



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE  
EN LOS GENES AURORA CINASA A Y CICLINA D1 EN PACIENTES CON  
MIELOMA MÚLTIPLE DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA.

AUTORA

ELENA BELÉN GUTIÉRREZ ALBARRACÍN

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE EN LOS  
GENES AURORA CINASA A Y CICLINA D1 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

Profesor Guía

M.Sc. Mayra Fernanda Chico Terán

Autora

Elena Belén Gutiérrez Albarracín

Año

2017

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el 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”

---

Mayra Fernanda Chico Terán

Máster en Biotecnología de Procesos

C. I. 1003327044

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

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

---

María Gabriela Granja Bastidas

Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina: especialidad en  
Patología Molecular

C.I. 1712995149

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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

---

Elena Belén Gutiérrez Albarracín

C.I. 1724626807

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Instituto de Investigaciones Biomédicas, de manera especial a la Dra. Paola Leone por permitirme ser parte de su proyecto.

También a Germán, María Eugenia, Lucho y Fabián por sus enseñanzas y apoyo. A Pao Guadalupe por acompañarme en este paso de mi carrera

A mi profesora guía Fernanda Chico por guiarme en este proceso y darme su apoyo.

## **DEDICATORIA**

A mi padre Jaime y a mi Mami Fabi por hacer posible esto. A mis tíos: Diego, Paulina y Patricio, el único que entendía de lo que hablaba y a mis hermanas: Caro y Pame por alentarme a cumplir mis sueños. Y a mi madre Elena que desde el cielo me ha guiado siempre.

## RESUMEN

Los SNPs o polimorfismos de nucleótidos simple son cambios de un solo par de base nitrogenada en la secuencia del ADN, este pequeño cambio puede estar relacionado con el desarrollo de enfermedades debido al cambio que ocurre en la secuencia proteica al momento de su traducción. El mieloma múltiple es un cáncer de tipo hematológico que afecta a personas de la tercera edad. Su incidencia a nivel mundial es baja en comparación con otros cánceres, además en el Ecuador hay pocos estudios relacionados a esta enfermedad. En el 2008 un estudio demostró que los genes *AURK-A* y *CCND1* se encontraban alterados en pacientes con mieloma múltiple. Es por eso que el objetivo de esta investigación es evaluar polimorfismos en estos genes en pacientes ecuatorianos, y asociar los datos obtenidos con sus respectivas historias clínicas. Los polimorfismos estudiados fueron el rs2273535 del gen *AURK-A* y el rs9344 del gen *CCND1*. Se encontró que el polimorfismo rs2273535 no se encuentra asociado al desarrollo de mieloma múltiple, a diferencia del rs9344 el cual presentó un valor muy próximo a la significancia estadística, pudiendo estar asociado al desarrollo de la enfermedad. Ninguno de estos polimorfismos se encontró asociado a los datos inmunológicos y hematológicos de las historias clínicas de los pacientes. Es por ello que se recomienda aumentar el tamaño de la muestra para próximos estudios.

**Palabras clave:** mieloma, plasmocitoma, para proteína, astemia, polimorfismo

## ABSTRACT

A single-nucleotide polymorphism is a change of a single nitrogen base in the DNA sequence. This change may be related to the development of diseases due the change that occurs in the protein sequence. Multiple myeloma is a hematological cancer that affects elder people. Its incidence in the world is lower in comparison with other types of cancer, also in Ecuador there are few studies related to this disease. In 2008 a study showed that the *AURK-A* and *CCND1* genes were altered in patients with multiple myeloma. For this reason, the objective of this research is to evaluate polymorphisms in these genes in Ecuadorian patients. And associate the genotypic data obtained with their respective medical records. The polymorphisms studied were rs2273535 of the *AURK-A* gene and rs9344 of the *CCND1* gene. It was found that the rs2273535 polymorphism is not associated to the development of multiple myeloma in comparison with rs9344 which presented a value very close to the statistical significance, so this polymorphism may be associated to the development of the disease. None of these polymorphisms were found to be associated with the immunological and hematological data of patients. Because of that it is recommended to increase the size of the sample for future studies.

# INDICE

<b>1. CAPITULO I INTRODUCCION</b> .....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema .....	3
1.3. Objetivo general .....	4
1.4. Objetivos Específicos.....	4
1.5. Justificación de la Investigación .....	5
<b>2. CAPITULO II MARCO TEÓRICO</b> .....	6
2.1. Mieloma Múltiple .....	6
2.1.1. Origen.....	6
2.1.2. Incidencia y epidemiología.....	7
2.1.3. Síntomas y diagnóstico.....	9
2.1.4. Tratamiento .....	10
2.1.5. Clasificación citogenética .....	11
2.1.6. Estadiaje.....	12
2.2. Alteraciones genéticas del Mieloma Múltiple.....	14
2.2.1. Gen <i>CCND1</i> .....	15
2.2.1.1. Polimorfismo A870G rs 9344 del gen <i>CCND1</i> .....	15
2.2.2. Gen <i>AURK-A</i> .....	16
2.2.2.1. Polimorfismo T1712A rs2273535.....	17
<b>3. CAPITULO III DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL</b> ....	17
<b>4. CAPITULO IV PROCEDIMIENTOS</b> .....	19
4.1 Población y muestra .....	19
4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos y evaluación .....	19
4.2.1 Extracción de ADN genómico.....	19
4.2.2 Amplificación de los polimorfismos (PCR) .....	20
4.2.3 Secuenciación y electroforesis capilar.....	22
4.2.4 Alineamiento de las secuencias.....	24

4.3.	Asociación de los datos clínicos y genéticos.....	24
4.3.1.	Parámetros Inmunológicos .....	24
4.3.2.	Parámetros hematológicos .....	25
4.4.	Análisis Estadístico .....	26
4.4.1.	Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	26
4.4.2.	Odds ratio .....	26
4.4.3.	Asociación de las historias clínicas con los datos ggenotípicos ...	27
<b>5.</b>	<b>CAPITULO V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>28</b>
5.1	Extracción de ADN genómico.....	28
5.2	Amplificación de los polimorfismos PCR .....	28
5.3	Secuenciación por electroforesis capilar .....	29
5.5	Asociación de datos clínicos y genéticos.....	36
5.5.1	Edad y género .....	36
5.5.2	Clasificación citogenética.....	37
5.5.3	Tiempo de supervivencia .....	39
5.5.2	Parámetros Inmunológicos .....	40
5.5.4	Parámetros hematológicos .....	41
5.6	Análisis estadístico.....	43
5.6.1	Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	43
5.6.2	Prueba Odds Ratio .....	45
5.6.3	Asociación de datos genéticos con datos clínicos .....	46
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>49</b>
6.1.	Conclusiones .....	49
6.2.	Recomendaciones .....	49
	<b>REFERENCIAS:</b> .....	<b>51</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>63</b>

## 1. CAPITULO I INTRODUCCION

### 1.1. Antecedentes

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, de sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) han sido relacionados al mieloma múltiple en varios estadios tumorales de la enfermedad (Egan et al., 2012). Por otra parte las proteínas cinasas intervienen en los mecanismos de señalización celular, como el control del crecimiento y la división de las células (Pohl et al., 2011). Es por ello que alteraciones genéticas en las rutas metabólicas encargadas de la regulación del ciclo celular conllevan a una transformación en las células y a una futura carcinogénesis. En el cáncer las enzimas cinasas permanecen activas todo el tiempo, conllevando así a la proliferación descontrolada de células y a la aparición de tumores (Karen, 2006)

Existe una familia de cinasas denominadas Auroras que son un tipo de cinasas serina/treonina implicadas en el ciclo celular. Estas enzimas facilitan el tránsito de la fase G2 del ciclo celular a la citocinesis, la formación del huso mitótico y en la maduración y formación del centrosoma durante la mitosis. Su mal funcionamiento o sobreexpresión está estrechamente relacionado con el desarrollo de cáncer, ya que alteraciones en sus genes podría conllevar a la incapacidad de mantener un contenido cromosómico estable, contribuyendo así a la génesis tumoral (Vader & Lens, 2008). Estudiar estas enzimas es de gran utilidad en los tratamientos contra el cáncer, ya que se podrían crear fármacos que inhiban dichas enzimas para que el ciclo celular ocurra de manera correcta y las células lleguen a la apoptosis (Shi et al., 2007).

Existen tres tipos de Auroras: A, B y C, siendo las más estudiadas las dos primeras, con respecto al desarrollo de tumores y cáncer. Ciertos estudios demuestran que cambios en la enzima Aurora cinasa A altera el funcionamiento de otra proteína denominada  $\beta$ -catenina, bajando sus niveles de expresión, lo que conlleva al desarrollo de mieloma múltiple (Dutta-Simmons et al., 2009). La enzima Aurora A modula la segregación cromosómica y la

citocinesis normal en las células. Su sobreexpresión conduce a la amplificación del centrosoma, inestabilidad cromosómica, y aneuploidias contribuyendo a la progresión de varios tipos de cáncer. Se ha estudiado un polimorfismo en el gen de Aurora A, Phe31Ile el cual consiste en un cambio de adenina por timina en la secuencia genómica y está relacionado en la susceptibilidad de desarrollo tumoral. Dicho polimorfismo ha sido estudiado en otros tipos de cáncer como el cáncer oral y el cáncer de colon. La variante homocigota de este polimorfismo TT está relacionada con el carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, ovario y cáncer colorrectal hereditario. Sin embargo, no se ha observado asociación estadística con la variante heterocigótica AT para el cáncer de mama y de próstata. De hecho se ha relacionado con el buen pronóstico en el cáncer de pulmón en la población caucásica (Lee et al., 2015)

También se han hecho estudios en otra proteína importante en el ciclo celular denominada Ciclina D1. Su principal función es regular enzimas cinasas dependientes de ciclinas (CDK) en la ruta CDK1/ciclinaD1/CDK4/Rb. Esta ruta es un punto control en la proliferación celular, por lo que alteraciones genómicas en dicha ruta aumentan la inestabilidad genómica, promoviendo la descontrolada proliferación celular y por ende favoreciendo el desarrollo de células cancerígenas (Michalides, 1998). La sobreexpresión del gen de Ciclina D1 está relacionado en el desarrollo tumoral. El nivel de expresión que se ha reportado es de 4 a 5 veces mayor que los parámetros normales y por ende, se asocia al desarrollo de varios tipos de cáncer (Moyano S, Franco T, Carreño T, Robinson M, & Sánchez J, 2004). Se reportó la asociación de un polimorfismo en el gen de la Ciclina D1 con el aumento de riesgo en cáncer colorrectal en la población caucásica (Yang, Zhang, & Chen, 2012). Otro grupo de investigadores reportaron este polimorfismo como un factor de riesgo en el mieloma múltiple. (Weinhold et al., 2013). Un estudio más reciente ha demostrado que este polimorfismo en pacientes con mieloma múltiple de nacionalidad china, posee una fuerte asociación entre el alelo variante homocigótico (GG) y la susceptibilidad a desarrollar mieloma múltiple (Wang, Huang, Su, Fang, & Han, 2015). Como consecuencia de esta cambio en la secuencia genómica se produce la desregulación de la ciclina D1 la cual está

relacionada con la generación temprana de mieloma ya que causa translocaciones en la cadena pesada de la inmunoglobulina H (IgH) (Egan et al., 2012).

Finalmente se ha comprobado la alteración de los genes, *AURK-A* y *CCND1* mediante estudios de microarreglos en líneas celulares de mieloma múltiple (Elosua et al., 2008).

## **1.2. Planteamiento del problema**

El mieloma múltiple es el segundo cáncer más frecuente de tipo hematológico, representa el 10% de las neoplasias sanguíneas. Su incidencia mundial es de 4-6 casos por cada 100.000 habitantes por año, esta incidencia aumenta en la población negra (Alegre, 2004). La sociedad de cáncer americana asegura que en el año 2016 se registraron 30.280 casos nuevos. En Latinoamérica no existen muchos estudios de epidemiología de esta enfermedad, sin embargo, en Chile en el año 2007 se realizó un estudio sobre la sobrevivencia de los pacientes, se ha demostrado que las tasas de mortalidad han ido incrementando ya que en dicho país se registra 330 casos nuevos cada año (Conté L, 2007).

A pesar que existen estudios de los polimorfismos que van a ser estudiados con respecto a varios tipos de cáncer, en los genes *AURK-A* y *CCND1* a nivel mundial, en el Ecuador solo existe un estudio realizado en el 2015 del gen *AURK-A* (Montesdeoca, 2015). En cuanto al gen *CCND1* no existe ningún estudio correlacionando el polimorfismo A870G con el mieloma múltiple en el Ecuador. Esto denota la necesidad de identificar la presencia de estos polimorfismos en la población ecuatoriana.

Cabe recalcar que la mayoría de los estudios que se han realizado han sido en poblaciones caucásicas y asiáticas, por lo que se desconoce el comportamiento de estos polimorfismos en países latinoamericanos como el Ecuador, ya que como se sabe, las frecuencias polimórficas varían entre

etnias, así como el estilo de vida de las distintas poblaciones. En cuanto al estudio del mieloma múltiple en Latinoamérica, hay pocos trabajos con excepción de Argentina, Brasil, Chile y México, y desde hace poco se ha iniciado la investigación del mieloma en el Ecuador (Leone et al., 2013).

La incidencia se ha visto incrementada por que los métodos diagnósticos han ido mejorando, no así su tratamiento ya que esto únicamente se lo utiliza como paliativo en la enfermedad, mejorar la calidad de vida del paciente y así prolongar su tiempo de sobrevida. No obstante, esta es una enfermedad incurable hasta el momento y progresiva (Marín, López, Aponte y Rivero, 2003). El pronóstico de esta enfermedad se calcula de acuerdo a las etapas de la enfermedad, el máximo tiempo de vida que puede tener un paciente es de 62 meses, este tiempo puede incrementar con un trasplante de células madre hematopoyéticas autólogas (Gómez, et al., 2010), sin embargo, no todas las personas tienen los recursos económicos suficientes para acceder a esta intervención.

### **1.3. Objetivo general**

Evaluar los polimorfismos de nucleótido simple en los genes Aurora cinasa A y Ciclina D1 en pacientes con Mieloma Múltiple de la población ecuatoriana.

### **1.4. Objetivos Específicos**

Identificar los polimorfismos de nucleótido simple en pacientes con mieloma múltiple mediante técnicas moleculares.

Correlacionar la presencia de los polimorfismos con el desarrollo de mieloma múltiple mediante la comparación de muestras control de personas sanas.

Asociar los datos genéticos con la historia clínica de cada paciente con mieloma múltiple mediante pruebas estadísticas.

### **1.5. Justificación de la Investigación**

La evaluación del comportamiento de los polimorfismos en genes afectados en personas con mieloma múltiple permitirá que a largo plazo se pueda implementar una herramienta de diagnóstico a nivel molecular. Además, conocer el comportamiento de los mismos en la población ecuatoriana, ayudará a proyectos relacionados con el estudio del genoma, el conocimiento de los cambios a nivel de las secuencias y como se expresan a través del fenotipo.

Por otro lado, dado que el mieloma múltiple no es una enfermedad común en el Ecuador, este estudio aportará a conocer las frecuencias alélicas que existen en la población ecuatoriana.

Conocer genómicamente como actúan estos genes relacionados en el ciclo celular ayudaría a mejorar los tratamientos para contrarrestar el cáncer ya que si se inhiben estos genes se podrían desarrollar tratamientos personalizados con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes y evitar el desarrollo de metástasis.

Finalmente, este estudio ayudaría a la investigación en el desarrollo de fármacos menos invasivos y más precisos para contrarrestar la enfermedad de acuerdo al daño que el paciente tenga. El desarrollo de fármacos personalizados representaría un ahorro para las entidades de salud, ya que dichos tratamientos serían más acertados y económicamente viables. A su vez esto mejoraría la calidad de vida de los pacientes que sufren los tratamientos comunes de quimioterapia que se realizan.

## 2. CAPITULO II MARCO TEÓRICO

### 2.1. Mieloma Múltiple

#### 2.1.1. Origen

El mieloma múltiple es una neoplasia hematológica en donde las células plasmáticas proliferan de manera descontrolada. Las células plasmáticas son un tipo de glóbulo blanco que se originan a partir de los linfocitos B cuando estos tienen contacto con un agente extraño denominado antígeno. Estas células plasmáticas se forman en la médula ósea (Welsch & Sobotta, 2008). La maduración de los linfocitos B da como resultado la expresión de anticuerpos denominados inmunoglobulinas en la membrana plasmática los cuales tienen como finalidad combatir distintos tipos de infecciones (Figura 1) (Fainboim & Geffner, 2005).

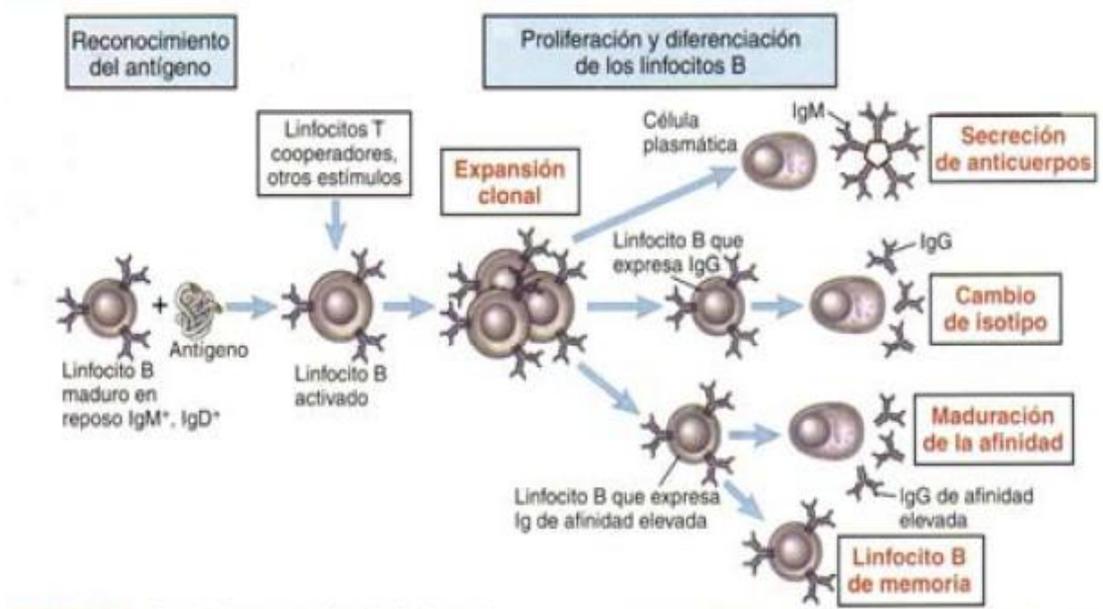


Figura 1. Desarrollo de una célula plasmática a partir de un linfocito B

Tomado de: (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015)

El incremento anormal de dichas células ocasiona un tumor denominado plasmocitoma, el cual se localiza en la medula ósea. Debido a la expresión de inmunoglobulinas, en el mieloma múltiple se produce una paraproteína monoclonal, es decir la producción de un solo tipo de inmunoglobulina (García-Sanz, Mateos, & San Miguel, 2007). Clasificando al mieloma múltiple en dos tipos dependiendo de la inmunoglobulina secretada (Durie, 2004) como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.**

*Clasificación del mieloma de acuerdo a la inmunoglobulina secretada*

<b>INMUNOGLOBULINA SECRETADA</b>	<b>TIPO DE MIELOMA MULTIPLE</b>
IGG O IGA	Bence-Jones
IGM	Waldenstrom's macroglobulinemia

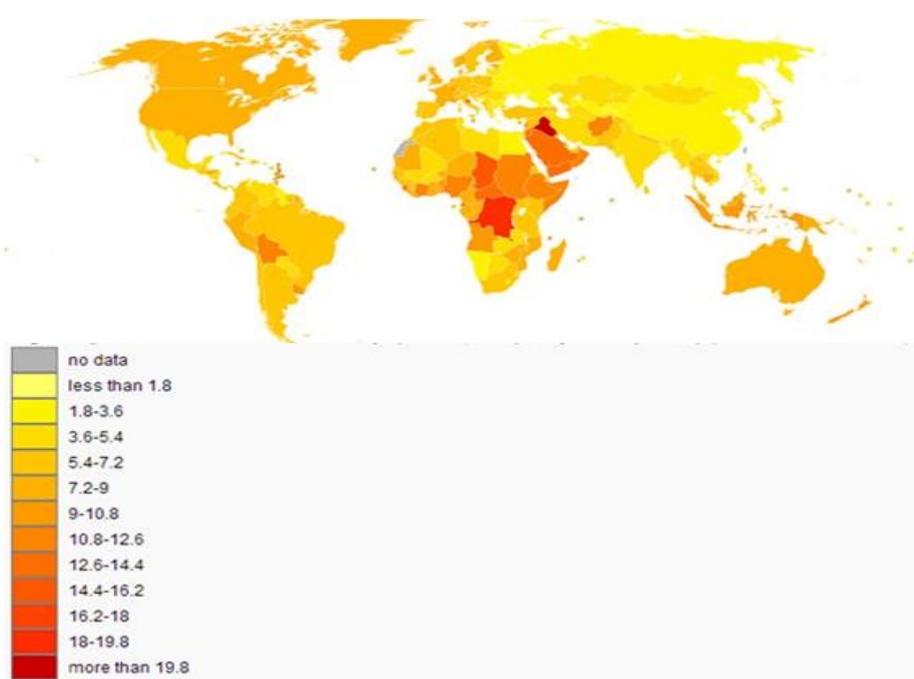
Adaptada de (Durie, 2004)

### **2.1.2. Incidencia y epidemiología**

El mieloma múltiple corresponde al 1 % de todos los tipos de cáncer. La incidencia de la enfermedad en Estados Unidos es de 5.3 casos nuevos de cada 100.000 habitantes por año, en Asia es de < 1 casos nuevos de cada 100.000 habitantes por año y en África es de 9.5 casos nuevos de cada 100.000 habitantes por año, de acuerdo a la Sociedad Americana de Cáncer. En la figura 2 se muestran las tasas de mortalidad de la enfermedad a nivel mundial (Durie, 2004). Siendo los individuos de raza negra los que presenta mayor riesgo al desarrollo de la enfermedad, con respecto a otras poblaciones (García-Sanz et al., 2007).

La edad de aparición del mieloma múltiple oscila entre los 60 y 70 años. Sin embargo, también puede aparecer de manera rara en individuos menores a 40 años, siendo un 15 % de pacientes ubicados en esta categoría. Con respecto al género, los hombres tienen mayor incidencia en el desarrollo de mieloma múltiple con respecto a las mujeres (Alexander et al., 2007).

En el Ecuador los datos de epidemiología son escasos, la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer, SOLCA lleva un Registro Nacional de Tumores, donde señala que el mieloma múltiple está entre los primeros 25 tumores a nivel nacional. Los datos que se tienen reportados van entre el 2006 y el 2010, se registraron 155 casos de los cuales 91 fueron del género masculino y 64 del género femenino (Cueva y Yépez, 2014) En el Ecuador la tasa de incidencia de la enfermedad es menor en comparación con otros países latinoamericanos como Chile y México, debido a que la enfermedad no es diagnosticada a tiempo (Montesdeoca, 2014).



*Figura 2.* Tasas de mortalidad por edad de linfomas: mieloma múltiple por país (por 100.000 habitantes).

Tomada de: (Durie, 2004)

### 2.1.3. Síntomas y diagnóstico

Esta enfermedad causa manifestaciones clínicas tales como: dolores y lesiones óseas, anemia, hipercalcemia, problemas renales, entre otros. El primer síntoma que aparece es el dolor óseo el cual mayoritariamente se origina en la columna vertebral, costillas y extremidades. El dolor óseo se presenta mayoritariamente en huesos con gran cantidad de medula ósea. Un 50 % de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple presentan anemia moderada: 10 g/dL de hemoglobina; y un 25 % presentan anemia grave < 8 g/dL (Ludwig et al., 2004).

Una de las posibles causas de que se presenten bajos niveles de hemoglobina es la invasión masiva de la medula ósea y el déficit de vitamina B12 (García-Sanz et al., 2007). Por lo general la anemia conlleva a otros síntomas como son la pérdida de peso y astenia que es la fatiga crónica, que por lo general se presenta en pacientes oncológicos (Barón & Gallego, 2004)

Otro de los síntomas más frecuentes es el fallo renal ocasionado por la eliminación de las cadenas ligeras de Ig o por la hipercalcemia generada debido a las lesiones óseas. Esta insuficiencia renal es tratable en el 50 % de los pacientes con mieloma múltiple. El fallo renal se ve reflejado en el incremento de los niveles de creatinina > 2 mg/dL. Al menos uno de cada 15 pacientes con mieloma múltiple presenta este incremento en el nivel de la misma (Bladé & Rosiñol, 2005). Otro parámetro relacionado con el fallo de los riñones es el aumento de los niveles de urea en sangre (BUN) de sus siglas en inglés: *Blood urea nitrogen* (Dvorkin, Dvorkin, & Cardinali, 2010).

Los valores altos de lactato deshidrogenasa revelan que ocurren alteraciones celulares generando diagnósticos más agresivos del mieloma (García-Sanz et al., 2007). Por otro lado, el factor hematológico más importante en el diagnóstico de la enfermedad es el nivel de Beta 2 microglobulina, que se considera como un marcador tumoral. Esta proteína forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad y se expresa en todas las células principalmente en aquellas pertenecientes a una línea tumoral. El valor de esta proteína

aumenta en enfermedades linfoides como es el caso del mieloma múltiple (Rivera, 1997). Es por eso que el nivel sérico de la misma en pacientes con mieloma múltiple se ha considerado esencial en el manejo clínico de dicha enfermedad (Kanemasa et al., 2016).

Los parámetros inmunológicos son de suma importancia en el diagnóstico del mieloma múltiple. Esto se hace mediante un proteinograma el cual es un estudio electroforético de proteínas donde se analizan dos tipos de proteínas presentes en el suero: globulinas y albuminas (Bermejo & García, 2006). Este estudio es indispensable para conocer la presencia del anticuerpo monoclonal, presentándose el isotipo IgG en el 60 % de los casos, IgA en el 30 % de los casos, el IgD en el 2 %, y los isotipos IgE e IgM en menos del 1 %. Por otro lado el nivel bajo de albumina es un signo de mieloma múltiple avanzado y mal pronóstico (García-Sanz et al., 2007).

Para hacer estudios más especializados se realiza una biopsia medular la cual consiste en una punción a nivel del esternón para la extracción de la medula del hueso. Con la muestra de la medula se puede realizar un recuento total de las células sanguíneas y por ende las células plasmáticas, también se realiza el análisis del cariotipo y pruebas más específicas como la hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés *Fluorescence in-situ hybridization*) (Chernecky y Berger, 2013) (Vajpayee, et al. 2011).

#### **2.1.4. Tratamiento**

El pronóstico de vida de un paciente con mieloma múltiple que no recibe tratamiento con quimioterapia es de 7 meses, las opciones terapéuticas están basadas en la quimioterapia y en el trasplante de células hematopoyéticas. Una de las quimioterapias que se realizan es la denominada VAD, la cual es eficaz para pacientes ambulatorios, esta consta de tres medicamentos: vincristina, doxorubicina y dexametasona; con este tratamiento la mediana de vida de los pacientes aumenta a aproximadamente 36 meses (Anderson, et al. 1995).

También se suministra fármacos inmunomoduladores como la talidomida, esta ayuda a detener la proliferación de células y aumenta de la secreción de interferón- $\gamma$  (Davies, et al. 2001). Esta se suele combinar con la dexametasona, esta combinación ha demostrado tasas de respuesta significativamente superiores en el mieloma recién diagnosticado en comparación con la dexametasona sola (Rajkumar, et al., 2006).

Los pacientes con trasplante de células hematopoyéticas presentan mejor tasas de supervivencia (Vela y García, 2005). Esta tasa puede llegar a 7 años, el trasplante igualmente va acompañado de quimioterapia con talidomida o melfalán en menores dosis, sin embargo, este tiempo de supervivencia está relacionado con los parámetros hematológicos de cada paciente como la lactato deshidrogenasa y el nivel de albumina sérica (Barlogie, et al., 2006).

### 2.1.5. Clasificación citogenética

El mieloma múltiple además de presentar alteraciones a nivel clínico como se mencionó anteriormente puede hacerlo a nivel genético y cromosómico, esta última revelada en el cariotipo. Eventos como las translocaciones, deleciones e hiperdiploidia son muy comunes en esta enfermedad (Mateo et al., 2005). De acuerdo a estas alteraciones cromosómicas el mieloma múltiple posee otra clasificación, la cual es importante para el tratamiento (Kaufman et al., 2016). Por ejemplo, dependiendo de la translocación que se presente el nivel de riesgo varía en la enfermedad como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.**

*Nivel de riesgo del mieloma en relación a la translocación cromosómica*

<b>TRANSLOCACIÓN</b>	<b>NIVEL DE RIESGO</b>
<b>T (14; 16) Y T (14; 20)</b>	Alto riesgo
<b>T (4; 14)</b>	Riesgo intermedio

<b>T (11; 14) Y T (6; 14)</b>	Riesgo estándar
-------------------------------	-----------------

Adaptada de: (Kaufman et al., 2016)

El mieloma múltiple tiene una clasificación a gran escala: hiperdiploide y no hiperdiploide. El mieloma de tipo hiperdiploide se caracteriza por la existencia de trisomías en cromosomas impares. Por lo general el mieloma del tipo hiperdiploide es menos agresivos que el de tipo no hiperdiploide ya que los pacientes tienen un mayor tiempo de sobrevida y la progresión de la enfermedad es lenta (Conté, 2009).

Por otro lado, el de tipo no hiperdiploide se caracteriza por la presencia de translocaciones cromosómicas mencionadas en la tabla 2 (Braggio & Albarracín, 2013). La translocación t (11; 14) y t (6; 14) produce la sobreexpresión del gen de Ciclina D1 y como se muestra en la tabla 2 tienen un riesgo estándar o neutro. La translocación t (4; 14) se detecta en el 15 % de los pacientes, los cuales tienen un tiempo de sobrevida menor. Y por último las translocaciones t (14; 16) y t (14; 20) está presente entre el 2 % y 10 % de los pacientes, en este tipo de mieloma existe una sobreexpresión de la proteína *c-maf* la cual estimula la progresión en el ciclo celular mediante la sobreexpresión de Ciclina D2, es por ello que los pacientes que presentan esta translocación tienen un peor pronóstico (Conté, 2009).

### **2.1.6. Estadiaje**

Para conocer cuan avanzado está el cáncer se ha realizado una clasificación por estadios, con el fin de determinar el pronóstico de la enfermedad y los tratamientos a realizarse (Lonial, 2009). El primer sistema de clasificación por etapas se introdujo en 1975, se lo denominó Durie-Salmon, este sistema clasifica de acuerdo a parámetros clínicos que predicen la carga tumoral de células de mieloma, entre los factores de clasificación están: el tipo de proteína monoclonal, la hemoglobina, el nivel de calcio y el número de lesiones óseas y

la creatinina sérica. En los años ochenta se buscó realizar una clasificación más objetiva que vaya de acuerdo al tratamiento que requerían los pacientes, en esta nueva clasificación se incluyó el nivel de Beta2-microglobulina como un factor imprescindible y fiable para la clasificación de la enfermedad, también se incluyó otros factores como el nivel de albúmina y daños a nivel del cariotipo (Greipp, et al., 2005). En la tabla 3 se observa los parámetros que se toman en cuenta para las dos clasificaciones del mieloma múltiple.

**Tabla 3.**

*Criterios para la clasificación del mieloma múltiple según Durie-Salmon y el Sistema Internacional de Estadaje (ISS).*

	<b>Durie-Salmon (DS)</b>	<b>Sistema Internacional (ISS)</b>
<b>ESTADIO</b>	<b>CRITERIOS</b>	
<b>I</b>	Hemoglobina > 10 g/dL Niveles de calcio normal o < 10.5mg/dL IgG < 5 g/dL IgA < 3 g/dL	$\beta_2$ -microglobulina < 3.5 mg/L Albúmina $\geq$ 3.5 g/dL
<b>II</b>	No estadio I ni III	$\beta_2$ -microglobulina < 3.5 mg/L Albúmina < 3.5 g/dL
		$\beta_2$ -microglobulina entre 3.5 – 5.5 mg/L No se toma en cuenta el nivel de albúmina

<b>III</b>	Hemoglobina < 8.5 g/dL Calcio > 12 mg/dL IgG < 7 g/dL IgA < 5 g/dL	$\beta_2$ -microglobulina > 5.5 mg/L
------------	---	---

Adaptada de: (Lonial, 2009) y (Greipp, et al., 2005).

## 2.2. Alteraciones genéticas del Mieloma Múltiple

Las translocaciones que se presentan en el cariotipo tienen repercusiones a nivel genómico, activando onco-genes. Entre los genes que se ven afectados están: *CCND1*, *FGFR*, *CMAF*, *MAFB* y *CCND3*; estos genes se encuentran sobreexpresados debido a las translocaciones que ocurren en el cariotipo de los pacientes (Chapman, et al. 2011). (Braggio & Albarracín, 2013). También se está realizando la secuenciación completa del genoma o del exoma con el fin de identificar mutaciones somáticas en los pacientes.

Como ya se mencionó anteriormente las enzimas Auroras cinasas desempeñan un papel fundamental en que el ciclo celular se desarrolle correctamente. La inhibición de estas enzimas principalmente la enzima Aurora cinasa A codificada por el gen *AURK-A* ayuda a detener la proliferación descontrolada en células del mieloma (Shi et al., 2007) (Dutta-Simmons et al., 2009).

En el estudio amplio de la asociación del genoma (GWAS de sus siglas en inglés *Genome-wide association study*) se puede estudiar en que sitios existen alteraciones genéticas y poder relacionarlas con la iniciación y progresión del mieloma (Mitchell, et al., 2016). Este estudio ayuda a conocer como se desregula el plasma en las células y que esto de lugar a las características que presenta el mieloma, y también permite saber cómo un tratamiento actúa de manera molecular y así mejorar los mismos (Morgan, 2012). Este estudio ha ayudado a identificar SNPs en el gen *AURK-A* que posiblemente estén asociados con algún tipo de enfermedad por ejemplo en un estudio en el 2015 ayudo a encontrar 20 polimorfismos asociados al cáncer de mama (Taylor, et al., 2015). Gracias a este estudio se ha asociado el gen *AURK-A* en infartos

cerebrales y alzhéimer (Chauhan, et al., 2015). Con respecto al gen *CCND1* gracias el estudio de GWAS se ha encontrado una asociación de nuevos polimorfismos en melanoma (Peña-Chilet, et al., 2013). Gracias a este estudio se ha confirmado la sobreexpresión del gen de la Ciclina D1 en pacientes con mieloma múltiple (Purdue, et al., 2011)

En este estudio se evaluaron los genes *CCND1* y *AURK-A*, con respecto al último gen en el 2014 se inició con el estudio de polimorfismos en el mismo en el IIB y se pretende seguir avanzando con el mismo.

### 2.2.1. Gen *CCND1*

El gen *CCND1* encuentra en el cromosoma 11 en la banda q 13 (figura 3), tiene aproximadamente 20370 pb, codifica para la proteína Ciclina D1 la cual pertenece a una familia de proteínas encargadas de la regulación de enzimas cinasas dependientes de ciclinas. Estas enzimas están involucradas en el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular durante la mitosis, por lo que las proteínas ciclinas contribuyen a la coordinación correcta de los eventos mitóticos. La inhibición de Ciclina D1 detiene el ciclo celular, entretanto que su sobreexpresión acelera la transición a la fase S. En varios cánceres humanos se ha visto alterado este gen con una expresión anormal de su proteína (Wang et al., 2015).

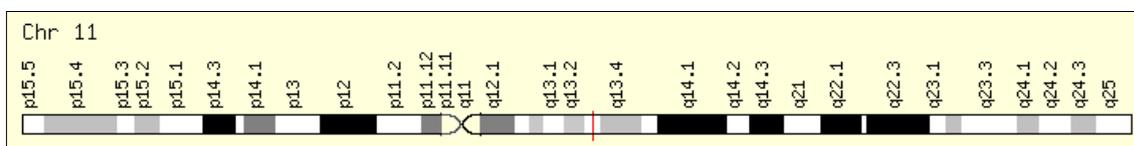


Figura 3. Posición del gen *CCND1* en el cromosoma 11

Tomada de: (Genecards, sf)

#### 2.2.1.1. Polimorfismo A870G rs 9344 del gen *CCND1*

El polimorfismo A870G está situado en el codón 242 entre el intrón 4 y el exón 5. Varios estudios indican que el genotipo AA está relacionado a cánceres

específicos como: carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello y cabeza, carcinomas esofágicos y cáncer de próstata y vejiga. Los individuos que presentan este genotipo tienen un mal pronóstico comparado con los que presentan los genotipos GA y GG (Solomon et al., 2003). El genotipo GA ha sido asociado con el desarrollo de metástasis en pacientes turcos con cáncer colorrectal (Eraltan, et al., 2010). En la mayoría de estudios no se encuentra relación del genotipo GG con el desarrollo de cáncer (Hussain, et al., 2011), sin embargo, en estudio en el 2010 reporto que la variante GG está asociada a la susceptibilidad genética al carcinoma nasofaríngeo (Catarino, et al., 2006).

### 2.2.2. Gen *AURK-A*

El gen *AURK-A* está localizado en el cromosoma 20, banda q 13.2 como se muestra en la figura 4. Codifica para la proteína Aurora cinasa A, esta proteína al igual que la Ciclina D1 está involucrada en el ciclo celular ya que regula el paso de la fase S a la fase M, así como la maduración y separación del centrosoma y la alineación cromosómica en la mitosis. Este gen desempeña un papel fundamental en la progresión y desarrollo tumoral (Dar, Goff, Majid, Berlin, & El-Rifai, 2010).

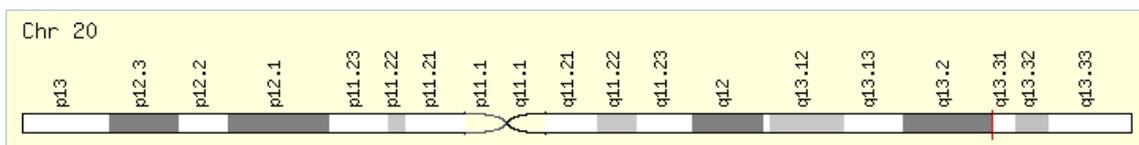


Figura 4. Posición del gen *AURK-A* en el cromosoma 20

Tomada de: (Genecards, sf)

### **2.2.2.1. Polimorfismo T1712A rs2273535**

Este polimorfismo presenta un cambio en la base nitrogenada adenina por timina. Está relacionado en la susceptibilidad de desarrollo tumoral. El polimorfismo T1712A conocido comúnmente como: Phe31Ile ha sido estudiado en otros tipos de cáncer como el cáncer oral y el cáncer de colon y recientemente en el cáncer de mama. La variante homocigota de este polimorfismo TT está relacionada con el carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, ovario y cáncer colorrectal hereditario. Cabe recalcar que la variante heterocigótica AT está relacionado con el buen pronóstico en el cáncer de pulmón en la población caucásica (Lee et al., 2015). El genotipo AA al ser el alélelo común no está relacionado en el desarrollo de cáncer, o presenta riesgos significativamente reducidos en el caso de cáncer de pulmón (Gu, et al., 2007).

## **3. CAPITULO III DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL**

Se realizó un muestreo por conveniencia donde la población que se estudió fue del banco de muestras que dispone el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). De esta población se analizó una muestra correspondiente a la de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple por centros de salud externos al IIB como son el Hospital Carlos Andrade Marín y el Hospital Oncológico Solca. La variable dependiente que se estudió es la presencia de mieloma múltiple y la variable independiente fue la presencia de SNPs. Estas variables se estudiarán en las muestras de los pacientes diagnosticados y en muestras control de 2 etnias distintas del Ecuador: mestizos y negros, estos últimos obtenidos de dos zonas distintas del país: Valle del Chota y la Provincia de Esmeraldas.

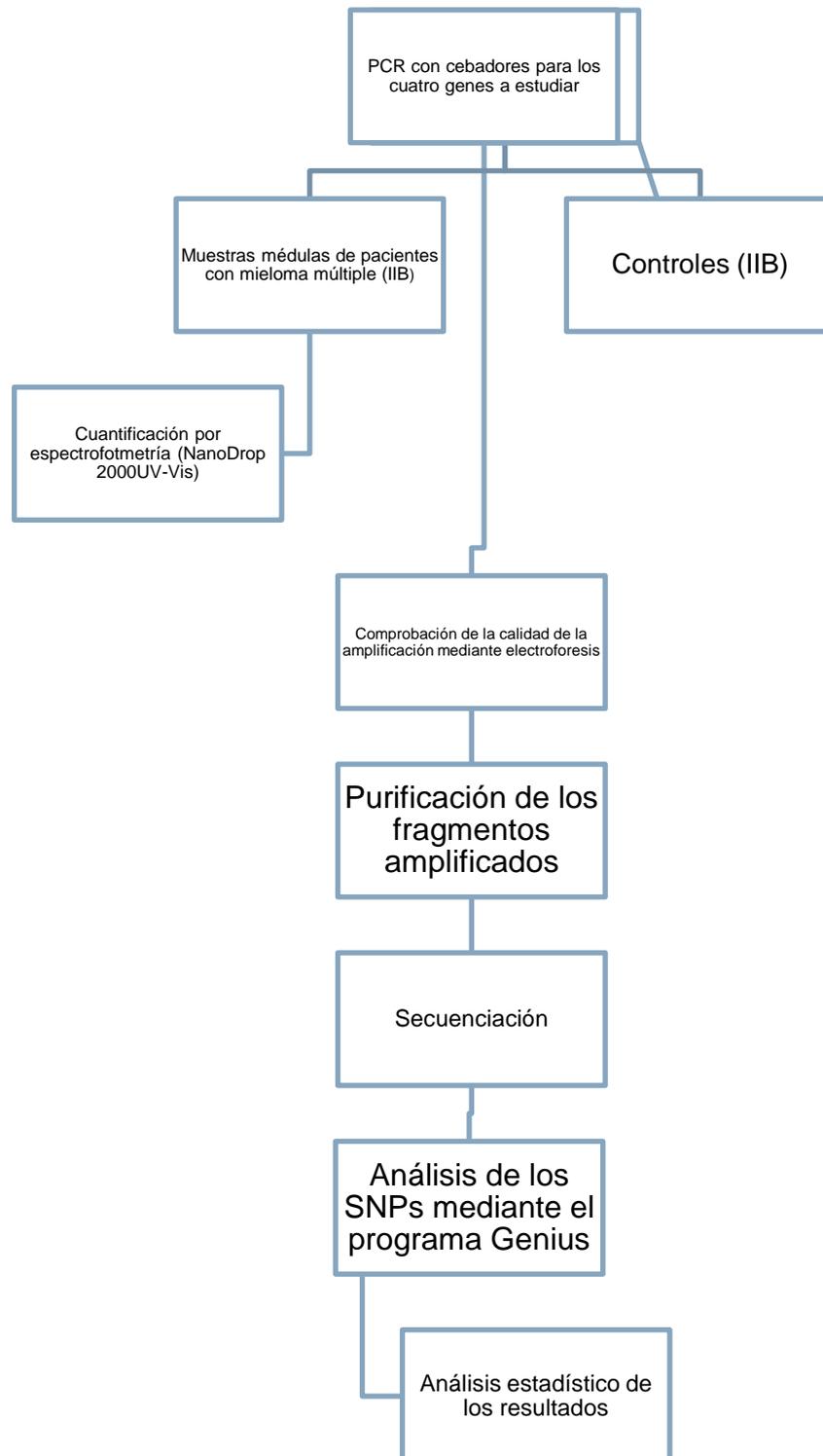


Figura 5. Procedimiento para la obtención de datos.

## 4. CAPITULO IV PROCEDIMIENTOS

### 4.1 Población y muestra

La población que se estudió fueron muestras del IIB de médula ósea de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple para su posterior extracción de ADN genómico. Dichas muestras se obtuvieron de dos hospitales de la ciudad de Quito: Hospital Carlos Andrade Marín y SOLCA. El tamaño muestral a estudiar en el presente trabajo fue de 70 muestras. También El IIB también cuenta con un banco para los controles que se van a estudiar y se estudiaron 40 controles.

Esta investigación se realizó como parte del proyecto: Estado del Mieloma Múltiple en el Ecuador, el cual está bajo la dirección de la Dra. Paola Leone. Y cuenta con la aprobación del Comité de Ética y Bioética de la Universidad de Las Américas CEBE, bajo el código: 2016-1204

### 4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos y evaluación

#### 4.2.1 Extracción de ADN genómico

A las muestras de pacientes se realizó la extracción de ADN con dos kits comerciales de acuerdo a la disponibilidad del laboratorio. Se utilizó el *High pure PCR template preparation* de la marca Roche y *PureLink® Genomic DNA* de la marca Thermo Fisher Scientific. Posterior a esto se cuantificó el ADN extraído utilizando el espectrofotómetro *Nano Drop* de la marca Thermo Fisher Scientific, USA.

#### 4.2.2 Amplificación de los polimorfismos (PCR)

Con esta concentración de ADN se procedió a realizar la amplificación de los fragmentos de los genes a estudiar mediante una PCR (Reacción de cadena polimerasa, de sus siglas en inglés *Polymerase chain reaction*). Los cebadores que se utilizaron se muestran en la tabla 4. Estos cebadores estaban previamente diseñados, para el SNP Phe31Ile por (Oña, 2014) y para el SNP A870G por (Zurita, 2014)

**Tabla 4.**

*Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de los polimorfismos de los genes AURK-A y CCND1*

<b>GEN</b>	<b>SNP</b>	<b>CEBADORES</b>
<b>Aurora cinasa A</b>	<b>Phe31Ile</b>	Forward: 5' CTTTCATGAATGCCAGAAAGTT 3' Reverse: 5' CTGGGAAGAATTTGAAGGACA 3'
<b>Ciclina D1</b>	<b>A870G</b>	Forward: 5' ACACCTAGTGCCACGGAAATG 3' Reverse: 5' CAGGAAGTTGTTGGGGCTCCT 3'

En este trabajo de investigación se realizó un master mix para el número total de muestras obtenidas de acuerdo al gen a estudiar. Previa a una estandarización se obtuvieron los siguientes volúmenes por cada gen analizado:

**Tabla 5.***Master Mix para la PCR del gen AURK-A*

	<b>Aurora Cinasa A</b>		
<b>MASTER MIX</b>	<b>Ci</b>	<b>Cf</b>	<b>1X</b>
Agua MiliQ			13 $\mu$ L
Buffer 5X	5X	25X	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	40 mM	0,8 $\mu$ L
DNTPs	10 mM	10 mM	1 $\mu$ L
Primer Forward	10 $\mu$ M	15 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
Primer Reverse	10 $\mu$ M	15 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
Taq Platinum	5 U/ $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L	0,2 $\mu$ L
ADN	8 ng/ $\mu$ L	16 ng/ $\mu$ L	2 $\mu$ L

**Tabla 6.***Master Mix para la PCR del gen CCND1*

	<b>Ciclina D1</b>		
<b>MASTER MIX</b>	<b>Ci</b>	<b>Cf</b>	<b>1X</b>
Agua MiliQ			14 $\mu$ L
Buffer 5X	5X	25X	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	35 mM	0,7 $\mu$ L
DNTPs	10 mM	11 mM	1,1 $\mu$ L
Primer Forward	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Primer Reverse	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Taq Platinum	5 U/ $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L	0,2 $\mu$ L
ADN	8 ng/ $\mu$ L	16 ng/ $\mu$ L	2 $\mu$ L

Con las siguientes condiciones en el termociclador:

**Tabla 7.**

*Condiciones en el termociclador SureCycler 8800 de la marca Agilent para los genes AURK- y CCND1*

<b>Aurora Cinasa A y Ciclina D1 (38 ciclos)</b>		
Desnaturalización Inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	95°C	30 seg
Hibridación	53°C	30 seg
Elongación	72°C	45 seg
Elongación Final	72°C	3 min
	4°C	∞

Se comprobó la amplificación correcta de los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% de acuerdo a los tamaños esperados: 200 pb para el gen *AURK-A* y de 130 pb para el gen *CCND1*. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb de la marca Invitrogen.

#### **4.2.3 Secuenciación y electroforesis capilar**

Posterior a ello se procedió a la purificación los productos de PCR utilizando el sistema *Agencourt AMPure XP* de la marca *Beckman Coulter Life Sciences*. Para así realizar una segunda amplificación por PCR de secuencia donde se añadió DNTPs marcados para la secuenciación utilizando el kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* de la marca *Applied Biosystems™*. La master mix para la PCR de secuencia es igual para todos los genes a

amplificar variando las concentraciones los cebadores tal como se muestra en la tabla 7 bajo las condiciones de las tablas 6 y 7.

**Tabla 8.**

*Master Mix para la PCR de secuencia de los genes AURK-A y CCND1.*

<b>PCR de secuencia</b>			
<b>MASTER MIX</b>	<b>Ci</b>	<b>Cf</b>	<b>1X</b>
Buffer	5X	4.5X	0,9 $\mu$ L
<i>BigDye 3.1</i>			0,5 $\mu$ L
Primer Fw o Rv	1 $\mu$ M	1.5 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
ADN			3 $\mu$ L

**Tabla 9.**

*Condiciones en el termociclador para la PCR de secuencia*

<b>PASO</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>CICLOS</b>
Desnaturalización Inicial	96°C	3 min	1
Desnaturalización	96°C	6seg	25
Hibridación	50.5°C	3 seg	
Elongación	60°C	4 min	
	4°C	$\infty$	

Este producto de PCR se sometió a una segunda purificación para obtener únicamente los fragmentos de ADN marcados, mediante el sistema de purificación *Agencourt CleanSEQ* de la marca Beckman Coulter Life Sciences, USA.

Posterior a esto se distribuyó 20  $\mu$ L de ADN de cada muestra en una placa plástica de secuenciación de 96 pocillos, la cual se colocó en el secuenciador de la marca ABI *Applied Biosystems*, después de aproximadamente 24 horas

se obtuvieron las secuencias y se procedió a realizar el alineamiento de las mismas.

#### 4.2.4. Alineamiento de las secuencias

Para encontrar los polimorfismos a estudiar se alineo las secuencias obtenidas utilizando el software bioinformático *Geneious* de la compañía Biomatters Limited, Nueva Zelanda. Este software permitió la visualización de las regiones de las secuencias donde existía alguna variación.

### 4.3. Asociación de los datos clínicos y genéticos

#### 4.3.1. Parámetros Inmunológicos

Los datos obtenidos de las secuencias de los genes estudiados se asociaron con los datos de las historias clínicas de cada paciente. Como ya se mencionó los valores inmunológicos son importantes para conocer qué tipo de clasificación presenta cada paciente. Es por ello que es importante conocer los rangos normales de cada parámetro inmunológico como se muestra en la tabla 10 para según estos comparar los datos obtenidos en las historias clínicas de cada paciente.

#### Tabla 10.

*Parámetros inmunológicos a tomar en cuenta para la asociación de los resultados*

Parámetros	Rango Normal
IgG (mg/dL)	751 - 1560

IgA (mg/dL)	82 - 453
IgM (mg/dL)	46 - 304
IgE (mg/dL)	20-87

Tomada de: (Valores Normales, sf)

#### 4.3.2. Parámetros hematológicos

También se tomó en cuenta los parámetros hematológicos como: urea, creatinina, albumina y la clasificación citogenética. Debido a que son características que sirven para el diagnóstico de la enfermedad. Asimismo, se clasificó a los pacientes por edad y género. Al igual que los parámetros inmunológicos en la tabla 11 se muestran los rangos normales de los parámetros hematológicos, los mismos que sirvieron para la comparación con los datos de las historias clínicas de los pacientes con mieloma múltiple.

#### Tabla 11.

*Parámetros inmunológicos a tomar en cuenta para la asociación de los resultados*

Parámetro	Rango Normal
Hemoglobina (g/dL)	12 – 17
Creatinina (mg/dL)	0.5 – 0.14
Urea (mg/dL)	10 - 40
Albumina (g/dL)	3.5 – 5.5
Calcio (mg/dL)	8.1 - 11.8
Beta 2 microglobulina (B2M) (ng/dL)	607- 2454

Tomada de: (Avallanet, Cuenca, Pastor y Jordana, 2007, p. 499)

#### **4.4. Análisis Estadístico**

Para el análisis de los resultados obtenidos se realizaron las siguientes pruebas estadísticas: Equilibrio de Hardy-Weinberg, Odds Ratio y Kruskal-Wallis.

##### **4.4.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg.**

La ley de Hardy Weinberg es utilizada para calcular la variación genética de una población que se encuentra en equilibrio. Esta ley establece que la variación genética en una población se mantendrá constante (en equilibrio) de generación en generación hasta que exista un factor que perturbe este equilibrio. La ecuación de Hardy-Weinberg se expresa como:

(Ecuación 1)

Donde “p” es la frecuencia genotípica del alelo homocigoto dominante, “pq” representa la frecuencia genotípica del alelo heterocigoto y “q” es la frecuencia fenotípica del alelo homocigoto recesivo (Education, 2014) Los resultados de esta prueba se comprobaron usando la prueba  $\chi^2$ .

##### **4.4.2. Odds ratio**

El Odds ratio OR es una medida de asociación entre una exposición y un resultado (Szumilas, 2010). Se lo puede definir como la proporción entre dos posibilidades. Es utilizada en estudios de casos-controles o estudios epidemiológicos (Lang & Secic, 2006) y sirve para expresar las probabilidades de que se produzca un resultado debido a una exposición particular en comparación con las probabilidades de que dicho resultado se produzca en ausencia de esa exposición.(Cerdeira, Vera, & Rada, 2013) (Szumilas, 2010). El resultado de esta medida estadística es la presencia de una enfermedad y se lo interpreta de la siguiente forma:

OR = 1 La exposición no afecta las probabilidades de resultado

OR > 1 Exposición asociada con mayores probabilidades de resultado (factor de riesgo)

OR <1 Exposición asociada con probabilidades menores de resultado (no es un factor de riesgo)

Y se calcula con la siguiente formula:

$$OR = \frac{a/c}{b/d} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Dónde:

a = Número de casos expuestos

b = Número de controles expuestos

c = Número de casos no expuestos

d = Número de controles no expuestos

#### **4.4.3. Asociación de las historias clínicas con los datos genotípicos**

Para la asociación de los parámetros clínicos tanto hematológicos como inmunológicas se utilizó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis. Esta prueba se utiliza cuando los datos no se comportan de una manera normal y por ende no se puede utilizar un ANOVA (Fernández, 2001), como es el caso del presente estudio.

## 5. CAPITULO V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Extracción de ADN genómico

Al momento de la cuantificación de ADN de cada muestra se obtuvieron concentraciones variables de cada una, es por eso que se realizaron alícuotas a una concentración final de 8 ng/μL en un volumen de 20 uL. Las muestras de los controles de la población mestizos y la población afroecuatoriana de la zona del Chota se diluyeron a una concentración de 10 ng/μL, y debido a que las concentraciones de las muestras de la población afroecuatoriana de la provincia de Esmeraldas tenían concentraciones muy bajas no se realizaron diluciones de estas.

### 5.2 Amplificación de los polimorfismos PCR

Las amplificaciones de los fragmentos a estudiar se observaron en corridas de geles de agarosa al 2%. Donde el tamaño del fragmento amplificado del gen *AURK-A* fue de aproximadamente 163 pb (figura 6), el fragmento del gen *CCND1* mostro un tamaño de 136 pb (figura 7).

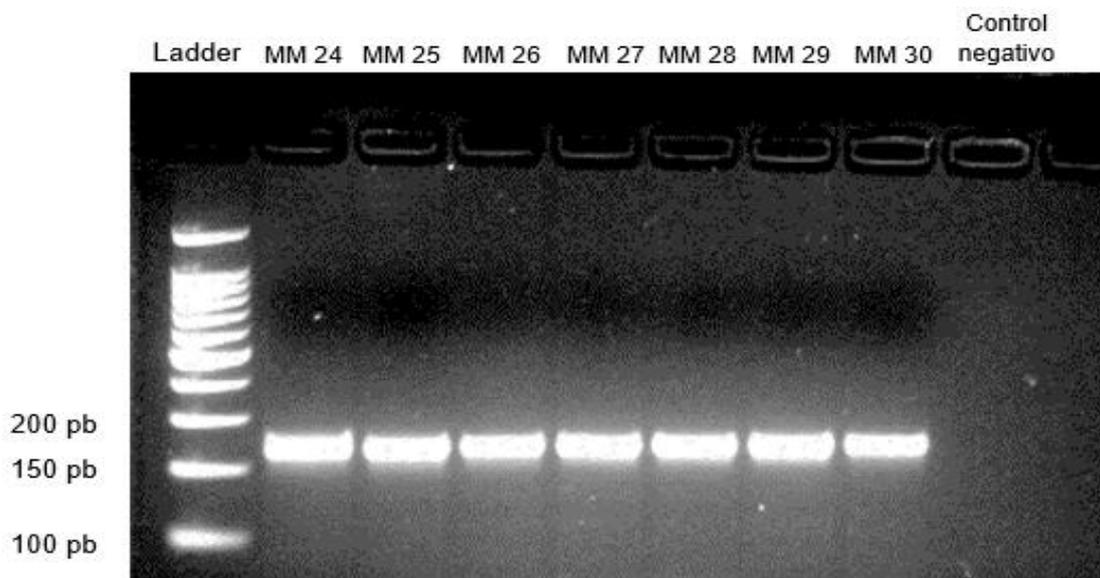


Figura 6. Electroforesis de los fragmentos del gen *AURK-A*.

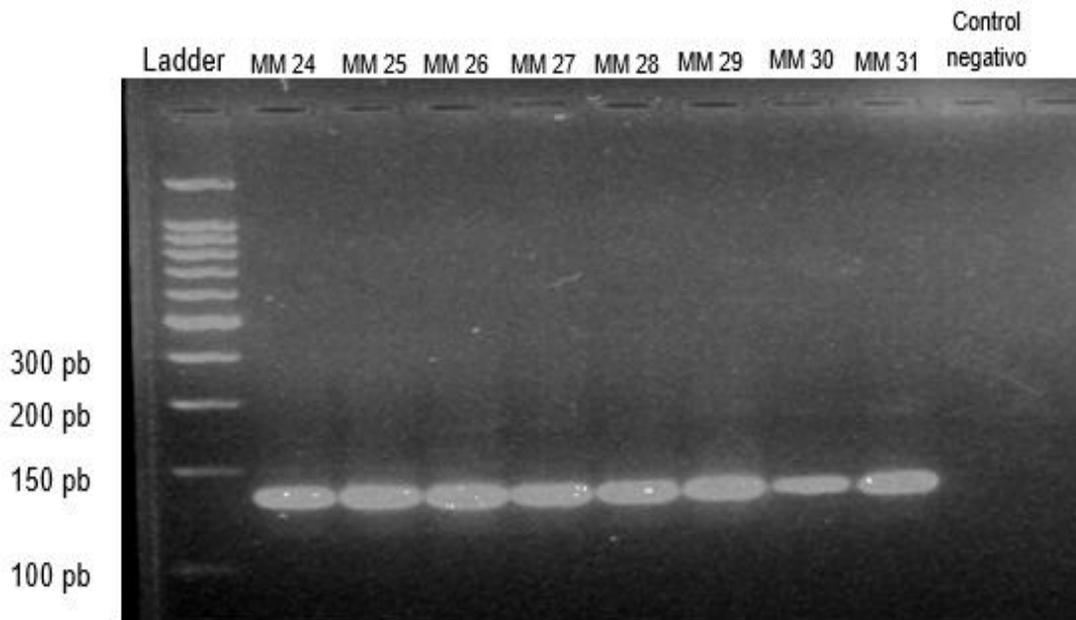


Figura 7. Electroforesis de los fragmentos del gen *ccd1*

### 5.3 Secuenciación por electroforesis capilar

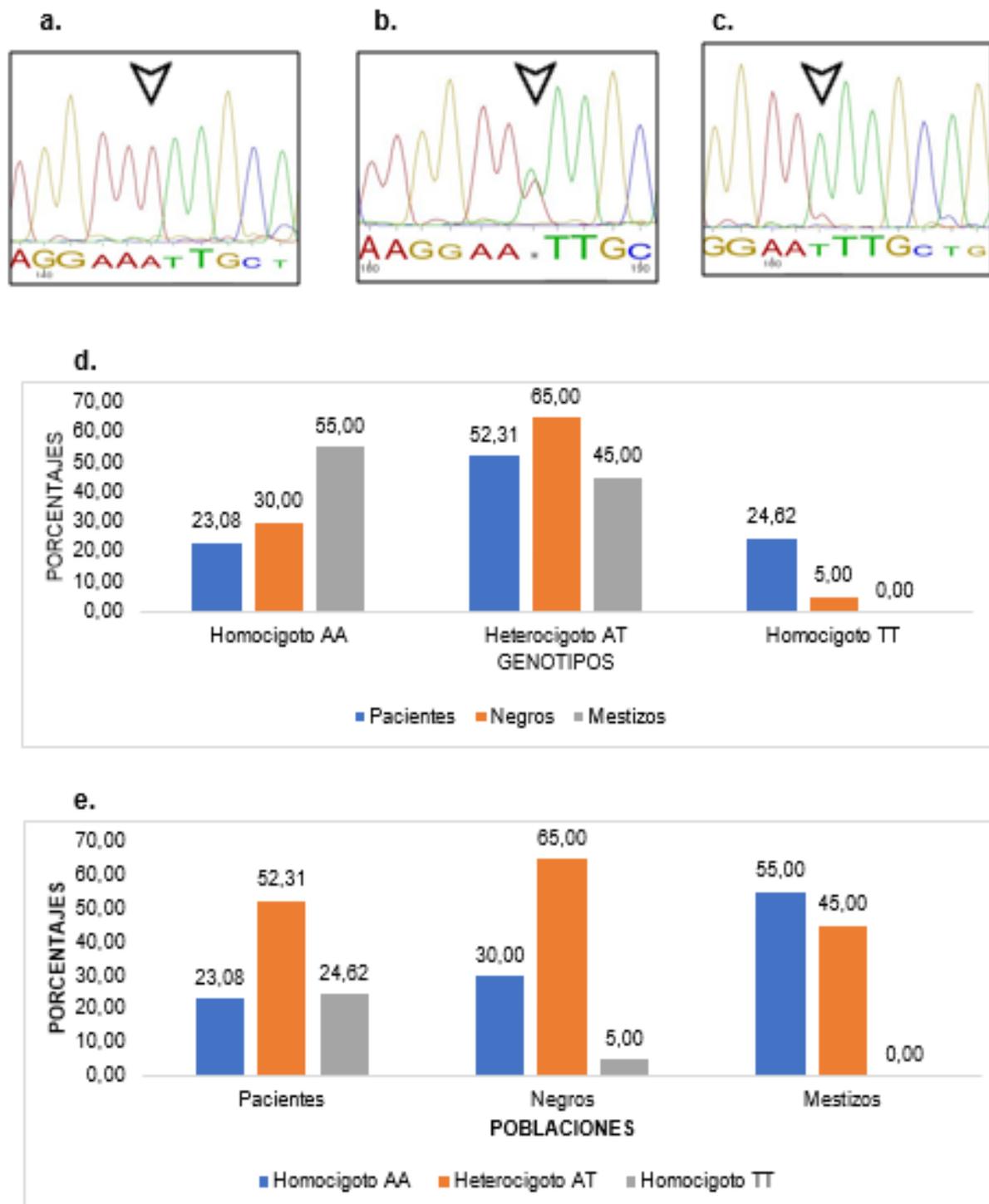
Los resultados obtenidos para el polimorfismo Phe31Ile rs2273535 del gen AURK-A se muestran en la figura 8. Se observan los porcentajes obtenidos para el homocigoto común (AA), heterocigoto (AT) y homocigoto polimórfico (TT); tanto de pacientes como de los controles estudiados, después del alineamiento de las secuencias obtenidas como se muestra en la figura 9 y 16.

Se puede observar que el alelo no mutado (AA) está presente en un 23.08 % del grupo de pacientes, este se encuentra mayoritariamente en los controles mestizos con un 56 % y en el grupo control de la población afroecuatoriana se encuentra en un 30 %. En el estudio previo que se realizó en el IIB se encontró que el alelo común (AA) estuvo presente en el 21 % de la población afectada (Montesdeoca, 2014).

El alelo heterocigoto predomina tanto para los pacientes con mieloma múltiple como para el grupo de controles de personas afroecuatorianas 52.31 % y 65 %

respectivamente. El grupo control de mestizos presento un 45 % este polimorfismo.

El alelo polimórfico (TT) está presente en un 24.62 % de la población afectada, en un 5.26 % de la población control afroecuatoriana y no se encontró este polimorfismo en el grupo control de mestizos. Esta aparición del alelo polimórfico en la población control afroecuatoriana pudo deberse a que según datos epidemiológicos la población africana tiene más incidencia en el desarrollo del mieloma múltiple: 9.5 casos nuevos de cada 100.000 (García-Sanz et al., 2007). Éstos datos sugieren que las personas afroamericanas son dos veces más propensas a ser diagnosticadas con mieloma múltiple en comparación por ejemplo con las personas europeas americanas, un estudio en el 2013 demostró que a pesar de que los individuos afrodescendientes tengan más incidencia en el desarrollo de la enfermedad estos suelen tener versiones menos agresivas de la misma (Baker, et al., 2013).



**Figura 8.** Distribución del polimorfismo Phe31Ile del gen *AURK-A* en la población de estudio

- Electroferograma para el homocigoto común AA
- Electroferograma para el heterocigoto AT
- Electroferograma para el homocigoto polimórfico TT
- Distribución porcentual de los genotipos en pacientes con mieloma múltiple y controles
- Distribución porcentual de las poblaciones estudiadas en relación con los genotipos



A continuación, en la figura 10 se muestra los resultados obtenidos del segundo polimorfismo estudiado del gen *CCND1*: A870G rs9344. Donde se muestran los porcentajes obtenidos para el homocigoto común (GG), heterocigoto (GA) y homocigoto polimórfico (AA); tanto de pacientes como de los controles estudiados después del alineamiento de las secuencias obtenidas como se muestra en la figura 11 y 17.

El alelo común (GG) se encuentra en un bajo porcentaje en toda la población estudiada: 21.43 % en pacientes, y un 5 % en mestizos y en el grupo control de afros no se encontró este genotipo. Un pequeño porcentaje de la población total presenta el alelo heterocigoto (GA). El alelo polimórfico (AA) se encuentra en la mayoría de todos los grupos estudiados.

El comportamiento del segundo polimorfismo estudiado del gen *CCND1* muestra un comportamiento similar tanto en la población afectada como en la población control. Siendo el alelo polimórfico AA el que presenta un mayor porcentaje con respecto al alelo heterocigoto y el alelo normal.

En un estudio de cáncer nasofaríngeo se encontró el alelo polimórfico AA en el mismo porcentaje tanto para pacientes como controles, 28.9 % y 27.7 % respectivamente (Catarino, et al., 2005). En otro estudio el alelo polimórfico se encontró en menor porcentaje tanto en el grupo control como el de pacientes con cáncer cervical (Warchol, et al. 2011)

La presencia de este polimorfismo no está asociada únicamente al mieloma múltiple ya que existen varios estudios en otros tipos de cáncer con respecto a este polimorfismo esto debido a que la desregulación de la ciclina D1 que está presente en una variedad de tejidos y depende de la etnia o población estudiada (Catarino, et al., 2005).

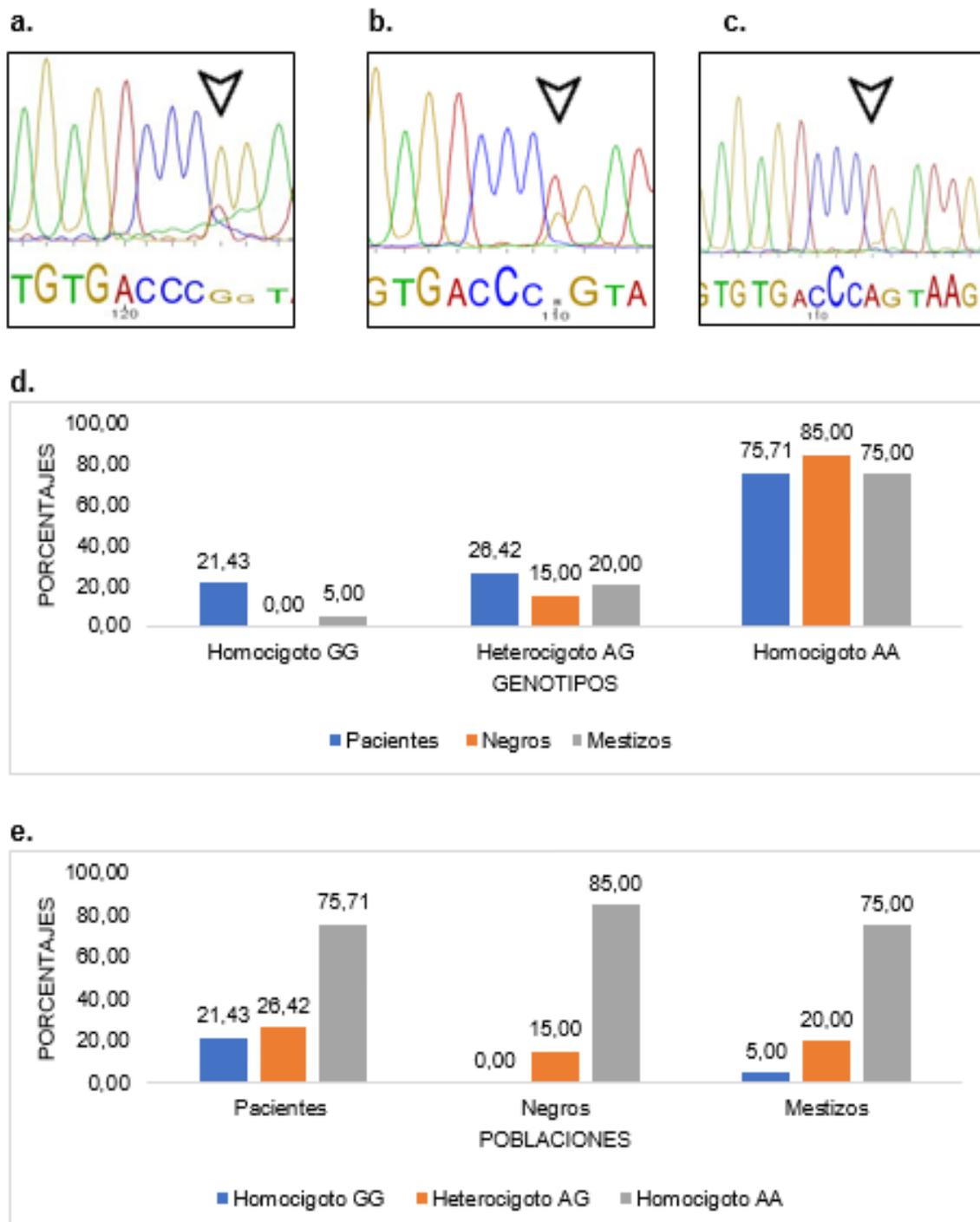


Figura 10. Distribución del polimorfismo A870G del gen *CCND1* en la población de estudio

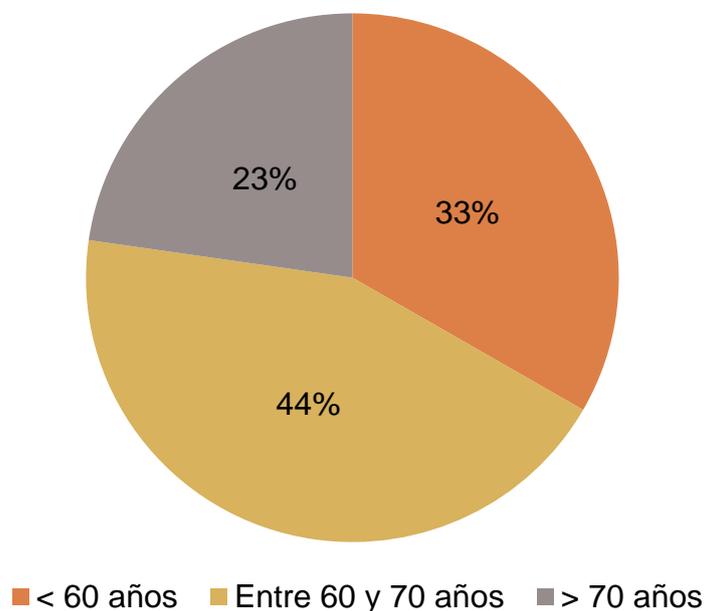
- Electroferograma para el homocigoto común GG
- Electroferograma para el heterocigoto GA
- Electroferograma para el homocigoto polimórfico AA
- Distribución porcentual de los genotipos en pacientes con mieloma múltiple y controles
- Distribución porcentual de las poblaciones estudiadas en relación con los genotipos.



## 5.5 Asociación de datos clínicos y genéticos

### 5.5.1 Edad y género

En la figura 12 se muestra la distribución de los pacientes según la edad, el promedio de la edad de los pacientes fue de 60 años. Del total de pacientes el 23% tenían menos de 60 años, el 44% se encontraron en un rango de 60 a 70 años y el 33% superó los 70 años.

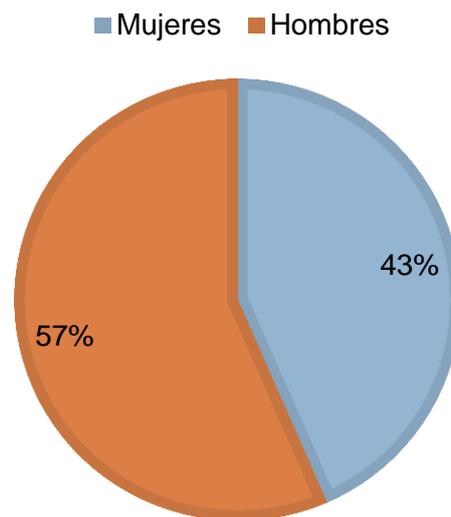


*Figura 12.* Distribución de pacientes según los rangos de edad

Datos epidemiológicos señalan que la edad de aparición del mieloma múltiple se sitúa en los 69 años, (García-Sanz et al., 2007) Otro estudio señala que la aparición del mieloma múltiple se da alrededor de los 60 años (Alexander et al., 2007), es por ello que en este estudio se distribuyó un rango entre los 60 y 70 años, en este rango se encontraron la mayoría de los pacientes con un 44 %. Los resultados obtenidos concuerdan con los datos proporcionados por otros estudios en relación a la edad. García-Sanz et al. también señala que solo un

15 % de pacientes es diagnosticado antes de los 50 años, en este estudio un 23 % se encontró en este rango de edad.

El grupo de pacientes presento un 43% de personas del sexo femenino y un 57% del sexo masculino como se muestra en la figura 13.



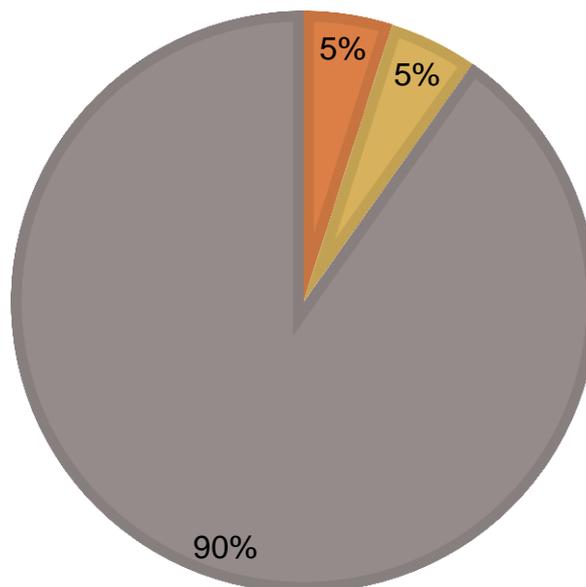
*Figura 13.* Distribución de pacientes de acuerdo al género

Los hombres tienen una probabilidad mayor a padecer mieloma múltiple en comparación con las mujeres (Zervas, et al., 2006), es por ello que el dato de la incidencia del mieloma con respecto al género también se confirma en este estudio ya que se observó un 12 % más de individuos del género masculino, como se aprecia en la figura 13.

### **5.5.2 Clasificación citogenética**

En la figura 14 se muestra la clasificación citogenética obtenida en los pacientes con mieloma múltiple. Cabe recalcar que a ciertos pacientes no se realizó el análisis citogenética debido a ausencias de mitosis en su muestra de medula ósea.

■ Hiperdiploide ■ Hipodiploide ■ Cariotipo Normal



*Figura 14.* Clasificación citogenética de los pacientes con mieloma múltiple de la población estudiada

Según la clasificación citogenética pueden presentarse tres tipos de cariotipos: normal, hiperdiploide e hipodiploide. En este estudio se contaron con datos del cariotipo de 29 pacientes de los cuales 26 pacientes presentaron un cariotipo normal 46XX o 46XY representando un 90% de la población, del tipo hiperdiploide como del hipodiploide se encontró un 5% de pacientes con cada uno de estos cariotipos como se muestra en la figura 15.

Por lo general en pacientes con mieloma múltiple el cariotipo normal está presente en el 40 % de los casos, el hipodiploide en el 50 % de los casos y el mieloma hiperdiploide el cual tiene un peor pronóstico se presenta en el 10 % de la población en general con esta enfermedad (Valvert, 2011). En un estudio en Venezuela se obtuvieron los siguientes datos: 32 % pacientes con cariotipo normal, 18 % mieloma de tipo hiperdiploide y un 50 % presentaron cariotipo hipodiploide (Quintero, et al., 2003).

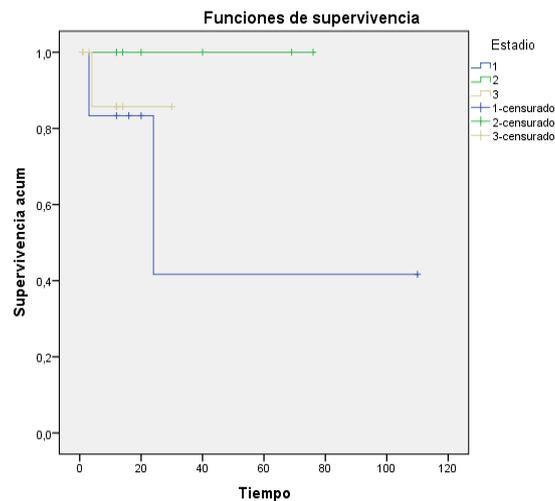
Estos datos no concuerdan con lo obtenido en este estudio ya que no se contó con la totalidad de análisis citogenéticos en toda la población estudiada debido

a que regularmente sólo se detecta anomalías cromosómicas en el 18 a 30% mediante análisis estándar de metafases (Rodríguez, et al., 2013).

### **5.5.3 Tiempo de supervivencia**

Para el análisis del tiempo de vida de los pacientes se utilizó la prueba de Kaplan Meyer. Se analizó de acuerdo al estadiaje de cada paciente en relación al número de meses de vida. Los resultados arrojan que los pacientes en estadio 1 tienen mayor tiempo de supervivencia en meses aproximadamente 90 meses con relación a aquellos que se encuentra en estadio 2 de 70 meses y el estadio 3 con una supervivencia de 30 meses aproximadamente (figura 15).

Un estudio en el 2003 reportó que los pacientes en el estadio III de Durie and Salmon, con tratamiento de hemodiálisis sobrevivieron más de 39 meses, (Valera, et al., 2003), lo que sugiere que el tiempo de supervivencia de los pacientes con mieloma múltiple podría aumentar con un correcto tratamiento de acuerdo a las condiciones de cada paciente. Por ejemplo, el tiempo de vida podría incrementar cuando el paciente se somete a un trasplante de células hematopoyéticas. Estos resultados concuerdan con lo descrito por el Sistema Internacional de Clasificación por Etapas del Mieloma Múltiple (García-Sanz, 2007) como se muestra en la tabla 12.



*Figura 15.* Curva de supervivencia de los pacientes con Mieloma Multiple según Durie-Salmon

**Tabla 12.**

*Sobrevida según estadios*

Estadio	Mediana de Supervivencia en meses
I	62 meses
II	44 meses
III	29 meses

Adaptada de: (Lonial, 2009) y (Greipp, et al., 2005).

### 5.5.2 Parámetros Inmunológicos

Se tomaron en cuenta los tipos y niveles de inmunoglobulinas de cada paciente ya que estas cumplen un papel fundamental en el diagnóstico de mieloma múltiple. En la tabla 13 se muestran los porcentajes de cada tipo de inmunoglobulina obtenidos de las historias de los pacientes con mieloma múltiple. Cabe recalcar que en algunos casos no se contaron con todos los datos del análisis inmunológico.

Con respecto a los datos inmunológicos se observa que la mayoría de pacientes tienen un incremento en el nivel de IgG en un 43.90 % del total de la muestra, y que la mayoría de pacientes tienen niveles normales del resto de inmunoglobulinas (A, E y M).

Salmon y Smith han reportado que la inmunoglobulina G (IgG) representa la inmunoglobulina sérica normal más abundante ya que se encuentran en más del 50% de los pacientes con mieloma múltiple, ellos reportaron un 90 % de pacientes con este tipo de inmunoglobulina secretada (Salmon y Smith, 2007). Este mismo porcentaje se reportó en un estudio en el 2009 (Weiss, et al., 2009)

Según datos a nivel mundial en el mieloma múltiple el isotipo IgG se encuentra en el 60 % de los casos, porcentaje similar a lo que se reportó en este estudio (García-Sanz et al., 2007).

### Tabla 13.

*Parámetros inmunológicos de la población afectada*

Inmunoglobulina	Rango Normal	Pacientes con Mieloma Múltiple (% Casos)		
		Inferior	Normal	Superior
<b>IgA</b>	82 -453 (mg/dL)	28,95	55,26	15,79
<b>IgE</b>	20 – 87 (mg/dL)	36,36	54,55	9,09
<b>IgG</b>	751-1560 (mg/dL)	24,39	31,71	<b><u>43,90</u></b>
<b>IgM</b>	46-304 (mg/dL)	40,00	54,29	5,71

#### 5.5.4 Parámetros hematológicos

Así mismo se analizaron los datos hematológicos obtenidos, los cuales fueron: hemoglobina, creatinina, urea, albumina, beta-2-microglobulina y calcio.

**Tabla 14.***Parámetros hematológicos de la población afectada*

CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS	Rango Normal	PACIENTES CON MIELOMA MULTIPLE (% CASOS)		
		Inferior	Normal	Superior
<b>Hemoglobina</b>	12-17 (g/dL)	37,74	60,38	1,89
<b>Calcio</b>	8.1 - 11.8 (mg/dL)	25.58	69.77	4.65
<b>Creatinina</b>	0.5-1.4 (mg/dL)	3,85	75	21,15
<b>Urea</b>	10-40 (mg/dL)	-	52,38	47,62
<b>Albumina</b>	3.5 - 5.5 (g/dL)	-	61,11	38,89
<b>Beta-2- microglobulina</b>	607 – 2454 (ng/mL)	7,0	51,2	41,9
<b>LDH</b>	105 – 333 (UI/dL)	-	51.22	48.78

En la tabla 14 se observa que la mayoría de pacientes presentan niveles normales de los parámetros hematológicos, sin embargo, un porcentaje importante y representativo muestra bajos niveles de hemoglobina (37.74%), lo que indica que estos pacientes presentaron anemia. Se tomaron en cuenta los parámetros inmunológicos y hematológicos mostrados en las tablas 13 y 14 respectivamente ya que estos son de suma importancia en el diagnóstico del mieloma múltiple (García-Sanz et al., 2007). Como se puede observar en la tabla 13 un 37.74 % de los pacientes presentaron niveles bajos de hemoglobina se ha reportado que un 25 % presentan anemia grave < 8 g/dL, este dato corresponde con lo reportado en este tipo de casos (Ludwig et al., 2004).

En un estudio en el 2005 el 47.62 % de los pacientes evaluados presentaron niveles altos de urea, es decir que presentaron fallos renales (Bladé & Rosiñol,

2005). Del mismo modo el parámetro de la urea se encuentra elevado en un 47.62% de la población. Un 41.9% de pacientes presenta niveles elevados de B2M (beta-2-microglobulina), y casi la mitad de los pacientes presentan valores elevados de lactato deshidrogenasa. Este valor elevado de LDH representa un decrecimiento en el tiempo de sobrevivencia de los pacientes ya que se ha reportado que de los 767 pacientes aquellos que presentaron altos niveles de LDH tuvieron un tiempo de vida de 14 meses (Eleutherakis-Papaiakovou, et al., 2007).

## **5.6 Análisis estadístico**

### **5.6.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg**

Para obtener el equilibrio de Hardy-Weinberg fue necesario obtener las frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo las cuales se muestran en la tabla 15. Para la comprobación de los resultados obtenidos se utilizó la prueba estadística chi cuadrado utilizando los valores de la fórmula de Hardy-Weinberg “p” y “q” que se muestran en la tabla 16. Dado que en los dos polimorfismos el valor de p es superior a 0.05 se puede decir que la población estudiada se encuentra en equilibrio con respecto a estos polimorfismos.

El equilibrio de Hardy-Weinberg está sujeto a procesos que lo alteran como selección natural o adaptaciones al medio, mutaciones, migración o flujo de genes está producida por el mestizaje que presenta la población ecuatoriana, deriva génica y consanguinidad (Paz y Miño & López. 2014).

**Tabla 15.**

*Frecuencias genotípicas y alélicas de la población estudiado (Análisis de Hardy*

SNP	Frecuencias Genotípicas					Frecuencias Alélicas					Hardy Weinberg
	Genotipo	Casos	Controles		TOTAL	Genotipo	Casos	Controles		TOTAL	P value
			Mestizos	Negros				Mestizos	Negros		
Phe31Ile	AA	0,23	0,55	0,30	0,30	A	0,49	0,78	0,63	0,57	X <sup>2</sup> = 0,8296296
	AT	0,52	0,45	0,65	0,53						
rs2273535	TT	0,25	0,00	0,05	0,16	T	0,51	0,23	0,38	0,43	P value = 0,3624
A870G	AA	0,76	0,75	0,85	0,77	A	0,89	0,85	0,93	0,87	X <sup>2</sup> = 3,0280356
	AG	0,26	0,20	0,15	0,19						
rs9344.	GG	0,21	0,05	0,00	0,04	G	0,35	0,15	0,00	0,13	P value = 0,0818

*Weinberg)*

**Tabla 16.**

*Datos de la formula Hardy-Weinberg para los dos polimorfismos*

Polimorfismo	Valor p	Valor q
rs 2273535	0.57	0.43
rs 9344	0.87	0.13

En un estudio realizado en el 2014 el comportamiento del polimorfismo rs2273535 en relación al mieloma no arrojó resultados estadísticamente significativos, se obtuvo un valor de p de 0.9997 en el equilibrio de Hardy-Weinberg (Montesdeoca, 2015). En el presente estudio este valor se ha reducido sin llegar a la significancia estadística a pesar de que la muestra se duplicó. Esto puede deberse a que todavía el n muestral sigue siendo insuficiente para este análisis o a que este polimorfismo no está desarrollado con el desarrollo de mieloma múltiple en la población ecuatoriana.

El valor de p en el equilibrio de Hardy Weinberg con respecto al polimorfismo rs 9344 fue de 0.08 acercándose a la significancia estadística ( $p < 0.05$ ), indicando que esta población tiende a no cumplir la condición de equilibrio. El valor de p se vería reducido si se aumentara el número de muestras y controles a

estudiar. Ya que si se emplea muestras pequeñas conlleva una pérdida de potencia en los contrastes de hipótesis y en la significancia estadística (Button, et al., 2013).

### 5.6.2 Prueba Odds Ratio

En la tabla 17 se observan los valores de Odds ratio para los dos polimorfismos estudiados. Como se aprecia la misma no arrojó valores significativos para ningún polimorfismo, esto significa que no existe asociación de estos genotipos con un riesgo relativo para presentar mieloma múltiple.

Es importante recalcar que existen estudios que relacionan otros tipos de cáncer, como el de mama, con el polimorfismo rs2273595 en el alelo TT. Tong y colaboradores (2004) han encontrado un valor de OR de 2.65, lo que significa 2,65 veces mayor riesgo de padecer esa enfermedad (Tong et al., 2004). Por otra parte, en cuanto al valor de OR el genotipo GA del polimorfismo rs9344 en la población asiática el genotipo AA es el que se encuentra más asociado al riesgo de desarrollar mieloma múltiple con un OR de 4.679 (Wang et al., 2015). Esta relación puede deberse a que la población asiática estuvo expuesta a un alto nivel de radiación ionizante debido a la bomba atómica de Hiroshima y Nagasaki (Preston et al., 1994).

Con lo antes expuesto, y los resultados obtenidos en donde se observa que tanto para el polimorfismo rs2273595 del alelo TT así como para el polimorfismo rs9344 del alelo AG, el valor de  $OR > 1$  (Tabla 16), se podría sugerir una asociación de estos con el riesgo de padecer mieloma múltiple. Sin embargo, para que esto sea verificado es necesario incrementar el n muestral con el fin de que la prueba presente significancia estadística, y se obtenga resultados válidos que reflejen el comportamiento real de la población ecuatoriana.

**Tabla 17.**

*Asociación de los polimorfismos rs2273595 y rs9344 con el riesgo de desarrollar Mieloma Múltiple en casos y controles*

SNP	GENOTIPO	CASOS (70)	CONTROLES (40)	ODDS RATIO (OR)	IC (95 %)	P value
<b>rs2273595</b>	AA	15	17	-	-	0.8944
	AT	34	22	0,98	0,729 - 1,328	
	TT	16	1	<b>1,05</b>	0,510 - 2,163	
	AT+TT	50	23	0.907	0.337 – 2.5856	
<b>rs9344</b>	GG	3	1	-	-	0.7138
	GA	14	7	<b>1.164</b>	0.513 – 2.635	
	AA	53	32	0.964	0.796 – 1.168	
	AG+GG	67	39	0.828	0.302 – 2.269	

### 5.6.3 Asociación de datos genéticos con datos clínicos

En la tabla 17 se observa que los valores de p de los distintos parámetros en relación a los polimorfismos no muestran significancia estadística  $p < 0.05$ . El dato que se aproxima a este valor es el de la relación del polimorfismo rs2273595 con el parámetro inmunológico IgE, con un valor de p de: 0.0622.

En la prueba de Kruskal-Wallis aplicada sobre los datos clínicos con los genotipos no se encontró significancia estadística en ningún parámetro (tabla 18). Esto quiere decir que los cambios estudiados en el genoma de los pacientes con mieloma múltiple no están asociados a las variaciones de los parámetros hematológicos.

Esto debido a que como se conocer aparte del genotipo de una persona el factor ambiental influye en el desarrollo de alguna característica observable o enfermedad (fenotipo). Algunos de los factores que están asociados al desarrollo de mieloma múltiple son el consumo de alcohol y tabaco,

fertilizantes, productos petroquímicos, y exposición a radiaciones ionizantes (González et al., 2008).

También el estilo de vida puede influir en la aparición de este cáncer como la obesidad asociada esta al desarrollo de varios tipos de cáncer con  $OR > 1$ , este factor se encuentra asociado únicamente en la población norteamericana (Alexander et al., 2007). El mayor uso de suplementos de vitamina C por personas de raza blanca y la mayor frecuencia de obesidad entre la población afroamericana puede explicar un grado de incidencia mayor de mieloma múltiple en lo afroamericanos en los Estados Unidos (Brown et al., 2001).

**Tabla 18.**

*Relación entre las variables cuantitativas con los polimorfismos rs2273595 y rs9344 utilizando la prueba estadística Kruskal-Wallis.*

PARÁMETROS	Valor p	
	rs2273595	rs9344
Edad	0,776	0,211
<b>PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS</b>		
B2M	0,75	0,172
Hemoglobina	0,614	0,511
Calcio	0,426	0,319
Creatinina	0,239	0,444
Urea	0,274	0,74
Albumina	0,931	0,225

LDH	0,883	0,137
<b>PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS</b>		
IgA	0,714	0,389
IgE	<b><u>0,0622</u></b>	0,123
IgG	0,773	0,895
IgM	0,532	0,7

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

La presencia de los dos polimorfismos estudiados rs2273535 y rs9344 en la población de pacientes con mieloma múltiple y en la población control fue encontrada en la población estudiada. El grupo control de la población afroecuatoriana presentó genotipos similares a los de los pacientes con mieloma múltiple, debido a que según datos epidemiológicos mundiales esta raza tiene mayor riesgo de desarrollar este cáncer, la causa de esto se desconoce.

El polimorfismo Phe31Ile del gen *AURK-A* (rs2273535) no se encuentra asociado con el desarrollo de mieloma múltiple ya que el comportamiento de la población estudiada se encuentra en equilibrio en relación a los controles según la prueba de Hardy-Weinberg, por otra parte si bien el polimorfismo A870G (rs9344) presentó un valor próximo a la significancia estadística en el equilibrio de Hardy-Weinberg, pero tampoco se encontró asociación estadística.

Estos dos polimorfismos no presentan asociación con las variaciones hematológicas e inmunológicas de los pacientes ya que no se encontraron valores estadísticamente significativos en la prueba de Kruskal-Wallis.

### 6.2. Recomendaciones

Diseñar cebadores más largos y que sean propios para mieloma múltiple para evitar problemas en la secuenciación e incrementar la especificidad del estudio.

Aumentar el número de muestras de la población control y de las muestras observadas para incrementar la significancia estadística del estudio.

Desarrollar estudios clínicos más detallados en base a los parámetros indicados en bibliografía, al igual de realizar pruebas citogenéticas a todos los pacientes diagnosticados para incrementar los datos de correlación entre las historias clínicas y diagnósticos de mieloma que den mayor consistencia a los resultados de este trabajo.

## REFERENCIAS:

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular + StudentConsult*. Elsevier Health Sciences Spain.
- Alegre, A. (2004). Libro Blanco del Mieloma Múltiple en España. Epidemiología. Cap 9. Novartis
- Alexander, D. D., Mink, P. J., Adami, H.-O., Cole, P., Mandel, J. S., Oken, M. M., & Trichopoulos, D. (2007). Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *International Journal of Cancer*, 120(S12), 40-61. Recuperado el 01 de mayo de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.22718/abstract;jsessionid=1025653A586F8A79BB4910BD19849C9E.f04t03>. doi: 10.1002/ijc.22718
- Anderson, H., Scarffe, J., Ranson, M., Young, R., Wieringa, G., Morgenstern, G., ... Ryder, D. (1995). VAD chemotherapy as remission induction for multiple myeloma. *British Journal of Cancer*. 326-330. Recuperado el 28 de julio del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2033610/>
- Avallanet, R., Cuenca, R., Pastor, J., Jordana, J. (2007). Parámetros hematológicos y bioquímico clínicos. Archivos de zootecnia vol. 56.
- Baker, A., Braggio, E., Jacobus, S., Jung, S., Larson, D., Therneau, T., ... Fonseca, R. (2013). Uncovering the biology of multiple myeloma among African Americans: a comprehensive genomics approach. *Blood Journal*. 121(16). Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de: <http://www.bloodjournal.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=23422747>. doi: 10.1182/blood-2012-07-443606
- Barlogie , B., Tricot , G., Anaissie , E., Shaughnessy , J., Rasmussen , E., van Rhee , F., . . . Crowley , J. (2006). Thalidomide and Hematopoietic-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 354(10), 1021-1030. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa053583#t=article>: doi:10.1056/NEJMoa053583

- Barón, M. G., & Gallego, A. O. (2004). *La astenia tumoral*: Editorial Médica Panamericana.
- Bermejo, M. J. G., & García, M. C. S. (2006). *T.laboratorio Analisis Clínico Bioquímica*: Editorial Mad, S.L.
- Bladé, J., & Rosiñol, L. (2005). Renal, hematologic and infectious complications in multiple myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 18(4), 635-652. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521-6926\(05\)00014-9](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521-6926(05)00014-9). doi: 10.1016/j.beha.2005.01.013
- Braggio, E., & Albarracín, F. (2013). El uso de alteraciones genéticas en la estratificación por riesgo del Mieloma Múltiple. *Medicina*, 73, 369-375.
- Brown, L., Gridley, G., Pottern, L., Baris, D., Swanso, C., Silverman, D., . . . Fraumeni, J. (2001). Diet and nutrition as risk factors for multiple myeloma among blacks and whites in the United States. *Cancer Causes Control*, 12(2), 117. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11246840>
- Button, K. S., Ioannidis, J. P. A., Mokrysz, C., Nosek, B. A., Flint, J., Robinson, E. S. J., & Munafò, M. R. (2013). Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 14(5), 365-376. Recuperado el 16 de diciembre de 2016 de: <http://www.nature.com/nrn/journal/v14/n5/full/nrn3475.html>. doi: 10.1038/nrn3475
- Catarino, R., Breda, E., Coehlo, V., Pinto, D., Sousa, H., Lopes, C., Medeiros, R., (2006). Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Wiley InterScience*. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hed.20377/abstract>. doi: 10.1002/hed.20377
- Cerda, J., Vera, C., & Rada, G. (2013). Odds ratio: aspectos teóricos y prácticos. *Revista médica de Chile*, 141, 1329-1335.
- Chapman, M., Lawrence, M., Keats, J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A.,...Golub, T. (2011). Initial genome sequencing and analysis of multiple

- myeloma. *Macmillan Publishers* 471. Recuperado el 22 de enero de 2017 de: [www.nature.com/nature/journal/v471/n7339/.../nature09837.html](http://www.nature.com/nature/journal/v471/n7339/.../nature09837.html). doi: 10.1038/nature09837
- Chauhan, G., Adams, H. H. H., Bis, J. C., Weinstein, G., Yu, L., Töglhofer, A. M., . . . DeBette, S. (2015). Association of Alzheimer disease GWAS loci with MRI-markers of brain aging. *Neurobiology of aging*, 36(4), 1765.e1767-1765.e1716. Recuperado el 30 de noviembre de 2016 de: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197-4580\(14\)00845-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197-4580(14)00845-8). doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.028
- Chernecky, C., Berger, B. (2013) Bone marrow aspiration analysis-specimen (biopsy, bone marrow iron stain, iron stain, bone marrow). *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders: 241-244
- Conté, G., Braggio, E., Figueroa, G., Fonseca, R. (2009). La genética como factor pronóstico y terapéutico en el mieloma múltiple. *Revista Médica de Chile*. 137(4). 552-558. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872009000400015](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872009000400015)
- Cueva, P., Yépez, J. (2014). Sociedad de Lucha Contra el Cáncer / Registro Nacional de Tumores. *Epidemiología del Cáncer en Quito 2006-2010*. Quito. 15 ed.
- Dar, A. A., Goff, L. W., Majid, S., Berlin, J., & El-Rifai, W. (2010). Aurora Kinase Inhibitors - Rising Stars in Cancer Therapeutics? *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(2), 268-278. Recuperado el 01 de noviembre de 2016 de: <http://mct.aacrjournals.org/content/9/2/268.long>. doi: 10.1158/1535-7163.mct-09-0765
- Davies, F., Raje, N., Hideshima, T., Lentzsch, S., Young, G., Tai, Y., ... Anderson K. (2001). Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood Journal*. 98(1) 210-216. Recuperado el 01 de noviembre de 2016 de:

- <http://www.bloodjournal.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=11418482>  
doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V98.1.210>
- Durie, B. G. M. (2004). Epidemiology of Multiple Myeloma and Related Disease. In J. R. Berenson (Ed.), *Biology and Management of Multiple Myeloma* (pp. 13-35). Totowa, NJ: Humana Press.
- Dutta-Simmons, J., Zhang, Y., Gorgun, G., Gatt, M., Mani, M., Hideshima, T., . . . Carrasco, D. R. (2009). Aurora kinase A is a target of Wnt/ $\beta$ -catenin involved in multiple myeloma disease progression. *Blood*, *114*(13), 2699-2708. Recuperado el 01 de mayo de 2016 de: <http://www.bloodjournal.org/content/114/13/2699.long>. doi: 10.1182/blood-2008-12-194290
- Dvorkin, C. I., Dvorkin, M. A., & Cardinali, D. P. (2010). *Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*: Ed. Médica Panamericana.
- Education, N. (2014). Hardy-Weinberg equation. *Scitable*. from <http://www.nature.com/scitable/definition/hardy-weinberg-equation-299>
- Egan, J. B., Shi, C.-X., Tembe, W., Christoforides, A., Kurdoglu, A., Sinari, S., . . . Stewart, A. K. (2012). Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*, *120*(5), 1060-1066. Recuperado el 28 de julio de 2016 de: <http://www.bloodjournal.org/content/120/5/1060.long>. doi: 10.1182/blood-2012-01-405977
- Eleutherakis-Papaiakovou, V., Bamias, A., Gika, D., Simeonidis, A., Pouli, A., Anagnostopoulos, A., . . . Dimopoulos on behalf of the Greek Myeloma Study Group, M. A. (2007). Renal failure in multiple myeloma: Incidence, correlations, and prognostic significance. *Leukemia & Lymphoma*, *48*(2), 337-341. Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10428190601126602>. doi: 10.1080/10428190601126602
- Elosua, C., Catalina, P., Walker, B. A., Dickens, N. J., Avramidou, A., Brito, L., . . . Leone, P. E. (2008). Molecular Characterization of Human Multiple Myeloma Cell Lines by Genome-Wide Profiling Identifies Kinase Pathway

- Alterations. *Blood*, 112(11), 1694-1694. Recuperado el 02 de mayo de 2016 de: <http://www.bloodjournal.org/content/112/11/1694>.
- Eraltan, Y., Arikan, S., Yildiz, Y., Cacina, C., Ergen, H., Tuna, G., ... Isbir, T. (2010). The influence of cyclin D1 A870G polymorphism on colorectal cancer risk and prognosis in a Turkish population. *Anticancer Research*, 30, 2875-2880. Recuperado el 17 de noviembre de 2016 de: <http://ar.iiarjournals.org/content/30/7/2875.long>.
- Fainboim, L., & Geffner, J. (2005). *Introducción a la inmunología humana*: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Fernández, S. M. (2001). *Guía Completa de Statgraphics: Desde MS-DOS a Statgraphics Plus*: Díaz de Santos.
- García-Sanz, R., Mateos, M., & San Miguel, F. J. (2007). Mieloma múltiple. *Medicina Clínica*, 129(3), 104-115. doi: 10.1157/13107365
- Gómez, D., Cano, R., Cedillo, J., Garcéz, O., Limón, A., Lopez, M.,... Zárata, P. (2010). Guías mexicanas de diagnóstico y recomendaciones terapéuticas para mieloma múltiple. *Revista de hematología*, 11(1)
- González, M., Fernández, C., Robles, V., González, J., Arias, M., González, A., . . . Fernández, J. (2008). Serie de 618 casos de gammopatías monoclonales de significado indeterminado (GMSI): factores predictivos de desaparición del componente monoclonal o de evolución a gammopatías malignas. *Revista Clínica Española*, 288-294.
- Gu, J., Gong, Y., Huang, M., Lu, C., Spitz, M., Wu, X. (2007). Polymorphisms of STK15 (Aurora-A) gene and lung cancer risk in Caucasians. *Carcinogenesis* 28(2) Recuperado el 17 de noviembre de 2016 de: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgl149>. doi: :10.1093/carcin/bgl149
- Greipp, P., San Miguel, J., Brian, G., Durie, J., Crowley, B., Barlogie, B., ... Westin, J. (2005) International Staging System for Multiple Myeloma. *Journal of clinical oncology*. Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de: <http://ascopubs.org/doi/full/10.1200/jco.2005.04.242>. doi: 10.1200/JCO.2005.04.242

- Hussain, S., Yuvaraj, M., Thakur, N., Salam, I., Singh, N., Mir, M., ... Bharadwaj, M. (2011). Association of Cyclin D1 Gene Polymorphisms With Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Kashmir Valley— A High Risk Area. *Molecular Carcinogenesis*, 50, 487-498. Recuperado el 01 de mayo de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.20732/abstract> doi: 10.1002/mc.20732
- Kanemasa, Y., Shimoyama, T., Sasaki, Y., Tamura, M., Sawada, T., Omuro, Y., . . . Maeda, Y. (2016). Beta-2 microglobulin as a significant prognostic factor and a new risk model for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematological Oncology*, n/a-n/a. Recuperado el 28 de julio de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hon.2312/abstract>. doi: 10.1002/hon.2312
- Karen, E. L. (2006). Lessons from the Drug Discovery of Lapatinib, a Dual ErbB1/2 Tyrosine Kinase Inhibitor. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6(5), 435-460. Recuperado el 14 de noviembre de 2016 de: <http://www.eurekaselect.com/57078/article>. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/156802606776743156>
- Kaufman, G. P., Gertz, M. A., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Buadi, F. K., Dingli, D., . . . Kumar, S. K. (2016). Impact of cytogenetic classification on outcomes following early high-dose therapy in multiple myeloma. *Leukemia*, 30(3), 633-639. Recuperado el 01 de mayo de 2016 de: <http://www.nature.com/leu/journal/v30/n3/full/leu2015287a.html>. doi: 10.1038/leu.2015.287
- Lang, T. A., & Secic, M. (2006). *How to Report Statistics in Medicine: Annotated Guidelines for Authors, Editors, and Reviewers*: American College of Physicians.
- Lee, C.-P., Chiang, S.-L., Lee, C.-H., Tsai, Y.-S., Wang, Z.-H., Hua, C.-H., . . . Ko, Y.-C. (2015). AURKA Phe31Ile polymorphism interacted with use of alcohol, betel quid, and cigarettes at multiplicative risk of oral cancer occurrence. *Clinical Oral Investigations*, 19(8), 1825-1832. Recuperado el 28 de julio del 2016 de:

- <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00784-015-1432-5>. doi: 10.1007/s00784-015-1432-5
- Leone, P. E., Montesdeoca, B., Chiluzza, D., Morales, I., Sanchez, M. E., Buenaño, M. E., . . . Paz y Miño, C. (2013). Datos de Ecuador en la Red Iberoamericana para la Investigación de Mieloma Múltiple. *Oncología Guayaquil*, 23(1), 7-16.
- Lonial, S. (2009). *Myeloma Therapy: Pursuing the Plasma Cell*: Humana Press.
- Ludwig, H., Van Belle, S., Barrett-Lee, P., Birgegård, G., Bokemeyer, C., Gascón, P., . . . Schrijvers, D. (2004). The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): A large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *European Journal of Cancer*, 40(15), 2293-2306. Recuperado el 28 de julio de 2016 de: [http://www.ejcancer.com/article/S0959-8049\(04\)00511-8/abstract](http://www.ejcancer.com/article/S0959-8049(04)00511-8/abstract). doi: 10.1016/j.ejca.2004.06.019
- Marin, D., López, M., Aponte, F., Rivero, P., (2003). Causas de muerte en el mieloma múltiple. *Revista de Ciencias Medicas*7(1. (pp. 44-51),). ISSN: 1561-3194
- Mateo, G., Castellanos, M., Rasillo, A., Gutiérrez, N. C., Montalbán, M. A., Martín, M. L., . . . San Miguel, J. F. (2005). Genetic Abnormalities and Patterns of Antigenic Expression in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 11(10), 3661-3667. Recuperado el 28 de julio de 2016 de: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/10/3661.long>. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-1489
- Michalides, R. (1998). Deregulation of Cyclin D1 in Cancer. In E. Mihich & C. Croce (Eds.), *The Biology of Tumors* (pp. 127-143). Boston, MA: Springer US.
- Mitchell, J., Li, N., Weinhold, N., Forsti, A., Ali, M., Van Duin, M.,... Houlston, R. (2016). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma. *Nature Communications*. Recuperado el 22 de enero de 2017 de: <http://www.nature.com/articles/ncomms12050>. doi: 10.1038/ncomms12050

- Montesdeoca, B. (2015). *Estado del Mieloma Múltiple, diagnóstico clínico, medicina de laboratorio e identificación de alteraciones genéticas asociadas con la patogénesis en el Hospital Carlos Andrade Marín en un periodo de tiempo comprendido entre 1986 a 2012*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador
- Morgan, G., Walker, B., Davies, F. (2012) The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*. (12). doi: 10.1038/nrc3257
- Moyano S, L., Franco T, C., Carreño T, L., Robinson M, P., & Sánchez J, G. (2004). HBME-1 y ciclina D1: marcadores diagnósticos de carcinoma folicular del tiroides. *Revista médica de Chile*, 132, 279-284.
- Oña, F., López, A., Echeverría, C., Ortiz, M., Rosales, F., Naranjo, M., Paz y Miño, C. (2013). Polimorfismo genético Phe31Ile (1712T>A) del gen STK15 y su relación con el desarrollo y progresión del cáncer de mama en población mestiza ecuatoriana. *Revista Oncologica del Ecuador*. 23(2) 19-29.
- Paz y Miño, C., López, A. (2014). *Genética molecular y citogenética humana: Fundamentos, aplicaciones e investigación en el Ecuador*. Universidad de las Américas. Universidad Yachay. Quito-Ecuador. pp 51-54.
- Peña-Chilet, M., Blanquer-Maceiras, M., Ibarrola-Villava, M., Martínez-Cadenas, C., Martín-González, M., Gómez-Fernández, C., . . . Ribas, G. (2013). Genetic variants in PARP1 (rs3219090) and IRF4(rs12203592) genes associated with melanoma susceptibility in a Spanish population. *BMC Cancer*, 13(1), 160. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537197>. doi: 10.1186/1471-2407-13-160
- Pohl, A., Azuma, M., Zhang, W., Yang, D., Ning, Y., Winder, T., . . . Lenz, H. J. (2011). Pharmacogenetic profiling of Aurora kinase B is associated with overall survival in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*, 11(2), 93-99.
- Purdue, M. P., Johansson, M., Zelenika, D., Toro, J. R., Scelo, G., Moore, L. E., . . . Brennan, P. (2011). Genome-wide association study of renal cell

- carcinoma identifies two susceptibility loci on 2p21 and 11q13.3. *Nat Genet*, 43(1), 60-65. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de: <http://www.nature.com/ng/journal/v43/n1/abs/ng.723.html#supplementary-information>
- Preston, D. L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., . . . Mabuchi, K. (1994). Cancer Incidence in Atomic Bomb Survivors. Part III: Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma, 1950-1987. *Radiation Research*, 137(2), S68-S97. doi: 10.2307/3578893
- Quintero, M., Rojas, A., Ruiz, A., Gonzalez, M., Herrera, J., Atencio, F., . . . Pérez, F. (2003). Anomalías cromosómicas en pacientes venezolanos con mieloma múltiple. *Invest Clin* 44(4): 327 - 335 ISSN 0535-5133.
- Rajkumar, V., Blood, E., Vesole, D., Fonseca, R., Greipp, P. (2006). Phase III Clinical Trial of Thalidomide Plus Dexamethasone Compared With Dexamethasone Alone in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Clinical Trial Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 24(3), 431-436. Recuperado el 16 de diciembre de 2016 de: [http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2005.03.0221?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2005.03.0221?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed). doi:10.1200/JCO.2005.03.0221
- Rivera, P. (1997). Utilidad clínica de los marcadores tumorales *Patología Clínica*, 44(4), 253.
- Rodriguez, A., Saltiel, C., Prieto, M., Chiquin, D., Gil, M., Viscaino, J., . . . Gross, A. (2013). *Evaluación del riesgo en gammapatías monoclonales*. Manual de Manejo de Mieloma Múltiple. pp 17
- Salmon, S., Smith, B. (2007). Immunoglobulin synthesis and total body tumor cell number in IgG multiple myeloma. *The Journal of Clinical Investigation* 49. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de: <http://www.jci.org/articles/view/106327>. doi: 10.1172/JCI106327
- Shi, Y., Reiman, T., Li, W., Maxwell, C. A., Sen, S., Pilarski, L., . . . Lichtenstein, A. (2007). Targeting aurora kinases as therapy in multiple myeloma. *Blood*, 109(9), 3915-3921. Recuperado el 01 de mayo del 2016 de:

- <http://www.bloodjournal.org/content/109/9/3915?sso-checked=true>. doi: 10.1182/blood-2006-07-037671
- Solomon, D., Wang, Y., Fox, S., Lambeck, T., Giesting, S., Lan, Z., . . . Knudsen, E. (2003). Cyclin D1 Splice Variants Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 30339-30347. Recuperado el 22 de enero de 2017 de: <http://www.jbc.org/content/278/32/30339.long>. doi: 10.1074/jbc.M303969200
- Szumilas, M. (2010). Explaining Odds Ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 19(3), 227-229.
- Taylor, N. J., Bensen, J. T., Poole, C., Troester, M. A., Gammon, M. D., Luo, J., . . . Olshan, A. F. (2015). Genetic Variation in Cell Cycle Regulatory Gene AURKA and Association With Intrinsic Breast Cancer Subtype. *Molecular carcinogenesis*, 54(12), 1668-1677. Recuperado el 01 de mayo de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.22238/abstract>. doi: 10.1002/mc.22238
- Tong, S., Xiaoping, M., Wang, J., Tan, W., Yifeng, Z., Chunyuan, Y., & Dongxin, L. (2004). Functional Phe31Ile polymorphism in Aurora A and risk of breast carcinoma. *Carcinogenesis*, 2225-2230.
- Vader, G., & Lens, S. M. A. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1786(1), 60-72. Recuperado el 01 de mayo del 2016 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X08000310>
- Vajpayee, N., Graham, S., Bem, S. (2011) Basic examination of blood and bone marrow. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* McPherson RA, Pincus MR, eds. 23rd ed. St Louis, MO: Elsevier: chap 30.
- Valera, A., Marínez, G., Ramos, B., Frutos, M., López, E., Ordóñez, V. (2003). Supervivencia de pacientes con mieloma tratados con diálisis. *Nefrología*, Madrid 23(131)

- Valvert, C. (2011). *Mieloma múltiple: rendimiento del estudio del cariotipo por técnicas convencionales y de hibridación in situ fluorescente. Significado pronóstico de las ganancias de 1q.* (Lincenciatura), Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- Vela, J., Garcia, M. (2005). Trasplante de células hematopoyéticas en mieloma múltiple. *Revista de investigación clínica* 57(2). ISSN 0034-8376
- Valores Normales. (sf). Inmunoglobulinas, cuantificación. Recuperado el 02 de febrero de 2017 de: <http://www.valoresnormales.com/i/inmunoglobulinas-cuantificacion>
- Wang, S., Huang, Y., Su, R., Fang, Z., & Han, M. (2015). Cyclin D1 G870A polymorphism is associated with an increased risk of multiple myeloma. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 5856-5861 Recuperado el 28 de julio de 2016 de: <http://www.geneticsmr.com/articles/4501>. doi: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.June.1.2>
- Warchol, T., Kruszyna, L., Lianeri, M., Rosak, A., Jagodziński, P. (2011). Distribution of CCND1 A870G Polymorphism in Patients with Advanced Uterine Cervical Carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 17 133–137. Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12253-010-9293-3>. doi: 10.1007/s12253-010-9293-3
- Weinhold, N., Johnson, D. C., Chubb, D., Chen, B., Forsti, A., Hosking, F. J., . . . Hemminki, K. (2013). The CCND1 c.870G>A polymorphism is a risk factor for t(11;14)(q13;q32) multiple myeloma. *Nat Genet*, 45(5), 522-525. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de: <http://www.nature.com/ng/journal/v45/n5/abs/ng.2583.html#supplementary-information>
- Weiss, B. M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R. S., & Kuehl, W. M. (2009). A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*, 113(22), 5418-5422. doi: 10.1182/blood-2008-12-195008
- Welsch, U., & Sobotta, J. (2008). *Histología*: Ed. Médica Panamericana.

- Yang, J., Zhang, G., & Chen, J. (2012). CCND1 G870A polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer, especially for sporadic colorectal cancer and in Caucasians: A meta-analysis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 36(2), 169-177. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210-7401\(11\)00393-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210-7401(11)00393-7). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinre.2011.11.007>
- Zervas, K., Verrou, E., Teleioudis, Z., Vahtsevanos, K., Banti, A., Mihou, D., ... Terpos, E. (2006). Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *British Journal of Haematology*, 134, 620-623. Recuperado el 22 de enero de 2017 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365141.2006.06230.x/abstract>. doi: 10.1111/j.1365-2141.
- Zurita, T., Cabrera, A., Salazar, C., Hidalgo, R., Rosales, F., Montalvo, A., Paz y Miño, C. (2014). *Relación de las variantes polimórficas A870G en Ciclina D1 y (CA)n en el Receptor del factor de crecimiento epidérmico con los estadios de la carcinogénesis colorrectal*. Universidad de las Fuerzas Armadas del Ecuador. ESPE.

## **ANEXOS**

Consensus	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
1. ECU08	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
2. ECU45	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	W	A	A	T	T	G	C
3. ECU55	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
4. ECU76	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
5. ECU82	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
6. ECU90	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
7. ECU100	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
8. ECU110	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
9. ECU117	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
10. ECU134	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
11. MEZ27	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
12. MEZ37	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	K	G	A	A	A	T	T	G	C
13. MEZ42	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	K	G	A	A	A	T	T	G	C
14. MEZ66	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
15. MEZ71	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
16. MEZ77	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
17. MEZ80	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
18. MEZ85	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
19. MEZ91	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
20. MEZ95	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
21. MEZ96	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	R	A	T	T	G	C
22. MEZ97	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	R	A	T	T	G	C
23. MEZ98	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
24. MEZ108	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
25. S34	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
26. S84	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
27. S86	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
28. S89	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
29. S95	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
30. S208	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
31. SCH09	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
32. SCH10	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
33. SCH12	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C
34. SCH15	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
35. SCH18	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
36. SCH19	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	W	T	T	G	C
37. SCH22	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	R	G	A	A	W	T	T	G	C
38. SCH23	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	R	G	A	A	W	T	T	G	C
39. SCH33	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	R	G	A	A	W	T	T	G	C
40. SCH37	A	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	A	C	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	C

Figura 16. Alineamiento de las secuencias de los controles para el polimorfismo Phe31Ile

Consensus	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
1. ECU08	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
2. ECU45	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
3. ECU55	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
4. ECU76	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
5. ECU82	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAKT
6. ECU90	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAKT
7. ECU100	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
8. ECU110	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCRGT
9. ECU117	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCRKT
10. ECU134	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
11. MEZ27	GTG - ATC - WAGT - GTGA - YCCRKT
12. mez37	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
13. mez42	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
14. mez67	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
15. mez71	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
16. mez76	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
17. mez80	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCRKT
18. mez85	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCGGT
19. mez90	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCRKT
20. mez95	GTG - ATC - AAGT - GKGA - CCCRGT
21. mez96	GTG - ATC - AAGT - GKGA - CCCAGT
22. mez97	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCART
23. mez98	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
24. mez108	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
25. s84	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
26. S84	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
27. S86	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
28. S89	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
29. S95	GTG AATC AAGKAKGA - CCCAGT
30. S208	RTG - ATC - AAGT - GTGA ACCCAGT
31. SCH9	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAKT
32. SCH10	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT
33. SCH12	GTG - ATC - WAGT - GTGA - YCCRKT
34. SCH15	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCGGT
35. SCH18	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCGGT
36. SCH19	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCRGT
37. SCH22	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCRGT
38. SCH23	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCGGT
39. SCH33	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAKT
40. SCH37	GTG - ATC - AAGT - GTGA - CCCAGT

Figura 17. Alineamiento de las secuencias de los controles para el polimorfismo A870G

