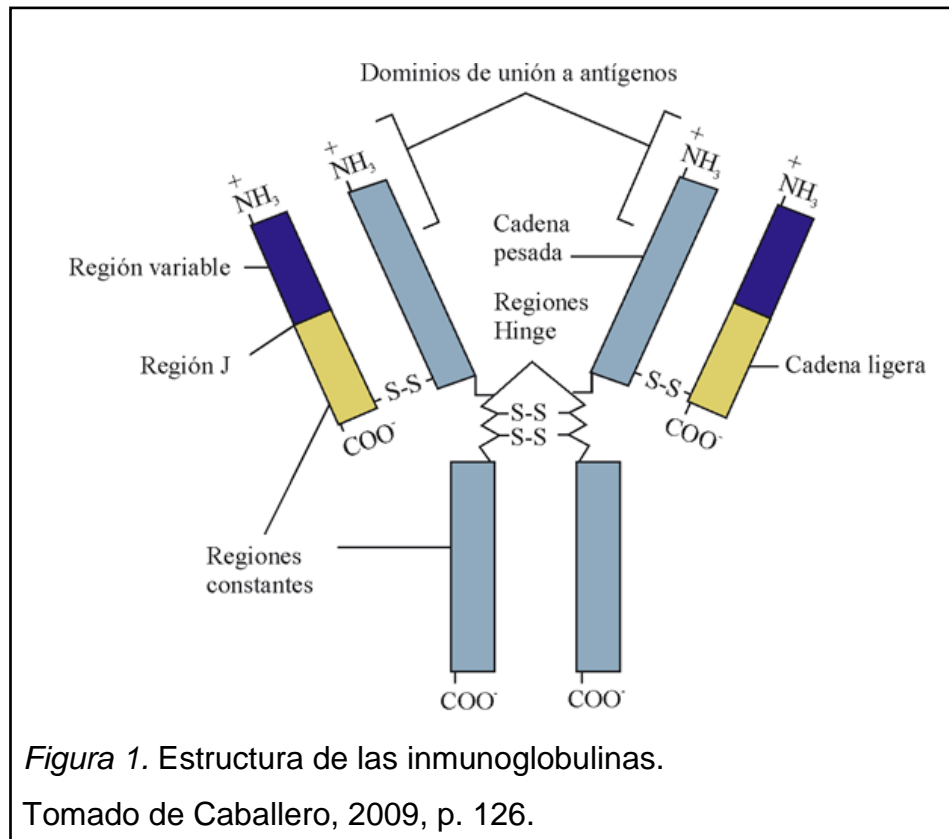
2.1 Biología y patogenia del mieloma múltiple

2.1.1 Origen y características de la célula mielomatosa

El mieloma múltiple es una enfermedad caracterizada por la degeneración maligna de las células plasmáticas o también denominadas plasmocitos. Este tipo de células forman parte del sistema inmune el cual está encargado de reconocer y proteger el organismo ante la presencia de cuerpos extraños (antígenos). El sistema inmune cuenta con dos grupos celulares: mieloides y linfocitos. Dentro de las células mieloides se encuentran neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos y células dendríticas. Mientras que el segundo grupo celular comprende linfocitos B y T (Arnaiz, Regueiro y López, 1995, p. 19).

Los linfocitos B alcanzan su madurez en la médula ósea, y posteriormente se dirigen a órganos específicos como el bazo y ganglios linfáticos. A lo largo de este proceso se van conformando receptores de antígenos en su membrana externa, y finalmente se activan mediante la exposición directa a agentes extraños. Una vez concluido este proceso, los linfocitos B maduros proliferan y se diferencian en células plasmáticas, células de memoria y productoras de anticuerpos (Rojas, 2003, p. 83).

Los receptores de antígenos son también denominados inmunoglobulinas o anticuerpos. Estos se encuentran formados por dos polipéptidos: cadenas pesadas y cadenas livianas. Ambas cadenas son estructuralmente idénticas ya que tienen una región variable y una región constante. La región constante como su nombre lo indica es idéntica en todas las inmunoglobulinas (Igs); mientras que la región variable es la encargada de otorgarle la característica de especificidad, debido a que por su ubicación en el extremo amino mediará la unión para determinados antígenos (Figura 1) (Parham, 2006, p. 23).



En cuanto a la clasificación de cadenas ligeras y pesadas, se han descrito dos tipos de cadenas ligeras (K , λ) y cinco de cadenas pesadas (μ , γ , δ , ϵ , α). Por lo que cualquier isotipo de cadena ligera puede unirse a distintas variantes de cadenas pesadas (Roitt, 2008, p. 257).

El proceso de maduración de los linfocitos B puede ser descrito en siete etapas (Figura 2). Primero, una célula madre da lugar a la primera célula humana pro-B, que posee los receptores CD19 y TdT, pero carece de inmunoglobulina citoplasmática o de unión a la superficie. El CD19 es un antígeno propio del estirpe B y el TdT es un receptor del estirpe T (Gutiérrez, 2009, pp. 235-238).

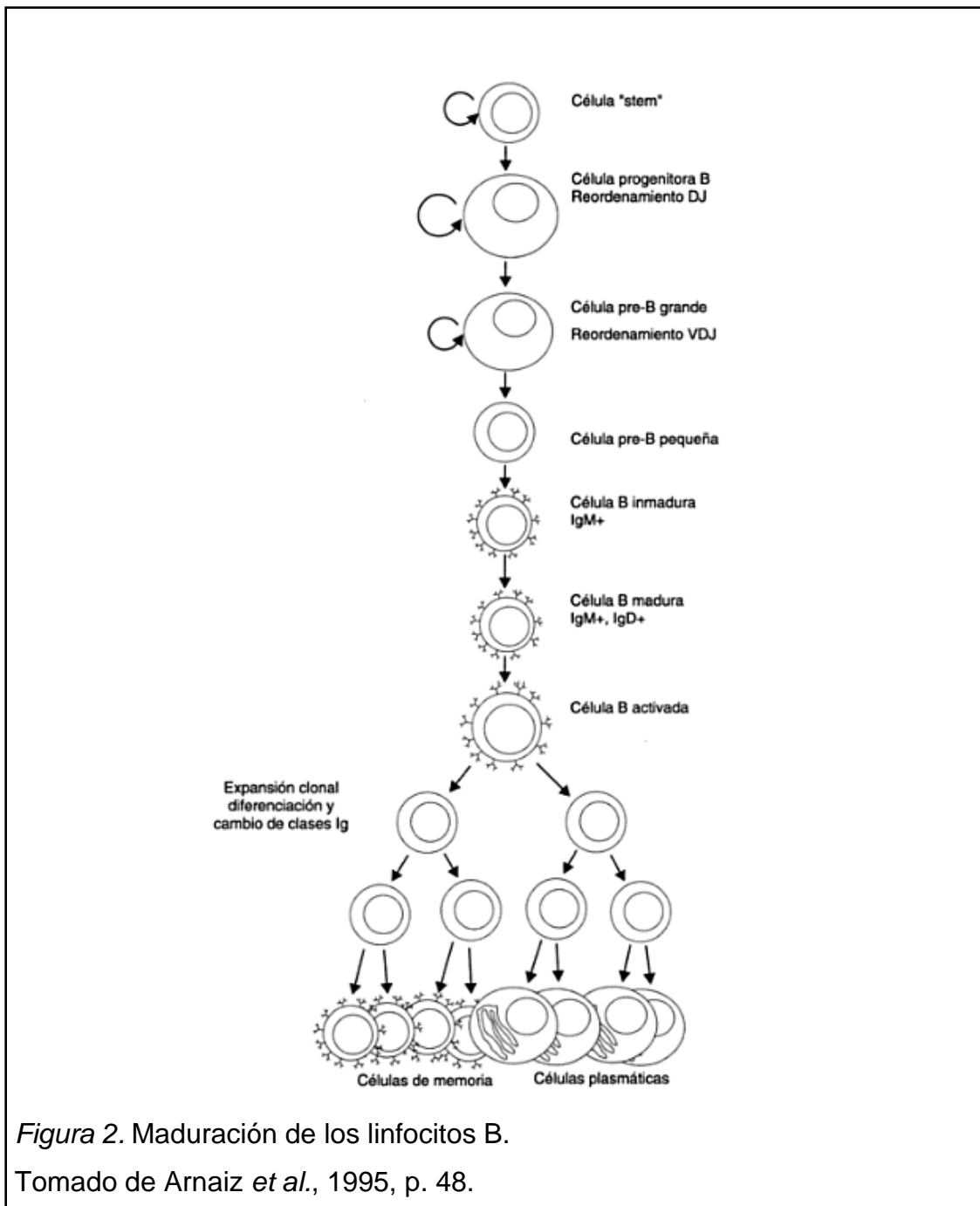
Segundo, se desarrollan células pre-B que serán capaces de sintetizar cadenas pesadas μ con regiones constantes y variables. Tercero, empiezan a originarse ambas clases de cadenas ligeras, por lo que al unirse con la cadena pesada μ comenzarán a expresar Igs M. En esta etapa las células B reciben el nombre de inmaduras porque no pueden proliferar y diferenciarse al estar expuestas a

antígenos, asimismo no podrán expresar otro tipo de cadena pesada y liviana (Peña, 2014).

Cuarto, las células inmaduras empiezan a producir cadenas pesadas δ y μ que al unirse con las cadenas ligeras expresarán inmunoglobulinas M y G en la superficie de su membrana. En esta fase las células inmaduras se movilizan de la médula ósea hacia los órganos linfáticos para su maduración y activación (Peña, 2014).

Quinto, las células B maduras al estar expuestas a antígenos se activan y adquieren la potencialidad de proliferación y diferenciación. Además, son capaces de sintetizar Igs solubles, es decir anticuerpos. Sexto, una vez activadas las células maduras pueden cambiar el isotipo de las cadenas pesadas para producir distintos tipos de inmunoglobulinas (Arnaiz *et al.*, 1995, pp. 47-49).

Séptimo, las células activadas podrán diferenciarse en células de memoria y células plasmáticas. De esta manera, las células que producen inmunoglobulinas de superficie son denominadas células de memoria. Por otro lado, las células plasmáticas son aquellas que crean anticuerpos de manera constante durante varios años desde los órganos linfáticos (Arnaiz *et al.*, 1995, pp. 47-49).



La causa del mieloma múltiple se ve relacionada directamente a una producción excesiva y descontrolada de células plasmáticas. Estas células no funcionales exhiben características anormales, tal como la secreción descomunal de inmunoglobulinas, principalmente IgG, IgA, IgD, IgM e IgE, lo cual facilita su detección. Adicionalmente, en cuanto a los rasgos genéticos se ha podido determinar que existen alteraciones cromosómicas en regiones

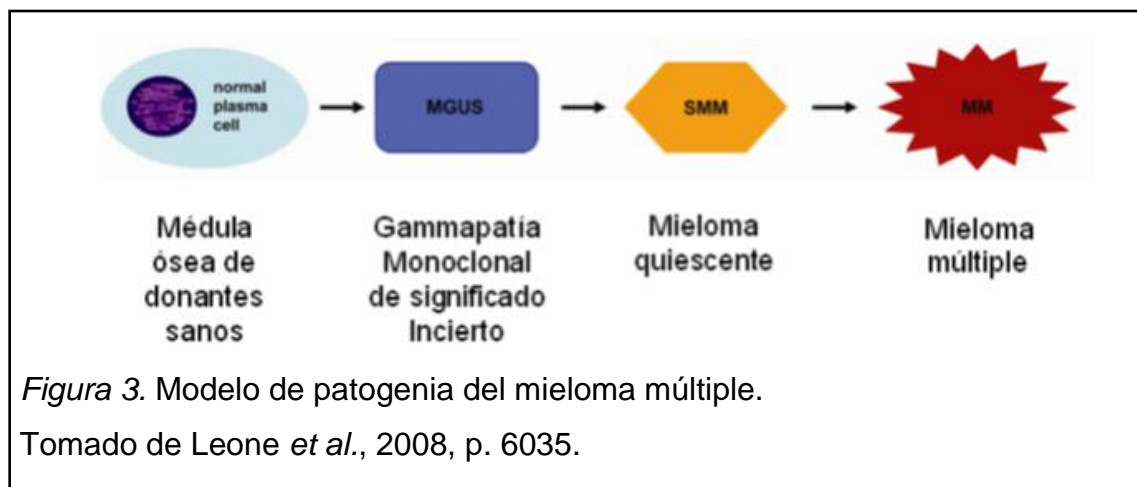
específicas, razón por la cual se ha determinado que esta enfermedad surge a raíz de cambios en el ADN (Fonseca *et al.*, 2004, pp. 1546-1547). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los que el ADN se degenera y por lo tanto las células pierden los mecanismos de control de proliferación celular y muerte programada. Inclusive en algunas ocasiones se pueden formar plasmocitomas o masas tumorales debido a la acumulación de células plasmáticas malignas (Estrada, 2012, p. 344).

2.1.2 Patogenia del mieloma múltiple

El mieloma múltiple surge de la proliferación excesiva de células plasmáticas que se han degenerado en malignas por diversas alteraciones microambientales o genéticas. Hasta la actualidad se desconoce la causa de esta enfermedad, pero se ha asociado al mieloma múltiple con otro tipo de gammopatías. Además, se ha podido identificar que existe una mayor predisposición a contraer la enfermedad según el grupo étnico, género, estilo de vida y ocupación (Estrada, 2012, p. 344).

Según Palumbo y Anderson (2011, pp. 1046-1047), el mieloma evoluciona de una gammopatía monoclonal de significado clínico incierto (MGUS) que progresa a mieloma quiescente o indolente y, finalmente a mieloma sintomático o activo (Figura 3). La gammopatía monoclonal de significado incierto se caracteriza por la producción de un solo anticuerpo por parte de las células plasmáticas, por lo que su detección es sencilla. Asimismo, esta patología es común en adultos mayores y al generar anticuerpos de un solo tipo, no afecta significativamente la salud. Adicionalmente, al ser asintomática no es tratada (Gertz y Greipp, 2004, p. 2). Por otro lado, cuando un paciente presenta todas las características del mieloma múltiple pero no exhibe síntomas, se conoce como mieloma quiescente. Razón por la cual su detección es sumamente importante para poder impedir la evolución de éste en mieloma múltiple. Cuando se detectan pacientes con mieloma asintomático se debe suministrar

tratamiento de forma inmediata para evitar la progresión en aproximadamente 2 años en cáncer (Davatelis, 2015).



En el ámbito genético, el ADN de las células plasmáticas sufre distintas mutaciones lo cual permite que se conviertan en patológicas. Una de las alteraciones genéticas más comunes es la translocación de IgH en el locus 14q32; esta mutación está presente en 40-50% de los pacientes con MGUS o MM asintomático, 55-70% en tumores intramedulares de MM, 70-80% en MM extramedular y 90% en líneas celulares con MM (Menoni y Da Silva, 2010, p. 10).

Además, las anomalías genéticas alteran la expresión de algunas moléculas de adhesión de las células mieloides, así como también las respuestas a los estímulos en el microambiente. De igual manera, las interacciones entre las células cancerígenas y las células normales, o a su vez de las proteínas de la matriz extracelular favorecen el incremento del tamaño del tumor, la migración, supervivencia e inclusive la resistencia a los medicamentos (Palumbo y Anderson, 2011, p. 1048).

Por otra parte, el contacto de las células plasmáticas con el microambiente medular y el estroma induce la secreción de citosinas y factores de crecimiento, tales como la interleucina-6 (Il-6), la interleucina-10 (Il-10), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor transformador del crecimiento

$\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y el factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1), los miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Todos estos compuestos permitirán aumentar la proliferación celular, angiogénesis tumoral y activación de osteoclastos que desencadenan lesiones óseas. Asimismo, debido a la proliferación descontrolada se podrían producir tumores óseos conocidos como plasmocitomas. Otra de las manifestaciones clínicas son anemia, insuficiencia renal, hipercalcemia, insuficiencia multiorgánica e infecciones (Fantl, 2003, pp. 11-15).

2.1.3 Clasificación cromosómica

Mediante estudios citogenéticos empleando pruebas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) e hibridación genómica comparada, se ha reportado que los pacientes con MM muestran alteraciones cromosómicas del tipo numérico y estructural (Conte, Braggio, Figueroa y Fonseca, 2009).

Específicamente mediante FISH, se pudo agrupar casos de MM según el cariotipo en: hiperdiploides y no hiperdiploides. El grupo hiperdiploide se caracteriza por la presencia de trisomías de los cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21) y una baja frecuencia de translocaciones de IgH. Mientras que el grupo no hiperdiploide, exhibe reestructuraciones cromosómicas como translocaciones y constante pérdida de cromosomas especialmente 13, 14, 16 y 18 (Fonseca *et al.*, 2004, p. 1546). De acuerdo a estudios previos, los casos hiperdiploides tienen una mayor supervivencia y nula progresión de la enfermedad, en comparación con el grupo no hiperdiploide. De tal manera que, según la incidencia, el 50% - 60% de los casos son hiperdiploides y el porcentaje restante son no hiperdiploides.

Las alteraciones estructurales con mayor frecuencia se encuentran en el locus 14q32 y afectan el gen de la cadena pesada de la IgH. La translocación 14q32 puede yuxtaponerse a cualquier cromosoma siendo los más recurrentes 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 Bersagel, 2013, pp. 313-315). La t(11;14) (q13;q32) actúa en la desregulación de la ciclina D1, la t(6;14)(p21.1;q32.3) se ve relacionada con la ciclina D3, la t(4;14)(p16.3;q32) es encargada de la desregulación de FGFR3 y por último la t(14;16)(q32;q23) afecta a la ruta c-maf. Asimismo, las translocaciones secundarias de comienzo tardío junto con los genes ligados a la progresión de la enfermedad incluyen anomalías genéticas tales como la activación de NRAS y KRAS, mutaciones en TP53 y FGFR3 e inhibidores de ciclina dependiente de quinasa. También existen otras mutaciones en el genoma que alteran la expresión de microRNAs y la metilación de genes (Prideaux, O' brien y Chevassut, 2014, p. 8).

2.1.4 Estadiaje del mieloma múltiple

El mieloma múltiple puede ser clasificado en etapas o estadios según el avance de la enfermedad. Esto permite dar un pronóstico y otorgar el mejor tratamiento a los pacientes. Se entiende como pronóstico a la predicción del curso y supervivencia de la enfermedad y está dado por las propiedades que exhiben las células mielomatosas (Sagar, 2009, p. 43). Estas propiedades son la tasa de crecimiento, la producción de varias citoquinas y sustancias que alteran funciones de tejidos u órganos, y la tasa de producción de proteínas monoclonales (Fantl, 2003, p. 18).

Hoy en día se usan dos tipos de sistemas de clasificación: Durie-Salmon e internacional (ISS). El primero fue desarrollado en 1975 y busca relacionar los parámetros clínicos mayores con la cantidad de masa tumoral. Es por ello que este sistema se basa en la gravedad del daño óseo, la cantidad de inmunoglobulina monoclonal en orina o sangre, y la cantidad de calcio y hemoglobina en sangre (American Cancer Society, 2014, p. 21). Mediante este sistema se ha podido describir tres estadios o etapas, siendo la primera de menor gravedad y la tercera de mayor daño con menos tiempo de supervivencia. Sin embargo, en los últimos años se ha reemplazado el sistema de Durie-Salmon por el sistema internacional, el cual divide el mieloma en tres

etapas basándose únicamente en los niveles de albúmina sérica y beta-2-microglobulina sérica (Greipp *et al.*, 2005, p. 3413) (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de sistemas de clasificación de MM.

Stage	Durie-Salmon[44]		ISS[45]	
	Criteria	Measured Myeloma Cell Mass (Cells $\times 10^{12}/m^2$)	Criteria	Median Survival
I	All of the following: 1. Hb >10 g/100 mL 2. Normal serum calcium value (≤ 12 mg/100 mL) 3. Normal bone structure (scale 0) or solitary plasmacytoma on bone x-ray 4. Low M-component production rates: a. IgG value < 5 g/100 mL b. IgA value < 3 g/100 mL c. Urine light chain M component on electrophoresis < 4 g/24 h	< 0.6 (low)	Serum β_2 -microglobulin < 3.5 mg/dL and serum albumin ≥ 3.5 g/dL	62 mo
II	Fitting neither stage I nor stage III	0.6 - 1.2 (intermediate)	Not stage I or III ^a	44 mo
III	One or more of the following: 1. Hb < 8.5 g/100 mL 2. Serum calcium value > 12 mg/100 mL 3. Advanced lytic lesions (scale 3) on bone x-ray 4. High M-component production rates: a. IgG value > 7 g/100 mL b. IgA value > 5 g/100 mL c. Urine light chain M component on electrophoresis > 12 g/24 h	> 1.2 (high)	Serum β_2 -microglobulin ≥ 5.5 mg/dL	29 mo

^aThere are two categories for stage II: serum β_2 -microglobulin < 3.5 mg/dL but serum albumin < 3.5 g/dL; and serum β_2 -microglobulin 3.5 to < 5.5 mg/dL irrespective of serum albumin level.

ISS = International Staging System.

Tomado de Kenneth, 2011, p. 6.

2.1.5 Factores de riesgo

El mieloma múltiple al ser una neoplasia presenta factores de riesgo en común con otras enfermedades de esta estirpe. Entre ellos se encuentra la edad, el grupo étnico y género, los antecedentes familiares, la obesidad, la dieta, la actividad física y la ocupación.

En cuanto a la edad, existe mayor predisposición a contraer esta patología a medida que las personas envejecen, aproximadamente 65 años. Únicamente el 1% de las personas diagnosticadas son menores a los 40 años. Asimismo, de

acuerdo a la raza y género, se han reportado una mayor incidencia en hombres de raza negra (American Cancer Society, 2014, p. 6).

De acuerdo a los antecedentes familiares, personas que hayan tenido algún familiar cercano con mieloma poseen mayor predisposición a desarrollar el mismo. Aproximadamente 4 veces más probabilidad que cualquier otro sujeto (American Cancer Society, 2014, p. 7).

Por otro lado, la dieta y la actividad física juegan un rol fundamental en la factibilidad de desarrollar enfermedades. En este caso el consumo de frutas y vegetales disminuyen el riesgo de padecer MM, mientras que la ingesta de pollo incrementa el riesgo (Becker, 2011, pp. 29 - 30). Sin embargo, hasta el momento se desconoce a ciencia cierta cuales son los alimentos encargados de elevar o disminuir el peligro de tener MM. No obstante, es importante recalcar que no se han encontrado asociaciones entre la obesidad y la actividad física con el MM ya que no existen investigaciones encaminadas a esta rama.

De igual manera la actividad diaria que desempeña el ser humano es de vital importancia ya que se ha encontrado una relación entre la exposición continua a genotóxicos y la propensión a contraer cáncer. Los genotóxicos son sustancias que como su nombre lo indica dañan la estructura del ADN resultando en mutaciones inesperadas. Los principales genotóxicos son usados en la industria agrícola y estos son los pesticidas, insecticidas, y solventes en general. Aunque de acuerdo a Leone y otros (2013, p. 10), en un estudio realizado en Ecuador se encontró que los pacientes que poseían MM se dedicaban mayoritariamente a la docencia y la agricultura.

2.2 Diagnóstico clínico del mieloma múltiple y de sus complicaciones

2.2.1 Manifestaciones clínicas

Los pacientes con MM exhiben características clínicas tales como anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal, trastornos del sistema nervioso y dolores óseos. Las células mielomatosas interfieren con las células encargadas del mantenimiento óseo. Existen dos clases principales de células óseas: osteoblastos y osteoclastos. Los osteoblastos son los que actúan en la generación *de novo* de huesos, y los osteoclastos son los que disuelven los huesos viejos. Las células malignas liberan una sustancia que indica a los osteoclastos que aceleren su función y por lo tanto disuelvan los huesos. Es por ello que los pacientes con MM tienen mayor susceptibilidad de padecer dolores óseos (García, Mateos y San Miguel, 2007, pp. 104-105). Alrededor del 80% de los casos en los cuales aqueja este mal, el sitio más común es la columna vertebral, pero también puede hallarse en el esternón, las extremidades, las costillas, la cadera y el cráneo (American Cancer Society, 2014, p. 9; Estrada, 2012, p. 345). Estas dolencias se originan por lesiones óseas que pueden manifestarse como osteoporosis e incluso fracturas que son visualizadas por radiología.

En imágenes obtenidas por rayos X se podrán ver imágenes osteolíticas, no obstante, para aquellas lesiones que son microscópicas se debe utilizar resonancia magnética (American Cancer Society, 2014, p. 3). Asimismo, la hipercalcemia afecta a un tercio de los pacientes durante el diagnóstico y a un 30% adicional en el transcurso de la enfermedad. Esta situación surge a raíz de la liberación de calcio en la sangre debido a la disolución de huesos por los osteoclastos, lo cual se ve reflejado en efectos secundarios como deshidratación, problemas renales, pérdida de apetito, dolor abdominal, debilidad, somnolencia y confusión (Oyajobi, 2007, pp. 1-3).

Adicionalmente, la proliferación descontrolada de células plasmáticas en la médula ósea puede impedir la producción normal de células sanguíneas ocasionando bajos recuentos de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Si se presenta el primer caso, o también denominado anemia, se producirán una serie de síntomas como debilidad, dificultad en la respiración, mareos y fatiga. Por otro lado, si existe un bajo recuento de glóbulos blancos, o también conocido como leucopenia, aumentará la susceptibilidad de contraer infecciones. Cuando hay pocas plaquetas en la sangre, o también llamado trombocitopenia, el paciente podrá sufrir sangrados abundantes por cualquier corte o raspadura leve (American Cancer Society, 2014, p. 9).

Por otro lado, la excesiva producción de inmunoglobulina monoclonal por parte de las células plasmáticas causa daño a los riñones. Debido a que estos compuestos se acumulan y precipitan en los túbulos distales de las nefronas e impiden el paso de la luz tubular (Manciola y Stemberg, 2013, p. 256). En los primeros estadios de la enfermedad, el daño renal no causa ningún síntoma, hasta que se realiza un análisis de sangre. Sin embargo, con el paso del tiempo y el avance de la patología, los riñones pierden la capacidad de eliminar el exceso de líquido, sales y desechos. De tal manera que genera debilidad, picazón, dificultad respiratoria e hinchazón de las extremidades inferiores (Fantl, 2003, p. 13).

Además de lo anteriormente mencionado es importante recalcar que el MM puede tener repercusiones en el sistema nervioso. Esto se debe principalmente a que el dolor óseo y descalcificación de huesos de la columna vertebral ejercen presión en los nervios espinales, y puede causar dolor de espalda inesperado e intenso, debilidad muscular y entumecimiento de piernas. Desde el punto de vista bioquímico, las proteínas monoclonales anormales producidas resultan ser tóxicas para los nervios, lo cual provoca debilidad y adormecimiento de músculos. En algunos casos, una excesiva producción del anticuerpo podría desencadenar hiperviscosidad en la sangre. Es importante que se remueva la proteína de la sangre si es que se presenta este síntoma, ya

que de no ser así podría retardar el flujo sanguíneo al cerebro y ocasionar confusión, dolor cerebral y mareos (Micheli, Nogués, Asconapé, Fernández y Biller, 2002, p. 1142).

De igual manera, la proteína anormal se puede acumular en órganos (corazón, hígado, riñones, entre otros) generando amiloidosis. Esta patología es poco frecuente ya que solo la presentan alrededor del 6% de los pacientes, razón por la que se la considera una enfermedad separada del MM. La acumulación de las cadenas ligeras de las proteínas monoclonales en ciertos órganos favorece a que estos aumenten su tamaño y dejen de funcionar adecuadamente (Cobleigh, 2015).

2.2.2 Complicaciones infecciosas

Los pacientes diagnosticados con MM tienen una mayor propensión a contraer infecciones debido a que solo producen un tipo de inmunoglobulina, y dejan de producir el resto de anticuerpos necesarios para mantener el buen funcionamiento del sistema inmunológico. De esta manera los individuos al poseer cualquier tipo de infección responderán con menor efectividad a pesar del tratamiento que estén tomando (Blink *et al.*, 2015, pp. 107-108).

La complicación más común es la causada por la presencia de bacterias o virus, y representa la primera causa de morbilidad. Según Haehle (2013), alrededor del 45% de pacientes con muerte temprana fue debido a infecciones inesperadas. Aún se desconoce el mecanismo por el cual se producen estas, sin embargo, se ha asociado a las bacterias encapsuladas con la hipogammaglobulinemia. Ésta constituye una disfunción del sistema inmune provocando una menor concentración de todas las inmunoglobulinas y por lo tanto aumenta la propensión a contraer una infección. Las infecciones más frecuentes son septicemia, meningitis, neumonía e influenza.

Asimismo, la disfunción multiorgánica y el tratamiento administrado para contrarrestar la enfermedad aumentan el riesgo de infecciones. Donde las infecciones más relevantes son insuficiencia renal, fallo respiratorio, daño en la mucosa intestinal, hiperglucemia, aumento de hierro en la sangre y amiloidosis (Nucci y Anaissie, 2009, pp. 278-281).

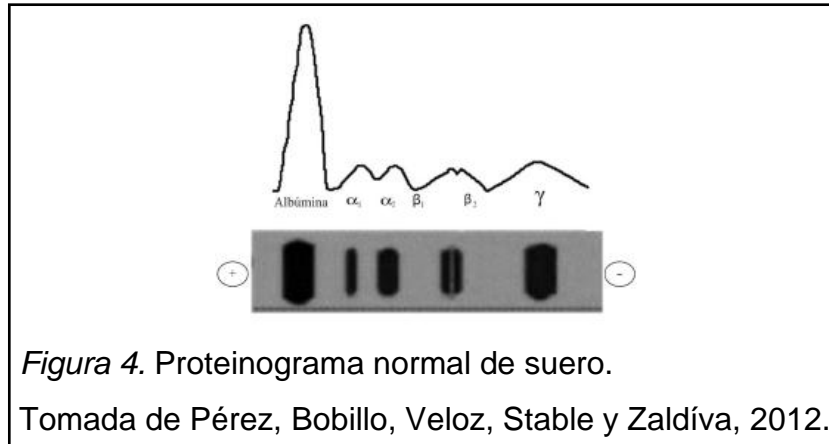
Por otra parte, la implementación de nuevas terapias ha permitido aumentar la supervivencia de pacientes con mieloma. Aunque existen varias recaídas durante el transcurso de la enfermedad, lo cual provoca inmunosupresión e incrementa la posibilidad de tener infecciones. Tal es el caso de la quimioterapia que, al ser realizada de forma seguida disminuye el número de linfocitos T CD4+ (Nucci y Anaissie, 2009, p. 280).

2.2.3 Exámenes de laboratorio

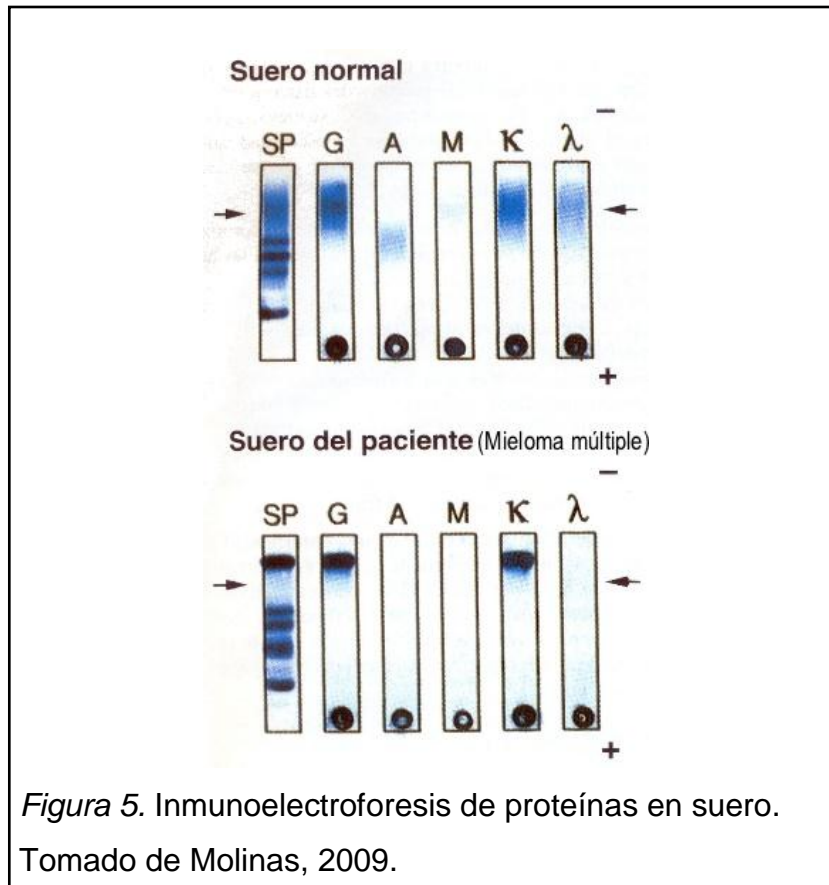
2.2.3.1 Detección de la proteína M

Dado el origen y la patogénesis de la enfermedad, las células mielomatosas producen descontroladamente inmunoglobulinas de un solo tipo y toman el nombre de paraproteína o proteína M. Las más comunes son la IgG e IgA, y con menor frecuencia se presentan la IgE e IgM (Menoni y Da Silva, 2010, p. 16).

Su detección es sencilla mediante el uso de un proteinograma de suero y orina. Esta metodología se basa en el principio de la electroforesis, el cual permitirá la separación de proteínas según su peso y carga eléctrica. Por lo que se visualizarán bandas de diferentes tamaños y alturas, permitiendo así determinar la cantidad y tipo de proteína presente en la muestra (Figura 4).



Posterior a la electroforesis se realiza una inmunofijación para poder determinar componentes monoclonales, especialmente en las fracciones de las β y γ globulinas. Para lo cual se colocan antígenos específicos favoreciendo así la formación de un complejo insoluble que será revelado por coloración (Rostango y Ghiso, 2013, pp. 7-8). De esta manera se puede identificar el tipo de inmunoglobulina que se está produciendo en exceso y la escasez de otras (Figura 5).



2.2.3.2 Cuantificación de inmunoglobulinas

Como se mencionó anteriormente los anticuerpos juegan un rol fundamental para el buen funcionamiento del sistema inmune. Las inmunoglobulinas con mayor abundancia en sangre son IgG, IgM e IgA, pero su concentración varía de acuerdo a la edad. Además, se ha identificado que también existen diferencias en función de la raza y el sexo (Menoni y Da-Silva, 2010, p. 16).

La nefelometría es la técnica más empleada para poder cuantificar las inmunoglobulinas debido a su alta sensibilidad. En esta metodología se requiere la extracción de sangre intravenosa y posteriormente la colocación de un antígeno específico para detectar la presencia de la inmunoglobulina deseada. Todo este proceso es realizado en condiciones que favorezcan la formación del complejo anticuerpo-antígeno. Cuando se lleva a cabo esta fusión, el complejo precipita gracias a su elevado peso molecular (Gutiérrez, 2006, p.17). De esta manera al colocar luz en la muestra con el precipitado, se dispersa la luz y esta será equivalente a la cantidad de inmunoglobulinas presente en la sangre (Schroeder y Cavacini, 2010, pp. S41-S52).

En adultos los valores promedios de inmunoglobulinas se encuentran detalladas en la tabla 2. Es importante recalcar que los rangos pueden variar según el laboratorio clínico.

Tabla 2. Valores promedios de inmunoglobulinas.

Inmunoglobulinas	mg/dL
IgG	560 -1800
IgM	45 - 250
IgA	100 - 400

Adaptado de Yi-Bin, 2015.

2.2.3.3 Cuantificación de cadenas ligeras libres

Cada célula plasmática produce un anticuerpo formado por un tipo de cadena pesada (μ , γ , δ , ϵ , α) y una clase de cadena ligera (K o λ). En este proceso se forma las cadenas pesadas y ligeras por separado, siendo estas últimas liberadas en mayor cantidad para garantizar la correcta formación de inmunoglobulinas. El exceso de cadenas ligeras es liberado en la sangre en conjunto con los anticuerpos ya formados. No obstante, estas son liberadas fácilmente por la orina y por lo tanto su detección es sencilla (Roitt, 2008, p. 257).

Se ha asociado el exceso de cadenas ligeras libres a distintas enfermedades, entre las cuales se encuentra el mieloma múltiple con una incidencia de $\frac{2}{3}$ de los casos diagnosticados (Hoffbrand, Moss y Petit, 2006, p. 218). Razón por la cual, es de suma importancia realizar la cuantificación de las mismas, así como también la prueba de Bence-Jones en la cual se identifica la presencia de cadenas libre excretadas a través de la orina. Asimismo, es muy útil realizar estas pruebas clínicas para identificar pacientes con amiloidosis y con mieloma múltiple no secretor (MMNS), evaluar el estado de la enfermedad y su progresión (Campos, Barbosa y Martin, 2012).

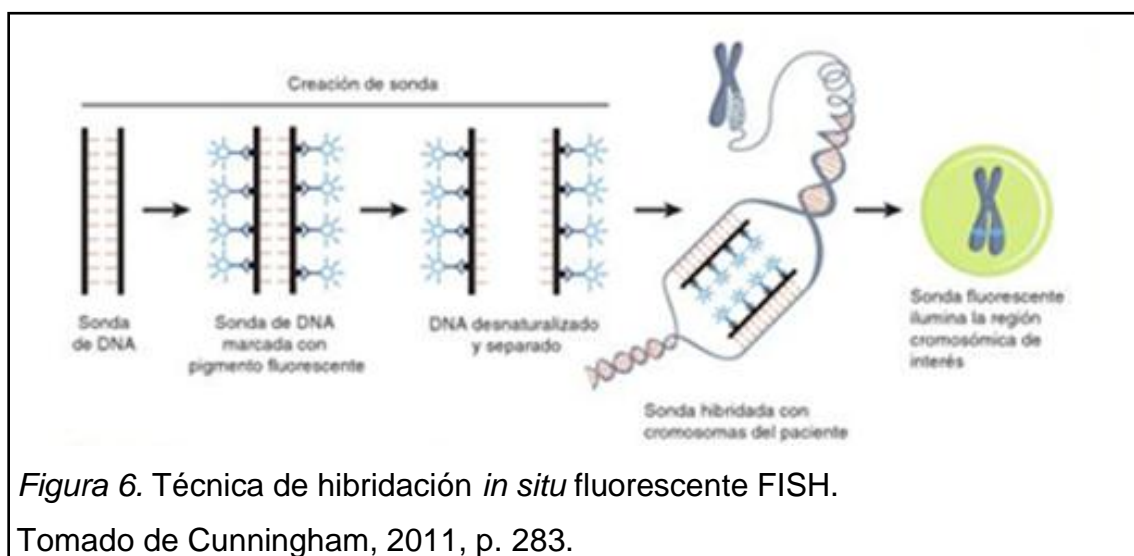
Al igual que los anteriores exámenes, se emplean los métodos de electroforesis, inmunofijación y posterior cuantificación con nefelometría. Los valores normales en suero son: kappa 3,30 – 19,40 mg/L, lambda 5,71 - 26,30 mg/L e índice Kappa/lambda 0,26 - 1,65 (Murata *et al.*, 2010, p. 16).

2.2.3.4 Pruebas citogenéticas

A través del uso de pruebas citogenéticas se ha podido determinar que existen alteraciones numéricas y estructurales en los cromosomas. Los exámenes más empleados son la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y la hibridación genómica comparada (CGH). FISH es empleada para la detección de

secuencias específicas de ADN en cromosomas mediante el empleo de sondas marcadas radiactivamente. Esta técnica funciona de forma correcta en 2 fases del ciclo celular, la etapa de metafase o en el núcleo cuando se encuentre en interfase. Adicionalmente, esta metodología es usada ampliamente en el estudio de enfermedades debido a su eficiencia en la detección de translocaciones, duplicaciones, deleciones e inversiones cromosómicas (Oliva, Ballesta, Oriola y Claria, 2004, p. 226).

La técnica se basa en el empleo de sondas que sean específicas para regiones que presentan mayor susceptibilidad a tener fragilidad cromosómica. El mecanismo de acción de esta técnica consiste en la hibridación de la sonda con la región de la muestra de interés. Si se lleva a cabo la hibridación, la sonda mandará una señal en forma de fluorescencia para que esta pueda ser detectada fácilmente por el investigador (Cunningham, 2011, pp. 282 - 283) (Figura 6).



Actualmente existen dos tipos de sondas para el diagnóstico de enfermedades, entre las que se encuentran aquellas que se unen a regiones repetitivas de ADN y sondas que hibridan a una región única. Las primeras son empleadas para hibridarse con regiones como los centrómeros o telómeros de los cromosomas, mientras que las segundas son específicas para regiones de

interés. Sin embargo, para realizar un análisis más completo se emplean cocteles de sondas que marcan un cromosoma y permite que este fluoreszca totalmente. Mediante esta metodología se pueden determinar anomalías presentes en el material genético de los pacientes (Lisker, Zentella, y Grether, 2013, pp. 188-205).

Por otro lado, CGH se encarga de la comparación genómica de una muestra de ADN con un caso control, en ella podrá identificarse las ganancias y pérdidas de material genético. Para lo cual, el ADN muestra es marcado con fluoróforos de un color diferente al ADN control de tal manera que al mezclarse e hibridarse se pueda definir las regiones que tengan mayor intensidad o carezcan de la misma (Nussbaum, McInnes y Willard, 2008, p. 55). No obstante, esta técnica está en desuso debido a su elevado costo y tiempo necesario.

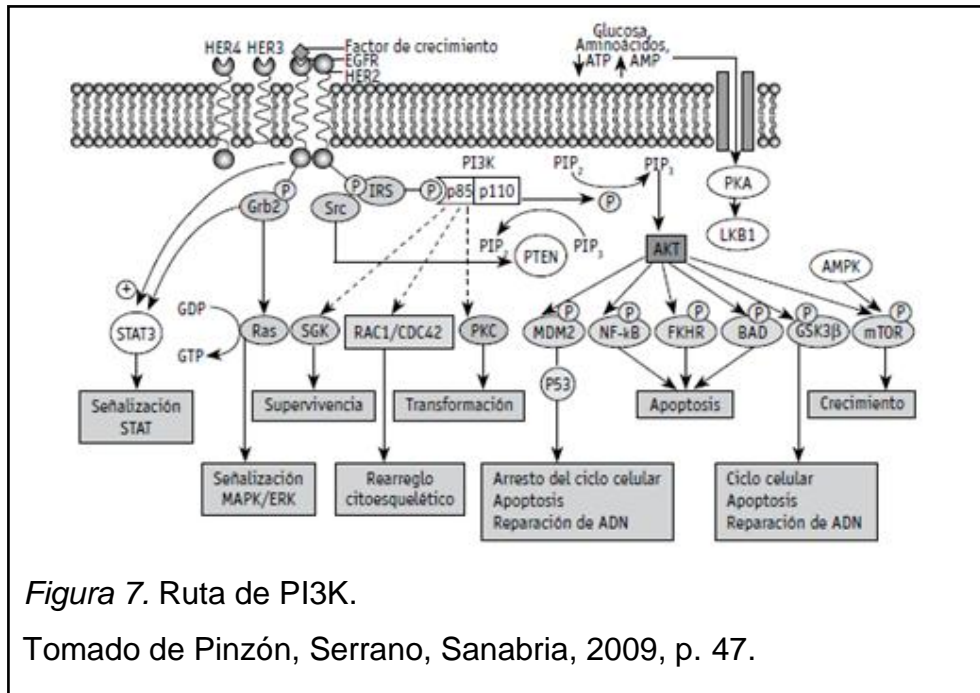
2.3 Genética molecular del mieloma múltiple

2.3.1 Ruta PI3K/AKT1/mTOR

La ruta del fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) es sumamente importante en algunos aspectos celulares ligados al crecimiento y división celular, razón por la cual juega un rol indispensable en el estudio del cáncer. Esta vía de señalización es activada a través de una serie de pasos (Figura 7).

La presencia de un ligando en los receptores tirosina quinasa de la membrana celular conlleva a la activación y fosforilación de los mismos, estos grupos fosforilo liberados interaccionan con el sustrato del receptor de la insulina (IRS). Esta unión permite la fosforilación de IRS, el cual desencadenará la fosforilación de la subunidad p85 de la PI3K permitiendo un cambio conformacional en la proteína y favoreciendo el reclutamiento de la subunidad p110 de PI3K y activando la misma. Subsecuentemente, PI3K fosforila el fosfatidil inositol 3,4 bifosfato (PIP2) y lo transforma en fosfatidil inositol 3, 4, 5

trifosfato (PIP₃), el cual dirige la activación de *AKT*. Finalmente, *AKT* se encargará de fosforilar a varias dianas responsables de la supervivencia, proliferación y crecimiento celular.



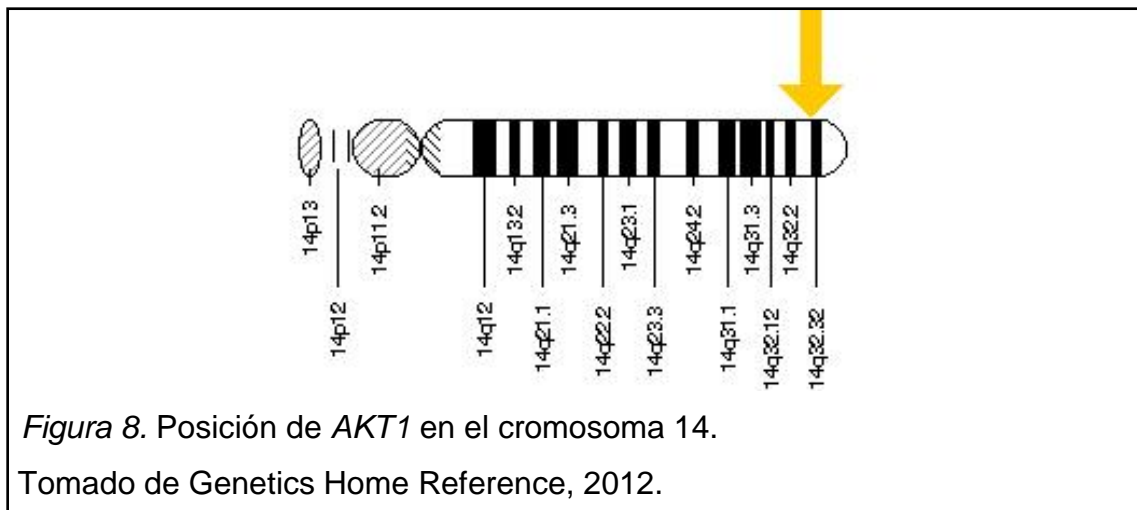
Varios estudios demuestran que esta ruta se encuentra implicada en el metabolismo del cáncer, contribuyendo a la progresión tumoral y transformación celular (Pinzón *et al.*, 2009, pp. 47-48). De tal manera cuando esta vía está inhibida, los pacientes con la enfermedad presentan resistencia a los tratamientos suministrados (Fresno *et al.*, 2004, pp. 198-201). Adicionalmente, se suprime la apoptosis y división de las células cancerígenas. Siendo esta ruta metabólica de vital importancia para la ejecución de investigaciones enfocadas en la generación de medicamentos (Osaki, Oshimura e Ito, 2004, pp. 670-673).

Según Leone y otros en un estudio realizado en el 2008 (p. 1694), las alteraciones genéticas encontradas en pacientes con MM afectan a genes pertenecientes a ciertas rutas metabólicas entre las que se encuentran PI3K/AKT, CdK (quinasa dependiente de ciclina), NF-κB y aurora quinasa. Específicamente las afecciones en PI3K/AKT se ven relacionadas con las

citoquinas encargadas del crecimiento intracelular o extracelular, como se mencionó anteriormente.

2.3.2 Gen *AKT1*

El gen *AKT* es el homólogo del oncogén viral v-akt, causante de la leucemia en ratones. Se ha podido describir 3 isoformas de este gen: *AKT1* (*PKB α*), *AKT2* (*PKB β*) y *AKT3* (*PKB γ*). Mediante el uso de la prueba citogenética FISH se pudo identificar la posición en la que se encuentra cada uno de ellos, de la siguiente manera: 14q32 (*AKT1*) (Figura 8), 19q13.1-13.2 (*AKT2*) y 1q44 (*AKT3*) (Osaki *et al.*, 2004, p. 668).

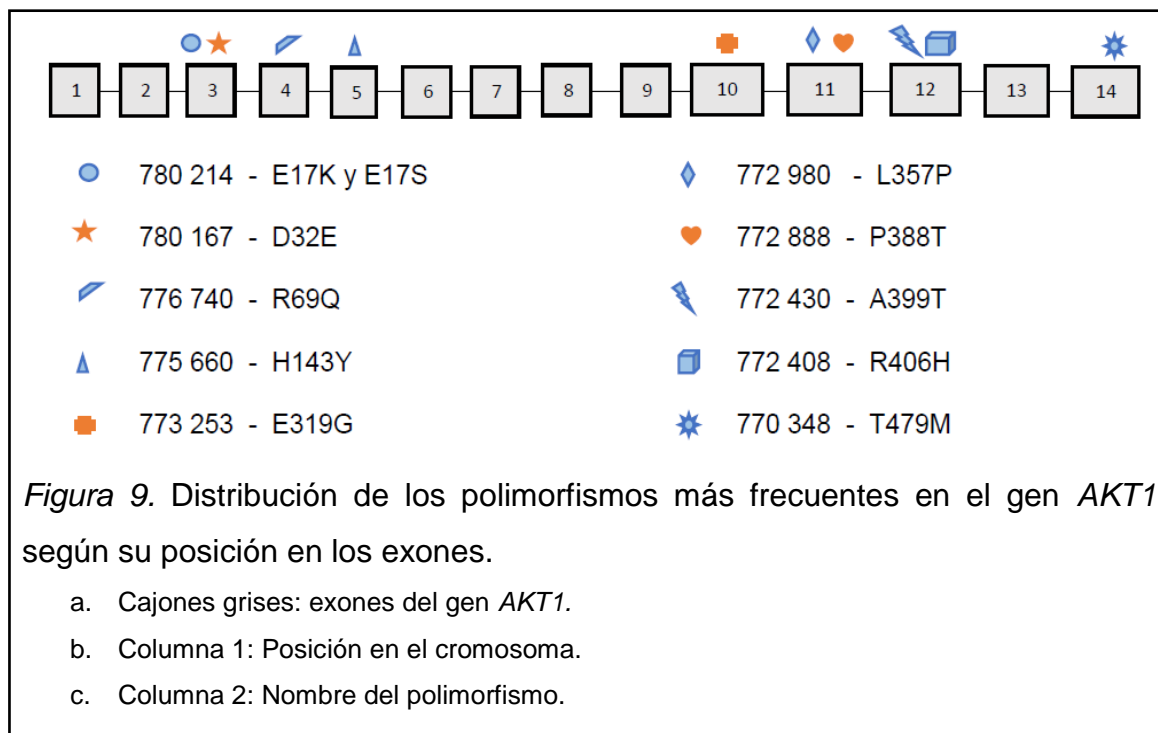


En cuanto a la estructura, el gen *AKT1* consta de 14 exones y contiene aproximadamente 26.396 pb y un marco de lectura abierto de 1.443 pb. Cuando este gen se traduce, se forma una proteína conformada por 480 aminoácidos con un peso molecular de 55.686 Da. La proteína quinasa B o llamada también serina/treonina quinasa tiene un dominio de homología Pleckstrina (PH), una región helicoidal corta, un dominio regulador hidrofóbico y un dominio catalítico quinasa. Esta proteína tiene como función controlar la viabilidad celular, inhibir los procesos de apoptosis, metabolismo de la glucosa, y favorecer la progresión del ciclo celular (Etro, Missiroli, Buontempo, Neri y Capitani, 2009).

2.3.3 Polimorfismos de nucleótido simple de *AKT1*

A pesar de la importancia de *AKT1*, hasta el momento no se ha reportado mutaciones de forma masiva. Sin embargo, de acuerdo a la base de datos GeneCards® (2015) se han descrito alrededor de 1.324 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en humanos. De los cuales, el SNP más estudiado es E17K debido a su potencial efecto negativo sobre las interacciones electrostáticas en la membrana de los fosfolípidos. Esta mutación se encuentra en el dominio PH de la proteína, de tal manera que genera un cambio conformacional favoreciendo la unión de un ligando fosfoinosítido mediante la formación de nuevos puentes de hidrógeno (Carpten *et al.*, 2007, pp. 435-337). Una vez llevado a cabo este proceso, *AKT1* es activado y subsecuentemente los procesos corriente abajo de la ruta. De tal manera que promoverá la oncogénesis en pacientes con cáncer. Sin embargo, a pesar de la función oncogénica comprobada de este polimorfismo su baja tasa de incidencia permite concluir que no juega un rol fundamental en desarrollo del cáncer.

Según un análisis bioinformático realizado por Shanti y otros (2014) existen algunos SNPs que poseen un efecto negativo sobre el ADN, alterando la función y estabilidad de la proteína producida y por lo tanto aumentando el riesgo de contraer enfermedades como el cáncer. Entre los que se encuentran E319G, L357P, P388T, D32E, T479M, A399T, R69Q, R406H, H143Y y E17S (Figura 9). Se esperaría que estos SNPs mencionados expongan el mismo comportamiento de E17K en relación a su función oncogénica, para de esta forma comprender la enfermedad y evaluar la posibilidad de desarrollar medicamentos que prolonguen el tiempo de vida de los pacientes.



CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Recolección de muestras patológicas y controles

Se recolectaron 34 muestras de médula ósea de pacientes que fueron diagnosticados con mieloma múltiple en los hospitales Solón Espinoza Ayala (SOLCA) y Carlos Andrade Marín (HCAM) de Quito. Asimismo, se analizaron 60 muestras de sangre periférica de personas sanas (grupo control) entre los 18 y 60 años de edad, pertenecientes a tres diferentes grupos étnicos: mestizos, indígenas y negros. Las muestras del grupo control provinieron del banco de muestras del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) debido a la disponibilidad de las mismas. El grupo étnico al que pertenecían estas muestras fue establecido previamente en otros proyectos realizados por el IIB. Los criterios de inclusión y exclusión se encuentran detallados en la tabla 3.

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión para la recolección de muestras patológicas y controles.

Criterio	Casos	Controles
Inclusión	Personas diagnosticadas con mieloma múltiple. Personas ecuatorianas. Pacientes con historial clínico.	Personas no diagnosticadas con mieloma múltiple. Personas ecuatorianas. Personas con historial clínico.
Exclusión	Personas no diagnosticadas con mieloma múltiple. Personas no ecuatorianas. Pacientes sin historial clínico.	Personas diagnosticadas con mieloma múltiple. Personas no ecuatorianas. Pacientes sin historial clínico.

3.2 Extracción de ADN

Los protocolos de extracción de ADN fueron distintos en función del tipo de la muestra. En el caso de muestras provenientes de sangre periférica, se siguió el procedimiento diseñado por el kit de extracción PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen, USA). Mientras que, en el caso de las muestras de médula ósea, se realizó un proceso previo a la utilización del protocolo de extracción PureLink™ Genomic DNA.

3.2.1 Extracción de ADN a partir de sangre periférica

Se precalentó el bloque térmico Accublock™ *Digital Dry Bath* (Labnet, USA) a 55°C. En un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL se colocó 200 µl de sangre periférica conservada con EDTA. Posteriormente, se colocó 20 µl de proteinasa K y se mezcló mediante el uso de vórtex por 1 minuto. Se añadió 20 µl de ARNasa al tubo eppendorf que contenía la mezcla de sangre con proteinasa K, se mezcló por vórtex de forma breve y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Se añadió 200 µl del buffer de lisis celular del kit (*Genomic Lysis Binding Buffer*) y se dio vórtex brevemente, de forma seguida se incubó en el bloque térmico previamente calentado por 10 minutos. Este último paso favorece la desnaturalización de lípidos y proteínas encontradas en la muestra. Se añadió 200 µl de etanol 95% - 100% al lisado y se mezcló adecuadamente mediante vórtex hasta obtener una muestra homogénea.

Se colocó la mezcla (aprox. 640 µl) en una columna de purificación PureLink™ sobre el tubo de colección, y se centrifuga a 10000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente. Se desechó el tubo de colección con el líquido restante y se colocó la columna de purificación en un tubo de colección nuevo. Se adicionó 500 µl de *Wash Buffer 1* en la columna de purificación y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Nuevamente se

desechó el tubo de colección con el líquido restante y se colocó la columna de purificación en un tubo de colección nuevo para posteriormente colocar 500 µl de *Wash Buffer 2* en la columna de purificación. Se centrifugó la columna a 15000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, se desechó el tubo de colección y la columna de purificación se la colocó en un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL.

Se añadió 50 µl de buffer de elución PureLink™ en la columna, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó la columna a 15000 rpm por 3 minutos. Finalmente, se desechó la columna y el tubo eppendorf con el ADN genómico purificado fue conservado a -20°C.

3.2.2 Extracción de ADN a partir de médula ósea

Las muestras de médula ósea conservadas con el anticoagulante EDTA o heparina de Litio fueron centrifugadas a 14.500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y se procedió a realizar los lavados con el pellet. Al tubo que contenía únicamente el botón celular, se le añadió 600 µl de PBS 1X. A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 14.500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet para repetir por 3 ocasiones el procedimiento con PBS.

Una vez realizado los lavados, se procedió a realizar la extracción de ADN con el mismo protocolo que se utilizó con la sangre periférica. Con una pequeña diferencia en el primer paso, ya que se colocó 200 µl del botón celular lavado en lugar de la muestra de partida.

3.3 Cuantificación de ADN

Para la determinación de concentraciones y pureza del ADN se utilizó la técnica de espectrofotometría, específicamente mediante el uso del equipo Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific, USA). La concentración de ADN en una

solución es calculada al medir la absorbancia o densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm. Las unidades empleadas para medir concentraciones fueron ng/ μ l.

Por otro lado, la determinación de pureza de la muestra está dada por la relación A_{260}/A_{280} . Cuando esta se encuentra dentro de un rango de 1,8 a 2, se puede afirmar que el ADN en la solución no se encuentra en presencia de contaminantes e inhibidores (Van Pelt-Verkuil, Van Belkum y Hays, 2008, p. 38).

3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica es comúnmente conocida como PCR debido a sus siglas en inglés (*polymerase chain reaction*), y tiene como objetivo amplificar un fragmento de ADN en particular usando como base una sola copia del mismo (Weissensteiner, Nolan, Bustin, Griffin y Griffin, 2003, p.12; Van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008, pp. 1-2). La PCR se fundamenta en la propiedad natural de la enzima ADN polimerasa, la cual se encarga de replicar hebras de ADN cuando estas se encuentran separadas. Debido a su alta efectividad, especificidad, sensibilidad y fidelidad la PCR es empleada en un sin número de investigaciones a nivel mundial (Kennedy, 2011, pp. 1-3).

El ADN obtenido a partir de sangre periférica y médula ósea sirvió como templado para la amplificación de los polimorfismos de interés del gen *AKT1*. En este caso, los polimorfismos estudiados fueron E319G, P388T y D32E ubicados en el exón 10, 11 y 3 respectivamente.

3.4.1 Diseño de cebadores específicos para los polimorfismos E319G, P388T, y D32E

Para el análisis de cada uno de los polimorfismos el personal del IIB diseñó con anterioridad cebadores que limiten la zona de interés, mediante el uso de una

herramienta bioinformática del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Todo este proceso fue realizado tomando en cuenta las regiones específicas del gen *AKT1* en estudio. De tal manera que se generaron 3 pares de cebadores cuya secuencia y temperatura de hibridación se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de cebadores empleados para la amplificación de los SNPs del gen *AKT1* y sus temperaturas hibridación.

SNP	Sentido del cebador	Secuencia	T de hibridación (°C)
E319G	<i>Forward</i>	5' CAGAGAGGACACAGCATTGCG 3'	64
	<i>Reverse</i>	5' ACAAGGACGGGCACATTAAGA 3'	62
P388T	<i>Forward</i>	5' CAAGGACATCAAGCTTTGGCT 3'	62
	<i>Reverse</i>	5' AAGTCCTTGCTTTCAGGGCT 3'	60
D32E	<i>Forward</i>	5' GCCTCACGTTGGTCCACATC 3'	64
	<i>Reverse</i>	5' CGCACGTCTGTAGGGGAGTA 3'	62

3.4.2 Amplificación de los polimorfismos del gen *AKT1*

Para la amplificación de las diferentes regiones de interés se optimizaron las condiciones y concentraciones de los reactivos. En cuanto al ADN a pesar de que el tipo de muestra de partida era distinta, se empleó la misma cantidad y concentración en todos casos. El Master Mix estuvo conformado por 8 reactivos a diferentes concentraciones, las cuales se detallan en la Tabla 5. La enzima empleada fue *Platinum® Taq DNA polymerase* y deoxinucleótidos trifosato (dNTPs) (Invitrogen, USA). Es importante recalcar que todas las PCR realizadas tuvieron un volumen final de reacción de 25 µl.

Tabla 5. Master Mix para la realización de la PCR

Componentes	Concentración Stock	Vol x 1 (µl)
Agua Milli-Q		14
Green Go Taq® Flexi Buffer (Promega, USA)	5X	5
MgCl₂	50 mM	0,8
dNTPs	10 mM	0,5
Cebador <i>Forward</i>	10 µM	1
Cebador <i>Reverse</i>	10 µM	1
Taq polimerasa	5 U/µl	0,2
ADN genómico	10 ng/µl	2,5
TOTAL		25

El programa utilizado para la amplificación de cada polimorfismo varió de acuerdo a la temperatura de hibridación de los cebadores.

3.4.2.1 Polimorfismo E319G

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) y el programa empleado fue el que se visualiza en la Tabla 6.

Tabla 6. Programa usado para la amplificación del polimorfismo E319G.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Denaturación inicial	94	5	1
Denaturación	94	0,5	
Hibridación	63,6	0,5	35
Elongación	72	1	
Elongación final	72	3	1

3.4.2.2 Polimorfismo P388T

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) y el programa empleado fue el que se visualiza en la Tabla 7.

Tabla 7. Programa usado para la amplificación del polimorfismo P388T.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Denaturación inicial	94	5	1
Denaturación	94	0,5	
Hibridación	60,8	0,5	35
Elongación	72	1	
Elongación final	72	3	1

3.4.2.3 Polimorfismo D32E

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) y el programa empleado fue el que se visualiza en la Tabla 8.

Tabla 8. Programa usado para la amplificación del polimorfismo D32E.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Denaturación inicial	94	5	1
Denaturación	94	0,5	
Hibridación	61,4	0,5	35
Elongación	72	1	
Elongación final	72	3	1

3.5 Electroforesis horizontal convencional

La técnica de electroforesis permite la separación, identificación y purificación de moléculas de acuerdo a su peso molecular en un campo eléctrico (Zavala, 2005, p. 43; Brown, 2007, p. 42). En el caso del ADN, la electroforesis es llevada a cabo en un gel de agarosa horizontal donde se coloca el material

genético que migra en dirección al electrodo de carga positiva (Puerta y Urueña, 2005, p. 24). Se empleó esta metodología para comprobar la correcta amplificación de los fragmentos de interés.

El gel de agarosa utilizado fue al 2%, el cual fue preparado con agar liofilizado y se disolvió en buffer TBE 1X (Tris-borato-EDTA). Esta mezcla fue calentada en un microondas hasta que la agarosa se fundió, y una vez que se enfrió se añadió 1µl de bromuro de etidio por cada 20 mL del volumen final de la solución. La nueva combinación fue colocada sobre el molde del gel y se colocó sus peines para la formación de pocillos.

En cada uno de los pocillos se cargó directamente el producto de la PCR que migró a través del campo eléctrico a 120V durante 25 minutos. El buffer Green Go Taq® Flexi utilizado incrementa la densidad de la muestra para que facilite su carga en el gel. Asimismo, durante la separación se pudo observar como este se dividía en dos bandas de color amarillo y azul ya que cuenta con dos colorantes que permiten monitorear la progresión de la migración en el gel (Promega, 2014). Posteriormente se visualizó el gel en un transiluminador con luz UV.

3.6 Secuenciación de ADN mediante electroforesis capilar

La secuenciación por electroforesis capilar es también conocida como el método de Sanger. Se fundamenta en la replicación de ADN, con la salvedad que se emplea dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados radiactivamente con un colorante diferente para cada base nitrogenada. Los ddNTPs carecen del grupo hidroxilo 3' de tal forma que cuando uno de estos se incorpora a la cadena de ADN, la elongación finaliza (Sundquist, 2008, p, 7; Kulkarni y Pfeifer, 2014, p. 5). El producto final serán varias bandas de diferentes tamaños, que serán sometidas a un detector láser que identificará la fluorescencia de cada una de las bandas en el gel de poliacrilamida. No obstante, si se moviliza el detector láser de forma horizontal, se conseguirán leer varias bandas de forma

simultánea. Toda la información producida pasa directamente a un sistema computarizado que permitirá al operador la lectura de cada muestra (Paz y Miño y López, 2014, p. 129).

3.6.1 Purificación de producto de PCR mediante método AMPure

Una vez comprobado la correcta amplificación de los fragmentos, se procedió a realizar la purificación de los mismos con el kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA). El cual cuenta con una serie de pasos que permiten una alta recuperación de amplicones y una remoción eficiente de reactivos como dNTPs, cebadores, dímeros de cebadores y contaminantes (Beckman-Coulter, 2015).

Para la purificación de los productos amplificados se siguió el protocolo diseñado por el IIB. Se llevó el AMPure a temperatura ambiente y se homogenizó con la ayuda del vórtex. Posteriormente, se colocó 15 μL del reactivo por cada 10 μL del producto de PCR en tubos con una capacidad de 0,2 mL, se mezcló con vórtex y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se colocaron los tubos en la placa magnética y se dejó en reposo por aproximadamente 5 minutos, para que durante este lapso se forme el anillo con las perlas magnéticas y el ADN. A continuación, se retiró el líquido sin tocar las paredes de los tubos ya que allí se encontraban los anillos con el ADN. Se adicionó 200 μL de etanol al 70% en cada uno de los tubos y se incubó por 30 segundos. Se eliminó el alcohol por inversión de la placa magnética sobre papel absorbente. Luego, se repitió el procedimiento de adición del alcohol y eliminación del mismo. Acto seguido, se eliminó los residuos de alcohol de la placa mediante la aspiración de los mismos con una pipeta multicanal, y para asegurar la eliminación completa de este reactivo se dejó secar la placa magnética en la incubadora a 37°C por 15 minutos. Se retiraron los tubos de la placa magnética, se añadió 30 μL de agua Milli-Q y se mezcló por vórtex con la finalidad de desprender el anillo con el ADN. Se colocó en la placa magnética nuevamente y se dejó incubar por 30 segundos a temperatura

ambiente. Finalmente, se aspiró el líquido sin tocar las paredes del tubo para succionar únicamente los amplificadores de ADN purificados.

3.6.2 Reacción en Cadena de la polimerasa de secuenciación

La PCR de secuenciación fue hecha con 5 reactivos a diferentes concentraciones y tuvo como volumen final 6 μl (Tabla 9). Para la secuenciación de los tres polimorfismos en estudio, se utilizó el BigDye Terminator v3.1 y BigDye Terminator Sequencing Buffer 5X (Applied Biosystems, USA). Adicionalmente, se emplearon los cebadores forward y reverse para amplificar los polimorfismos E319G y P388T. Sin embargo, para el polimorfismo D32E únicamente se empleó el cebador reverse.

Tabla 9. MasterMix para la realización de PCR de secuenciación

Reactivo	Concentración Final	Volumen Final
Agua Milli-Q		1,5
BigDye Terminator mix v 3.1		0,5
BigDye Terminator Sequencing Buffer 5X	0,75 X	0,9
Cebador Fw/Rv (1μM)	0,27 μM	1,6
ADN		1,5
TOTAL		6

Todo el proceso de preparación del MasterMix fue realizado fuera del alcance de la luz para evitar que los fluoróforos pierdan su luminosidad. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) y el programa empleado se visualiza en la Tabla 10.

Tabla 10. Programa usado para la PCR de secuencia

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Denaturación inicial	96	3	1
Denaturación	96	0,1	25
Hibridación	50,5	0,05	
Elongación	60	4	

3.6.3 Purificación de producto de PCR de secuenciación mediante método CleanSeq

Al igual que el otro proceso de purificación, este cumple la misma función, se basa en el mismo principio y fue llevado a cabo después de la PCR de secuenciación. El protocolo utilizado fue el diseñado por el IIB.

Se llevó el Agentcourt CleanSeq® (Applied Biosystems, USA) a temperatura ambiente y se homogenizó con la ayuda del vórtex. Posteriormente, se colocó 2 µl del reactivo y 16,2 µl de alcohol al 85% por cada 6 µl del producto de PCR de secuencia; se mezcló con vórtex y se dejó incubar en la placa magnética por 3 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el líquido sin tocar las paredes de los tubos, ya que allí se encontraban los anillos con el ADN. Se adicionó 100 µl de etanol al 85% en cada uno de los tubos y se incubó por 30 segundos. Se eliminó el alcohol por inversión de la placa magnética sobre papel absorbente. Luego, se repitió la adición del alcohol y eliminación del mismo. Acto seguido, se eliminó los residuos de alcohol de la placa mediante la aspiración de los mismos con una pipeta multicanal, y para asegurar la eliminación completa de este reactivo se dejó secar la placa magnética en la incubadora a 37°C por 15 minutos. Se retiraron los tubos de la placa magnética, se añadió 20 µl de agua Milli-Q y se mezcló por vórtex con la finalidad de desprender el anillo con el ADN. Se colocó en la placa magnética nuevamente y se dejó incubar por 30 segundos a temperatura ambiente. Finalmente, se aspiró el líquido sin tocar las paredes del tubo para succionar únicamente los amplificadores de ADN

purificados. El líquido aspirado fue colocado en el plato de carga del secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA), este equipo permitirá determinar si existe la presencia o ausencia de los polimorfismos en estudio.

3.7 Alineamiento de secuencias

Se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas con el fin de encontrar nuevos polimorfismos existentes en las regiones amplificadas. Esto fue llevado a cabo con la ayuda de una herramienta bioinformática denominada M-View, el cual se encuentra disponible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/>. Se empleó específicamente M-View debido a que permite visualizar el alineamiento resaltando las zonas donde hay una variación en la secuencia.

3.8 Análisis estadístico

Después de determinar los genotipos de cada individuo con respecto a los polimorfismos estudiados, se hicieron varias pruebas estadísticas con el fin de analizar los resultados obtenidos para lograr el cumplimiento de los objetivos planteados. Estas fueron equilibrio de Hardy-Weingber, Odds-Ratio y las pruebas no paramétricas Fisher, U Mann-Whitney y Kruskal Wallis.

El equilibrio de Hardy-Weinberger se basa en las frecuencias genotípicas y alélicas en una población, estableciendo que estas se mantienen constantes a lo largo de las generaciones hasta que exista algún factor que rompa este equilibrio. De tal manera que la suma de cada una de las frecuencias genotípicas (homocigoto dominante, heterocigoto y homocigoto recesivo) debe ser igual a 1,00. Los cálculos de las frecuencias esperadas se hicieron en base a la ecuación de Hardy-Weingber: $(p+q)^2 = (p^2+2pq+q^2)$, en donde p y q representan alelos. La frecuencia de los homocigotos serán p^2 y q^2 y de los heterocigotos será $2pq$ (Campbell y Reece, 2007, pp. 457 – 458). Se analizaron

y comprobaron los resultados obtenidos mediante la prueba de chi-cuadrado (χ^2).

Odds-Ratio fue utilizado para conocer el riesgo relativo que tiene un individuo en desarrollar la enfermedad de acuerdo a su perfil genético, entre los grupos de pacientes y controles (Lang y Secic, 2006, p.26). Esto fue realizado mediante el programa SPSS Statistics 20, con tablas de contingencia 2x2 y un intervalo de confianza del 95%.

La prueba F de Fisher de igual forma se efectuó en el programa SPSS y fue considerada debido a que permite determinar la existencia de diferencias significativas entre pacientes y controles para cada uno de los polimorfismos estudiados. Para la realización de esta prueba se empleó la opción de tablas de contingencia que facilitan el cálculo del valor de p, no obstante, esta prueba estadística fue realizada como exacta ya que las frecuencias observadas fueron menores que 5.

Asimismo, se correlacionaron los SNPs y haplotipos con las variables cualitativas encontradas en los historiales clínicos (género, citogenética y estadiaje) a través del uso de la prueba de Fisher. Mientras que la relación entre los polimorfismos y haplotipos con las variables cuantitativas de los datos clínicos (edad, supervivencia, características inmunológicas y parámetros hematológicos) fue mediante el uso de dos pruebas estadísticas en el programa SPSS. Las pruebas estadísticas empleadas fueron U Mann-Whitney y Kruskal Whitney debido a que los datos clínicos fueron variables continuas, y tienen como objetivo analizar la distribución de los polimorfismos y haplotipos en función de los historiales. Específicamente la prueba U Mann-Whitney fue usada ya que comprueba la heterogeneidad de dos muestras independientes, mientras que Kruskal Wallis cumple la misma función que la anterior, pero es empleada para tres o más muestras independientes. En este estudio el número de muestras independientes fue la cantidad de variantes genóticas o haplotipos registrados.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

4.1 Historias Clínicas

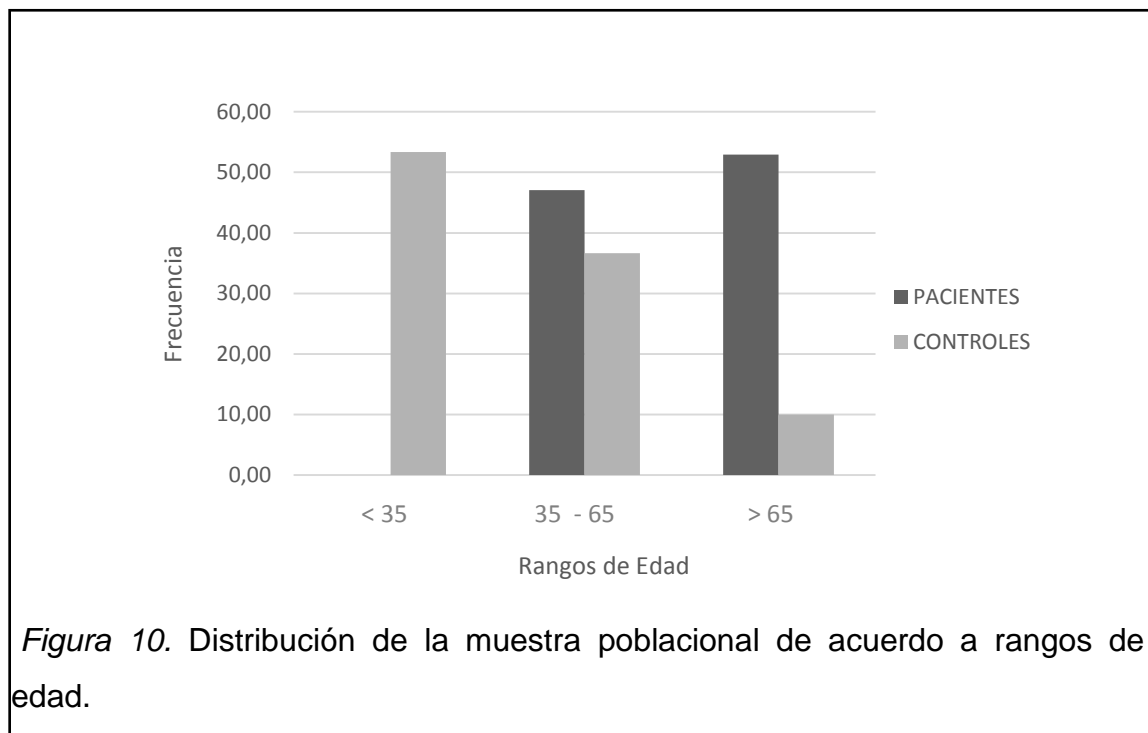
El presente estudio fue realizado con 34 muestras de pacientes y 60 muestras de controles, para lo cual se recopiló toda la información clínica de los afectos tanto del Hospital Oncológico Solón Espinoza Ayala (SOLCA) como del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM). Para esta investigación se tomó en cuenta algunos datos de interés encontrados en las historias clínicas, tales como: edad, género, clasificación citogenética, estadio de la enfermedad, tiempo de supervivencia, características inmunológicas (IgG, IgA, IgM, IgE) y parámetros hematológicos (hemoglobina, glóbulos blancos, plaquetas, linfocitos, urea, creatinina, calcio, albumina, lactato deshidrogenasa lactato deshidrogenasa LDH, beta-2-microglobulina B2M y proteínas totales). No obstante, es importante mencionar que no todas las muestras contaron con la información completa. Además, se desconoce el origen étnico al que pertenecen los pacientes. En el Anexo 1 y 2 se detalla la información recolectada sobre las historias clínicas.

4.1.1 Edad

Se realizó una estratificación por rangos de edad para que subdividir a la población en 3 grandes grupos (Figura 10). Estos grupos fueron creados considerando el comportamiento de la enfermedad, la cual afecta mayoritariamente a personas con más de 65 años y en un menor porcentaje a menores de 35 años (American Cancer Society, 2014, p. 6). La población de afectos mostró una edad media de 64 años y en controles la edad promedio fue de 37 años.

En la población con MM, el 47,06% se encuentra entre los 35 y 65 años y el 52,94% supera los 65 años de edad. Mientras que en los controles existe una

mayor cantidad de individuos menores de 35 años (53,33%), y muy pocos sujetos superan los 65 años (10%).

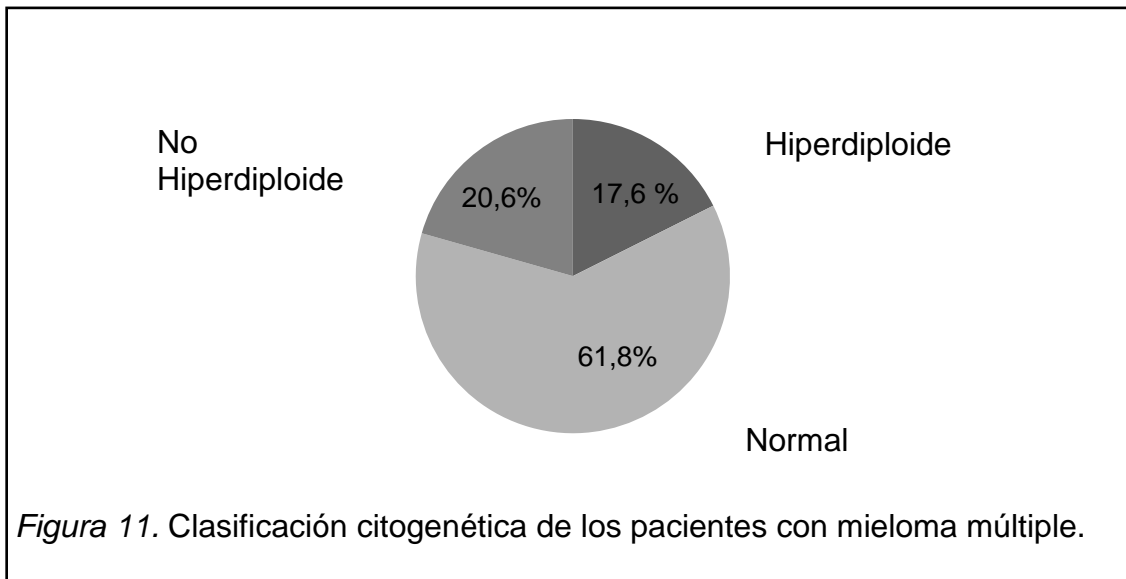


4.1.2 Género

En el grupo afecto el 61,8% (21 de un total de 34) de muestras representó al sexo masculino y el 38,2% (13 de un total de 34) restante al sexo femenino. Mientras que en el grupo control se mantuvo el equilibrio con un 50% (30 de un total de 60) de hombres y mujeres respectivamente.

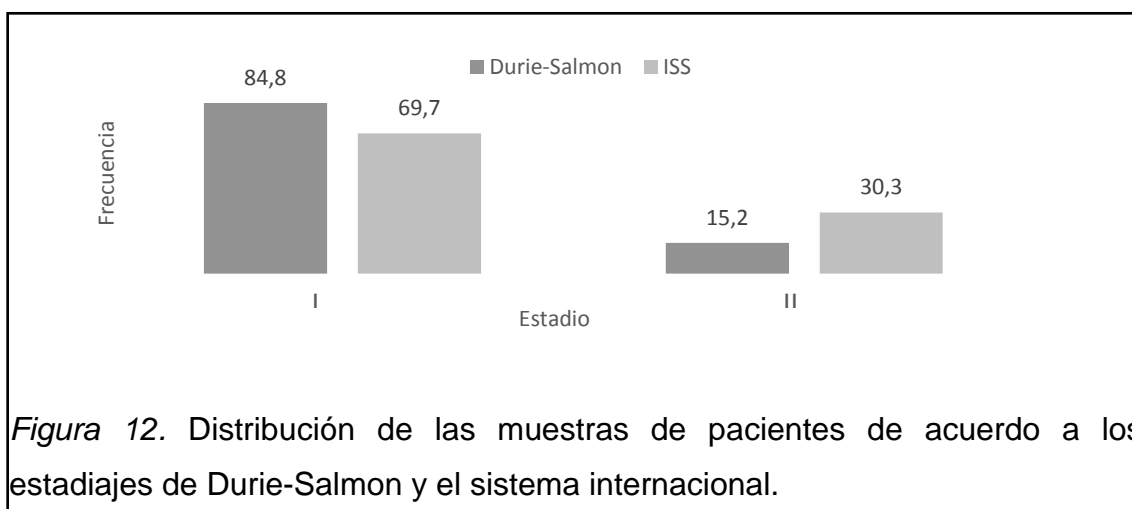
4.1.3 Clasificación citogenética

Se contó con la información de clasificación citogenética en todas las muestras de pacientes, determinando así que el 61,8% de la población tienen un cariotipo normal, el 17,6% exhiben características de hiperdiploidía y el 20,6% presentan pérdida de cromosomas y constantes translocaciones. Sin embargo, no a todas las muestras se les realizó un estudio citogenético debido a que los hospitales no cuentan con un presupuesto para este análisis. Razón por la cual, a la mayoría de las muestras se les asignó un cariotipo normal.



4.1.4 Estadio de la enfermedad

Para la clasificación de acuerdo al estadio de la enfermedad se consideró el estadiaje del sistema internacional y de Durie-Salmon. Esta estratificación fue realizada según los parámetros establecidos a nivel mundial. Únicamente se contó con la información de 33 pacientes y se encontró que de acuerdo al estadiaje de Durie-Salmon el 84,8% de la población atraviesa el estadio I de la enfermedad y el 15,2% el estadio II. Por otro lado, mediante el estadiaje del sistema internacional (ISS) el 69,7% se encuentra en el estadio I y el 30,3% en el estadio II.



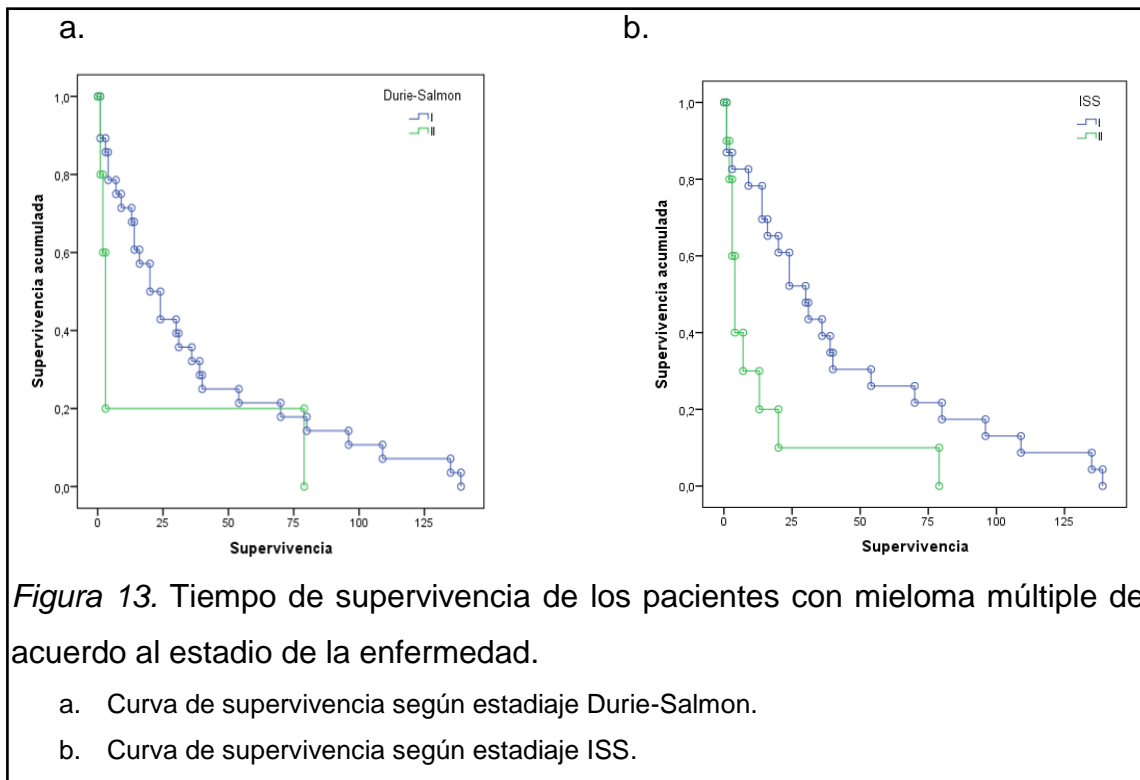
4.1.5 Tiempo de supervivencia

Para evaluar el tiempo de supervivencia se consideraron los rangos promedios establecidos por la American Cancer Society (2014): 1 – 29 meses (estadio III), 30 – 44 meses (estadio II), 45 – 62 meses y más (estadio I). Sin embargo, estos rangos promedio no coincidieron con los encontrados en la población afecto, ya que para el estadio I el rango fue de 1 – 139 meses y para el estadio II fue de 1 – 79 meses. Adicionalmente se obtuvo la media y la mediana para cada estadio considerando el sistema de clasificación (Tabla 11). Estos parámetros estadísticos fueron analizados para visualizar mejor el comportamiento de la supervivencia, siendo la media el producto de los valores totales y la mediana un valor más real de acuerdo a la tendencia de los datos recopilados.

Tabla 11. Supervivencia de pacientes con mieloma múltiple.

SISTEMA	ESTADIO	MEDIA	MEDIANA	RANGO
DURIE-SALMON	I	36,9	22,0	1 - 139
	II	17,6	3,0	1 - 79
ISS	I	42,9	30,0	1 - 139
	II	13,6	4,0	1 - 79

Asimismo, se realizaron curvas de supervivencia tomando en cuenta el estadio y el sistema de clasificación empleado (Figura 13). En estas se pudo visualizar un comportamiento similar entre los sistemas de clasificación para los estadios I y II, teniendo un mayor tiempo de supervivencia los pacientes del estadio I que los del estadio II.



4.1.6 Características inmunológicas

Las características inmunológicas cumplen un papel indispensable en el diagnóstico de la enfermedad, razón por la cual se consideró este parámetro. Se obtuvo la media, mediana y rango en los pacientes con mieloma múltiple para poder relacionar con el rango normal esperado (Tabla 12).

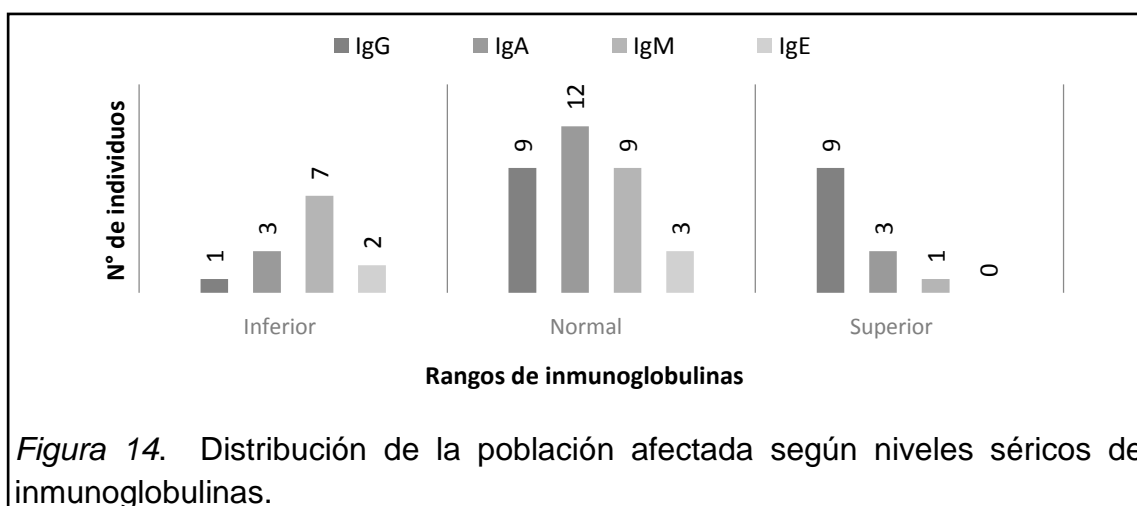
Tabla 12. Características inmunológicas en pacientes con mieloma múltiple.

Características (unidades)	Rango normal	Pacientes con MM		
		Media	Mediana	Rangos
IgG (mg/dL)	751 - 1560	1954,0	1634,0	657,6 - 5110
IgA (mg/dL)	82 - 453	238,5	161,5	10,3 - 860
IgM (mg/dL)	46 - 304	84	85,5	25,7 - 251
IgE (ng/mL)	20,40 - 87,00	14,5	9	6 - 42,9

Además, se establecieron 3 niveles cuantitativos para la medición de cada inmunoglobulina en sangre, siendo estas: inferior, normal y superior tomado en

cuenta el rango promedio señalado en la Tabla 12. En la mayoría de los casos no existió esta información registrada en las historias clínicas de los pacientes, razón por la cual se trabajó únicamente con aquellos que si la poseían.

Los datos arrojaron que, en la población afectada la inmunoglobulina M se encuentra en un rango inferior al esperado. Mientras que la inmunoglobulina que se encuentra con mayor frecuencia en un rango normal es la A, y la que se encuentra en un rango superior al deseado es la inmunoglobulina G. Por lo tanto, se puede clasificar a la mayoría de estos pacientes como mieloma IgG (Figura 14).



4.1.7 Parámetros hematológicos

Los parámetros hematológicos fueron tomados en cuenta debido a que son algunas manifestaciones clínicas que permiten diagnosticar el mieloma múltiple. En este caso se consideró: hemoglobina, leucocitos, plaquetas, linfocitos, urea, creatinina, calcio, albumina, lactato deshidrogenasa, beta-2-microglobulina y proteínas totales. En la tabla 13, se describen los rangos observados en la población de pacientes con mieloma múltiple. No obstante, para el grupo control no se contó con esta información en la base de datos del IIB.

Tabla 13. Parámetros hematológicos de los pacientes con mieloma múltiple.

Características (unidades)	Rango normal	Pacientes con MM		
		Media	Mediana	Rangos
Hemoglobina (g/dL)	14 - 18	12,7	13,1	8,7 - 15,4
Leucocitos (K/ μ L)	4,5 - 10	6,7	6,4	2,5 - 13,8
Plaquetas	130.000- 400.000	257.093	234.000	39.500 - 989.600
Linfocitos (K/ μ L)	13 - 40	22,7	21,4	9,3 - 55
Urea (mg/dL)	10-50	44,3	36,7	20,7 - 170
Creatinina (mg/dL)	0,5 - 1,4	1	0,9	0,3 - 2,7
Calcio (mg/dL)	4,0 – 6,0	5,8	4,7	3,8 - 13,3
Albumina (g/dL)	3,5 - 5,5	3,6	3,6	1,7 - 5,1
LDH (U/L)	240 - 480	316,6	276	174 - 518,5
B2M (ng/mL)	604 - 2.286	2.328,9	1,91	1.361 - 4.804,7
Proteínas Totales (g/Dl)	6,6 - 8,7	7,3	7,3	4,2 - 11,6

Al analizar cada característica hematológica se pudo determinar que los pacientes con MM presentan una media que se encuentra dentro del rango normal, pero no para la B2M. Sin embargo, es comprensible que este parámetro se encuentre fuera de rango ya que este es considerado como crítico para esta enfermedad según el sistema de clasificación internacional (ISS). Asimismo, se identificó que el rango observado de todos los parámetros analizados muestra valores inferiores y/o superiores al rango normal esperado, por lo que se relacionaron con la supervivencia. Este análisis dio como resultado que en promedio 61,2% de individuos tuvieron valores dentro del rango normal para los valores hematológicos, y el 37,4% de los pacientes estuvieron fuera de este rango. De estos últimos, el 25% tuvieron una supervivencia de 1- 29 meses; y de los primeros el 28,3% vivieron como mínimo 30 meses en adelante. Es decir que los pacientes que exhiben valores

fuera del rango esperado tienen un menor tiempo de supervivencia en comparación a aquellos que presentan valores normales.

4.2 Extracción de ADN de muestras patológicas y controles

A través de los protocolos establecidos se obtuvieron 34 muestras de pacientes con mieloma múltiple. Cada una de ellas poseía concentraciones de ADN muy variables, por lo que se realizó una dilución a una concentración de 10 ng/ μ l (Anexo 3). De igual manera se diluyeron las muestras controles de los grupos étnicos: mestizos y negros a una concentración de 10 ng/ μ l. Mientras que las muestras de los indígenas ya fueron previamente estandarizadas a 2 ng/ μ l por el personal del IIB (Anexo 4).

4.3 Amplificación de los polimorfismos

Mediante la técnica de PCR se amplificaron las tres regiones de interés en las muestras control y afectos. Cada uno de los SNPs se situaron en diferentes exones del gen *AKT1*, de la siguiente manera: exón 10 (E319G), exón 11 (P388T) y exón 3 (D32E). Posteriormente, se validaron las amplificaciones mediante corridas electroforéticas, las cuales se encuentran ilustradas en las Figuras 15, 16 y 17.

En la Figura 15, se visualiza la electroforesis de los amplicones del polimorfismo E319G que tuvieron un peso molecular de 153 pares de bases.

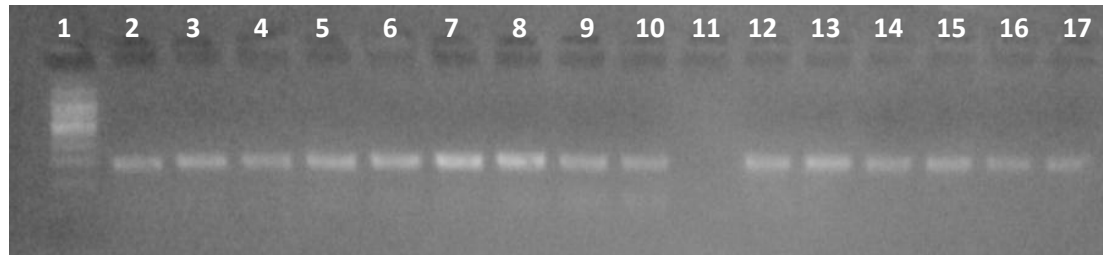


Figura 15. Electroforesis de amplicones del polimorfismo E319G de 153 pb.

- a. Carril 1: Marcador molecular de 100 pares de bases (Promega, USA).
- b. Carriles 2 – 10: Amplicones provenientes de muestras de pacientes con MM.
- c. Carriles 12-17: Amplicones provenientes de muestras de controles.
- d. Carril 11: Control negativo (Reacción llevada a cabo sin la adición de ADN).

En la Figura 16, se visualiza la electroforesis de los amplicones del polimorfismo P388T que tuvieron un peso molecular de 132 pares de bases.

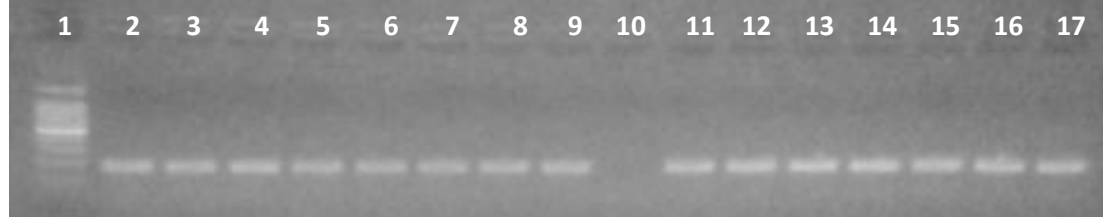


Figura 16. Electroforesis de amplicones del polimorfismo P388T de 132 pb.

- a. Carril 1: Marcador molecular de 100 pares de bases (Promega, USA).
- b. Carriles 2 – 9: Amplicones provenientes de muestras de pacientes con MM.
- c. Carriles 11-17: Amplicones provenientes de muestras de controles.
- d. Carril 10: Control negativo (Reacción llevada a cabo sin la adición de ADN).

En la Figura 17, se visualiza la electroforesis de los amplicones del polimorfismo D32E que tuvieron un peso molecular de 75 pares de bases.

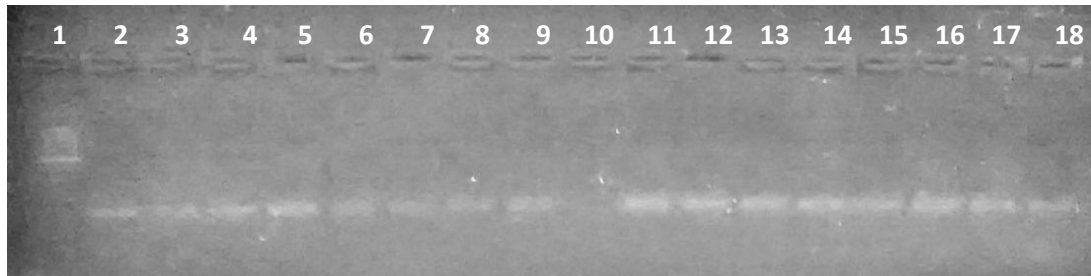


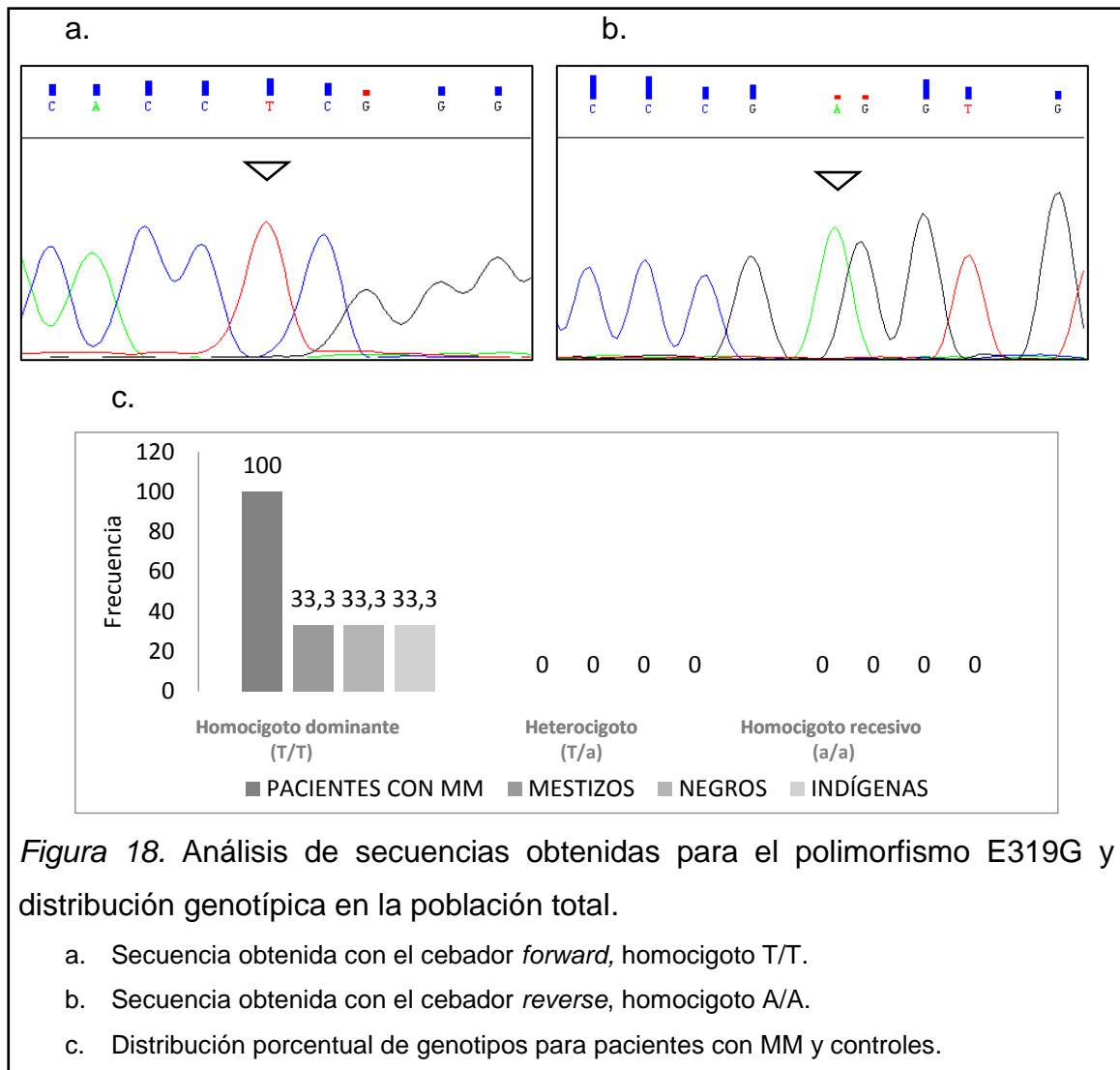
Figura 17. Electroforesis de amplicones del polimorfismo D32E de 75 pb.

- a. Carriles 1 y 20: Marcador molecular de 100 pares de bases (Promega, USA).
- b. Carriles 2 – 9: Amplicones provenientes de muestras de pacientes con MM.
- c. Carriles 11-18: Amplicones provenientes de muestras de controles.
- d. Carril 10: Control negativo (Reacción llevada a cabo sin la adición de ADN).

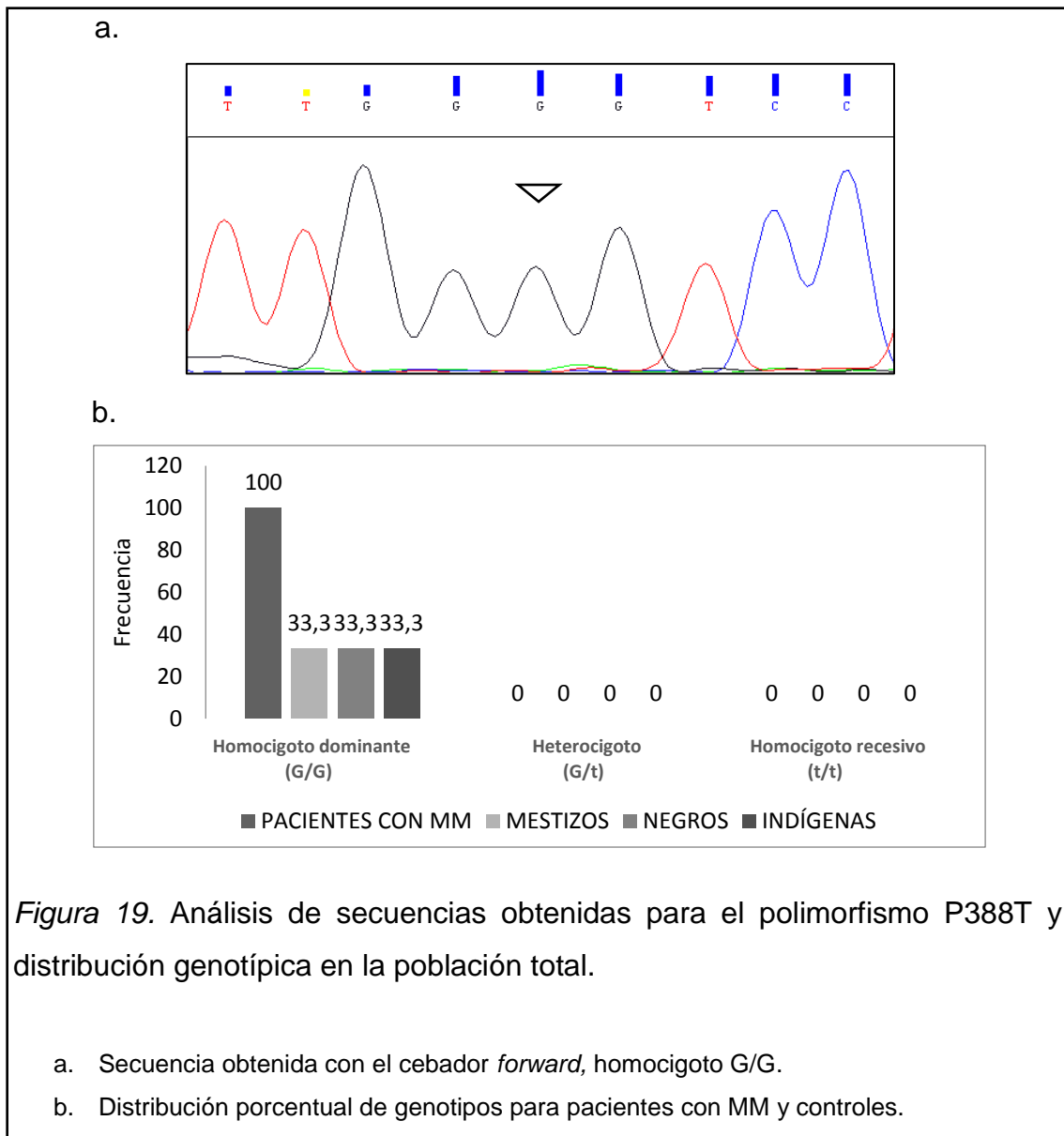
4.4 Secuenciación de ADN mediante electroforesis capilar

Se empleó el protocolo descrito anteriormente para obtener las secuencias de cada fragmento en estudio. Este procedimiento fue hecho para los tres polimorfismos tanto para afectados y controles, sin realizar ninguna variación entre ellos. Los electroferogramas obtenidos por el secuenciador presentaron cada base nitrogenada de diferente color, siendo azul para citosina, verde para adenina, rojo para timina y negro para guanina.

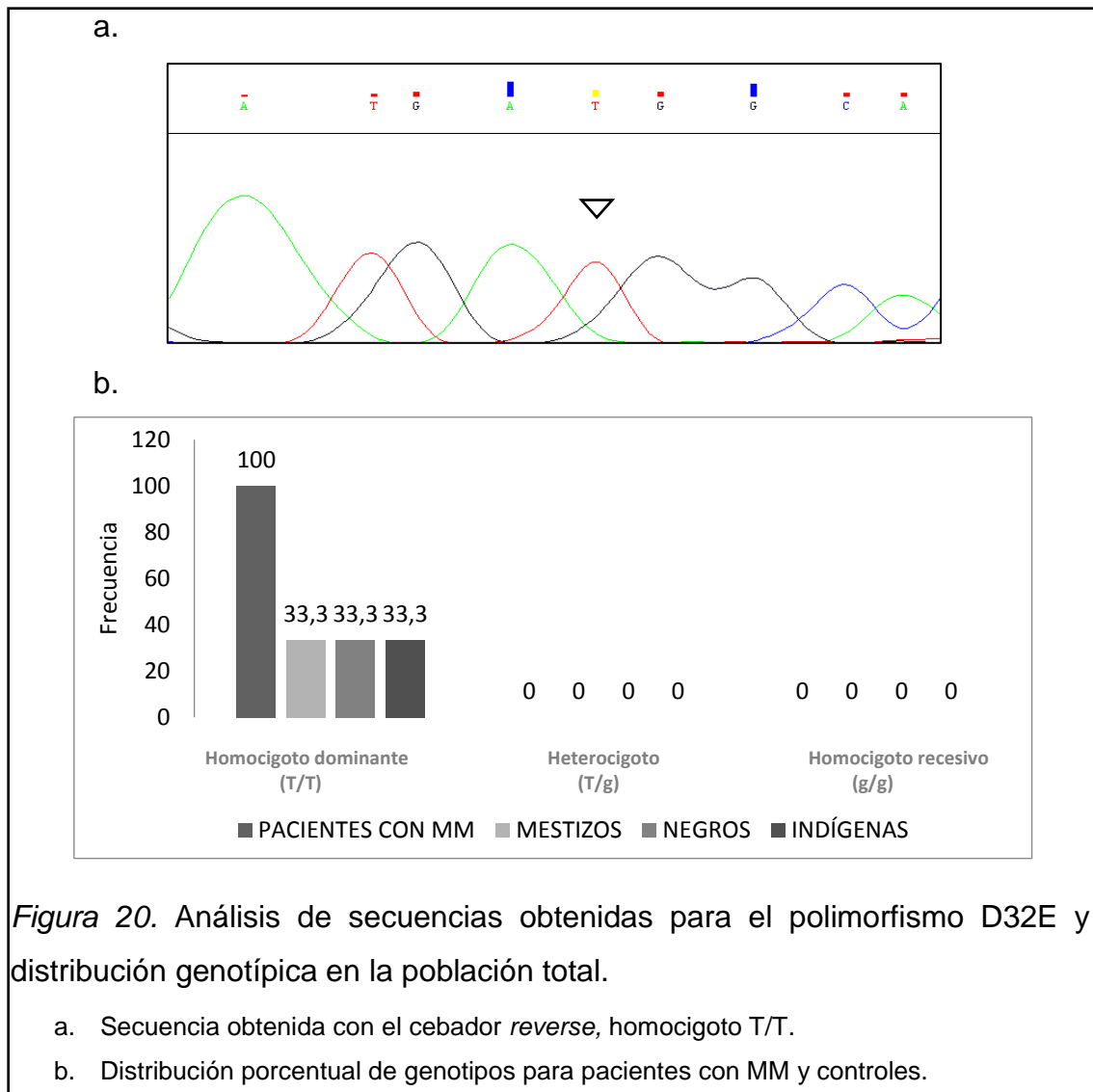
La secuenciación del polimorfismo E319G fue realizada empleando cebadores en ambos sentidos, es decir, *forward* y *reverse*. Esto fue hecho con el fin de comprobar la presencia o ausencia del polimorfismo en las muestras. Sin embargo, no se encontró ninguna variación en la secuencia esperada es decir que pacientes y controles exhibieron un genotipo homocigoto dominante T/T (Figura 18).



La secuenciación del polimorfismo P388T fue realizada empleando los cebadores *forward* y *reverse*, pero al analizar la secuencia únicamente el cebador *forward* permitió visualizar la zona de interés. El cebador *reverse* amplificó una región aledaña a la deseada pero no específicamente la zona del polimorfismo. En cuanto a la frecuencia genotípica, de igual manera no se encontró ninguna variación en la secuencia esperada, teniendo pacientes y controles un genotipo homocigoto dominante G/G (Figura 19).



Asimismo, la secuenciación del polimorfismo D32E fue realizada empleando el cebador *reverse*, debido a que solamente éste amplificó la zona de interés. No obstante, no se encontró ninguna diferencia con la secuencia esperada para los casos afectos y controles. En la Figura 20 se muestra la región en estudio de la secuencia obtenida, siendo esta homocigoto dominante T/T.



4.5 Alineamiento de secuencias

Después de la amplificación de las regiones donde se situaron los tres polimorfismos de interés, se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas con M-View. Se encontraron nuevas variantes a lo largo de la secuencia esperada, registrando un total de 9 polimorfismos. M-View permite ver el alineamiento resaltando las zonas donde hay una variación en la secuencia con una coloración distinta al patrón predominante. En el fragmento esperado de E319G no se detectaron SNPs nuevos en secuencias de pacientes ni controles (Figura 21).

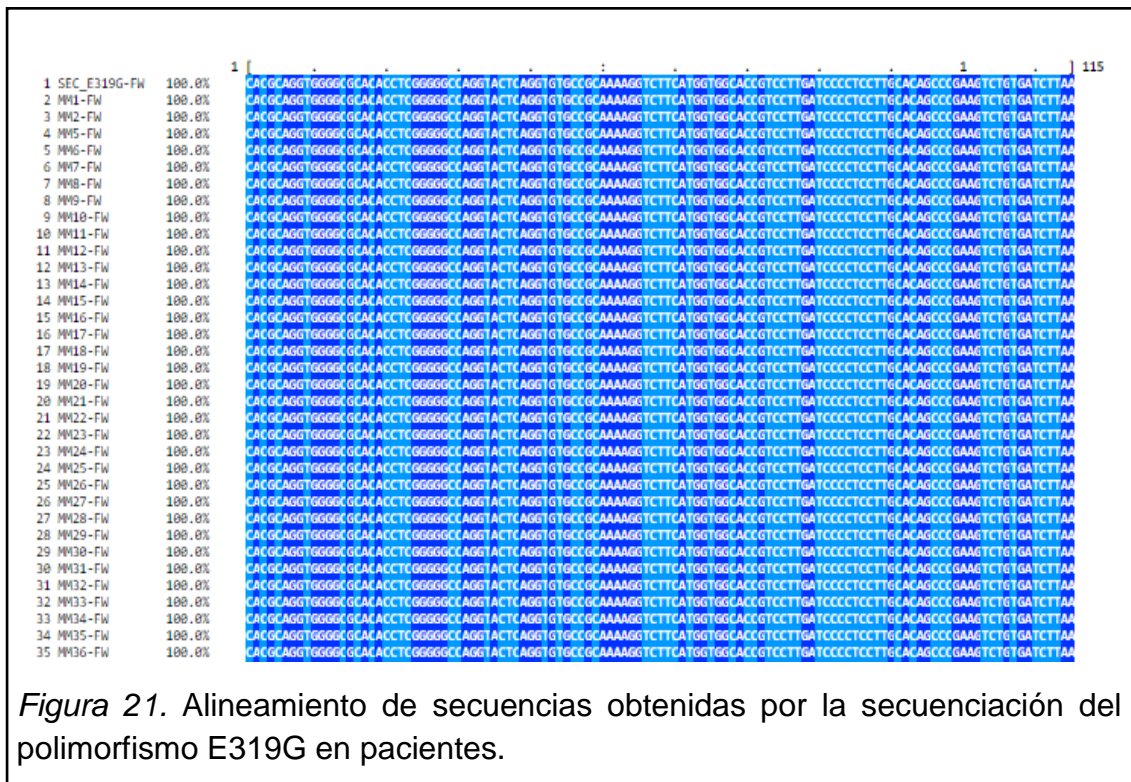


Figura 21. Alineamiento de secuencias obtenidas por la secuenciación del polimorfismo E319G en pacientes.

En el fragmento esperado de P388T se encontraron nuevos polimorfismos empleando el cebador *forward* y *reverse*. Con *forward* se encontró un polimorfismo registrado en NCBI como rs2494732, en la posición 104.772.855 del gen *AKT1* (Figura 22). Este estuvo presente en pacientes y controles de manera similar.

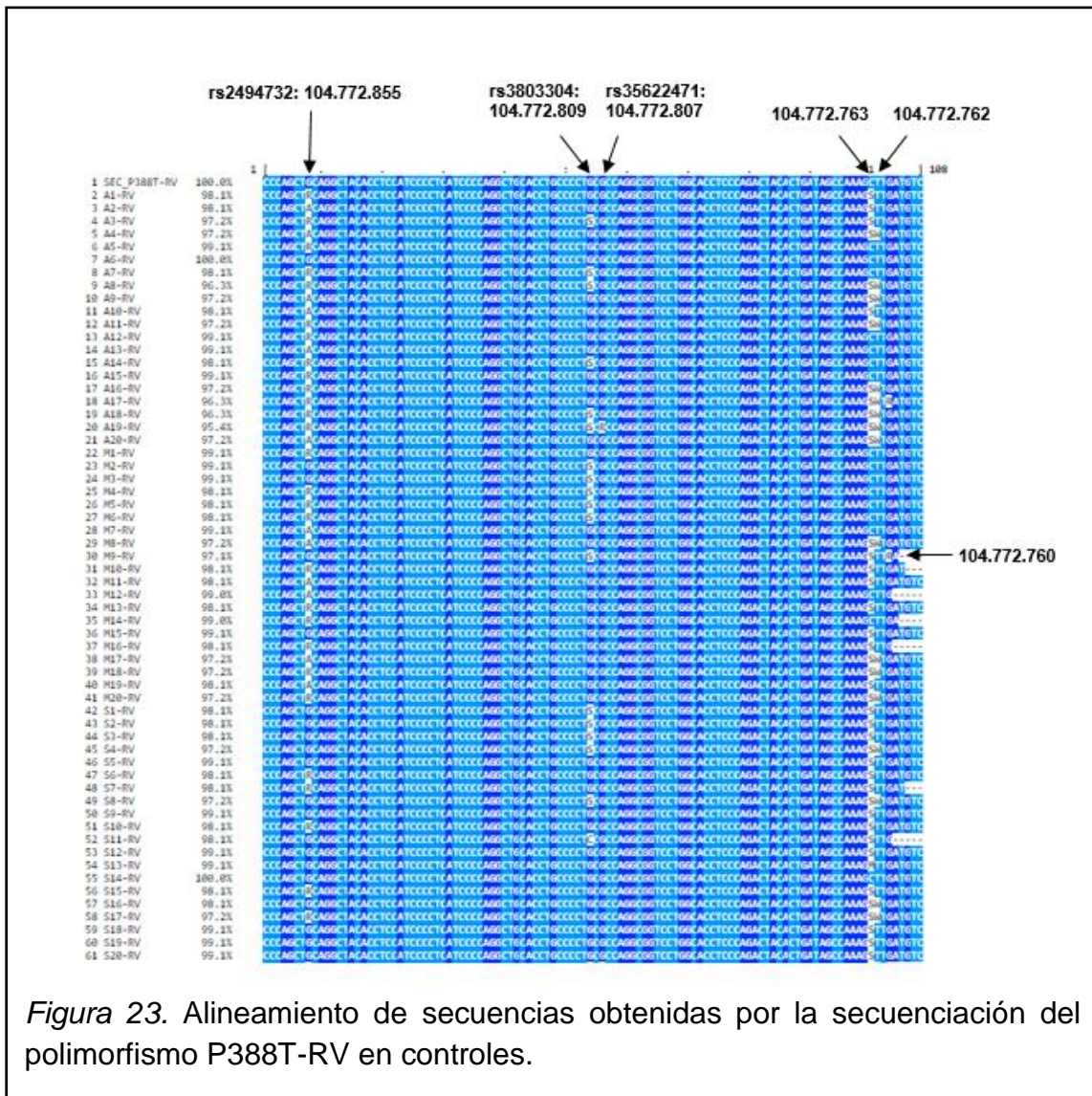
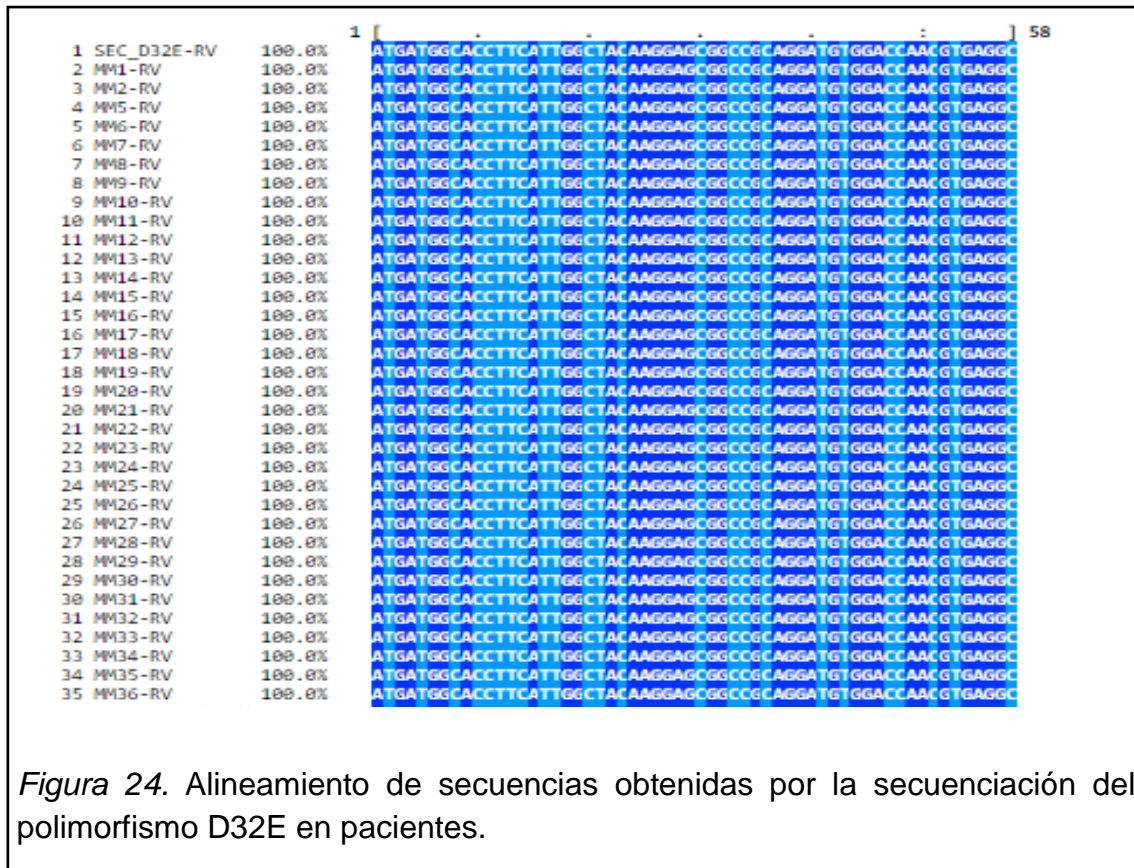


Figura 23. Alineamiento de secuencias obtenidas por la secuenciación del polimorfismo P388T-RV en controles.

En cuanto al alineamiento de las secuencias resultantes de la amplificación del polimorfismo D32E no mostraron variación alguna en ambos grupos de muestras (pacientes y controles), tal como se señala en la Figura 24.



Posterior al alineamiento se pasó a comprobar la presencia de estas variantes en los electroferogramas. Primero se visualizó la secuencia obtenida con el cebador *forward* que amplifican la región del polimorfismo P388T, donde se encontró que existió otro polimorfismo rs2494732 en la mitad del fragmento. El polimorfismo rs2494732 fue analizado en la población total, encontrando individuos que exhiben un genotipo homocigoto dominante (T/T), otros heterocigotos (T/c) y algunos homocigotos recesivos (c/c) (Figura 25).

En cuanto a los pacientes, el 32,4% fueron homocigotos dominantes, el 29,4% heterocigotos y el 38,2% homocigotos recesivos para este polimorfismo. Mientras que, en el caso de los controles, dentro de los mestizos el 25% fueron homocigotos dominantes, el 20% heterocigotos y el 55% homocigotos recesivos. Asimismo, se analizó el genotipo de los negros y se encontró que el 25% fueron homocigotos dominantes, el 10% heterocigotos y el 65% homocigotos recesivos.

Sin embargo, en los indígenas no se observaron homocigotos dominantes pero el 75% fueron heterocigotos y 25% homocigotos recesivos.

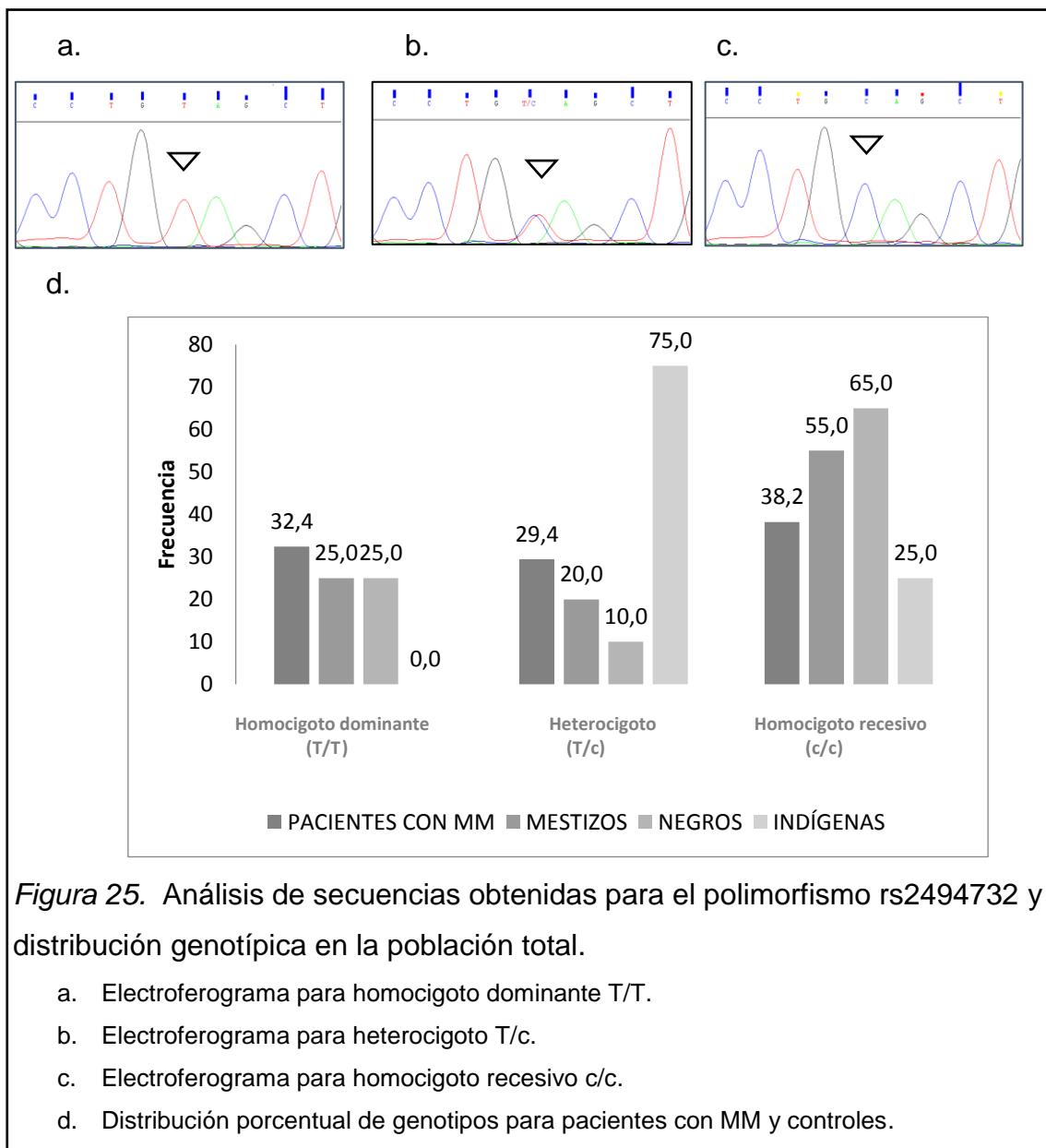


Figura 25. Análisis de secuencias obtenidas para el polimorfismo rs2494732 y distribución genotípica en la población total.

- Electroferograma para homocigoto dominante T/T.
- Electroferograma para heterocigoto T/c.
- Electroferograma para homocigoto recesivo c/c.
- Distribución porcentual de genotipos para pacientes con MM y controles.

Adicionalmente, se realizó la prueba de Fisher relacionando el grupo afecto con el grupo control considerando el origen étnico de este último. En esta prueba se encontró que existe diferencia en la distribución del polimorfismo en la relación paciente e indígena ya que el valor de p fue menor a 0,05 (Tabla 14).

Tabla 14. Prueba de Fisher para la distribución del polimorfismo rs2494732.

Relación	Valor F	Valor p
Pacientes vs. Mestizos	1,400	0,554
Pacientes vs. Negros	4,059	0,132
Pacientes vs. Indígenas	13,414	0,001

De la misma forma se analizó la secuencia resultante de la amplificación de P388T con el cebador *reverse*, la cual muestra 5 nuevos polimorfismos ubicados en la mitad y fin del fragmento. En la mitad se encuentran 2 polimorfismos: rs3803304 y rs356224711. Los 3 polimorfismos restantes fueron encontrados en la porción final de la secuencia, muy próximos entre ellos. Estos 3 últimos se encuentran en las posiciones: 104.772.763, 104.772.762 y 104.772.760. Es importante recalcar que estos SNPs aún no han sido registrados en la base de datos de NCBI, y por lo tanto no existen artículos donde hayan sido mencionados.

El polimorfismo rs3803304 estuvo presente tanto en pacientes como en controles, de tal manera que existieron homocigotos dominantes (G/G), heterocigotos (G/c) y homocigotos recesivos (c/c) (Figura 26). En el grupo de pacientes con MM, el 58,8% fueron homocigotos dominantes y el 41,2% heterocigotos. En el caso de los controles, los mestizos mostraron una distribución genotípica distinta, el 70% homocigotos dominantes y el 30% heterocigotos. El comportamiento genético de los negros fue similar al de los mestizos, el 70% homocigotos dominantes y el 30% heterocigotos. Finalmente, de los indígenas el 70% fueron homocigotos dominantes, el 25% heterocigotos y 5% homocigotos recesivos.

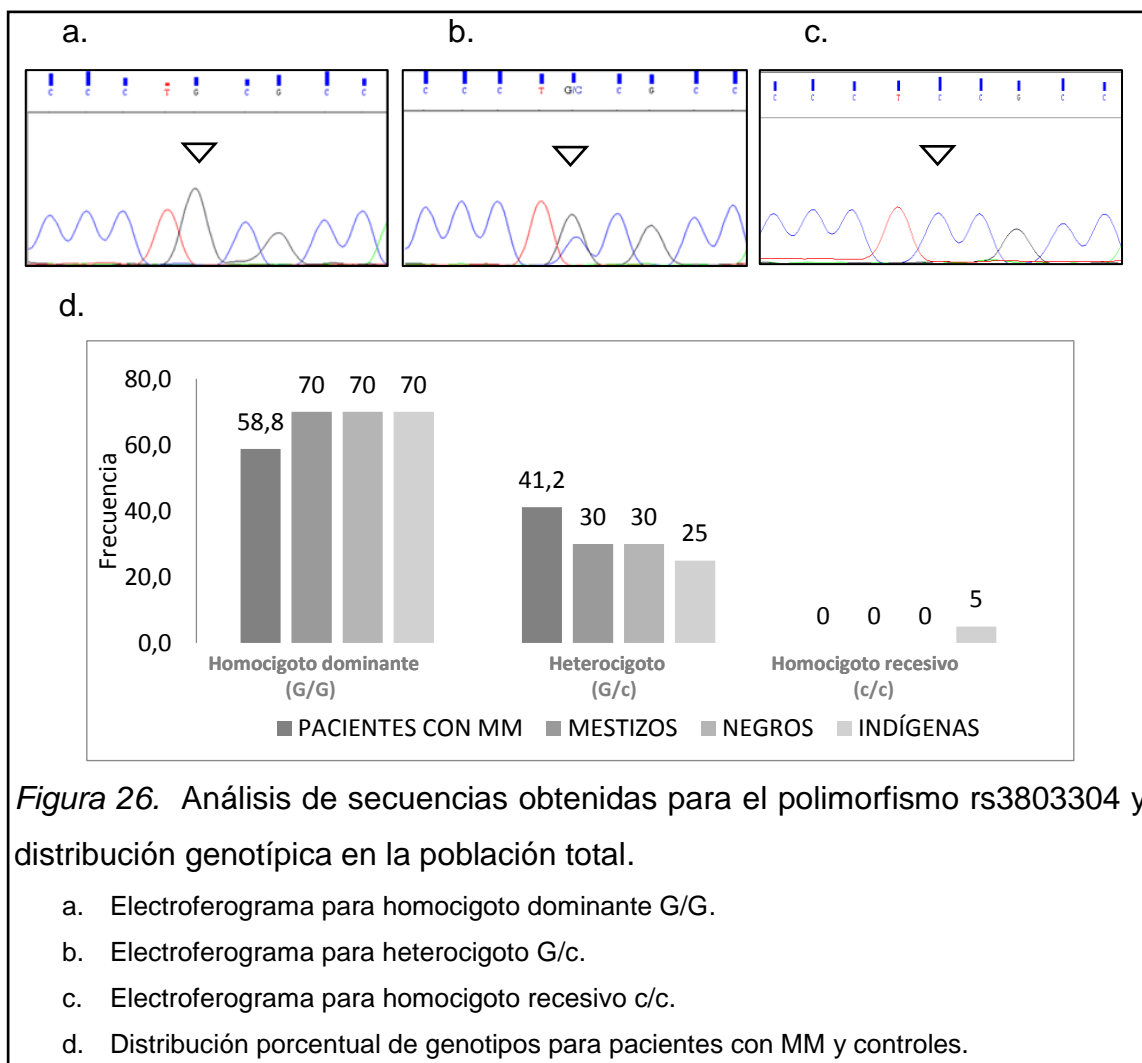


Figura 26. Análisis de secuencias obtenidas para el polimorfismo rs3803304 y distribución genotípica en la población total.

- Electroferograma para homocigoto dominante G/G.
- Electroferograma para heterocigoto G/c.
- Electroferograma para homocigoto recesivo c/c.
- Distribución porcentual de genotipos para pacientes con MM y controles.

Al realizar la prueba de Fisher no se encontraron diferencias estadísticas significativas con ningún grupo étnico ya que $p > 0,05$ (Tabla 15).

Tabla 15. Prueba de Fisher para la distribución del polimorfismo rs3803304.

Relación	Valor F	Valor p
Pacientes vs. Mestizos	0,675	0,300
Pacientes vs. Negros	0,675	0,300
Pacientes vs. Indígenas	2,731	0,227

El polimorfismo rs35622471 estuvo presente en la población total (pacientes y controles), sin embargo, solo existieron homocigotos dominantes (G/G) y heterocigotos (G/a) (Figura 27). En el grupo de pacientes con MM, el 100%

fueron homocigotos dominantes. De igual manera en el caso de los controles, el 100% de los mestizos e indígenas fueron homocigotos dominantes. En cuanto a los negros, el 95% fueron homocigotos dominantes y el 5% fueron heterocigotos.

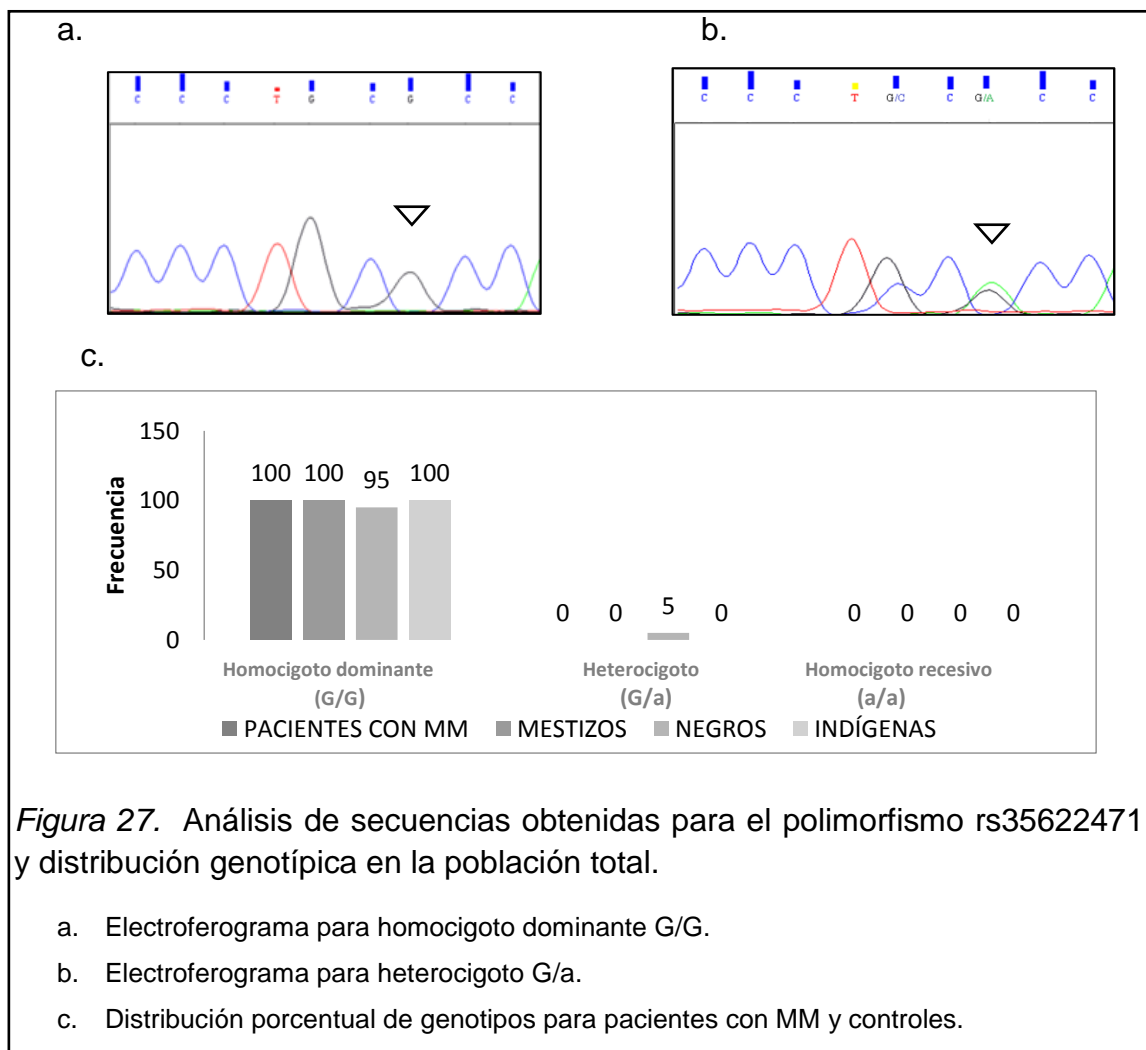


Figura 27. Análisis de secuencias obtenidas para el polimorfismo rs35622471 y distribución genotípica en la población total.

- Electroferograma para homocigoto dominante G/G.
- Electroferograma para heterocigoto G/a.
- Distribución porcentual de genotipos para pacientes con MM y controles.

No se pudo realizar la prueba Fisher para relacionar pacientes con mestizos e indígenas respectivamente, ya que no presentaron más de una variante genotípica. Razón por la cual, solamente se relacionó pacientes con negros, pero el valor de p fue de 0,370, es decir que no fue significativo.

Uno de los polimorfismos encontrados al final de la secuencia se encuentra en la posición 104.772.763 del gen *AKT1*. Este SNP fue encontrado tanto en

pacientes como en controles en distintas frecuencias, pero únicamente se registraron homocigotos dominantes (C/C) y heterocigotos (C/g) (Figura 28). En pacientes el 64,7% fueron homocigotos dominantes y el 35,3% heterocigotos. No obstante, en los controles la frecuencia genotípica varió ampliamente según el grupo étnico. El 45% de los mestizos fueron homocigotos dominantes y el 55% heterocigotos, el 35% de los negros fueron homocigotos dominantes y el 65% heterocigotos, y en los indígenas el 5% fueron homocigotos dominantes y el 95% heterocigotos.

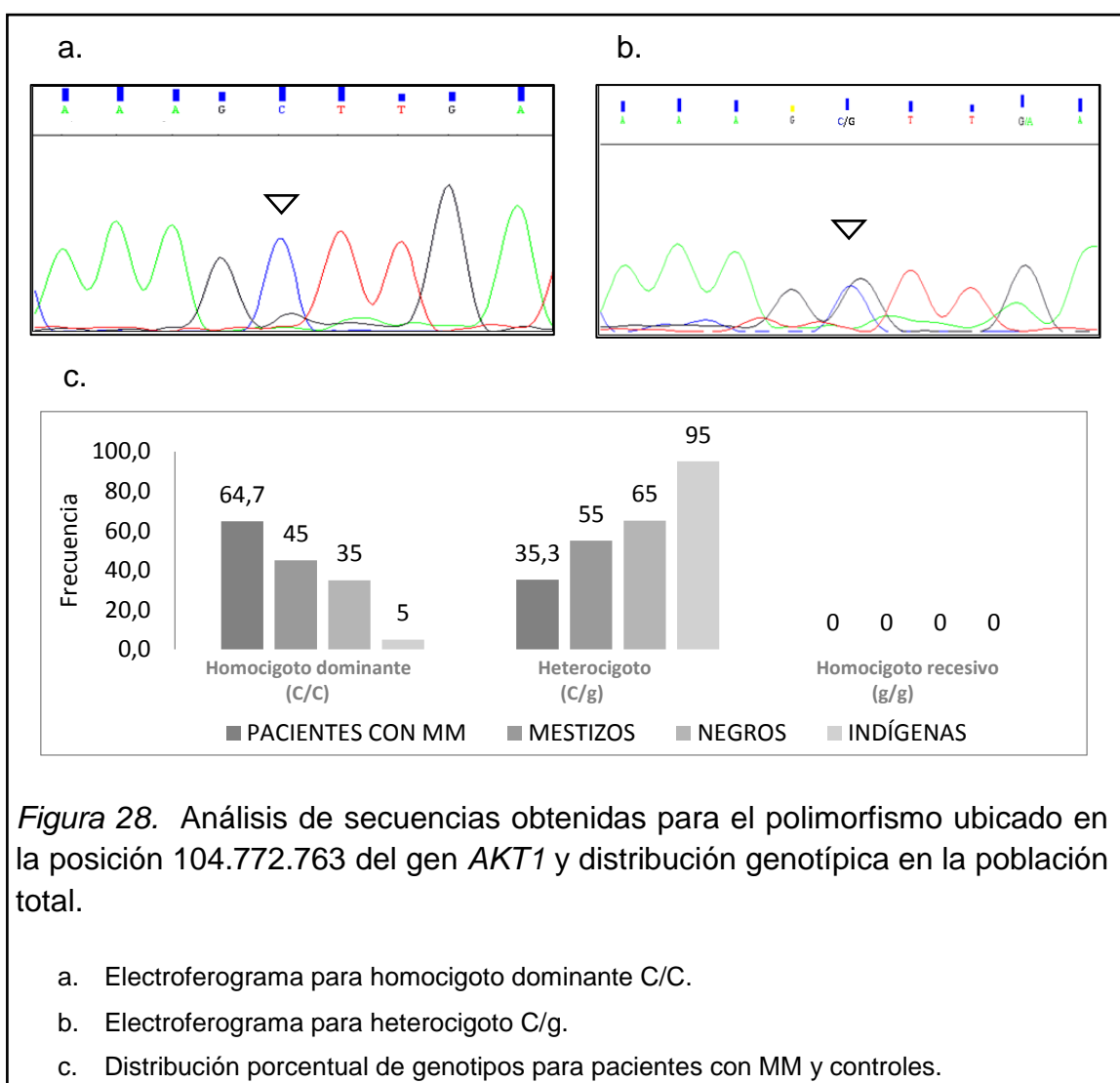


Figura 28. Análisis de secuencias obtenidas para el polimorfismo ubicado en la posición 104.772.763 del gen *AKT1* y distribución genotípica en la población total.

- Electroferograma para homocigoto dominante C/C.
- Electroferograma para heterocigoto C/g.
- Distribución porcentual de genotipos para pacientes con MM y controles.

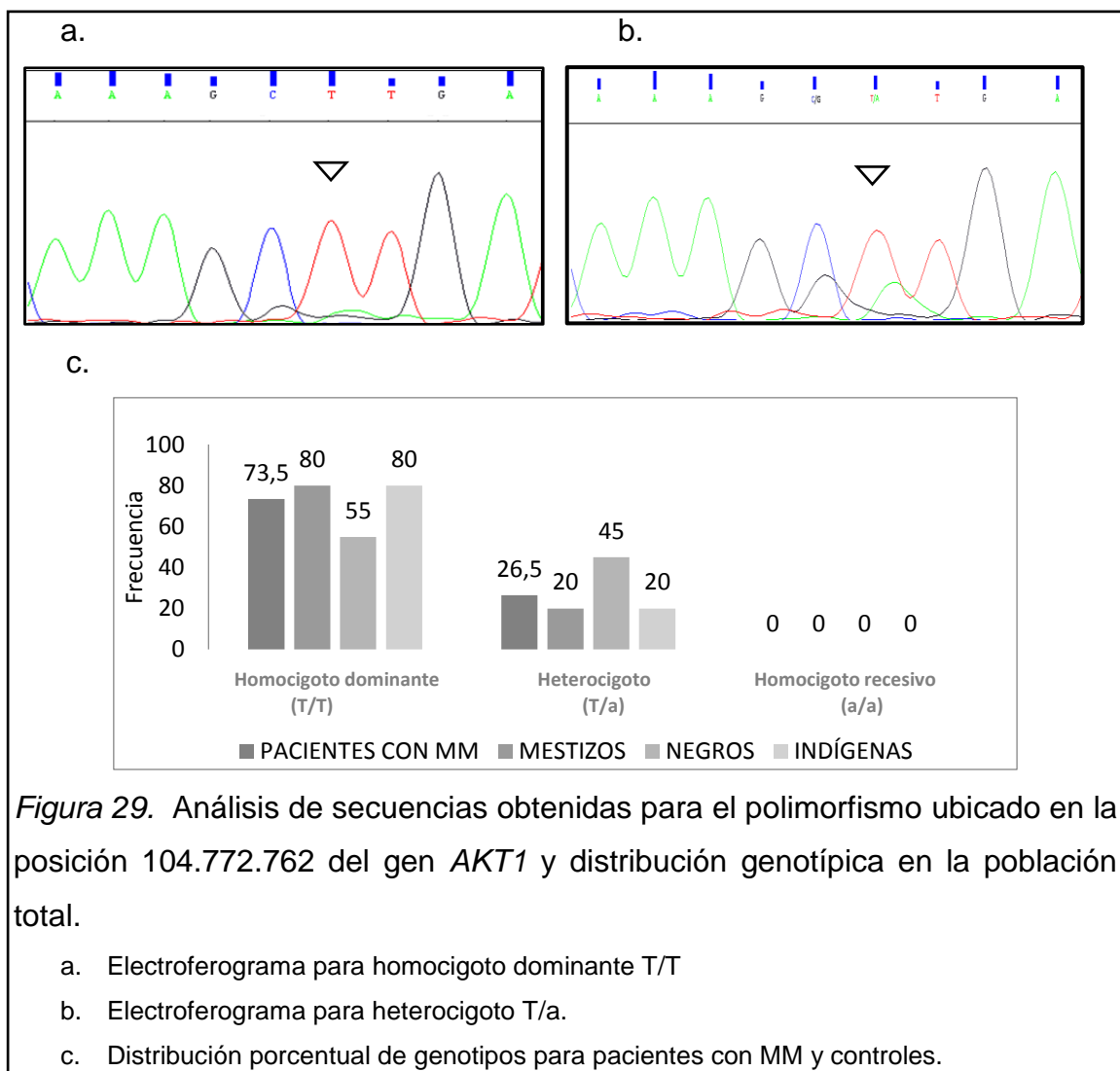
Adicionalmente, se realizó la prueba de Fisher relacionando el grupo afecto con el grupo control. En esta prueba se encontró que existe diferencia en la

distribución del polimorfismo en la relación pacientes e indígenas ya que el valor de p fue 0,000, también para la relación paciente y negros con un valor de p igual a 0,033 (Tabla 16).

Tabla 16. Prueba de Fisher para la distribución del polimorfismo ubicado en la posición 104.772.763.

Relación	Valor F	Valor p
Pacientes vs. Mestizos	0,130	2,000
Pacientes vs. Negros	4,469	0,033
Pacientes vs. Indígenas	18,359	0,000

Otro polimorfismo fue ubicado en la posición 104.772.762 del gen *AKT1* y fue encontrado en pacientes y controles. Solamente se registraron homocigotos dominantes (T/T) y heterocigotos (T/a) (Figura 29). En la población afecto, el 73,5% fueron homocigotos dominantes y el 26,5% fueron heterocigotos. Por otro lado en el grupo control, el 80% de los mestizos e indígenas fueron homocigotos dominantes y el 20% heterocigotos. De los negros, el 55% fueron homocigotos dominantes y el 45% heterocigotos.



Al llevar a cabo la prueba de Fisher relacionando el grupo afecto con el grupo control considerando su origen étnico, no se encontró que existe diferencia en la distribución del polimorfismo, ya que p fue mayor que 0,05 (Tabla 17).

Tabla 17. Prueba de Fisher para la distribución del polimorfismo ubicado en la posición 104.772.762.

Relación	Valor F	Valor p
Pacientes vs. Mestizos	0,288	0,424
Pacientes vs. Negros	1,946	0,137
Pacientes vs. Indígenas	0,288	0,424

El último polimorfismo fue ubicado en la posición 104.772.760 del gen *AKT1* y estuvo presente en el grupo control y afecto. De igual manera, solamente se registraron homocigotos dominantes (G/G) y heterocigotos (G/a) (Figura 30). El 100% de los pacientes e indígenas tuvieron un genotipo homocigoto dominante. Mientras que, el 95% de los mestizos y negros fueron homocigotos dominantes y el 5% restantes fueron heterocigotos.

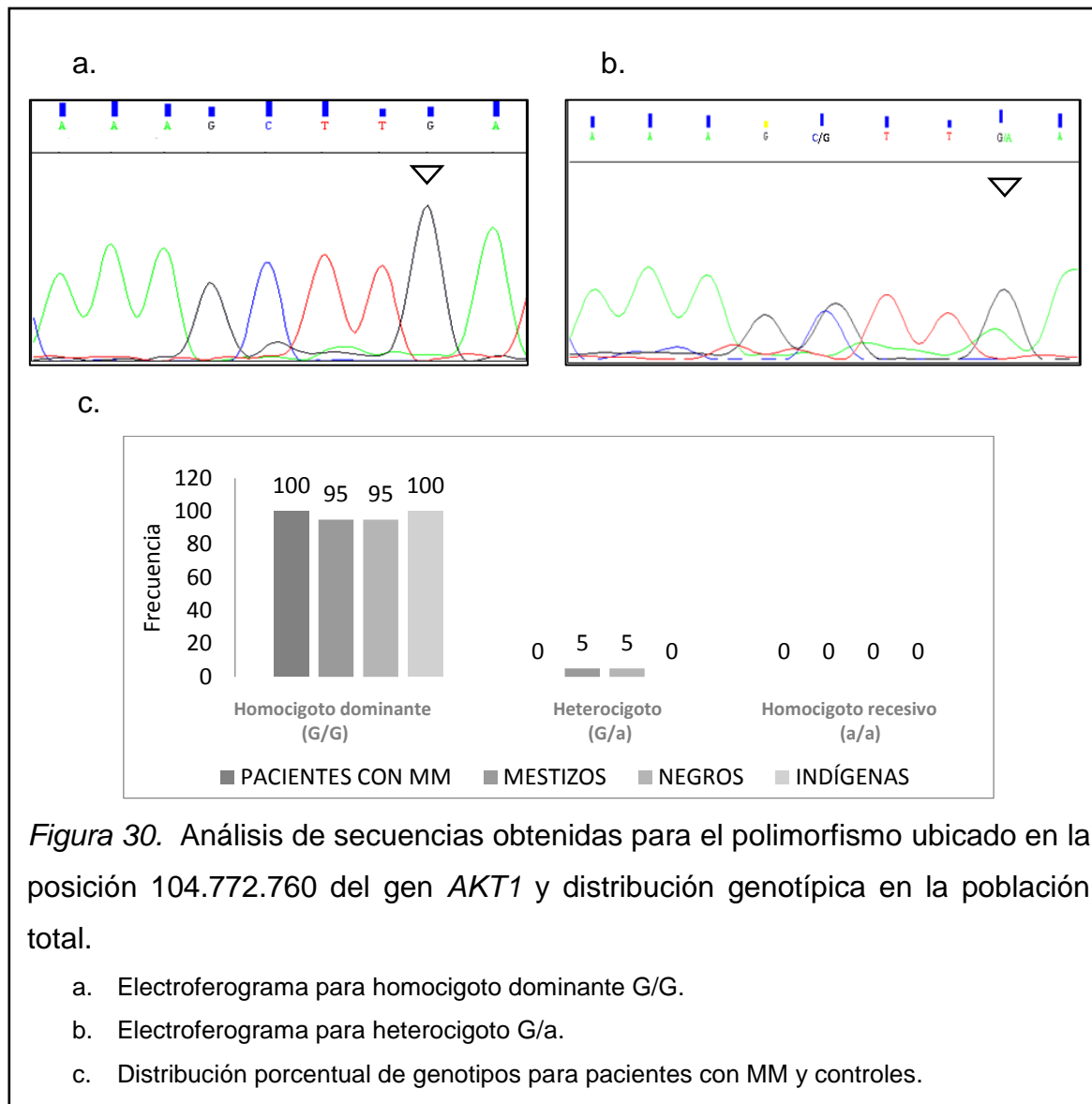


Figura 30. Análisis de secuencias obtenidas para el polimorfismo ubicado en la posición 104.772.760 del gen *AKT1* y distribución genotípica en la población total.

- Electroferograma para homocigoto dominante G/G.
- Electroferograma para heterocigoto G/a.
- Distribución porcentual de genotipos para pacientes con MM y controles.

La prueba de Fisher no pudo ser realizada para la relación de pacientes e indígenas ya que estos solo exhibieron el genotipo homocigoto dominante. Sin embargo, las relaciones de pacientes con negros e indígenas respectivamente,

no fue significativa ya que ambas tuvieron un valor F igual a 1,732 y p de 0,370.

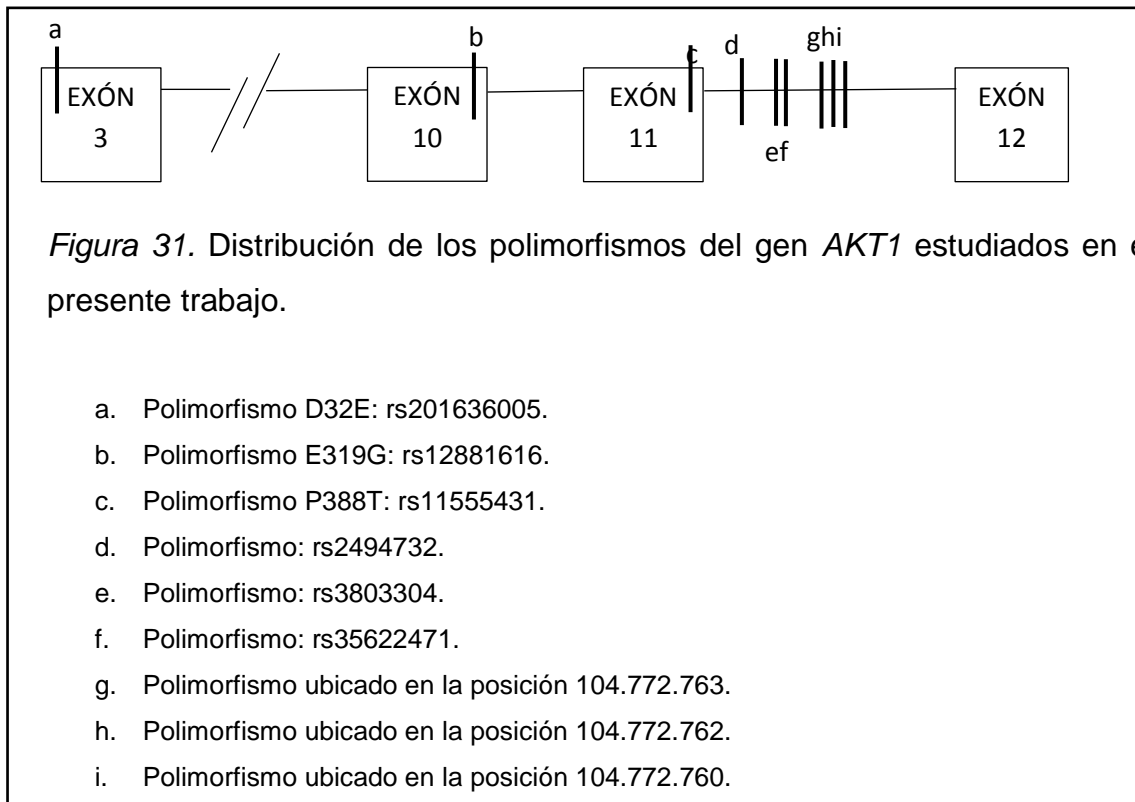
En la Tabla 18 se resume la distribución de los polimorfismos estudiado que presentan más de una variante genotípica, es decir que no se incluyó a E319G, P388T y D32E.

Tabla 18. Distribución general de los polimorfismos en la población estudiada.

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS						
SNP	GENOTIPOS	CASOS	CONTROLES			VALOR P
			MESTIZOS	NEGROS	INDÍGENAS	
rs2494732	T/T	32,4	25,0	25,0	0,0	0,000
	T/c	29,4	20,0	10,0	75,0	
	c/c	38,2	55,0	65,0	25,0	
rs3803304	G/G	58,8	70,0	70,0	70,0	0,621
	G/c	41,2	30,0	30,0	25,0	
	c/c	0,0	0,0	0,0	5,0	
rs356224711	G/G	100,0	100,0	100,0	100,0	0,638
	G/a	0,0	0,0	95,0	0,0	
	a/a	0,0	0,0	5,0	0,0	
104,772,763	C/C	64,7	45,0	35,0	5,0	0,000
	C/g	35,3	55,0	65,0	95,0	
	g/g	0,0	0,0	0,0	0,0	
104,772,762	T/T	73,5	80,0	55,0	80,0	0,291
	T/a	26,5	20,0	45,0	20,0	
	a/a	0,0	0,0	0,0	0,0	
104,772,760	G/G	100,0	95,0	95,0	100,0	0,405
	G/a	0,0	5,0	5,0	0,0	
	a/a	0,0	0,0	0,0	0,0	

Finalmente, en la Figura 31 se ilustra la distribución del total de polimorfismos estudiados en el presente trabajo. Los nuevos polimorfismos encontrados después del alineamiento, se sitúan en el intrón 11 entre los exones 11 y 12. La

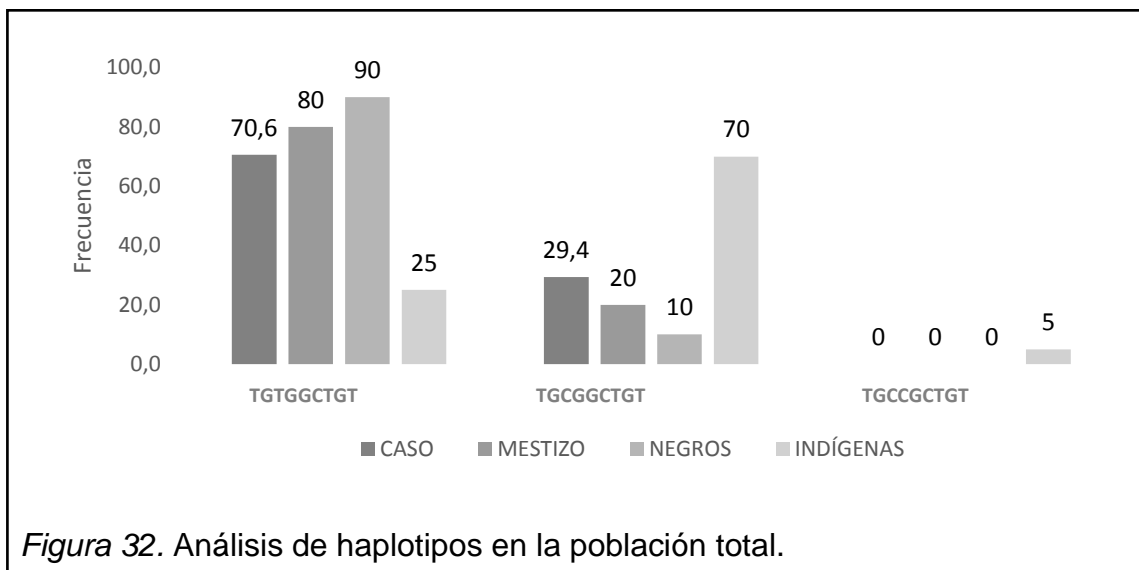
distancia entre ambos exones es de 640 pares de bases, pero los polimorfismos se encuentran más cercanos al exón 11. Se contabilizó la distancia entre el final del exón 11, de tal forma que rs2494732 se encuentra a 23 pb., rs3803304 a 69 pb., rs35622471 a 71 pb., 104.772.763 a 115 pb., 104.772.762 a 116 pb. y 104.772.760 a 118 pb.



4.6 Determinación de haplotipos

Considerando los 9 polimorfismos estudiados en este trabajo y que estos tienen 2 variantes alélicas darían un total de 162 posibilidades de haplotipos resultantes. Sin embargo, del total de haplotipos esperados únicamente se obtuvieron 3, ya que en la mayoría de polimorfismos predominó el genotipo homocigoto dominante. Estos haplotipos fueron: TGTGGCTGT, TGCGGCTGT y TGCCGCTGT.

La frecuencia de los haplotipos varió en pacientes y controles (Figura 32). El haplotipo TGTGGCTGT estuvo presente en el 70,6% de los casos, 80% de los mestizos, 90% de los negros y 25% de los indígenas. Mientras que el haplotipo TGCGGCTGT tuvo una menor frecuencia que el anterior, 29,4% para los pacientes, 20% en mestizos, 10% en negros, y 70% en indígenas. Por último, el haplotipo TGCCGCTGT solo se encontró en un 5% en indígenas.



Realizando la prueba de Fisher, se encontró que entre los pacientes e indígenas la distribución de los haplotipos es significativamente distinta ya que $p= 0,002$. Pero las relaciones de pacientes con negros y mestizos respectivamente, no fueron significativos debido a que el valor de p superó 0,05 (Tabla 19).

Tabla 19. Prueba de Fisher para la distribución de haplotipos en la población total.

Relación	Valor F	Valor p
Pacientes vs. Mestizos	0,581	0,335
Pacientes vs. Negros	2,745	0,091
Pacientes vs. Indígenas	11,241	0,002

4.7 Análisis estadístico

4.7.1 Equilibrio Hardy-Weinberg en la población

Se realizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos estudiados en el presente trabajo, y posterior a esto se confirmaron los resultados mediante el uso de la prueba estadística X^2 . Se encontró que rs2494732 y el SNP situado en la posición 104.772.763 no se encuentran en equilibrio dentro de la población total ya que el valor de p obtenido mediante la prueba X^2 es menor que 0,05 (Tabla 20). Sin embargo, el resto de polimorfismos estudiados si se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg ya que el valor de p no es significativo ($p > 0,05$). Los polimorfismos E319G, P388T y D32E al presentar el genotipo homocigoto dominante, no fue posible llevar a cabo esta prueba.

Tabla 20. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados.

SNP	GENOTIPOS	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS			FRECUENCIAS ALÉLICAS			HARDY-WEINBERG VALOR P
		CASOS	CONTROL	TOTAL	CASOS	CONTROL	TOTAL	
rs2494732	T/T	32,4	16,7	22,3	47,1	34,2	33,3	0,0030
	T/c	29,4	35,0	33,0				
	c/c	38,2	48,3	44,7	52,9	65,8	66,7	
rs3803304	G/G	58,8	70,0	60,0	79,4	84,2	98,4	0,1765
	G/c	41,2	28,3	33,0				
	c/c	0,0	1,7	1,0	20,6	15,8	1,59	
rs35622471	G/G	100,0	98,3	98,9	100,0	99,2	100,0	0,9587
	G/a	0,0	1,7	1,1				
	a/a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	
104.772.763	C/C	64,7	28,3	41,5	82,4	64,2	100,0	0,0001
	C/g	35,3	71,7	58,5				
	g/g	0,0	0,0	0,0	17,6	35,8	0,0	
104.772.762	T/T	73,5	71,7	72,3	86,8	85,8	100,0	0,1197
	T/a	26,5	28,3	27,7				
	a/a	0,0	0,0	0,0	13,2	14,2	0,0	
104.772.760	G/G	100,0	96,7	97,9	100,0	98,3	100,0	0,9170
	G/a	0,0	3,3	2,1				
	a/a	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0	

4.7.2 Prueba de odds-ratio entre grupo afecto y control

La prueba estadística fue realizada en todos los polimorfismos, sin embargo, se obtuvo el riesgo relativo de pocos SNPs ya que esta herramienta no funciona si es que existen valores iguales a cero. Razón por la cual no se hizo esta prueba para los polimorfismos E319G, P388T y D32E.

En la Tabla 21 se encuentra detallado el riesgo para cada genotipo en función de los polimorfismos estudiados. Únicamente el polimorfismo ubicado en la posición 104.772.763 del gen *AKT1* muestra un valor de $p < 0,05$ para un genotipo heterocigoto (C/g) y la sumatoria de homocigoto dominante y heterocigoto (C/C+C/g).

Tabla 21. Asociación entre los polimorfismos estudiados y el riesgo genotípico de desarrollar mieloma múltiple entre casos y controles.

SNP	GENOTIPOS	CASOS (n=34)	CONTROL (n=60)	ODDS RATIO	IC (95%)	VALOR P
rs2494732	T/T	11	10	1,0	-	-
	T/c	10	21	0,433	0,138-1,354	0,245
	c/c	13	29	0,408	0,139 - 1,197	0,169
	T/T+T/c	21	31	0,616	0,222 - 1,708	0,500
rs3803304	G/G	20	42	1,0	-	-
	G/c	14	17	1,729	0,713 - 4,192	0,322
	c/c	0	1	-	-	-
	G/G + G/c	34	59	1,210	0,613 - 2,387	0,705
rs35622471	G/G	34	59	1,0	-	-
	G/a	0	1	-	-	-
	a/a	0	0	-	-	-
	G/G+G/a	34	60	1,0	0,542-1,784	1,000
104.772.763	C/C	22	17	1,0	-	-
	C/g	12	43	0,216	0,088 - 0,530	0,001
	g/g	0	0	-	-	-
	C/C+C/g	32	60	0,4	0,192-0,885	0,035
104.772.762	T/T	25	43	1,0	-	-
	T/a	9	17	0,911	0,353 - 2,346	1,000
	a/a	0	0	-	-	-
	T/T + T/a	34	60	0,975	0,510 - 1,863	1,000

SNP	GENOTIPOS	CASOS (n=34)	CONTROL (n=60)	ODDS RATIO	IC (95%)	VALOR P
104.772.760	G/G	34	58	1,00	-	-
	G/a	0	2	-	-	-
	a/a	0	0	-	-	-
	G/G +G/a	34	60	1,00	0,532 - 1,756	1,00

De la misma forma se obtuvo el odds-ratio en función de los alelos de cada polimorfismo, solamente se obtuvieron de rs2494732, rs3803304, 104.772.763 y 104.772.762. Pero, ninguno de ellos tuvo un valor significativo es decir menor a 0,05 (Tabla 22).

Tabla 22. Asociación entre los polimorfismos estudiados y el riesgo alélico de desarrollar mieloma múltiple entre casos y controles.

SNP	ALELOS	CASOS (n=34)	CONTROL (n=60)	ODDS RATIO	IC (95%)	VALOR P
rs2494732	T	16	20,5	1,0		
	C	18	39,5	0,591	0,251 - 1,39	0,322
rs3803304	G	27	42,0	1,0		
	C	7	9,5	1,322	0,452 - 3,865	0,816
rs35622471	G	34	59,5	1,0	-	-
	A	0	0,5	-	-	-
104.772.763	C	26	17	1,0		
	G	12	21,5	0,818	0,346 - 1,935	0,811
104.772.762	T	29,5	43	1,0		
	A	4,5	8,5	0,963	0,295 - 3,140	1,000
104.772.760	G	34	59	1,0	-	-
	A	0	1	-	-	-

4.7.3 Análisis estadístico entre polimorfismos e historias clínicas

Este análisis estadístico fue llevado a cabo para los SNPs que presentaron más de una variante genotípica para el grupo de afectados, es decir los

polimorfismos rs2494732, rs3803304, 104.772.763 y 104.772.762. No se realizó este análisis para los polimorfismos E319G, P388T y D32E.

La relación entre las variables cualitativas y los polimorfismos no fue significativa para ninguna característica analizada ya que al realizar la prueba de Fisher el valor de p fue mayor a 0,05 (Anexo 5). Mientras que la relación entre las variables cuantitativas de las historias clínicas y los SNPs fue significativa en algunas circunstancias. Específicamente la distribución del polimorfismo rs2494732 fue significativamente diferente entre los pacientes considerando como parámetro la beta-2-microglobulina. Se encontró el mismo comportamiento al analizar el polimorfismo 104.772.763 con la albúmina, ya que el valor de p fue menor a 0,05 (Anexo 6).

4.7.4 Análisis estadístico entre haplotipos e historias clínicas

Se analizaron las posibles relaciones entre las variables cualitativas y cuantitativas con los haplotipos de los pacientes con mieloma múltiple, pero ninguna de ellas arrojó un valor significativo ya que p fue mayor de 0,05 (Anexos 7 y 8).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El mieloma múltiple es una neoplasia poco frecuente que afecta a la población mundial. Esta enfermedad ocupa la posición 23 en el ranking mundial de tipos de cáncer con aproximadamente 114.000 casos nuevos anualmente y tiene una incidencia del 0,8% (World Cancer Research Fund International, 2012). Sin embargo, en el Ecuador su incidencia es 0,1% menor a los datos obtenidos en el mundo con 91 y 64 casos nuevos por cada 100.000 habitantes para hombres y mujeres respectivamente (Globocan, 2012; Cueva y Yépez, 2014, p. 43).

Debido a que el número de pacientes con MM es reducido en el país, el presente estudio fue realizado con 34 muestras provenientes de dos hospitales de la ciudad de Quito. La edad promedio de los pacientes fue de 64 años y el rango observado fue de 38 a 83 años. En estudios previos realizados por Dispenzier *et al.* (2008, p. 786) y Dimopoulos *et al.* (2012, p. 2765) se determinó que la edad promedio es de 64 años, con la salvedad que el rango observado fue de 26 a 90 años y 29 a 92 años respectivamente. De acuerdo a Waxman *et al.* (2010, p. 5502) y Bhatnagar *et al.* (2015, p. 1066), existen variaciones en cuanto a la edad de diagnóstico y sobrevida de acuerdo al grupo étnico de los pacientes. Encontrando que la edad promedio de diagnóstico en negros es menor que la de los pacientes blancos; y la sobrevida es mayor para los pacientes negros que para los blancos.

En cuanto al género, la base de datos Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) (2015) afirma que la población masculina tiene una mayor predisposición a contraer esta enfermedad, sin importar el grupo étnico al que pertenece. Razón por la cual, existieron en el estudio un mayor número de individuos del sexo masculino que femenino.

Asimismo, de acuerdo a los análisis citogenéticos se puede predecir el riesgo de progresión de la enfermedad y por lo tanto su supervivencia. En el grupo de

pacientes con MM se encontró que el 20,6% de los pacientes presentan un cariotipo no hiperdiploide y el 17,6% hiperdiploide. Según Rajan y Rajkumar (2015, pp. 2 - 3) y Prideaux con sus colaboradores (2014, p. 7), los pacientes con características no hiperdiploides tiene un menor tiempo de vida que el hiperdiploide. Esta situación se debe a que en el grupo no hiperdiploide existen translocaciones con cromosomas asociados a oncogenes que alteran ciertas rutas metabólicas, desencadenando un peor pronóstico para el paciente.

Por otro lado, las pruebas inmunológicas y hematológicas son de vital importancia en el mieloma múltiple ya que permite estratificarlo en estadios. Es por ello que estos parámetros fueron considerados, encontrando que la inmunoglobulina G se encuentra por encima del rango normal con una media de 1.954 mg/dL. No obstante, IgA e IgM se encuentran dentro del rango esperado. Pero, la inmunoglobulina E se encuentra por debajo del rango promedio con una media de 14,5 mg/dL, lo cual se pudo deber a que solo se contó con la información de este isotipo en escasos pacientes. Se ha podido establecer que los tipos más frecuentes de inmunoglobulinas o paraproteínas son: IgG en aproximadamente el 50-60% de los pacientes, IgA en un 30%, IgM en un 2% e IgE con un porcentaje mínimo (Sabín, 2013; Kyle y Rajkumar, 2009, pp. 3 – 4; Pandey y Kyle, 2013, pp. 1 – 2).

En las pruebas hematológicas se encontró que tanto la albúmina como la beta-2-microglobulina (B2M) se encuentran alteradas en comparación con los valores normales. Específicamente la albúmina tuvo una media de 3,6 g/dL encontrándose muy cerca del límite inferior del rango normal. Mientras que, la B2M exhibe valores superiores a los esperados con una media de 2.328,9 ng/mL. Ambos parámetros han sido considerados como factores predictivos del tiempo de supervivencia de los pacientes con la enfermedad según el sistema de clasificación ISS (Greipp *et al.*, 2005, pp. 3412 – 3413; Munshi *et al.*, 2011, p. 4697).

En el Ecuador el sistema de clasificación Durie-Salmon es utilizado masivamente y toma en cuenta algunos parámetros que determinarán el pronóstico de la enfermedad. En el presente estudio la hemoglobina, los leucocitos, las plaquetas, los linfocitos, la urea, la creatinina, la lactato deshidrogenasa, y las proteínas totales se encontraron dentro del rango esperado. No obstante, pocos pacientes exhibieron cifras altas de leucocitos, plaquetas, linfocitos, urea, creatinina, calcio, LDH, B2M y proteínas totales.

La clasificación de los estadios fue hecha mediante el análisis de los datos existentes en los historiales clínicos en conformidad a los parámetros establecidos por el sistema Durie-Salmon e ISS. Independientemente del sistema de clasificación utilizado, en este estudio hubo un mayor número de pacientes en el estadio I y II. Sin embargo, según Leone *et al.* (2013) el estadio III es el más común de acuerdo al estudio multicéntrico realizado entre 1984 y 2013 debido a que no se diagnostica a tiempo esta enfermedad. Al comparar ambos resultados, se puede deducir que existe una falencia en los datos de los historiales clínicos recopilados o a su vez de una falta de registro de la información en los hospitales muestreados.

El tiempo de supervivencia de un paciente que tiene mieloma es variable y proporcional al estadio de la enfermedad. En los años 80, el tiempo de supervivencia no superaba los 28 meses, pero actualmente se ha podido mejorar éste a 5 años (Kumar *et al.*, 2015, p. 2518). Este incremento en el tiempo de supervivencia se debe aproximadamente a 60 parámetros, pero debido a su elevado número únicamente se toma en cuenta aquellos encargados de evaluar el comportamiento clínico (San Miguel y García-Sanz, 2005, pp. 570 - 578). En el 2005, Greipp y su equipo de trabajo pronosticaron el tiempo de supervivencia esperado según el sistema internacional, siendo este: 62 meses para el estadio I, 44 meses para el estadio II y 29 meses para el estadio III. En el actual estudio se encontraron pacientes que atravesaron los estadios I y II de acuerdo a los sistemas de clasificación Durie-Salmon e ISS. La media de supervivencia para el estadio I fue de 36,9 meses según el

sistema Durie-Salmon, mientras que para el sistema ISS fue de 42,9 meses. Asimismo, se calculó la media para el estadio II la cual fue de 17,6 meses en el sistema Durie-Salmon y 13,6 meses para ISS. Estos datos concuerdan con los mencionados previamente ya que los pacientes que se encontraron en el primer estadio sobreviven un mayor tiempo que los que atravesaron el estadio II, sin importar el sistema de clasificación usado.

Debido a que el mieloma múltiple es una patología compleja, algunos investigadores han optado por analizar a nivel molecular el comportamiento de esta enfermedad. Se han realizado un sin número de estudios con la finalidad de determinar alteraciones genéticas, identificar factores de riesgo y pronóstico e incluso mejoras en los métodos de diagnóstico para incrementar el tiempo y calidad de vida de los pacientes. Se han asociado diversas alteraciones génicas y rutas metabólicas con la patogénesis de la enfermedad. Tal es el caso de los estudios hechos por el grupo de Leone (Elosua *et al.*, 2008, p. 1694; Leone *et al.*, 2009), donde se pudo caracterizar líneas celulares de mieloma múltiple mediante el uso de arrays de mapeo genético. Este estudio dio como resultado que existe en el mieloma una desregulación de proteínas quinasas, específicamente en rutas metabólicas que desempeñan una función crucial en la apoptosis, regulación y progresión del ciclo celular, así como también de la transcripción del ADN. Estas vías de señalización son: PI3K/AKT, Quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), Auroras, MAPK-ERK, y NFkB.

La ruta metabólica PI3K/AKT es de suma importancia ya que está encargada de la regulación del ciclo celular, apoptosis, senescencia, motilidad, metabolismo y reparación del ADN (Thorpe, Yuzugullu y Zhao, 2015, p. 7; Fruman y Rommel, 2014, p. 140). Para que esta vía sea activada se necesita de una serie de pasos que permitirán transmitir las señales desde la superficie celular hacia el citoplasma (Wong, Engelm y Cantley, 2010, p. 87; Hemmings y Restuccia, 2012, p. 1).

En personas que no padecen ninguna enfermedad esta ruta metabólica actúa de forma regulada gracias a la presencia de señales internas, no obstante, la desregulación de esta ruta se ha asociado con la posibilidad de desarrollar cáncer. Se determinó que esta actividad no regulada de la ruta PI3K promueve la angiogénesis tumoral y carcinogénesis (Akinleye, Avvaru, Furgan, Song y Liu, 2013, pp. 1 – 2; Courtney, Corcoran y Engelman, 2010, p. 1075). Asimismo, se ha relacionado a la sobreactivación de esta ruta con la resistencia a tratamientos convencionales tales como radiación, biológicos, quimioterapia, entre otros (Falasca, 2010, pp. 1410 - 1411; Courtney *et al.*, 2010, p. 1075). Mientras que la inhibición de esta ruta conlleva a la muerte de células cancerígenas (Han *et al.*, 2014, p. 1). Por tal razón, se identificó que la ruta PI3K/AKT puede ser considerada como una diana para el tratamiento contra el cáncer. Se han desarrollado inhibidores que actúen de manera eficiente y selectiva que se encuentran en la fase de evaluación clínica, estos son: Idelalisib, Buparlisib, GDC-0941, PX-866, GDC-0032, BAY 80-6946, IPI-145, BEZ-235, BYL-719, BGT-226, PF-04691502, GDC-0980, GSK-2126458, PF-05212384, XL-765, y XL-147 (Akinleye *et al.*, 2013, p. 1). De forma concreta ya existen inhibidores de esta ruta que servirán como posible tratamiento para el mieloma, pero aún no ha sido comprobada su eficiencia y seguridad (Han *et al.*, 2014, p. 2).

El gen *AKT1* es activado directamente por el fosfoinositol 3 fosfato (PIP3) en la ruta PI3K/AKT, y este a su vez inhibe algunos genes inhibidores dependientes de ciclinas (CDKIs) que se encargan de regular el ciclo celular. *AKT1* al desempeñar un papel clave en la ruta PI3K, ha sido estudiado en algunas enfermedades como esquizofrenia y varios tipos de cáncer (Cairns, Harris, y Mak, 2011, pp. 85-86). A pesar de la importancia de este gen, hasta el momento no se han reportado polimorfismos de nucleótido simple que se encuentren ligados con el mieloma múltiple. En un estudio bioinformático se analizaron 22 polimorfismos de *AKT1* que potencialmente desencadenarían efectos en la estructura y función de la proteína codificante. Se encontró que E319G, P388T y D32E afectará la estabilidad y estructura de la proteína

resultante, razón por la cual estos SNPs fueron investigados en el presente trabajo (Shanti *et al.*, 2014, pp. 959–961). Sin embargo, ninguno de estos polimorfismos estuvo presente en pacientes con mieloma ni en controles.

Se registraron 6 polimorfismos en la amplificación del P388T con el cebador *reverse*, de los cuales 3 ya han sido registrados en NCBI y estos son: rs2494732, rs3803304, rs35622471. Y adicionalmente se registraron 3 polimorfismos al final de la amplificación de esta región en las posiciones 104.772.763, 104.772.762 y 104.772.760. Estos 6 polimorfismos están en el intrón 11 del gen *AKT1* y se encuentran muy próximos a la región final del exón 11. Justamente al existir tantos polimorfismos en esta región se puede establecer que este es un *hotspot* o punto caliente de mutaciones (Raisman y González, 2007). Aún no se conoce por completo cual es la causa ni el mecanismo de acción en estas regiones calientes, pero se ha determinado que con esta información se podrá vislumbrar mecanismos mutagénicos en el futuro y a su vez relacionarlo con distintos tipos de cáncer donde existan estos patrones (Rogozin y Pavlov, 2003, pp. 68 – 69).

Cabe mencionar que al estar esos polimorfismos en un intrón no tendrían ningún efecto en la proteína obtenida, sin embargo, si existiera un error durante el corte y empalme de exones posiblemente el producto resultante sería distinto. Hasta el momento el polimorfismo rs2494732 ha sido investigado en esquizofrenia, cáncer de pulmón, carcinoma nasofaríngeo y consumidores de *Cannabis* (Ohi *et al.*, 2013, pp. 108 - 110; Min Jung *et al.*, 2012, pp. 168 - 169; Zhang *et al.*, 2014, pp. 2 - 3; Van-Winkel, 2011, pp. 153 - 154). Mientras que el SNP rs3803304 ha sido estudiado en cáncer esofaríngeo y carcinoma epinocelular de la cabeza y cuello (Hildebrandt *et al.*, 2009, p. 863; Pfisterer, Fusi, Klimghammer, Knödler, Nonnenmacher y Keilholz, 2012, p. 8).

En este estudio el polimorfismo rs2494732 estuvo presente en pacientes y controles, de forma general existió una distribución distinta entre ambos grupos el análisis estadístico fue realizado con un nivel de confianza del 95%. Sin

embargo, esta diferencia se visualizó específicamente al relacionar los casos de pacientes con mieloma e indígenas, ya que p fue 0,001. No obstante, en la investigación realizada por Zhang *et al.* (2014, p. 2) en cáncer nasofaríngeo no hubo una distribución diferente entre controles y pacientes. De igual forma en otro estudio hecho en esquizofrenia no se encontró una diferencia significativa en personas con la enfermedad y sin ella (Ohi *et al.*, 2013, p. 105). Cabe recalcar que las personas que participaron en ambos estudios pertenecieron a un grupo étnico de China. De tal manera que se puede establecer que este polimorfismo se encuentra presente en la población china indistintamente de la condición patológica que presenten, pero en la población ecuatoriana el SNP se encuentra principalmente en indígenas.

Asimismo, el polimorfismo rs3803304 se encontró en pacientes y controles, no obstante, el genotipo más común fue el homocigoto dominante mientras que el homocigoto recesivo se exhibió exclusivamente en una persona indígena. Razón por la cual no existió una diferencia significativa entre los pacientes con mieloma y los controles sin importar su grupo étnico. Hasta el día de hoy este polimorfismo se ha estudiado para evaluar si su presencia muestra una mejor respuesta al tratamiento de cáncer esofaríngeo y carcinoma espinocelular de la cabeza y cuello (Hildebrandt *et al.*, 2009, p. 857; Pfisterer, Fusi, Klimghammer, Knödler, Nonnenmacher y Keilholz, 2012, p. 1).

En cuanto a rs35622471, el grupo afecto presentó un genotipo homocigoto dominante y el grupo control de igual manera con la salvedad de un individuo negro que tuvo un genotipo heterocigoto. Es por ello que no hubo diferencias significativas entre pacientes y controles. Lo mismo sucedió con los nuevos polimorfismos registrados en las posiciones 104.772.762 y 104.772.760, ya que solamente se encontraron individuos con genotipo homocigoto dominante y heterocigoto. En el caso de 104.772.762 se distribuyó de forma homogénea el polimorfismo entre personas con mieloma y sin la enfermedad. Mientras que en 104.772.760 se observó un mayor porcentaje de homocigotos dominantes y 2 individuos fueron heterocigotos, estos pertenecieron al grupo étnico mestizo y

negro respectivamente. Debido a la baja incidencia del genotipo heterocigoto, la distribución general de este polimorfismo fue similar entre ambos grupos.

Por otro lado, el polimorfismo ubicado en la posición 104.772.763 tuvo una distribución dispereja entre pacientes y controles, ya que el valor de p fue menor a 0,05. De forma concreta, la relación entre el grupo afecto con negros tuvo un valor de $p=0,033$ y de igual manera con los indígenas p fue 0,000. En este estudio no se registró ningún individuo con el genotipo homocigoto recesivo, predominó el homocigoto dominante y heterocigoto en el grupo afecto y control. Sin embargo, es importante mencionar que en el grupo indígena el genotipo más común fue el heterocigoto y solo una persona fue homocigoto dominante.

De acuerdo a las bases de datos NCBI (2016) y EBI (2016), aún no se han registrado los SNPs de las posiciones 104.772.763, 104.772.762 y 104.772.760. Por lo tanto, se requerirían de otros estudios que avalen la información presentada en este trabajo para poder aseverar que estos sean nuevos polimorfismos y a su vez poder determinar su influencia en la población ecuatoriana con mieloma múltiple.

El análisis de haplotipos fue llevado a cabo con el fin de agrupar a todos los polimorfismos y examinar de manera global los resultados obtenidos. De acuerdo a Nature (2014), mediante esta indagación se puede determinar patrones de variantes génicas y asociarlos con ciertas enfermedades o cuadros clínicos, de tal manera que a futuro esta información sirva como herramienta de diagnóstico. Considerando que en este estudio se estudiaron 9 polimorfismos con 2 variantes alélicas, darían un total de 162 posibles haplotipos. Sin embargo, la mayoría de SNPs no registró el genotipo homocigoto recesivo por lo que solo se anotaron tres haplotipos TGTGGCTGT, TGCGGCTGT y TGCCGCTGT. Se analizó la distribución de los haplotipos entre los pacientes y controles, encontrando que si hay una diferencia exclusivamente entre pacientes e indígenas con un valor de p igual a 0,002. Esta diferencia se debe

a que el grupo étnico indígena fue el único que presentó los tres posibles haplotipos en relación a los demás grupos. Sin embargo, con el resto de grupos étnicos no se evidenció un valor significativo ya que p fue mayor a 0,05.

En cuanto al análisis estadístico, el equilibrio de Hardy-Weinberg fue una de las pruebas realizadas encontrando que los polimorfismos rs3803304, rs35622471, 104.772.762 y 104.772.760 cumplían con las condiciones de equilibrio de la población, es decir p mayor a 0,05. Sin embargo, los SNPs rs2494732 y 104.772.763 arrojaron un valor de p menor que 0,05 indicando que estos no se encuentran en equilibrio dentro de la población investigada. Esto puede observarse en la Tabla 13, donde en rs2494732 el alelo dominante es T en el grupo afecto y en el grupo control es C. Lo mismo sucede en 104.772.763, donde el alelo dominante es C para los pacientes y es G para los controles. La ley de Hardy-Weinberg establece que una población se mantiene en equilibrio cuando sus frecuencias genotípicas y alélicas son constantes con el paso de las generaciones, este se romperá cuando se incorporen factores perturbadores (Paz y Miño y López, 2014, p. 49). De tal manera que el desequilibrio de la población para los polimorfismos rs2494732 y 104.772.763 puede deberse a que se encuentran evolucionando gracias a procesos sistemáticos al azar como la generación de mutaciones o también por la migración, deriva génica o consanguinidad entre individuos.

Asimismo, se realizó la prueba de odds-ratio (OR) para cada uno de los polimorfismos y se encontró un valor significativo en el SNP de la posición 104.772.763 para el genotipo homocigoto dominante (C/C) y la sumatoria de homocigoto dominante con heterocigoto (C/C+ C/g) con un valor de p menor a 0,05. En el caso del genotipo C/C este tuvo un valor OR de 0,2 con un intervalo de confianza de 0,088 a 0,530, asimismo para C/C+C/g el valor OR fue de 0,4 el cual se encontró dentro del intervalo de confianza de 0,192 a 0,885. Estos resultados indican que los genotipos antes mencionados representan 0,2 y 0,4 veces respectivamente, más riesgo de desarrollar mieloma múltiple. Cabe recalcar que genotipo el homocigoto dominante fue considerado como

referencia con un valor OR de 1, por lo que se infiere que una persona con esta característica no tiene riesgo de contraer esta enfermedad.

Al evaluar los otros polimorfismos rs2494732, rs3803304, rs35622471, 104.772.762 y 104.772.760 no se encontró ningún valor significativo de OR. Existen varios estudios que comprueban que algunos de estos SNPs no han sido asociados con el riesgo de padecer alguna enfermedad. De acuerdo a un estudio hecho por Zhang *et al.* (2014), rs2494732 no representa ningún riesgo para contraer cáncer nasofaríngeo. No obstante, en otra investigación se encontró que este SNP ha sido asociado con el riesgo de desarrollar desórdenes psicóticos en consumidores de *Cannabis* y esquizofrénicos (Karege *et al.*, 2011, p. 12). Asimismo, se encontró que cualquiera de las variantes genéticas de este polimorfismo representa un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama (P. Leone, comunicación personal, 3 de febrero de 2016). Por otro lado, rs3803304 ha sido relacionado con un menor riesgo de muerte en pacientes que tienen carcinoma espinocelular de la cabeza y cuello y reciben un tratamiento con Cetuximab-Docetaxel (Pfisterer *et al.*, 2012, p. 8). De forma similar el polimorfismo rs3803304 ha sido asociado con una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia en pacientes con cáncer esofaríngeo (Hildebrandt *et al.*, 2009, p. 857). Igualmente, se evidenció que el genotipo homocigoto recesivo de éste SNP representa un mayor riesgo de contraer cáncer de mama (P. Leone, comunicación personal, 3 de febrero de 2016).

Igualmente, se realizó la prueba de odds-ratio para cada uno de los polimorfismos en función de los alelos. Debido a que no todos los SNPs presentaron las dos variantes alélicas, únicamente se pudo calcular el OR para rs2494732, rs3803304, 104.772.763 y 104.772.762. De los cuales, no se encontró ningún alelo que represente un mayor riesgo de padecer la patología en estudio.

Finalmente, se relacionaron los datos de las historias clínicas de los pacientes con los polimorfismos estudiados y a su vez con los haplotipos. Se evidenció que no existe ninguna asociación entre los SNPs estudiados con las variables cualitativas ya que el valor de p no fue significativo. Debido a que la distribución de los polimorfismos fue similar para cada una de las variables analizadas como: género, citogenética y estadiaje. Pero, al examinar las variables cuantitativas se encontró que la distribución del polimorfismo rs2494732 fue significativamente distinta entre los pacientes considerando como parámetro la B2M. Al igual que el polimorfismo de la posición 104.772.763 con la albúmina, ya que tienen un valor de p significativo. Estos resultados resaltan la importancia de los parámetros B2M y albúmina ya que en este trabajo ambos fueron alterados, lo cual corresponde al comportamiento general de la enfermedad. Es por ello que ambos parámetros en la actualidad son utilizados como factores de pronóstico y progresión de la enfermedad según el sistema de clasificación internacional (ISS) (Greipp *et al.*, 2005, pp. 3412 – 3413). El mismo procedimiento fue hecho con los haplotipos, sin embargo, no se encontró relaciones significativas con ninguna variable cualitativa ni cuantitativa.

En resumen, este trabajo permite comprender de mejor manera los polimorfismos del gen *AKT1* en la población ecuatoriana. De tal manera que se pudo establecer que los SNPs E319G, P388T y D32E no se encuentran presentes en la población ecuatoriana sana ni afectada con mieloma múltiple. Asimismo, se comprobó la presencia de variantes genéticas no esperadas e incluso no reportadas durante la amplificación de los polimorfismos antes mencionados. Dos de estas variantes genéticas (rs294732 y 104.772.763) no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y muestran una distribución distinta entre pacientes y controles. Además, éstos exhiben una relación directa con albúmina y B2M, los cuales han sido considerados como parámetros de clasificación según el sistema ISS y podrían estar implicados en la progresión de la enfermedad. Igualmente se determinó que los genotipos C/C y C/C+C/G del SNP 104.772.763 representan más riesgo de desarrollar mieloma múltiple. Por

lo que se éste estudio sirve de base para profundizar más sobre el funcionamiento del gen *AKT1* y comprender su rol en la población ecuatoriana, así como también el efecto de la presencia de cada uno de los polimorfismos analizados.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Los polimorfismos E319G, P388T y D32E no se encuentran presentes en la población ecuatoriana, por lo tanto, no afectan el funcionamiento del gen *AKT1*. Debido a que los polimorfismos E319G, P388T y D32E no fueron registrados en pacientes con mieloma múltiple, no existe ninguna relación con la clasificación cromosómica, historiales clínicos y tiempo de supervivencia.

Al relacionar los polimorfismos con los historiales clínicos se encontró una asociación entre rs2494732 con beta-2-microglobulina, al igual que el polimorfismo de la posición 104.772.763 con la albúmina. Ambos polimorfismos podrían estar implicados la progresión de la enfermedad, ya que la albúmina y beta-2-microglobulina han sido descritos anteriormente como puntos claves por el sistema de clasificación ISS.

No se encontró ninguna relación entre los polimorfismos estudiados y la clasificación citogenética, ni tampoco con el tiempo de supervivencia, lo cual significa que estos SNPs no se encuentran ligados al pronóstico de la enfermedad.

Se encontró una distribución distinta de rs2494732 y 104.772.763 entre casos y controles, pero esta diferencia fue notoria para la relación pacientes-indígenas para ambos polimorfismos. Lo cual indica que los indígenas tienen mayor predisposición a tener estas mutaciones. No obstante, el polimorfismo rs2494732 también tiene una relación significativa con negros.

Los SNPs rs2494732 y 104.772.763 no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg dentro de la población investigada debido que está evolucionando gracias a procesos sistemáticos al azar como la generación de mutaciones.

El genotipo C/C y C/C+C/G del SNP 104.772.763 presenta una relación con el riesgo de desarrollar mieloma múltiple.

6.2 Recomendaciones

La extracción de ADN debe ser realizada el mismo día que llega la muestra al laboratorio para evitar que esta se dañe o a su vez mantenerlas a 4°C e impedir la degradación celular y molecular.

Se recomienda realizar diluciones y alícuotas de ADN para evitar posibles contaminaciones producto de la manipulación. Lo mismo se debe hacer con los reactivos utilizados para la amplificación de ADN.

El diseño de los cebadores debe ser hecho considerando una zona de amplificación de 150 a 300 pb. para que el fragmento sea leído sin problemas en el secuenciador.

La mezcla de reactivos empleados para la realización de PCR de secuencia debe ser manejada con cuidado de la luz ya que estos son fotosensibles y además debe mantenerse en un bloque térmico frío.

Para la comprobación de la existencia de los polimorfismos 104.772.763, 104.772.762 y 104.772.760 se debería realizar otras experimentaciones con cebadores que permitan amplificar esta zona de manera más puntual.

De ser posible se debería aumentar el número de muestra del grupo afecto mediante la búsqueda de convenios con hospitales públicos y privados que tengan en su institución a pacientes con esta enfermedad.

Se recomienda que exista un registro único hospitalario que contenga todos los datos de los historiales clínicos para que esto sirva de herramienta en el

análisis de resultados, ya que lastimosamente existe mucho desorden en la manipulación de la información.

Debería haber un seguimiento más profundo a los pacientes y registrar cada una de las visitas hechas a los hospitales, en conjunto con los resultados de los exámenes.

Si existiera la posibilidad de realizar un análisis citogenético a todas las muestras sería de mucho provecho para poder predecir la supervivencia de los pacientes de una manera más verídica.

REFERENCIAS

- Akileye, A., Avvaru, P., Furgan, M., Song, Y. y Liu, D. (2013). *Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics*. *Journal of Hematology and Oncology*, 6(88), 1-17.
- Alavanja, M., Ross, M. y Bonner, M. (2013). *Increased Cancer Burden Among Pesticide Applicators and Others Due to Pesticide Exposure*. *A Cancer Journal for Clinicians*, 63, 120–142.
- American Cancer Society. (2014). *Multiple myeloma*. Recuperado el 30 de agosto de 2015 de <http://www.cancer.org/cancer/multiplemyeloma/detailedguide/multiple-myeloma-staging>
- Arnaiz, A., Regueiro, J. y López, C. (1995). *Inmunología*. Madrid, España: Editorial Complutense.
- Bhatnagar, V., Wu, Y., Goloubeva, O., Ruehle, K., Milliron, T., Harris, C., Rapoport, A., Yanovich, S., Sausville, E., Baer, M. y Badros, A. (2015). *Disparities in black and white patients with multiple myeloma referred for autologous hematopoietic transplantation: A Single Center Study*. *Cancer*, 121, 1064-1070.
- Becker, N. (2011). *Epidemiology of Multiple Myeloma*. *Recent Results in Cancer Search*, 183, 25-35.
- Beckman – Coulter. (2015). *Agencourt AMPure XP - PCR Purification*. Recuperado el 22 de noviembre de 2015 de <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/nucleic-acid-sample-preparation/agencourt-ampure-xp-pcrpurification/index.htm?i=A63881#2/10//0/25/1/0/asc/2/A63881///0/1//0/%2Fwsrportal%2Fwsr%2Fresearch-anddiscovery%2Fproductsand-services%2Fnucleic-acid-samplepreparation%2Fagencourt-ampure-xp-pcr-purification%2Findex.htm/>
- Blink, C., Holmberg, E., Mellqvist, U., Landgren, O., Björkholm, M., Hultcrantz, M., Kjellander, C., Turesson, I. y Kristinsson S. (2015). *Multiple Myeloma*

- And Infections: A Population-Based Study On 9253 Multiple Myeloma Patients*. *Haematologica*, 100, 107-113.
- Brown, T. (2007). *Genomas*. (3.^a ed.). Madrid, España: Editorial Panamericana.
- Caballero, A. (2009). *Terapia intensiva*. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- Cairns, R., Harris, I. y Mak, T. (2011). *Regulation of cancer cell metabolism*. *Nature Reviews*, 11, 85-94.
- Campbell, N. y Reece, J. (2007). *Biología*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Campos, L., Barbosa, N. y Martin, G. (2012). *Valor del ensayo de las cadenas ligeras libres en suero para los pacientes de gammopatías monoclonales e insuficiencia renal*. Recuperado el 14 de octubre de 2016 de <http://www.revistanefrologia.com/es-publicacion-nefrologia-articulo-valor-del-ensayo-las-cadenas-ligeras-libres-suero-los-pacientes-X0211699512000604>
- Carpten, J., Faber, A., Horn, C., Donoho, G., Briggs, S., Robbins, C., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y., Zeckner, D., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M., Blanchard, K. y Thomas, J. (2007). *A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer*. *Nature*, 448(7152), 439-444.
- Chesi, M. y Bergsagel, P. (2013). *Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates*. *Internal Journal of Hematology*, 97, 313–323.
- Cobleigh, M. (2015). *Multiple Myeloma-Associated Amyloidosis – What Every Patient Should Know*. Recuperado el 4 de septiembre de 2015 de <http://www.myelomabeacon.com/news/2010/09/15/multiple-myeloma-associated-amyloidosis-what-every-patient-should-know/>
- Conte, G., Braggio, E., Figueroa, G. y Fonseca, R. (2009). *La genética como factor pronóstico y terapéutico en el mieloma múltiple*. Recuperado el 18 de enero de 2016 de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872009000400015

- Courtney, K. Corcoran, R. y Engelman, J. (2010). *The PI3K Pathway as Drug Target in Human Cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 28(6), 1075-1083.
- Cunningham, F. (2011). *Williams: Obstetricia*. (23.^a ed.). México D.F., México: Editorial McGraw-Hill.
- Cueva, P. y Yépez, J. (2014). *Epidemiología del Cáncer en Quito 2006-2010*. Quito, Ecuador: Solca Núcleo Quito.
- Davatelis, G. (2015). *Más datos sobre nuevos cambios en el tratamiento del mieloma múltiple*. Recuperado el 25 de agosto de 2015 de <https://mielomamultiple.wordpress.com/tag/mieloma-indolente/>
- 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.
- 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.
- European Bioinformatics Institute. (2016). *AKT1*. Recuperado el 20 de febrero de 2016 de http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table?db=core;g=ENSG00000142208;r=14:104769349-104795751
- 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.
- Elosua, C., Purification, C., Walker, B., Dickens, N., Avramidou, A., Brito, L., Davenport E., Jenner, M., González, D., Davies, F., Morgan, G. y Leone, P. (2008). *Molecular characterization of Human Multiple Myeloma Cell*

- Lines by Genome-Wide Profiling identifies Kinase Pathway alterations.* Blood, 112(11), 1694.
- Estrada, N. (2012). *Revisión de fisiopatología, clínica y diagnóstico de mieloma múltiple.* Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica, 69(603), 343-349.
- Etro, D., Missiroli, S., Buontempo, F., Neri, L. y Capitani, S. (2009). *AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1).* Recuperado el 17 de octubre de 2015 de <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/AKT1ID355ch14q32.html>
- Falasca, M. (2010). *PI3K/Akt Signalling Pathway Specific Inhibitors: A Novel Strategy to Sensitize Cancer Cells to Anti-Cancer Drugs.* Current Pharmaceutical Design, 16(12), 1410-1416.
- Fantl, D. (2003). *Conceptos breves sobre la enfermedad y las opciones terapéuticas: Mieloma múltiple.* North Hollywood, California: International Myeloma Foundation.
- Fresno, J., Casado, E., Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniseta, C. y González-Barón, M. (2004). *PI3K/Akt signalling pathway and cancer.* Cancer treatment reviews, 30, 193–204.
- 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.
- Fruman, D. y Rommel, C. (2014). *PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities.* Nature, 13, 140-157.
- García, R., Mateos, M. y San Miguel, J. (2007). *Mieloma múltiple.* Medicina Clínica, 129(3), 104-115.
- GeneCards. (2015). *AKT1.* Recuperado el 6 de noviembre de 2015 de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AKT1&keywords=akt1#snp>
- Genetics Home Reference. (2012). *AKT1.* Recuperado el 12 de noviembre de 2015 de <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/AKT1>

- Gertz, M. y Greipp, P. (2004). *Hematologic Malignancies: Multiple Myeloma and Related Plasma Cell Disorders*. Heidelberg, Alemania: Springer Science & Business Media.
- Globocan. (2012). *Population Fact Sheets*. Recuperado el 23 de mayo de 2015 de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
- Greipp, P., San Miguel, J., Durie, B., Crowley, J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R., Lahuerta, J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I. y Westin, J. (2005). *International Staging System for Multiple Myeloma*. *Journal of Clinical Oncology*, 23(15), 3412-3420.
- Gutiérrez, S. (2006). *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. Bogotá, Colombia: Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
- Gutiérrez, R. (2009). *Determinación de los marcadores de apoptosis en pacientes con mieloma múltiple de novo*. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 56(4), 235-246.
- Han, K., Xu, X., Chen, G., Zeng, Y., Zhu, J., Du, X., Zhang, Z., Liu, Z. y Mao, X. (2014). *Identification of a promising PI3K inhibitor for the treatment of multiple myeloma through the structural optimization*. *Journal of Hematology & Oncology*, 7(9), 1-13.
- Haehle, M. (2013). *El riesgo de infección en los pacientes con mieloma múltiple es alto y subiendo (ASH 2012)*. Recuperado el 15 de septiembre de 2015 de <http://www.myelomabeacon.com/espanol/2013/03/04/el-riesgo-de-infeccion-en-los-pacientes-con-mieloma-multiple-es-alto-y-subiendo-ash-2012/>
- Hemmings, B. y Restucciaa, D. (2012). *PI3K-PKB/Akt Pathway*. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 4, 1-4.
- Hildebrandt, M., Yang, H., Hung, M., Izzo, J., Huang, M., Lin, J., Ajani, J. y Wu, X. (2009). *Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/MTOR pathway are*

- associated with clinical outcomes in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy. Journal of Clinical Oncology, 27(6), 857- 871.*
- Hoffbrand V, Moss P y Pettit J (2006). *Essential Haematology (Essential)*. (5.^a ed.). Oxford, Inglaterra: Blackwell Publishing Professional.
- Karege, F., Méary, A., Perroud, N., Jamain, S., Leboyer, M., Ballman, E., Fernandez, R., Malafosse, A. y Schürhoff, F. (2011). *Genetic overlap between schizophrenia and bipolar disorder: A study with AKT1 gene variants and clinical phenotypes*. Schizophrenia Research, 135, 8–14.
- Kennedy, S. (2011). *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*. Norfolk, Inglaterra: Horizon Scientific Press.
- Kenneth, A. (2011). *Multiple Myeloma: A Clinical Overview*. Oncology, 25(2), 3-9.
- Kyle, R. y Rajkumar, S. (2009). *Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma*. Leukemia, 23, 3-9.
- Kulkarni, S. y Pfeifer, J. (2014). *Clinical Genomics*. San Diego, Estados Unidos: Academic Press.
- Kumar, S., Rajkumar, V. Dispenzieri, A., Lacy, M., Hayman, S., Buadi, F., Zeldenrust, S., Dingli, D., Russel, S., Lust, J., Greipp, P., Kyle, R. y Gertz, M. (2015). *Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies*. Blood, 111(5), 2515-2521.
- Lang, T. y Secic, M. (2006). *How to Report Statistics in Medicine*. Philadelphia, Estados Unidos: American College of Physicians.
- Leone, P., Walker, B., Jenner, M., Chiecchio, L., Dagrada, G., Protheroe, R., Johnson, D., Brito, J., Else, M., Gonzalez, D., Ross, F., Chen-Kiang, S., Davies, F. y Morgan, G. (2008). *Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: Biological and clinical implications*. Clinical Cancer Research, 14(19), 6033-6041.
- Leone, P., Elosua, C., Catalina, P., Palma, C., Walker, B., Dickens, N., Avramidou, A., Brito, L., Davenport, E., Jenner, M., Gonzalez, D., Davies, F. y Morgan, G. (2009). *Molecular characterization by Genome-Wide Profiling identifies alterations involving key enzymatic proteins*. Proceedings ASHG 59th Annual Meeting (1284/W/Poster Board #942).

Recuperado el 1 de marzo de 2016 de <http://www.ashg.org/2009meeting/abstracts/fulltext/>.

- Leone, P., Montesdeoca, B., Chiluiza, D., Morales, I., Sánchez, M., Buenaño, M., Cevallos, F., Espín, V., Ocampo, L. y Paz-y-Miño, C. (2013). *Datos de Ecuador en la Red Iberoamericana para la investigación de Mieloma Múltiple*. *Oncología*, 25(1), 7-16.
- Lisker, R., Zentella, A. y Grether, P. (2013). *Introducción a la genética humana*. México D.F., México: Editorial El Manual.
- Manciola, F. y Stemberg, E. (2013). *Mieloma Múltiple e injuria renal*. *Hematología*, 17(3), 256-265.
- 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.
- Micheli, F., Nogués, M., Asconapé, J., Fernández, M. y Biller, J. (2002). *Tratado de neurología clínica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Min Jung, K., Hyo-Gyoung, K., Shin Yup, L., Hyo-Sung, J., Won-Kee, L., Ji Young, P., Eung Bae, L., Jae Hee, L., Sung-Ick, C., Dong Sun, K., Chang-Ho, K., Sin, K., Tae Hoon, J. y Jae, Y. (2012). *AKT1 Polymorphisms and Survival of Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer*. *Journal of Surgical Oncology*, 105,167–174.
- Molinas, F. (2009). *Mieloma múltiple*. Recuperado el 17 de septiembre de 2015 de <http://es.slideshare.net/FERPY/mieloma-mltiple>
- Munshi, N., Anderson, K., Bergsagel, P., Shaughnessy, J., Palumbo, A., Durie, B., Fonseca, R., Stewart, A., Harousseau, J., Dimopoulos, M., Jagannath, S., Hajek, R., Sezer, O., Kyle, R., Sonneveld, P., Cavo, M., Rajkumar, S., San Miguel, J., Crowley, J. y Avet-Loiseau, H. (2011). *Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2*. *Blood*, 117(18), 4696-4700.
- Murata, K., Clark, R., Lockington, K., Tostrud, L., Greipp, P. y Katzmann, J. (2010). *Incremento abrupto de la concentración de Cadenas Ligeras*

- Séricas después del Tratamiento de Mieloma Múltiple*. *Clinical Chemistry*, 56(1), 16–20.
- Nature. (2014). *Haplotype*. Recuperado el 15 de febrero de 2016 de <http://www.nature.com/scitable/definition/haplotype-haplotypes-142>
- National Center of Biotechnology Information. (2016). *AKT1*. Recuperado el 29 de febrero de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=AKT1>
- Neira, J., Morán, C., Correa, R. y Estrada, R. (2014). *Mieloma múltiple: aspectos biológicos, clínicos, diagnóstico, tratamiento con nuevos agentes y estidificación*. *Revista Médica FCM-UCSG*, 18(2), 87-94.
- Nucci, M. y Anaissie, E. (2009). *Infections in patients with multiple myeloma*. *Seminars in Hematology*, 46(3), 277-288.
- Nussbaum, R., McInnes, R. y Willard, H. (2008). *Thompson & Thompson: Genética en medicina*. Barcelona, España: Editorial Elsevier.
- Ohi, Z., Hashimoto, R., Yasuda, Y., Fukumoto, M., Nemoto, K., Ohnishi, T., Yamamori, H., Takahashi, H., like, N., Kamino, K., Yoshida, T., Azechi, M., Ikezawa, K., Tanimukai, H., Tagami, S., Morihara, T., Okochi, M., Tanaka, T., Kudo, T., Iwase, M., Kazui, H. y Takeda, M. (2013). *The AKT1 gene is associated with attention and brain morphology in schizophrenia*. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 14, 100–113.
- Oliva, R., Ballesta, F., Oriola, J. y Claria, J. (2004). *Genética médica*. Barcelona, España: Universitat de Barcelona.
- Osaki, M., Oshimura, M. e Ito H. (2004). *PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer*. *Apoptosis*, 9(6), 667–676.
- Oyajobi, B. (2007). *Multiple myeloma/hypercalcemia*. *Arthritis Research & Therapy*, 9(1), 1-6.
- Palumbo, A. y Anderson, K. (2011). *Multiple Myeloma*. *The New England Journal of Medicine*, 364, 1046-1060.
- Parham, P. (2006). *Inmunología*. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.
- Pandey, S. y Kyle, R. (2013). *Unusual Myelomas: A Review of IgD and IgE Variants*. *Oncology*, 27(8), 1-10.
- Paz y Miño, C., Sánchez, M.E., Araujo, S., Ocampo, L., Espín, V.H. y Leone, P.E. (2013). *Cytogenetic and molecular characterization of hematological*

- neoplasm in an Ecuadorian Population*. *Open Journal of Blood Diseases*, 3, 108-115.
- Paz y Miño, C. y López, A. (2014). *Genética molecular y citogenética humana. Fundamentos, aplicaciones e investigaciones en el Ecuador*. Quito, Ecuador: Yachay EP.
- Peña, J. (2014). *Maduración de linfocitos B y reordenamiento de Igs*. Recuperado el 21 de agosto de 2015 de <http://inmunologiaenlinea.es/index.php/03mmm-9/b>
- Pérez, L., Bobillo, H., Veloz, J., Stable, T. y Zaldívar, D. (2012). *Bioquímica clínica para tecnologías de salud*. Recuperado el 17 de septiembre de 2015 de <http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library?e=d-00000-00---off-0prelicin-00-0----0-10-0---0---0direct-10---4-----0-1l--11-es-50---20-about---00-0-1-00-0-0-11-1-0utfZz-800&a=d&c=prelicin&cl=CL1&d=HASH0177c0b33293a81c94025160.1>
- Pfisterer, K., Fusi, A., Klimghammer, K., Knödler, M., Nonnenmacher, A. y Keilholz, U. (2012). *PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway genetic variations are associated with the clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment*. *Head Neck*, 37(4), 471-478.
- Pinzón, C., Serrano, M. y Sanabria, M. (2009). *Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos*. *Revista Ciencias de la Salud*. Bogotá, 7(2), 47-66.
- Prideaux, S., O'Brien, E. y Chevassut, T. (2014). *The Genetic Architecture of Multiple Myeloma*. *Advances in Hematology*, 2014, 1-16.
- Promega. (2014). *GoTaq® Flexi DNA Polymerase (M829) Product Information*. Recuperado el 19 de noviembre de 2015 de <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-flexi-dna-polymerase-m829-protocol/>
- Puerta, C. y Ureña, C. (2005). *Prácticas de biología molecular*. Bogotá, Colombia: Editorial Pontificia Universidad Javeriana.

- Raisman, J. y González, A. (2007). *Glosario de Genética*. Recuperado el 9 de febrero de 2016 de <http://www.biologia.edu.ar/genetica/glosariogenetica.html>
- Rajan, A. y Rajkumar, S. (2015). *Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice*. *Blood Cancer Journal*, 5(10), 2-7.
- Ries, L., Eisner M. y Kosary, C. (2005). *SEER Cancer statistics review, 1975-2002*. Recuperado el 31 de agosto de 2015 de http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/
- Roitt, I. (2008). *Inmunología: Fundamentos*. (11.^a ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Rogozin, I. y Pavlov, Y. (2003). *Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity*. *Mutation Research*, 544, 65–85.
- Rojas, O. (2003). *Inmunología (de la memoria)*. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana
- Rostango, A. y Guiso, J. (2013). *Análisis bioquímico de mioglobulinuria asociada con rhabdomiolisis*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(1), 7-15.
- Sabín, P. (2013). *Mieloma múltiple*. Recuperado el 6 de abril de 2015 de <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/linfomas-y-mieloma/mieloma?start=1>
- Sagar, L. (2009). *Myeloma Therapy: Pursuing the Plasma Cell*. Totowa, Estados Unidos: Springer.
- San Miguel, J. y García-Sanz, R. (2005). *Prognostic features of multiple myeloma*. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 18, 569–583.
- Schroeder, H. y Cavacini, L. (2010). *Structure and function of immunoglobulins*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S41-S52.
- Shanti, V., Rajasekaran, R. y Ramanathan, K. (2014). *Computational Identification of Significant Missense Mutations in AKT1 Gene*. *Cell Biochemistry Biophysics*, 70, 957–965.
- Sundquist, A. (2008). *Algorithms for Next-generation Sequencing*. California, Estados Unidos, ProQuest.
- Surveillance, Epidemiology, and End Results. (2015). *Multiple Myeloma*. Recuperado el 25 de enero de 2015 de <http://seer.cancer.gov/>

- Thorpe, L., Yuzugullu, H. y Zhao, J. (2015). *PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting*. *Nature*, 15, 7-24.
- 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.
- Van-Winkel, R. (2011). *Family-Based Analysis of Genetic Variation Underlying Psychosis-Inducing Effects of Cannabis*. *Archives of General Psychiatry Journal*, 68 (2), 148-157.
- Vivanco, I. y Sawyers, C. (2002). *The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2, 489-501.
- Waxman, A., Mink, P., Devesa, S., Anderson, W., Weiss, B., Kristinsson, S., McGlynn, K., y Landgren, O. (2010). *Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study*. *Blood*, 116(25), 5501- 5506.
- Weissensteiner, T., Nolan, T., Bustin, S., Griffin, H. y Griffin A. (2003). *PCR Technology: Current Innovation*. Nueva York, Estados Unidos: CRC Press.
- Wong, K., Engelman, J. y Cantley, L. (2010). *Targeting the PI3K signaling pathway in cancer*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20, 87-90.
- World Cancer Research Fund International. (2012). *Worldwide data*. Recuperado el 21 de enero de 2016 de <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>
- Yi-Bin, C. (2015). *Nefelometría cuantitativa*. Recuperado el 19 de septiembre de 2015 de <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003545.htm>
- Zavala, J. (2005). *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular*. Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Zhang, X., Chen, X., Zhai, Y., Cui, Y., Cao, P., Zhang, H., Wu, Z., Li1, P., Yu, L., Xia, X., He, F. y Zhou, G. (2014). *Combined Effects of Genetic Variants of the PTEN, AKT1, MDM2 and p53 Genes on the Risk of Nasopharyngeal Carcinoma*. *Plos One*, 9(3), 1-7-

ANEXOS

Anexo 1. Datos clínicos de los pacientes con mieloma múltiple.

Parámetro	Frecuencia	
Género: hombre/mujer (%)	61,7/38,3	
Edad: media/mediana (rango)	64,1/65 (38 - 83)	
Supervivencia: media/mediana (rango)	34/20 (1-139)	
Citogenética	Normal	21
	Hiperdiploide	6
	No Hiperdiploide	7
Estadaje Durie-Salmon (%)	I	82,4
	II	14,7
	No definido	2,9
Estadaje ISS (%)	I	67,6
	II	29,4
	No definido	2,9

Anexo 2. Datos hematológicos de pacientes con mieloma múltiple.

Características	Rango normal	Pacientes con MM		
		Media	Mediana	Rangos
IgG (mg/dL)	751 - 1560	1954,0	1634,0	657,6 - 5110
IgA (mg/dL)	82 - 453	238,5	161,5	10,3 - 860
IgM (mg/dL)	46 - 304	84	85,5	25,7 - 251
IgE (ng/mL)	20,40 - 87,00	14,5	9	6 - 42,9
Hemoglobina (g/dL)	14 - 18	12,7	13,1	8,7 - 15,4
Leucocitos (K/μL)	4,5 - 10	6,7	6,4	2,5 - 13,8
Plaquetas	130.000- 400.000	257.093	234.000	39.500 - 989.600
Linfocitos (K/μL)	13 - 40	22,7	21,4	9,3 - 55
Urea (mg/dL)	10 - 50	44,3	36,7	20,7 - 170
Creatinina (mg/dL)	0,5 - 1,4	1	0,9	0,3 - 2,7
Calcio (mg/dL)	8,1 - 11,8	5,8	4,7	3,8 - 13,3
Albumina (g/dL)	3,5 - 5,5	3,6	3,6	1,7 - 5,1
LDH (U/L)	240 - 480	316,6	276	174 - 518,5
B2M (ng/mL)	604 - 2.286	2.328,90	1,91	1,361 - 4.804,7
Proteínas Totales (g/dL)	6,6 - 8,7	7,3	7,3	4,2 - 11,6

Anexo 3. Concentraciones de las muestras de pacientes.

Muestra	Género	Edad	CI (ng/μl)	CF (ng/μl)	VF (μl)	VI (μl)	H2O (μl)
MM1	F	55	111,8	10,0	30,0	2,7	27,3
MM2	M	75	28,5	10,0	30,0	10,5	19,5
MM3	M	51	171,3	10,0	30,0	1,8	28,2
MM5	F	72	19,8	10,0	30,0	15,2	14,8
MM6	F	57	20,0	10,0	30,0	15,0	15,0
MM7	M	38	90,7	10,0	30,0	3,3	26,7
MM8	F	83	46,5	10,0	30,0	6,5	23,5
MM9	M	60	53,8	10,0	30,0	5,6	24,4
MM10	M	66	125,8	10,0	30,0	2,4	27,6
MM11	M	48	6,1	-	-	-	-
MM12	F	82	237,1	10,0	30,0	1,3	28,7
MM13	M	58	60,5	10,0	30,0	5,0	25,0
MM14	M	65	557,0	10,0	30,0	0,5	29,5
MM15	F	56	231,3	10,0	30,0	1,3	28,7
MM16	M	77	17,0	10,0	30,0	17,6	12,4
MM17	M	65	75,9	10,0	30,0	4,0	26,0
MM18	F	60	164,1	10,0	30,0	1,8	28,2
MM19	M	83	414,9	10,0	30,0	0,7	29,3
MM20	M	48	94,2	10,0	30,0	3,2	26,8
MM21	M	50	418,4	10,0	30,0	0,7	29,3
MM22	M	64	828,7	10,0	30,0	0,4	29,6
MM23	M	65	290,7	10,0	30,0	1,0	29,0
MM24	M	63	68,4	10,0	30,0	4,4	25,6
MM25	M	75	85,6	10,0	30,0	3,5	26,5
MM26	M	63	206,0	10,0	30,0	1,5	28,5
MM27	M	64	3467,8	10,0	30,0	0,1	29,9
MM28	M	68	60,5	10,0	30,0	5,0	25,0
MM29	F	53	32,5	10,0	30,0	9,2	20,8
MM30	M	73	44,1	10,0	30,0	6,8	23,2
MM31	F	75	14,4	10,0	30,0	20,8	9,2
MM32	M	67	21,3	10,0	30,0	14,1	15,9
MM33	F	72	21,2	10,0	30,0	14,2	15,8
MM34	F	45	66,5	10,0	30,0	4,5	25,5
MM35	F	69	11,6	10,0	30,0	25,9	4,1
MM36	F	65	94,2	10,0	30,0	3,2	26,8

Anexo 4. Concentraciones de muestras de los controles.

Muestra	Género	Grupo étnico	Edad	CI (ng/μl)	CF (ng/μl)	VF (μl)	VI (μl)	H2O (μl)
CHC5	M	Negros	27	17,1	30	10	17,5	12,5
SCH22	F	Negros	15	46,3	30	10	6,5	23,5
SCH21	M	Negros	35	35,6	30	10	8,4	21,6
SCH26	F	Negros	18	10,9	30	10	27,5	2,5
SCH17	M	Negros	63	18,8	30	10	16	14
SCH16	F	Negros	60	11,1	30	10	27	3
SCH18	M	Negros	20	16,8	30	10	17,9	12,1
SCH23	M	Negros	21	21,6	30	10	13,9	16,1
SCH11	F	Negros	26	24	30	10	12,5	17,5
SCH19	F	Negros	47	22,9	30	10	13,1	16,9
SCH10	F	Negros	25	24,3	30	10	12,3	17,7
SCH20	F	Negros	28	14,3	30	10	21	9
CHC6	F	Negros	50	11,6	30	10	25,9	4,1
CHC1	M	Negros	36	23,1	30	10	13	17
CHC15	F	Negros	50	22,4	30	10	13,4	16,6
CHC11	F	Negros	70	23,4	30	10	12,8	17,2
SCH14	M	Negros	48	32,4	10	30	9,3	20,7
SCH15	M	Negros	48	102,4	10	30	2,9	27,1
SCH4	M	Negros	35	16,9	10	30	17,8	12,2
CHC4	M	Negros	35	18,8	10	30	16	14
S95	M	Mestizos	20	56,7	15	30	5,3	24,7
S211	M	Mestizos	19	32,7	15	30	9,2	20,8
S222	M	Mestizos	24	17,3	15	30	17,3	12,7
S198	M	Mestizos	19	16,3	15	30	18,4	11,6
S215	M	Mestizos	19	38,3	15	30	7,8	22,2
INT183	M	Mestizos	22	64,6	15	30	4,6	25,4
S204	M	Mestizos	22	34,9	15	30	8,6	21,4
S219	M	Mestizos	23	34,1	15	30	8,8	21,2
S202	M	Mestizos	21	44,3	15	30	6,8	23,2
S213	M	Mestizos	62	64,5	15	30	4,7	25,3
S223	F	Mestizos	23	225,3	15	30	1,3	28,7
S208	F	Mestizos	50	17,7	15	30	16,9	13,1
S220	F	Mestizos	20	128,5	15	30	2,3	27,7
S210	F	Mestizos	20	74,2	15	30	4	26
S221	F	Mestizos	21	18	15	30	16,7	13,3
S112	F	Mestizos	20	51,3	15	30	5,8	24,2
S218	F	Mestizos	20	16,8	15	30	17,9	12,1
S214	F	Mestizos	18	94,2	15	30	3,2	26,8
S209	F	Mestizos	20	54,1	15	30	5,5	24,5
S216	F	Mestizos	19	150,7	15	30	2	28
SSH60	F	Indígenas	60	2	-	-	-	-

Muestra	Género	Grupo étnico	Edad	Cl (ng/μl)	CF (ng/μl)	VF (μl)	VI (μl)	H2O (μl)
SSH35	F	Indígenas	37	2	-	-	-	-
SSH13	F	Indígenas	54	2	-	-	-	-
SSH6	F	Indígenas	27	2	-	-	-	-
SSSH7	F	Indígenas	30	2	-	-	-	-
SSH17	F	Indígenas	57	2	-	-	-	-
SSH45	F	Indígenas	69	2	-	-	-	-
SSH3	F	Indígenas	67	2	-	-	-	-
SSH46	M	Indígenas	73	2	-	-	-	-
SSH9	M	Indígenas	52	2	-	-	-	-
SSH21	M	Indígenas	64	2	-	-	-	-
SSH36	M	Indígenas	56	2	-	-	-	-
SSH41	M	Indígenas	66	2	-	-	-	-
SSH54	M	Indígenas	21	2	-	-	-	-
SSH55	M	Indígenas	39	2	-	-	-	-
SSH4	M	Indígenas	74	2	-	-	-	-
SSH23	F	Indígenas	47	2	-	-	-	-
SSH14	F	Indígenas	46	2	-	-	-	-
SSH8	M	Indígenas	33	2	-	-	-	-
SSH10	M	Indígenas	26	2	-	-	-	-

Anexo 5. Prueba Fisher sobre la relación entre las variables cualitativas con polimorfismos.

Prueba Fisher		Valor p			
		Polimorfismos			
Variables categóricas		rs2494732	rs3803304	104.772.763	104.772.762
<u>Género</u>	Masculino	0,493	0,296	0,292	0,107
	Femenino				
<u>Citogenética</u>	Normal	0,423	1,000	0,605	0,464
	Hiperdiploide				
	No hiperdiploide				
<u>Estadíaie</u>	I	0,588	0,669	0,450	0,224
<u>Durie-Salmon</u>	II				
<u>Estadíaie ISS</u>	I	0,633	0,629	0,066	0,212
	II				

Anexo 6. Prueba no paramétrica sobre la relación entre las variables cuantitativas con polimorfismos.

Características	Valor p			
	rs2494732	rs3803304	104.772.763	104.772.762
Edad	0,679	0,717	0,403	0,673
Supervivencia	0,787	0,478	0,611	0,696
<u>Inmunoglobulinas</u>				
IgG	0,088	0,898	0,823	0,823
IgA	0,634	0,125	0,820	0,387
IgM	0,501	0,506	0,462	0,799
IgE	0,344	1,000	1,000	0,800
<u>Parámetros hematológicos</u>				
Hemoglobina	0,113	0,158	0,191	0,081
Leucocitos	0,604	0,625	0,56	0,22
Plaquetas	0,446	0,573	1	0,789
Linfocitos	0,875	0,281	0,836	0,550
Urea	0,752	0,819	0,155	0,063
Creatinina	0,973	0,074	0,233	0,606
Calcio	0,181	0,672	0,307	0,629
Albúmina	0,351	0,185	0,007	0,118
LDH	0,137	0,517	0,772	0,494
B2M	0,043	0,428	0,871	0,456
Proteínas Totales	0,974	0,232	0,217	0,075

Anexo 7. Prueba Fisher sobre la relación entre las variables cualitativas con haplotipos.

Prueba Fisher		Valor p
Variables cualitativas		Haplotipos
<u>Género</u>	Masculino	0,406
	Femenino	
<u>Citogenética</u>	Normal	0,870
	Hiperdiploide	
<u>Estadiaje Durie-Salmon</u>	No hiperdiploide	0,418
	I	
<u>Estadiaje ISS</u>	II	0,252
	I	
	II	

Anexo 8. Prueba no paramétrica sobre la relación entre las variables cuantitativas con haplotipos.

Características	Valor p
	Haplotipos
Edad	0,401
Supervivencia	0,512
<u>Inmunoglobulinas</u>	
IgG	0,262
IgA	0,738
IgM	0,953
IgE	0,400
<u>Parámetros hematológicos</u>	
Hemoglobina	0,486
Leucocitos	0,592
Plaquetas	0,290
Linfocitos	0,648
Urea	0,594
Creatinina	0,858
Calcio	0,393
Albúmina	0,532
LDH	0,055
B2M	0,658
Proteínas Totales	0,893