



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE EN LOS
GENES VEGF Y EGFR EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE DE
LA POBLACIÓN ECUATORIANA



AUTORA

Paola Concepción Guadalupe Camino

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE EN LOS
GENES *VEGF* Y *EGFR* EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE DE LA
POBLACIÓN ECUATORIANA

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

Profesora Guía

M.Sc. María Gabriela Granja Bastidas

Autora

Paola Concepción Guadalupe Camino

Año

2017

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”.

María Gabriela Granja Bastidas

Master of Science Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina: especialidad
en Patología

C.I. 1712995149

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Mayra Fernanda Chico Terán
Master of Science in Biotechnology
CI: 1003327044

DECLARACION DEL DIRECTOR CIENTIFICO

Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Paola Elizabeth Leone Campo
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: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”.

Paola Concepción Guadalupe Camino

C.I. 1722480389

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Paola E. Leone y al Dr. César Paz-y-Miño, por abrirme las puertas del IIB

Agradezco a mis padres, Isabel e Iván por ser mi ejemplo de esfuerzo, sacrificio y perseverancia durante toda mi vida.

A mis hermanos Caro, Jorge y Ramón, por ser el motor de mi felicidad y demostrarme que el amor verdadero existe.

A mis hermanas de vida, mis primas, Pame, Katha, Karla y Charis, por su apoyo incondicional y sus locuras las amo.

A Sammy, Washo y Jorguito por tanto amor y amistad que me han brindado.

Al Doc. Espín, Gaby, Meli, Ali y Giannethcita por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme el maravilloso mundo de la citogenética.

DEDICATORIA

“Yo creo en Dios gracias a la ciencia, no a pesar de la ciencia”

William D. Phillips.

A Milita, que es el más claro ejemplo de la existencia de Dios.

A mis padres y hermanos, porque volar sólo no es volar.

A quien me demostró el amor más hermoso de la Tierra mi abuelita Laura, para ti este sólo es el principio de muchos logros. Te amo mi ángel guardián.

A mi hermano Ramón, este trabajo te lo dedico a ti, como muestra de lo difícil pero sublime que es la Ciencia y espero que en el futuro te apasione tanto como a mí.

Pao libre, segura y humilde.

RESUMEN

El mieloma múltiple (MM), es una neoplasia clonal de células plasmáticas, se desarrolla en la médula ósea y se caracteriza por la producción de una proteína sérica y/o urinaria. Actualmente, representa el 1% de los cánceres y del 10 al 15 % de las neoplasias hematopoyéticas. Anualmente, la tasa de incidencia es de un 5,9 por cada 100.000 habitantes. Investigaciones anteriores, han demostrado que la expresión de ciertos genes promueven el desarrollo de esta neoplasia como: el gen *VEGF*, está relacionado con la neoangiogénesis ósea y su expresión con un mal pronóstico de la enfermedad, mientras que el gen *EGFR*, pertenece a los receptores tirosina quinasa implicado en la patogénesis y progresión de diferentes tipos de carcinomas. En la presente investigación, se analizó la relación de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) -2578C→A, -1498C→T, -1154G→A, -634G→C y +936C→T del gen *VEGF* y los SNPs rs759171 A→C y 55.017.893G→A del gen *EGFR*, la última variante no se encuentra reportada en el NCBI; con curvas de supervivencia, clasificación cromosómica y parámetros clínicos. Mediante pruebas estadísticas, se obtuvo una relación significativa ($p < 0,05$) entre las frecuencias genotípicas encontradas en el grupo de pacientes y control para los SNPs *VEGF*-2578C→A, *VEGF*-1154G→A, *VEGF*-634G→C. Por otra parte, los polimorfismos *VEGF*-1154G/A y rs759171 A/C no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que su valor p fue menor a 0,05. En cuanto, al riesgo de desarrollar mieloma múltiple dependiendo de las variantes genotípicas se encontró significancia con un valor $p < 0,05$ en los genotipos C/A del polimorfismo *VEGF*-2578 C→A, así también en A/A y G/A+A/A del *VEGF*-1154G→A, por último en C/C y G/A y A/A del *VEGF*+936C→T. Correlacionando los polimorfismos con el historial clínico, se evidenció cierta significancia entre el polimorfismo *VEGF*-1154G→A con los dos sistemas de estadiaje de la enfermedad, los niveles de IgA y albúmina, el *VEGF*+936C→T y los niveles de hemoglobina y finalmente entre el 55.017.893G→A y los niveles de leucocitos. Los resultados obtenidos en esta investigación contribuyen a futuras estudios los cuales ayudarán a dilucidar el papel que cumple los genes *VEGF* y *EGFR* en los pacientes diagnosticados con mieloma múltiple del Ecuador.

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a clonal neoplasia of plasmatic cells. It is originated in the bone marrow and it is characterized by the production of a serum and/or urinary protein. Now, it represents 1% of cancerous diseases and 10 to 15% of hematopoietic malignancies. Annually, the incidence rate is of 5.9 per 100,000 people. Previous studies have shown that some genes expression increases the development of the neoplastic such as *VEGF* gen that is related to bone neoangiogenesis. It's expression is related to a poor prognosis; *EGFR* gen belongs to tyrosine kinase receptors involved in the pathogenesis and progression of different types of carcinoma. This research analyzed the relation between Single-nucleotide Polymorphism (SNPs) -2578C→A, -1498C→T, -1154G→A, -634G→C and +936C→T of *VEGF* gene and the SNPs rs759171 A/C and 55.017.893G/A of *EGFR* gene. Last variant is not found reported in the NCBI with survival curves, chromosomic classification, and clinical parameters. Through statistical tests, it was obtained a significant relation ($p < 0,05$) between genotypic frequencies for SNPs *VEGF*-1154G→A, *VEGF*-634G/C found in the affect and control group. In the other hand, polymorphisms *VEGF*-1154G→A and rs759171A→C are not found in Hardy-Weinberg equilibrium because its p value was lower than 0,05. Regarding to the risk of developing multiple myeloma rely on genotype variants, it was found a significance with a $p < 0,05$ value in genotypes C/A of polymorphism *VEGF*-2578 C→A, as well as A/A and G/A+A/A of *VEGF*-1154G→A, and finally C/C and G/A and A/A of *VEGF*+936C→T. Correlating polymorphism to medical history, it was noticed certain significance between polymorphism *VEGF*-1154G→A and two staging systems of the disease, IgA and albumin levels, also *VEGF*+936C→T and hemoglobin levels. Finally between 55.017.893G/A and leukocyte levels. Results obtained from this research contribute to further studies that could help to elucidate and explain the role of *VEGF* and *EGFR* genes in patients diagnosed with multiple myeloma in Ecuador.

ÍNDICE

1. Capítulo I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Objetivos	4
1.4. Justificación.....	5
2. Capítulo II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Patogenia del mieloma múltiple	6
2.1.2. Patogenia del mieloma múltiple	9
2.1.3. Clasificación cromosómica	10
2.1.4. Sistemas de estadificación del mieloma múltiple	12
2.1.5. Factores de riesgo	13
2.2. Diagnóstico y complicaciones del mieloma múltiple	14
2.2.1. Manifestaciones clínicas	14
2.2.2. Datos de laboratorio.....	15
2.2.2.1. Aspirado de médula ósea	15
2.2.2.2. Electroforesis de proteínas séricas	16
2.2.2.3. Inmunofijación de proteínas séricas.....	16
2.2.2.4. Proteína de Bence Jones.....	17
2.2.2.5. Parámetros bioquímicos	18
2.2.2.6. Citogenética	18
2.2.2.7. Estudios de imagen	18
2.3. Gen <i>VEGF</i>	19
2.4. Gen <i>EGFR</i>	20
2.5. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	21
3. Capítulo III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ...	21

4. Capítulo IV. PROCEDIMIENTOS	22
4.1. Población y muestra	22
4.2. Materiales y métodos para la obtención de los datos	23
4.2.1. Extracción de ADN genómico a partir de médula ósea.....	23
4.2.1.1. Extracción de ADN mediante kit comercial PureLink™ Genomic DNA	23
4.2.1.2. Extracción de ADN mediante High Pure PCR Template Preparation Kit	25
4.2.2. Cuantificación de ADN.....	25
4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) <i>Touchdown</i>	26
4.2.4. Diseño de cebadores específicos para la reacción en cadena de la polimerasa <i>touchdown</i> (PCR).....	27
4.2.5. Amplificación de polimorfismos del gen <i>VEGF</i>	28
4.2.5.1. Polimorfismo <i>VEGF</i> +936 C→T	28
4.2.5.2. Polimorfismo <i>VEGF</i> -1498 C→T	29
4.2.5.3. Polimorfismo de <i>VEGF</i> -2578 C→A.....	29
4.2.5.4. Polimorfismo de <i>VEGF</i> -1154 G→A.....	30
4.2.5.5. Polimorfismo de <i>VEGF</i> -634 G→C	30
4.2.6. Amplificación de polimorfismos del gen <i>EGFR</i>	31
4.2.6.1. Amplificación de <i>EGFR</i> PROM1 G→A y PROM2 A→C	31
4.2.7. Electroforesis horizontal convencional.....	31
4.2.8. Secuenciación Sanger con electroforesis capilar.....	32
4.2.8.1. Purificación de producto PCR por Ampure ®.....	32
4.2.8.2. Reacción en cadena de la polimerasa de secuencia	33
4.2.8.3. Purificación de PCR de secuencia por CleanSEQ ®	34
4.2.8.4. Secuenciación de ADN mediante electroforesis capilar.....	35
4.3. Evaluación estadística de los resultados	35
5. Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
5.1. Recopilación historiales clínicos	36
5.1.1. Género.....	37
5.1.2. Edad	38

5.1.3.	Resultado citogenético.....	39
5.1.4.	Estadificación de la enfermedad.....	41
5.1.5.	Tiempo de supervivencia.....	42
5.1.6.	Isotipo de mieloma.....	44
5.1.7.	Parámetros hematológicos.....	45
5.2.	Extracción de ADN genómico de pacientes y controles	47
5.3.	Determinación del Genotipo.....	47
5.3.1.	Amplificación de los fragmentos de los genes <i>VEGF</i> y <i>EGFR</i>	47
5.4.	Secuenciación tipo Sanger mediante electroforesis capilar	48
5.4.1.	Análisis genético de la variante <i>VEGF</i> -2578C→A.....	48
5.4.2.	Análisis genético de la variante <i>VEGF</i> -1498C→T.....	50
5.4.3.	Análisis genético de la variante <i>VEGF</i> -1154G→A.....	51
5.4.4.	Análisis genético de la variante <i>VEGF</i> -634G→C.....	52
5.4.5.	Análisis genético de la variante <i>VEGF</i> +936C→T.....	54
5.4.6.	Análisis genético de la variante <i>EGFR</i> 55.017,893 G→A.....	55
5.4.7.	Análisis genético de la variante <i>EGFR</i> rs759171.....	56
5.5.	Frecuencias genotípicas en la población y asociación de las mismas con los grupos paciente y control.....	58
5.6.	Determinación de haplotipos.....	61
5.7.	Análisis estadístico.....	61
5.7.1.	Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	61
5.7.2.	Prueba de Odds-ratio entre el grupo de pacientes y controles ...	63
5.7.3.	Análisis entre polimorfismos e historias clínicas.....	65
5.7.4.	Análisis entre haplotipos e historiales clínicos.....	67
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	69
6.1.	Conclusiones.....	69
6.2.	Recomendaciones.....	70
	REFERENCIAS.....	71

ANEXOS	85
---------------------	-----------

1. Capítulo I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El mieloma múltiple es una neoplasia que se ha presentado desde épocas antiguas, no obstante en 1845 se reportaron los dos primeros casos, los cuales se asignaron con el nombre de “mollities ossium” (Ortiz, 2011, p. 121). A lo largo del tiempo la tasa de incidencia a nivel mundial de mieloma múltiple ha ido en aumento, debido a que en 1949 fue de 0,8/100.000 personas, en 1963 fue de 1,7/100.000 personas y en el 2001 fue de 4,3/100.000 personas (Kyle y Rajkumar, 2014, p. 1).

Anteriormente, el diagnóstico del mieloma múltiple tenía ciertos inconvenientes dependiendo del sistema que se utilizaba, debido a que se podía confundir con otras gammapatías. Este problema se ha elucidado con el paso de los años dado que, el mieloma múltiple sintomático se caracteriza por la presencia de una lesión, la cual puede ser tisular y orgánica, de igual forma puede tener otras manifestaciones como: anemia, hipercalcemia, lesiones osteolíticas u osteoporosis, insuficiencia renal, hiperviscosidad sintomática, amiloidosis e infecciones bacterianas frecuentes (García, Mateos y San Miguel, 2007, p.p. 109-110).

En cuanto a la clasificación en el mieloma múltiple se tiene en cuenta dos sistemas de estadiaje que son el Durie-Salmon (D&S) y el Sistema de Estadificación Internacional (ISS), el último toma como referencia un factor como es la concentración de beta-2-microglobulina, debido a que valores altos pronostican una mortalidad temprana. Así también es importante el número de células plasmáticas y la velocidad de producción de proteínas monoclonales. En adición a los diferentes sistemas de estadiaje el mieloma múltiple tienen un componente genético que clasifica casos en no hiperdiploides, considerados de mal pronóstico y hiperdiploides considerandos de buen pronóstico (Alvarado et al., 2015, p.p. 317-318).

En estudios anteriores, se han encontrado ciertos factores de riesgo que contribuyen a aumentar la predisposición para el desarrollo de mieloma múltiple como son: el grupo étnico de la población, la edad, el género y la exposición a ciertos agentes químicos y físicos determinando que esta enfermedad afecta a personas adultas con una edad promedio de 60 años en adelante; de igual forma una ancestría afrodescendiente, mayormente se predispone en el género masculino y que se han expuesto especialmente a genotóxicos, pesticidas y radiaciones ionizantes a lo largo de su vida (Estrada, 2012, p. 344).

Además de los factores de riesgo que tiene la enfermedad también es importante la variabilidad fenotípica de cada individuo debido a que los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) le confieren la susceptibilidad o resistencia individual a distintas enfermedades. Los SNPs pueden ser producto de errores en los mecanismos de replicación y reparación; se han encontrado que pueden estar presentes a lo largo del gen y como resultado pueden producir alteraciones en la función proteica (Checa, 2007, p.p. 214-216).

El tratamiento de esta enfermedad depende de si esta neoplasia es de carácter sintomático o asintomático, en ambos casos la mejor alternativa es la quimioterapia y algunos casos dependiendo de cómo reaccionan al tratamiento se suele sugerir un trasplante de células troncales hematopoyéticas (Cano, et al., 2010, p. 44).

En estudios previos se ha determinado que el gen del factor de crecimiento endotelial vascular *VEGF* como el principal factor pro-angiogénico en esta patología, de tal manera que si existe una mayor expresión del gen, se relaciona con ciertas enfermedades malignas como son el cáncer de ovario, el cáncer colorectal y el cáncer gástrico (Liu, Yang y Kong, 2013, p.1925).

La expresión del gen *VEGF* se ha relacionado con la susceptibilidad y la agresión que puede tener el cáncer debido a que se han encontrado ciertos polimorfismos de nucleótido simple como el -634 G/C, el cual está relacionado

significativamente con la expresión de la proteína en ciertas poblaciones del mundo como la japonesa (Sa-nguanraksa y O-charoenrat, 2012, p. 14847).

En investigaciones anteriores, se ha encontrado una asociación entre los SNPs +936 C/T, -2578 A/C, -1154 G/A, -634 G/C y -1498C/T del gen *VEGF* y el mieloma múltiple, en cuanto a la expresión del gen a un alto riesgo en su pronóstico; esto en cuanto a la población de Brasil (Borsarelli, Lourenco, Oliveira, Souza y Passos, 2014, p.p. 1363-1368).

Por otro lado la expresión de gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico *EGFR*, se ha relacionado con el pronóstico de distintas enfermedades como el cáncer de pulmón, colorectal, riñón y gliomas (Sánchez y González, 2010, p. 176).

1.2.Planteamiento del problema

Actualmente, la tasa de incidencia en el mundo es de 5,9 por cada 100.000 personas, por esta razón el mieloma múltiple representa el 1% de todos los cánceres, además dentro de las neoplasias hematológicas representa del 10-15% y la mortalidad de esta enfermedad dentro de los cánceres es del 2% (Leone et al., 2013, p. 8). En el Ecuador, según el último registro nacional de tumores que se lo realizó entre los años 2006- 2010. Se estableció que la tasa de incidencia anual de mieloma múltiple fue de 1,8/100.000 habitantes (Cueva y Yépez, 2014, p. 39).

El mieloma múltiple representa el 1-2% dentro de las neoplasias hematológicas y el 2% de las muertes por cáncer (Conté et al., 2007, p. 1111). Los estudios epidemiológicos y genéticos del mieloma son escasos y de igual forma a nivel de Latinoamérica esto se debe a que sólo existen datos clínicos de países como Argentina, Brasil, Chile y México (Leone et al., 2013, p. 7). Con respecto al Ecuador existe un limitado número de publicaciones indexadas con información acerca de la prevalencia del mieloma múltiple, datos clínicos y

genéticos (Leone et al.,2013, p. 7; Paz-y-Miño et al., 2013, p. 109; Paz-y-Miño, Guillen y Leone, 2015, p. 1).

Hasta la actualidad no se han encontrado polimorfismos que estén relacionados con el mieloma múltiple, pese a saber que el gen *EGFR* es uno de los genes que está implicado en la proliferación celular y la trasducción de señales en el mieloma múltiple (Ria, et al., 2009, p. 5373). Estudios previos en países como Brasil han indican asociaciones de los de los polimorfismos +936 C/T, -2578 A/C, -1154 G/A, -634 G/C y -1498C/T del gen *VEGF* con un peor pronóstico de la enfermedad (Borsarelli, Lourenco, Oliveira, Souza y Passos, 2014, p.p. 1363-1368). Sin embargo, en el Ecuador no se han realizado investigaciones a nivel molecular que determinen las asociaciones entre los polimorfismo del gen *VEGF* y el pronóstico de esta neoplasia, pero existe un estudio previo en líneas celulares de mieloma múltiple se determinó que estaban alteradas las vías celulares de los genes *VEGF* y *EGFR* (Leone et al. 2008).

Actualmente, no existe un diagnóstico eficaz que ayude a determinar el mieloma múltiple, debido a que los sistemas de estadiaje se basan en pruebas de laboratorio y sus resultados se pueden confundir con otras enfermedades hematológicas (Cano, et al., 2010, p. 41). En cuanto al pronóstico el mieloma múltiple es una neoplasia tratable pero sigue siendo incurable con una media de vida de 4 años (García, 2007, p. 104).

En lo que respecta al tratamiento existen ciertos factores relacionados a un riesgo alto de mortalidad precoz como resultado de los medicamentos y terapias utilizadas en el mieloma múltiple así mismo la edad de los pacientes (Conté, et al., 2007, p.1116). EL poseer sistemas diagnósticos y pronósticos tempranos permitiría que el tratamiento sea más efectivo y dirigido.

1.3.Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Relacionar la presencia de los polimorfismos +936 C→T, -2578 A→C, 1154 G→A, 634 G→C y 1498C→T del gen *VEGF*, PROM 1 y PROM 2 del gen *EGFR* con la clasificación cromosómica, datos clínicos y curvas de supervivencia en pacientes diagnosticados mieloma múltiple.

1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar la presencia de polimorfismos en los genes *VEGF* y *EGFR* en pacientes con mieloma múltiple mediante secuenciación- PCR.
- Correlacionar la frecuencia de cada polimorfismo presente en pacientes con casos controles mediante pruebas estadísticas.
- Relacionar los polimorfismos encontrados en los genes *EGFR* y *VEGF* con la clasificación cromosómica de la enfermedad.
- Analizar la asociación de cada polimorfismo encontrado en los genes *VEGF* y *EGFR* con los historiales clínicos mediante haplotipos.
- Determinar la relación existente entre la presencia de los polimorfismos y las curvas de supervivencia en los pacientes con mieloma múltiple.

1.4. Justificación

Con base a lo antes expuesto, la evaluación de polimorfismos de nucleótido simple en los genes *VEGF* y *EGFR* en pacientes con mieloma múltiple de la población ecuatoriana permitirá contribuir a mejorar las estadísticas de la prevalencia de la enfermedad en el país, ya que el diagnóstico de la enfermedad en estadios tempranos contribuirá a la disminución de los valores antes mencionados.

Adicionalmente, los estudios en mieloma múltiple que se han iniciado recientemente en el Ecuador (Leone, et al., 2013, p. 8) incluyendo la presente investigación, ayudarán a identificar de manera general las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de los genes *VEGF* y *EGFR*, así como la asociación de las mismas con el riesgo de padecer la enfermedad así como con el pronóstico de la misma en nuestra población. Por otro lado, y dada la ineficiencia de los sistemas diagnósticos actuales para establecer el estadio del mieloma múltiple, la determinación de estos polimorfismos permitirá mediante el uso de esta información y resultados, mejorar a largo plazo el diagnóstico a nivel nacional de esta patología. Además, si se aplica este sistema como estrategia diagnóstica y pronóstica de la enfermedad se podría acortar el tiempo de detección de la patología, haciendo así más oportuno y dirigido el tratamiento para los pacientes.

Finalmente, en un futuro cercano, los resultados obtenidos y en otras investigaciones alrededor del mundo aportarán al desarrollo de nuevos fármacos que se podrán administrar a los pacientes con mieloma múltiple y que tomen en cuenta además de la clasificación cromosómica, y los parámetros clínicos, los polimorfismos presentes, ayudando de esta manera mejorar la sobrevida de los pacientes.

2. Capítulo II. MARCO TEÓRICO

2.1. Patología del mieloma múltiple

2.1.1. Origen de la célula mielomatosa

Las células plasmáticas (CP), pueden desarrollarse y proliferar en la médula ósea o en tejido extramedular. Cuando su proliferación es de forma clonal en la médula ósea, la neoplasia se conoce como mieloma múltiple, mientras que si su desarrollo es extramedular se lo denomina plasmocitoma óseo (Suárez, 2015, p. 98).

Las CP, son el estadio terminal correspondiente a los linfocitos B maduros, cuya función es la secreción de anticuerpos para la detección de patógenos que pueden afectar al organismo (Aparicio y Gallart, 2010, p. 1), cuando existe una proliferación de CP de carácter clonal, provocando una anomalía, esta se conoce como mieloma múltiple que es considerada una neoplasia incurable (Conté et al., p. 1111).

El proceso de maduración y diferenciación de los linfocitos B, inicia a partir de una célula madre, la cual reside en la médula ósea, con el fin de proliferar y producir células hematopoyéticas, que posteriormente se diferenciarán en los linajes hematopoyéticos (Brink, 2010, p. 4), estos son: mieloides (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófago, mastocitos, monocitos y macrófagos) y linfoides donde se encuentran los linfocitos T y B, los principales protagonistas de la respuesta inmune adaptativa (Arnaiz, Regueiro y López, 1995, p. 19).

Los linfocitos B en el feto se originan en el hígado y el bazo, mientras que en los adultos se encuentran en la médula ósea, como se describió anteriormente provienen de una célula madre y su proceso de maduración (*Figura 1*). Este proceso consiste en la activación de las células progenitoras de linaje linfoide, las cuales se diferencian en células pro-B tempranas, se multiplican e interaccionan con células estromales y reticulares, en esta fase comienza la reorganización de genes del receptor del antígeno provocando la diferenciación a una célula pre-B, que tienen la capacidad de expresar receptores de antígenos, es decir cadenas pesadas μ y posteriormente producen cadenas ligeras, pero no pueden proliferar en presencia de un patógeno y por ello se denominan células B inmaduras (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015, p. 215), siguiendo su proceso de maduración las células pueden producir cadenas pesadas μ y δ , expresando inmunoglobulinas (IgM e IgG), denominándose células B maduras, posteriormente, se movilizan a órganos linfáticos para su maduración y activación. (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015, p.p. 215-216; Díaz-González y Ferraz, 2016, p. 177).

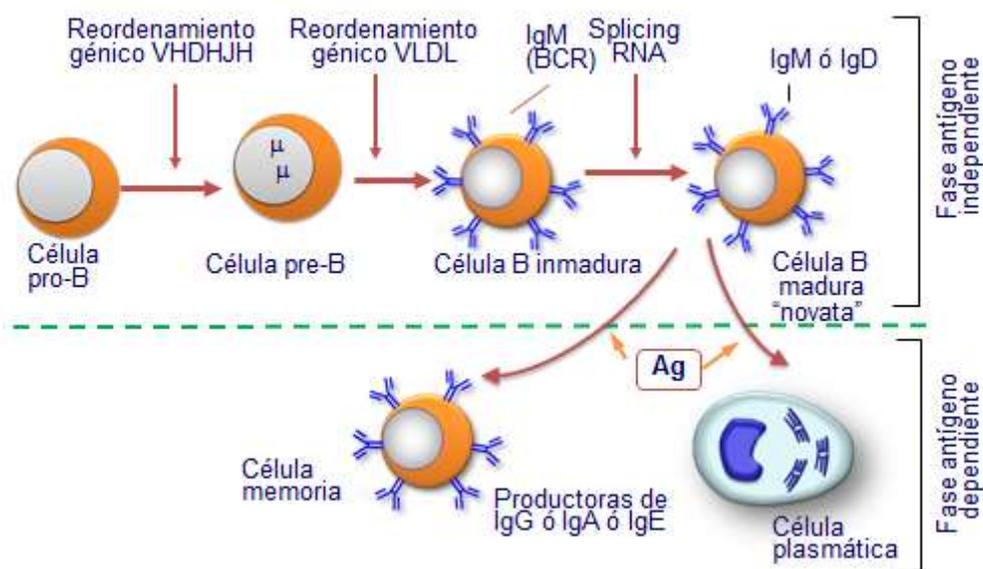


Figura 1. Proceso de maduración de los linfocitos B.
Tomado de Peña, 2014.

Durante todo el proceso de maduración de linfocitos B, existen dos fases: la primera es la fase antígeno independiente, que se desarrolla en la médula ósea y comienza desde que la célula progenitora, produce células pro-B hasta la culminación de las células B maduras de carácter inmunocompetente. Por otro lado la fase antígeno dependiente ocurre en los órganos linfoides secundarios como fin la diferenciación del linfocito B en células plasmáticas, las cuales secretan anticuerpos y linfocitos de memoria. (García, 2015, p.1; Aparicia y Gallart, 2010, p.p.1-2).

Los linfocitos B llegan a su madurez en la médula ósea, posteriormente se dirigen a órganos blanco como es el bazo y ganglios linfáticos, estas células se caracterizan por la presencia de un receptor, el cual reconoce a los distintos antígenos. Al concluir este proceso, los linfocitos B maduran, proliferan y se diferencian en células plasmáticas que tiene como función ser células memoria y productoras de antígenos (Rojas, 2003, p.83; Gamberale, 2004, p. 85).

El receptor antigénico de los linfocitos (BCR) por sus siglas en inglés, se constituye por el anclaje de una inmunoglobulina (Ig), la misma que se asocia con un heterodímero formado por las moléculas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (Gamberale, 2004, p. 85). Las inmunoglobulinas son moléculas glicoproteínas, constituidas por tres

fracciones de las cuales las fracciones (I y II), son similares y se las conoce como *Fragment antigen binding* (Fab), debido a que puede unirse a un antígeno, mientras que la fracción (III) es cristalizante tiene la función de unión a células o moléculas. La unión de las fracciones da como resultado la forma de Y, de la cual se compone por cuatro cadenas de aminoácidos; dos ligeras y dos pesadas (*Figura 2*); Las cadenas ligeras pueden ser del tipo kappa (κ) y lambda (λ), mientras que las cadenas pesadas hay 5 tipos (μ , γ , α , δ , ϵ), que corresponden a cada clase de anticuerpo como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Vega, 2008, p.p.136-137), hasta la actualidad, se han identificado cinco estructuras semejantes de inmunoglobulinas IgG y dos IgA (Ramos-Bello, y Llorente, 2009, p. 284; Vega, 2008, p.137).

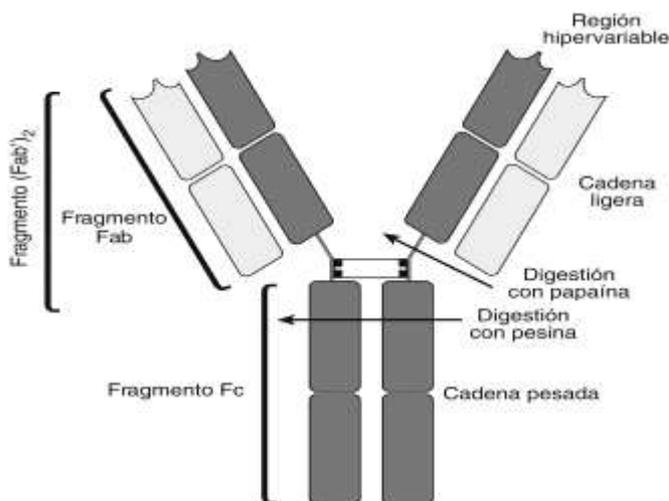


Figura 2. Estructura de una inmunoglobulina.
Tomado de Ramos-Bello y Llorente, 2009, p. 284.

2.1.2. Patogenia del mieloma múltiple

El desarrollo del mieloma es provocado por la proliferación excesiva de células plasmáticas clonales, que se encuentran acumuladas en la médula ósea, dentro de esta enfermedad influyen muchos factores endógenos como la información genética y exógenos como el medio ambiente, la calidad de vida, exposición a agentes físicos y químicos (Leone et al., 2013, p. 8). Las CP secretan inmunoglobulinas (Ig), en donde el 95% de los casos es por la

expresión de inmunoglobulinas defectuosas mayoritariamente la IgG e IgA en el suero, debido a la presencia de un pico monoclonal en la electroforesis de proteínas (Neira, Morán, Correa y Estrada, 2014, p. 88).

Actualmente, se desconoce la causa principal para que se desarrolle esta neoplasia pero se ha descubierto que se asocia a otras gammapatías (Khosravi, 2005, p.p.532-533). El mieloma múltiple, es una neoplasia que puede estar precedida por una anomalía llamada gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), por sus siglas en inglés, que es una neoplasia asintomática de las células plasmáticas que afecta a personas entre un rango de edad de 50 años en adelante, el riesgo de progresión a MM es del 1% (Neira, Morán, Correa y Estrada, 2014, p. 88; Zsolt, 2016, p. 155); mientras que el mieloma asintomático asintomático (SMM), es una enfermedad de CP, la cual representa el 10% de progresión a un MM. Estos son los dos modelos más estudiados en enfermedades precursoras del mieloma múltiple (Korde, Kristinsson y Landgren, 2016, p. 5573).

Es muy probable que la evolución a mieloma múltiple sea por alteraciones oncogénicas, que pueden ser alteraciones genéticas, cambios en el microambiente y fallos en el sistema inmune.

2.1.3. Clasificación cromosómica

Durante el desarrollo del mieloma múltiple se han encontrado ciertas alteraciones cromosómicas teniendo como resultado la alteración en la unión de las cadenas pesada de inmunoglobulinas, este tipo de alteraciones brinda a la célula la inmortalización de la célula y su acumulación (Alcalde, Rodríguez, Santos y Escobar, 2012, p. 135).

Dentro de la citogenética, a nivel cromosómico los casos de mieloma múltiple pueden dividirse en dos grupos: los hiperdiploides, que se caracterizan por la ganancia de cromosomas y se consideran de buen pronóstico; y los no hiperdiploides, que se caracterizan por un número modal variable (hipodiploide,

pseudodiploide, pseudotri o tetraploide), los cuales tienen un pronóstico y evolución de la enfermedad peor (Fantl et al., 2013, p. 300).

Las translocaciones en esta neoplasia aparecen en los estadios iniciales, por lo cual se ha comprobado que existen eventos primarios no aleatorios, los cuales desestabilizan al cromosoma y como resultado se producen alteraciones secundarias; además se producen alteraciones primarias las cuales comprometen a las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulinas (Menoni-Blanco y Da Silva-De Abreu, 2010, p.15).

Por consiguiente, a partir de este proceso se produce un inestabilidad cariotípica y ciertas mutaciones genéticas secundarias como translocaciones y deleciones, en ciertos casos anulan la expresión de genes supresores de tumores como son: las mutaciones en la proteína p53 y metilaciones en las proteínas p16 lo cual hacen que la enfermedad sea más agresiva (Alcalde, Rodríguez, Santos y Escobar, 2012, p. 135).

Los casos hiperdiploides representan el 50% de los casos su principal característica es la trisomía de los cromosomas impares y con una baja tasa de translocación de IGH. Mientras que los no hiperdiploides (cariotipos complejos), presentan translocaciones que afectan a locus de cadena pesada representando el 50% de inmunoglobulinas (14q32) y el 10% en translocaciones que afectan a las cadenas ligeras con una alta incidencia de monosomía 13/13q (Kriangkumet al., 2003, p. 427; Conte, Braggio, Figueroa y Fonseca, 2009, p.p. 554-555).

En los pacientes diagnosticados MM, se realiza cariotipo e hibridación fluorescente *in situ* (FISH), con el fin de identificar anomalías estructurales o numéricas, de esta forma se puede tener un mejor pronóstico y un adecuado tratamiento dependiendo del tipo de caso que sea. El estudio de FISH, permite la detección de translocaciones específicas para esta neoplasia con un 55-70% para la 14q32; 15-18% para 11q33, 15% para 4p16.3, 2% para 20q11, 5% para 16q23 y 3% para 6p31 (Alvarado et al., 2015, p. 313).

2.1.4. Sistemas de estadificación del mieloma múltiple

Debido a que el mieloma múltiple es una neoplasia compleja se lo clasifica según el estadio en que se encuentra la enfermedad, así como la progresión que puede tener. Para ello se han desarrollado sistemas que permiten su clasificación los cuales son Durie-Salmon y el sistema de estadificación internacional que toman de referencia parámetros clínicos como se observa en la Tabla 1, con la finalidad de establecer un diagnóstico. Actualmente, se ocupan dos sistemas, lo que permite un mejor pronóstico y mejorar las condiciones de supervivencia del paciente (Tabla 1) (Conte, Figueroa, Lois, Cabrera, León, García y Rojas, 2009, p. 8). En 1975, se desarrolló el primer sistema de estadificación Durie-Salmon, el cual toma en cuenta ciertos parámetros clínicos y los relaciona con la cantidad de masa de las células plasmáticas malignas encontradas en el cuerpo, como diagnóstico se obtiene que los pacientes que se encuentran, en los estadios I poseen un mieloma asintomático o indolente; mientras que los pacientes que se encuentran en los estadios II y III son pacientes con un mieloma sintomático o activo. Por otro lado el sistema de estadificación internacional, es uno de los más usados actualmente debido a que el diagnóstico se obtiene en un menor tiempo, este sistema toma como criterios los niveles de albúmina sérica y beta-2-microglobulina sérica presentes en la sangre y se clasifica en tres etapas (Tabla 1) (Alvarado et al., 2015, p.p.315-316; Greipp et al., 2005, p. 3413; Cersosimo, 2008, p.p. 7-8).

Tabla 1.

Sistemas de estadiaje; Durie-Salmon y el Sistema de estadificación internacional (ISS).

Estadio	Criterios	Masa de células de mieloma (células $\times 10^{12}/m^2$)	Criterio	Supervivencia media
I	1. Hb > 10g/100 mL 2. Valor normal del calcio sérico (≤ 12 mg/100 mL) 3. Estructura ósea (escala 0) o plasmocitoma solitario de radiografía ósea 4. Bajas tasas de producción de componente M: a. Valor IgG < 5 g/100 mL b. Valor IgA < 3 g/100 mL c. Componente M de la cadena ligera de orina en la electroforesis < 4 g/24 h	< 0.6 (bajo)	Beta-2-microglobulina sérica < 3.5 mg/dL y albumina sérica ≥ 3.5 g/dL	62 meses
II	Ni la etapa I ni la etapa III	0.6 - 1.2 (intermedio)	Ni en estadio I o III	44 meses
III	Una o más de las siguientes: 1. Hb < 8,5 g/100 mL 2. Valor del calcio sérico > 12 mg/100 mL 3. Lesiones líticas avanzadas (escala 3) en radiografía ósea 4. Altas tasas de producción del componente M: a. Valor IgG > 7 g/100 mL b. Valor IgA > 5 g/100 mL c. Componente M de la cadena ligera de orina en la electroforesis > 12 g/24 h	> 1.2 (alto)	Beta-2-microglobulina sérica > 5.5 mg/dL	29 meses

Adaptado de Kenneth, 2011, p.6.

2.1.5. Factores de riesgo

En la actualidad, se desconoce cuáles son las causas para el desarrollo del mieloma múltiple, pero si se han encontrado ciertos factores que pueden aumentar predisposición de presentar esta neoplasia. Uno de factores principales es la exposición a radiaciones, sustancias químicas y genotóxicas (Fredman, 1986, p.p. 424-425; Estrada, 2012, p. 344). Otros factores son: la edad, debido a que esta neoplasia se presenta en pacientes con una edad de 50 años en adelante; el sexo, tiene una mayor predisposición en hombre que en mujeres; el grupo étnico, mayor prevalencia en las personas que tienen ancestría afrodescendiente, así como los antecedentes familiares (Cano, et al., 2010, p. 5).

Según Leone, et al., en el 2013 (p.10) en el Ecuador la mayor parte de pacientes que presentan mieloma múltiple son personas que se dedican a la docencia y a la agricultura, el último tiene relación debido a que los agricultores están expuestos a sustancias como se mencionó antes genotóxicas, las cuales tienen la capacidad de dañar la estructura del ADN. También considerando la región geográfica se encontró una incidencia elevada en Loja, posiblemente por estar cerca de una zona minera.

2.2.Diagnóstico y complicaciones del mieloma múltiple

2.2.1. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas se pueden presentar dependiendo del estadio en que se encuentre la enfermedad como: elevación del calcio, disfunción renal, anemia, dolor, pérdida de peso e infecciones continuas (Estrada, 2012, p. 345).

La proliferación de las células plasmáticas malignas, conlleva a un daño óseo, esto se debe a las interacciones entre los osteoclastos (OC), los osteoclastos (OB), se sabe que la destrucción del hueso se ve incrementada por la acción de los OC, mientras que la renovación de los husos está disminuida por parte de los OB, como resultado de ese proceso se produce un desequilibrio óseo (Contte, Isnardi y Sieza, 2009, p.p. 29-30), este proceso se observa en etapas iniciales de la enfermedad, debido a la hiperactividad del receptor *RANK/RANK-L*, ya que el ligando que produce actúa directamente en el desarrollo de las células plasmáticas y el estroma. Un 70-80% de los pacientes presenta dolor óseo en la zona de la columna, esternón y costillas, las cuales se presentan como osteoporosis y fracturas patológicas visibles a radiografías, así también lesiones microscópicas en zonas como columna vertebral, cráneo, pelvis y huesos largos, las cuales se aprecian mediante resonancia magnética (García, Mateos y San Miguel, 2007, p.p.104-105).

Como resultado del aumento de la resorción ósea, un tercio de los pacientes con mieloma múltiple tienden a presentar un cuadro de hipercalcemia (Heras, Saiz, Fernández-Reyes, Sánchez, Zurita y Urrego, 2011, p.230), como consecuencia de los altos niveles de calcio y la excesiva producción de inmunoglobulina, se puede desarrollar insuficiencia renal, debido a que se puede producir estasis y ciertos depósitos de calcio en los riñones causando necrosis de las células epiteliales y obstrucción de los túbulos.

Una manifestación del MM, es la presencia de un cuadro anémico, esto se debe a distintos factores como la presencia de ligando *Fas*, que se encuentra en la superficie de la células plasmáticas y tiene la capacidad de activar la apoptosis para los progenitores eritroides. Así también como consecuencias de la dieta que consume el paciente, la quimioterapia, el déficit de vitamina B₁₂ y folato (García, Mateos y San Miguel, 2007, p.105).

2.2.2. Datos de laboratorio

Los estudios que se describirán a continuación son los que se realizan para tener un mejor diagnóstico, tipo de gammapatía monoclonal, extensión de la masa tumoral y encontrar si existe lesiones en órganos blanco que pueden afectar la sobrevida del paciente (Fantl, et al., 2013, p. 297).

Los factores asociados al mieloma múltiple son varios como ya se ha mencionado en el apartado (2.1.5.), es por ello para determinar un buen diagnóstico se necesitan varias pruebas como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2.

Exámenes para determinar mieloma múltiple.

<u>Factores asociados con el pronóstico en el mieloma múltiple</u>
<i>Relacionado con el paciente</i>
Edad
Género
Estado funcional
<i>Parámetros de laboratorio</i>
Hemoglobina
Conteo de plaquetas
Albumina
Calcio
BUN/creatinina
Beta2 microglobulina
Proteína C reactiva
LDH
<i>Específico de la enfermedad</i>
Tipo de paraproteína
Mieloma de cadena ligera
Relación anormal de la cadena ligera libre
Morfología plasmabástica
PCLl
Respuesta rápida
Resistencia primaria a la terapia
<i>Características citogenéticas</i>
Hipodiploide del 13 (citogenética)
t(14;16), t(14;20) del 17p

Adaptado de Roy y Greipp, 2014, p.48.

2.2.2.1. Aspirado de médula ósea

Dentro del aspirado de médula ósea se realizan diferentes pruebas para determinar mieloma múltiple. Una de las pruebas es citomorfológico para determinar si existe la presencia de plasmocitosis, en la cual se evalúa el porcentaje de plasmocitomas. Para considerar que es MM el rango debe ser superior a 10% con un promedio de 50%. Por otro lado, también se realiza la biopsia de médula ósea, con el fin de saber el grado de infiltración tumoral (García, Mateos y San Miguel, 2007, p.106).

2.2.2.2. Electroforesis de proteínas séricas

La electroforesis de proteína séricas o proteinograma (*Figura 3*), es la separación en cinco o seis bandas o regiones a partir del suero que contiene las proteínas por medio de electroforesis en agarosa; Las fracciones o zonas se separan en: Albúmina, Alfa1, alfa2, Beta la cual se puede separar en (beta1 y beta2) y finalmente en gamma, donde se pueden encontrar a inmunoglobulinas policlonales. Se lo realiza para identificar si existe la presencia de un pico monoclonal (Pedroza y Zamora, 2015, p.p. 57-58).

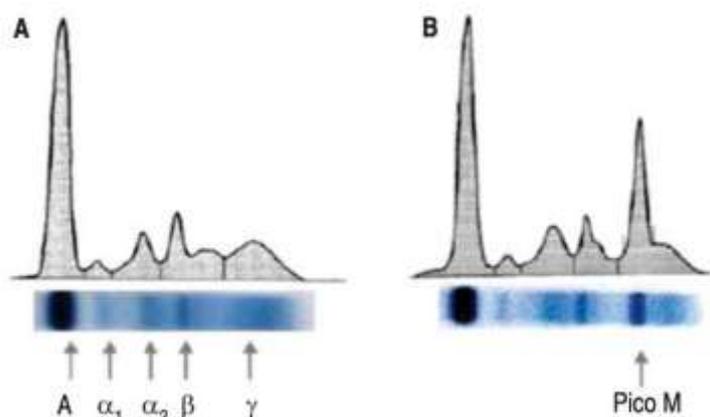


Figura 3. Proteinograma sérico en gel de agarosa.

Tomado de Pedroza y Zamora, 2015, p. 58.

a) Perfil normal

b) Mieloma múltiple.

2.2.2.3. Inmunofijación de proteínas séricas

La inmunofijación de proteínas (*Figura 4*), nos permite identificar qué tipo de inmunoglobulina es la responsable para que la banda aparezca en el proteinograma, así también el tipo de cadena ya que si es de cadena pesada,

podría ser γ para la IgG, α para la IgA y μ para la IgM; mientras que si es de cadena ligera podría ser (κ , λ). Es importante conocer el tipo de inmunoglobulina que está presente en el paciente con mieloma múltiple, ya que se podría establecer un mejor diagnóstico. Para este examen se utilizan antisueros específicos, los cuales reaccionan sólo con un tipo de cadena. Es así que la muestra se coloca sobre un gel de agarosa, posteriormente se agrega un tipo de suero monoespecífico para las distintas cadenas pasadas y ligeras y después de un período de incubación, se puede visualizar si existe la presencia de un tipo de proteína-M por medio de una banda definida en el gel. (Pedroza y Zamora, 2015, p.p. 57-59; Ramos, García, Cuesta, Rivera y Cuesta, 2001, p. 667). La paraproteína más frecuente dentro de los casos de MM es la IgG ya que se presenta entre un 50-60%, seguido de un 20% de IgA.

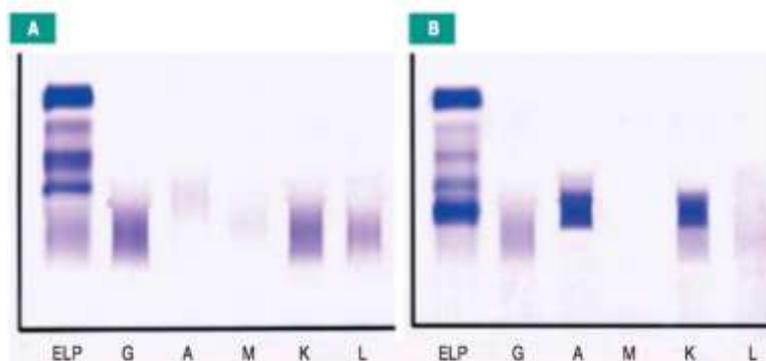


Figura 4. Inmunofijación en suero.

Tomado de Pedroza y Zamora, 2015, p. 59.

a) Patrón normal

b) Mieloma múltiple: componente monotípico IgA con restricción de cadenas kappa.

2.2.2.4. Proteína de Bence Jones

La proteína de Bence Jones, es importante en los casos que tienen una producción de cadenas ligeras para determinar la cantidad diaria excretada de proteína-M. Este examen consiste en la recolección de orina durante 24 horas, para luego ser concentrada 200 veces y mediante electroforesis se observa su detección (García, Mateos, y San Miguel, 2007, p. 106). Esta prueba puede demostrarse en orina en el 80% de los casos con MM y su excreción depende

de la cantidad de masa tumoral del paciente y si existe falla renal (Pedroza y Zamora, 2015, p. 59; García, Mateos, y San Miguel, 2007, p. 106).

2.2.2.5. Parámetros bioquímicos

Las pruebas bioquímicas son varias y se usan para diagnosticar el estadio de la neoplasia, así también pueden determinar si existe alguna complicación en órganos blanco. La cuantificación del lactato deshidrogenasa, es importante debido a que en casos agresivos se encuentra elevada por los recambios celulares que existen. De igual forma la beta-2-microglobulina, indica una gran carga tumoral. Es por esta razón que se cuantifican la creatinina, DHL y calcio, valores que permiten la detección de hipercalcemia en un 35% de los pacientes, y en ciertos casos insuficiencia renal (García, Mateos, y San Miguel, 2007, p. 106; Roy y Greipp, 2014, p.p.50-51). Estos parámetros bioquímicos, son importantes debido a que constituyen indicativos en los sistemas de estadificación del mieloma múltiple como se mencionó en el apartado (2.1.4.).

2.2.2.6. Citogenética

Las pruebas citogenéticas que ya se han citado en el apartado (2.1.3.); son importantes debido a que dan información acerca del pronóstico que va a tener el paciente y que tratamiento se podría aplicar para elevar la sobrevida del mismo. Las anomalías más frecuentes son del cromosoma 14, mayoritariamente son translocaciones en el 40% de los pacientes. De igual forma se encuentra la ganancia del brazo largo del cromosoma 1 en el 50% de los casos y que se relaciona con la delección del cromosoma 13, esto se puede identificar con ayuda de técnicas de hibridación *in situ* con sondas para el gen *RB* (García-Sanz, Mateos, y San Miguel, 2007, p.p. 107-108; Alvarado et al., 2015, p. 313).

2.2.2.7. Estudios de imagen

Dentro de los estudios de imagen, la más importantes es: la resonancia magnética, para identificar el nivel de afectación, la cual puede ser normal,

focal, mixto o difuso, así también permite la visualización de plasmocitomas y la compresión medular en los pacientes que la puedan presentar (Alvarado et al., 2015, p. 313).

Otra prueba es la tomografía por emisión de positrones (PET), no se la realiza con frecuencia en los pacientes con mieloma múltiple debido a que puede arrojar falsos positivos en pacientes que reciben quimioterapia o sufren de inflamaciones agudas, pero es útil en cuanto a la identificación de la extensión del mieloma múltiple, detectar infiltración extramedular como es el caso de los plasmocitomas. Esta prueba tiene una sensibilidad del 93% para la detección de lesiones focales, del 84-92% en lesiones difusas (Alvarado et al., 2015, p. 313; García-Sanz, Mateos, y San Miguel, 2007, p. 108).

Las radiografías convencionales, para la detección de lesiones osteolíticas, se presentan con frecuencia en la calota craneal, columna vertebral, costillas, pelvis y en huesos largos (Estrada, 2012, p. 347).

2.3.Gen VEGF

El gen del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*), es una glicoproteína homodímera, que encuentra ubicado en el cromosoma 6p21.3 (Figura 5); se constituye por ocho exones y siete intrones con una actividad mitogénica alta específica, siendo el principal regulador de las células endoteliales (ECs) (Andresen et al., 2012, p. 131; Martínez y Herrera, 2006, p. 86).

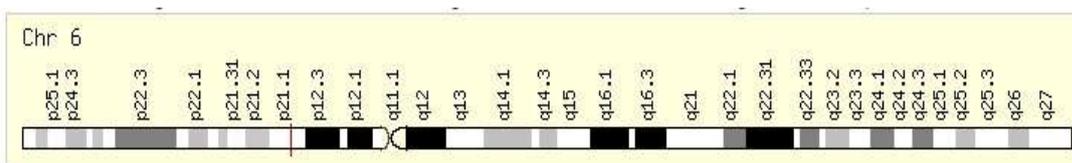


Figura5. Ubicación del gen VEGF dentro del cromosoma 6. Tomado de GeneCards, 2014.

La expresión del *VEGF* se encuentra modulada por efectores como: citoquinas, lipopolisacáridos y hormonas. En ciertas neoplasias malignas la expresión de este gen aumenta, debido al crecimiento tumoral y la metástasis (Andresen, et al., 2012, p. 131; Podar y Anderson, 2016, p. 4).

Estudios anteriores, han identificado en el mieloma múltiple existe una relación, donde el factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*) se une a su receptor de tipo 2 (*VEGFR2*) y así promueve a formación de nuevos vasos sanguíneos. Los genes *VEGF* y *VEGFR2* son genes polimórficos en humanos y los SNPs estudiados en esta neoplasia han sido *VEGF* -2578 C→A, -1154 G→A que se encuentran en la región promotora, mientras que el *VEGF* -634 G→C se encuentra en la región no traducida 5' del gen, y estos pueden ser hereditarios. (Borsarelli, Lourenco, Borba, De Souza, Vassallo y Passos, 2014, p. 1363). También se han estudiado los polimorfismos *VEGF* -2578 C→A, -1154 G→A, -634 G→C, -1498 C→T y +936 C→T en otros tipos de cáncer como el cáncer colorectal (*Figura 6*) (Ulivi et al., 2015, p. 1).

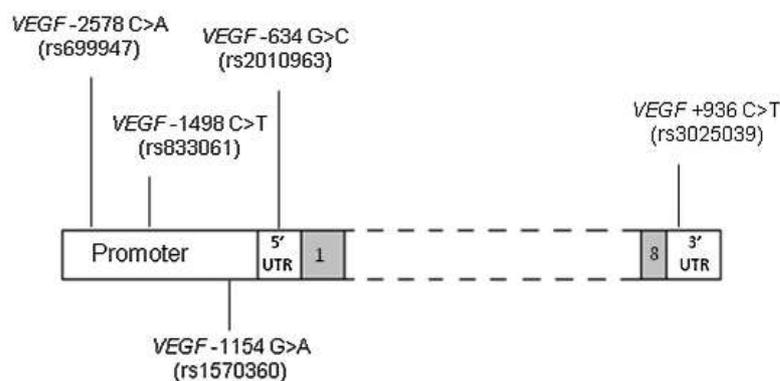


Figura 6. Ubicación de los SNPs del gen *VEGF*. Tomado de Ulivi et al., 2015, p. 4.

2.4. Gen *EGFR*

El gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), se encuentra localizado en el cromosoma 7p11.2 (*Figura 7*), está constituido por 28 exones que ocupan un segmento de 75 kb y codifican una proteína 1210 aminoácidos (Sánchez y González, 2010, p. 174); pertenece a

una familia de receptores tirosina quinasa, la cual se compone por cuatro receptor diferentes incluyendo el *EGFR*, *HER2*, *HER3* y *HER4*. Las proteínas que codifican estos receptores se expresan en distintos cromosomas como son el 7, 17, 13 y 2 respectivamente. El *EGFR* posee un ligando que es el factor de crecimiento epidérmico (EGR) y cuando este se une el receptor se dimeriza, posteriormente se autofosforila en residuos de tirosina dentro del dominio celular (Cappuzzo, 2014, p. 7).

Estudios anteriores han encontrado que la sobreexpresión del gen *EGFR* y *SEC61G* esta relaciona con la translocación (7;14), con esto se ha relacionado con la progresión del ciclo celular, la división celular, supervivencia y progresión de la neoplasia (Walker, Wardell, Ross y Morgan, 2013, p.p.819-821).

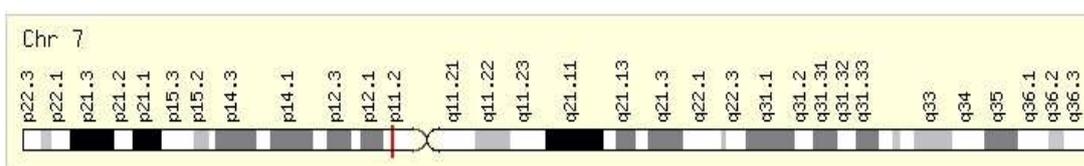


Figura 7. Ubicación del gen *EGFR* dentro del cromosoma 7. Tomado de GeneCards, 2014.

2.5. Equilibrio de Hardy-Weinberg

El equilibrio de Hardy-Weinberg es una ley de genética de poblaciones, la cual establece que dentro de la composición genética de una población grande, en la cual se caracteriza por tener matrimonios al azar, sus frecuencias genéticas permanece constantes de generación en generación, con la ausencia de factores que rompan el equilibrio, los cuales pueden ser mutaciones, migración, selección, deriva génica y flujo de genes (Paz y Miño y López, 2014, p. 49).

3. Capítulo III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El diseño del plan experimental que se empleó para la obtención de las muestras de médula ósea de los pacientes fue por conveniencia, es decir, en función de la disponibilidad de pacientes en el momento de la recolección en el Hospital Carlos Andrade Marín y Solca Núcleo de Quito. En lo que se refiere a

la población control se utilizarán muestras de sangre periférica obtenidas a partir del banco del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UDLA.

Toda esta investigación se desarrolló dentro del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas, bajo la dirección de la Dra. Paola Elizabeth Leone Campo, Ph.D, investigadora del IIB. Las muestras que se recolectaron siguieron el proceso que se detalla en la *Figura 8*.

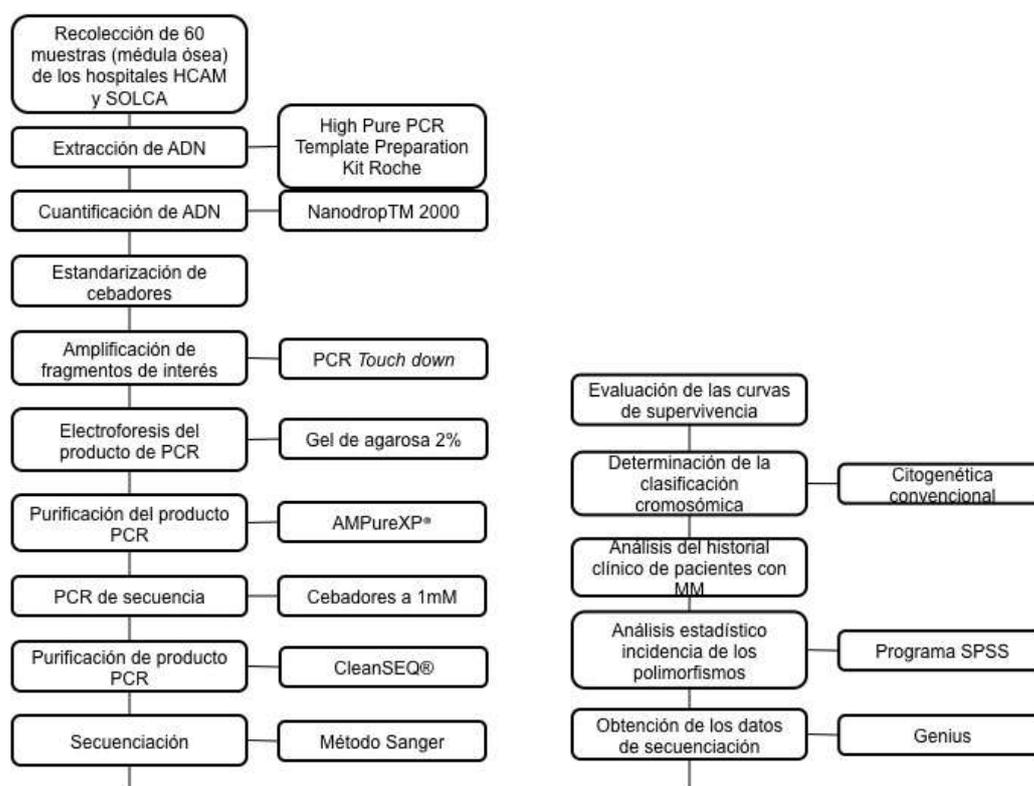


Figura 8. Procedimiento para la evaluación de los polimorfismos +936 C→T, -2578 A→C, 1154 G→A, 634 G→C y 1498 C→T del gen *VEGF*, 55.017.893 G→A y rs759171 A→C del gen *EGFR*.

Tomado de Paz-y-Miño, 2010, p. 397.

4. Capítulo IV. PROCEDIMIENTOS

4.1. Población y muestra

Para la determinación del tamaño de muestras se empleó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N\sigma^2 Z\alpha^2}{E^2(N-1) + \sigma^2 Z\alpha^2}$$

Ec.1. Fórmula para determinar el número de muestra.

Dónde:

n: representa el número de muestras (pacientes/controles)

N: tamaño de la población (pacientes: 60; controles: 40)

Z α : constante del nivel de confiabilidad (95%: 1,96)

σ : desviación estándar de la población (0,66)

E: limite aceptable de error muestral (0,1)

n=63 muestras.

Obteniendo así, que el número de muestras necesarias para la investigación es de 63 pacientes y 40 controles. Para todas las muestras de pacientes que se recolectarán, se firmará un consentimiento informado en donde se detallará el objetivo y la información pertinente a la investigación. En lo que se refiere a la población control se obtendrán 40 muestras de sangre periférica, igualmente se firmará un consentimiento informado, a partir de dos grupos étnicos como son: afrodescendientes y mestizos.

4.2. Materiales y métodos para la obtención de los datos

4.2.1. Extracción de ADN genómico a partir de médula ósea

Una vez obtenidas las muestras de médula ósea, se procedió a realizar la extracción de ADN genómico, para lo cual se usaron dos kits de diferentes casas comerciales, debido a que se lo realizó conforme a la disponibilidad que había en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas.

4.2.1.1. Extracción de ADN mediante kit comercial PureLink™ Genomic DNA

Para la extracción de ADN genómico se procedió a seguir el protocolo que establece el kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen™, California). Para

comenzar, se precalentó el bloque térmico Accublock™ Digital Dry Bath (Labnet, USA) a 55°C. En un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL, previamente rotulado con el código del paciente, se colocaron 20 µL de proteinasa K (Invitrogen™, California), 20 µL de ARNasa (Invitrogen™, California) y se añadieron 200 µL de médula ósea, se homogenizó por medio de VortexGene2 (Scientific Industries) y se incubó a temperatura ambiente por aproximadamente 2 minutos.

A continuación, se añadieron 200 µL de buffer de lisis celular, provisto por el kit, se homogenizó nuevamente y se colocó en el bloque térmico durante 10 minutos a una temperatura de 55°C, con el fin de acelerar el proceso de digestión y favorecer la desnaturalización de proteínas y lípidos que posee la muestra. Una vez transcurrido este tiempo, se colocaron 200 µL de etanol al 100% al lisado, se continuó a mezclar durante 10 segundos por vórtex.

El volumen obtenido fue de 640 µL aproximadamente, se colocó en una columna de purificación PureLink™ rotulada con el código del paciente, el cual se insertó sobre un tubo de colección y se procedió a centrifugar a 10.000 g por 1 minuto a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se descartó el tubo de colección con el líquido y se colocó la columna en un nuevo tubo de colección. Se añadieron 500 µL de Wash Buffer 1, provisto por el kit y previamente preparado con etanol grado analítico. La columna se centrifugó a 10.000 g por 1 minuto. Se descartó el tubo de colección y se colocó un nuevo tubo a la columna, se adicionaron 500 µL de Wash Buffer 2, se centrifugó la columna a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente, se desechó el tubo de colección y se colocó la columna sobre un tubo eppendorf estéril rotulado. Finalmente, se colocaron 30 µL de buffer de elusión PureLink™, provisto por el kit, en el centro de la columna, se incubó la columna por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a velocidad máxima por 3 minutos. El ADN obtenido se cuantificó y se guardó inmediatamente a -80°C para su conservación.

4.2.1.2. Extracción de ADN mediante High Pure PCR Template Preparation Kit

Para la extracción de las muestras de médula ósea mediante High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic: Alemania). Se siguió con el protocolo ya establecido por la casa comercial. Se comenzó con limpiar el área de extracción con hipoclorito al 1% y después con etanol al 70%. Posteriormente, se precalentó la incubadora a 70°C y se colocó el buffer de elución del kit (Elution Buffer). Para comenzar en un tubo estéril de 1,5 mL, previamente rotulado, se colocaron 200 µL de binding buffer, 40 µL Proteínasa K y 200 µL de la muestra de médula ósea. Se homogenizó la mezcla por medio de vórtex y se incubó el tubo por 10 minutos a 70°C. Transcurrido este tiempo, se colocaron 100 µL de isopropanol de grado 100% en el tubo y se homogenizó durante 15 segundos. La mezcla se colocó en una columna High Pure Filter Tube sobre un tubo colector y se procedió a centrifugar a 8.000 g por 1 minuto. El tubo colector se descartó y se colocó un nuevo tubo, a la columna se añadió 500 µL de Inhibitor Removal Buffer y se centrifugó la columna a 8.000 g por 1 minuto, al finalizar se descartó el tubo colector y se colocó un nuevo y se agregó en la columna 500 µL de Wash buffer y se centrifugó la columna a 8.000 g por 1 minuto, se descartó el tubo colector y se colocó sobre un nuevo tubo se procedió hacer un segundo lavado añadiendo 500 µL Wash Buffer y la columna se centrifugó a 8.000 g por 1 minuto y por posteriormente se centrifugó a 13.000 g por 10 segundos, para eliminar los remanentes de Wash Buffer existentes en la columna y el tubo se descartó. Para finalizar, la columna se colocó sobre un nuevo tubo 1,5 mL estéril rotulado previamente, en la columna se colocaron 60 µL de Elution Buffer en la columna, que estaba previamente calentado a 70°C y se centrifugó a 8.000 g por 1 minuto. Para finalizar el ADN recolectado se lo cuantificó y se guardó a temperaturas de -80°C para evitar su degradación.

4.2.2. Cuantificación de ADN

Para cuantificar el ADN genómico obtenido de la extracción, así también las concentración obtenida en (ng/ μ L) y su pureza se utilizó el equipo Nanodrop TM 2000 (Thermo Scientific, USA) que se basa en la técnica de espectrofotometría.

4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *Touchdown*

La amplificación de los fragmentos de interés, se trabajó bajo condiciones estériles en un cuarto exclusivo para el ensamblaje de PCR. La PCR de cada uno de los genes se las realizó en cámaras de flujo laminar horizontal (Euroclon, Italia), con el fin de evitar la contaminación de las muestras.

Para la amplificación de los fragmentos de interés correspondientes a los genes *VEGF* y *EGFR*, se optimizaron las condiciones, concentraciones de reactivos y de ADN genómico correspondiente a muestras de pacientes (médula ósea) como controles (sangre periférica), pese a que es diferente el tipo de muestra en pacientes y controles, se utilizó el mismo volumen de los distintos componentes para cada una de las reacciones. El ensamblaje del Master Mix estuvo conformado por 8 reactivos a diferentes concentraciones como se detalla en la Tabla 3. Cada reacción tuvo un volumen final de 20 μ L. Mientras que las condiciones en el termociclador variaron dependiendo de las temperaturas de hibridación de cada par de primers.

Tabla 3.

Componentes de la Master Mix para la PCR de los genes *VEGF* y *EGFR*.

Componentes	Concentración Inicial	Concentración final en la reacción	Volumen 1X
<i>Green Go Taq® Flexi Buffer</i> (Promega, USA)	5X	1X	4 μ L
MgCl ₂	50 Mm	2,5 mM	1 μ L
dNTPs (Invitrogen™, USA)	10 Mm	25 μ L	0,4 μ L
Cebador <i>Forward</i>	10 μ M	0,5 mM	0,6 μ L
Cebador <i>Reverse</i>	10 Mm	0,5 mM	0,6 μ L
<i>Platinum® Taq polymerase</i> (Invitrogen™, California)	5 U/ μ L	1 U/ μ L	0,2 μ L
Agua Mili-Q			12,6 μ L

ADN genómico	10 ng/μL	6 ng/μL	0,6 μL
		Total	20 μL

4.2.4. Diseño de cebadores específicos para la reacción en cadena de la polimerasa *touchdown* (PCR)

Para analizar cada polimorfismo planteado en los genes *VEGF* y *EGFR* se utilizó cebadores, los cuales, investigadores del IIB diseñaron con anterioridad en proyectos previos a éste para ello hicieron uso de *Primer-BLAST*, que es una herramienta bioinformática usada para el diseño de cebadores. Durante este proceso, se tomó en cuenta regiones específicas; en el gen *VEGF* se diseñaron 5 pares de cebadores cuya secuencia se observa en la Tabla 4.

Tabla 4.

Diseño de cebadores para la amplificación de fragmentos del gen *VEGF*.

Cebadores	Secuencia	Fragmento	Polimorfismo
<i>VEGF</i> +936-FW	5'AAGGAAGAGGAGACTCTGCGC 3'	198 pb.	rs3025039
<i>VEGF</i> +936-RV	5' TATGTGGGTGGGTGTGTGTCTACAG 3'		
<i>VEGF</i> -1498-FW	5' GTGTGTGTCTGTGTGGGTGAG	190 pb.	rs833061
<i>VEGF</i> -1498-RV	5' CTGAGAGCCGTTCCCTCTT 3'		
<i>VEGF</i> -1154-FW	5' TTCAGGCTGTGAACCTTGG 3'	225 pb.	rs1570360
<i>VEGF</i> -1154-RV	5' GATCCTCCCGCTACCAG 3'		
<i>VEGF</i> -634-FW	5' ATTTATTTTTGCTTGCCATT 3'	304 pb.	rs2010963
<i>VEGF</i> -634-RV	5' GTCTGTCTGTCTGTCCGTCA 3'		
<i>VEGF</i> -2578-FW	5' GGATGGGGCTGACTAGGTAAGC 3'	325 pb.	rs699947
<i>VEGF</i> -2578-RV	5' AGCCCCCTTTTCTCCAAC 3'		

De igual forma se diseñaron los cebadores para el gen *EGFR* obteniendo 2 pares de cebadores cuya secuencia se observa en la Tabla 5. Para el diseño

de cebadores se tomó en cuenta la región promotora del gen, la cual contenía los SNPs de interés.

Tabla 5.

Diseño de cebadores para la amplificación de fragmentos del gen *EGFR*.

Cebadores	Secuencia	Fragmento	Polimorfismo
<i>EGFR</i> - PROM1-FW	5' GGCAGTGAGCAGACCTGTG 3'	315 pb.	55.017.893
<i>EGFR</i> - PROM1-RV	5' CCATCCCCCACTGTTCTTCTC 3'		
<i>EGFR</i> - PROM2-FW	5' TCGGACTTTAGAGCACCACC 3'	369 pb.	rs759171
<i>EGFR</i> - PROM2-RV	5' GGGTGCCCTGAGGAGTTAATT 3'		

4.2.5. Amplificación de polimorfismos del gen *VEGF*

4.2.5.1. Polimorfismo *VEGF* +936 C→T

El ensamblaje de las reacciones se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente en el apartado 3.9., se escogió la temperatura mayor a la cual se amplificaron las muestras y la menor, esta reacción se realizó en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) bajo el programa que se observa en la Tabla 6.

Tabla 6.

Programa usado para la amplificación del polimorfismos *VEGF* +936C→T.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización	95 °C	5:00	10
	95 °C	0:30	
Hibridación	68 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	25
Desnaturalización	95 °C	5:00	
Hibridación	68 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	

4.2.5.2. Polimorfismo *VEGF* -1498C→T

El ensamblaje de las reacciones se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente en el apartado 3.9., se escogió la temperatura mayor a la cual se amplificaron las muestras y la menor, esta reacción se realizó en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) bajo el programa que se observa en la Tabla 7.

Tabla 7.

Programa usado para la amplificación del polimorfismos *VEGF* -1498 C→T.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización	95 °C	5:00	10
	95 °C	0:30	
Hibridación	65 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	30
Desnaturalización	95 °C	5:00	
Hibridación	59 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	

4.2.5.3. Polimorfismo de *VEGF* -2578C→A

El ensamblaje de las reacciones se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente en el apartado 3.9., se escogió la temperatura mayor a la cual se amplificaron las muestras y la menor, esta reacción se realizó en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) bajo el programa que se observa en la Tabla 8.

Tabla 8.

Programa usado para la amplificación del polimorfismos *VEGF* -2578 C→A.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización	95 °C	5:00	10
	95 °C	0:30	
Hibridación	66.1 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	

Desnaturalización	95 °C	5:00	30
Hibridación	61 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	

4.2.5.4. Polimorfismo de *VEGF* -1154G→A

El ensamblaje de las reacciones se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente en el apartado 3.9., se escogió la temperatura mayor a la cual se amplificaron las muestras y la menor, esta reacción se realizó en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) bajo el programa que se observa en la Tabla 9.

Tabla 9.

Programa usado para la amplificación del polimorfismos *VEGF* -1154 G→A.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización	95 °C	5:00	10
	95 °C	0:30	
Hibridación	63 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	
Desnaturalización	95 °C	5:00	30
Hibridación	55 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	

4.2.5.5. Polimorfismo de *VEGF* -634G→C

El ensamblaje de las reacciones se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente en el apartado 3.9., se escogió la temperatura mayor a la cual se amplificaron las muestras y la menor, esta reacción se realizó en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) bajo el programa que se observa en la Tabla 10.

Tabla 10.

Programa usado para la amplificación del polimorfismos *VEGF* -634 G→C.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización	95 °C	5:00	10
	95 °C	0:30	
Hibridación	58,5 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	30
Desnaturalización	95 °C	5:00	
Hibridación	55 °C	0:50	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	

4.2.6. Amplificación de polimorfismos del gen *EGFR*

4.2.6.1. Amplificación de *EGFR* PROM1G→A y PROM2 A→C

El ensamblaje de las reacciones se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente en el apartado 3.9., se escogió la temperatura mayor a la cual se amplificaron las muestras y la menor, esta reacción se realizó en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA) bajo el programa que se observa en la Tabla 11.

Tabla 11.

Programa usado para la amplificación del polimorfismos *EGFR* PROM1G→A y *EGFR* PROM2 A→C.

Etapas	Temperatura	Tiempo (min)	Nº Ciclos
Desnaturalización	95 °C	5:00	10
	95 °C	0:30	
Hibridación	63 °C	1:00	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	30
Desnaturalización	95 °C	5:00	
Hibridación	61 °C	1:00	
Elongación	72 °C	1:00	
Elongación final	72 °C	5:00	

4.2.7. Electroforesis horizontal convencional

Se procedió a realizar un gel al 2% de agarosa. Para lo cual en un matraz se colocó agar liofilizado y se disolvió con buffer Tris-borato-EDTA (TBE) a una concentración de 1X, la mezcla se calentó en el microondas hasta que el agar se disolvió completamente. A continuación se agregaron 0,2 µL bromuro de etidio por cada 20 mL de TBE 1X utilizado y se mezcló uniformemente con movimientos circulares. El agar disuelto se colocó en el molde con los respectivos peines para el número de pocillos necesitados.

Una vez que el gel se solidificó, se comenzó a cargar en el primer pocillo 2 µL de marcador de peso de 100pb, a continuación en los siguientes pocillos se colocaron 5 µL de producto de la PCR y por último el control negativo de la reacción así las muestras migraron a través del campo eléctrico a 90V durante 45 minutos aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se observó el gel en el transiluminador con luz UV (GE Healthcare).

4.2.8. Secuenciación Sanger con electroforesis capilar

4.2.8.1. Purificación de producto PCR por Ampure®

Confirmada la correcta amplificación de los fragmentos de las distintas reacciones de PCR de los genes *VEGF* y *EGFR*, se procedió a purificar cada uno de los fragmentos con el método de purificación Agencourt AMPure® XP (Beckman Coulter, California).

Como paso inicial, se equilibró y se homogenizó el Ampure® a temperatura ambiente. En tubos strips de 0,2 mL, se colocaron 15 µL de Ampure® por cada 10 µL de producto PCR obtenido, se homogenizó por VortexGene2 (Scientific Industries) durante 10 segundos y se dejó reposar las muestras durante 5 minutos. Terminado este tiempo, se colocaron las muestras en la placa magnética durante 5 minutos, se observó la formación de un anillo en las paredes de los tubos. Posteriormente a este tiempo, se procedió a aspirar el líquido con cuidado de no tocar el anillo que se formó y sin retirar los tubos de la placa magnética. Se adicionaron 200 µL de Etanol al 70% fresco, se incubó

por 30 segundos. El etanol colocado se retiró por inversión con toallas absorbentes. Posteriormente se realizó un segundo lavado, se colocaron 200 μL de etanol al 70% se incubó por 30 segundos nuevamente y se descartó con toallas absorbentes. La placa con las muestras se llevaron a la incubadora a 37°C durante 30 minutos para eliminar todos los remanentes de Etanol. Concluido el tiempo establecido, se retiró la placa de la incubadora y en cada tubo se colocaron 30 μL de H_2O Milli-Q. Se re-suspendió las muestras por vórtex, hasta obtener un color marrón. Se colocó nuevamente las muestras en la placa magnética y se procedió a retirar el líquido en tubos estériles de 0,2 mL y rotulados correctamente. Los amplificados se los guardaron a -20°C .

4.2.8.2. Reacción en cadena de la polimerasa de secuencia

Terminado la purificación de cada una de las muestras de los genes *VEGF* y *EGFR*, se procedió a realizar la PCR de secuencia para cada uno de los polimorfismos correspondientes a cada gen. En esta PCR se usaron 5 reactivos con los cuales se ajustó a un volumen final de 6 μL como se visualiza en la Tabla 12. Se tomó en cuenta que para cada reacción se colocó un sólo cebador, es decir sólo el cebador forward o sólo el cebador reverse, donde se tuvo para cada muestra dos reacciones con cada cebador.

Tabla 12.

Reactivos utilizados para PCR de secuencia, concentraciones y volumen para 1X.

Reactivo	Concentración Final	Volumen Final 1X
Agua Mili-Q		1,5 μL
BigDye Terminator mix v 3.1		0,5 μL
BigDye Terminator Sequencing Buffer 5X	0,75 X	0,9 μL
Cebador Fw/Rv (1 μM)	0,27 μM	1,6 μL
Producto PCR purificado		1,5 μL
	Total	6 μL

El programa que se usó, para la PCR de secuencia se lo realizó en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA), el mismo que se describe en la Tabla 13. Todo el proceso de ensamblaje de las muestras se lo realizó en ausencia de luz, debido a que los reactivos son sensibles a la misma.

Tabla 13.

Programa utilizado para realizar la PCR de secuencia

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96 °C	3 min	
Desnaturalización	96 °C	10 seg	25
Hibridación	50,5 °C	5 seg	
Elongación	60 °C	4 min	

4.2.8.3. Purificación de PCR de secuencia por CleanSEQ®

Para comenzar, el método de purificación Agencourt CleanSEQ® (Coulter, California), se lo realizó una vez que se terminó la PCR de secuencia. Se inició por equilibrar el CleanSEQ® a temperatura ambiente posteriormente se homogenizó mediante vórtex, a cada tubo que contuvo los 6 µL de PCR de secuencia, se añadieron 2 µL de CleanSEQ®, a continuación se añadió 16,2 µL de Etanol fresco de grado 85%. Cada muestra fue homogenizada por vórtex y se colocaron los tubos en la placa magnética por un lapso de 3 minutos, se formó un anillo en las paredes de los mismos, con cuidado se aspiró el líquido sin topar el anillo que se formó. Una vez, aspirado todo el líquido se procedió a realizar lavados, para lo cual, se añadieron a cada tubo 100 µL de etanol al 85% fresco y se dejó incubar por 30 segundos, transcurrido ese tiempo se retiró el etanol por inversión con ayuda de servilletas absorbentes, posteriormente se realizó un segundo lavado con etanol al 85%, se repitió el mismo tiempo de incubación y aspirado del primer lavado. Para eliminar los remanentes de etanol se colocó la placa con los tubos en la incubadora a 37 °C por aproximadamente 25 minutos.

Al finalizar la incubación, a cada tubo se colocaron 20 μ L de H₂O Mili-Q y por medio de agitación con vórtex se re-suspendió cada muestra. Posteriormente, se colocó en la placa magnética los tubos con los amplificadores re-suspendidos e inmediatamente se aspiró el líquido y se cargó en la placa de carga de secuenciación para su lectura en el secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Texas).

4.2.8.4. Secuenciación de ADN mediante electroforesis capilar

Para la secuenciación como se mencionó anteriormente, se usó el equipo Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Texas), dependiendo del número de pares de base que cada fragmento tuvo se utilizó el programa RAPIDSEC36-BD3-POP7-INY1200 para los fragmentos entre 100 y 250 pb. Mientras para los fragmentos que tenían entre 300 a 400 pb se usó el programa RAPIDSEC36-BD3-POP7-INY1700. Una vez finaliza la lectura de las secuencias se procedió a leer las secuencias con el software ABI PRISM® Data Collection V3.0 (Applied Biosystems, Texas). El análisis de las secuencias se lo realizó mediante el programa bioinformático *Geneious (Restricted)*

8.1.7. Los electroferogramas obtenidos por el software presentaron curvas de colores para cada base nitrogenada, siendo el color azul (citosina), verde (adenina), negro (guanina) y por último rojo (timina).

4.3. Evaluación estadística de los resultados

La evaluación estadística de los resultados se realizó en el programa SPSS Statistics 20, el cual mediante tablas de contingencia calculó el valor p para las diferentes pruebas con un intervalo de confianza del 95%.

Para correlacionar, la frecuencia de cada polimorfismo que se encontró en pacientes y controles se realizó la prueba de Fisher debido a que los genotipos son variables cualitativas. Esta prueba es significativa cuando el valor p es menor a 0,05, es decir que existe una asociación significativa entre los

polimorfismos encontrados en los pacientes y en el grupo control. Esta prueba exacta de Fisher también se usó para determinar si existe una diferencia significativa entre los polimorfismos y las variables cualitativas del historial clínico como: el género, la citogenética y el estadio de la enfermedad dependiendo del sistema de estadificación. De igual forma se usó para determinar si existió asociación significativa entre los haplotipos y las variables cualitativas antes descritas.

Para determinar, si los polimorfismos se encuentran en equilibrio se usó Hardy-Weinberg, en el cual el valor p debe ser mayor a 0,05 para que se encuentre en equilibrio, si este valor p es menor los polimorfismos no están en equilibrio por diversos factores.

Se utilizó la prueba de Odds Ratio, la cual es significativa cuando el valor de p es menor a 0,05 y nos indica el riesgo relativo entre genotipos de los polimorfismos estudiados y el desarrollo de la enfermedad. La prueba estadística de Odds-Ratio no es válida si las variantes genotipos es igual a cero.

Para relacionar, los polimorfismos con las variables cuantitativas de los historiales clínicos; así también los haplotipos con las mismas variables como: Edad, supervivencia, hemoglobina, leucocitos, plaquetas, glóbulos blancos, creatinina, urea, albúmina, LDH, IgG, IgA, IgM, IgE, calcio, B2M y proteínas totales, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para medir la heterogeneidad entre muestras independientes y la cual muestra una asociación significativa entre las muestras si el valor p es menor a 0,05.

5. Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Recopilación historiales clínicos

Para la presente investigación se recolectaron 40 muestras de controles y 63 muestras de pacientes con sus respectivos historiales, de los cuales se

tomaron ciertas variables de interés como son: el género, la edad, la clasificación cromosómica, el estadio de la enfermedad, el tiempo de supervivencia, la cuantificación de inmunoglobulinas y ciertos parámetros hematológicos (Anexo 1). Estos datos fueron utilizados para obtener los resultados que se describen a continuación.

5.1.1. Género

Como primera variante se tomó al género, es por ello que al analizar las muestras obtenidas del grupo de pacientes se encontraron que en su mayoría fueron hombres (*Figura 9*), con un 55,6% (35 de un n=63), mientras que en el género femenino fue de un 44,4% (28 de un n=63) respectivamente. Mientras que el género en los controles (*Figura 10*), predominó el género femenino con un 65% (26 de un n=40) y un 35% (14 de un n=40) en hombres.

Según Chesi y Bergsagel (2014, p. 35), el género es una variante importante dentro del mieloma múltiple, debido a que esta neoplasia tienen una mayor predisposición en hombres que en mujeres independientemente de la etnia. Presentándose con una tasa de incidencia de 8,1 y 6,1 en hombres y mujeres afrodescendientes respectivamente, de igual forma en personas blancas con una tasa de 4 y 2,7 en hombres y mujeres respectivamente (Estrada, 2012, p. 344). Este resultado concuerda con la mayor presencia del sexo masculino en los pacientes del presente estudio, tal como se muestra en la *Figura 9*

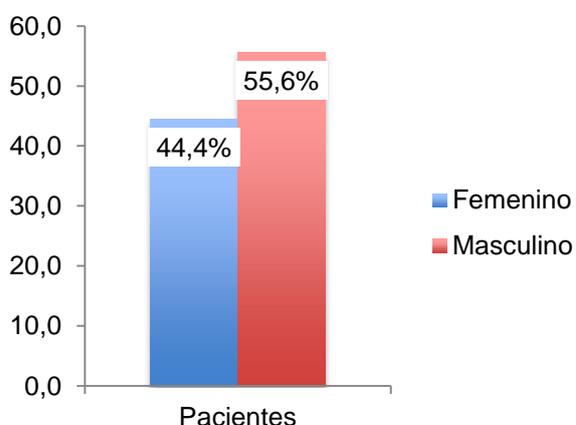


Figura 9. Distribución del género en el grupo de pacientes (n=63).

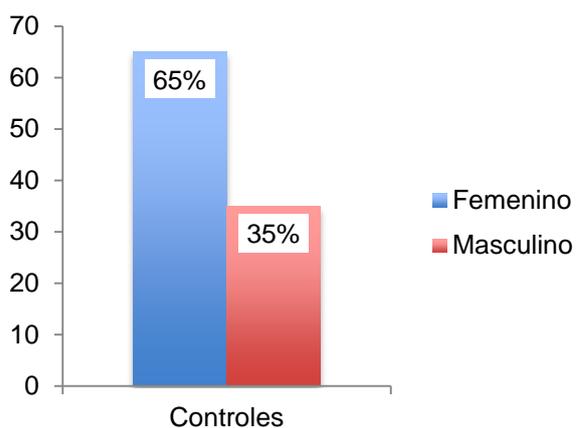


Figura 10. Distribución del género en el grupo control (n=40).

5.1.2. Edad

Para analizar la edad entre pacientes y controles se realizaron dos histogramas para cada población con 3 rangos, debido a que las edades de los pacientes y controles no tenían edades similares. Para los pacientes (*Figura 11*) los rangos obtenidos fueron <49, 49 – 66, >66 años respectivamente. Obteniéndose una mayor frecuencia (0,508) en el rango de 49 – 66 años. Lo que concuerda con la edad de aparición de la enfermedad que es a partir de los 60 años (Leone et al., 2013, p. 3). Mientras que la menor frecuencia fue 0,095 en el rango <49 años, resultado que podría deberse a que sólo un 15% de esta enfermedad se da antes de los 50 años, ya que es usualmente confundida con otras enfermedades hematológicas (García, Mateos y San Miguel, 2007, p.104).

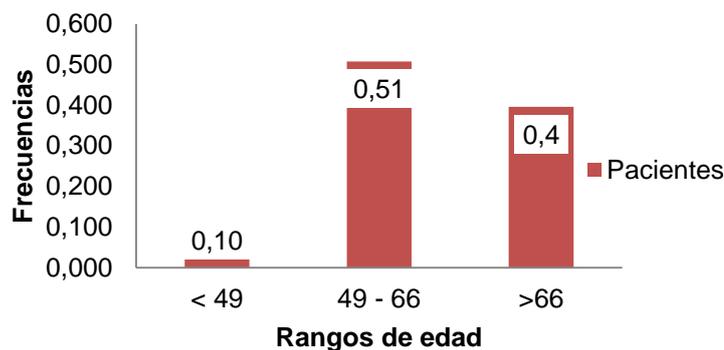


Figura 11. Histograma del grupo de pacientes.

En contraste con lo antes expuesto, en el grupo control (Figura 12), los 3 rangos de edad fueron <24, 35 – 58 y >58 años, obteniéndose la mayor frecuencia (0,51) en el rango >58 años, lo que concuerda para los controles con investigaciones anteriores (Leone et al., 2013, p. 3).

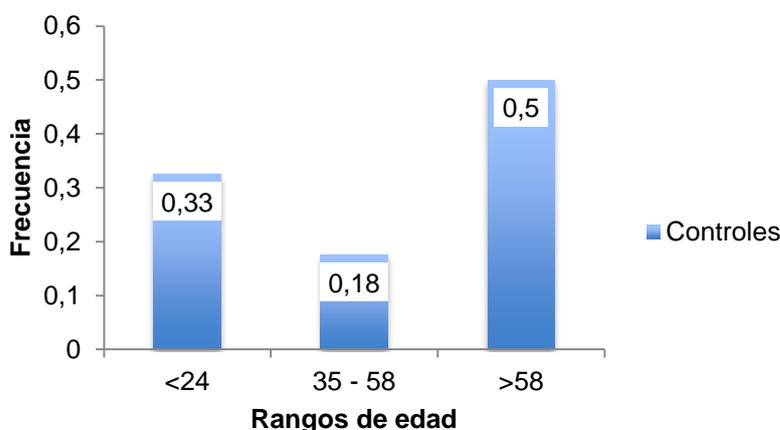


Figura 12. Histograma del grupo control.

5.1.3. Resultado citogenético

Como se ha mencionado anteriormente, el componente citogenético es importante en cuanto a evolución de la enfermedad. (Alvarado et al., 2015, p.p. 317-318). Por lo tanto, se realizó la clasificación citogenética del grupo de pacientes dependiendo del cariotipo descrito en las historias clínicas

(Figura 13), para ello se clasificaron en tres tipos que fueron: normal, no hiperdiploide e hiperdiploide.

Se obtuvo un 79% (50 de un n=63) en el cariotipo normal, 11% (7 de un n=63) y un 10 (6 de un n=63) en los cariotipos no hiperdiploides e hiperdiploides respectivamente (Figura 13). El cariotipo de los pacientes ayuda a determinar con mayor precisión el pronóstico de la enfermedad, ya que los casos no hiperdiploides tiende a tener un peor pronóstico, debido a ciertas alteraciones primarias que involucran oncogenes con *CCDN1*, *FGFR3*, los cuales cumplen roles fundamentales en el crecimiento celular y progresión tumoral (Menoni-Blanco y Da Silva-De Abreu, 2010, p. 15). En este caso los pacientes con un mal pronóstico corresponderían al 11% de los pacientes.

El cariotipo normal fue el que predominó en este estudio, esto puede deberse a que la mayoría de las muestras se analizaron mediante citogenética convencional, con esta técnica sólo identifica un 30% de las alteraciones genéticas. Además, sobre muestra de médula total y no sobre muestra separada situación descrita previamente en Ecuador como gran limitante en la obtención de resultados citogenéticos (Leone et al., 2013, p. 14). Es por ello que es importante realizar técnica FISH, ya que en el mieloma múltiple los casos no hiperdiploides representan el 60% (translocaciones), mientras que los hiperdiploides son el 40% (García, Mateos y San Miguel, 2007, p.107). Pese a no contar con los resultados de la técnica FISH de todas las muestras se evidenció que los casos no hiperdiploides predominan con respecto a los hiperdiploides (Figura 13).

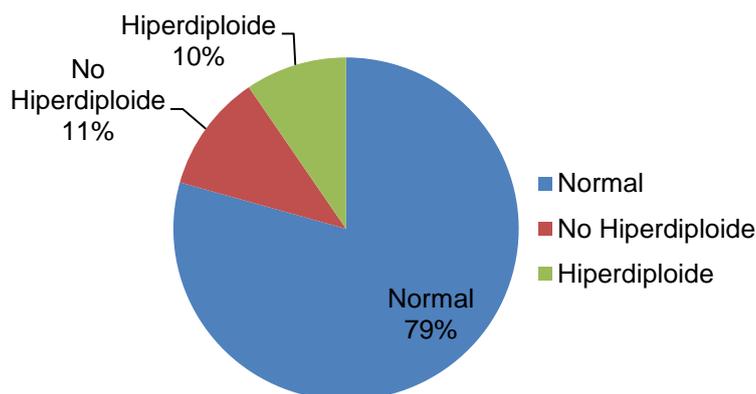


Figura 13. Clasificación citogenética del grupo de pacientes.

5.1.4. Estadificación de la enfermedad

Para determinar el estadio de la enfermedad, las muestras se clasificaron en los estadios I, II y III, de acuerdo a los sistemas de estadiaje Durie-Salmon y el Sistema de Estadificación Internacional (ISS) (*Figura 14*).

En la distribución según el sistema Durie-Salmon, se obtuvo un porcentaje de 74,58% en las muestras que se encuentra en el estadio I y sólo un 8,4% para muestras en el estadio III. Mientras que según el sistema internacional (ISS) existió un mayor porcentaje (67,8%), de las muestras en estadio II, pero de igual forma que se encontró en el anterior sistema, sólo se obtuvo un 5,08% en muestras en estadio III. Los resultados obtenidos no son los esperados, ya que según Leone et al. (2013, p. 3), en el Ecuador debería predominar el estadio III en los dos sistemas de estadificación (D&S – ISS), esto se debe a que no existe un diagnóstico temprano apropiado de la enfermedad. Una de las razones por las cuales en esta investigación exista pocos pacientes en estadio III, es por la recolección de muestras, ya que se hizo por conveniencia, las muestras fueron las que en ese momento disponían los hospitales y la mayoría fueron pacientes que ya estaban en tratamiento, lo cual pudo modificar los resultados obtenidos. Por otra parte puede deberse a que el sistema de salud del país a mejorado en cuanto al diagnóstico temprano de esta neoplasia y por

esta razón la mayoría de los pacientes se encuentran en tratamiento para los estadios I y II, pero además en la actualidad las personas tienen un mayor cuidado en cuanto a la prevención del cáncer en general, por lo cual hace que acudan a los hospitales a la menor sospecha de cáncer, esto permite diagnosticar con eficacia y eficiencia esta enfermedad.

A pesar de contar con el estadio de las muestras en los dos sistemas en la actualidad, el sistema que se utiliza con mayor frecuencia es el Sistema Internacional de Estadificación (ISS), ya que incorpora la cuantificación de la albúmina y de la beta-2-microglobulina, este método es más simple y efectivo para agrupar pacientes con un diagnóstico similar (Conte, Figueroa, Lois, Cabrera, León y García, 2008, p.p. 10-11). Debido a que el sistema ISS sólo se basa en dos parámetros clínicos, la mayoría de los pacientes al estar en tratamiento, se ubicaron en el estadio I. Mientras que hubieron más pacientes en el estadio II del sistema D&S, debido a que este sistema considera más datos de laboratorio y el diagnóstico es más acertado que con el sistema ISS.

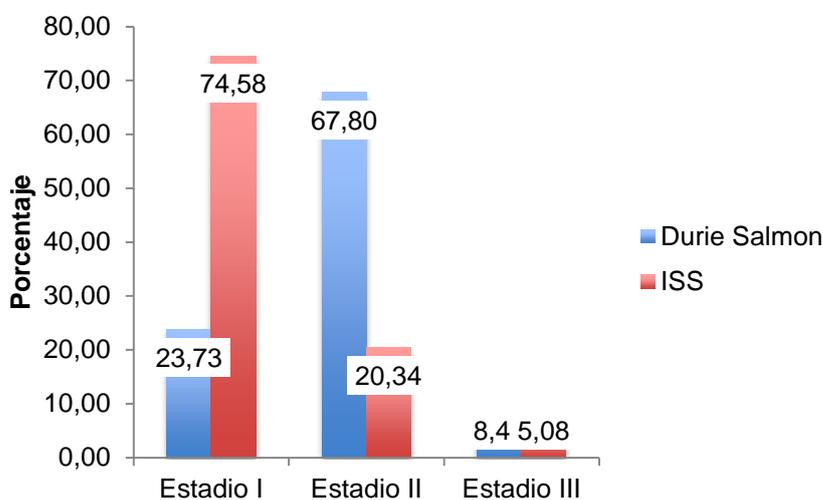


Figura 14. Distribución de estadio de las muestras con mieloma múltiple de acuerdo con los sistemas Durie-Salmon y el Sistema Internacional de Estadificación.

5.1.5. Tiempo de supervivencia

En cuanto al tiempo de sobrevida, se encontró que hay un mayor tiempo cuando el paciente se encuentra en el estadio I, tanto del Sistema Durie-Salmon y el sistema Internacional (Tabla 14), por otro lado existe una media igual en los el tiempo de sobrevida de los pacientes que se encuentran en el estadio III, independientemente del sistema se utilizó para su estadificación. De igual forma se realizaron las curva de sobrevida (*Figura 15*), para cada uno de los sistemas de estadificación dependiendo de los meses y la sobrevida que cada muestra posee. Se obtuvo que el mayor tiempo de sobrevida poseen los pacientes que se encuentran en el estadios I de ambos sistemas tanto en el (D&S – ISS). Mientras que el menor tiempo de sobrevida poseen los pacientes que se encuentran en el estadio III.

Los resultados descritos concuerdan con un estudio previo de Conte, Figueroa, Lois, Cabrera, León y García (2008, p. 8), el cual dice que el tiempo de vida de los pacientes que presentan MM es muy variable pero existe una mediana que va entre 2,5 a 3 años, esto se puede deber a el tipo de tratamiento que el paciente recibe, así como el pronóstico del paciente, es decir el estadio en el que se encuentre. Dentro de los estadios, existe una sobrevida mediana par el sistema Durie-Salmon de (I-67, II-26 y III-33), mientras que para el Sistema ISS (I-28, II-28 y III-25), comparando con los datos de las medianas obtenida sólo el estadio II independientemente del sistema que se utilizó tiene una media que se acerca a la descrita anteriormente.

Tabla 14.

Sobrevida según estadios Durie-Salmon y el sistema internacional

Sistema de Estadificación	Estadio	Media	Mediana	Rango
Durie-Salmon	I	48,9	16,5	5 – 155
	II	29,5	18	1 – 123
	III	20,5	20,5	11 – 30
ISS	I	35,9	16,5	1-155
	II	27,3	18	7 – 86

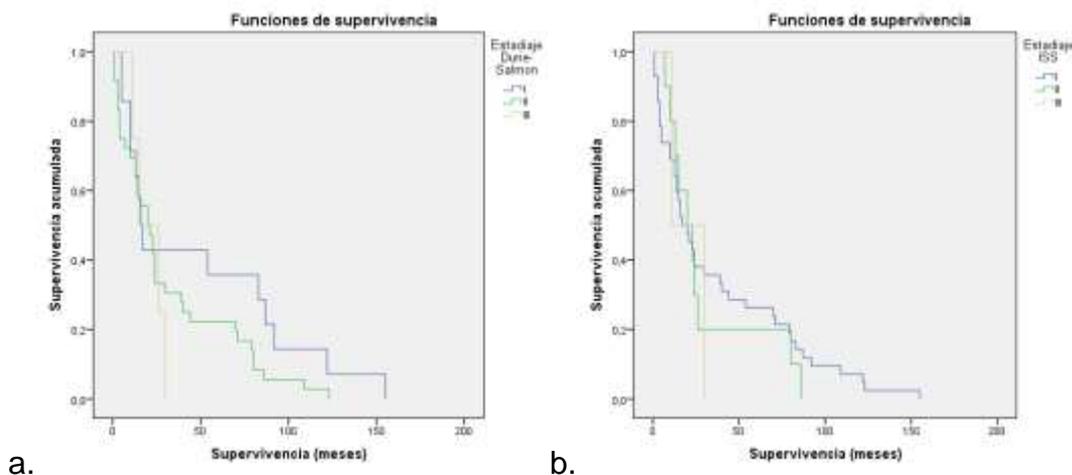


Figura 15. Curvas de supervivencia dependiendo del sistema de estadificación.

- a. Curvas de supervivencia según el sistema Durie-Salmon.
- b. Curvas de supervivencia según el Sistema de Estadificación Internacional (ISS).

5.1.6. Isotipo de mieloma

Para determinar el isotipo inmunológico, que se encontró en exceso en los pacientes se realizó una distribución para cada una de las inmunoglobulinas en 3 diferentes rangos que fueron: superior o en exceso, normal e inferior o déficit (Figura 16), estos rangos fueron establecidos de acuerdo con el rango normal en que se deberían encontrar las inmunoglobulinas (Tabla 15)

De acuerdo con Estrada (2012, p. 345) y Segovia, Duarte, Restrepo, Saavedra y Andrade (2008, p. 279), el isotipo que se encuentra en exceso, por lo general es el IgG con un 54-57%, seguido del IgA con un 21% y con el 18% están los isotipos IgM e IgE.

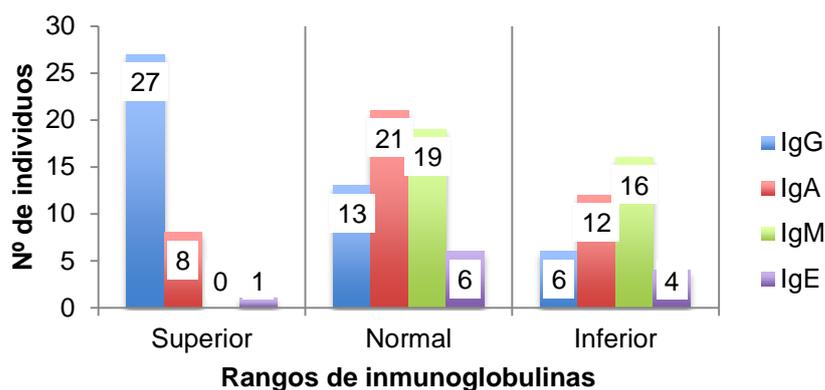


Figura 16. Distribución de cada isotipo (IgG, IgA, IgM e IgE) en los pacientes con mieloma múltiple dependiendo de 3 rangos: Superior, normal e inferior.

Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura descrita anteriormente, debido a que se encontró con un mayor número de individuos que presentaban el isotipo IgG en exceso, siguiendo del isotipo IgA y por último el isotipo IgE. Dentro del rango que se establece como normal se obtuvo un mayor número de individuos que presentaron el isotipo IgA, seguido del isotipo IgM, lo cual tendría sentido ya que los pacientes que presentan el isotipo IgM en exceso es menor o igual al 18% de todos los casos diagnosticados (Estrada, 2012, p. 345).

Tabla 15.

Isotipos de inmunoglobulinas encontradas en pacientes con mieloma múltiple.

Características (unidades)	Rango normal	Pacientes con MM		
		Media	Mediana	Rangos
IgG (mg/dL)	751 - 1560	2066,5	1584,835	628 - 7630,83
IgA (mg/dL)	82 - 453	296,5	123,5	1 - 3474
IgM (mg/dL)	46 - 304	75,7	62,5	1,7 - 271,67
IgE (ng/mL)	20,40 - 87,00	38,4	27	0,1 - 198

5.1.7. Parámetros hematológicos

El análisis de parámetros hematológicos (Tabla 16), se lo llevó a cabo debido a que dentro de las manifestaciones clínicas existen pacientes que presentan cuadros de hipercalcemia, anemia, trombocitopenia, insuficiencia renal e infecciones (Estrada, 2012, p. 345). Para lo cual, se tomó en cuenta los niveles de hemoglobina, leucocitos, plaquetas, linfocitos, plaquetas, urea, creatinina, calcio, albúmina, lactato deshidrogenasa (LDH), beta-2-microglobulina (B2M) y proteínas totales.

Tabla 16.

Parámetros hematológicos en pacientes con mieloma múltiple.

Características (unidades)	Rango normal	Pacientes diagnosticados MM		
		Media	Mediana	Rangos
Hemoglobina (g/dL)	14 - 18	14,2	13,11	8,06 - 17,24
Leucocitos (K/ μ L)	4,5 - 10	6,6	6,38	2,4925 - 13,81
Plaquetas	130.000- 400.000	249.962	238.026	82.06-989.600
Linfocitos (fracción)	1,1 - 3,2	2,3	1,70	0,42 - 10,5
Urea (mg/dL)	10 - 50	51,7	40,06	19,3 - 170
Creatinina (mg/dL)	0,5 - 1,4	1,4	0,94	0,35 - 21,28
Calcio (mg/dL)	8,1 - 11,8	7,7	8,50	3,75 - 14,3
Albumina (g/dL)	3,5 - 5,5	3,6	3,56	1,65 - 5,1
LDH (U/L)	240 - 480	369,5	322,00	174 - 1733
B2M (ng/mL)	604 - 2.286	3.129	2432,00	1297 - 12841
Proteínas Totales (g/dL)	6,6 - 8,7	7,1	6,88	4,4 - 11,6

Para determinar los parámetros se utilizó el rango normal, en cual deberían encontrarse. Así se estableció la media de cada uno de los parámetros, que se encontró en el grupo de pacientes. Obteniendo, que los pacientes con mieloma múltiple están dentro de los parámetros hematológicos y bioquímicos antes mencionados, pero en los parámetros: la urea y la B2M estuvieron en exceso. En cuanto a los niveles de urea, la media que se encontró en los pacientes con MM, fue de 51,7 mg/dL, cuando el rango normal es de 10- 50 g/dL, este parámetro está relacionado con el daño renal que puede generarse y por

consiguiente insuficiencia renal en pacientes con mieloma múltiple (García, Mateos y San Miguel, 2007, p.113), debido a esto es justificable el exceso de urea, ya que en el rango se encontraron pacientes con niveles de 170 mg/dL de urea.

De igual forma otro de los parámetros que se encontró en exceso fue la B2M con una media de 3.129 g/mL, cuando el rango normal es de 604 – 2.286 ng/mL, este parámetro se relaciona con la mortalidad temprana y es independiente de la función renal que tiene el paciente (Alvarado et al., 2015, p. 317; Greipp et al., 2005, p. 3412). Con esto podemos decir que los pacientes que se encontraron fuera del rango normal de la B2M van a tener un tiempo de vida menor al resto de pacientes.

5.2.Extracción de ADN genómico de pacientes y controles

Como se describió en el capítulo a apartado (4.2.1.), el ADN genómico se obtuvo a partir de muestras de médula ósea (grupo de pacientes) y sangre periférica (grupo control). Las muestras de los pacientes presentaron distintas concentraciones de ADN madre con un rango de 3,1 – 3.467,8 ng/μL, por lo cual se hicieron diluciones de 20ng/μL (Anexo 3). Para las muestras del grupo control, se contó ya con diluciones que se encontraban estandarizadas a una concentración de 10 ng/μL.

5.3.Determinación del Genotipo

5.3.1. Amplificación de los fragmentos de los genes *VEGF* y *EGFR*

Para la amplificación de los fragmentos de interés en el gen *VEGF*, se amplificaron 5 distintos fragmentos *VEGF* -2578C→A de 325 pb, *VEGF* -1498C→T de 190 pb, *VEGF* -1154 G→A de 225 pb, *VEGF* -634G→C de 304 pb y *VEGF* +936 C→T de 198 pb. Mientras que para los fragmentos del gen *EGFR* fueron el 55.017.893 G→A de 315 pb y el rs759171 A→C de 369 pb .

Posteriormente a la amplificación de los fragmentos, se comprobó por medio de una electroforesis convencional la correcta amplificación de los fragmentos así como el peso molecular de cada uno (Anexos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

5.4. Secuenciación tipo Sanger mediante electroforesis capilar

Para el análisis cada una de las variantes encontradas se utilizó el software descrito en el apartado de metodología (4.2.7.4), el procedimiento se realizó para las muestras de los pacientes con mieloma múltiple y muestras controles como se describe a continuación para cada uno de los polimorfismos encontrados. Los electroferogramas que se presentaran a continuación para cada uno de los polimorfismos estudiados, tienen cada base nitrogenada de diferente color como se mencionó e el apartado (4.2.7.4) de la metodología.

5.4.1. Análisis genético de la variante *VEGF* -2578C→A

En el análisis de esta variante *VEGF* -2578C→A (Figura 17), se encontraron 3 genotipos, los cuales fueron: homocigoto dominante C/C (primer cuadrante), heterocigoto C/A (segundo cuadrante) y homocigoto recesivo A/A (tercer cuadrante).

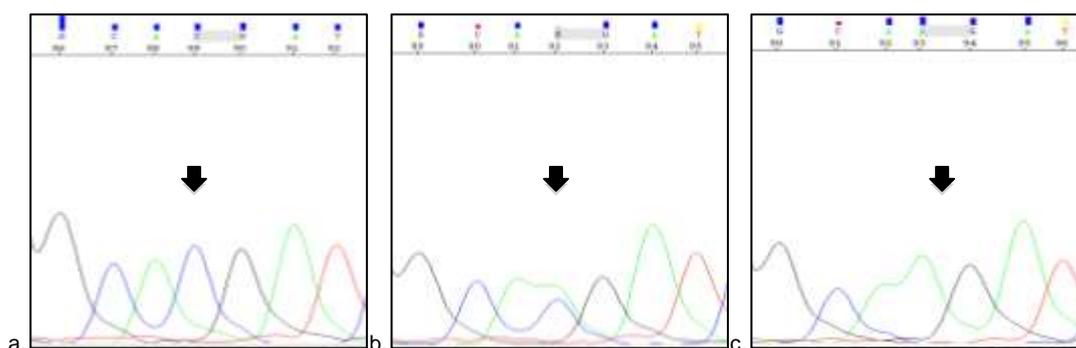


Figura 17. Identificación del polimorfismo *VEGF* -2578C→A, mediante secuenciación capilar.

- Secuencia para homocigoto dominante C/C
- Secuencia para heterocigoto C/A
- Secuencia para homocigoto recesivo A/A

En la *Figura 18*, se puede observar la distribución porcentual de las frecuencias genotípicas encontradas de la variante *VEGF -2578C→A*, donde en los pacientes predominó el genotipo homocigoto dominante C/C con un 63,5%, seguido del heterocigoto C/A con un 27% y por último el genotipo homocigoto recesivo A/A con un 9,5 %. Mientras que en los controles el genotipo que predominó fue el Heterocigoto (C/A) con 50% seguido de un 47,5% del genotipo homocigoto dominante C/C y por último al igual en que en la distribución de paciente estuvo el genotipo homocigoto recesivo (A/A) con un 2,5%. El genotipo A/A tuvo la menor frecuencia en la población ecuatoriana de estudio, esto se puede relacionar de acuerdo a Martínez-Fierro et al. (2013, p. 239); Sa-nguanraksa y O-charoenrat (2012, p.14850) con la progresión del cáncer directamente. Se ha demostrado en la población mexicana con frecuencias del genotipo A/A del 11% en pacientes y 12% en controles, una asociación significativa de este polimorfismo con la progresión del cáncer de próstata y el cáncer de pulmón. Los valores obtenidos por tanto sugieren una relación directa de estos SNPs con el cáncer, pudiéndose incluir al mieloma múltiple dentro de estas asociaciones.

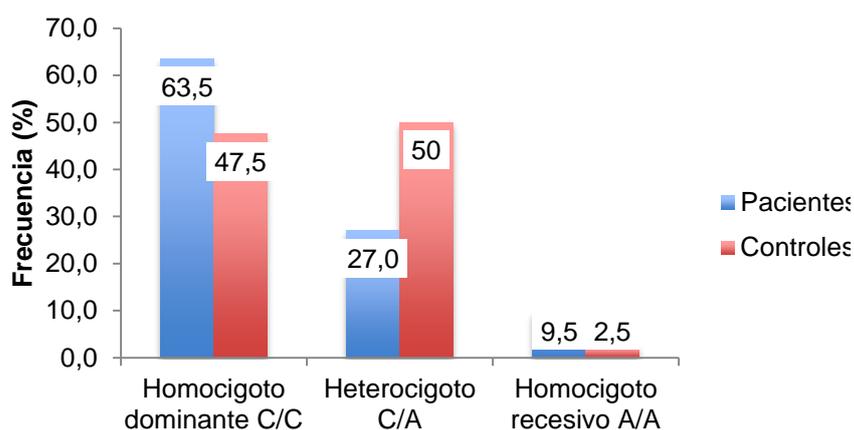


Figura 18. Distribución porcentual (*VEGF -2578C→A*) de los genotipos encontrado en paciente y controles

5.4.2. Análisis genético de la variante *VEGF* -1498C→T

De igual forma se analizaron los genotipos para la variante *VEGF* -1498C→T, encontrándose con los genotipos: homocigoto dominante C/C, heterocigoto C/T y el homocigoto recesivo T/T como se observa en la *Figura 19*.

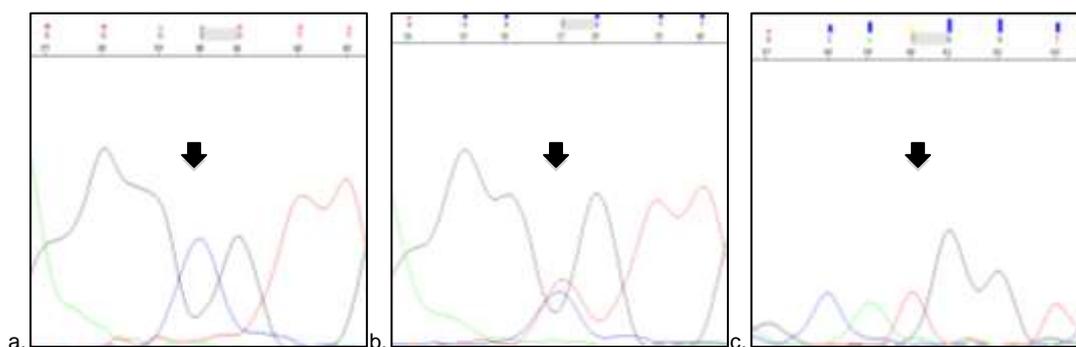


Figura 19. Identificación del polimorfismo *VEGF* -1498C→T, mediante secuenciación capilar.

- a. Secuencia para homocigoto dominante C/C
- b. Secuencia para heterocigoto C/T
- c. Secuencia para homocigoto recesivo T/T

Los 3 genotipos fueron encontrados tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control, con lo cual se realizaron las distribuciones de los mismo en cada grupo (*Figura 20*). Obteniendo así una predominancia en los genotipos heterocigoto C/T en el grupo control con un 60% y 39,7% en los pacientes; a su vez el genotipo homocigoto recesivo T/T se observó en un 50,8% en pacientes y en un 35% en controles; mientras que el genotipo homocigoto dominante C/C tuvo una menor distribución con un 9,5 y 5% en los grupos pacientes y controles, respectivamente. La distribución obtenida de este polimorfismo fue similar a la descrita en estudios de cáncer colorrectal en la población japonesa (Yamamori et al., 2008, p.p.82-83; así como en cáncer gástrico (Guan et al., 2009, p. 3).

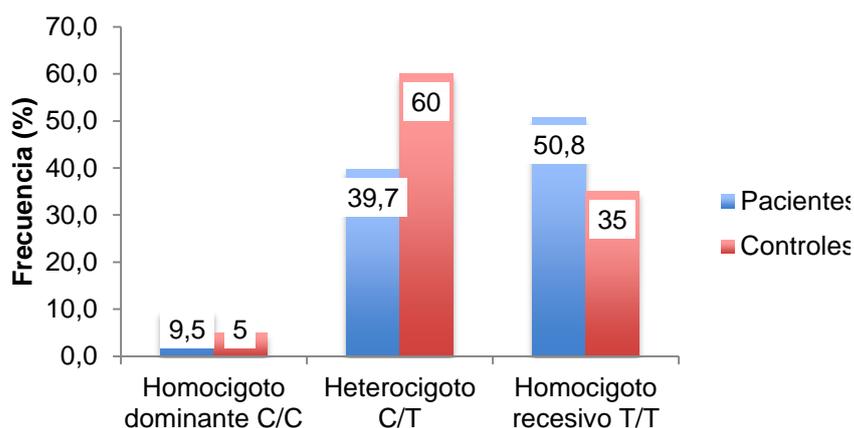


Figura 20. Distribución porcentual (*VEGF* -1498C→T) de los genotipos encontrado en paciente y controles

5.4.3. Análisis genético de la variante *VEGF* -1154G→A

Para esta variante, los electroferogramas que se obtuvieron se mostraron la presencia de los 3 genotipos como son: homocigoto dominante G/G, heterocigoto G/A y el homocigoto recesivo A/A como se observa en la Figura 21, los cuales se encontraron en el grupo de pacientes y control.

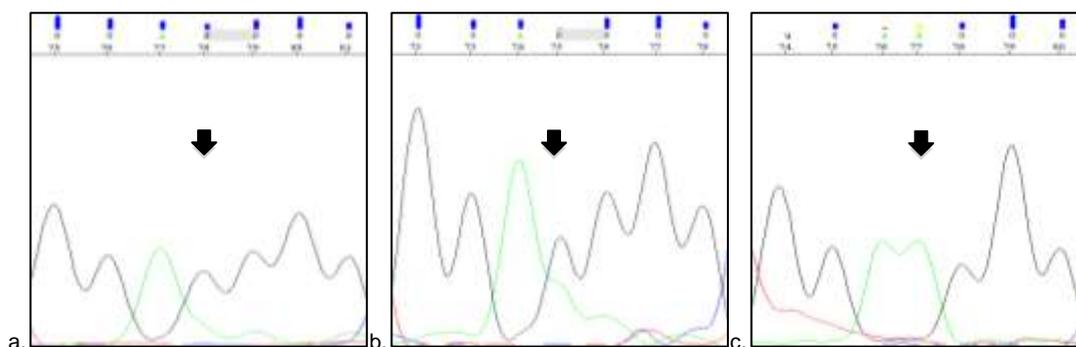


Figura 21. Identificación del polimorfismos *VEGF* -1154G→A, mediante secuenciación capilar.

- Secuencia para homocigoto dominante G/G
- Secuencia para heterocigoto G/A
- Secuencia para homocigoto recesivo A/A

En la distribución porcentual de los genotipos (Figura 22), se observó que en los pacientes existió un mayor porcentaje de homocigotos dominantes G/G (60,3%), mientras que los controles presentaron una mayor predominancia del genotipo homocigoto recesivo A/A (70%); a su vez que, para el genotipo

heterocigoto G/A, ambos grupos presentaron un 6,3 y 10% en pacientes y controles, respectivamente. Los datos obtenidos en la distribución concuerdan con investigaciones en carcinoma basocelular donde el genotipo G/G en los pacientes tuvo una mayor frecuencia relacionándose con el riesgo de padecer este tipo de carcinoma, y el genotipo A/A con un efecto protector de la enfermedad (Sobjanek et al., 2014, p.p. 542-543).

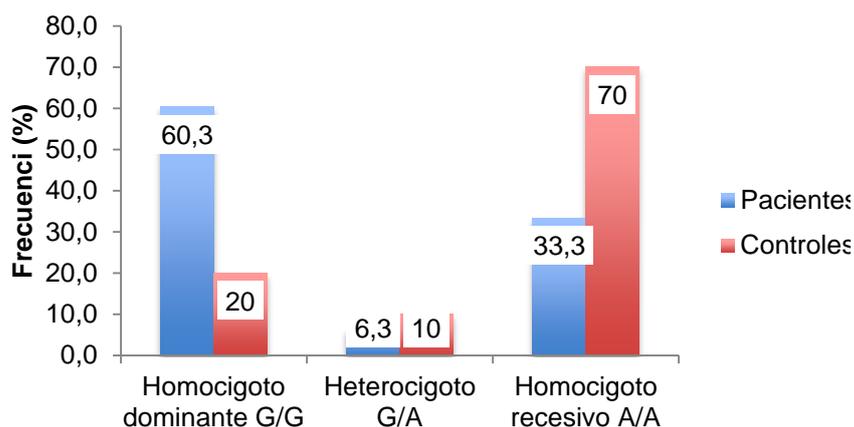


Figura 22. Distribución porcentual (*VEGF* -1154G→A) de los genotipos encontrado en paciente y controles

5.4.4. Análisis genético de la variante *VEGF* -634G→C

De igual forma en la variante *VEGF* -634G→C se contó con los 3 genotipos tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control que fueron: homocigoto dominante G/G, heterocigoto G/C y el homocigoto recesivo C/C, como se observa en la *Figura 23*.

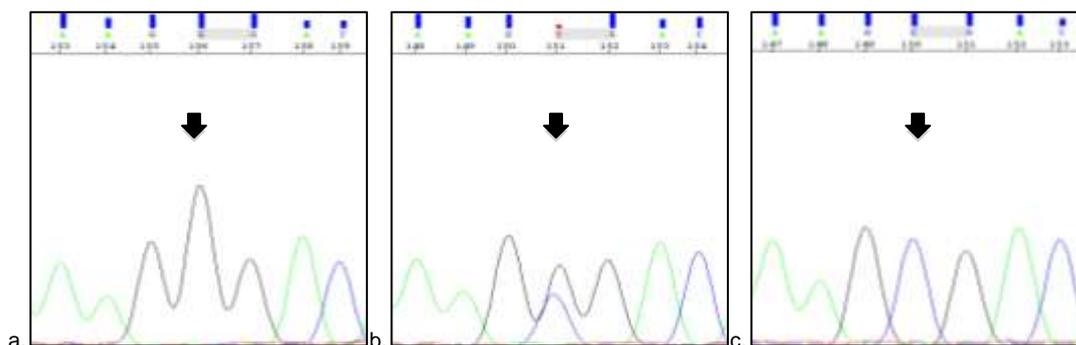


Figura 23. Identificación del polimorfismo *VEGF* -634G→C, mediante secuenciación capilar.

- a. Secuencia para homocigoto dominante G/G
- b. Secuencia para heterocigoto G/C
- c. Secuencia para homocigoto recesivo C/C

Las distribuciones porcentuales de los genotipos encontrados para este polimorfismo fueron similares (*Figura 24*), tanto para el grupo de pacientes como para el grupo control, donde se obtuvo el genotipo homocigoto dominante G/G con un 31,7 y 32,5% para cada grupo, respectivamente. Mientras que el genotipo predominante en ambas poblaciones fue el heterocigoto G/C con un 49,2% en pacientes y un 65% en controles. Por otro lado, el genotipo homocigoto recesivo C/C fue el que menor porcentaje tuvo con un 19% en pacientes y un 2,5% en controles. Este polimorfismo no tiene todavía un rol funcional, pero en estudios previos se ha asociado el genotipo G/G con una mayor expresión del gen *VEGF*, pero no se han encontrado asociaciones significativas entre diferentes cánceres como el de mama, ovario y colorrectal (Watson et al., 2000, 1233). Estas distribuciones concuerdan con los resultados obtenidos por (Borsarelli, Lourenco, Oliveira, Souza y Passos, en el 2014, en la población de Brasil con mieloma múltiple.

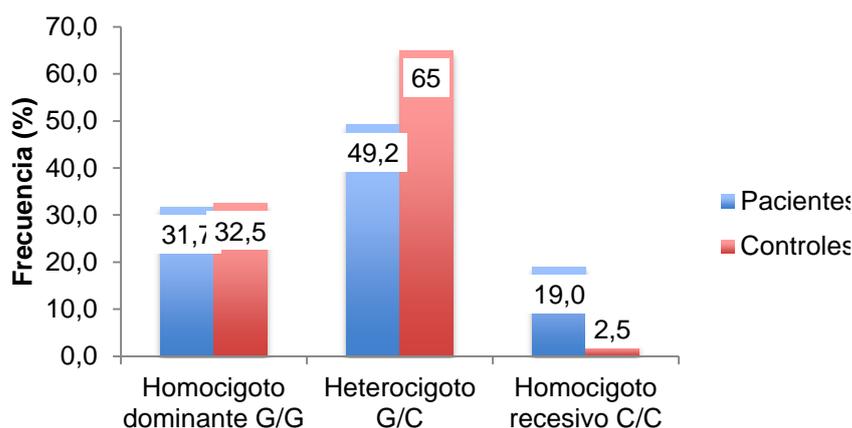


Figura 24. Distribución porcentual (*VEGF* -634G→C) de los genotipos encontrado en paciente y controles

5.4.5. Análisis genético de la variante *VEGF* +936C→T

Para finalizar con las variantes del gen *VEGF*, se analizó el polimorfismo *VEGF* +936C→T, al igual que las anteriores variantes, se encontraron los 3 genotipos: homocigoto dominante C/C, heterocigoto C/T y el homocigoto recesivo T/T distribuidos en ambos grupos de estudio (afecto y control), como se observa en los electroferogramas de la Figura 25.

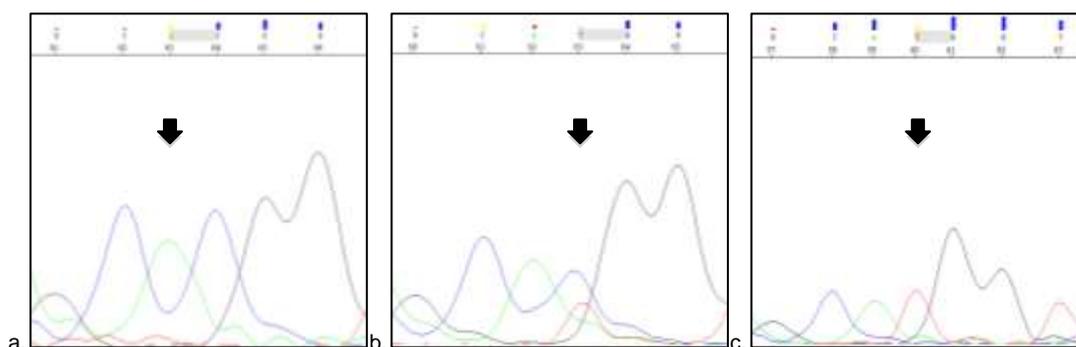


Figura 25. Identificación del polimorfismos *VEGF* +936C→T, mediante secuenciación capilar.

- Secuencia para homocigoto dominante C/C
- Secuencia para heterocigoto C/T
- Secuencia para homocigoto recesivo T/T

La distribución porcentual de los genotipos en el grupo de pacientes y control, tuvieron la siguiente tendencia como se puede ver en la Figura 26, en la cual

predominó en el grupo de pacientes el genotipo heterocigoto C/T con un 49,2%, seguido del genotipo C/C (homocigoto dominante) con 39,7% y en un menor porcentaje el genotipo homocigoto recesivo T/T con 11,1%, mientras que para el grupo control predominó con un 65% el genotipo dominante CC, seguido de un 30% con el genotipo heterocigoto C/T y por último con un 5% del genotipo T/T.

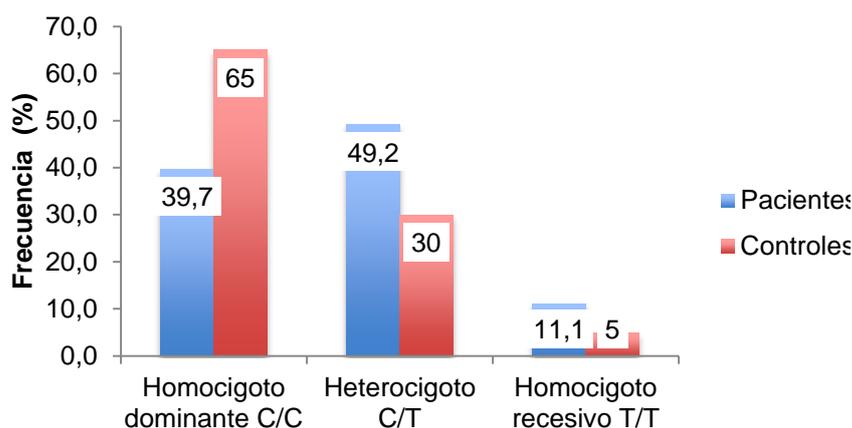


Figura 26. Distribución porcentual (*VEGF* +936C→T) de los genotipos encontrados en paciente y controles

5.4.6. Análisis genético de la variante *EGFR*55.017,893G→A

En cuanto al análisis de las variantes del gen *EGFR*, con el primer par de cebadores se identificó una variante que no se encuentra reportada en las bases de datos, para la cual sólo se encontraron 2 genotipos en el grupo de paciente: homocigoto dominante G/G y heterocigoto G/A (Figura 27). Mientras que en el grupo control todos presentaron el genotipo homocigoto dominante G/G.

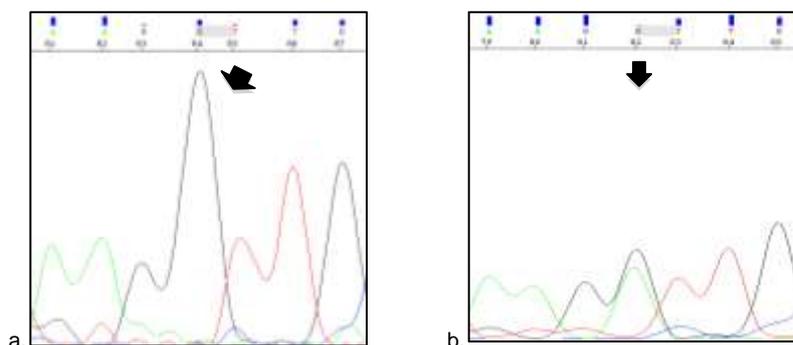


Figura 27. Identificación del polimorfismo *EGFR* 55.017.893G→A, mediante secuenciación capilar.

- Secuencia para homocigoto dominante G/G
- Secuencia para heterocigoto G/A

Al realizar la distribución en cuanto a porcentajes (Figura 28), se obtuvo que la muestra que evidenció el genotipo heterocigoto G/A representó el 1,6%, mientras que el 98,4% perteneció al genotipo homocigoto dominante G/G. Por otro lado, se identificó que el 100% de la distribución en el grupo control fue para el genotipo homocigoto dominante G/G. Debido a que es una mutación nueva no se ha encontrado información que respalde las frecuencias encontradas en la población de estudio.

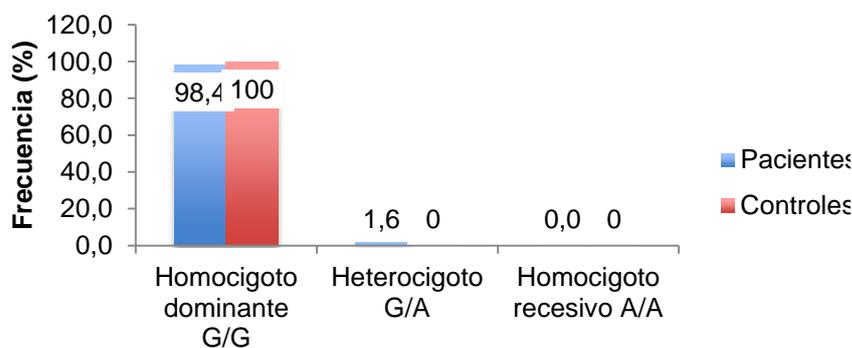


Figura 28. Distribución porcentual (*EGFR* 55.017.893G→A) de los genotipos encontrados en paciente y controles

5.4.7. Análisis genético de la variante *EGFR*rs759171

Por último se analizaron los electroferogramas para determinar la presencia del polimorfismo rs759171, el cual se encontró en ambas poblaciones (afecto y

control), presentando 3 genotipos que son: el homocigoto dominante A/A, heterocigoto A/C y el homocigoto recesivo C/C (*Figura 29*).

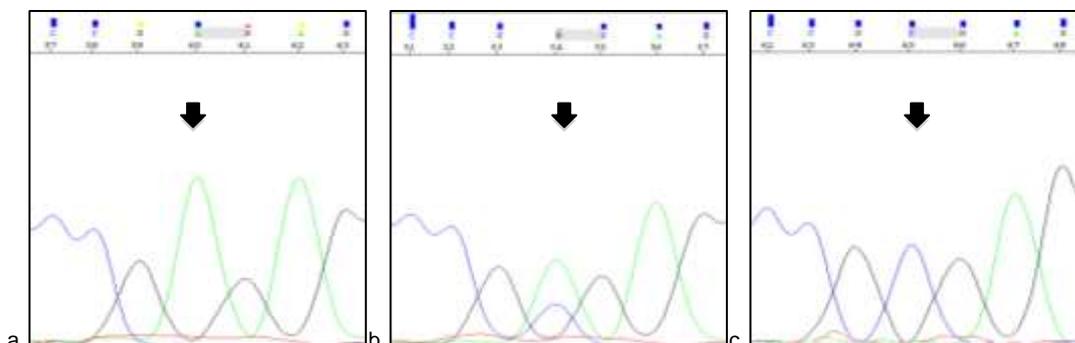


Figura 29. Identificación del polimorfismo *EGFR* rs759171A→C, mediante secuenciación capilar.

- a. Secuencia para homocigoto dominante A/A
- b. Secuencia para heterocigoto A/C
- c. Secuencia para homocigoto recesivo C/C

Para este polimorfismo (rs759171) la distribución de los genotipos (*Figura 30*) fue similar en ambos grupos, puesto que el genotipo con mayor frecuencia porcentual fue homocigoto recesivo C/C con un 60% en controles y un 46% en el grupo de pacientes, seguido de un 25 y 39,7% en controles y pacientes respectivamente que tuvieron el genotipo A/C (heterocigoto); por último se obtuvo un 15 y 14,3% para el homocigoto dominante A/A en controles y pacientes, respectivamente. Las frecuencias encontradas en estos polimorfismos son similares a las descritas en el cáncer colorrectal donde predomina el genotipo C/C, y las bajas frecuencias obtenidas en el genotipo A/A estarían relacionadas con el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Poole et al., 2011, p. 31).

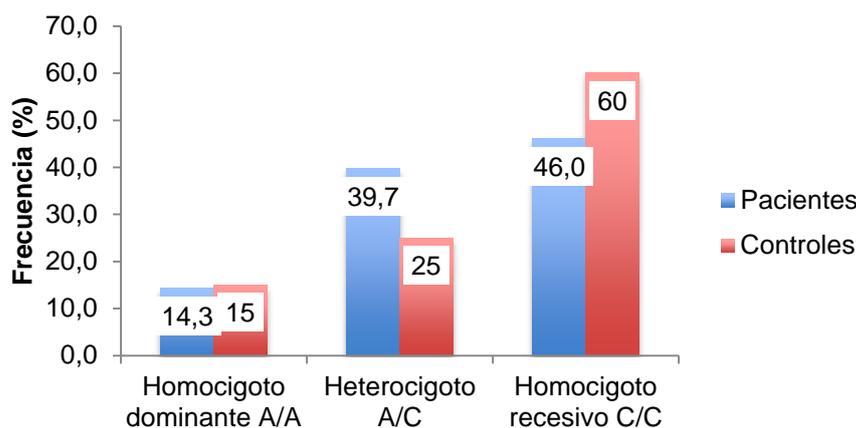


Figura 30. Distribución porcentual (*EGFR* rs759171 A→C) de los genotipos encontrados en paciente y controles

5.5. Frecuencias genotípicas en la población y asociación de las mismas con los grupos paciente y control

Se identificaron las frecuencias genotípicas de todos los polimorfismos en las poblaciones de pacientes con mieloma múltiple y controles, se procedió a determinar mediante la prueba exacta de Fisher el valor p para cada uno de los SNPs, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre las poblaciones de estudio (Tabla 17).

Para el polimorfismo *VEGF* -2578 C→A se encontró una diferencia significativa ($p=0,045$). En estudios de asociación de este SNP en pacientes y controles, en cáncer de próstata (Martínez-Fierro et al., 2013, p. 239) y en cáncer de pulmón (Sa-nguanraksa y O-charoenrat (2012, p.14850), también se encontraron diferencias significativas, relacionándolo con la progresión de la enfermedad. Con lo antes mencionado, podríamos suponer que la diferencia significativa encontrada de este polimorfismo en este estudio se relacionaría con la progresión del mieloma múltiple en los pacientes.

Por otro lado, para el polimorfismo *VEGF* -1498 C→T, no se encontró diferencia significativa ($p=0,146$), en estudios anteriores de asociación de este

SNP en cáncer colorrectal en la población japonesa (Yamamori et al., 2008, p.p.82-83 y cáncer gástrico (Guan et al., 2009, p. 3), tampoco se encontraron asociaciones significativas, al igual que en este estudio, por lo que podríamos suponer que esta mutación es propia de la población.

Para el polimorfismo-1154 G→A se encontró diferencia significativa ($p=0,00163$). Como se ha mencionado anteriormente, el polimorfismo-1154 G→A se lo ha relacionado directamente con la expresión del gen *VEGF* en distintos tipos de cánceres, incluido el mieloma múltiple en la población de Brasil, en el cual si hubo diferencia significativa entre pacientes y controles relacionándolo con el pronóstico de esta neoplasia (Borsarelli, Lourenco, Oliveira, Souza y Passos, 2014, p.1368), al igual que en esta investigación, lo cual nos indica que este SNP podría estar relacionado con la sobreexpresión del gen *VEGF* y el pronóstico de la enfermedad en la población ecuatoriana.

Para el polimorfismo *VEGF* -634 G→C se encontró una diferencia significativa ($p=0,04$), al igual que en investigaciones anteriores en cáncer de pulmón y mieloma múltiple, pero todavía se desconoce el rol que cumple este polimorfismo individualmente (Borsarelli, Lourenco, Oliveira, Souza y Passos, 2014, p.1368), con lo cual podríamos considerar que este polimorfismo está asociado a la población ecuatoriana con mieloma múltiple al igual que la de Brasil.

Además, para el polimorfismo *VEGF* +936C→T, no se encontró una asociación significativa ($p=0,05$) entre los pacientes y controles, pero en estudios en cáncer de pulmón, colorrectal y de mama si se han encontrado significancia (Krippel et al., 2003, p. 468; Luo et al, 2013, p. 2436). Con lo antes citado podríamos considerar que a pesar de presentar frecuencias similares con otros tipos de cánceres, este polimorfismo no está asociado al mieloma múltiple.

Finalmente, para los polimorfismos del gen *EGFR* (55017893G→A y rs759171A→C), no se encontraron diferencias significativas (Tabla 17). En

investigaciones previas acerca del polimorfismo rs759171 A→C en el cáncer de pulmón (Choi et al., 2007, p. 3), se observó que no existió diferencia significativa entre pacientes y controles, al igual que en este estudio. Por lo cual podríamos decir, que esta mutación es propia de la población y su presencia no está relacionada con la expresión del gen *EGFR* en pacientes con mieloma múltiple.

Tabla 17.

Relación entre las frecuencias genotípicas entre el grupo de pacientes y el grupo control, usando la prueba exacta de Fisher.

SNP	GENOTIPOS	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS		VALOR P
		CASOS	CONTROL	
VEGF -2578 C→A rs699947	C/C	0,63	0,48	0,045
	C/A	0,27	0,50	
	A/A	0,10	0,03	
VEGF -1498 C→T rs833061	C/C	0,10	0,05	0,146
	C/T	0,40	0,60	
	T/T	0,51	0,35	
VEGF -1154 G→A rs1570360	G/G	0,60	0,20	0,00163
	G/A	0,06	0,10	
	A/A	0,33	0,70	
VEGF -634 G→C rs2010963	G/G	0,32	0,33	0,04
	G/C	0,49	0,65	
	C/C	0,19	0,03	
VEGF +936 C→T rs3025039	C/C	0,40	0,65	0,05
	C/T	0,49	0,30	
	T/T	0,11	0,05	
EGFR PROM1 G→A 55017893	G/G	0,98	1,00	0,61
	G/A	0,02	0,00	
	A/A	0,00	0,00	
EGFR PROM2 A→C rs759171	A/A	0,14	0,15	0,29
	A/C	0,40	0,25	
	C/C	0,46	0,60	

5.6. Determinación de haplotipos

La importancia en cuanto al estudio de haplotipos radica en que la variación poblacional está intrínsecamente relacionada con la presencia de haplotipos, además que estadísticamente la generación de haplotipos es mejor en cuanto a la correlación de los datos, ya que se reduce la dimensión de los datos que se van a analizar (Clark, 2004, p. 321). Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, la construcción de los haplotipos se realizó sólo para el gen *VEGF* que se encuentra en el cromosoma 6.

En estudios previos se determinaron haplotipos para este gen pero sólo considerando los polimorfismos -2578 C→A, -1157 G→A, -604 T→C y -634 G→C (Borsarelli, Lourenco, Oliveira, Souza y Passos, 2014, p. 1365). Por esta razón se determinaron nuevos haplotipos, para ello se consideraron los 5 polimorfismos estudiados del gen *VEGF*, se tomó en cuenta el siguiente orden: *VEGF* -2578C→A, *VEGF* -1498C→T, *VEGF* -1154 G→A, *VEGF* -634G→C y *VEGF* +936 C→T, cada polimorfismo tuvo 2 variantes alélicas, como resultado de estas se obtuvo un total de 50 combinaciones, de las cuales los haplotipos encontrados en la población de pacientes fueron los siguientes: CCCAG, CCGAG, CCGCG, CTCCG, CTGCG.

5.7. Análisis estadístico

5.7.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE)

Para determinar si los polimorfismos estudiados se encontraron en equilibrio, se realizó la prueba de Hardy-Weinberg para cada uno de ellos (Tabla 18). Como se sabe el equilibrio de Hardy-Weinberg, establece que una población se mantiene en equilibrio cuando sus frecuencias genotípicas se mantienen constantes en una población con matrimonios al azar (panmixia) y las cuales van a heredarse de generación en generación, en ausencia de factores que alteran este equilibrio (Paz y Miño y López, 2014, p. 49). Por esta razón, se observó que la mayoría de los polimorfismos se encuentran en equilibrio

(*VEGF* -2578C→A, -1498C→T, -634G→C, +936C→T y el *EGFR* 55.017.89 G→A); ya que su valor p en la población es mayor a 0,05, debido a que no existen factores que influyen sobre este equilibrio. Sin embargo, los polimorfismos *VEGF* -1154 G→A y el *EGFR* rs759171 A→C, no se encontraron en equilibrio, debido a que el valor p es menor a 0,05. El desequilibrio presente en estos polimorfismos se puede deber a factores como la deriva génica, flujo de genes, migración, mutaciones entre otras haciendo que herencia de los genes y las frecuencias genotípicas ya no sean al azar (Wigginton, Cutler, Abecasis, 2005, p. 887). Con esto, podemos decir que estos polimorfismos no se encuentran en equilibrio por factores desconocidos pero probablemente sea debido a mutaciones.

Tabla 18.

Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de todos los polimorfismos, usando la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg.

SNP	GENO TIPOS	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS			ALEL O	FRECUENCIAS ALÉLICAS			HWEV alor p
		Casos	Control	Total		Casos	Control	Total	
<i>VEGF</i> -2578 C→A rs 699947	C/C	0,6	0,5	0,6	C	0,7	1,02	0,89	0,716
	C/A	0,3	0,5	0,4					
	A/A	0,1	0,0	0,1	A	0,2	0,48	0,36	
<i>VEGF</i> -1498 C→T rs833061	C/C	0,1	0,1	0,1	C	0,3	0,59	0,44	0,304
	C/T	0,4	0,6	0,5					
	T/T	0,5	0,4	0,4	T	0,7	1,01	0,86	
<i>VEGF</i> -1154 G→A rs1570360	G/G	0,6	0,2	0,4	G	0,6	0,68	0,66	0,000
	G/A	0,1	0,1	0,1					
	A/A	0,3	0,7	0,5	A	0,4	0,42	0,39	
<i>VEGF</i> -634 G→C rs2010963	G/G	0,3	0,3	0,3	G	0,6	0,89	0,73	0,128
	G/C	0,5	0,7	0,6					
	C/C	0,2	0,0	0,1	C	0,4	0,76	0,60	
<i>VEGF</i> +936 C→T rs3025039	C/C	0,4	0,7	0,5	C	0,6	0,79	0,72	0,988
	C/T	0,5	0,3	0,4					
	T/T	0,1	0,1	0,1	T	0,4	0,51	0,43	

<i>EGFR</i> 55.017.893 G→A	G/G	1,0	1,0	1,0	G	0,9	1,00	1,00	0,961
	G/A	0,0	0,0	0,0					
	A/A	0,0	0,0	0,0	A	0,01	0,00	0,00	
<i>EGFR</i> rs759171 A →C	A/A	0,1	0,2	0,1	A	0,3	0,28	0,31	0,030
	A/C	0,4	0,3	0,3					
	C/C	0,5	0,6	0,5	C	0,7	0,73	0,69	

5.7.2. Prueba de Odds-ratio entre el grupo de pacientes y controles

La prueba estadística de Odds-Ratio se realizó para todos los polimorfismos estudiados, a excepción de la variante *EGFR* 55.017.893G→A como se explicó en metodología. Cabe recalcar la importancia de describir un nuevo polimorfismo en la población ecuatoriana. Como se puede observar en la Tabla 19, para cada variante se detalló el riesgo dependiendo del genotipo, es así como se encontró valores significativos ($p < 0,05$) en los siguientes polimorfismos:

Para el *VEGF* -2578 C→A se encontró al genotipo C/A con un OR= 0,40, (0,17-0,94), y p de 0,036, lo que nos indica que este genotipo se relaciona con un menor riesgo de padecer mieloma múltiple específicamente. Estudios en diferentes cánceres que ha identificado que este genotipo C/A confiere un mayor riesgo de padecer cáncer de tiroides (Hsiao et al., 2007, p.p.268-269), mientras que en cánceres como el de mama y el de próstata el genotipo con riesgo de presentar la enfermedad es el A/A (Martínez-Fierro et al., 2013, p. 239; Sa-nguanraksa y O-charoenrat, 2012, p.14850). Esto podría ser un indicativo de que el genotipo C/A en la población ecuatoriana confiere un efecto protector ante el mieloma múltiple.

De igual forma, para el polimorfismo *VEGF* -1154 G→A se encontró que el genotipo A/A con un OR= 0,16, (0,06-0,40) y un valor de $p=0,0001$, que a su vez presentó un valor de sumatoria de los genotipos heterocigoto y homocigoto recesivo (G/A+A/A) de OR= 0,16, (0,06-0,41) y $p=0,0001$, que el alelo A se encuentra asociado con un menor riesgo de desarrollar mieloma múltiple, es decir que confiere un efecto protector. Estos resultados también se

han descrito en un estudio sobre degeneración macular en la población india, dando como resultado un mayor riesgo de esta enfermedad en el genotipo heterocigoto y la sumatoria de los heterocigotos y homocigotos recesivos de este polimorfismo (Gupta et al., 2016, p.p. 246-251). En otros tipos de cánceres como el de mama y el colorrectal los genotipos A/G es el que le confiere un mejor pronóstico de la enfermedad (Sa-nguanraksa y O-charoenrat, 2012, p. 14843; Smith, Bateman, Fussell y Howell, 2004, 167).

Por último para la variante *VEGF* +936> C/T se encontró que el genotipo heterocigoto (C/T) tenía un OR=2,68, (1,13-6,37), $p=0,025$ y la sumatoria de los genotipos heterocigoto y homocigoto recesivo (C/T+T/T) tenía un OR=2,82, (1,24-6,43), $p=0,013$; lo cual demuestra la asociación con un riesgo elevado a desarrollar mieloma múltiple. No existen estudios que relaciones a este polimorfismo con el mieloma múltiple, sin embargo, otros estudios en cáncer de mama lo han asociado a un riesgo menor de presentar esa enfermedad (Rodrigues et al., 2012, p.769; Jakubowska et al., 2008, p. 71).

Tabla 19.

Asociación entre las variantes estudiadas y el riesgo genotípico para desarrollar mieloma múltiple en casos y controles, usando la prueba de Odds ratio.

SNP	GENOTIPO CASOS (n=63)		CONTROL (n=40)	ODDS RATIO	IC (95%)	VALOR P
<i>VEGF</i> -2578 C→A rs699947	C/C	40	19	1		
	C/A	17	20	0,40	0,17 - 0,94	0,036
	A/A	6	1	2,85	0,32 - 25,37	0,348
	C/A+A/A	23	21	0,52	0,23 - 1,16	0,116
<i>VEGF</i> -1498> C/T rs833061	C/C	6	2	1		
	C/T	25	24	0,32	0,06 - 1,89	0,221
	T/T	32	14	0,76	0,14 - 4,25	0,756
	C/T+T/T	57	38	0,50	0,09 - 2,61	0,411
<i>VEGF</i> -1154 G→A rs1570360	G/G	38	8	1		
	G/A	4	4	0,21	0,04 - 1,02	0,053
	A/A	21	28	0,16	0,06 - 0,40	0,0001
	G/A+A/A	25	32	0,16	0,06 - 0,41	0,0001

VEGF -634 G→C rs2010963	G/G	20	13	1		
	G/C	31	26	0,78	0,32 - 1,85	0,566
	C/C	12	1	7,80	0,90 - 67,38	0,062
	G/C+C/C	43	27	1,04	0,44 - 2,41	0,936
VEGF+936 C→T rs3025039	C/C	25	26	1		
	C/T	31	12	2,69	1,13 - 6,37	0,025
	T/T	7	2	3,64	0,69 - 19,23	0,128
	C/T+T/T	38	14	2,82	1,24 - 6,43	0,013
EGFR PROM2>A/ C rs759171	A/A	9	6	1		
	A/C	25	10	1,67	0,47 - 5,92	0,429
	C/C	29	24	0,81	0,25 - 2,59	0,716
	A/C+C/C	54	34	1,06	0,35 - 3,24	0,920

5.7.3. Análisis entre polimorfismos e historias clínicas

Para análisis entre los polimorfismos y los historiales clínicos, se tomó en cuenta pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas. En la asociación entre los polimorfismos estudiados y las variables cualitativas (Tabla 20). Se evidenció una relación significativa en dos polimorfismos que son: *VEGF* - 2578C→A y el estadiaje Durie-Salmon con un valor p de 0,025, mientras que el *VEGF*-1154G→A tuvo una relación significativa entre el sistema de estadiaje Durie-Salmon y el Estadiaje ISS con un valor p de 0,036 y 0,064, respectivamente. Estos polimorfismos están relacionados con la supervivencia y pronóstico en diferentes cánceres, incluyendo neoplasias malignas hematológicas debido a que se encuentran en la región promotora del gen y regulan la expresión del mismo (Andersen et al., 2012, p. 640), razón por la cual en esta enfermedad son significativos en el estadio que se relaciona con el tiempo de vida que aproximadamente tienen los pacientes.

Tabla 20.

Prueba exacta de Fisher relación entre polimorfismos y variables cualitativas

Prueba Fisher	Valor p
	Polimorfismos

Variables categóricas		<i>VEGF</i> -2578C→A	<i>VEGF</i> -1498C→T	<i>VEGF</i> -1154G→A	<i>VEGF</i> -634G→C	<i>VEGF</i> +936C→T	<i>EGFR</i> 55.017.893	<i>EGFR</i> rs759171
Género	M	0,12	0,756	0,715	0,393	0,548	0,556	0,338
	F							
Citogenética	N	0,287	0,078	0,808	0,571	0,1	0,206	0,817
	H							
	NH							
Estadíaie Durie-Salmon	I	0,025	0,58	0,036	0,408	0,139	1	0,151
	II							
	III							
Estadíaie ISS	I	0,072	0,66	0,064	0,673	0,068	1	0,79
	II							
	III							

Nota: M: Masculino; F: Femenino; N: Normal, H: Hiperdiploides; NH: No hiperdiploide

Para correlacionar, los polimorfismos con las variables cuantitativas (la edad, meses de supervivencia, los niveles de hemoglobina, leucocitos, plaquetas, linfocitos, urea, creatinina, albúmina LDH, B2M y proteínas) se realizaron pruebas no paramétricas (Tabla 21). Como resultado de este análisis, se ha visto que existe una relación entre los polimorfismos *VEGF* -1154G→A, *VEGF* +936C→T y los parámetros de inmunoglobulinas IgA, IgG y albúmina.

Esto se debe a que la expresión del gen *VEGF* se encuentra regulada por factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, pero además existen polimorfismos que están involucrados en los distintos niveles de expresión del gen como son el *VEGF* +936C→T, el *VEGF* -2578C→A, el *VEGF*-460C→T y el *VEGF*+405G→C (Kim et al., 2007, p.p. 71-72; Andersen et al., 2012, p. 636). Por esta razón los polimorfismos *VEGF* -1154G→A, *VEGF* +936C→T se relacionan con estos parámetros (IgA, IgG y albúmina), siendo importantes en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, así como tomados en cuenta por los sistemas de estadificación: Durie-Salmon o en el ISS.

Tabla 21.

Prueba no paramétrica (U de Mann-Whitney), entre polimorfismos y variables cuantitativas.

	Valor p						
	<i>VEGF</i> -2578C→A	<i>VEGF</i> -1498C→T	<i>VEGF</i> -1154G→A	<i>VEGF</i> -634G→C	<i>VEGF</i> +936C→T	<i>EGFR</i> 55.017.893	<i>EGFR</i> rs759171
Edad	0,555	0,691	0,135	0,782	0,991	0,584	0,681
Supervivencia	0,878	0,577	0,426	0,414	0,966	0,256	0,921
Inmunoglobulinas							
IgG	0,798	0,898	0,112	0,985	0,015	0,467	0,118
IgA	0,675	0,842	0,02	0,139	0,496	0,867	0,15
IgM	0,68	0,654	0,093	0,587	0,51	0,7	0,358
IgE	0,387	0,351	0,389	0,72	0,197	833	0,272
Parámetros hematológicos y bioquímicos							
Hemoglobina	0,06	0,197	0,102	0,175	0,7	0,1	0,491
Leucocitos	0,54	0,332	0,91	0,861	0,99	0,033	0,213
Plaquetas	0,365	0,765	0,479	0,907	0,04	0,433	0,971
Linfocitos	0,74	0,39	0,203	0,34	0,287	0,5	0,481
Urea	0,931	0,893	0,067	0,622	0,05	0,733	0,641
Creatinina	0,974	0,8	0,06	0,392	0,302	0,933	0,294
Calcio	0,553	0,811	0,434	0,264	0,298	0,467	0,045
Albúmina	0,193	0,672	0,007	0,204	0,59	0,533	0,241
LDH	0,147	0,281	0,87	0,437	0,421	0,867	0,271
B2M	0,586	0,892	0,066	0,787	0,651	0,167	0,239
Proteínas Totales	0,961	0,176	0,065	0,53	0,694	0,533	0,804

5.7.4. Análisis entre haplotipos e historiales clínicos

En el análisis entre haplotipos e historiales clínicos se hicieron para todas las variables (cualitativas y cuantitativas). Sin embargo, ninguna de las relaciones mostraron significancia debido a que su valor p fue mayor a 0,05 como se observa en el Anexo 11 y 12.

El análisis de haplotipos se hizo con el fin de agrupar los polimorfismos encontrados en el gen *VEGF* y así poder correlacionarlos de mejor manera con los historiales clínicos, se debe saber que cada mutación nueva viene de un

haplotipo de partida y que en la actualidad el análisis de haplotipos contribuye al estudio de enfermedades complejas como el cáncer (Clark, 2004, p. 322). En investigaciones anteriores en mieloma múltiple, se encontró una diferencia significativa con el haplotipo ACG, (-2578A, -634C y -640G) y la respuesta al tratamiento con fármacos inhibidores de la angiogénesis (Borsarelli, Lourenco, Oliveira, Souza y Passos, 2014, p.1368). Con lo mencionado anteriormente, se podría suponer que las combinaciones estudiadas en esta investigación, no mostraron una asociación significativa con la población ecuatoriana que padece de mieloma múltiple.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

La identificación de los polimorfismos en los genes *VEGF* y *EGFR* mediante secuenciación presentaron una prevalencia alta para los polimorfismos *VEGF* -2578 C→A de 63,5 % para el genotipo salvaje C/C, para el *VEGF* -1154 G→A de 60,3 % para el genotipo salvaje G/G. y para el polimorfismo *VEGF* -634 G→C presentó una prevalencia para el genotipo G/C de 49,2%, los cuales están relacionados con la progresión de la enfermedad.

De todos los polimorfismos estudiados en esta investigación, los polimorfismos -2578C→A y -634G→C del gen *VEGF* presentan diferencias significativas entre pacientes y controles en la población estudiada, los cuales están asociados a la sobreexpresión del gen y por tanto a la progresión de la enfermedad al ser el encargado de la vascularización y angiogénesis en células tumorales.

De los polimorfismos encontrados en los genes *VEGF* y *EGFR*, no se encontró una asociación significativa en cuanto a la clasificación cromosómica, por lo cual se podría decir que los SNPs estudiados no tienen una relación directa con la agresividad y el pronóstico de esta neoplasia.

El polimorfismo *VEGF* -2578 C→A presentó una diferencia significativa con el sistema de estadificación Durie-Salmon, el cual relaciona parámetros clínicos para dar una estimación del tiempo de vida y el tratamiento que debe seguir el paciente, por lo tanto este polimorfismo se lo podría relacionar con la progresión de la enfermedad en los pacientes.

En cuanto al polimorfismo *VEGF* +936 C→T, presentó una diferencia significativa con la inmunoglobulina IgG, la cual es un parámetro utilizado en el sistema de estadificación Durie-Salmon, este parámetro al encontrarse elevado determina el isotipo de la enfermedad. Relacionándolo con el tipo de tratamiento que se le podría aplicar al paciente.

La mutación nueva *EGFR*→55.017.893, tuvo una diferencia significativa con los niveles de leucocitos, dentro de esta neoplasia los recuentos de leucocitos son elevados, debido a que los pacientes con mieloma múltiple son propensos a infecciones. A pesar de ser un polimorfismo nuevo se encontró en equilibrio en la población de estudio.

Las combinaciones de haplotipos utilizadas en esta investigación, no demostraron una asociación significativa con los historiales clínicos, lo cual podríamos suponer que estas combinaciones no están asociados con la población ecuatoriana que padece mieloma múltiple.

De los polimorfismos estudiados en los genes *VEGF* y *EGFR*, no se encontró asociación significativa con tiempo de sobrevida de la enfermedad, por lo cual podríamos decir que los SNPs estudiados no están relacionados con el pronósticos del mieloma múltiple en la población ecuatoriana.

6.2.Recomendaciones

Aunque valdría aumentar el número muestral en ambos grupos de estudios, debido a que se encontró que el polimorfismo *VEGF* -1154G→A presentó una diferencia significativa, pero al no encontrarse en equilibrio de Hardy Weinberg sus resultados no son confiables, pese a ello es recomendable ampliar su estudio para ver su comportamiento en la población con mieloma múltiple en el Ecuador.

Alicuotar todos los reactivos de PCR, con el fin de evitar la contaminación de los mismos, de igual forma utilizar una alícuota de agua Mili-Q nueva para cada PCR, ya que esta es la más propensa a contaminación.

Las estadística en cuanto a la citogenética mejoraría si las muestras que se analizarán tuvieran el análisis de su cariotipo a partir del estudio de la muestra

separada de células plasmáticas y no de la muestra total de médula ósea por la técnica FISH, para saber si existe translocaciones específicas del mieloma múltiple.

Para extraer el ADN genómico de las muestras se debe centrifugar y tomar la capa de glóbulos blancos que se forma, así el ADN madre tendrá una mayor concentración.

REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A. y Pillai, S. (Eds). (2015).Capítulo 12. *Activación de linfocitos b y producción de anticuerpos. Inmunología celular y molecular*. España: Elsevier.
- Alcalde, M., Rodríguez, G., Santos, M. y Escobar, E. (2012). *Mieloma múltiple en una forma infrecuente de debut y evolución*. Presentación de caso. GME, 14(2), 134-141. Recuperado el 5 de junio del 2016 de: [http://bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.14.\(2\)_10/p10.html](http://bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.14.(2)_10/p10.html)
- Alvarado, M., Álvarez, J., Peña, A., García, L., Hernández, E., Herrera, W., Leyto, F., Loera, S., Martínez, A., Medina, J., Mojica, L., Morales, J., Palafox, M., Pérez, J., Ramírez, E., Ramos, E., Reyes, G., Rodríguez, J., Romero, E., Saavedra, A., Silva, K. y Tapia, A. (2015). *Primer Consenso Nacional de Mieloma Múltiple por Hematólogos del ISSSTE*. Rev Hematol Mex., 16(4), 306-332. Recuperado el 16 de junio del 2016 de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/hematologia/re-2015/re154i.pdf>
- American Cancer Society. (2014). *Multiple myeloma*. Recuperado el 5 de junio de 2016 de: <http://www.cancer.org/cancer/multiplemyeloma/detailedguide/multiple-myeloma-staging>
- Andersen, N., Voguel, U., Klausen, T., Gimsing, P., Gregersen, H., Abildgaard, N. y Vangsted, A. (2012). *Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms may influence the efficacy of thalidomide in multiple myeloma*. Int J Cancer, 131(5), 636-642.
- Aparicia, P. Y Gallart, T. (2010). *Activación linfocitos B*. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de: <http://files.uladech.edu.pe/docente/32968894/>

INMUNOLOGIA/Semana_05/05_Lectura_complementaria/05_Receptores_y_activacion_de_Linfocitos_B.pdf

- Arnaiz, A., Regueiro, J. y López, C. (1995). *Inmunología*. Madrid, España: Editorial Complutense.
- Borsarelli, A., Lourenco, G., Oliveira, G., Souza, C. y Passos, C. (2014). *Associations of VEGF and VEGFR2 polymorphisms with increased risk and aggressiveness of multiple myeloma*. Springer, 93, 363-1369.
- Brink, R. (2010). *B LYMPHOCYTES*. Recuperado el 1 de noviembre de 2016 de: <http://www.eolss.net/sample-chapters/c03/E6-80-05.pdf>
- Debes-Marun, C., Dewald, G., Bryant, S., Picken, E., Santana-Dávila, R., González-Paz, N., Winkler, R., Kyle, R., Gertz, M., Witzig, T., Dispenzieri, M., Lacy, M., Rajkumar, S., Lust, J., Greipp, P. y Fonseca, R. (2003). *Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma*. *Leukemia. Official Journal of the Leukemia Society of America*, 17, 427–436. Recuperado el 16 agosto del 2016 de: doi:10.1038/sj.leu.2402797
- Cano, R., Cedillo, J., Garcés, O., Gómez, D., Limón, A., López, M., Martínez, D., May, E., Nambo, M., Rivas, S., Ruiz, G., Sobrevilla, P., Vela, J., Villalobos, A. y Zarate, P. (2010). *Guías mexicanas de diagnóstico y recomendaciones terapéuticas para mieloma múltiple (2009)*. *Revista de Hematología*, 11(1), 40-62. Recuperado el 28 de Julio de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/hematologia/re-2010/re101h.pdf>
- Cappuzzo, F. (2014). *Guide to targeted therapies; EGFR mutations in NSCLC. The Human Epidermal growth factor Receptor (HER) family: structure and function*. New York: ADIS.

- Choi, J., Park, S., Kim, K., Lee, W., Kam, S., Cha, S., Kim, C., Kang., Kim, Y., Han, S., Jung., Park, J. (2007). *Polymorphisms in the epidermal growth factor receptor gene and the risk of primary lung cancer: a case-control study*. BMC Cancer, 7(199), 1-9. Recuperado el 25 de Noviembre del 2016 de: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-7-199>
- Clark, A. (2004). *The Role of Haplotypes in Candidate Gene Studies*. Genetic Epidemiology, 27(1), 321-333. Recuperado el 25 de Julio del 2016 de: <https://www.biostat.wisc.edu/~kbroman/teaching/gaw17/papers/ClarkHaplotypeAssociations.pdf>
- Cersosimo, R. (2008). *Goals of Therapy for Multiple Myeloma*. Pharm,33(4), 6-19. Recuperado el 18 de Julio de 2016 de: <https://www.uspharmacist.com/article/goals-of-therapy-for-multiple-myeloma>
- Checa, M. (2007). *Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex, 20(3), 213-221. Recuperado el 29 de junio del 2016 de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2007/in073h.pdf>
- Chesi, M. y Bergsagel, P.L. (Comps.). (2014). *Patogenesis of multiple myeloma*. En Gertz, M. y Rajkumar, S. (Eds.). *Multiple Myeloma diagnosis and treatment*. New York: Springer.
- Choi, K., Creighton, C., Stivers, D., Fujimoto, N. y Kurie, J. (2007). *Transcriptional Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer Cells with Activating EGFR Somatic Mutations*. PLOS ONE, 2(11), 1-11. Recuperado el 30 agosto del 2016 de:

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001226>

- Conte, G., Figueroa, G., Lois, V., Cabrera, M., León, A. y Rojas, H. (2007). *Mieloma múltiple en Chile. Características clínicas y sobrevida*. Falta nombre de revista 135, 1111-1117.
- Conte, G., Figueroa, G., Lois, V., Cabrera, M., León A, García H. y Rojas, H. (2008). *Valor pronóstico del nuevo sistema de etapificación internacional en mieloma múltiple. Comparación con el sistema de Durie-Salmon*. Revista Médica de Chile, 136(1), 7–12.
- Contte, M., Isnardi, S. y Sueza, Y. (2009). *Enfermedad ósea en el mieloma múltiple*. Hematología, 14(2), 29-40. Recuperado el 19 de junio del 2016 de: <http://www.sah.org.ar/Revista/numeros/vol14.n2.29-40.pdf>
- Cueva, P. y Yépez, J. (2014). *Epidemiología del Cáncer en Quito 2006- 2010*. Quito, Ecuador: Solca Núcleo Quito.
- Díaz-González, J. y Ferraz, I. (2016). *La célula B en la patogenia de la artritis reumatoide*. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de: file:///Users/jorgeoctavio/Downloads/S1699258X07736173_S300_es.pdf
- Eroglu, A., Gulec, S., Kertman, C., Cam, R. y Akar falta inicial del nombre. (2016). *Vascular endothelial growth factor 936 C/T polymorphism in cancer patients*. Recuperado el 24 de noviembre de 2016 de: <http://annonc.oxfordjournals.org/content/17/9/1467.full.pdf+html>
- Estrada, N.W. (2012). *Revisión de fisiopatología, clínica y diagnóstico de mieloma múltiple*. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica, 69(603), 343-349.

- Fantl, D., Curutchet, M.C., Kusminsky, Gustavo Labanca, V., Orlando, S., Quiroga, L., Sánchez Avalos, J. y Slavutsky, I. (2013). *Mieloma Múltiple. Sociedad Argentina de Oncología Médica*, 290–315. Recuperado el 26 de Octubre del 2016 de: <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/linfomas-y-mieloma/mieloma?start=1>
- Friedman, G. (1986). *Multiple myeloma: relation to propoxyphene and other drugs, radiation and occupation*. *Int J Epidemiol*, 15 (1), 423-425. Recuperado el 20 de septiembre del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3771083>
- Gamberale, R. (2004). *Ontogenia B: el delicado equilibrio entre la diversidad y la autoinmunidad*. *Revista Química Viva*, 3(3), 84-95. Recuperado el 10 de Octubre del 2016 de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86330303>
- García, E. (2015). *Capítulo 5. Linfocitos B*. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de: <http://garciamacgregor.com/medicina/temas-de-inmunologia/cap-5-linfocitos-b/>
- García, R., Mateos, M. y San Miguel, J. (2007). *Mieloma Múltiple*. *Med Clin*, 129(3), 104-115.
- GeneCards. (2014). *The human compendium*. Recuperado el 23 de noviembre del 2016 de: <http://www.genecards.org/>
- 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. Recuperado el 2 de Noviembre del 2016 de: <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.04.242>

Guan, X., Zhao, H., Jiangong, N., Tan, D., Ajani, J. y Wei, Q. (2009). *Polymorphisms of TGFB1 and VEGF genes and survival of patients with gastric cancer*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 25(94), 1-8. Recuperado el 5 de Agosto del 2016 de: <http://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-28-94>

Guapta, D., Guapta, V., Singh, V., Prakash, S., Agrawal, S., Chawla, S. y Phadke, S. (2016). *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and association with age related macular degeneration in Indian patients*. Meta Gene, 9, 249-253. Recuperado el 11 Septiembre del 2016 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214540016300342>

Heras, M., Saiz, A., Fernandez-Reyes, R., Sanchez, R., Zurita, P. y Urrego, C. (2011). *Mieloma múltiple, hipercalcemia severa, insuficiencia renal aguda y fallo multiorgánico por calcinosis*. Nefrología, 1(2), 218-40. Recuperado el 20 de Octubre del 2016 de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0211-69952011000200025

Hsiao, P., Lu, M., Chiang, F., Shin, S., Tai, Y. y Hank, S. (2007). *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in thyroid cancer*. Journal of endocrinology, 195, 265-270. Recuperado el 7 de Octubre del 2016 de: <http://joe.endocrinology-journals.org/content/195/2/265>

Jakubowska, A., Gronwald, J., Menkiszak, J., Górski, B., Huzarski, T., Byrski, T., Edler, L., Lubinski, J., Scott, R. y Hamann, U. (2008). *The VEGF_936_C>T 3'UTR polymorphism reduces BRCA1-*

associated breast cancer risk in Polish women. Cancer Letters, 262(1), 71-76. Recuperado el 19 de Noviembre del 2016 de: *The VEGF_936_C>T 3'UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women*

Khosravi, S. (2005). *Leucemia de células plasmáticas: variante rara del mieloma múltiple.* Casoclínico. An. Med. Interna, 25(11), 532-534.

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

Kim, H., Chung, H., Yoo, Y., Kim, H., Lee, J., Lee, M. y Kong, G. (2007). *Inhibitor of DNA binding 1 activates vascular endothelial growth factor through enhancing the stability and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha.* Mol Cancer Res, 5(1), 71-81. Recuperado el 12 de Noviembre del 2016 de: <http://mcr.aacrjournals.org/content/5/4/321>

Korde, N., Kristinsson, S. y Landgren, O. (2016). *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies.* Blood, 117 (21), 5573-5581. Recuperado el 19 de Noviembre del 2016 de: <http://www.bloodjournal.org/content/117/21/5573?sso-checked=true>

Kriangkum, J., Motz, S., Debes-Marun, C., Lafarge, S., Gibson, S., Venner, C., Johnston, J., Belch, A. y Pilarski, L. (2013). *Frequent Occurrence of Highly Expanded but Unrelated B-Cell Clones in Patients with Multiple Myeloma.* PLOS ONE, 8(5), 554-560. Recuperado el 2 de Noviembre del 2016 de: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064927>

- Krippel, P., Langsenlehner, U., Renner, W., Yazdani-Biuki, B., Wascher, T., Paulweber, B., Haas, J. y Samonigg, H. *A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk*. *Int J Cancer*, 106(4), 468-471. Recuperado el 10 de Noviembre del 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.11238/abstract;jsessionid=509B95CA8EB35FFFAC5E002DF2B3CA0B.f02t04>
- Kyle, R. y Rajkumar, S. (Comps.). (2014). *Criteria for diagnosis and response*. En Gertz, M. y Rajkumar, S. (Eds.). *Multiple Myeloma diagnosis and treatment*. New York: Springer.
- Leone, P.E., Pérez, J.C., Morillo, S.A., Paz-y-Miño, C. (2002). Low incidence of follicular lymphoma and t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction analysis: observations on Ecuadorian patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 137, 72-74.
- Leone, P.E., Elosua, C., Catalina, P., Walker, B.A., Dickens, N.J., Avramidou, A., Brito, L., Davenport, E., Jenner, M.W., Gonzalez, D., Davies, F.E., Morgan G.J. (2008). *Molecular characterization of Human Multiple Myeloma Cell Lines by Genome-Wide Profiling identifies Kinase Pathway alterations*. *Blood* 112(11), 1694.
- Leone, P.E., 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.
- Liu, X., Yang, Q. y Kong, B. (2013). *Vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphism and cancer risk in Asians: a meta-analysis*. *Genetics and Molecular Research*, 12(2), 1924-1933. Recuperado el 20 de Abril del 2016 de: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2013/vol12-2/pdf/gmr1952.pdf>

- Luo, T., Chen, L., He, P., Hu, Q., Zhong, X., Sun, Y., Yang, Y., Tian, T. y Zheng, H. (2013). *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk in a Chinese Population*. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 14(4), 2433-2437. Recuperado el 30 Mayo del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23725153>
- Martínez-Fierro., Garza, I., Rojas, A., Ortiz, R., Castruita, C., Ortiz, Y., Lazalde, B., Cervantes, A., Castañeda, M., Gomez, L., Delgado, I. y Martínez, A. (2013). *Positive association between vascular endothelial growth factor (VEGF) -2578 C/A variant and prostate cáncer*. *Cancer Biomarkers*, 13(1), 235-241.
- Martínez, J. y Herrera, L. (2011). *Angiogénesis: VEGF/ VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer*. *Cancerología*. Recuperado el 06 de junio de 2016 de: <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1172284727.pdf>
- Menoni-Blanco, B., Da Silva-De Abreu, A. y Cueva-Nieves, D. (2010). *Mieloma Múltiple: Alteraciones génicas y cromosómicas no translocacionales y sus implicaciones pronósticas*. *Acta Científica Estudiantil*, 8(1), 9-14.
- Neira, J., Morán, C., Correa, R. Y Estrada, R. (2014). *Mieloma múltiple: aspectos biológicos, clínicos, diagnóstico, tratamiento con nuevos agentes y estadificación*. *Revista Médica FCM-UCSG*, 18(2), 87-94.
- Ortiz, C. (2011). *De las células plasmáticas al mieloma múltiple. Una breve perspectiva histórica*. *Patología Revista latinoamericana*, 49(2), 120-131. Recuperado el 5 octubre del 2016 de: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=72744&id_seccion=4361&id_ejemplar=7263&id_revista=279

- Paz-y-Miño, C., Muñoz, M., Lopez-Cortes, A., Cabrera, A., Palacios, A., Paz-y-Miño, N. y Sanchez, M. E. (2010). *Frequency of Polymorphisms pro198leu in GPX-1 Gene and ile58thr in MnSOD Gene in the Altitude Ecuadorian Population With Bladder Cancer*. *Oncology Research*, 18(2), 395-400.
- Paz-y-Miño, C., Sánchez, M.E., Araujo, S., Ocampo, L., Espín, V.H., Leone, P.E. (2013). *Cytogenetic and Molecular Characterization of Hematological Neoplasm in an Ecuadorian population*. *Open Journal of Blood*, 3(4), 108-115.
- Paz-y-Miño, C. y López, A. (2014). *Genética molecular y citogenética humana. Fundamentos, Aplicaciones e investigaciones en el Ecuador*. Quito: Yachay EP.
- Paz-y-Miño, C., Guillen, M.J., Leone, P.E. (2015). *Genetics and Genomic Medicine in Ecuador*. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2015; 1-9.
- Pedroza, A. y Zamora, A. (2015). *Utilidad de las pruebas de laboratorio en el diagnóstico de mieloma múltiple*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 62 (1), 55-62.
- Peña, J. (2014). *Activación de linfocitos B*. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de: <http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php/03mmm-9/b>
- Pérez, Q. (2010). *Análisis multiparamétrico mediante citometría de flujo de las células plasmáticas de la médula ósea en pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto y mieloma quiescente: valor pronóstico e implicaciones clínicas*. (Tesis doctoral). Universidad de Salamanca.
- Podar, K. y Anderson, K. (2004). *The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: Therapeutic implications*. *Blood*, 105(4), 1383-1395. Recuperado el 25 de Septiembre del 216 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471951>

- Poole, E., Curtin, K., Hsu, L., Kulmacz, R., Duggan, D., Makar, K., Xiao, L., Carlson, C., Slattery, M., Caan, B., Potter, J. y Ulrich, C. (2011). *Genetic variability in EGFR, Src and HER2 and risk of colorectal adenoma and cáncer*. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2(4), 300-315. Recuperado el 27 de Noviembre del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3244110/>
- Ramirez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C. y Fragoso, J. (2013). *Polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas*. Recuperado el 24 de noviembre de 2016 de: http://www.anmm.org.mx/GMM/2013/n2/GMM_149_2013_2_220-228.pdf
- Ramos-Bello, D. y Llorente, L. (2009). *Cincuentenario del descubrimiento de la estructura química de los anticuerpos*. *Reumatol Clin*, 5(6), 280-284. Recuperado el 6 de Octubre del 2016 de: <http://www.reumatologiaclinica.org/es/cincuentenario-del-descubrimiento-estructura-quimica/articulo/S1699258X09002010/>
- Ramos, R., García, A., Cuesta, M., Rivera, G., Cuesta, L. (2001). *El laboratorio en el diagnóstico de las gammopatías monoclonales*. Recuperado el 3 de noviembre de 2016 de: <http://www.aebm.org/formación%20distancia/distancia%2020112012/Actualizaciones/monografias%202011/2.%20Gammopatias%20monoclonales.pdf>
- Ria, R., Todoerti, K., Berardi, S., Luce, A., Luisi, A., Mattioli, M., Ronchetti, D., Morabito, F., Guarini, A., Petrucci, M., Dammacco, P., Ribatti, D., Neri, A. y Vacca, A. (2009). *Gene Expression Profiling of Bone Marrow Endothelial Cells in Patients with Multiple Myeloma*. *Clin Cancer Res*, 15(17), 5369- 5378. Recuperado el 2 de Octubre del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690192>

- Rodrigues, P., Furriol, J., Tormo, E., Ballester, S., Lluch, A. y Eroles, P. (2012). *The single-nucleotide polymorphisms +936 C/T VEGF and -710 C/T VEGFR1 are associated with breast cancer protection in a Spanish population*. Breast Cancer Research and Treatment, 133(2), 769-778. Recuperado el 15 de Noviembre de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315135>
- Rojas, O. (2003). *Inmunología (de la memoria)*. Madrid, España: Ed. MédicaPanamericana.
- Roy, V. y Greipp, P. (Comps.). (2014). *Staging of Multiple Myeloma*. En Gertz, M. y Rajkumar, S. (Eds.). *Multiple Myeloma diagnosis and treatment*. New York: Springer.
- Samli, H., Demir, B., Ozgoz, A., Atalay, M. y Uncu, G. (2012). *Vascular endothelial growth factor gene 1154 G/A, 2578 C/A, 460 C/T, 936 C/T polymorphisms and association with recurrent pregnancy losses*. Genet. Mol. Res, 11(4), 4739-4745. Recuperado el 5 de Noviembre del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23315815>
- Sa-nguanraksa, D. y O-charoenrat, P. (2012). *The Role of Vascular Endothelial Growth Factor A Polymorphisms in Breast Cancer*. International Journal of Molecular Sciences, (13), 14845-14864. Recuperado el 5 de Noviembre del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3509613/>
- Sánchez, T. y González, O. (2010). *El receptor del factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral*. Revista Habanera de Ciencias Médicas, 9(2), 172-180. Recuperado el 10 de Noviembre del 2016 de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180414048006>
- Segovia, J., Duarte, M., Restrepo, J., Saavedra, C. y Andrade, R. (2008). *Mieloma multiple en el Hospital Universitario Fundacion Santa Fe de Bogota (1983-2006)*. Acta Médica Colombiana, 33(4), 276-281. Recuperado el 21 de Noviembre del 2016 de:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482008000400004

- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2016). *PCR: reacción en cadena de la polimerasa*. Recuperado el 26 de Octubre del 2016 de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pcr.pdf>
- Smith, K., Bateman, A., Fussell, H. y Howell, W. (2004). *Cytokine gene polymorphisms and breast cancer susceptibility and prognosis*. *Eur J Immunogenet*, 31(4), 167-173. Recueprado el 15 de Octubre del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265021>
- Sobjanek, M., Zabłotna, M., Lesiak, A., Michajłowski, I., Szczerkowska-Dobosz, A., Sokolowska-Wojdylo, M., y Nowicki, R. (2014). *The -1154 G/A VEGF gene polymorphism is associated with the incidence of basal cell carcinoma in patients from northern Poland*. *Archives of Dermatological Research*, 306(6), 539–544. Recuperado el 15 de Octubre del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4107281/>
- Ulivì, P., Scarpi, E., Passardi, A., Marisi, G., Calistri, D., Zoli, W., Re, M., Luca, G., Tassinari, D., Tamberi, S. Y Vertogen, B. (2015). *eNOS polymorphisms as predictors of efficacy of bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer: data from a randomized clinical trial*. *Journal of TranslMed*, 13 (258), 1-10. Recuperado el 15 de Agosto del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26259598>
- Vega, G. (2008). *Inmunología para el médico general anticuerpos*. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-3/RFM052000310.pdf>
- Walker, B., Wardell, C., Ross, F. Y Morgan, G. (2013). *Identification of Novel t(7;14) Translocation in Multiple Myeloma Resulting in Overexpression of EGFR*. *Genes, Chromosomes & Cancer*, (52),

817-822. Recuperado el 17 de Julio del 2016 de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765574>

Watson C.J., Webb N.J., Bottomley M.J., Brenchley P.E. (2000) *Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production*. *Cytokine*, 12(8), 1232–1235. Recuperado el 16 de Noviembre del 2016 de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10930302>

Wigginton, J., Cutler, D. y Abecasis, G. (2005). *A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium*. *Am J Hum Genet*, 75(5), 887-93. Recuperado el 15 de Octubre del 2016 de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1199378/>

Yamamori, M., Taniguchi, M., Maeda, S., Nakamura, T., Okamura, N., Kuwahara, A., Iwaki, K., Tamura, T., Aoyama, N., Markova, S., Kasuga, M., Okumura, K. y Sakaeda, T. (2008). *VEGF T-1498C polymorphism, a predictive marker of differentiation of colorectal adenocarcinomas in Japanese*. *Int. J. Med. Sci*, 5(2), 80-86. Recuperado el 15 de Julio del 2016 de:
<http://www.medsci.org/v05p0080.htm>

Zsolt, N. (2016). *Mielóma multiplex ésegyéblazmasejtesdiszkráziák*. Recuperado el 21 de Enero del 2017 de:
<http://huon.hu/2016/60/2/0154/0154a.pdf>

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 22. Parámetros hematológicos y bioquímicos de los pacientes con mieloma múltiple.

Características (unidades)	Rango normal	Pacientes diagnosticados MM		
		Media	Mediana	Rangos
Hemoglobina (g/dL)	14 - 18	14,2	13,11	8,06 - 17,24
Leucocitos (K/ μ L)	4,5 - 10	6,6	6,38	2,4925 - 13,81
Plaquetas	130.000- 400.000	249.962	238.026	82,06-989.600
Linfocitos (mg/dL)	1,1 - 3,2	2,3	1,70	0,42 - 10,5
Urea (mg/dL)	10 - 50	51,7	40,06	19,3 - 170
Creatinina (mg/dL)	0,5 - 1,4	1,4	0,94	0,35 - 21,28
Calcio (mg/dL)	8,1 - 11,8	7,7	8,50	3,75 - 14,3
Albumina (g/dL)	3,5 - 5,5	3,6	3,56	1,65 - 5,1
LDH (U/L)	240 - 480	369,5	322,00	174 - 1733
B2M (ng/mL)	604 - 2.286	3129,68	2432,00	1297 - 12841
Proteínas Totales (g/dL)	6,6 - 8,7	7,1	6,88	4,4 - 11,6

Anexo 2

Tabla 23. Parámetros clínicos del grupo de pacientes.

Parámetro		Frecuencia
Género: hombre/mujer (%)		55,56/44,44
Edad: media/mediana (rango)		64,2/64 (32 - 83)
Supervivencia: media/mediana (rango)		33,57/16,5 (1-155)
Citogenética	Normal	50
	Hiperdiploide	7
	No Hiperdiploide	6
Estadiaje Durie-Salmon (%)	I	23,72
	II	67,79
	III	8,47
Estadiaje ISS (%)	I	74,57
	II	20,33
	III	5,084

Anexo 3

Tabla 24. Edad, género y concentración del ADN genómico (madre) de los pacientes con mieloma múltiple.

Muestra	Género	Edad (años)	Institución	C1 (ng/μl)	V1 (μl)	C2 (ng/μl)	V2 (μl)	H2O (μl)
MM-1	Femenino	55	Solca	111,8	1,8	10	20	18,2
MM-2	Masculino	75	Solca	28,5	7,0	10	20	13,0
MM-10	Masculino	66	Solca	125,8	1,6	10	20	18,4
MM-12	Femenino	82	Solca	237,1	0,8	10	20	19,2
MM-13	Masculino	58	Solca	60,5	3,3	10	20	16,7
MM-14	Masculino	65	Solca	557	0,4	10	20	19,6
MM-15	Femenino	56	Solca	231,3	0,9	10	20	19,1
MM-16	Masculino	77	Solca	17	11,8	10	20	8,2
MM-17	Masculino	65	Solca	75,9	2,6	10	20	17,4
MM-18	Femenino	60	Solca	164,1	1,2	10	20	18,8
MM-19	Masculino	83	Solca	414,9	0,5	10	20	19,5
MM-21	Masculino	50	Solca	418,4	0,5	10	20	19,5
MM-22	Masculino	64	Solca	828,7	0,2	10	20	19,8
MM-23	Masculino	65	Solca	290,7	0,7	10	20	19,3
MM-24	Masculino	63	Solca	68,4	2,9	10	20	17,1
MM-25	Masculino	75	HCAM	85,6	2,3	10	20	17,7
MM-26	Masculino	63	Solca	206	1,0	10	20	19,0
MM-27	Masculino	64	HCAM	3467,8	0,1	10	20	19,9
MM-28	Masculino	68	HCAM	60,5	3,3	10	20	16,7
MM-29	Femenino	53	HCAM	32,5	6,2	10	20	13,8
MM-31	Femenino	75	HCAM	14,4	13,9	10	20	6,1
MM-32	Masculino	67	HCAM	21,3	9,4	10	20	10,6
MM-33	Femenino	72	HCAM	21,2	9,4	10	20	10,6
MM-34	Femenino	45	HCAM	66,5	3,0	10	20	17,0
MM-35	Femenino	69	HCAM	11,6	17,2	10	20	2,8

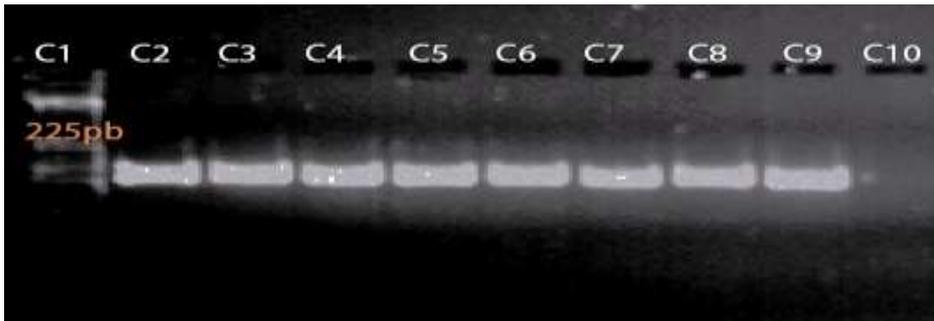
MM-36	Femenino	65	Solca	94,2	2,1	10	20	17,9
MM-37	Femenino	58	Solca	19	10,5	10	20	9,5
MM-40	Femenino	75	Solca	21	9,5	10	20	10,5
MM-41	Femenino	63	HCAM	68,5	2,9	10	20	17,1
MM-42	Femenino	74	HCAM	30,1	6,6	10	20	13,4
MM-43	Femenino	61	HCAM	60,5	3,3	10	20	16,7
MM-44	Masculino	60	HCAM	344	0,6	10	20	19,4
MM-45	Masculino	32	HCAM	457	0,4	10	20	19,6
MM-46	Femenino	77	HCAM	346	0,6	10	20	19,4
MM-47	Masculino	77	HCAM	47,27	4,2	10	20	15,8
MM-48	Femenino	53	Solca	5,3	37,7	10	20	-17,7
MM-49	Femenino	57	Solca	3,1	64,5	10	20	-44,5
MM-50	Femenino	45	Solca	49,1	4,1	10	20	15,9
MM-51	Masculino	66	HCAM	398,2	0,5	10	20	19,5
MM-52	Femenino	77	HCAM	160,4	1,2	10	20	18,8
MM-53	Masculino	68	HCAM	218,1	0,9	10	20	19,1
MM-54	Masculino	43	HCAM	252,1	0,8	10	20	19,2
MM-55	Masculino	78	HCAM	51,9	3,9	10	20	16,1
MM-56	Femenino	75	HCAM	285,9	0,7	10	20	19,3
MM-57	Masculino	78	HCAM	166,6	1,2	10	20	18,8
MM-58	Masculino	58	HCAM	190,5	1,0	10	20	19,0
MM-59	Masculino	71	HCAM	731,7	0,3	10	20	19,7
MM-60	Masculino	77	HCAM	367,5	0,5	10	20	19,5
MM-61	Masculino	54	HCAM	456,3	0,4	10	20	19,6
MM-62	Femenino	61	HCAM	266	0,8	10	20	19,2
MM-63	Masculino	67	HCAM	100,4	2,0	10	20	18,0

MM-64	Femenino	62	HCAM	191	1,0	10	20	19,0
MM-65	Femenino	46	HCAM	121	1,7	10	20	18,3
MM-66	Femenino	73	HCAM	148,3	1,3	10	20	18,7
MM-67	Masculino	61	HCAM	274,4	0,7	10	20	19,3
MM-68	Femenino	55	HCAM	611,8	0,3	10	20	19,7
MM-71	Masculino	61	HCAM	360,6	0,6	10	20	19,4
MM-72	Masculino	63	HCAM	356,7	0,6	10	20	19,4
MM-73	Masculino	62	HCAM	637,3	0,3	10	20	19,7
MM-74	Femenino	68	HCAM	371,2	0,5	10	20	19,5
MM-75	Masculino	49	HCAM	346	0,6	10	20	19,4
MM-76	Masculino	79	HCAM	307,8	0,6	10	20	19,4
MM-77	Femenino	62	HCAM	544,9	0,4	10	20	19,6

Anexo 4

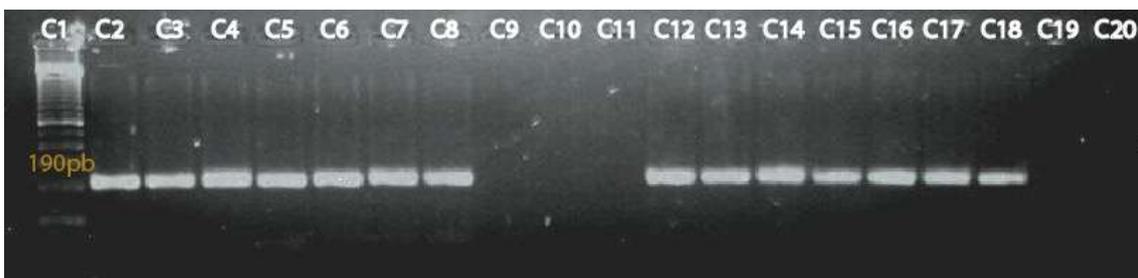
Resultado de la electroforesis convencional del fragmento *VEGF* -2578C→A de 325pb. Posición C1: Marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen™, California), Primer gel (C2-C7): muestras de pacientes con mieloma múltiple, C8-C10: controles negativos y segundo gel C8-C10: muestras de población control.





Anexo 5

Resultado de la electroforesis convencional del fragmento *VEGF* -1498C→T de 190pb. Posición C1: Marcador de peso molecular 100pb (invitrogen™, California), C2-C8: muestras de pacientes con mieloma múltiple, C9-C19: controles negativos y C12-C18: muestras de población control.



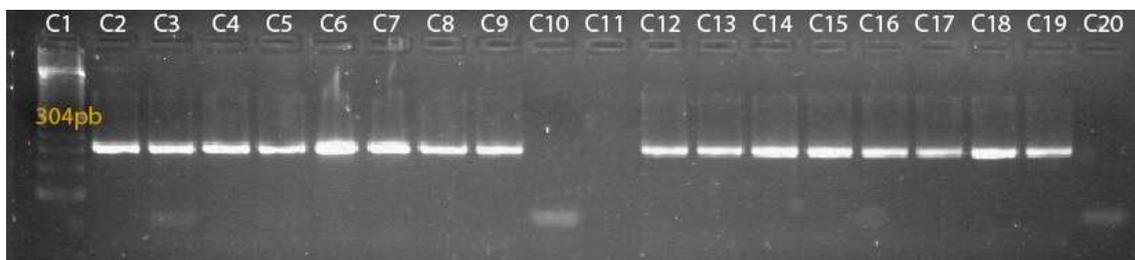
Anexo 6

Resultado de la electroforesis convencional del fragmento *VEGF* -1154G→A de 225pb. Posición C1: Marcador de peso molecular 100pb (invitrogen™, California), C2-C7: muestras de pacientes con mieloma múltiple, C8-C18: controles negativos y C12-C17: muestras de población control.



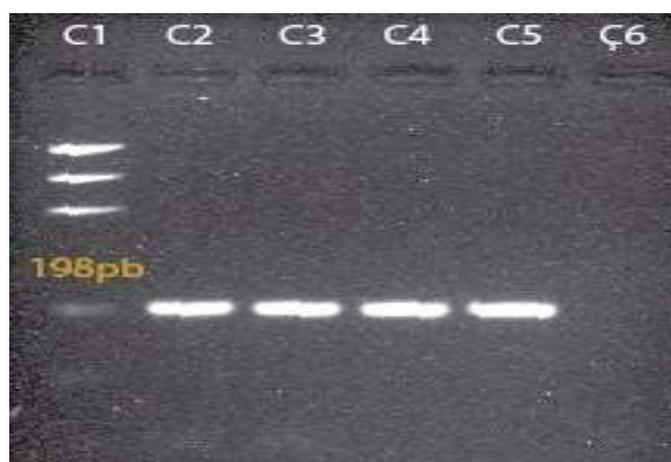
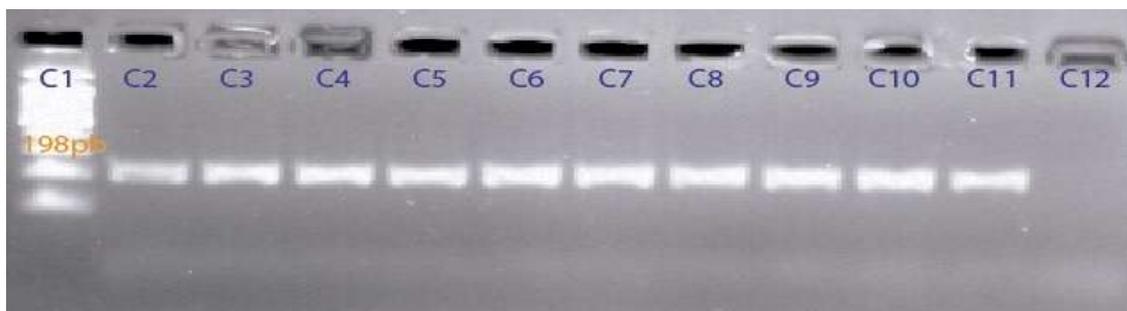
Anexo 7

Resultado de la electroforesis convencional del fragmento *VEGF* -634G→C de 304pb. Posición C1: Marcador de peso molecular 100pb (invitrogen™, California), C2-C9: muestras de pacientes con mieloma múltiple, C10-C20: controles negativos y C12-C19: muestras de población control.



Anexo 8

Resultado de la electroforesis convencional del fragmento *VEGF* +936C→T de 198pb. Posición C1: Marcador de peso molecular 100pb (invitrogen™, California), Primer gel C2-C11: muestras de pacientes con mieloma múltiple, C12-C6: controles negativos y C2-C5: muestras de población control.



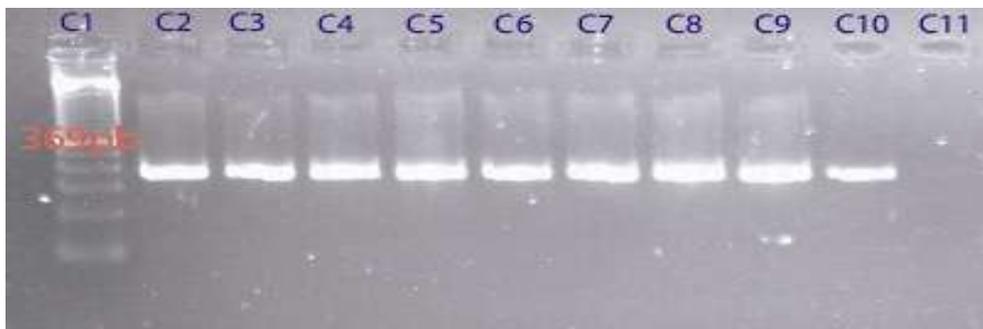
Anexo 9

Resultado de la electroforesis convencional del fragmento *EGFR* 55.017,893 de 315pb. Posición C1: Marcador de peso molecular 100pb (invitrogen™, California), C-C: muestras de pacientes con mieloma múltiple, C-C: controles negativos y C-C: muestras de población control.



Anexo 10

Resultado de la electroforesis convencional del fragmento *EGFR* rs759171 de 369pb. Posición C1: Marcador de peso molecular 100pb (invitrogen™, California), primer gel C2-C7: muestras de pacientes con mieloma múltiple, C8-C11: controles negativos y segundo gel C2-C10: muestras de población control.



Anexo11

Tabla 25. Relación entre haplotipos y variables cualitativas, usando la prueba exacta de Fisher.

Prueba Fisher		Valor p
Variables cualitativas		Haplotipos
<u>Género</u>	Masculino	0,884
	Femenino	
	Normal	
<u>Citogenética</u>	Hiperdiploide	0,584
	No hiperdiploide	
<u>Estadaje Durie-Salmon</u>	I	0,149
	II	
<u>Estadaje ISS</u>	I	0,475

Anexo 12

Tabla 26. Relación entre haplotipos y variables cuantitativas, usando la prueba de independencia de muestras (U de Mann-Whitney)

Característica	Valor p
Haplotipos	
Edad	0,359
Supervivencia	0,633
<u>Inmunoglobulinas</u>	
IgG	0,301
IgA	0,751
IgM	0,453
IgE	0,115
<u>Parámetros hematológico</u>	
Hemoglobina	0,712
Leucocitos	0,624
Plaquetas	0,314
Linfocitos	0,601
Urea	0,371
Creatinina	0,254
Calcio	0,392
Albúmina	0,263
LDH	0,402
B2M	0,574
Proteínas Total	0,874

