

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**DISERTACIÓN**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL**

**TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS CLÍNICO**

“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”

María Belén Montesdeoca Narváez

Quito 2015

# PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

## DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo, **MARÍA BELÉN MONTESDEOCA NARVÁEZ**, C.I. **100265249-1** autora del trabajo de graduación intitulado: “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”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN BIOANÁLISIS CLÍNICO** en la Escuela de **Bioanálisis**:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 22 de Mayo del 2015



María Belén Montesdeoca Narváz

C.I. 1002652491

## **DEDICATORIA**

A mi tía Nildita, que nunca dejó de creer en mí, por enseñarme a ser una mejor persona cada día, por ser mi apoyo y siempre estar presente en mi vida y en mi corazón.

A mi hermana Camila, quien me dio fuerzas para continuar este camino.

A mi Padre Luis, por trabajar tan duro para que nunca nos falte nada, y enseñarme a ser honesta tal como él lo ha sido.

A mi madre Wilma, por enseñarme a luchar y superar toda adversidad.

A mis tíos, Ismeria, Carlos, Yarus y Yolanda, por preocuparse por mí y siempre estar presentes en los momentos más importantes de mi vida.

A mis abuelitos Alejandro y Graciela, porque a pesar de estar lejos nunca dejaron de enviarme sus bendiciones.

A Paola, Ivan, Maria Paula y Andres por abrirme las puertas de su casa que ha sido como un segundo hogar para mí.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Instituto de Investigaciones Biomédicas por darme todo el apoyo en la realización en este proyecto.

A la “Pontificia Universidad Católica”, por permitirme realizar los estudios en tan prestigiosa Universidad, un especial agradecimiento a Sandra, Lucy, Mary, Ruth, Iveth, Pepita, Miriam, por enseñarme con tanta dedicación todo lo que se.

Al Hospital Carlos Andrade Marín por permitirme tomar las Historias Clínicas de todos mis pacientes, y al Hospital de SOLCA Quito por proporcionarme muestras biológicas de los pacientes que fueron incluidos en este estudio, un especial agradecimiento a todas las personas que conforman estos Hospitales por brindarme todo su cariño y apoyo, siempre los llevaré en mi corazón.

A mi tutora Paola del Instituto de Investigaciones Biomédicas por brindarme todo su apoyo y por ser un soporte muy importante en mi vida.

A César por hacer que cada día sea diferente gracias a su sentido de humor y explicarme todas las dudas que he tenido a través de este proceso de aprendizaje.

A Ligia mi tutora de la Universidad Católica por darme consejos que han sido de gran importancia para continuar mi camino.

A Maria Eugenia, Ma. José, Carolina, Carolina E, Jenny, Andres, Lucho, German, Fabian P, Fabian O, Camilo P, Camilo H, Eduardo, Michael, por brindarme todo su apoyo cuando lo necesité.

A mis compañeros de Universidad por compartir tantos momentos especiales a mi lado, Lucía, Dani, Gabriela, Anita, Daniela, Sofía, Catalina, Alexandra, Andrés, Jhoanna, Anabel, Cristina, Andrea, y a todas las personas que compartieron momentos especiales a mi lado.

A mis amigas de colegio que aunque no esté mucho tiempo junto a ellas, siempre las llevo en mi corazón, Vanesa, Estefania, Estefy, Verenice, Ma. Fernanda, Ma. José.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE GRAFICOS .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESÚMEN .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>xiv</b>
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>1</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 OBJETIVO GENERAL .....	3
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>5</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Biología y Patogenia del Mieloma Múltiple. ....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Origen de la célula mielomatososa. ....	7
2.2.2 Patogenia del mieloma múltiple en múltiples etapas. ....	11
<b>2.3 Diagnóstico clínico del mieloma múltiple y de sus complicaciones, diagnóstico diferencial, tipos de MM.....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Manifestaciones clínicas. ....	11
2.3.2 Complicaciones Infecciosas .....	12
2.3.3 Insuficiencia renal .....	12
2.3.4 Complicaciones hematológicas.....	13
<b>2.3 Diagnóstico de Mieloma Múltiple. ....</b>	<b>13</b>
2.4.1 Sistema Internacional de Estadiaje (ISS) .....	13
2.4.2 Sistema de estadiaje Durie y Salmon .....	14
<b>2.5 Diagnóstico de laboratorio en el mieloma múltiple. ....</b>	<b>14</b>
2.5.1 Detección de la proteína M. ....	14
2.5.2 Cuantificación de las Inmunoglobulinas.....	15
2.5.3 Cuantificación de cadenas ligeras libres. ....	15
2.5.4 Factores de riesgo.....	16
2.5.5 Dentro de los factores del Estilo de Vida podemos encontrar. ....	17
<b>CAPITULO III .....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 TIPO DE ESTUDIO .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 POBLACIÓN - AMBIENTE – PERIODO. ....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....</b>	<b>18</b>

<b>3.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.....</b>	<b>19</b>
<b>3.6 TAMAÑO DE MUESTRA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.7 TÉCNICAS EMPLEADAS.....</b>	<b>20</b>
3.7.1 Electroforesis de Proteínas.....	20
3.7.2 Realización de B2M e IgE.....	20
3.7.3 Realización de IgG, IgA, IgM, PCR, Cadenas Kappa y Lambda.....	21
3.7.4 Realización de Urea, Creatinina, Calcio, Albúmina, LDH, Proteínas Totales, Proteína de Bence Jones.....	21
3.7.5 Realización de Biometría Hemática.....	22
3.7.6 Citogenética Convencional.....	23
3.7.7 Extracción de ADN, cuantificación.....	24
3.7.8 Biología Molecular (PCR).....	26
3.7.8.1 Gen Aurora Quinasa A.....	26
3.7.8.1.1 Función.....	27
3.7.8.1.2 Localización.....	27
3.7.8.1.3 Polimorfismo a identificar.....	28
3.7.8.1.4 Secuencia de primers (pag 54).....	28
3.7.8.2 Gen de la Aurora Quinasa B.....	28
3.7.8.2.1 Función.....	28
3.7.8.2.2 Localización.....	28
3.7.8.2.3 Polimorfismos a identificar.....	29
3.7.8.2.4 Secuencia de primers.....	30
Fundamento de la PCR.....	30
3.7.8.3 Fundamento:.....	30
3.7.8.3.1 PCR convencional.....	32
3.7.8.3.2 PCR de secuencia.....	33
<b>3.8 OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES (ANEXO 1.).....</b>	<b>37</b>
3.8.1 MÉTODO ESTADÍSTICO.....	37
3.8.1.1 Métodos de recolección de Información.....	37
3.8.1.2 Recolección de muestras.....	37
<b>3.9 ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.10 MARCO CONCEPTUAL.....</b>	<b>38</b>
3.10.1 Mieloma Múltiple:.....	38
3.10.1.1 Monoclonal.....	38
3.10.1.2 GMSI.....	38
3.10.1.3 Plasmocitoma.....	38
3.10.1.4 Glóbulos Rojos.....	38
3.10.1.5 Hemoglobina.....	39
3.10.1.6 Leucocitos o Glóbulos Blancos.....	39
3.10.1.7 Plaquetas.....	39
3.10.1.8 Trombocitopenia.....	39
3.10.1.9 Neutrófilos.....	39
3.10.1.10 Linfocitos.....	40
3.10.1.11 Leucopenia.....	40

3.10.1.12 Médula Ósea.....	40
3.10.1.13 Biopsia de Médula Ósea.....	40
3.10.1.14 Lesión Lítica.....	40
3.10.1.15 Urea:.....	40
3.10.1.16 Creatinina .....	41
3.10.1.17 Cadenas ligeras libres.....	41
3.10.1.18 Cadena Ligera .....	41
3.10.1.19 Amiloidosis .....	41
3.10.1.20 Calcio .....	41
3.10.1.21 Hipercalcemia .....	41
3.10.1.22 Albumina.....	42
3.10.1.23 LDH.....	42
3.10.1.24 Beta 2 microglobulina .....	42
3.10.1.25 Proteinuria de Bence Jones .....	42
3.10.1.26 FISH.....	42
3.10.1.27 Gen.....	43
3.10.1.28 Electroforesis de Proteínas .....	43
3.10.1.29 Proteína M (Picos M).....	43
3.10.1.30 PCR .....	43
3.10.1.31 Cadenas Ligeras en suero:.....	43
3.10.1.32 Citología.....	43
<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>44</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>
<b>Anexo 1. Operacionalización de las variables. ....</b>	<b>92</b>
<b>Anexo 2. Cuantificación del ADN del total de pacientes con Mieloma múltiple....</b>	<b>95</b>
<b>Anexo 3 Secuenciación del gen Aurora Quinasa A en la serie de pacientes de mieloma múltiple de este estudio. MM, mieloma múltiple .....</b>	<b>102</b>
<b>Anexo 4. Protocolo de trabajo establecido entre el IIB y el HCAM. ....</b>	<b>118</b>
<b>Anexo 5. Modelo del formulario de petición de realización de estudio genético. ....</b>	<b>123</b>
<b>Anexo 6. Documento explicativo con las condiciones de envío de muestras para la realización de los estudios de genética y biología molecular.....</b>	<b>124</b>
<b>Anexo 7. Modelo de Consentimiento Informado para este estudio.....</b>	<b>127</b>
<b>Anexo 8. Inserto PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. ....</b>	<b>131</b>
<b>Anexo 9. Especificaciones técnicas NanoDrop 2000. ....</b>	<b>132</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estadio de Mieloma Múltiple según el Sistema Internacional de Estadaje ISS... 13	13
Tabla 2. Estadio de Mieloma Múltiple según Durie y Salmon. Fuente: Low, et al., 2011. 14	14
Tabla 3. Pruebas Bioquímicas. Valores de Referencia - Reactivos..... 22	22
Tabla 4. Biometría Hemática. Equipo- Reactivos. .... 22	22
Tabla 5. Reacción en cadena de la polimerasa – Aurora Quinasa A..... 32	32
Tabla 6. Reacción en cadena de la polimerasa - Aurora Quinasa B..... 32	32
Tabla 7. Aurora Quinasa A - Ciclos en Termociclador..... 32	32
Tabla 8. Aurora Quinasa B – Ciclos en Termociclador. .... 33	33
Tabla 9. PCR de secuencia - Aurora Quinasa A. .... 35	35
Tabla 10. PCR de Secuencia - Aurora Quinasa B. .... 35	35
Tabla 11. Características demográficas y clínicas de 116 pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple en el HCAM en el periodo comprendido entre 1986 - 2012..... 45	45
Tabla 12. Supervivencia de los pacientes con mieloma múltiple asociado al estadiaje..... 45	45
Tabla 13. Distribución de 116 pacientes que presentaron Mieloma múltiple y el daño óseo que presentaron al momento del diagnóstico. .... 46	46
Tabla 14. Características clínicas de pacientes con Mieloma múltiple. Media, mediana, desviación estándar y P de Fisher..... 47	47
Tabla 15. Distribución de casos por procedencia..... 48	48
Tabla 16. Distribución de casos por ocupación..... 49	49
Tabla 17. Análisis Hardy – Weinberg para los diferentes genes estudiados con sus respectivos polimorfismos..... 61	61
Tabla 18. Análisis de riesgo de adquirir mieloma múltiple con los polimorfismos Phe31Ile (rs2273535), Thr298Met (rs1059476), AURKB /Ser295Ser (rs2241909), mediante un análisis de Odds Ratio ..... 63	63
Tabla 19. Análisis de Chi - cuadrado para los diferentes genes estudiados con sus respectivos polimorfismos..... 65	65
Tabla 20. Análisis de Fisher exacto para identificar correlación entre alteraciones citogenéticas y polimorfismos estudiados en el gen de Aurora Quinas A y Aurora Quinasa B. .... 66	66
Tabla 21. Análisis de pacientes que presentaron alteraciones genéticas vs pacientes que no las presentaron, con respecto a los polimorfismos estudiados en Aurora Quinasas A y B. 67	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de patogénesis de células plasmáticas. Fuente: Leone, et al., Clin Cáncer Res. 14(19), 6033-41. 2008. ....	11
Figura 3. Gráfico molecular de la Aurora Kinasa A. Fuente: NCBI - Gene. ....	27
Figura 4. Gráfico del Cromosoma 20. Fuente: Genetics home reference. ....	27
Figura 5. Gráfico molecular de la Aurora Quinasa B. Fuente: NCBI - Gene. ....	29
Figura 6. Gráfico del Cromosoma 17. Fuente: Genetics home reference. ....	29
Figura 7. Electroforesis de los fragmentos de ADN aproximadamente 165 pb Aurora A y 216pb Aurora B en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. ....	35
Figura 8. Electroforesis del fragmento de ADN aproximadamente 216pb, gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio. Gen Aurora Quinasa B .....	36

## **LISTA DE GRAFICOS**

Gráfico 1. Estadío de pacientes con mieloma múltiple asociado a sobrevida.....	46
Gráfico 2. Distribución de casos por procedencia en porcentajes.....	48
Gráfico 3. Distribución de casos por ocupación en porcentajes.....	49
Gráfico 4. Alteraciones citogenéticas en pacientes con mieloma múltiple.....	51

## RESÚMEN

El mieloma múltiple es un tipo de cáncer de células plasmáticas que se caracteriza por presentar una proteína monoclonal en suero o en orina, es un tipo de cáncer poco frecuente que representa al 1,5% del total de neoplasias y el 10% de neoplasias hematológicas, se presenta más comúnmente en hombres que en mujeres, se ha descrito que la exposición a diferentes agentes químicos y físicos podrían constituir factores de riesgo. Es una enfermedad que incide principalmente en personas mayores de 60 años y muestra una tasa de 5,9 por 100.000 habitantes en todo el mundo, en Latinoamérica los estudios epidemiológicos y genéticos son escasos.

El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia del MM en Ecuador, las causas, el manejo del paciente y las correlaciones clínico-genéticas. Para la obtención de estos datos se obtuvieron 116 casos diagnosticados de mieloma múltiple en el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) en un periodo comprendido entre 1986 a 2012 y en el hospital SOLCA Quito 19 pacientes que se realizaron estudio de médula ósea en el 2012. En el Instituto de investigaciones Biomédicas (IIB) se realizó un estudio de médula ósea en los 19 pacientes en los cuales se examinó la función del polimorfismo Phe31Ile del gen AURKA y para el gen de AURKB se identificaron dos polimorfismos importantes Thr298Met y Ser295Ser que podrían estar asociados al riesgo de desarrollar MM y a su progresión.

En los resultados obtenidos se pudo identificar que el alelo Ile se encuentra con mayor frecuencia que el alelo Phe en los pacientes que presentaron mieloma múltiple. En nuestra población se identificó que la mayor cantidad de pacientes presentaron el genotipo heterocigoto Phe/Ile que homocigoto para el genotipo Phe/Phe, lo que nos indica que el alelo Ile puede verse relacionado al desarrollo tumoral.

Lo observado en los resultados obtenidos del análisis de cada uno de los polimorfismos Phe31Ile (AURKA), Thr298Met y Ser295Ser (AURKB) con respecto a la citogenética y estadiaje se pudo identificar que no presentaron riesgo significativo de desarrollar mieloma múltiple.

## **ABSTRACT**

Multiple myeloma is a type of plasma cells that is characterized by a monoclonal protein in serum or urine cancer is a rare type of cancer that accounts for 1.5% of all cancers and 10% of hematological malignancies it is most common in men than in women, it described that exposure to various chemical and physical agents may be risk factors. It is a disease that mainly affects people over 60 years and shows a rate of 5.9 per 100,000 population in the world, in Latin America the epidemiologic and genetic studies are scarce.

The aim of this study is to determine the prevalence of MM in Ecuador, causes, patient management and clinical-genetic correlations. To obtain this data 116 diagnosed cases of multiple myeloma in the Carlos Andrade Marín (HCAM) Hospital in the period between 1986-2012 and in Quito SOLCA 19 patients bone marrow study conducted in 2012 hospital were obtained.

At the Institute of Biomedical Research (IIB) study bone marrow was performed on 19 patients whose function Phe31Ile AURKA gene polymorphism and gene AURKB examined two important polymorphisms and Ser295Ser Thr298Met that could be identified associated with the risk of GM and its progression.

In the results it was possible to identify that the Ile allele is found more often than the Phe allele in patients who had multiple myeloma.

In our population it was identified that the greatest number of patients had a heterozygous genotype Phe / Ile genotype homozygous for that Phe / Phe, which indicates that the Ile allele may be related to tumor development.

Observed in the results obtained from the analysis of each Phe31Ile (AURKA) Thr298Met and Ser295Ser (AURKB) polymorphisms regarding the cytogenetic and staging was identified which showed no significant risk of developing multiple myeloma.

## INTRODUCCIÓN

El mieloma múltiple es un cáncer de células plasmáticas que presenta una proteína monoclonal en suero o en orina, es un tipo de cáncer poco frecuente que representa al 1,5% del total de neoplasias y el 10% de neoplasias hematológicas está en segundo lugar después del linfoma, pocas veces los pacientes que han sido diagnosticados con esta patología han escuchado hablar de ella.

Sus manifestaciones clínicas son hipercalcemia, niveles de hemoglobina bajos, algunos pacientes presentan daño renal por presencia excesiva de cadenas ligeras libres en suero llegando a presentar niveles elevados de urea y creatinina, también presentan un pico en una proteína monoclonal debido a la producción de un tipo de inmunoglobulina en especial, los pacientes con esta patología generalmente presentan anemia, infecciones frecuentes a repetición debido a que poseen gran cantidad de anticuerpos pero son parcialmente funcionales, fracturas espontáneas debido a que las células plasmáticas liberan una sustancia que provocan que los osteoclastos actúen con mayor rapidez degradando el hueso, y mediante rayos X se puede observar lesiones típicas en sacabocado muy características del mieloma múltiple.

En la actualidad no se sabe exactamente cuál es la causa de presentar un mieloma múltiple, su desarrollo posiblemente se deba a la alteración de varios mecanismos genéticos o ambientales. Los factores de riesgo o predisponentes corresponden a la raza negra, el sexo masculino, edad avanzada, estar expuesto durante tiempo prolongado a sustancias tóxicas, radiación, antecedentes familiares con algún tipo de cáncer en especial hematológico, estilo de vida: obesidad, alcohol, cigarrillo.

El mieloma múltiple es un tipo de cáncer muy complejo ya que no se conoce cuál es su origen, posee gran cantidad de variantes: por ejemplo en el estudio de cromosomas mediante citogenética se han podido encontrar en estos pacientes daños estructurales y numéricos, localización de plasmocitomas en distintas áreas, por esta razón es importante investigar el origen de esta patología y analizar gracias a los datos encontrados en nuestra

población un posible tratamiento y un adecuado seguimiento por parte de las áreas implicadas. (Conte, et al., 2007; Calvo-Villas, et al., 2009).

# **CAPITULO I**

## **JUSTIFICACIÓN**

El mieloma múltiple (MM) es un tumor muy agresivo con una mediana de vida muy baja. Es una patología hematológica frecuente en otros países y se desconoce la frecuencia de esta enfermedad en el Ecuador siendo un país con tradición agrícola y trabajo en cuero y petróleo; habiéndose planteado que trabajadores en agricultura, petroleras, industrias del cuero y cosmética tienen un mayor riesgo a desarrollar mieloma.

Esta investigación tiene la finalidad de brindar un conocimiento aproximado del estado del mieloma múltiple en el Ecuador, a través del estudio de los casos de MM del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM), un hospital de referencia con pacientes procedentes de diferentes provincias del país, y que fueron diagnosticados entre 1986 a 2012, lo que permite tener un rango amplio de tiempo. Se decidió considerar desde 1986 puesto que en ese año se inician los estudios de citogenética convencional en el Ecuador (Paz-y-Miño, 2009).

Al tratarse de un primer estudio de esta índole en el país, se requiere evidenciar en todos los casos de estudio, los protocolos de diagnóstico, manejo del paciente y muestras biológicas, pruebas de laboratorio clínico, estudios genéticos, posibles factores de riesgo por exposición ocupacional y medioambiental y correlaciones clínico-genéticas.

Se requiere conocer toda esta información para que pueda ser discutida a futuro con otras instituciones nacionales a fin de implementar, estandarizar y mejorar los protocolos en marcha. Estos datos también se compararán con los existentes en otros países latinoamericanos a través de la Red Iberoamericana para la Investigación de Mieloma múltiple (Leone, et al., 2013).

Desde el punto de vista genético es una enfermedad compleja, clasificada citogenéticamente en casos no-hiperdiploides, que presentan principalmente translocaciones que afectan al locus de la inmunoglobulina de cadena pesada y casos hiperdiploides, con ganancias de la mayoría de los cromosomas impares. Estas alteraciones

cromosómicas están fuertemente relacionadas con el pronóstico así los pacientes del grupo no-hiperdiploide tienen peor pronóstico que los del grupo hiperdiploide.

El mieloma es una enfermedad para la que no existe curación. La posibilidad de caracterizar clínica y genéticamente a los enfermos brinda información base para estudios siguientes sobre posibles dianas terapéuticas que sean consideradas en el desarrollo de nuevos medicamentos y con aplicación a pacientes ecuatorianos considerando las diferencias étnico-geográficas existentes.

La aplicabilidad clínico-social de la información obtenida en este estudio es de gran importancia y se evidenciará en distintos niveles. De forma inmediata, la comunidad científica contará con un registro de pacientes, bien caracterizados a nivel clínico y genético. A mediano plazo, la identificación de factores con valor pronóstico podrá ser utilizado como parte de los criterios de nuevos ensayos clínicos. Por último, a largo plazo se espera que esta información contribuya al desarrollo de nuevos fármacos y pautas terapéuticas destinadas a prolongar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

## **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El mieloma múltiple (MM) es el segundo tipo más frecuente de cáncer hematológico después del linfoma no Hodgkin. Representa aproximadamente el 1% de todos los cánceres y el 2% de las muertes por cáncer (Cueva y Yépez, 2009). El MM se presenta más comúnmente en hombres que en mujeres y se ha informado de diferencias en la incidencia según el grupo étnico (Waxman, et al., 2010), situación que podría explicarse por la influencia de factores genéticos (Paz-y-Miño, 2009). Con respecto a las causas relacionadas al desarrollo de MM, se ha descrito que la exposición a diferentes agentes químicos y físicos podrían constituir factores de riesgo. Es una enfermedad que incide principalmente en personas mayores de 60 años y muestra una tasa de 5,9 por 100.000 habitantes en todo el mundo (Facts, 2013). Los estudios epidemiológicos y genéticos del mieloma en Latinoamérica son escasos, situación que se evidencia al revisar las publicaciones sobre mieloma procedentes de Latinoamérica, en donde Argentina, Brasil, Chile y México son los únicos países que presentan información clínica y/o genética de

esta enfermedad (Stella, et al., 2011; Hungria, et al., 2008; Conte, et al., 2007; Ruiz-Delgado et al., 2004). Existen estudios de grupos norteamericanos en los que se describe la incidencia de esta enfermedad incluyendo pacientes procedentes de Puerto Rico, República Dominicana y Haití. Con respecto a Ecuador no se tiene información procedente de ninguna publicación indexada. Esto plantea el reto de determinar la prevalencia del MM en Ecuador, las causas, el manejo del paciente y las correlaciones clínico-genéticas.

Por lo cual se propone realizar un estudio descriptivo, en el que se determine todas las pruebas clínicas que caracterizan al mieloma múltiple y el manejo de cada paciente, será también un estudio espaciotemporal, en el que se determine la prevalencia del mieloma múltiple en un rango amplio como es en los últimos veintiséis años, y será un estudio causal puesto que se buscará establecer el efecto de las condiciones medio ambientales de cada paciente y el desarrollo de éste cáncer. Para lo cual se analizarán todos los registros de pacientes diagnosticados de mieloma múltiple en el HCAM entre 1986 y 2012 y en el hospital SOLCA Quito en pacientes que se realizaron estudio de médula ósea en el 2012. Se realizarán todas las pruebas del Laboratorio Clínico en el hospital SOLCA Quito en un periodo comprendido entre 2011 y 2012, las técnicas de citogenética convencional, citogenética molecular y biología molecular se realizarán en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) en 2012, que son de gran utilidad para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con este tipo de cáncer. Finalmente, correlacionaremos los estudios genéticos con la clínica de los pacientes para identificar posibles factores pronósticos que nos permitan poder predecir el desarrollo de su enfermedad y la respuesta a diferentes tratamientos.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el estado del mieloma múltiple, según las pruebas de laboratorio clínico, estudio genético, edad, género, procedencia y ocupación de los pacientes diagnosticados en el Hospital Carlos Andrade Marín ente 1986 y 2012.

### **1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar todos los valores de pruebas de laboratorio para poder clasificar a cada paciente según el sistema Internacional de estadio (ISS).
2. Establecer el impacto de factores sociodemográficos sobre la epidemiología del MM.
3. Especificar las alteraciones cromosómicas asociadas a cada caso de MM a través del análisis de citogenética convencional.
4. Identificar alteraciones en genes asociados a problemas de ploidía.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 ANTECEDENTES**

En la actualidad en Ecuador no se han realizado estudios acerca de factores predisponentes y genéticos de mieloma múltiple, los únicos datos obtenidos a nivel epidemiológico se registraron en la Sociedad Ecuatoriana de lucha contra el cáncer SOLCA Quito correspondientes al período 2003-2005 (Cueva y Yépez, 2009) y en el Instituto de estadísticas y censos INEC (Censos, 2010). Aunque exista una guía de diagnóstico y tratamiento que no se aplica (SEO, 2011)

En una revista médica de Costa Rica y Centroamérica publicada en el 2012, se realizó un estudio retrospectivo en donde se identificó que el primer caso de mieloma múltiple había sido diagnosticado en el año de 1845 (Estrada, 2012), durante mucho tiempo esta enfermedad fue considerada un tumor óseo, por esta razón se ha dificultado el estudio de esta patología, también se pudo identificar la incidencia y prevalencia, es más común en personas mayores de 60 años (Ross, et al., 2005) solo un 15% representa a pacientes menores de 50 años, afecta más a hombres que a mujeres, es más común en raza negra que en blancos con una incidencia de 8,1 hombres negros y 6,1 mujeres negras por cada 100.000 habitantes, en personas de raza blanca la incidencia es de 4,0 hombres y 2,7 mujeres por cada 100.000 habitantes. Se desconoce el origen y los factores de riesgo que puedan ocasionar un Mieloma múltiple y la razón de que las personas de raza negra puedan tener mayores probabilidades de desarrollar esta patología, aunque se cree que puede ser debido a exposición prolongada a sustancias químicas y radiaciones ionizantes en donde se identificó que gran cantidad de radiólogos mueren por esta causa, del mismo modo una alta mortalidad se ha identificado en los sobrevivientes japoneses de la bomba atómica (Estrada, 2012).

En un estudio realizado en Colombia en el Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá (1983-2006), se encontró que los pacientes que padecían de MM recibían su diagnóstico en etapas avanzadas de la enfermedad con una carga tumoral elevada, también

se pudo encontrar que existe mayor incidencia en pacientes jóvenes y un compromiso renal superior a los estudios realizados anteriormente, con estos resultados se llegó a la conclusión de que es importante la realización de estudios similares a mayor escala para poder identificar el impacto de esta neoplasia en Colombia (Segovia, et al., 2008).

En el Ecuador es de gran importancia el estudio de factores predisponentes y genéticos de Mieloma Múltiple, ya que es una enfermedad que desconocemos la incidencia y que en otros países tiene una supervivencia de tan solo 3 años, se cree que en el Ecuador debido a que es un país en vías de desarrollo está asociado a mayor riesgo laboral.

En el Ecuador no se han realizado estudios acerca de este tipo de cáncer, los únicos datos que se han obtenido es gracias al Registro Nacional de Tumores en SOLCA Quito y los datos obtenidos por el INEC en el último censo registrado en el año 2010. Según el Censo realizado en el 2010, Ecuador tiene 14'483.499 habitantes. En el Ecuador según la Sociedad Ecuatoriana de Oncología afirma que el cáncer es la segunda causa de muerte, con una mortalidad superior a 100 por cada 100.000 habitantes, el cáncer es una patología que se ha ido incrementado con una incidencia 1,5 por año (Cueva y Yépez, 2009). Con los datos obtenidos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (Censos, 2010) solo se pudo identificar total de egresos clasificados por género, días de estadía en hospitales a nivel nacional con estos datos no podemos identificar una incidencia de pacientes con Mieloma Múltiple en el Ecuador (Censos, 2010).

Según el Registro Nacional de Tumores se pudieron identificar desde el año 1999 hasta el año 2008 un total de 221 casos de Mieloma múltiple que corresponden a 131 casos sexo masculino y 90 casos sexo femenino. En las tasas de incidencia promedial anual según localización topográfica por grupos de edad en pacientes con sexo masculino y femenino se pudo identificar que la edad es un factor de riesgo pronóstico para Mieloma Múltiple con un porcentaje del 19,5 correspondiente a pacientes mayores de 75 años en varones y del 14,8 en mujeres mayores de 65 años (Cueva y Yépez, 2009).

Según estudios realizados en diferentes países se pudo identificar que el Mieloma Múltiple tiene una incidencia internacional de 0,2 a 5,1 casos por cada 100.000 habitantes, con una media de 2,65 por año (Conte, et al., 2007), con los datos obtenidos por SOLCA e

INEC se podría deducir que la incidencia en el Ecuador podría ser menor comparada a la de otros países o puede ser que esta patología sea sub-diagnosticada en nuestro país. Según los cálculos realizados, el Ecuador debería tener 77,28 casos de pacientes con Mieloma múltiple por año en la provincia de Pichincha, sin embargo en Ecuador se han identificado una media de 24,5 casos por año cada 100.000 habitantes.

Gracias al estudio que se va a realizar se podrá identificar la causa de esta patología en el Ecuador y poder plantear información básica a los médicos oncólogos y hematólogos para un diagnóstico oportuno de esta patología tan compleja como es el Mieloma Múltiple.

A pesar de los avances de la ciencia y los arduos esfuerzos para identificar una posible cura para este tipo de cáncer, han sido en vano; se plantean estrategias muy prometedoras (Leone, 2013); sin embargo, el Mieloma múltiple es de gran complejidad diagnóstica por esta razón la gran mayoría de pacientes son diagnosticados en estadios muy avanzados y sus probabilidades de vida son escasas después del diagnóstico (Geipp, et al., 2005).

## **2.2 Biología y Patogenia del Mieloma Múltiple.**

### **2.2.1 Origen de la célula mielomatosa.**

El mieloma múltiple es un tipo de cáncer causado por la proliferación de células plasmáticas malignas en médula ósea de esta manera provocando una anomalía en la producción normal de las células sanguíneas.

El sistema inmunológico cuenta con dos tipos de células de la serie de glóbulos blancos importantes en la defensa de nuestro organismo, que son linfocitos B y linfocitos T.

Los linfocitos B maduran en la médula ósea, para luego ubicarse en ganglios linfáticos en donde se van a activar si son estimulados mediante un agente extraño, inmediatamente van a producir una respuesta inmune como mecanismo de defensa del organismo, por lo que son capaces de producir anticuerpos a través de señales del BCR,

CD40, TLR y receptores para citoquinas. Los linfocitos B durante su maduración comienzan en una célula madre totipotente que va a dar lugar a una célula progenitora (pro-B), seguida de la célula pre-B y posteriormente en las células B más diferenciadas. Las células plasmáticas sufren un cambio en sus características morfofuncionales: carecen de Inmunoglobulina de membrana, no circulan por el torrente sanguíneo, sino que se localizan en órganos linfoides secundarios y los lugares en donde se produce una respuesta inmunológica, viven pocos días ya que son células que se encuentran en fase terminal, presenta fosfatasa ácida positiva, las células plasmáticas malignas generalmente presentan CD38+, CD138+ y CD56+ (Hernández, 2009).

La causa de mieloma múltiple se ve relacionada a una producción excesiva no regulada de células plasmáticas que se acumulan en gran cantidad en la médula ósea, están células no funcionales secretan inmunoglobulinas en exceso, entre ellas están: IgG en un 57%, IgA 21%, IgD: 1%, IgM e IgE son menos comunes y se presentan en raras ocasiones, solo en un 18% se presentan casos de mieloma múltiple de cadenas ligeras (Estrada, 2012).

Estas células pueden estar presentes en distintas partes de nuestro organismo pero en especial en la médula ósea, cuando por causa aún desconocida se pierden los mecanismos de control de proliferación celular y muerte programada provocan la aparición de plasmocitomas que son masas o tumores formados por acumulación de células plasmáticas malignas.

Los pacientes con mieloma múltiple presentan una sintomatología muy diversa entre ellas está la presencia de células plasmáticas en médula ósea mayor al 10%, que ocasiona el desplazamiento de células productoras de diferentes tipos de células sanguíneas normales, provocando de esta manera que la persona afectada presente lesiones líticas óseas, anemia, trombocitopenia, leucopenia y en especial la elevación de un tipo de inmunoglobulina sérica y urinaria, como daño secundario que se puede producir en esta patología están: infecciones frecuentes, insuficiencia renal, dolores óseos y fracturas debido a que las células plasmáticas interfieren con la producción de células encargadas de regenerar el hueso llamadas osteoblastos y la producción de una sustancia que hace que las células encargadas de degradar el hueso llamadas osteoclastos actúen con mayor rapidez, de esta manera provocando fracturas inesperadas sin ninguna causa aparente, esta fractura

lo que produce es la liberación de calcio causando niveles elevados de calcio sérico en exámenes de laboratorio, a veces la expansión de estas lesiones líticas puede producir efectos neurológicos, debido a la compresión que ocasiona a nivel de la médula espinal (Estrada, 2012).

El mieloma múltiple se le considera el 1% del total de neoplasias y un 10% de tumores hematológicos y tiene una incidencia anual de 3 a 4 casos cada 100.000 habitantes y una media de edad de aproximadamente 62 años, con una supervivencia aproximada de 3 años.

Este tipo de neoplasia se presenta más comúnmente en hombres que en mujeres y se ha identificado diferencias según el grupo étnico, situación que podría explicarse por influencia de factores genéticos, las causas que se cree que desarrollan esta patología están relacionadas con la exposición a diferentes agentes químicos y físicos que podrían constituir factores de riesgo.

Mediante un análisis genético se puede identificar si un paciente tiene o no un mal pronóstico, un paciente con MM puede presentar diversas ganancias y pérdidas cromosómicas (Menoni-Blanco, 2010). Así los casos de MM se dividen en dos grupos basados en la distribución del número cromosómico: hiperdiploides y no hiperdiploides (Debes-Marun, et al., 2003; Wuilleme, et al., 2005). Aproximadamente el 50% de los MM se identifican por su estado hiperdiploide (de 47 a 74 cromosomas), mostrando trisomías múltiples de cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21). (Conte, et al., 2009; Hideshima, et al., 2004). Los casos no-hiperdiploides no presentan ganancias cromosómicas, se caracterizan por presentar translocaciones, las cuales generalmente involucran al locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina en el cromosoma 14q32 tales como t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) y t(14;20) (Hideshima, et al., 2004; Kyle y Rajkumar, 2005; Lombardi, et al., 2007), resultando en activaciones transcripcionales de genes como *FGFR3/MMSET*, *CCND3*, *CCND1*, *MAF* o *MAFB* dando como resultado un pronóstico desfavorable (Fonseca, et al., 2004; Bergsagel y Kuehl, 2005; Conte, et al., 2009). Sin embargo, las translocaciones se distribuyen en ambos grupos, presentes en el 85% de no-hiperdiploides y cerca del 30% de hiperdiploide (Smadja, et al., 2001; Debes-Marun, et al., 2003; Fonseca, et al., 2003). Los estados hiperdiploides y no-hiperdiploides también se pueden encontrar en pacientes con MGUS, y en los estadios finales de la

enfermedad como Leucemia de células plasmáticas (LCP) y en líneas celulares de mieloma (HMCLs) que se caracterizan además por mutaciones de los genes *p53* y *RAS* y metilación de *CDKN2A* (Schultheis, et al., 1999; Bezieau, et al., 2001; Mateos, et al., 2002). Esta presentación de alteraciones cromosómicas y genéticas y acumulación de las mismas a lo largo de diferentes estadios es consistente con un modelo de enfermedad de varias fases.

La desregularización de genes debido a los rearrreglos cromosómicos juegan un papel fundamental en la patología del MM, tal es el caso de los genes *MMSET* (*multiple mieloma SET domain*) y *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*), identificados como genes involucrados en la translocación t(4;14) (p16;q32) presente en aproximadamente del 15% al 20% de MM mostrando además pronósticos desfavorables (Keats, et al., 2003; Santra, et al., 2003; Hideshima, et al., 2004; Hurt, et al., 2004).

Dentro de las generalidades que encierra la inestabilidad genética del MM, además de las translocaciones recurrentes de 14q32 e hiperdiploidías, se encuentran la delección parcial o total de los cromosomas 13 y 17 y la amplificación de 1q. Estas alteraciones se han caracterizado con técnicas de citogenética convencional y molecular lo que ha incitado a la aplicación de técnicas de mayor resolución como los arrays de mapeo genético que permiten analizar simultáneamente el número de copias cromosómicas y el estado de heterocigosis. Combinando esta información con los arrays de expresión, también se han planteado genes importantes de esta enfermedad. También se ha obtenido información sobre los mecanismos por los cuales surgen alteraciones cromosómicas como son la disomía uniparental (UPD), en el cual hay pérdida de heterocigosis (LOH) sin cambios en el número de copias cromosómicas y situaciones con pérdida cromosómica sin LOH (Walker, et al., 2006).

Con la implementación de tecnologías de alta densidad se han identificado nuevos genes asociados al mal pronóstico, *WWOX* y *CYLD* en 16q (Jenner, et al., 2007) y *CDKN2C* en 1p32 (Leone, et al., 2008). También se han establecido firmas genéticas relevantes en la patogénesis y evolución del MM (Dickens, et al., 2011). Toda la información conocida hasta el momento evidencia la complejidad del MM lo que exige la aplicación de técnicas informativas para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con esta enfermedad.

### 2.2.2 Patogenia del mieloma múltiple en múltiples etapas.

De acuerdo a estudios realizados se pudo identificar que aproximadamente un 50% de pacientes con mieloma múltiple pasaron previamente por una gamapatía monoclonal de significado incierto. Se ha podido identificar que pacientes con GMSI tuvieron alteraciones genéticas similares a los pacientes con MM, pudiendo encontrar reordenamientos de IGH que es un proceso de tumorigénesis que conducen con el tiempo a tener un mieloma múltiple. Otro dato de gran interés sería la delección completa o pérdida parcial del cromosoma 13 que se vería asociado a una transición de GMSI a MM. Las mutaciones activadoras del RAS FGFR3 son considerados marcadores moleculares de progresión tumoral. (Calvo-Villas, et al., 2009).

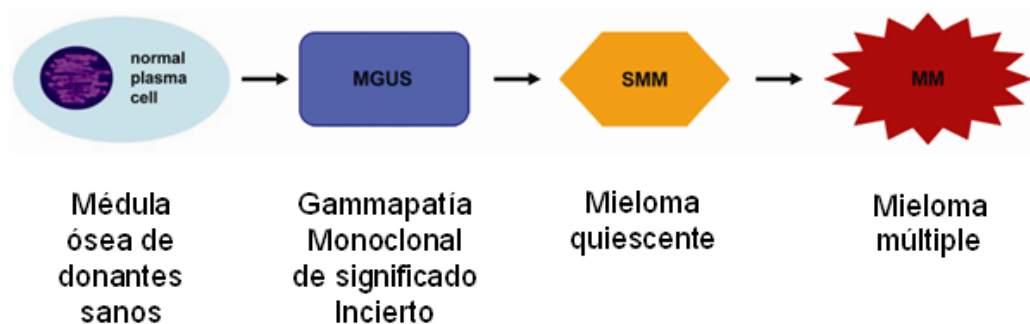


Figura 1. Modelo de patogénesis de células plasmáticas. Fuente: Leone, et al., Clin Cáncer Res. 14(19), 6033-41. 2008.

### 2.3 Diagnóstico clínico del mieloma múltiple y de sus complicaciones, diagnóstico diferencial, tipos de MM.

#### 2.3.1 Manifestaciones clínicas.

El dolor óseo en los pacientes con mieloma múltiple es muy común al momento del diagnóstico, aparece en el 60-70% de los casos y es causado por la osteopenia y las lesiones líticas, entre las áreas más afectadas se encuentran parrilla costal, columna vertebral y cráneo. Las células mielomatosas producen un tipo de sustancias encargadas de activar las células osteoclasticas que degradan el hueso, y bloquean a las células osteoblásticas que permiten la regeneración del mismo.

Los pacientes que padecen esta patología generalmente sufren alteraciones hematológicas obteniendo valores bajos de hemoglobina, por esta razón presentan astenia y fatiga, la pérdida de peso se presenta en menor número de casos, otro de los síntomas más comunes son las infecciones a repetición debido a la producción excesiva de un solo anticuerpo de mala calidad, los pacientes suelen presentar hipercalcemia, daño a nivel renal, sistema central o periférico, frecuentemente se encuentran a pacientes con palidez de piel y mucosas.(Calvo-Villas, et al., 2009).

### **2.3.2 Complicaciones Infecciosas**

Los pacientes presentan inmunodeficiencia debido a que dentro de la patología se encuentra un menor número de linfocitos CD4+ y un aumento de los linfocitos CD8+. La célula plasmática tumoral presenta solo un tipo de anticuerpo poco o nada eficaz. Una de las causas de esta disminución de inmunoglobulinas son infecciones de tracto urinario a repetición; encontrando así microorganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomona ssp*, *Proteus sp*, *Enterobacter* y *Klebsiella* y, también suele presentarse infecciones a nivel de tracto respiratorio siendo las más comunes: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*. El riesgo de padecer este tipo de sintomatología se ve aumentado cuando la infección se encuentra activa y se necesita administrar tratamiento inmunosupresor, estas complicaciones suelen producirse durante los tres primeros meses luego del diagnóstico o luego de una recaída, por esta razón se incrementa el riesgo de muerte en este grupo de pacientes.(Calvo-Villas, et al., 2009).

### **2.3.3 Insuficiencia renal**

El 20 – 25% de pacientes presentan una creatinina elevada mayor a 2mg/dl, esta elevación es un factor pronóstico negativo, se produce por la excreción de cadenas ligeras por parte de las células plasmáticas que cuando no llegan a reabsorberse por parte del riñón pueden producir nefropatía, amiloidosis, necrosis tubular aguda (síndrome de Fanconi). Estos problemas se dan debido a que las cadenas ligeras libres en grandes cantidades llegan a obstruir los túbulos ya sea proximal o distal, reducen el flujo formando acúmulos llegando a producir daño directo sobre las células tubulares. (Campos, et al. 2012).

Otras causas de insuficiencia renal aguda en el MM, es la hipercalcemia que llega a producir polidipsia, poliuria, deshidratación, estreñimiento y trastornos neurológicos.

### 2.3.4 Complicaciones hematológicas.

La complicación hematológica más común es la anemia normocítica normocrómica que es producida porque gran cantidad de células plasmáticas se encuentran en médula ósea, de esta manera impiden que la médula produzca otros tipos de células sanguíneas. Los pacientes con esta enfermedad son sometidos a Quimioterapia y radioterapia, esto es una de las principales causas de presentar anemia e inmunoglobulinas deficientes.

## 2.3 Diagnóstico de Mieloma Múltiple.

Los exámenes de gran importancia dentro del laboratorio clínico son:

Cuantificación de cadenas ligeras y de inmunoglobulinas, hemoglobina, glóbulos blancos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, urea, creatinina, calcio, albúmina, deshidrogenasa láctica, beta 2 microglobulina, PCR, proteínas totales, proteinuria de Bence Jones.

Para el diagnóstico del Mieloma Múltiple se han clasificado dos tipos de estadiaje

### 2.4.1 Sistema Internacional de Estadiaje (ISS)

**Tabla 1. Estadio de Mieloma Múltiple según el Sistema Internacional de Estadiaje ISS.**

Beta 2 Microglobulina en mg/dl	
Albúmina en g/dl	
Estadio I	B2M < 3,5 / ALB >3,5
Estadio II	B2M <3,5 / ALB < 3,5 o B2M 3,5 - 5,5
Estadio III	B2M > 5,5

Fuente: Low, et al., 2011.

## 2.4.2 Sistema de estadiaje Durie y Salmon

**Tabla 2. Estadio de Mieloma Múltiple según Durie y Salmon. Fuente: Low, et al., 2011.**

Estadio	Criterio	Medida de masa de células mielomatosas
Estadio I	Valor de hemoglobina >10,0 g/dl Valor de calcio en suero <2,60 mmol/l Placa de rayos X con estructura ósea normal o plasmocitoma solitario Producción de componente M bajo IgG valor < 50g/l IgA valor < 30g/l Cadena ligera M en orina < 4g/24h	<0,6
Estadio II	No clasificable como estadio I o III	0,6 – 1,2
Estadio III	Valor de hemoglobina < 8,5 g/dl Valor de calcio en suero > 3,00 mmol/l Lesiones líticas avanzadas Cadena ligera M alta IgG valor > 70g/l IgA valor > 50g/l Cadena ligera M en orina > 12g/24h	>1,2

## 2.5 Diagnóstico de laboratorio en el mieloma múltiple.

### 2.5.1 Detección de la proteína M.

El mieloma múltiple es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación de células plasmáticas en médula ósea y la presencia de una proteína que provienen de un único clon de células plasmáticas, esta producción monoclonal anormal se denomina proteína M o paraproteína. Esta proteína se la puede encontrar en suero o en orina en grandes cantidades.

La detección de esta proteína monoclonal en suero se la realiza mediante electroforesis de proteínas, las proteínas van a migrar de acuerdo al peso, la cantidad y la carga eléctrica que posean, existen 5 fracciones: albúmina, alfa 1, alfa 2, Beta y Gamma.

Dentro de las globulinas gamma podemos encontrar a las inmunoglobulinas o anticuerpos (IgG, IgA, IgM, IgE) (Romero, 2011).

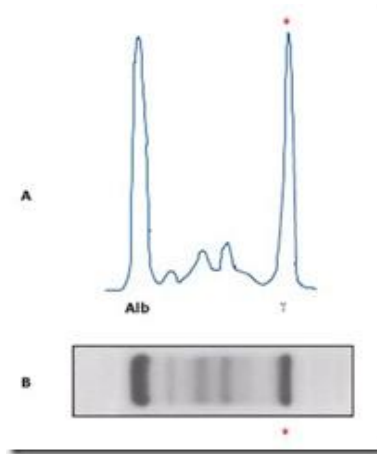


Figura 2. Gráfico de Inmunoglobulinas. Fuente: Resinos, S., Reacciones de precipitación (II): electroforesis. *Epidemiología de enfermedades infecciosas*. 2015.

### **2.5.2 Cuantificación de las Inmunoglobulinas.**

Es importante identificar de qué tipo de mieloma múltiple estamos tratando y que tipo de inmunoglobulina se encuentra en mayor proporción; con la ayuda de estos datos se podrá identificar la carga tumoral y la progresión de la enfermedad. (Low, E. 2011).

### **2.5.3 Cuantificación de cadenas ligeras libres.**

Las cadenas ligeras libres son pequeños polipéptidos que contienen 212 residuos de aminoácidos. Existe dos formas de cadenas libres circulantes en el suero llamadas kappa y lambda, estructuralmente podemos encontrar algunas diferencias por ejemplo las cadenas kappa están conformadas por monómero y dímeros no dissociables, mientras que las cadenas lambda están constituidas por dímeros covalentes.

Las cadenas ligeras circulantes en el plasma van a ser filtradas por el glomérulo, luego de un proceso de endocitosis mediada por receptores multiligandocubulina y

megalina, que se da lugar a las células proximales se van a catabolizar a aminoácidos con la ayuda de enzimas lisosomales, aproximadamente el 10% de las cadenas ligeras libre no cursan por este proceso y son excretadas directamente por la orina en un rango no mayor a 10mg diarios si este rango llega a ser mayor se observara un pico monoclonal en orina en pacientes con mieloma múltiple de cadenas ligeras. (Viedma, C. 2005).

Estas cadenas ligeras libres excretadas se las llama proteína de Bence Jones, que es cuantificable pudiendo ser de gran utilidad como marcador pronóstico en los casos de mieloma múltiple, la concentración en orina de esta proteína se ve ligada a la carga tumoral, función renal y características moleculares de la proteína. (Viedma, C. 2005).

#### **2.5.4 Factores de riesgo**

Existen diversos factores de riesgo para que el MM pueda desarrollarse como son:

**Las radiaciones:** varios estudios plantean que la radiación ionizante puede llegar a desencadenar MM debido a que se encontraron gran cantidad de muertes en trabajadores expuestos a radiaciones y personas sobrevivientes de la bomba atómica (Ichimaru, et al., 1982).

**Sustancias químicas:** Aun no se han podido identificar sustancias químicas que sean consideradas de riesgo para desarrollar un MM, se han encontrado algunas ocupaciones que presentan una incidencia elevada por MM (Alavanja, et al., 2013).

**Edad, sexo y grupo étnico:** En algunas estadísticas encontradas en Ecuador se pudo identificar que la edad promedio de presentar la enfermedad fue de 62 años, con una prevalencia en pacientes de raza negra, el sexo también fue importante en la investigación ya que se pudo identificar que es más común en hombres que en mujeres (Ferlay, et al., 2008).

**Antecedentes Familiares:** El MM suele presentarse con mayor incidencia en algunas familias. Una persona que tenga un familiar hasta tercer grado de consanguineidad (Ogmundsdottir, et al., 2005).

**Defectos citogenéticos:** En varios estudios realizados se encontraron alteraciones cromosómicas de gran importancia en el pronóstico (Zandecki, et al., 1996).

#### **2.5.5 Dentro de los factores del Estilo de Vida podemos encontrar.**

**Obesidad:** En teoría se evidencia que posiblemente la obesidad produzca acumulación de gran cantidad de tóxicos liposolubles que puedan provocar un daño al metabolismo de otras sustancias. (Calvo-Villas, J.M, et al. 2009).

**Tabaco y alcohol:** En los estudios realizados en la actualidad no se ha encontrado una relación clara entre el consumo de estas sustancias con el desarrollo de Mieloma múltiple.(Calvo-Villas., et al. 2009).

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 TIPO DE ESTUDIO**

Esta investigación tiene un diseño longitudinal, ya que va a tomar datos clínicos a partir del año 1986 a 2012, los datos de las historias clínicas y resultados de laboratorio van a ser obtenidos en el Hospital Carlos Andrade Marín, en el cual se va a identificar la incidencia de mieloma múltiple y los posibles factores de riesgo. Es un estudio en el que se determina la prevalencia del mieloma múltiple en un rango de veintiséis años, y un estudio causal puesto que se buscará establecer el efecto de las condiciones medio ambientales de cada paciente y el desarrollo de éste cáncer.

#### **3.2 POBLACIÓN - AMBIENTE – PERIODO.**

Población: Pacientes que cumplan con los criterios para presentar un mieloma múltiple que sean atendidos en el Hospital Carlos Andrade Marín y SOLCA Quito; los cuales son centros de referencia a donde acuden pacientes de provincias: Esmeraldas, Carchi, Imbabura, Manabí, Santo Domingo, Chimborazo, Los Ríos, Bolívar, Tungurahua, Pastaza, Loja, Cotopaxi, Azuay, El Oro, Santa Elena, Napo, Pichincha y Guayas.

Muestra: Se obtuvo muestras de médula ósea de los pacientes que llegaron al laboratorio de genética en SOLCA Quito en el año 2013, las muestras fueron referidas al centro de Investigaciones Biomédicas, en el cual se realizaron pruebas para identificar mutaciones en genes relacionados con el mieloma múltiple como Aurora A y Aurora B, mediante PCR en tiempo real y la realización de un análisis mediante secuenciación.

#### **3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

El presentar todos los datos clínicos para haber sido diagnosticado de mieloma múltiple previo un análisis realizado mediante la clasificación basada en el sistema de estadiaje Durie y Salmon.

### **3.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

Pacientes que no cumplan con los criterios de clasificación para ser diagnosticados con mieloma múltiple basados en el sistema de estadiaje Durie y Salmon.

### **3.5 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.**

La primera etapa de esta investigación se basó en la identificación de los pacientes diagnosticados con mieloma múltiple en el Hospital Carlos Andrade Marín mediante la revisión de la base de datos del laboratorio clínico, en un periodo comprendido entre el año 1986 a 2012.

Se encontraron 116 pacientes de los cuales se analizaron las historias clínicas de los mismos con el objetivo de obtener datos importantes de laboratorio clínico y determinar los posibles factores de riesgo, se analizaron datos de edad, género, procedencia, ocupación y tratamiento. Dentro de los datos de laboratorio Clínico se determinaron los valores de hemoglobina, glóbulos blancos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, urea, creatinina, calcio, albúmina, LDH, B2M, estadío, PCR, IgG, IgA, IgM, cadenas kappa y lambda, cadenas ligeras libres en suero y orina, proteínas totales. Para el análisis de citogenética y pruebas de biología molecular se obtuvieron 19 muestras de médula ósea de pacientes que fueron diagnosticados en el Hospital de SOLCA Quito que acudieron al laboratorio de genética en el año 2012, de la misma manera se revisó los datos de las historias clínicas para poder obtener la mayor cantidad de información.

El procesamiento de pruebas especiales se lo realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), lo primero que se realizó con la muestra de médula ósea fue un cultivo celular en un medio F- 10, para poder identificar daño a nivel cromosómico mediante una citogenética convencional, con la otra fracción de médula se realizó la extracción de ADN con la ayuda del kit de Invitrogen y posteriormente se midió la concentración del mismo en el Nanodrop 2000, el siguiente paso a seguir fue la realización de una PCR para Aurora A para la identificación de un polimorfismo y otra PCR para la identificación de dos polimorfismos en Aurora B, estas determinaciones se las realizó en el secuenciador 3130 Hitachi.

En la última etapa de la investigación se correlacionaron datos de laboratorio clínico con la supervivencia de cada uno de los pacientes, se realizó un análisis entre el estadio con el tiempo de vida, la correlación entre la citogenética y la biología molecular asociado al tiempo de vida.

### **3.6 TAMAÑO DE MUESTRA.**

Se analizaron 116 pacientes que fueron diagnosticados en el Hospital Carlos Andrade Marín de Mieloma Múltiple en el periodo comprendido entre 1986 y 2012, y 20 pacientes del Hospital Solca Quito.

### **3.7 TÉCNICAS EMPLEADAS.**

#### **3.7.1 Electroforesis de Proteínas.**

<b>Equipo:</b>	Capillarys (Electroforesis de proteínas) (Equipo semi-automatizado)
<b>Principio:</b>	La electroforesis de proteínas está basada en los principios de electroforesis de zona realizada en un medio de soporte adecuado.
<b>Método:</b>	Electroforesis
<b>Espécimen:</b>	Suero
<b>Reactivo:</b>	Capillarys Proteín (E) 6
<b>Control:</b>	No usa controles
<b>Casa Comercial:</b>	Simed

#### **3.7.2 Realización de B2M e IgE.**

<b>Equipo:</b>	INMULITE 2000 (Equipo automatizado)
<b>Principio:</b>	Es un ensayo secuencial inmunométrico con dos sitios de unión, quimioluminiscente en fase sólida.
<b>Método:</b>	Quimioluminiscencia
<b>Espécimen:</b>	Suero
<b>Reactivo:</b>	Beta 2 Microglobulin, Inmulite 2000 3g Allergy IgE

**Control:** Se corren tres niveles de control: Bajo, Normal, Alto. Son tres viales de material liofilizado, uno para cada nivel.

### **3.7.3 Realización de IgG, IgA, IgM, PCR, Cadenas Kappa y Lambda.**

**Equipo:** IMAGE (Equipo automatizado)

**Principio:** El análisis mide la velocidad de incremento de dispersión de la luz producida por las partículas suspendidas en la solución, resultantes de los complejos formados durante una reacción antígeno – anticuerpo.

**Método:** Nefelometría cinética

**Espécimen:** Suero

**Control:** El control vigilprotein niveles: 1, 2, 3 (bajo, normal, alto) que sirve para cadenas Kappa, Lambda, e Inmunoglobulinas  
El control VigilSerology niveles 1 y 3 (bajo y alto) se utiliza para las pruebas: PCR

### **3.7.4 Realización de Urea, Creatinina, Calcio, Albúmina, LDH, Proteínas Totales, Proteína de Bence Jones.**

**Equipo:** Modular P800

**Método:** Automatizado de tecnología fotolorimétrica cinética y de punto final que determina analitos bioquímicos en sangre, plasma y otros líquidos biológicos.

**Espécimen:** Suero

**Reactivo:** Tabla Anexa

**Control:** Control normal Precinorm (pn)  
Control patológico Precipath (pp)

**Tabla 3. Pruebas Bioquímicas. Valores de Referencia - Reactivos.**

Pruebas Bioquímicas	Valores de referencia	Reactivos
Urea	10 – 50 mg/dl	KINETIC UV urenitrogen R1: L.U y R2: L.U
Creatinina	0.5 – 1,4mg/dl	R1: Glucose GOD – PAP R1: L.U.
Proteínas Totales	6,6 – 8,7mg/dl	TP Proteína Total R1: L.U y R2: L.U
Albúmina	3,5 – 5,5mg/dl	ALB Plus R1: L.U. y R2: L.U.
LDH	240 – 480 U/L	LDH, LDH optimizada R1: L.U. y R2: L.U.
Calcio Total	8,1 11,8mg/dl	Calcium R1: L.U. y R2: L.U.

### 3.7.5 Realización de Biometría Hemática

- Equipo:** XE 2100 (Equipo automatizado)
- Método:** Medición basada en: Enfoque Hidrodinámico y corriente eléctrica, óptica con citometría de flujo fluorescente, espectrofotometría y radiofrecuencia e Impedancia
- Espécimen:** Sangre Total (Anticoagulante EDTA)
- Reactivo:** Tabla Adjunta
- Control:** Tres niveles de control diario: Normal, y 2 niveles patológicos  
Sysmex Cat Check (XE), L1, L2, L3

**Tabla 4. Biometría Hemática. Equipo- Reactivos.**

Equipo	Reactivos	Determinaciones
SYSMEX – XE. XT- XS	Cellpack	Biometría Hemática
	Cellsheath	
	Sulfolyser Stromatolyser NR	
	Stromatolyserlysing Stromatolyser IM Stromatolyser 4DL	
	Stromatolyser 4DS RET- SEARCH DILUENT	
	RET- SEARCH DYE STROMATOLYSER FB	

### 3.7.6 Citogenética Convencional.

<b>Equipo:</b>	Técnica Manual/ Programa Cytovision 3.93.2
<b>Método:</b>	Estudia la apariencia microscópica de los cromosomas y sus anomalías, es importante relacionarlo con la historia clínica del paciente.
<b>Espécimen:</b>	Sangre Total (Anticoagulante heparina de litio)
<b>Pasos:</b>	Cultivo de Médula Ósea o Sangre Periférica Cosecha de Cultivos de Sangre periférica y Médula Ósea/ Sacrificio celular Extensión de Placas Tinción
<b>Control:</b>	Muestras de médula ósea y sangre periférica (con anticoagulante heparina) de individuos sanos.

#### **MEDIO F-10 SUPLEMENTADO (médula):** Técnica directa y 24 horas

- 100 ml. de F-10
- 10 ml. Suero Fetal Bovino
- 1 ml. Antibiótico-antimicótico
- 1 ml. Hepes Buffer
- 1 ml. L-Glutamina

#### **CULTIVO DE LA MUESTRA (médula) TÉCNICA DIRECTA**

- Descongelar el medio de cultivo F-10 suplementado en el baño maría a 40°C
- Limpiar la cámara de flujo laminar con alcohol
- Etiquetar un tubo cónico nuevo con el código de la muestra a cultivar y la fecha (en el tubo y en la tapa)
- Colocar el tubo cónico y el frasco de medio F-10 suplementado descongelado en la cámara de flujo laminar y encender la luz ultravioleta por 10 minutos antes del cultivo
- Pasado los 10 minutos apagar la luz ultravioleta

- Encender la cámara de flujo al momento de comenzar el cultivo
- Colocar 4ml del medio F-10 suplementado en el tubo cónico y añadir 0.5ml.
- Añadir al cultivo 150ul de Colcemid
- Sellar el tubo cónico con el cultivo y todos los reactivos utilizados con parafilm.
- Incubar la muestra a 37°C por media hora
- Cosechar la muestra según lo indicado en el protocolo de cosecha de cultivos, desde el paso 2
- Limpiar la cámara de flujo laminar con alcohol, guardar el medio de cultivo y si sobró muestra guardar está en la refrigeradora de citología, en el caso contrario desechar la jeringuilla o va container en el bote de desechos tóxicos de citogenética.

### 3.7.7 Extracción de ADN, cuantificación

<b>Equipo:</b>	Extracción de ADN (kit Invitrogen)
<b>Método:</b>	Se basa en lisar la membrana plasmática de la célula con la ayuda de un detergente para dejar libre su ADN, se realizan distintos pasos para su purificación.
<b>Espécimen:</b>	Muestras de médula ósea y sangre periférica (con anticoagulante EDTA)
<b>Pasos:</b>	Lavado de células (Si las células están con anticoagulante de Heparina de Litio). <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fase de Lisis</li> <li>○ Fase de enlace de ADN</li> <li>○ Fase de lavado</li> <li>○ Fase de Elución</li> <li>○ Almacenamiento de ADN</li> </ul>
<b>Control:</b>	Muestras de médula ósea y sangre periférica (con anticoagulante EDTA) de individuos sanos
<b>Fundamento:</b>	La extracción de ADN de una muestra se basa en extraer ácidos nucleicos a través de la lisis de membrana celular, inactivación de nucleasas y separación del ácido nucleico de los restos de células.

Para poder realizar la lisis de la membrana celular se necesita de detergentes que son los encargados de solubilizar las membranas de las células y sales caotrópicas que produzcan una inactivación de las enzimas intracelulares.

### **Procedimiento:**

#### **Preparación de Cabina de Extracción.**

- Limpiar la cabina con ETOH de adentro hacia afuera para eliminar cualquier tipo de contaminación.
- Bajar la seguridad de la cámara de extracción.
- Activar radiación UV durante 10 min.
- Lavado de la muestra (Elimina Impurezas)
- Calentar el baño maría a 55°C
- Muestra que contiene anticoagulante EDTA o Heparina de Litio centrifugar a 14500 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante que en este caso sería el plasma.
- Proceder a realizar lavados del botón celular con PBS
- Colocamos 600ul de PBS al 1X.
- Centrifugamos a 14500 rpm durante 5 min
- Eliminamos el sobrenadante
- Resuspendemos el pellet (repetir los lavados 3 veces)

#### **Extracción de ADN:**

- Rotular los tubos de acuerdo al código que se esté utilizando
- Colocar 200ul del botón celular previamente lavado con PBS en el ependorf de 1.5
- Adicionar 20ul de proteinasa k
- Adicionar 20ul de RNAsa
- Vortexear
- Incubar durante 2 min a temperatura ambiente

- Añadir 200ul de Pure Link (marca genomiclysis)
- Incubar durante 10 min a 55°C (promueve lisis o digestión de la proteína)
- Añadir 200ul de ETOH al 96-100% (produce lisis celular)
- Dar un Vortex durante 5 segundos
- Coger columnas y numerar
- Tomar la mezcla anterior y colocar en la columna debidamente enumerada
- Centrifugar a 10000rcf por 1min a temperatura ambiente
- Pasar el spin collection a otro tubo de colección
- Colocar wash buffer 1
- Centrifugar 10000 rcf durante 1 min
- Pasar el spin a otro tubo de colección
- Realizar el mismo paso con wash buffer 2
- Pasar el spin a otro tubo de colección
- Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos
- Numerar otro tubo de 1.5 y colocar spin encima
- Colocar 15ul de Elution- buffer
- Incubar por 1min a temperatura ambiente
- Centrifugar a máxima velocidad por 1 min
- Repetir los 3 últimos pasos.
- Las muestras deben ser almacenadas de 2-8°C o a -20°C por hasta un año.

### **3.7.8 Biología Molecular (PCR).**

#### **3.7.8.1 Gen Aurora Quinasa A.**

La Aurora Quinasa A es una proteína que si se encuentra sobre expresada puede estar vinculada a la formación de tumores, sin embargo si se encuentra en condiciones normales es la encargada de corregir errores durante la división. En la división celular se ven incluidos varios procesos para obtener dos células hijas idénticas, cuando los cromosomas de encuentran ubicados en la línea ecuatorial del huso mitótico se dividen en partes iguales a los dos polos, cuando ambos cromosomas hermanos de un par replicado se van a un mismo polo habrá un desequilibrio ya que una célula hija tendrá un cromosoma

más, es en este momento puede producirse un fallo a nivel genético produciendo alguna patología. (Tomotoshi., et al. 2005; NCBI. 2008).

#### **3.7.8.1.1 Función.**

Si la Aurora Quinasa se llega a inhibir, los cromosomas se vuelven propensos a la unión inadecuada entre ellos cuando se encuentran en la división celular, debido a que está implicada directamente en la formación de microtúbulos, además es la encargada de controlar el proceso de segregación de los cromosomas a los polos. (NCBI. 2008).

#### **3.7.8.1.2 Localización.**

La Aurora Kinasa A se encuentra localizada en el cromosoma veinte en el brazo largo en la posición 13. (20q13).

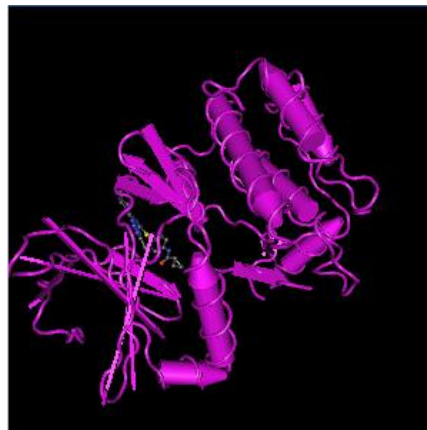


Figura 3. Gráfico molecular de la Aurora Kinasa A. Fuente: NCBI - Gene.

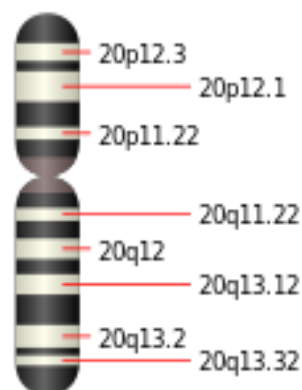


Figura 4. Gráfico del Cromosoma 20. Fuente: Genetics home reference.

### **3.7.8.1.3 Polimorfismo a identificar**

- Phe31Ile (rs2273535)

En la secuencia de ADN se va a encontrar un cambio de una Timina por una Adenina (T/A).

### **3.7.8.1.4 Secuencia de primers (pag 54)**

Primers Aurora Kinasa A

**Forward:** ctttcatgaatgccagaaagtt

**Reverse:** 59.2 C ctgggaagaattgaaggaca

### **3.7.8.2 Gen de la Aurora Quinasa B**

Este gen codifica a una subfamilia de las quinasas. Estas quinasas son las encargadas de regular la segregación de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis con la ayuda de los microtúbulos. Esta proteína se localiza durante el proceso de división en el huso mitótico en la parte central, esta quinasa va a actuar como sensor que va a inhibir la citocinesis controlando el ciclo celular (NCBI. 2013; Pieck. 2009).

#### **3.7.8.2.1 Función**

Regula la segregación de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis.  
Actúa como sensor inhibiendo la citocinesis controlando el ciclo celular.

#### **3.7.8.2.2 Localización**

La Aurora Quinasa B se encuentra localizada en el cromosoma diecisiete en el brazo corto en la posición 13.1. (17p13.1).

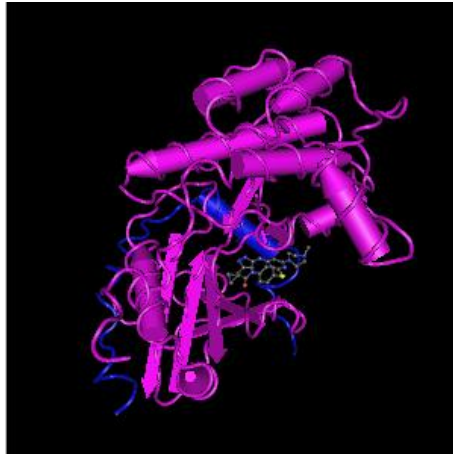


Figura 5. Gráfico molecular de la Aurora Quinasa B. Fuente: NCBI - Gene.

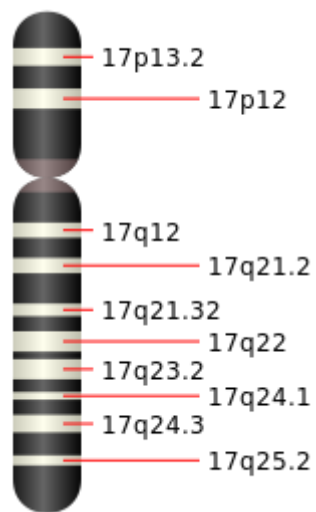


Figura 6. Gráfico del Cromosoma 17. Fuente: Genetics home reference.

### 3.7.8.2.3 Polimorfismos a identificar

- Thr298Met
- Ser295Ser

En la secuencia de ADN se va a encontrar un cambio de una Guanina por una Adenina (G/A) en el primer polimorfismo

En el segundo polimorfismo se va a identificar un cambio de una Adenina por una Guanina (A/G)

#### 3.7.8.2.4 Secuencia de primers

Primers AURORA KINASA B

**Forward:** 59.8 C agcccttccatctcttcaca

**Reverse:** 60.3 C gaatgacagggaccatcagg

#### Fundamento de la PCR

**Equipo:** Termociclador Labnet/ Multigene Optimax

Termociclador Agilent Technologies Sure Cyclor 8800

Secuenciador 3130 Genetic Analyzer

**Método:** Reacción en Cadena de la Polimerasa. Amplifica un fragmento del ADN que se va a realizar el análisis.

**Espécimen:** ADN de muestras de pacientes con MM

**Pasos:** PCR

PCR Secuencia

Secuenciación

Análisis

**Control:** Médula ósea y Sangre total (EDTA), de una persona sin ningún tipo de patología

#### 3.7.8.3 Fundamento:

La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), sintetiza varias veces un fragmento de ADN con la ayuda de una polimerasa capaz de reaccionar a altas temperaturas (79°C – 85°C), su nombre comercial es Taq Polimerasa debido a que proviene de una bacteria llamada *Thermusaquaticus*.

Es una reacción in vitro que simula el proceso interno de síntesis de ADN dentro de una célula.

El ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ser ADN monocatenario, se realiza un proceso de duplicación y se vuelve a enrollar. Esta técnica consiste en repetir varias veces tres ciclos: (1,2,3)

- **Desnaturalización:** Es necesario someter a la doble hélice de ADN a temperaturas entre 90 a 95°C para provocar la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios provocando su separación y de esta manera pueda empezar la reacción, esta temperatura debe mantenerse durante algunos minutos para asegurarse de que la doble cadena de ADN se haya separado completamente.

- **Hibridación o Anillamiento:** Luego que se produjo la desnaturalización y se obtuvo cadenas de ADN sencillas se procede a la fase de hibridación que consiste en bajar la temperatura de 40 a 60°C, para que pueda existir la unión de los cebadores o primers a la cadena sencilla de ADN, existen dos tipos de primers: Forward y reverse que se unen a la cadena de ADN a cada extremo y con la ayuda de la taq polimerasa se produce la replicación o extensión en sentido 5' a 3', los primers deben ser uno idéntico a la cadena de ADN y el otro debe llevar la cadena complementaria, para que uno sea complementario a la cadena que forma el otro.

- **Extensión o Elongación:** para que se pueda producir la extensión o elongación es importante que la temperatura suba hasta lo máximo que puede actuar la taq polimerasa que es 72°C, esta polimerasa es la encargada de añadir los dNTPs que se encontraban en la mix para que exista la unión de 5' al grupo fosfato y 3' al grupo hidroxilo de esta manera se va produciendo la extensión en un medio adecuado en presencia de iones de  $Mg^{2+}$ , 20 segundos serán necesarios para amplificar fragmentos hasta de 500pb, mientras que para amplificar fragmentos de mayor tamaño se necesitará de 40 segundos.

- **Elongación final:** la temperatura debe estar entre 70-74°C durante aproximadamente 10 minutos de esta manera se asegura que no existan remanentes de cadenas simples de ADN, y que todas se hayan ampliado. La forma de conservación de la muestra en el termociclador es la última fase que es en un periodo de tiempo indefinido con una temperatura de 4 -15°C. Para verificar que el fragmento amplificado sea el correcto se realiza una electroforesis en un gel de agarosa y con la ayuda de un Lader de 50 o 100pb de acuerdo al fragmento analizado se identifica si se obtuvo el fragmento adecuado y si existen impurezas (dimeros).

### 3.7.8.3.1 PCR convencional

Preparación de Master – Mix:

Para esta investigación se realizó un master mix para el número total de muestras obtenidas. Previa a una estandarización se obtuvieron los siguientes volúmenes por cada muestra analizada:

**Tabla 5. Reacción en cadena de la polimerasa – Aurora Quinasa A.**

AURORA KINASA A	
PCR	X1
Agua Mili Q	16.9ul
Buffer	2.5ul
MgCl <sub>2</sub>	1ul
DNTPs	0.5ul
Primer Forward	1ul
Primer Reverse	1ul
TaqPlatinum	0.2ul
DNA	3ul

**Tabla 6. Reacción en cadena de la polimerasa - Aurora Quinasa B.**

AURORA KINASA B	
PCR	X1
Agua Mili Q	16.9ul
Buffer	2.5ul
MgCl <sub>2</sub>	1ul
DNTPs	0.5ul
Primer Forward	1ul
Primer Reverse	1ul
TaqPlatinum	0.2ul
DNA	3ul

**Termociclador : Agilent Technologies**

**Tabla 7. Aurora Quinasa A - Ciclos en Termociclador.**

AURORA KINASA A		
Hot Start	94°C	05:00
Denaturación	95°C	00:30

Anillamiento	62°C	00:30
Extensión	72°C	00:45
Extensión	72°C	10:00
	4°C	∞

**Tabla 8. Aurora Quinasa B – Ciclos en Termociclador.**

AURORA KINASA B		
Hot Start	94°C	10:00
Desnaturación	95°C	00:30
Anillamiento	63°C	00:30
Extensión	72°C	00:45
Extensión	72°C	06:00
	4°C	∞

### 3.7.8.3.2 PCR de secuencia

#### Método de Purificación AMPure

- Codificar los tubos
- Dejar reactivo de AMPure a temperatura ambiente, homogenizar bien
- Colocar 10ul de AMPure por cada 10ul de PCR (20ul de AMPure)
- Vortexear durante 5 segundos e incubar la muestra durante 5 minutos
- Colocar los tubos en la placa magnética y dejarlos en reposo durante 10 minutos hasta que se forme un halo de color café y el líquido quede totalmente claro
- Aspirar el líquido con la pipeta sin tocar el halo que se ha formado en la pared del tubo
- Adicionar 200ul de ETOH al 70% e incubar durante 30 segundos
- Eliminar el ETOH por inversión de la placa magnética sobre papel absorbente, dar unos pequeños golpes hasta que se haya eliminado el ETOH completamente
- Repetir los dos últimos pasos
- Eliminar el remanente de ETOH de cada uno de los tubos con la ayuda de una pipeta
- Dejar el producto al aire libre sobre la placa magnética, esperar de 15 a 20 minutos hasta que esté totalmente seco
- Retirar de la placa magnética
- Re suspender en 40ul de TE al 1x, vortexear durante 5 segundos y colocar nuevamente en la placa magnética el menor tiempo posible
- Tomar el líquido y pasarlos a nuevos tubos que deben estar numerados correctamente

### **Método de purificación de CleanSeq**

- Codificar los tubos
- Dejar reactivo de CleanSeq a temperatura ambiente, homogenizar bien
- Colocar 3ul de CleanSeq y 26.4ul de ETOH al 85% por cada 10ul de PCR de Secuencia
- Vortexear durante 5 segundos, colocar los tubos en la placa magnética e incubar la muestra a temperatura ambiente durante 3 minutos hasta que se forme un halo de color café y el líquido quede totalmente claro
- Aspirar el líquido con la pipeta multicanal sin tocar el halo que se ha formado en la pared del tubo
- Adicionar 100ul de ETOH al 85% e incubar durante 30 segundos
- Eliminar el ETOH por inversión de la placa magnética sobre papel absorbente, dar unos pequeños golpes hasta que se haya eliminado el ETOH completamente
- Repetir los dos últimos pasos
- Eliminar el remanente de ETOH de cada uno de los tubos con la ayuda de una pipeta
- Dejar el producto al aire libre sobre la placa magnética, esperar de 15 minutos hasta que esté totalmente seco
- Retirar de la placa magnética
- Re suspender en 40ul de EDTA 0.1mM, vortexear durante 5 segundos y colocar nuevamente en la placa magnética el menor tiempo posible
- Tomar 20ul del producto, tener cuidado de no tomar las partículas y pasarlo a la placa del secuenciador
- Cargar al equipo directamente
- Preparación de Primers para realización de PCR

### **Concentración del Primer: 10nM**

$$V1.C1=V2.C2$$

$$V1= 50ul. 10nM = 5ul (Primer Madre) + 45ul Agua Mili Q$$
$$100nM$$

Preparación de Primers para realización de PCR de Secuencia

### Concentración del primer 1nM

$$V1.C1=V2.C2$$

V1= 50ul. 1nM = 0.5ul (Primer Madre) + 49.5ul Agua Mili Q 100nM.

**Tabla 9. PCR de secuencia - Aurora Quinasa A.**

PCR DE SECUENCIA – AURORA KINASA A	
PCR MIX	X1
Agua Mili Q	2.8ul
Buffer 5x	2ul
BDT 3.1	1ul
Primer 1x Forward	3.2ul
PCR	3ul

**Tabla 10. PCR de Secuencia - Aurora Quinasa B.**

PCR DE SECUENCIA – AURORA KINASA B	
PCR MIX	X1
Agua Mili Q	2.8ul
Buffer 5x	2ul
BDT 3.1	1ul
Primer 1x Forward	3.2ul
PCR	3ul

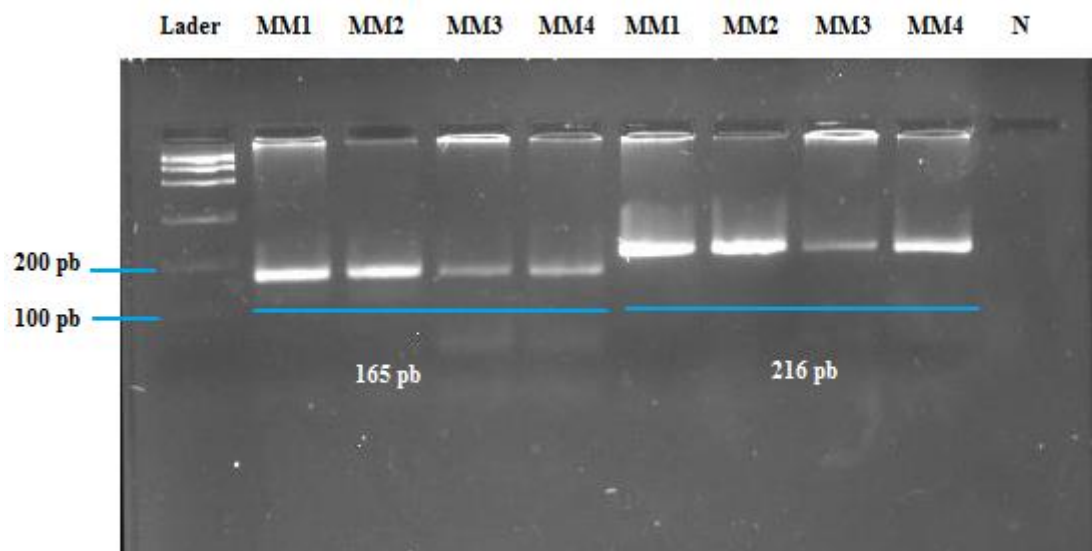


Figura 7. Electroforesis de los fragmentos de ADN aproximadamente 165 pb Aurora A y 216pb Aurora B en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

### Descripción de la Figura:

- a. Lader : 100 pares de bases
- b. Carriles 2-5 : Amplificación del fragmento de casos de Mieloma múltiple.  
Polimorfismo Aurora Quinasa A.
- c. Carriles 6-9 : Amplificación del fragmento de casos de Mieloma Múltiple.  
Polimorfismo Aurora Quinasa B.
- d. Carril 10 : Control Negativo

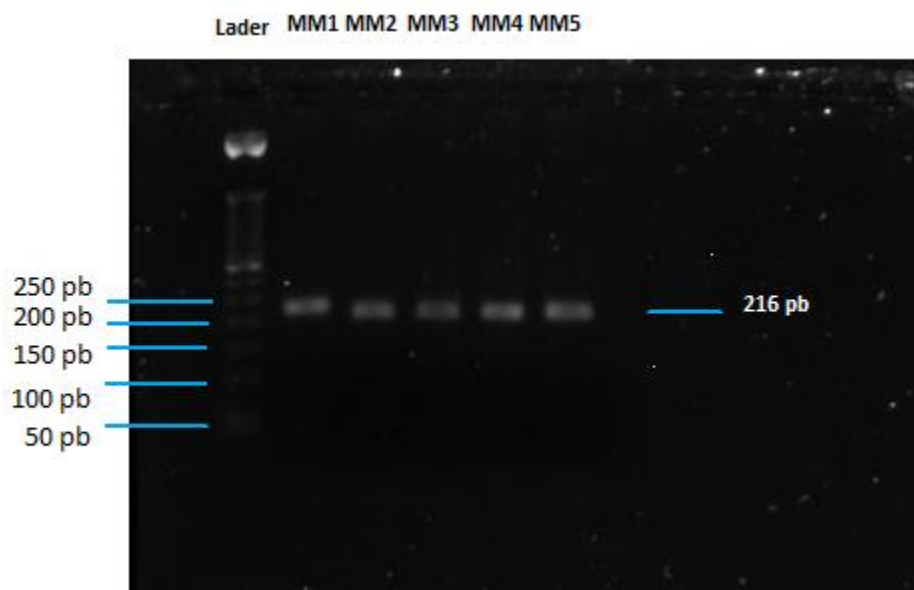


Figura 8. Electroforesis del fragmento de ADN aproximadamente 216pb, gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio. Gen Aurora Quinasa B

- **Descripción de la Figura:**

- e. Lader : 50 pares de bases
- f. Carriles 2-6 : Amplificación del fragmento de casos de Mieloma múltiple
- g. Carril 7 : Control Negativo

## **3.8 OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES (ANEXO 1.)**

### **3.8.1 MÉTODO ESTADÍSTICO**

#### **3.8.1.1 Métodos de recolección de Información**

Se realizó un análisis de todos los datos desde el año de 1986 – 2012 considerando la media, mediana y desviación estándar (F de Fisher).

Se probó si los datos se ajustaron a la distribución normal, mediante la prueba de hipótesis de Kolgomorov y gráficamente con un QQplot. Si los datos siguen a la normalidad se procederá con una prueba de T para buscar diferencias significativas entre las medias de los casos, de lo contrario se aplicará tests no paramétricos como el de Wilcoxon.

#### **3.8.1.2 Recolección de muestras.**

Se analizaron 116 pacientes que fueron diagnosticados en el Hospital Carlos Andrade Marín de mieloma múltiple en el periodo comprendido entre 1986 y 2012, y 20 pacientes del Hospital SOLCA Quito de los cuales se obtuvieron muestras de aspirado de médula ósea y sangre periférica de los pacientes que se encontraban internados o les realizaron exámenes de laboratorio el día de recolección de las muestras.

## **3.9 ASPECTOS ÉTICOS.**

Para poder acceder a las historias clínicas de los pacientes diagnosticados con mieloma múltiple en el Hospital Carlos Andrade Marín, se envió una carta al director del laboratorio clínico obteniendo una respuesta favorable, se envió una carta dirigida a la directora del laboratorio de genética en el Hospital de SOLCA para obtener las muestras de médula ósea de los pacientes que se les realizó el estudio de citogenética.

### **3.10 MARCO CONCEPTUAL.**

#### **3.10.1 Mieloma Múltiple:**

El MM es una patología en donde se encuentra gran cantidad de células plasmáticas maduras e inmaduras infiltrando en la médula ósea, cuando las células plasmáticas se encuentran en un estado normal producen anticuerpos que son de gran importancia en la defensa del organismo. En el mieloma múltiple las células plasmáticas anormales (llamadas así porque presentan un daño en el ADN lo que provoca que las células se conviertan en cancerígenas), producen solo un tipo de inmunoglobulinas llamadas paraproteínas, su función es impedir la formación de anticuerpos normales, por esta razón los pacientes que padecen de esta patología tienen infecciones repetitivas.

Generalmente el mieloma múltiple se encuentra en pacientes mayores de 50 años, en casos no muy frecuentes se han podido identificar en adultos jóvenes (Kyle y Rajkumar, 2004).

**3.10.1.1 Monoclonal:** El mieloma múltiple se desarrolla desde una única célula plasmática maligna. Aparece como un pico en el test de electroforesis de proteínas por un clon o duplicado de una única célula (Low, 2011).

**3.10.1.2 GMSI:** Gammapatía monoclonal de significado incierto, es una enfermedad benigna, a pesar de presentar concentraciones altas de paraproteínas, no presenta enfermedad clínica evidente ( menos del 10% de células plasmáticas en médula ósea y ninguna fractura ósea), existe riesgo mínimo que representa al 1% de los casos que pudiera existir una transcripción de GMSI a mieloma múltiple (Low, 2011).

**3.10.1.3 Plasmocitoma:** Tumor conformado por células plasmáticas, similares al mieloma en su histología, si el tumor se encuentra afectando a tejidos blancos se lo denomina plasmocitomaextramedular, y si está afectando al hueso se denomina plasmocitoma óseo. (Noval, 2003).

**3.10.1.4 Glóbulos Rojos:** Los glóbulos rojos también llamados eritrocitos o hematíes son las células sanguíneas más numerosas de la sangre, estas células son las encargadas

de transportar el oxígeno desde los pulmones a los distintos órganos de nuestro cuerpo, con la ayuda de la hemoglobina. Cuando una persona tiene niveles bajos de glóbulos rojos se denomina anemia y si los niveles de glóbulos rojos son elevados se denomina poliglobulia. Valores de Referencia: Hombre: de 4,7 a 6,1 millones de células por microlitro (células/mcL), Mujer: de 4,2 a 5,4 millones de células/mcL(Low, 2011).

**3.10.1.5 Hemoglobina:** Es una proteína presente dentro de los glóbulos rojos, gracias a la cual se puede medir la capacidad transportadora de oxígeno de la sangre. Para medir los niveles de hemoglobina presente es necesario lisar los glóbulos rojos para liberar su contenido. Los valores de hemoglobina varían dependiendo de la edad y el sexo. Valores de Referencia: 14,0 – 18,0 g/dL (Brandan, et al., 2008).

**3.10.1.6 Leucocitos o Glóbulos Blancos:** Los leucocitos también llamados glóbulos blancos, son células que se producen en médula ósea, constituyen el sistema inmune e incluyen a tres familias de células, de acuerdo a su morfología se dividen en: Monocitos, Linfocitos y granulocitos. Los glóbulos blancos son las células encargadas de efectuar una respuesta inmunitaria contra sustancias extrañas (antígenos) que ingresan al organismo. Valores de Referencia: 4,50 – 10.000 K/microL(Diccionario Médico, 2014).

**3.10.1.7 Plaquetas:** Son fragmentos que se obtienen de la liberación del citoplasma de los megacariocitos, carecen de núcleo, también se las conoce con el nombre de trombocitos, su función es la formación del coagulo impidiendo la pérdida de sangre. Valores de referencia: 130.000- 400.000 K/microL (FIBAO, 2008a).

**3.10.1.8 Trombocitopenia:** Es un número bajo de plaquetas en sangre periférica, se realiza mediante una prueba llamada Biometría Hemática. Si los niveles de plaquetas se encuentran en valores inferiores a 50.000 puede haber problemas de hemorragias, y si los valores se encuentran por debajo de 10.000 puede ser debido a una hemorragia severa (Low, 2011).

**3.10.1.9 Neutrófilos:** Constituyen un tipo de glóbulo blanco es el encargado de iniciar procesos inflamatorios, destruir y fagocitar las bacterias. Este tipo de células tiene un

núcleo multilobulado con 2 a 5 lóbulos, presenta gránulos que son los que le permiten realizar todas sus funciones de protección. Valores de Referencia: 40 – 60% (FIBAO, 2008b).

**3.10.1.10 Linfocitos:** Son un tipo de glóbulos blancos, son de dos tipos linfocitos B y los linfocitos T que son elaborados en la médula ósea a partir de la célula madre linfoide. La función de los linfocitos B es la de elaborar anticuerpos para la defensa del organismo y los linfocitos T son los encargados de destruir las células tumorales, poseen memoria inmunológica. Valores de Referencia: 20 – 40% (Cáncer, 2013).

**3.10.1.11 Leucopenia:** Valores disminuidos de glóbulos blancos (Low, 2011).

**3.10.1.12 Médula Ósea:** Es un tejido blando y esponjoso, es el encargado de la producción de las células sanguíneas y se encuentra en el interior de los huesos (Low, 2011).

**3.10.1.13 Biopsia de Médula Ósea:** La extracción mediante una aguja de una muestra de parte líquida y esponjosa de los huesos en donde se producen todos los tipos de células sanguíneas, la biopsia de médula ósea es una prueba de gran utilidad diagnóstica para pacientes con mieloma múltiple ya que va a identificar la presencia de células plasmáticas en cantidades elevadas (Low, 2011).

**3.10.1.14 Lesión Lítica:** Las lesiones líticas son zonas dañadas de hueso que se las pueden identificar mediante un examen de rayos x. Las lesiones líticas parecen agujeros en el hueso y significa que el hueso se está debilitando (Low, 2011).

**3.10.1.15 Urea:** Es el producto final del metabolismo de las proteínas se produce en el hígado de los seres humanos a partir del amoníaco por distintas reacciones que inician en mitocondrias y continúan en el citoplasma. La Urea es una prueba que va a ayudar a determinar cómo se encuentra la función renal. La proteína del mieloma múltiple puede dañar los riñones, cuando estos empiezan a fallar pierden su capacidad de eliminar el exceso de sales, líquidos y productos de desecho corporal. Valores de Referencia: 10 – 50mg/dL(Definición, 2011).

**3.10.1.16 Creatinina:** Producto que se degrada de creatina que es un compuesto importante en el músculo por esta razón la excreción de creatinina depende de la masa corporal de cada individuo. La creatinina se excreta por los riñones hacia la orina. Los valores de creatinina se pueden ver afectados en pacientes con Mieloma múltiple, la principal causa de daño renal es el exceso de producción monoclonal de cadenas ligeras que provocan obstrucción a nivel tubular. Valores de Referencia: 0,5 – 1,4mg/dL (Marcano, 2012).

**3.10.1.17 Cadenas ligeras libres:** Esta prueba es de gran utilidad en los casos poco comunes de mieloma múltiple en donde no se encuentra proteína M. Una porción de proteína monoclonal que se puede medir a pesar de que tiene un bajo peso molecular (Low, 2011).

**3.10.1.18 Cadena Ligera:** Existen dos tipos de cadenas ligeras: kappa y lambda. La amiloidosis se puede clasificar en amiloidosis de cadenas kappa o amiloidosis de cadenas Lambda (Low, 2011).

**3.10.1.19 Amiloidosis:** Es una patología en la cual las cadenas ligeras mielomatosas kappa o lambda (Proteína de Bence Jones) se depositan en los tejidos y en los órganos en todo el cuerpo. En algunos pacientes las cadenas ligeras se adhieren a algunos órganos como el corazón y riñones causando daño (Low, 2011).

**3.10.1.20 Calcio:** Mineral de gran importancia en el organismo se encuentra normalmente en el hueso, sus funciones son: construcción y mantenimiento de los huesos, regulación del ritmo de corazón, transmite impulsos nerviosos, interviene en la coagulación sanguínea. En pacientes con mieloma múltiple se desarrolla una enfermedad activa ósea, la cual ocasiona la liberación de calcio desde los huesos hacia el torrente sanguíneo, lo cual puede provocar hipercalcemia (niveles elevados de calcio en la sangre). Valores de Referencia: 8,1 – 11,8mg/dL (Low, 2011).

**3.10.1.21 Hipercalcemia:** Niveles elevados de calcio en sangre periférica, esto se da debido al desgaste de hueso. Puede causar varios síntomas entre ellos se incluyen:

debilidad general, cansancio, náuseas, vómito, pérdida de apetito, somnolencia, deshidratación (Low, 2011).

**3.10.1.22 Albumina:** Proteína producida en el hígado que forma la mayor parte de proteína en la sangre, se encuentra en el plasma y cumple importantes funciones, a nivel osmótico, transporte de sustancias. En el mieloma múltiple, las hormonas producidas por la misma enfermedad como la Interleuquina 6 suprime la producción de albúmina. Valores de Referencia: 3,5 – 5,5g/dL(Low, 2011).

**3.10.1.23 LDH:** Enzima que constituye parte del corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos en el cerebro y en los pulmones, su función es la de catalizar la oxidación de L- lactato a piruvato. El aumento de este tipo de enzima se asocia a un fenotipo de mieloma múltiple agresivo y una supervivencia corta. Valores de Referencia: 100 a 200 UI/L(Low, 2011).

**3.10.1.24 Beta 2 microglobulina:** Proteína constituyente de la membrana de las células, se libera cuando la célula muere, cuando existen valores elevados de esta proteína es un signo de una muerte anormal que puede ser causada por distintas patologías. En el mieloma múltiple la beta 2 microglobulina representa un indicador de gran importancia para indicar pronóstico y actividad de esta patología. Valores de Referencia: 1010 – 1.730ng/ml (Low, 2011).

**3.10.1.25 Proteinuria de Bence Jones:** Es detectada en orina y en sangre en pacientes que tienen MM. Es una proteína constituida por cadenas ligeras o fragmentos de una molécula de globulina gamma (Low, 2011).

**3.10.1.26 FISH:** La técnica de hibridación *In Situ* Fluorescente consiste en usar una sonda de ADN marcada con un fluorocromo que va a hibridar a una región específica de interés del ADN. Gracias a esta técnica se va a poder identificar deleciones o duplicaciones al interior de un cromosoma. Con el FISH se va a poder identificar patologías que presenten un daño cromosómico que no sea visible en la citogenética convencional. (Leone, 2005).

**3.10.1.27 Gen:** Es un fragmento pequeño de una molécula de ADN, es el encargado de transportar órdenes que una célula usa para cumplir una función específica (Low, 2011).

**3.10.1.28 Electroforesis de Proteínas:** La electroforesis de proteínas es una metodología que permite separar las proteínas presentes en suero, orina u otros líquidos biológicos.

En esta técnica es necesaria la utilización de corriente eléctrica para desplazar las proteínas en una capa fina de agar. La distancia recorrida de cada proteína depende de su tamaño, su carga eléctrica y su forma. En el Mieloma múltiple esta prueba es de gran importancia ya que permite identificar la cantidad de proteína M como la identificación de características específicas de los picos M de cada paciente (Low, 2011).

**3.10.1.29 Proteína M (Picos M):** La proteína M es una proteína monoclonal. Un pico de proteína M significa la sobreproducción de un único clon de células plasmáticas (Low, 2011).

**3.10.1.30 PCR:** La proteína C reactiva se eleva cuando existe una inflamación a nivel de todo el cuerpo existe necrosis tisular, esta proteína es producida en el hígado, pertenece al grupo de reactantes de fase aguda. Valores de Referencia: 0,00 – 1,10mg/dL(Low, 2011).

**3.10.1.31 Cadenas Ligeras en suero:** Las cadenas ligeras junto a las cadenas pesadas dan lugar a anticuerpos, una pequeña parte de las cadenas kappa y lambda constituyentes de las cadenas ligeras pueden circular libremente en el plasma, cuando las cantidades de cadenas ligeras libres sobrepasan los límites de referencia se trata de una proliferación de un clon de célula plasmática (Encinas, 2008).

**3.10.1.32 Citología:** Es la ciencia que estudia a la célula en diferentes aspectos: su estructura, funciones y su evolución(García, 2011).

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS**

El total de pacientes incluidos en el estudio con un diagnóstico de mieloma múltiple fue de 116, de los cuales 77 fueron hombres (66,3%) y 39 (33,62%) mujeres con una edad media de 59,26 años, una mediana de 60 años y una desviación estándar de 9,61. El rango de edad de los pacientes fue de 36 a 88 años, de los cuales 33 que representan al 28.4% son mayores de 65 años y 83 (71.5%) fueron pacientes menores de 65 años.

Las biopsias de médula ósea de cada paciente al momento del diagnóstico presentaron menor al 10% de células plasmáticas en 15 pacientes (12,9%), mayor al 10% de células plasmáticas en 62 pacientes (53,4%) y pacientes que no se obtuvieron datos 39 (33,6%), el total de pacientes presento una media de 40,19% de porcentaje de células plasmáticas en médula ósea con una mediana de 40% y una desviación estándar de 26,05

De acuerdo al estadio Durie y Salmon la clasificación fue la siguiente: 39 pacientes se encuentran en estadio IIIA que representan al 33.6%, en estadio IIIB se encuentran 33 pacientes que representa al 28.4%, en estadio IIA se encuentran 19 pacientes que representa al 16.3%, en estadio IA se encuentran 16 pacientes que representa el 13.7%, en estadio IIB se encuentran 4 pacientes que representa al 3.4% y 5 pacientes de los cuales no se obtuvieron datos de estadiaje que representa al 4.3%.

Como muestra la tabla 12 y Gráfico 1, se pudo identificar que los pacientes que fueron diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad presentaron menor tiempo de vida que los pacientes que fueron diagnosticados en etapas tempranas de la enfermedad.

De acuerdo a las inmunoglobulinas la variedad más frecuente encontrada en la población fue IgG 60 pacientes que representan el 51.72%, cadenas ligeras 20 pacientes (17.24%), IgA 17 pacientes (14.65%), no secretor en 1 paciente (0.86%), y 18 pacientes en los que no se encontraron datos de inmunoglobulinas que representan el 15.5%.

Al momento del diagnóstico 32 pacientes presentaron daño renal (27.5%), los pacientes que no presentaron daño renal fueron 77 pacientes que constituyen el 66.37%, y 7 pacientes que no se han registrado datos de función renal representó el 6.03%.

**Tabla 11. Características demográficas y clínicas de 116 pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple en el HCAM en el periodo comprendido entre 1986 - 2012.**

	N	%
Total de pacientes	116	100
Hombre/mujer	77/39	66,3/33,62
Edad media (rango)	59,26 (39-88)	
Anemia (Hb menor a 10 mg/dL)	26/111	23,4
Hipercalcemia (Ca mayor a 10,5 mg/dL)	18/102	17,6
Insuficiencia Renal (Crea mayor a 2mg/dL)	32/109	29,3
Tipo de Inmunoglobulina		
IgG	60	51,7
IgA	17	14,7
Cadenas ligeras	20	17,2
No secretor	1	0,86
Sin Información	18	15,5
Estadía según D&S (%)		
Ia	16	13,7
IIa	19	16,3
IIb	4	3,4
IIIa	39	33,6
IIIb	33	28,4
Sin Información	5	4,3

**Tabla 12. Supervivencia de los pacientes con mieloma múltiple asociado al estadiaje.**

Resumen de casos procesados

Estadio	Total N	N de eventos	Censurado	
			N	Porcentaje
IA	5	3	2	40,0%
IIA	10	8	2	20,0%
IIB	2	2	0	0,0%
IIIA	25	13	12	48,0%
IIIB	28	21	7	25,0%
Overall	70	47	23	32,9%

Overall Comparisons

	Chi-Square	Df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	10,502	4	,033

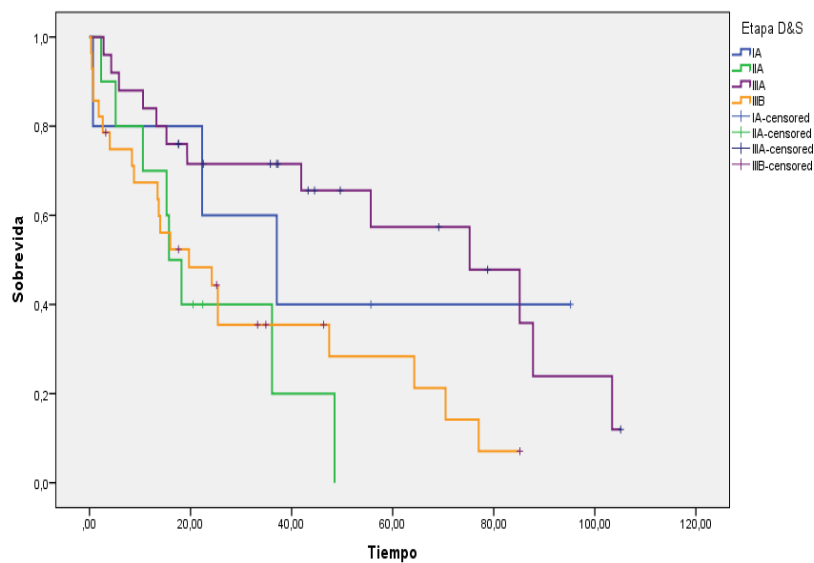


Gráfico 1. Estadío de pacientes con mieloma múltiple asociado a sobrevida.

Daño óseo se presentó con mayor frecuencia en columna vertebral y dorso lumbar en 63 pacientes que representa al 54,3%, seguido de daño a nivel de columna y otros huesos en 18 pacientes que representa el 15%, en 15 pacientes que representa el 13% se identificó daño óseo en otros sitios no especificados, en 9 pacientes que representa el 7,8% no se identificó lesiones, en 6 pacientes se identificó daño a nivel de cráneo representando al 5,2%, 1 paciente presentó daño a nivel de huesos largos representando al 0,9%, y de 4 pacientes que representa el 3,4% no se obtuvieron datos. (Tabla 13).

**Tabla 13. Distribución de 116 pacientes que presentaron Mieloma múltiple y el daño óseo que presentaron al momento del diagnóstico.**

	N	%
Daño Óseo	116	100
Cráneo	6	5,2
Columna	63	54,3
Columna y Otros huesos	18	15
Huesos Largos	1	0,9
Otros	15	13
No lesiones	9	7,8
No datos	4	3,4

**Tabla 14. Características clínicas de pacientes con Mieloma múltiple. Media, mediana, desviación estándar y P de Fisher.**

<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>Mediana</b>	<b>W</b>	<b>P (2 colas)</b>
Hemoglobina	111	11,79	3,03	11,80	7236,00	<0,0001
Glóbulos Blancos	111	6,31	2,92	5,67	10287,50	<0,0001
Neutrófilos	109	56,81	14,83	55,60	14552,00	<0,0001
Linfocitos	108	32,29	13,24	32,00	12967,50	0,0915
Urea	106	54,26	47,79	41,00	14528,50	<0,0001
Creatinina	109	1,91	3,21	1,00	13791,00	0,0025
Cadenas kappa	19	2857,58	3453,95	1600,00	1639,50	0,0279
Cadenas Lambda	13	843,46	566,32	561,50	1068,50	0,0803
IgG	98	3051,07	4697,94	1460,00	11640,50	0,0143
IgA	95	599,00	1311,38	96,00	8245,00	<0,0001
IgM	92	48,28	47,39	26,50	5144,50	<0,0001
IgE	57	83,30	176,53	26,00	3526,50	<0,0001
Proteínas Totales	103	8,53	2,38	8,10	12348,50	0,0295
LDH	99	365,77	136,82	331,00	14702,50	<0,0001
B2M	98	5151,64	4802,62	3177,05	15643,00	<0,0001
Calcio	102	9,47	1,51	9,20	9049,50	<0,0001

El tratamiento en pacientes menores de 65 años fue el siguiente: 42 pacientes con quimioterapia VAD (59,2%), melfalan y talidomida en 2 pacientes (2,81%), talidomida y dexametasona en 15 pacientes (21,1%), dexametasona + vincristina + talidomida en 2 pacientes (2,81%), bortezomib y dexametasona en 2 pacientes (2,81%), talidomida en 2 pacientes (2,81%), melfalan en 3 pacientes (4,22%), bortezomib en 1 paciente (1,4%), bortezomib + dexametasona + talidomida en 2 pacientes (2,81).

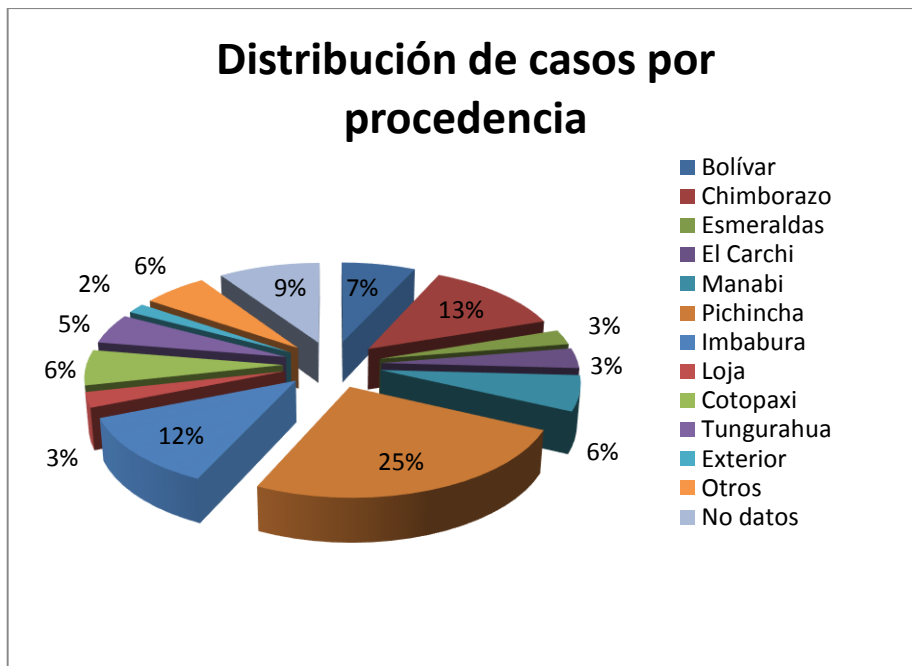
Tratamiento en pacientes mayores de 65 años: 16 pacientes recibieron quimioterapia VAD (61,5%), Radioterapia en 4 pacientes (15,3%), talidomida en 3 pacientes (11,5%), melfalan y talidomida en 1 paciente (3,8%), dexametasona 1 paciente (3,8%), bortezomib + dexametasona 1 paciente (3,8%).

19 pacientes que no recibieron tratamiento o lo hicieron en otras casas de salud y no se pudieron obtener datos de importancia.

La media de supervivencia global fue de 1 año 9 meses.

**Tabla 15. Distribución de casos por procedencia.**

Provincias	N	%
Bolívar	8	6,9
Chimborazo	15	12,9
Esmeraldas	3	2,6
El Carchi	4	3,4
Manabi	7	6,0
Pichincha	29	25,0
Imbabura	14	12,1
Loja	3	2,6
Cotopaxi	7	6,0
Tungurahua	6	5,2
Exterior	2	1,7
Otros	7	6,0
No datos	11	9,5



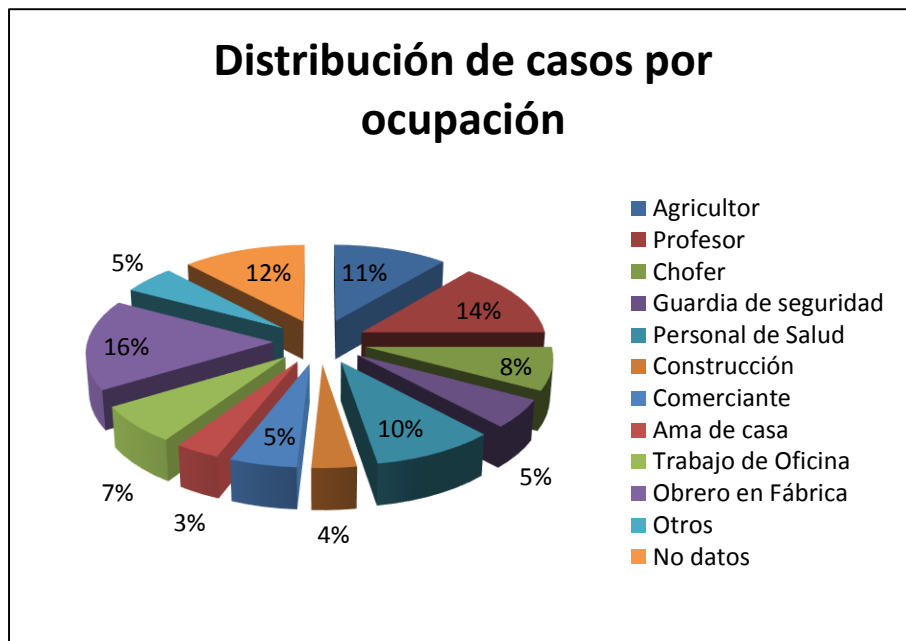
**Gráfico 2. Distribución de casos por procedencia en porcentajes.**

Según la distribución de casos por ocupación se pudo identificar que el 18,6% (19 pacientes) pertenecían a personal que trabaja como obreros en fábricas, seguidos de 16 profesores que representa el 15,6%, 13 agricultores que representa el 12,7%, personal de salud 11 pacientes que representa el 10,8%, chofer 9 pacientes que representa el 8,8%,

guardia de seguridad, comerciante y otros con 6 pacientes respectivamente que representa el 5,9%, y por último 4 ama de casa que representa el 3,9%.

**Tabla 16. Distribución de casos por ocupación**

Ocupación	n	%
Agricultor	13	11,2
Profesor	16	13,8
Chofer	9	7,8
Guardia de seguridad	6	5,2
Personal de Salud	11	9,5
Construcción	4	3,4
Comerciante	6	5,2
Ama de casa	4	3,4
Trabajo de Oficina	8	6,9
Obrero en Fábrica	19	16,4
Otros	6	5,2
No datos	14	12,1



**Gráfico 3. Distribución de casos por ocupación en porcentajes**

Los datos obtenidos de la citogenética de pacientes diagnosticados con MM en Hospital SOLCA Quito y HCAM se clasificaron por medio de rango de edad y sexo; para pacientes de sexo masculino se dividieron en dos grupos uno entre las edades de 49 - 59 años y 62 - 80 años y pacientes de sexo femenino su distribución fue entre pacientes de 43

– 60 años y 64 – 85 años. En el grupo de pacientes entre 49 a 59 años de sexo masculino se pudo identificar alteraciones hiperdiploides en 23% de los casos, alteraciones estructurales en 6%, mientras que en 29% de casos no se encontraron alteraciones citogenéticas, mientras que en 18% de los casos no se encontraron metafases y en 24% de los casos no se encontraron datos; con respecto a los pacientes de sexo masculino con edades entre 62 a 80 años se pudo identificar 16% de alteraciones hiperdiploides, el 10% de alteraciones estructurales y el 42% de pacientes sin daño cromosómico, mientras que en 16% de los casos no se encontraron metafases y en 16% no se encontró resultados.

En las pacientes de sexo femenino de 43 a 60 años se identificó mayor número de casos con alteraciones estructurales representando el 30% del total de casos, alteraciones hiperdiploides en 20% de los casos y 20% de las pacientes presentaron un cariotipo normal, mientras que el 10% presentaron Cr1 alterado, en 10% de los pacientes no se encontraron metafases y 10% de pacientes falta resultado, con respecto a las pacientes de sexo femenino con edades entre 61 a 85 años se pudo identificar que el mayor número de casos no se identificaron alteraciones genéticas que representaba un 34% del total de casos analizados, el 22% de los casos representa a alteraciones hiperdiploides y alteraciones estructurales respectivamente, mientras que el 22% de los casos restantes no se han obtenido metafases.

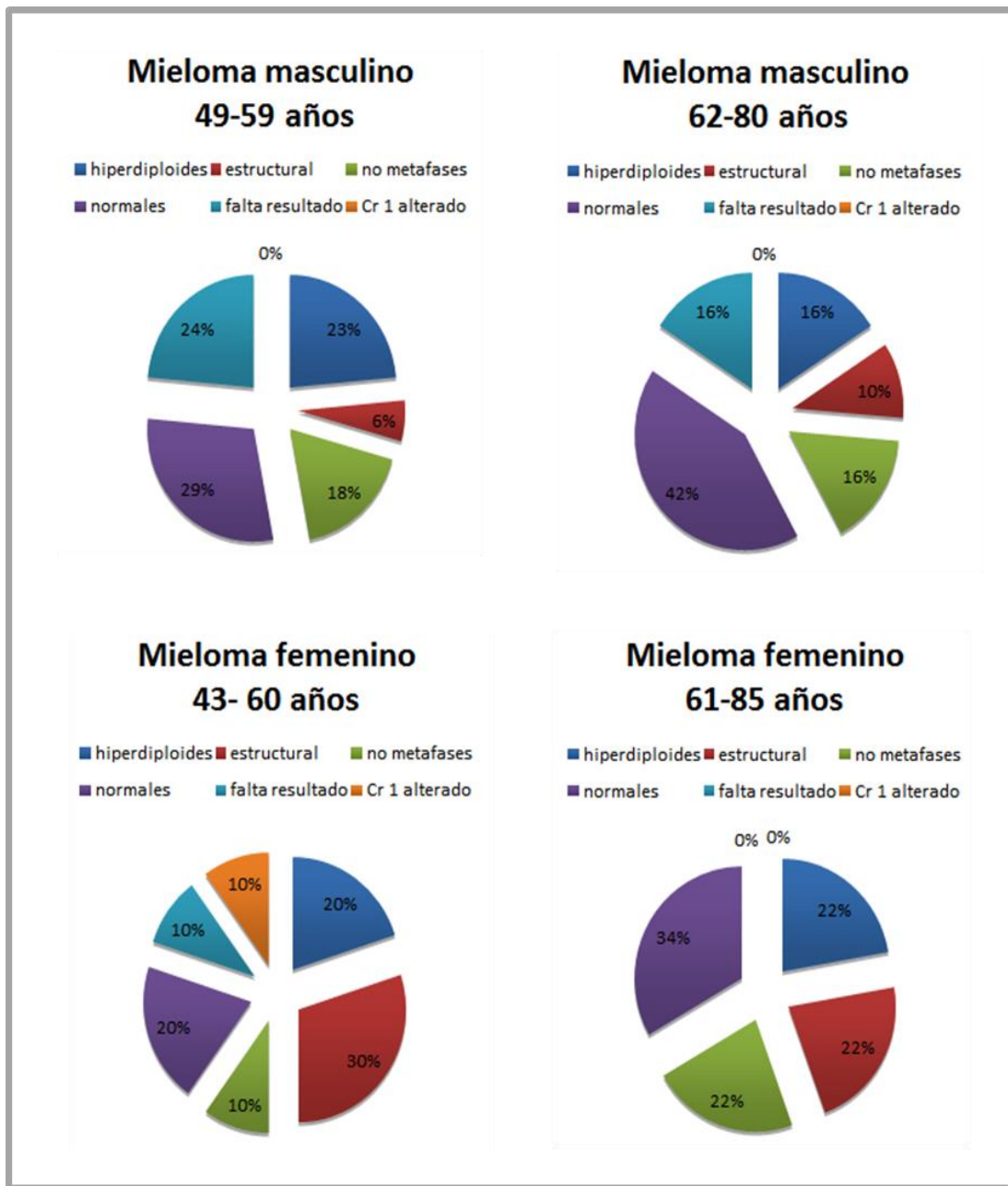


Gráfico 4. Alteraciones citogenéticas en pacientes con mieloma múltiple.

## Frecuencia Genotípica y Alélica

Para identificar las frecuencias genotípicas y alélicas en la población estudiada se lo realizó mediante la prueba de chi – cuadrado en la cual se obtuvieron valores de P mayores a 0.05, los datos obtenidos nos muestran que los grupos de individuos afectados vs los controles se encuentran en equilibrio Hardy – Weinberg (HWE) y por lo tanto no se encuentran diferencias significativas, como podemos observar en la tabla 17.

### Polimorfismo Phe31Ile del gen Aurora Kinasa A

**Tabla 17. Análisis Hardy – Weinberg para los diferentes genes estudiados con sus respectivos polimorfismos**

GEN	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS			FRECUENCIAS ALELICAS			HWE VALOR DE P	
	GENOTIPO	CASOS	CONTROLES	TODOS	CASOS	CONTROLES		TODOS
AURKA / Phe31Ile (rs2273535)	T/T	0,16	0,36	0,34	0,475	0,59	0,57	X <sup>2</sup> = 0,0008 P=0,977
	T/A	0,63	0,46	0,48				
	A/A	0,21	0,18	0,19	0,525	0,41	0,43	
AURKB / Thr298Met (rs1059476)	G/G	0,58	0,57	0,57	0,765	0,77	0,765	x <sup>2</sup> = 0,0071 P= 0,933
	G/A	0,37	0,40	0,39				
	A/A	0,05	0,03	0,04	0,235	0,23	0,235	
AURKB /Ser295Ser (rs2241909)	A/A	0,47	0,47	0,47	0,705	0,705	0,705	x <sup>2</sup> = 0,0169 P= 0,897
	A/G	0,47	0,47	0,47				
	G/G	0,06	0,06	0,06	0,295	0,295	0,295	

La distribución encontrada fue la siguiente: del grupo de los individuos afectados se encontró 3 homocigotos normales (TT), 4 homocigotos raros (AA) y 12 heterocigotos (TA), por otro lado en el grupo de los controles se identificó 53 homocigotos normales (TT), 27 homocigotos raros (AA) y 68 heterocigotos (TA).

### Polimorfismo Thr298Met del gen Aurora Kinasa B

En el grupo de los individuos afectados se pudo identificar 11 homocigotos normales (GG), 1 homocigotos raros (AA), y 7 heterocigotos (GA), por otra parte en el grupo de los controles se encontraron 33 homocigotos normales (GG), 2 homocigotos raros (AA) y 23 heterocigotos (GA).

### Polimorfismo Ser295Ser del gen Aurora Kinasa B

La distribución que se encontró en este polimorfismo en individuos afectos fue: 9 homocigotos normales (AA), 1 homocigoto raro (AG) y 9 heterocigotos (AG), en el grupo de los controles se pudo identificar 27 homocigotos normales (AA), 4 homocigotos raros (GG) y 27 heterocigotos (AG).

#### Frecuencia de Alelos

Los genotipos analizados en la tabla 17 fueron ordenados de manera que el alelo común este en primera posición seguido del heterocigoto, y por último se encuentra el alelo raro, en esta tabla se puede identificar la distribución total de los genotipos estudiados. En cuanto al polimorfismo Phe31Ile en el gen AURKA, podemos identificar que mayor cantidad de individuos presentan el heterocigoto raro T/A, mientras que en el polimorfismo Thr298Met presente en el gen AURKB, se pudo identificar que el homocigoto normal G/G es el que prevalece, al contrario del polimorfismo Ser295Ser que se encuentra en el mismo gen se encontró que tenía los mismos porcentajes tanto en homocigoto normal como en heterocigoto raro.

En la Tabla 18 se puede identificar el estudio de un polimorfismo para Aurora A y dos polimorfismos para la Aurora B y el riesgo de desarrollar Mieloma Múltiple, en presencia de dichos polimorfismos, comparando individuos afectos con respecto a controles, en este cálculo se usa tablas de contingencia 2x2. Con respecto al gen Aurk A Phe31Ile, los individuos con genotipos T/A, A/A y T/A + A/A, no presentaron riesgo: su OR fue de 3,12 (con un 95% de confiabilidad de 0,387 – 11,614;  $p = 0,14$ ); 2,62 (95 % CI de 0,546 – 12,543;  $p = 0,41$ ) y 2,98 (95% CI de 0,829 – 10,681;  $p = 0,14$ ) respectivamente.

Para el gen de Aurk B Thr298Met, los individuos con genotipos G/A, A/A, G/A + A/A, no presentaron riesgo: su OR fue de 0,91 (con un intervalo de confianza del 95% de 0,308 – 2,707;  $p = 1,00$ ); 1,50 (95% CI de 0,124 – 18,193;  $p = 1,00$ ) y 0,86 (95% CI de 0,303 – 2,427;  $p = 0,979$ ); Para el polimorfismo Ser295Ser, los individuos con genotipos A/G, G/G y A/G + G/G de igual manera no presentaron riesgo de desarrollar mieloma múltiple: su OR fue de 1,00 (95% CI de 0,344 – 2,906;  $p = 1,00$ ); 0,75 (95% CI de 0,074 – 7,613;  $p = 1,00$ ) y 0,94 (95% CI de 0,343-2,732,  $p = 1,00$ )

Como se puede observar en la tabla 18 los polimorfismos estudiados no presentaron riesgo significativo de desarrollar mieloma múltiple, estos datos pueden ser resultado de la cantidad de muestras analizadas, se recomienda realizar un estudio más amplio en donde se puedan obtener mayor cantidad de muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple en los distintos centros de referencia a nivel nacional, para de esta manera llegar a una conclusión precisa acerca de la posibilidad de que estos polimorfismos se vean correlacionados para el desarrollo de esta patología.

Conclusión: Los resultados obtenidos en esta investigación determinan que no existe relación entre los polimorfismos Phe31Ile (AURKA), Thr298Met y Ser295Ser (AURKB) con mieloma múltiple.

**Tabla 18. Análisis de riesgo de adquirir mieloma múltiple con los polimorfismos Phe31Ile (rs2273535), Thr298Met (rs1059476), AURKB /Ser295Ser (rs2241909), mediante un análisis de Odds Ratio.**

GEN	GENOTIPO	CONTROLES	CASOS	OR	95% IC	P
AURKA / Phe31Ile (rs2273535)	T/T	53	3 (15,8)			
	T/A	68	12 (63,2)	3,118	0,387-11,614	0,137
	A/A	27	4 (21,1)	2,617	0,546-12,543	0,408
	T/A + A/A	95	16 (84,2)	2,975	0,829-10,681	0,138
AURKB / Thr298Met (rs1059476)	G/G	33	11 (57,9)			
	G/A	23	7 (36,8)	0,913	0,308-2,707	1
	A/A	2	1 (5,3)	1,5	0,124-18,193	1
	G/A + A/A	25	8 (42,1)	0,857	0,303-2,427	0,979
AURKB /Ser295Ser (rs2241909)	A/A	27	9 (47,4)			
	A/G	27	9 (47,4)	1	0,344-2,906	1
	G/G	4	1 (5,3)	0,75	0,074-7,613	1
	A/G + G/G	31	10 (52,6)	0,938	0,343-2,732	1

En la tabla 19 se realizó una prueba de Chi- Cuadrado para identificar si existe relación entre el estadio del mieloma múltiple y los polimorfismos estudiados. Los datos obtenidos se distribuyen de la siguiente manera, para el gen de Aurora Kinasa A para el polimorfismo Phe31Ile (rs2273535), en el estadio IIA se pudo identificar 2 pacientes que presentaban el homocigoto normal (TT), 7 pacientes heterocigotos (TA) y 1 paciente que presentó el homocigoto raro (AA), mientras que para el estadio IIB solo se identificó a 1 paciente heterocigoto (TA), en el estadio IIIA se pudo identificar que 2 pacientes presentaron el homocigoto raro (AA), en el estadio III se identificó 1 pacientes homocigoto normal (TT) y un heterocigoto (TA). Con estos datos se obtuvo una P (0,0991) no

significativa, esto nos da a entender que no existe una correlación entre el estadio de la patología respecto al polimorfismo estudiado, sin embargo podemos identificar que los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad presentan con mayor frecuencia heterocigotos (TA) y homocigotos raros (AA).

En Aurora Kinasa B para el polimorfismo Thr298Met (rs1059476), en el estadio IIA se pudo identificar 4 pacientes que presentaban el homocigoto normal (GG), 4 pacientes heterocigotos (GA) y 1 paciente que presentó el homocigoto raro (AA), mientras que para el estadio IIB solo se identificó a 1 paciente heterocigoto (GA), en el estadio IIIA se pudo identificar que 2 pacientes presentaron el homocigoto normal (GG) y 1 paciente heterocigoto (GA), en el estadio IIIB se identificaron 2 pacientes que presentaron el homocigoto normal (GG). En el análisis de los resultados se obtuvo una P no significativa de 0,6726, con estos datos obtenidos se pone en manifiesto que el polimorfismo Thr298Met no tiene asociación directa con el riesgo a desarrollar un mieloma múltiple, con respecto al polimorfismo Ser295Ser (rs2241909) para el mismo gen, se pudo identificar que en el estadio IIA, 1 paciente presentó el homocigoto normal (AA), 6 pacientes fueron heterocigotos (AG) y 3 pacientes presentaron el homocigoto raro (GG), mientras que para el estadio IIB solo se identificó a 1 paciente heterocigoto (AG), en el estadio IIIA se pudo identificar que 1 paciente presentó el heterocigoto (AG) y 1 paciente presentó el homocigoto raro (GG), en el estadio IIIB se identificaron 2 pacientes que presentaron el homocigoto raro (GG). Con estos datos se obtuvo una P (0,6013) no significativa, esto nos da a entender que no existe una correlación entre el estadio de la patología respecto al polimorfismo estudiado, sin embargo podemos identificar que los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad presentan con mayor frecuencia heterocigotos (AG) y homocigotos raros (GG). Con los datos obtenidos en la tabla no podemos afirmar si existe o no una asociación entre el estadio de los pacientes con MM y los polimorfismos estudiados ya que la muestra analizada es muy pequeña, se recomienda aumentar el número de pacientes para obtener resultados que nos puedan proporcionar resultados mucho más claros.

**Tabla 19. Análisis de Chi - cuadrado para los diferentes genes estudiados con sus respectivos polimorfismos.**

AURKA / Phe31Ile (rs2273535)	T/T	T/A	A/A	P
IIA	2	7	1	P= 0,0991
IIB		1		
IIIA			2	
IIIB	1	1		
AURKB / Thr298Met (rs1059476)	G/G	G/A	A/A	
IIA	4	4	1	P= 0,6726
IIB		1		
IIIA	2	1		
IIIB	2			
AURKB /Ser295Ser (rs2241909)	A/A	A/G	G/G	
IIA	1	6	3	P= 0,6013
IIB		1		
IIIA		1	1	
IIIB			2	

En la tabla 20 se realizó una prueba de Fisher exacta para identificar si existe relación entre las alteraciones citogenéticas en el mieloma múltiple y los tres polimorfismos estudiados en dos genes Aurora Kinasa A y Aurora Kinasa B. Los datos obtenidos se distribuyen de la siguiente manera, para el gen de Aurora Kinasa A para el polimorfismo Phe31Ile (rs2273535), con respecto a los pacientes en los que no se observó ninguna alteración se pudo identificar 1 paciente homocigoto normal (TT), 6 pacientes heterocigotos (TA) y 2 pacientes homocigotos raros (AA), para los pacientes que presentaron Hiperdiploidía se pudo observar 3 pacientes con homocigoto normal (TT), 2 pacientes heterocigotos (TA) y 1 paciente que presentó el homocigoto raro (AA), mientras que para las alteraciones estructurales se pudo identificar 1 paciente heterocigoto (TA) y un paciente que presentó el homocigoto raro (AA). En el análisis estadístico con estos valores se obtuvo una P no significativa de 0,4502.

En aurora Kinasa B en el polimorfismo Thr298Met (rs1059476) se pudo observar en los pacientes que no presentaron alteraciones que en 4 de estos tenía genotipo homocigoto normal (GG), 3 pacientes presentaron el heterocigoto (GA) y 1 paciente presentó el homocigoto raro (AA), en los pacientes que presentaron hiperdiploidía se pudo identificar que 4 pacientes presentaron el genotipo normal (GG), 2 pacientes fueron heterocigotos (GA), mientras que los pacientes que presentaron daños estructurales se encontró 1 paciente homocigoto normal (GG) y 1 paciente heterocigoto (GA). En el

análisis estadístico se pudo identificar una P mayor a 0,9999; que nos da como resultado que las alteraciones citogenéticas no tienen relación con este polimorfismo.

Para el polimorfismo Ser295Ser (rs2241909), los valores obtenidos fueron los siguientes, para los pacientes que no presentan alteraciones estructurales se encontró 1 paciente que presentó el homocigoto normal (AA), 3 pacientes presentaron el heterocigoto (AG) y 4 pacientes presentaron el homocigoto raro (GG), para los pacientes que presentaron hiperdiploidías se pudo encontrar 3 pacientes heterocigotos (AG), y 3 pacientes que presentaron el homocigoto raro (GG), mientras que en los pacientes que presentaron daños estructurales se encontró 1 paciente heterocigoto (AG) y 1 paciente que presentó el homocigoto raro (GG). En el análisis estadístico se pudo identificar una P mayor a 0,9999

**Tabla 20. Análisis de Fisher exacto para identificar correlación entre alteraciones citogenéticas y polimorfismos estudiados en el gen de Aurora Quinas A y Aurora Quinasa B.**

GEN	GENOTIPO	NORMALES	HIPERDIPLOIDES	ESTRUCTURALES	P
AURKA / Phe31Ile (rs2273535)	T/T	1	3		P= 0,4502
	T/A	6	2	1	
	A/A	2	1	1	
AURKB / Thr298Met (rs1059476)	G/G	4	4	1	P= >0,9999
	G/A	3	2	1	
	A/A	1			
AURKB /Ser295Ser (rs2241909)	A/A	1			P= >0,9999
	A/G	3	3	1	
	G/G	4	3	1	

Debido a que no se pudo encontrar una significancia estadística en estos casos se decidió separarlos por pacientes sin alteraciones citogenética y pacientes que poseían alguna alteración los datos que se obtenidos fueron los siguientes, para el gen de Aurora Kinasa A para el polimorfismo Phe31Ile (rs2273535), se pudo observar en los pacientes que no presentaron alteraciones citogenéticas que 1 paciente presentó el homocigoto normal (TT), 6 pacientes presentaron el heterocigoto (TA) y 2 pacientes presentaron el homocigoto raro (AA), mientras que los pacientes que presentaron algún tipo de alteración citogenética se pudo observar que 3 pacientes presentaron el homocigoto normal (TT), 3 pacientes presentaron el heterocigoto (TA), y 2 pacientes presentaron el homocigoto raro (AA) con una P no significativa de 0,377; con respecto al gen de la Aurora Kinasa B para

el polimorfismo Thr298Met (rs1059476) se pudo identificar que 4 pacientes presentaron el homocigoto normal (GA), 3 pacientes presentaron el heterocigoto (GA) y 1 paciente presentó el homocigoto raro (AA), mientras que para los pacientes que presentaron algún tipo de alteración citogenética se encontró 5 pacientes que presentaron el homocigoto normal (GG) y 3 pacientes que presentaron el heterocigoto (GA) con una P no significativa de 0,574; el análisis para el polimorfismo Ser295Ser (rs2241909) fue el siguiente, dentro de los pacientes que no presentaron alteraciones citogenéticas se pudo identificar 1 paciente que presentó el homocigoto normal (AA), 3 pacientes presentaron el heterocigoto (AG) y 4 pacientes presentaron el homocigoto raro (GG), con respecto a los pacientes con alteraciones citogenéticas se pudo identificar que 4 pacientes presentaron el heterocigoto (AG) y 4 pacientes presentaron el homocigoto raro (GG). En el análisis estadístico se pudo identificar una P no significativa de 0,565.

**Tabla 21. Análisis de pacientes que presentaron alteraciones genéticas vs pacientes que no las presentaron, con respecto a los polimorfismos estudiados en Aurora Quinasas A y B.**

GEN	GENOTIPO	NORMALES	ALTERADOS	P
AURKA / Phe311Ile (rs2273535)	T/T	1	3	0,3772
	T/A	6	3	
	A/A	2	2	
AURKB / Thr298Met (rs1059476)	G/G	4	5	0,5741
	G/A	3	3	
	A/A	1		
AURKB /Ser295Ser (rs2241909)	A/A	1		0,5655
	A/G	3	4	
	G/G	4	4	

Los valores que se obtuvo en el análisis de la citogenética relacionado a los polimorfismos estudiados se cree que es respecto a la cantidad de células plasmáticas de cada uno de los pacientes, ya que cuando se realiza el cultivo celular para la citogenética se toma una muestra de médula ósea sin diferenciarse en la cual van a existir células normales y también células plasmáticas que serían en este caso las células que presentan alteraciones, lo que se recomienda es realizar previo el análisis de citogenética la diferenciación por medio de un citómetro de flujo que permita identificar y separar solamente las células plasmáticas y tener resultados más certeros que puedan ser analizados a profundidad.

## DISCUSIÓN

El mieloma múltiple está dentro de los 25 tumores más frecuentes según el registro Nacional de Tumores y el IARC, es el segundo cáncer hematológico más común después del linfoma no Hodgkin, corresponde al 1,5% de las enfermedades malignas y el 15% de las enfermedades hematológicas, la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) ha estimado que en el año 2012 hubo 62469 nuevos casos de mieloma múltiple y 43094 muertes por este tipo de cáncer en todo el mundo y se estima una elevación del número de casos a 124985 en el año 2017 para el sexo masculino, mientras que para el sexo femenino se identificaron 51782 nuevos casos de mieloma múltiple, con una mortalidad de 36921 y se estima que para el año 2017 el número de casos sea de 104483 (Globocan,2012).

El mieloma múltiple se caracteriza por ser un tipo de cáncer muy tratable pero excepcionalmente curable (Calvo-Villas, 2009).

En Ecuador, los únicos datos epidemiológicos encontrados acerca de mieloma múltiple fueron los datos registrados en la Sociedad ecuatoriana de tumores SOLCA Quito correspondientes al período 2003 – 2005 y en el Instituto de estadísticas y censos INEC que se han obtenido hasta el año 2010, el mieloma múltiple es un tipo de cáncer que no ha sido estudiado a profundidad por ser una patología compleja tanto en su diagnóstico y tratamiento, en Latinoamérica se ha obtenido escasa información acerca de esta patología situación que se evidencia al revisar publicaciones indexadas sobre mieloma múltiple en donde se pudo observar que en México, Chile, Brasil y Argentina (Stella, et al., 2011; Stella, et al., 2013; Hungria, et al., 2008; Conte, et al., 2007; Ruiz- Delgado, et al., 2004) son los únicos países que presentan información acerca de epidemiología y etiología de esta enfermedad, esta es la razón que nos impulsa a realizar estudios a profundidad para poder observar en nuestra población cual es el comportamiento de la enfermedad.

Existen estudios que se realizaron en individuos norteamericanos, en los cuales fueron incluidos tanto pacientes de Puerto Rico y Haití (Seidman, 1970; Moskowitz, et al., 1983), publicaciones a nivel nacional se encontraron en Colombia, Cuba, Ecuador y Perú. (Abello, et al., 2006; Mechán- Méndez, et al., 2011).

En el presente estudio se analizaron 116 pacientes que pertenecían al HCAM y 19 pacientes a SOLCA Quito con diagnóstico de mieloma múltiple de los cuales en el HCAM el 66,3% y 57,8% en SOLCA Quito correspondían al sexo masculino, siendo consecuente con lo publicado por Waxman en el 2010 (Waxman,2010); con respecto a la media de edad se pudo identificar que en nuestra población la tendencia es menor, ubicándose en un rango de 59,26 años, mientras que en un estudio publicado por Ries en el 2005 se identifica una media de edad de 65,8 años en caucásicos y 69,8 en afrodecendientes, los datos obtenidos en nuestro país se pueden asociar a las pocas medidas de seguridad dentro de los ambientes laborales, especialmente a la exposición a agentes químicos (Ries, et al., 2005).

Para determinar si los agentes químicos son los causantes de la aparición del mieloma múltiple se analizó de los 116 pacientes su ocupación, encontrando que el 18,6% pertenecía a personal que trabaja como obreros en fábricas, seguidos del 15,6% profesores, el 12,7% agricultores y 10,8% que representa al personal de salud, estos son los grupos que están expuestos en sus ambientes laborales a sustancias químicas, estos resultados sugieren que los agentes genotóxicos podrían constituir factores de riesgo.

Según el Registro Nacional de Tumores (Cueva, et al., 2009), indica una alta incidencia de mieloma múltiple en Loja, posiblemente asociada al trabajo minero realizado en esta zona al sur del Ecuador, sin embargo en el estudio realizado solo se identificó que el 2,9% de pacientes pertenecían a esta zona de Ecuador, la mayor cantidad de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple pertenecían a la provincia de Pichincha con un 27,6%, seguido de la provincia de Chimborazo con 14,3% e Imbabura que representa al 13,3%, los datos obtenidos se deben a que el estudio se realizó en el Hospital Carlos Andrade Marín ubicado en la ciudad de Quito, que es un centro de referencia para este tipo de enfermedades catastróficas, por esta razón gran cantidad de pacientes de la provincias aledañas son enviados a este hospital.

La gran cantidad de estudios etiológicos son muy complicados debido al reducido número de casos, es de gran dificultad encontrar la exposición de cada uno de los pacientes y cuantificarla, como consecuencia a estos problemas de metodología, no se han podido establecer de forma concluyente factores de riesgo medio ambiental, ocupacional o de estilo de vida relacionados con el mieloma múltiple. Al parecer en nuestra población

algunos grupos tienen mayor predisposición al estar en contacto con agentes químicos que podrían volverse genotóxicos, por esta razón se sugiere realizar un análisis más profundo en diferentes zonas del Ecuador en donde podría existir mayor riesgo laboral como son las florícolas, lugares en donde se curte cuero, haciendas en donde se practique la agricultura y hospitales en donde trabajen con agentes carcinogénicos, para poder identificar si los agentes genotóxicos son o no los posibles causantes del desarrollo de mieloma múltiple.

En un estudio realizado por Segovia en el Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá acerca del mieloma múltiple se obtuvo una media de edad de 58 años similar a los datos encontrados, con respecto a la edad en este estudio se encontró un porcentaje elevado de pacientes menores de 65 años, al igual que en nuestro país con un 71.5% pacientes menores de 65 años mientras que pacientes mayores de 65 años solo representó al 28.4%.

En el Ecuador la Sociedad ecuatoriana de Oncología usa el sistema de estadiaje de Durie y Salmon para clasificar al mieloma múltiple en sus distintas etapas, este sistema fue creado en el año de 1975 (Conte, et al., 2008), para esta clasificación se tomaron en cuenta distintos parámetros como son: valor de hemoglobina, valor de calcio en suero, placa de rayos x, producción de componente M bajo y cadena ligera M en orina; la subclasificación se realizó en base a función renal, A para función renal relativamente normal y B para función renal alterada.

En tres estudios realizados en Chile y Colombia (Segovia, et al., 2008; Conte, et al.; 2008; Conte, et al., 2007), se identificó que más del 50% de pacientes que son diagnosticados de mieloma múltiple se encontraban en etapas avanzadas de la patología, se identificó una media del 72,2% de pacientes se encontraban en estadios IIIA y IIIB, estos datos son similares a los encontrados en el presente estudio que detalla una media de pacientes del 65,4% en etapas tardías de la enfermedad, IIIA y IIIB. Los datos obtenidos a través de distintos estudios en 3 países Latinoamericanos se deben a la falta de programas de prevención que puedan ayudar a identificar las distintas patologías al inicio de cada una de ellas para otorgar a los pacientes un tratamiento adecuado que les proporcione mayor tiempo de vida con una mejor calidad de vida.

En el mieloma múltiple una de las pruebas más importantes es cuantificar los niveles sanguíneos de los diferentes anticuerpos. Existen distintos isotipos de anticuerpos presentes en la sangre: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Las Inmunoglobulinas juegan un papel importante debido a que son secretadas por las células plasmáticas las cuales se encuentran afectadas y por esta razón, forma solo un tipo de anticuerpo en exceso y los otros tipos se encuentran disminuidos o no son producidos por el sistema inmunológico.

La IgG es el isotipo de inmunoglobulinas más frecuentemente encontrado en el Ecuador con un 51,7%, seguido por el grupo de pacientes que presenta cadenas ligeras con el 17,2%, IgA con un 14,7%, mieloma múltiple no secretor con 0,85%, e IgM, IgD, IgE no se han encontrado pacientes con esta subclasificación de inmunoglobulinas, estos datos no se asemejan a lo encontrado en otros países que presenta una media de 56,6% de IgG, seguido de IgA con una media de 25.5%, cadenas ligeras con una media de 11,3% , mieloma múltiple no secretor, IgM, IgD, e IgE como isotipos muy poco frecuentes (Segovia, et al., 2008; Conte, et al., 2007; Viedma, 2005; Conte, et al., 2009; Menoni-Blanco, et al., 2010; Estrada, 2012; García- Sanz, et al., 2007; Conte, et al., 2008).

Con respecto a los valores referentes a las biopsias de médula ósea se observó en nuestra población que tan solo 12.9% de pacientes presentaron valores menores al 10% de células plasmáticas, mientras que el 53,4% de pacientes las células plasmáticas se encontraban en valores mayores al 10%. Estos datos son similares a los encontrados en distintas poblaciones (Segovia, et al; 2008; Conte, et al., 2007; Estrada, 2012; García-Sanz, et al., 2007; Conte, et al., 2008) que presentan una media de células plasmáticas del 50%. Las células plasmáticas en valores mayores a 10% se presentan debido a que los pacientes son diagnosticados en etapas tardías de la enfermedad.

En relación a las pruebas sanguíneas se observó un aumento de valores de B2M con una media de 5152 y una mediana de 3177, PCR con una media de 6,54 y una mediana de 2,00, cadenas kappa y lambda con una media de 2857 y 843; y una mediana de 1600 y 799 respectivamente, IgG con una media de 3077 y una mediana de 1470; La urea es una de las pruebas que sufrió un ligero incremento con una media de 54,26 y la mediana de 41,00, seguido de la creatinina con una media de 1,91 y una mediana de 1,00. Con respecto a la hemoglobina se encuentran niveles bajos con una media y mediana de 11,8. De estos datos

obtenidos se pudo observar que tan solo el 23,4% de los pacientes presentaron anemia, 17,6% presentaron hipercalcemia y el 29,3% insuficiencia renal todos los datos obtenidos fueron al momento del diagnóstico lo que se pudo identificar es que los pacientes diagnosticados de mieloma múltiple a pesar de que fueron en etapas tardías de la enfermedad no presentaban un daño sistémico grave.

Según la literatura internacional nos informa que la prueba de laboratorio que se encontraba con alteración severa en aproximadamente el 50% de los casos fue la anemia (Segovia, et al., 2008; Conte, et al., 2007; Estrada, 2012; García- Sanz, et al., 2007; Conte, et al., 2008), sin embargo en nuestra población solamente se identificó un 23,4%, esta variación está asociada a la producción excesiva de solo un tipo de línea celular, causando un desequilibrio en la producción normal de glóbulos rojos y glóbulos blancos, es este el motivo por el cual los pacientes presentan anemia e infecciones a repetición, causadas por la falta de células de defensa que se produce en médula ósea, llegando a ser más propensos de contraer cualquier tipo de bacterias que se encuentran en un ambiente hospitalario pudiendo llegar a causarles la muerte.

La B2M es una prueba que mide el grado de actividad tumoral, por esta razón ha sido de gran utilidad según el ISS, que es la nueva clasificación para pacientes con mieloma múltiple (Conte, et al., 2008). Esta prueba debido a que mide el proceso neoplásico al mismo tiempo mide la progresión de la enfermedad, por lo tanto es de gran importancia pronóstica en pacientes con mieloma múltiple al igual que la albumina, en nuestro estudio realizado en población ecuatoriana se pudo identificar niveles normales de albúmina mientras que la B2M se encontraba elevada en la mayoría de los casos.

Los pacientes con mieloma múltiple presentan varias comorbilidades que se deben a causa de la fisiopatología de la enfermedad, esta es la causa principal por la cual la supervivencia y la calidad de vida se encuentran afectadas. Entre estas complicaciones se encuentran la anemia, producción excesiva de inmunoglobulina monoclonal, infecciones bacterianas recurrentes, excreción de cadenas ligeras en orina, insuficiencia renal, osteopenia, fracturas espontáneas provocando hipercalcemia (Calvo- Villas, et al., 2009).

El síntoma más frecuente que aparece en aproximadamente el 65% de los pacientes que presentan mieloma múltiple al momento del diagnóstico, es el dolor óseo provocado por la osteopenia y las lesiones líticas, entre las zonas que se encuentran más afectadas se pudo identificar la columna vertebral, la parrilla costal y en menor número de casos hubo afección a nivel de extremidades (Calvo- Villas, et al., 2009).

Varios estudios han demostrado que existe una alteración en el balance normal de reabsorción/formación ósea, en todos los pacientes que presentan mieloma múltiple se ha observado el incremento de actividad osteoclástica, mientras que en aquellos pacientes que tienen enfermedad ósea se ha visto disminución de actividad osteoblástica. Por el contrario, en los pacientes que presentan mieloma múltiple sin desarrollar lesiones óseas, la osteogénesis se encontraría con un leve incremento o pudiera estar normal (Calvo- Villas, et al., 2009).

El daño óseo al momento del diagnóstico representa a una de las afecciones más importantes debido a que en un estudio realizado en Reino Unido por Karadag se pudo encontrar que los osteoclastos son los encargados de mantener vivas y fortalecer el crecimiento de las células plasmáticas tumorales. Por otra parte se ha observado que los osteoblastos son los encargados de secretar una citoquina que es de gran importancia en el mieloma múltiple ya que son las encargadas de estimular el crecimiento de la célula mielomatososa, esta citoquina se llama IL-6.

En nuestro estudio se encontró que de los 116 pacientes analizados, 63 pacientes tenían daño a nivel de columna que representa el 54,3%, similar a los datos analizados a nivel mundial descritos en el libro actualización del mieloma múltiple escrito por Calvo-villas (Calvo- Villas, et al., 2009), seguido de 18 pacientes que presentaron daño óseo a nivel de columna y otros huesos con el 15%, 9 pacientes no presentaron lesiones que representa al 7,8%, 6 pacientes presentaron lesiones a nivel de cráneo con el 5,2% y tan solo 1 paciente con el 0,9% presentó lesiones a nivel de huesos largos, como pudimos observar estos datos son similares a los datos encontrados en estudios en diferentes poblaciones a nivel mundial. (Segovia, et al., 2008; Conte, et al., 2007; García- Sanz, et al., 2007; Calvo- Villas, et al., 2009). Estos datos confirman que los pacientes que presentan daño óseo tienen peor pronóstico.

Dentro de los factores de riesgo se evaluó si los pacientes que tiene la patología previamente presentaron una gammapatía monoclonal de significado incierto, ya que existe el riesgo que dentro de los 25 años posteriores al diagnóstico pueda darse una transformación a mieloma múltiple en el 1% de los casos, sin embargo dentro del estudio ningún paciente era una progresión de GMSI, los datos obtenidos son similares a un estudio realizado en una población Mexicana que reporta baja incidencia de GMSI, que puede ser debido al grupo étnico mestizo, o a la falta de sintomatología en dichos pacientes.

En Ecuador no se han obtenido registros acerca de casos de pacientes con Gamapatía Monoclonal de significado Incierto.

El mieloma múltiple es una patología que se diferencia de otras neoplasias hematológicas debido a que todavía no se ha logrado identificar con certeza alguna alteración genética o cromosómica que promuevan la oncogénesis de la célula plasmática. Varias investigaciones han logrado gracias al estudio cromosómico identificar si un paciente presenta o no un mal pronóstico. (Menoni-Blanco, et al., 2010). Estudios realizados acerca de citogenética molecular afirman que casi todos los pacientes que presentan la patología tienen alteraciones genéticas. (Zandecki, et al., 2006), llegando a presentar diversas ganancias o pérdidas cromosómicas (Menoni- Blanco, 2010). Así los casos de MM se dividen en dos grupos basados en la distribución del número cromosómico: hiperdiploides y no- hiperdiploides (Debes- Marun, et al., 2003; Wuilleme, et al., 2005; Calvo- Villas., 2009), teniendo en cuenta que los pacientes que presentan alteraciones hiperdiploides tienen mejor pronóstico que pacientes que presentan alteraciones de tipo no-hiperdiploide (Calvo- Villas, et al., 2009). En la presente investigación se realizó estudios de citogenética a cada uno de los pacientes en donde se obtuvieron los siguientes datos: metafases normales en 32,05% de los casos, seguidos de alteraciones hiperdiploides en un 20,77%, alteraciones no hiperdiploides en 17,44%, no metafases en 16,92% y 12,82% pacientes que no obtuvieron resultados.

Con los datos obtenidos podemos identificar que gran cantidad de pacientes no presentan alteraciones cromosómicas, esto puede ser debido a que la técnica que se utiliza incluye a todas las células presentes en médula ósea sin diferenciación, por esta razón se

van a obtener gran cantidad de metafases normales, gracias a la realización de este estudio se evidencia la necesidad de implementar un análisis de citometría de flujo para obtener células plasmáticas identificadas gracias al marcador CD138 de esta manera llegando a hacer un análisis citogenético adecuado. Con respecto al porcentaje identificado de pacientes en los que no se pudieron observar metafases se recomienda la implementación de técnicas mucho más avanzadas como FISH mediante sondas en las cuales se pueda evaluar el estado de IgH, RB, p53 y las ganancias de cromosomas impares (Conte, et al., 2009; Calvo- Villas, et al., 2009).

El mieloma múltiple es una patología muy compleja se caracteriza por presentar con regularidad periodos de recidiva y remisión. Varios hematoncólogos y biólogos moleculares se han dedicado a investigar a profundidad el estudio de las alteraciones moleculares del MM. (Menoni-Blanco, et al., 2010). Este es el motivo por el cual en esta investigación se decidió realizar un análisis acerca de dos genes que se cree están alterados en esta patología.

Las auroras quinasas A, B, y C desempeñan papales que son esenciales en mitosis, tanto aurora A como aurora B se encuentran sobre expresados frecuentemente en distintos tipos de cánceres humanos y han sido de gran importancia en el desarrollo de la inestabilidad cromosómica y transformación oncogénica, además presentan variaciones en los genes supresores de tumores y las vías reguladoras de oncoproteínas, por esta razón se dio importancia al estudio de estos genes, en un estudio pre- clínico realizado en el Departamento de medicina clínica y experimental de la Universidad de Parma se identificó una actividad anti – mieloma potente y específica que se da debido a la combinación de inhibidores de la Aurora Kinasa con TRAIL que es un fármaco miembro de la familia del factor de necrosis tumoral, la inhibición de Aurora quinasa aumenta el efecto terapéutico de TRAIL en células plasmáticas. (Mazzera, et al., 2013)

En un estudio realizado por Dutta-Simmons publicado en el 2009 se pudo observar un aumento de en la expresión de B- catenina y Aurora Kinasa A en las células plasmáticas tumorales que se vio relacionado a la progresión de la enfermedad pasando de la fase de GMSI a MM, mientras que las células plasmáticas normales no presentaron ninguna correlación significativa, se pudo identificar que un gen como la Aurora Kinasa A es

extremadamente sensible a los cambios que se producen en la célula y la perturbación de su ambiente normal puede conducir a una inestabilidad y llegar a presentar alteraciones cromosómicas asociadas con la iniciación de cáncer y su progresión (Dutta-Simmons, et al., 2009).

Esta es la razón por la cual hemos decidido realizar un estudio a profundidad acerca de las aurora quinasas; en esta investigación se examinó la función del polimorfismo Phe31Ile del gen AURKA y para el gen de AURKB se identificaron dos polimorfismos importantes Thr298Met y Ser295Ser que podrían estar asociados al riesgo de desarrollar MM y a su progresión.

En los resultados obtenidos se pudo encontrar que el alelo Ile se encuentra con mayor frecuencia que el alelo Phe en los pacientes que presentaron Mieloma Múltiple, en diversos estudios se encuentra una correlación entre el alelo Ile y pacientes con cáncer de colon y cáncer de mama (Sun, et al., 2004; Goepfert, et al., 2002; Ewart-Toland, et al., 2005), en nuestra población se identificó que la mayor cantidad de pacientes presentaron el genotipo heterocigoto Phe/Ile que los pacientes homocigotos para el genotipo Phe/Phe, lo que nos indica que el alelo Ile puede verse relacionado al desarrollo tumoral, estos datos tiene correlación con un estudio en el cual se realizó una comparación entre el genotipo Phe/Phe y el genotipo Ile/Ile en el cual en el primero de los casos muestra una unión defectuosa a la enzima ubiquitina de conjugación E2 (UBEN2N), por tal motivo la degradación a nivel proteico de AURKA A se da gracias a la sustitución de una Fenilalanina por una Isoleucina (Phe31>Ile) en la mitosis, lo que va a dar resultado un fallo en su función facilitando un proceso oncogénico. (Ewart-Toland, et al, 2005).

En un estudio realizado en población alemana en 564 casos y 724 controles para identificar si las Auroras juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer de mama familiar se analizaron tres polimorfismos uno en aurora kinasa A (Phe31Ile) y dos en aurora Kinasa B (Thr298Met y Ser295Ser), los resultados que se obtuvieron confirman que el polimorfismo Se1295Ser puede estar relacionado al desarrollo de cáncer de mama familiar, mientras que los polimorfismos Phe31Ile y Thr298Met no tuvieron significancia estadística por lo que se puede afirmar que en población Alemana estos polimorfismos no tienen relación al desarrollo de cáncer familiar. (Tchatchou, et al., 2007)

Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman que existe un equilibrio Hardy Weinberg y que no presentan diferencias significativas, con respecto a los resultados obtenidos en el análisis de cada uno de los polimorfismos Phe31Ile (AURKA), Thr298Met y Ser295Ser (AURKB) con respecto a la citogenética y estadiaje se pudo identificar que no presentaron riesgo significativo de desarrollar mieloma múltiple, estos datos pueden ser resultado de la cantidad de muestras analizadas, se recomienda realizar un estudio más amplio en donde se puedan obtener mayor cantidad de muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple en los distintos centros de referencia a nivel nacional, para de esta manera llegar a una conclusión precisa acerca de la posibilidad de que estos polimorfismos se vean correlacionados para el desarrollo de esta patología.

## CONCLUSIONES

La incidencia de Mieloma Múltiple en Ecuador es inferior a la informada en Europa y USA.

El Ecuador es un país con amplios cultivos de flores y tradición de curtidores de cuero, que en caso de pocas medidas de seguridad podrían convertirse en agentes genotóxicos y aumentar el riesgo de desarrollar MM, con los resultados obtenidos se identificó con claridad que la mayor cantidad de pacientes con el 18,6% pertenecían a obreros de grandes fábricas, seguido de profesores con un 15,6%, agricultores con el 12,7% y 10,8% pertenecían a personal de la salud.

El tiempo de supervivencia de los pacientes con MM es inferior a lo informado en Estados Unidos y Europa, posiblemente asociado al tipo de tratamiento.

El 65% de pacientes son diagnosticados en etapas tardías de la enfermedad, lo que podría asociarse con la corta sobrevida observada en pacientes con MM en el Ecuador.

No existe relación entre los polimorfismos Phe31Ile (AURKA), Thr298Met y Ser295Ser (AURKB) con el riesgo a desarrollar mieloma múltiple.

Estos datos deben correlacionarse con estudios avanzados de genética como son: Arrays de mapeo genético y de expresión, FISH, y asociaciones entre genes y características clínicas.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda implementar técnicas de genética molecular avanzada y realizar un análisis en conjunto con los datos epidemiológicos para de esta manera proporcionar un mejor diagnóstico y posteriormente sea de utilidad para elegir un tratamiento personalizado para cada uno de los pacientes otorgando la posibilidad de tener mayor tiempo de vida con una mejor calidad de vida.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abello, V., Rodriguez, M., Combariza, J.F., Solano, M.H., Ramirez, C., Casas, C.P., Duque, J.E., et al. (2006). Consenso colombiano sobre el tratamiento de mieloma múltiple. *Rev Colomb Cancerol*, 10(4), 234-56.
- Alavanja, M.C., Ross M.K., Bonner M.R. (2013). Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *Cancer Journal for Clinicians*, 63(2), 120-142.
- Bergsagel, P.L. y Kuehl, W.M. (2005). Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(26), 6333-6338.
- Bezieau S., Devilder M.C., Avet-Loiseau H., et al. (2001). High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Human Mutation*, 18, 212-224.
- Biomédicas. (2008). *Biomédicas*. Recuperado el 2014, de <http://idibam.blogspot.com/2008/06/fundamentos-y-etapas-de-la-reaccin-en.html>.
- Brandan, N., Aguirre, M.V., Giménez, C.E., et al. (2008). Hemoglobina. Chiapas: Facultad de Medicina, UNNE.
- Calvo –Villas, J.M., Alegre, A., Alvarez, I., De Arriba, F., Blanes, M., Casado, L., Fisac, R.M., García, J., García, R., Gómez-Rial, J., Gutiérrez, N.C., Hernández, M.T., Hernández, J.M., Jover, R., Lahuerta, J.J., Lourido, D., Martínez, R., Mateos, M., Molero, T., Oliver, C., Del Prado, M., Ríos, P., De la Rubia, J., Rubio, F., Sureda, A., Tapia, M., Villar, L. (2009). Mieloma Múltiple Actualización, *Momento médico Iberoamericana, s.I. Madrid*.

- Campos, A. (2014). Reacción en cadena de la polimerasa. *Prezi*. Recuperado el 2014 de <http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n6.pdf>
- Campos, M.L., de Carvalho, N.M.B., Reyes, G.M. (2012). Valor del ensayo de las cadenas ligeras libres en suero para los pacientes de gammapatías monoclonales e insuficiencia renal. *Nefrología: Publicación oficial de la Sociedad Española de Nefrología*, 32(1), 15-19.
- Cáncer, I.N. (2013). Definición de Linfocito. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(8), 599-613. Recuperado el 07 de Marzo de 2014, de <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tratamiento/terapias-biologicas-respuestas>.
- Censos. (2010). Mieloma Múltiple. Quito: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de Ecuador.
- Conte 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.
- Conte G., Figueroa M., Lois V., Cabrera, M.E., León A., García H., Rojas H. (2007). Mieloma múltiple en Chile: Características clínicas y sobrevida. *Revista Médica de Chile*, 135(9), 1111-1117.
- Conté, G., Figueroa, G., Lois, V., Cabrera, M. E., León, A., García, H., & Rojas, H. (2008). Valor pronóstico del nuevo sistema de etapificación internacional en mieloma múltiple: Comparación con el sistema de Durie-Salmon. *Revista médica de Chile*, 136(1), 7-12.
- Cueva P. y Yépez J. (2009). Registro Nacional de Tumores: Epidemiología del Cáncer en Quito 2003 – 2005. Quito: SOLCA.

Debes-Marun, C.S., Dewald, G.W., Bryant, S., Picken, E., Santana-Davila, R., Gonzalez-Paz, N., Winkler, J.M., Kyle, R.A., Gertz, M.A., Witzig, T.E., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Rajkumar, S.V., Lust, J.A., Greipp, P.R., Fonseca, R. (2003). Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia*, 17(2), 427-436.

Definición, C.Y. (2011). Definición de Urea. Recuperado el 15 de enero de 2013, de Definiciones médicas: <http://conceptodefinicion.de/urea/>

Diccionario Médico. (2014). Leucocitos Definición. *Doctissimo*. Recuperado el 07 de Marzo de 2014, de <http://salud.doctissimo.es/diccionario-medico/leucocito.html>

Dickens, N.J., Walker, B.A., Leone, P.E., Johnson, D.C., Brito, J.L., Zeisig, A., Jenner, M.W., Boyd, K.D., Gonzalez, D., Gregory, W.M., Ross, F.M., Davies, F.E., Morgan, G.J. (2010). Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome. *ClinicalCancerResearch*, 16(6), 1856-1864.

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.

Eguiarte, L.E., Sousa, V., Aguirre, X. (2007). *Ecología Molecular*; Coyoacan : Coordinación editorial, diseño de interiores tipografía.

Encinas, M.A. (2008). Cadenas ligeras libres en suero. *Anales de Medicina Interna*, 249-250.

Estrada, N.W. (2012). Revisión de fisiopatología, clínica y diagnóstico de mieloma múltiple. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 69(603), 343-349.

Ewart-Toland, A., Dai, Q., Gao, Y., Nagase, H., Dunlop, M., Farrington, S., et al. (2005). Aurora-A/STK15 T+91A is a general low penetrance cancer susceptibility gene: a meta-analysis of multiple cancer types. *Oxford Journals*, 26:1368-1373.

- Facts. (2013). Leukemia&LymphomaSociety 2013. Recuperado el 15 de enero de 2014, de <http://www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/generalcancer/pdf/facts.pdf>
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. (2010). GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. Lyon, France, IARC CancerBase No. 10 [Internet]: International Agency for Research on Cancer, 2010. Recuperado el 15 de enero de 2014, de <http://globocan.iarc.fr>.
- FIBAO. (2008a). Definición de Plaquetas. *Medicina Molecular*. Recuperado el 07 de Marzo del 2014, de <http://medmol.es/glosario/91/>.
- FIBAO. (2008b). Definición de Neutrófilo. *Medicina Molecular*. Recuperado el 07 de Marzo del 2014, de <http://medmol.es/glosario/86/>.
- Fonseca, R., Debes-Marun, C.S., Picken, E.B., Dewald, G.W., Bryant, S.C., Winkler, J.M., Blood, E., Oken, M.M., Santana-Dávila, R., González-Paz, N., Kyle, R.A., Gertz, M.A., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Greipp, P.R. (2003). The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*, 102(7), 2562-2567.
- Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Davies, F.E., Drach, J., Greipp, P.R., Kirsch, I.R., Kuehl, W.M., Hernandez, J.M., Minvielle, S., Pilarski, L.M., Shaughnessy, J.D., Stewart, A.K., Avet-Loiseau, H. (2004). Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: A workshop report. *Cancer Research*, 64(4), 1546-1558.
- García, M. (2011). Definición de citología. *Portales médicos*. Recuperado el 07 de Marzo del 2014, de [http://www.portalesmedicos.com/diccionario\\_medico/index.php/Citologia](http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Citologia)

- García- Sanz, R., Mateos, M.V., San Miguel, J.F. (2007). Revisión Mieloma Múltiple. Servicio de Hematología. Hospital universitario de Salamanca. *Med Clin*, 129(3):104-15.
- Globocan. (2012). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence. International agency for research on Cancer. World health organization.
- Goepfert, M., Adiyun, Y., Zhong, L., Gay, L., Medina, D., Brinkley, W. (2002). Centrosome amplification and overexpression of Aurora-A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 62:4115-4122.
- Greipp, P.R., San Miguel, J., Durie, B.G., Crowley, J.J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R.A., Lahuerta, J.J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneyeld, P., Tosi, P., Turesson, I., Westin, J. (2005). International staging system for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(15), 3412-3420.
- Hernández, R.G. (2009). Determinación de los marcadores de apoptosis en pacientes con mieloma múltiple de novo. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 56(4), 235-246.
- Hideshima, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Anderson, K.C. (2004). Advances in biology of multiplemyeloma: clinicalapplications. *Blood*, 104(3), 607-618.
- Hungria, V.T.M., Maiolino, A., Martinez, G., Colleoni, G.W.B., Coelho, E.O.D.M., Rocha, L., Nunes, R., Bittencourt, R., Oliveira, L.C.O., Faria, R.M.O., Pasquini, R., Magalhaes, S.M.M., Souza, C.A., Pinto-Neto, J.V., Barreto, L., Andrade, E., Portella, M.S., Boleiack, V., Durie, B.G. (2008). Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica*, 93(5), 791-792.
- Hurt, E.M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A.L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Staudt, L.M. (2004). Overexpression of c-maf is a frequent

oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell*, 5(2), 191-199.

Ichimaru, M., Ishimaru, T., Mikami, M., Matsunaga, M. (1982). Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *Journal of the National Cancer Institute*, 69, 323-328.

Jenner, M.W., Leone, P.E., Walker, B.A., Ross, F.M., Johnson, D.C., Gonzalez, D., Chiecchio, L., Dachs Cabanas, E., Dagrada, G.P., Nightingale, M., Protheroe, R.K.M., Stockley, D., Else, M., Dickens, N.J., Cross, N.C.P., Davies, F.E., Morgan, G.J. (2007). Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood*, 110(9), 3291-3300.

Keats, J.J., Reiman, T., Maxwell, C.A., Taylor, B.J., Larratt, L.M., Mant, M.J., Belch, A.R., Pilarski, L.M. (2003). In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood*, 101(4), 1520-1529.

Kyle, R.A., Rajkumar, S.V. (2005). Monoclonal gammopathy of undetermined significance. In *Neoplastic Diseases of the Blood* (pp. 751-785). Springer New York.

Kyle, R.A. y Rajkumar, S.V. (2004). Expanded safety experiences with lenalidomide plus dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, 351, 1860-1873.

Leone, P.E. (2005). La técnica Pescado y mi paso por el análisis de las leucemias. *Revista Nuestra Ciencia*, 7, 15-16.

Leone, P.E., Walker, B.A., Jenner, M.W., Chiecchio, L., Dagrada, G.P., Protheroe, R.K.M., Johnson, D., Brito, J.L., Else, M., Gonzalez, D., Ross, F.M., Chen-Kiang, S., Davies, F.E., Morgan, G.J. (2008). Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: Biological and clinical implications. *Clinical Cancer Research*, 14(19), 6033-6041.

- Leone, P.E. (2013). Las células madre embrionarias y pluripotentes: otro concepto de transgénicos en salud. En: Paz-y-Miño, C. Transgénicos, una cuestión científica (pp. 81-86). Quito: Edición de la UDLA.
- Leone, P.E., Montesdeoca, B., Ocampo, L., Espín, V.H., Cevallos, F., Paz-y-Miño, C. (2013). Mieloma Múltiple en el Ecuador. Libro de Comunicaciones VIII Congreso Ecuatoriano de Patología Clínica P-008.
- Lombardi, L., Poretti, G., Mattioli, M., Fabris, S., Agnelli, L., Biciato, S., Kwee, I., Rinaldi, A., Ronchetti, D., Verdelli, D., Lambertenghi-Deliliers, G., Bertoni, F., Neri, A. (2007). Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 46(3), 226-238.
- Low, E., Morris, M. (2011). ¿Que es el Mieloma?: Información general sobre la enfermedad.. Madrid: AEAL, Asociación Española de afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemia.
- Marcano, R. (2012). Definición de Creatinina. *Medicina Preventiva Santa Fe*. Recuperado el 08/03/2014, de <http://www.medicinapreventiva.com.ve/laboratorio/creatinina.htm>
- Mateos M.V., García-Sanz R., López-Pérez R., Moro MJ., Ocio E., Hernández J., Megido M., Caballero MD., Fernández-Calvo J., Bárez A., Almeida J., Orfão A., González M., San Miguel JF. (2002). Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *British Journal of Haematology*, 118, 1034-1040.
- Mazzer, L., Lombardi, G., Abeltino, M., Ricca, M., Donofrio, G., Giuliani, N., Lunghi, P. (2013). Aurora and IKK kinases cooperatively interact to protect multiple myeloma cells from Apo2L/TRAIL. *Blood*, 122(15), 2641-2653.

- Mechán- Méndez, V., Chipana- Sotomayor, M., Aguilar- Herrera, S., Alfaro- Lozano, A., Mechán- Escalante, D. (2011). Mieloma múltiple (MM) a cadenas ligeras asociado a plasmocitomas óseos (PO): Evolución de PO a MM. *Revista Sociedad Perú Medicina Interna*. 24(4): 212-7.
- Menoni-Blanco, B.J. y Cueva-Nieves, D.A. (2010). Mieloma Múltiple: Alteraciones génicas y cromosómicas no translocacionales y sus implicaciones pronósticas. *Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina de la UCV*, 8(1): 9-14.
- Menoni-Blanco, B. J. (2010) Mieloma Múltiple: Translocaciones más importantes y sus implicaciones en el pronóstico de la enfermedad. *Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina de la UCV*, 8(1): 15-22.
- Moskowitz, L.B., Kory, P., Chan, J.C., Haverkos, H. W., Conley, F. K., Hensley, G.T. (1983). Unusual causes of death in Haitians residing in Miami. High prevalence of opportunistic infections. *JAMA*. 250(9) : 1187-91.
- Noval Menendez, J., Nuno Mateo, F. J., MazorraIraculis, M. y Miranda Martinez, E. (2003). Plasmocitoma óseo solitario de pared costal. *Anales de Medicina Interna (pp. 56). Madrid*.
- NCBI. (2014). Aurora kinase A. Recuperado el 26 de Junio del 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6790>.
- NCBI. (2014). Aurora kinase B. Recuperado el 26 de Junio del 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9212>.
- Ogmundsdottir, H.M., Haraldsdottir, V., Johannesson, G.M., Olafsdottir, G., Bjarnadottir, K., Sigvaldason, H., Tulinius, H. (2005). Familiality of benign and malignant paraproteinemias. A population-based cancer registry study of multiple myeloma families. *Haematologica*, 90, 66-71.

- Paz-y-Miño, C. (2009). Estudios genéticos para caracterizar a la población ecuatoriana. En: Zurita, J. (Ed.), Una mirada a la salud del Ecuador (pp. 85-96). Quito: Editorial Nueva Arte.
- Pieck, K. (2009). Una cinasa detecta la segregación cromosómica y envía una señal que favorece la inhibición de la citocinesis. *Diario médico.com*.
- Resinos, S., Reacciones de precipitación (II): electroforesis. *Epidemiología de enfermedades infecciosas*. Recuperado el 2015 en <http://epidemiologiamolecular.com/reacciones-precipitacion-ii-electroforesis/>.
- Ries L.A.G., Melbert, D., Krapcho, M., Stinchcomb, D.G., Howlader, N., Horner, M.J., Mariotto, A., Miller, B.A., Feuer, E.J., Altekruse, S.F., Lewis, D.R., Clegg, L., Eisner, M.P., Reichman, M., Edwards, B.K. (2008). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/), based on November 2007 SEER data submission, posted to the SEER web site.
- Romero, H. (2011). Mieloma Múltiple. *Portales Médicos*. Recuperado el 2014 en <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/3442/1/Mieloma-multiple.html>.
- Ross, F.M., Ibrahim, A.H., Vilain-Holmes, A., Winfield, M.O., Chiecchio, L., Protheroe, R.K.M., Strike, P., Gunasekera, J.L., Jones, A., Harrison, C.J., Morgan, G.J., Cross, N.C.P. (2005). Age has a profound effect on the incidence and significance of chromosome abnormalities in myeloma. *Leukemia*, 19(9), 1634-1642.
- Ruiz-Argüelles G.J., Gómez-Rangel J.D., Ruiz-Delgado G.J., Aguilar-Romero L. (2004). Multiple myeloma in Mexico: a 20-year experience at a single institution. *Archives of Medical Research*, 35(2), 163-7.

- Ruiz-Delgado G.J., Gómez-Rangel J.D. (2004). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) in Mexican mestizos: one institution's experience. *Gac Med Mex* . 2004; 140 (4): 375-9.
- Santra, M., Zhan, F., Tian, E., Barlogie, B., Shaughnessy, J. (2003). A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood*, 101(6), 2374-2376.
- Schultheis B., Kramer A., Willer A., Hegenbart U., Goldschmidt H., Hehlmann R. (1999). Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. *Leukemia*, 13, 2099-2103.
- Segovia, J., Duarte, M., Restrepo, J.G., Saavedra, C.E., Andrade, R.E. (2008). Mieloma múltiple en el Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá (1983-2006). *Acta Médica Colombiana*, 33(4).
- Seidman, H. (1970). Cancer death rates by site and sex for religious and socioeconomic groups in New York City. *Environ Res*. 3(3): 234 – 50.
- SEO, Sociedad Ecuatoriana de Oncología y Sociedad Ecuatoriana de Hematología. (2011). Guías Ecuatorianas: Diagnóstico y Tratamiento de Mieloma Múltiple. Quito.
- Smadja, N.V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D., Fruchart, C. (2001). Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*, 98(7), 2229-2238.
- Society American Cancer. (2010). Mieloma Múltiple. *American Cancer Society* .  
Recuperado el 08/03/2014, de  
<http://www.cancer.org/espanol/cancer/mielomamultiple/>
- Stella, F., Pedrazzini, E., Rodríguez, A., Baialardo, E., Kusminsky, G., Arbelbide, J., Fantl, D.B., Slavutsky, I. (2011). New recurrent chromosome alterations in patients with multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Cytogenetic and Genome Research*, 134(4), 249-259.

- Stella, F., Weich, N., Panero, J., Fantl, D. B., Schutz, N., Fundia, A. F., Slavutsky, I. (2013). Glutathione S- transferase P1 mRNA expression in plasma cell disorders and its correlation with polymorphic variants and clinical outcome. *Cancer Epidemiol.* 37 (5): 671-4.
- Sun, T., Miao, X., Wang, J., Tan, W., Zhou, Y., Yu, C., & Lin, D. (2004). Functional Phe31Ile polymorphism in Aurora A and risk of breast carcinoma. *Carcinogenesis.* 25(11): 2225–30. doi:10.1093/carcin/bgh244.
- Tchatchou, S., Wirtenberger, M., Hemminki, K., Sutter, C., Meindl, A., Wappenschmidt, B., Burwinkel, B. (2007). Aurora kinases A and B and familial breast cancer risk. *Cancer letters*, 247(2), 266-272.
- Tomotoshi, M., Dongwei, Z., Hideyuki, S. (2005).Aurora-A - A guardian of poles. *NatureReviewsCancer*. Recuperado el 26 de Junio del 2014, de <http://www.nature.com/nrc/journal/v5/n1/full/nrc1526.html>
- Viedma, J.A. (2005). Aspectos clínicos y de laboratorio de las proteínas de bence jones. *Educación continuada en el laboratorio clínico*.Recuperado el2014, de <http://www.google.com.ec/url>
- Walker, B.A., Leone, P.E., Jenner, M.W., Li, C., Gonzalez, D., Johnson, D.C., Ross, F.M., Davies, F.E., Morgan, G.J. (2006). Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 108(5), 1733-1743.
- Waxman, A.J., Mink, P.J., Devesa, S.S., Anderson, W.F., Weiss, B.M., Kristinsson, S.Y., McGlynn, K., Landgren, O. (2010). Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study. *Blood*, 116(25), 5501-5506.
- Weber, N., (2012)
- Wuilleme, S., Robillard, N., Lode, L., Magrangeas, F., Beris, H., Harousseau, J.L., Proffitt, J., Minvielle, S., Avet-Loiseau, H. (2005).Ploidy, as detected by fluorescence in

situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia*, 19(2), 275-278.

Zandecki, M., Lai J.L., Falcon T. (1996). Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *British Journal of Haematology*, 94, 217-227.

## ANEXOS

### Anexo 1. Operacionalización de las variables.

Variable Dependiente	Definición	Indicador	Instrumento de medida
Estadío de Mieloma Múltiple	El estadío permite identificar en qué fase de la enfermedad se encuentra el paciente, se establece con las manifestaciones clínicas y la masa tumoral de las células plasmáticas.	<p>Estadio I (&lt; 0,6 x 10<sup>12</sup> células/m<sup>2</sup>)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hemoglobina mayor de 10 g/dL</li> <li>2. Calcio sérico menor de 12 mg/dL</li> <li>3. Componente monoclonal de baja producción: IgG menor de 5 g/dl; IgA menor de 3 g/dl y cadenas livianas en orina menor de 4 g en 24 horas o presencia de proteína de Bence-Jones.</li> <li>4. Plasmocitoma solitario.</li> <li>5. Ausencia de lesiones óseas.</li> </ol> <p>6. Estadio II (no cumple los criterios del estadio I y II y una masa tumoral 0,6 a 1,2 x 10<sup>12</sup> células/m<sup>2</sup>).</p> <p>Estadio III (&gt; 1,2 x 10<sup>12</sup> células/m<sup>2</sup>).</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hemoglobina menor de 8,5 g/dL</li> <li>2. Calcio sérico mayor de 12 mg/dL</li> <li>3. Componente monoclonal de alta producción: IgG mayor de 7 g/dL; IgA mayor de 5 g/dL y cadenas livianas en orina mayor de 12 g en 24 horas.</li> <li>4. Lesiones osteolíticas severas.</li> </ol> <p>Existe una subclasificación de los estadios en:</p> <p>A: cuando la creatinina sérica es menor de 2 mg%, o</p> <p>B: cuando es mayor de 2 mg/dL</p>	Valores Obtenidos de Laboratorio Clínico y exámenes médicos

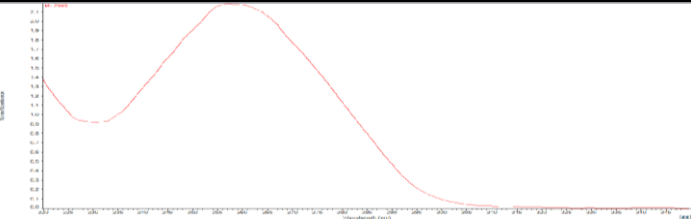
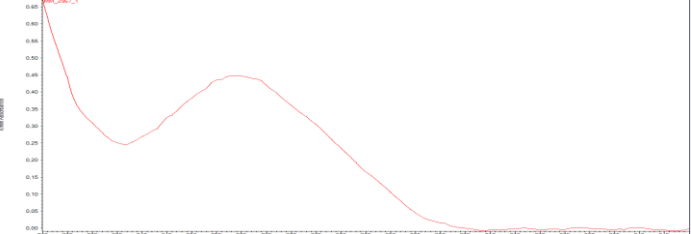
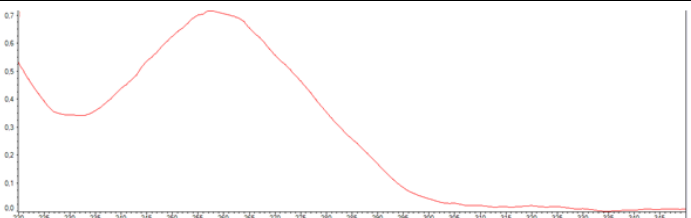
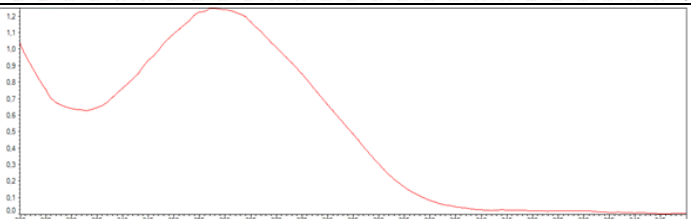
<b>Variable Independiente</b>	<b>Definición</b>	<b>Indicador</b>	<b>Instrumento de medida</b>
Mieloma Múltiple	Es un tipo de cáncer hematológico en donde se encuentran gran cantidad de células plasmáticas maduras infiltrando en la médula ósea.	Número de pacientes diagnosticados de mieloma múltiple en el Hospital Carlos Andrade Marín.	Cumplimiento de criterios antes del diagnóstico. Realización de pruebas de laboratorio: hemoglobina, recuento de glóbulos blancos, plaquetas, urea, creatinina, calcio, albumina, LDH, beta 2 microglobulina, PCR, electroforesis de proteínas, cadenas ligeras en suero y orina, proteinuria Bence- Jones, grado de afectación ósea, citogenética, citología.

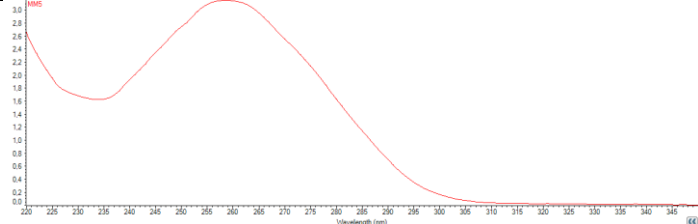
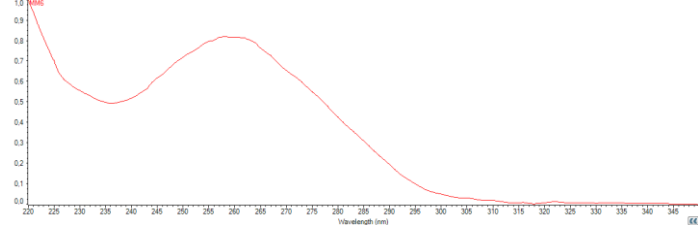
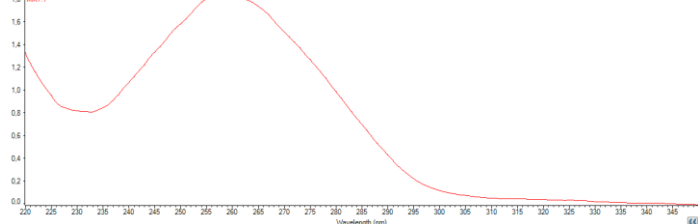
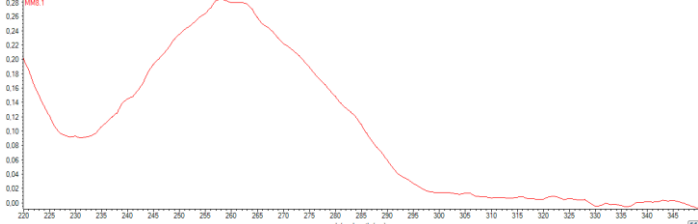
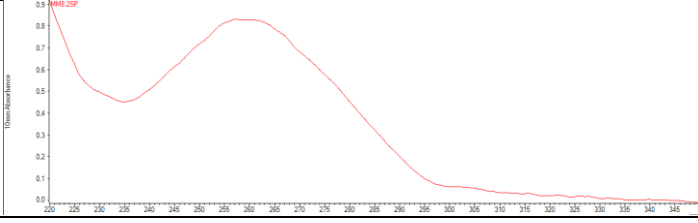
<b>VARIABLES MODERADORAS</b>	<b>Definición</b>	<b>Indicador</b>	<b>Categorías/Escala</b>	<b>Instrumento de medida</b>
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la actualidad	Años	Menos de 60 años 60-64 años 65-69 años 70-74 años Más de 75 años	Historia Clínica – Encuesta
Sexo	Conjunto de características físicas, biológicas, anatómicas y fisiológicas de los seres humanos, que los definen como hombre o mujer.	Género	Femenino  Masculino	Historia Clínica

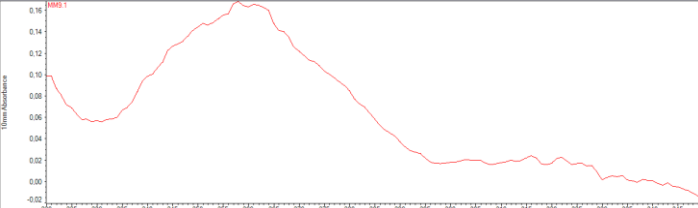
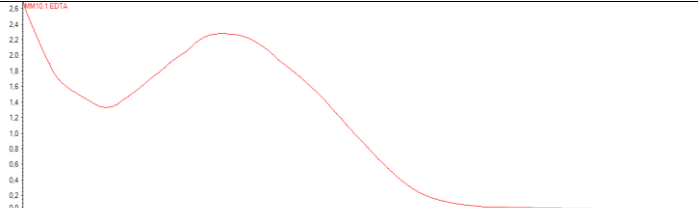
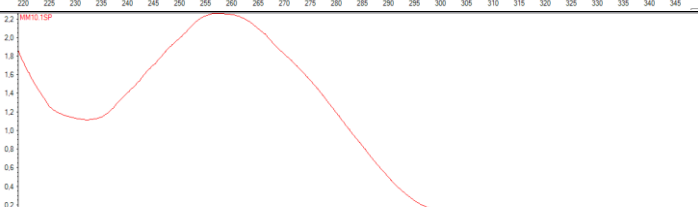
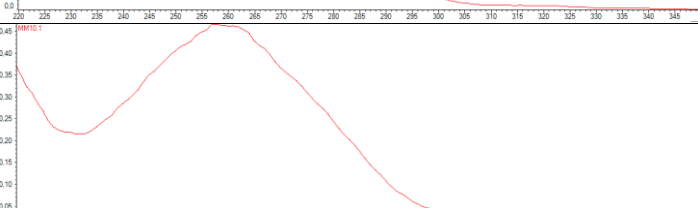
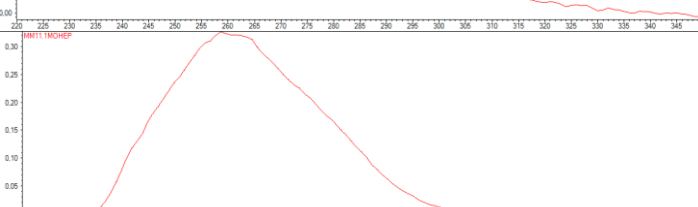
Hemoglobina	Es una proteína presente dentro de los glóbulos rojos, gracias a la cual se puede medir la capacidad transportadora de oxígeno de la sangre.	Varones: 23,3 – 17,7g/dl Mujeres 11,7 – 15,7 g/dl	Biometría Hemática
Glóbulos Blancos	Células presentes en la sangre encargadas de efectuar una respuesta inmunitaria.	Varones: 3,9 – 10,6x10 <sup>3</sup> /ul Mujeres: 3,5 – 11,0x10 <sup>3</sup> /ul	Biometría Hemática
Plaquetas	Fragmentos que se obtienen de la liberación del citoplasma de los megacariocitos, su función es la formación de coágulo,	Varones: 150 – 440x10 <sup>3</sup> /ul Mujeres: 150 – 440x10 <sup>3</sup> /ul	Biometría Hemática
Neutrófilos	Constituyen un tipo de Glóbulo blanco es el encargado de iniciar procesos inflamatorios, destruir y fagocitar las bacterias.	Varones: 40 – 65% Mujeres: 40 – 65%	Biometría Hemática
Linfocitos	Son un tipo de glóbulos blancos, son de dos tipos linfocitos B y los Linfocitos T, la función de los linfocitos B es la de elaborar anticuerpos y los linfocitos T destruyen células tumorales.	Varones: 20 – 40% Mujeres: 20-40%	Biometría Hemática

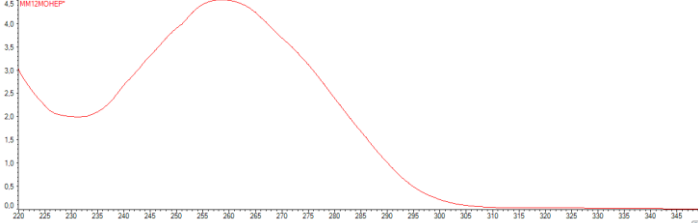
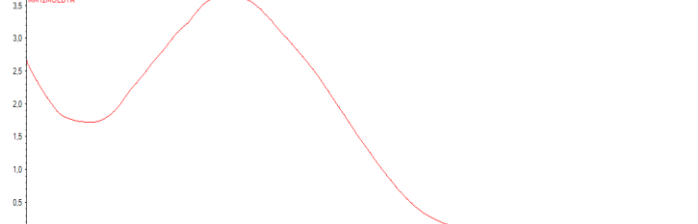
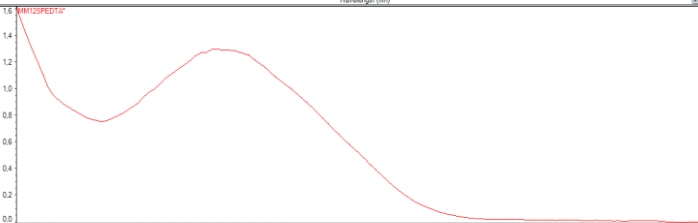
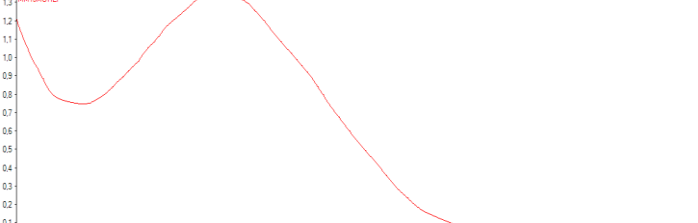
Urea	Final del metabolismo de las proteínas se produce en el hígado de los seres humanos a partir del amoníaco.	hasta 40 mg/dl	Química y Enzimas Sanguíneas
Creatinina	Producto que se degrada de creatina que es un compuesto importante en el músculo por esta razón la excreción de creatinina depende de la masa corporal de cada individuo.	Varones: 0-1,5 mg/dl Mujeres: 0-1,3 mg/dl	Química y Enzimas Sanguíneas
Calcio	Mineral de gran importancia en el organismo ya que es indispensable para realizar numerosas funciones entre ellas: construcción y mantenimiento de los Huesos, regulación del ritmo de corazón, transmite impulsos nerviosos, interviene en la coagulación sanguínea.	8-10 mg/dl	Química y Enzimas Sanguíneas
Albumina	Proteína que se encuentra en el plasma, con importantes funciones, a nivel osmótico, transporte de sustancias.	2,8-5,5 g/dl	Química y Enzimas Sanguíneas
LDH	Enzima que constituye parte del corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos en el cerebro y en los pulmones, su función es la de catalizar la oxidación de L- Lactato a piruvato.	197-416 IU/l	Química y Enzimas Sanguíneas
Beta 2 microglobulina	Proteína constituyente de la membrana de las células, se libera cuando la célula muere, cuando existen valores elevados de esta proteína es un significativo de una muerte anormal.	1,010-1,730 ng/ml	Marcadores Tumorales
PCR	Proteína C reactiva. Proteína plasmática circulante producida por el hígado, se eleva cuando existe una inflamación a nivel de todo el cuerpo.	Positiva Negativa	Inmunología
Electroforesis de Proteínas	La electroforesis de proteínas es una metodología que permite separar las proteínas presentes en suero, orina u otros líquidos biológicos. En esta técnica es necesaria la utilización de corriente eléctrica para desplazar las proteínas en una capa fina de agar, La distancia recorrida de cada proteína depende de su tamaño, su carga eléctrica y su forma.	Proteína total: 6,4 a 8,3 g/dL Albumina: 3,5 a 5,0 g/dL Alfa-1 globulina: 0,1 a 0,3 g/dL Alfa-2 globulina: 0,6 a 1,0 g/dL Beta globulina: 0,7 a 1,2 g/dL Gammaglobulina: 0,7 a 1,6 g/dL	Inmunología
Cadenas ligeras en suero y orina	Las cadenas ligeras junto a las cadenas pesadas dan lugar a anticuerpos, una pequeña parte de las cadenas kappa y lambda constituyentes de las cadenas ligeras pueden circular libremente en el plasma, cuando las cantidades de cadenas ligeras libres sobrepasan los límites de referencia se trata de una proliferación de un clon de célula plasmática.		
Proteinuria Bence- Jones	Es detectada en Orina y en sangre en Pacientes que tienen Mieloma Múltiple, es una proteína constituida por cadenas ligeras o fragmentos de una molécula de globulina gamma.	< 80 mg por día	Urianálisis
FISH	La Técnica de Hibridación In Situ Fluorescente consiste en identificación de secuencias de ADN mediante sondas fluorescentes sobre cromosomas o núcleos celulares.	Número de señales fluorescentes	Genética

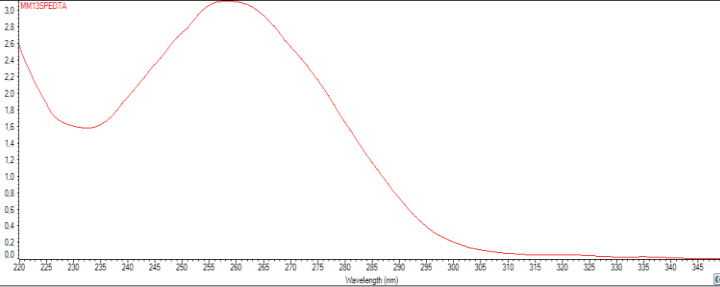
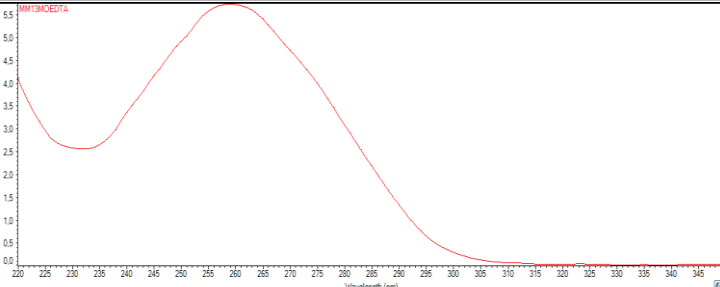
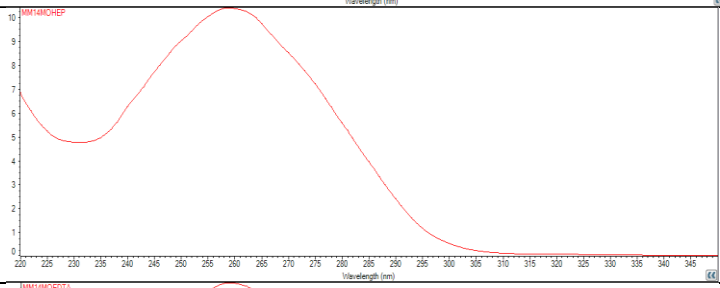
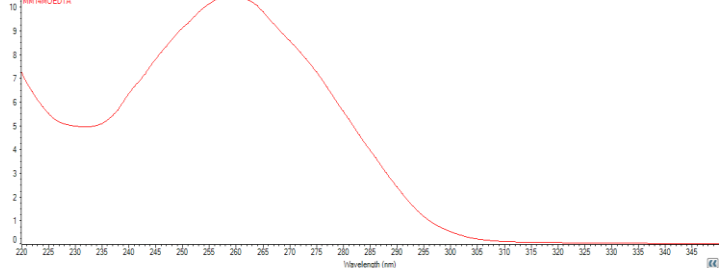
**Anexo 2. Cuantificación del ADN del total de pacientes con Mieloma múltiple.**

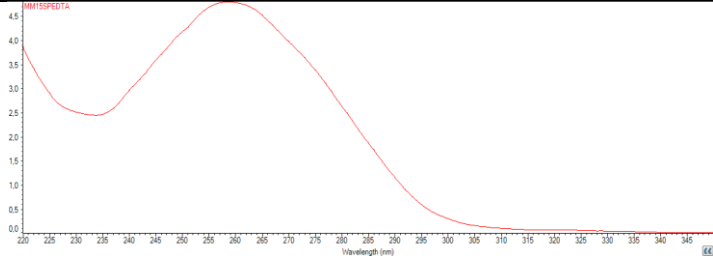
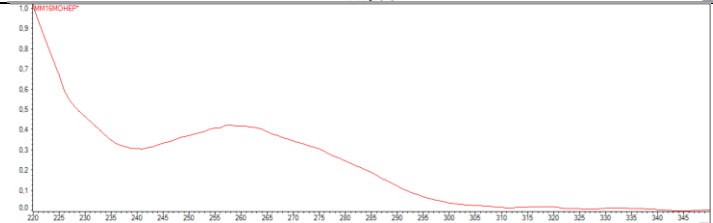
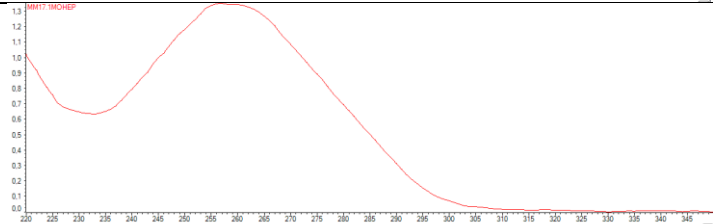
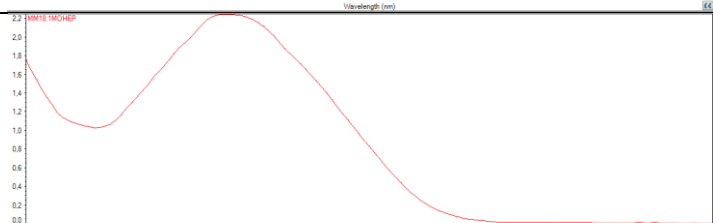
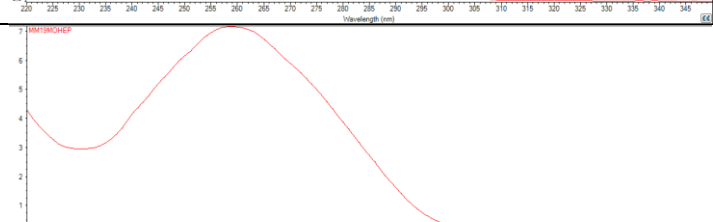
	N° Casos	Imagen	Concentración ng/uL	A 260/280	A 260/230
MM1	2949		108,7	1,92	2,38
MM2	2967		22,3	1,89	1,44
MM3	2932		35,2	1,99	2,06
MM4	2972		61,9	1,87	1,95

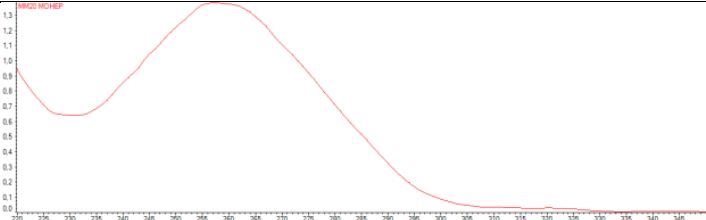
MM5	2985		157	1,93	1,87
MM6	2988		40,7	1,92	1,47
MM7	2994		91,3	1,86	2,25
MM8	3001		18,3	1,97	2,19
MM8sp	3001		41,3	1,83	1,67

MM9	3002		13,6	1,6	1,07
MM10M O EDTA	3004		113,3	1,82	1,5
MM10S P	3004		112,3	1,83	1,98
MM10M O HEP	3004		37,3	1,78	0,97
MM11M O HEP	3017		27,5	1,76	0,69

MM12M O HEP	3038		224,9	1,88	2,26
MM12M O EDTA	3038		151,6	1,89	2,04
MM12S P EDTA	3038		64,4	1,87	1,51
MM13M O HEP	3059		66,8	1,89	1,77

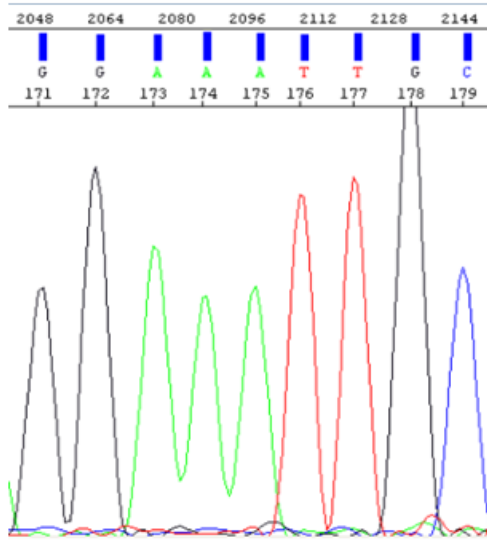
MM13S P EDTA	3059		155,1	1,89	1,95
MM13M O EDTA	3059		285,9	1,86	2,23
MM1M O HEP	3058		518	1,86	2,18
MM14M O EDTA	3058		521,5	1,87	2,11

MM15S PEDTA			239,1	1,82	1,91
MM16M O HEP	3080		20,7	1,72	0,9
MM17M O HEP	3093		67,1	1,94	2,09
MM18M O HEP	3090		111,7	1,91	2,11
MM19M O HEP	3110		356,7	1,85	2,39

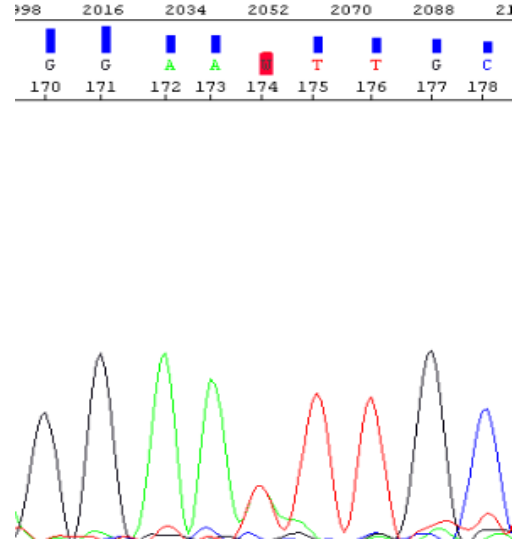
MM20M O HEP	3123		68,7	1,94	2,16
----------------	------	--	------	------	------



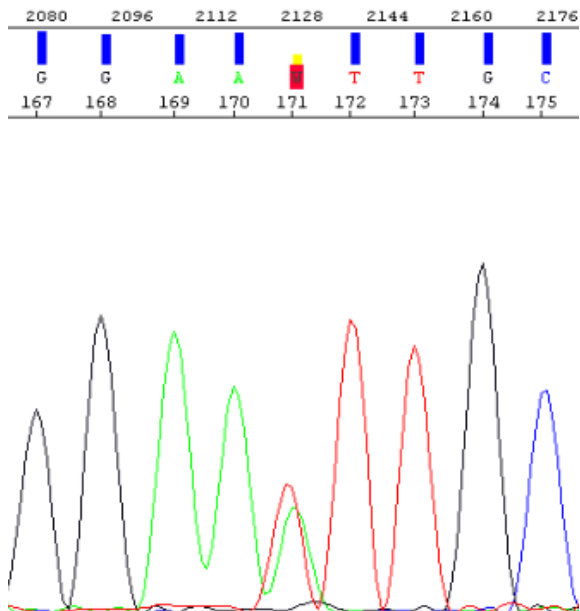
AURKA MM5 RV



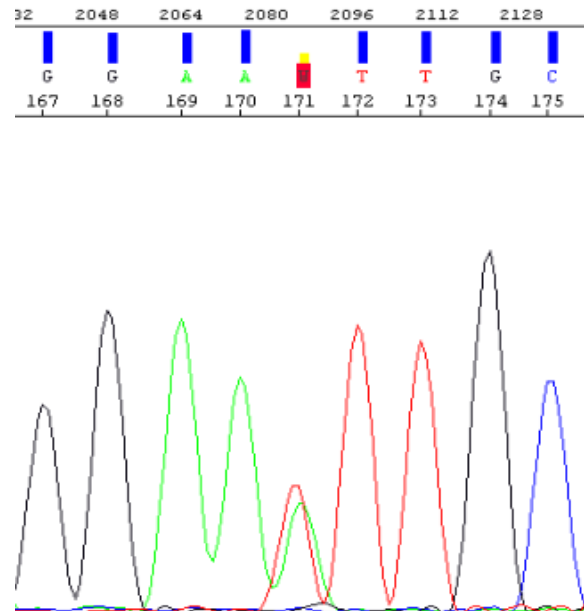
AURKA MM6



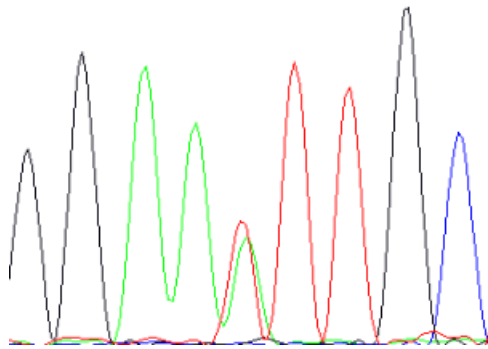
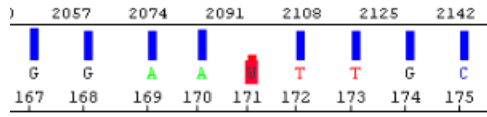
AURK MM7



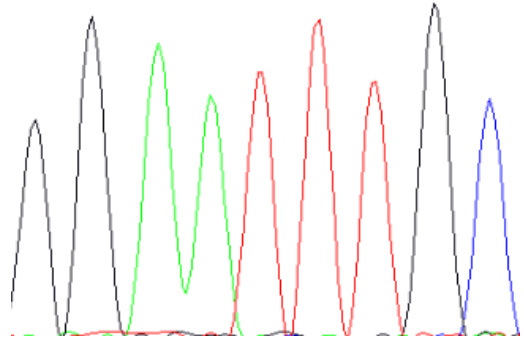
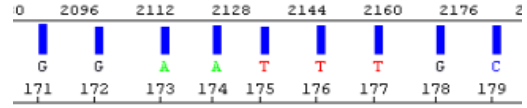
AURKA MM8



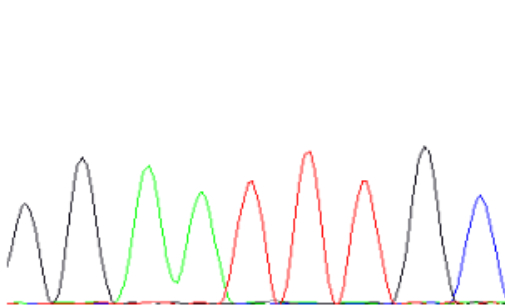
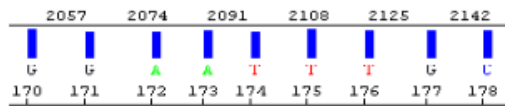
### AURKA MM9



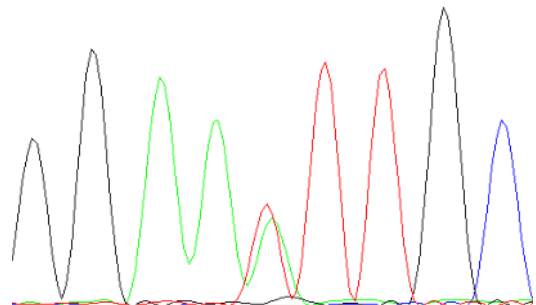
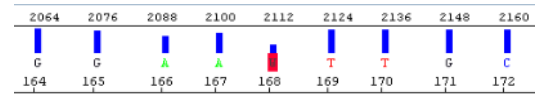
### AURKA MM10



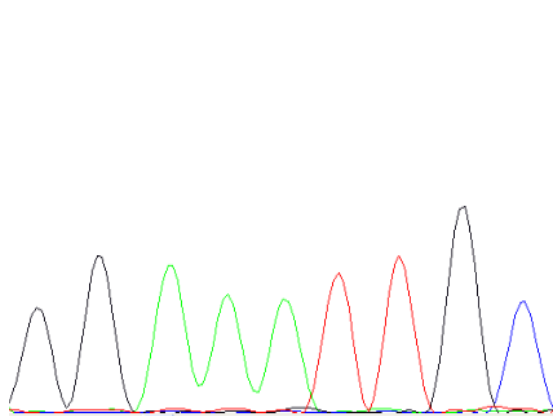
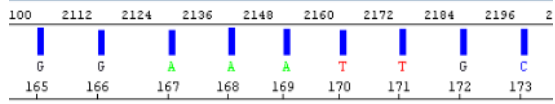
### AURKA MM10.SP



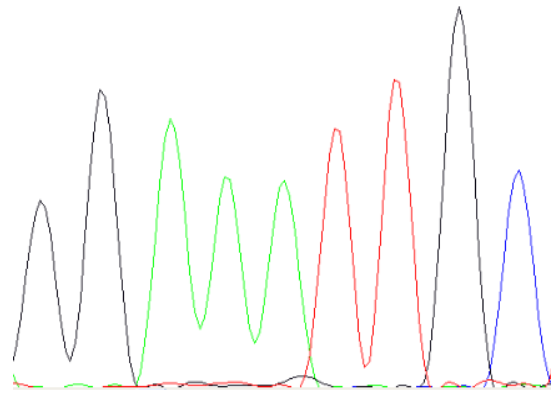
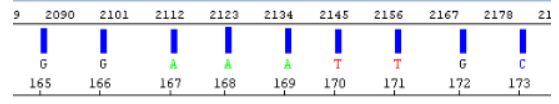
### AURKA MM11



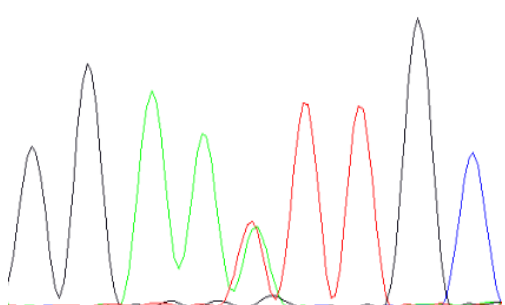
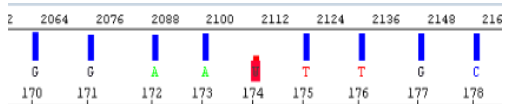
### AURKA MM12



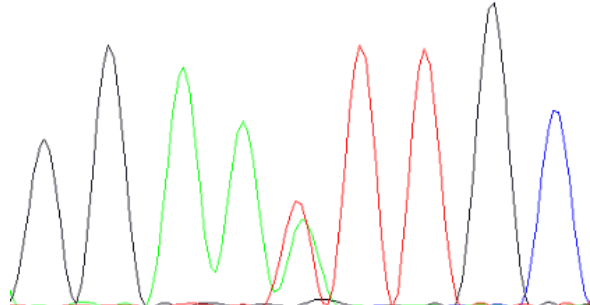
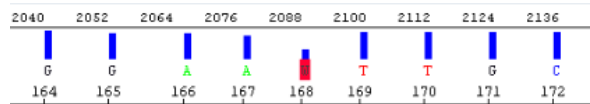
### AURKA MM12SP



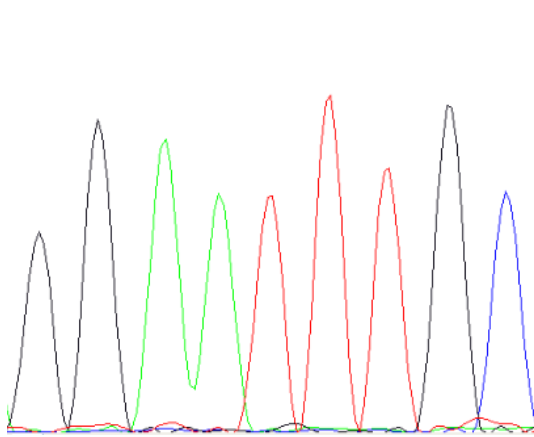
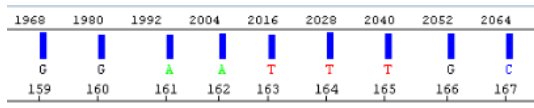
### AURKA MM13



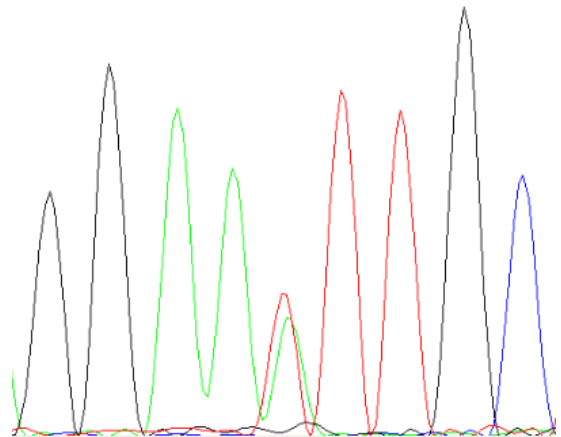
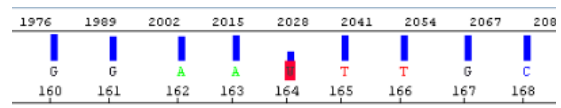
### AURKA MM13SP



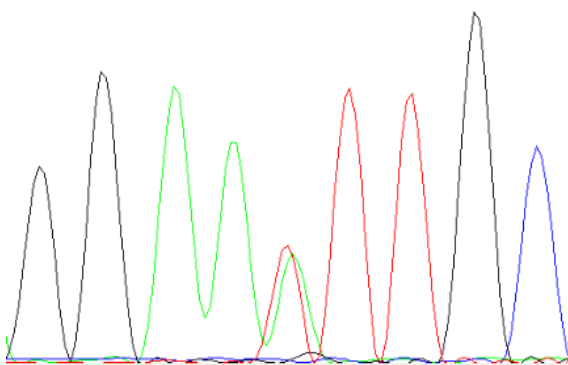
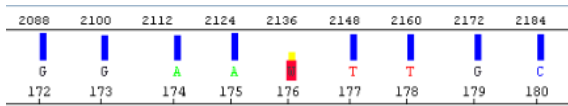
### AURKA MM14



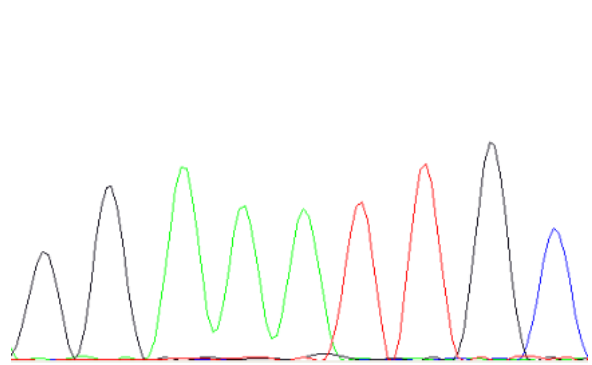
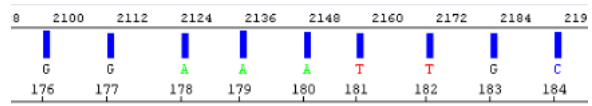
### AURKA MM15SP



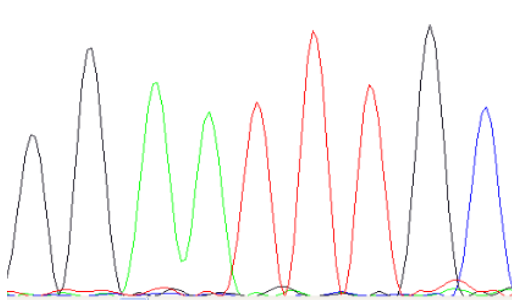
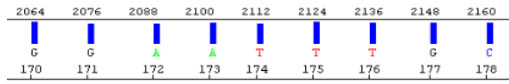
### AURKA MM16



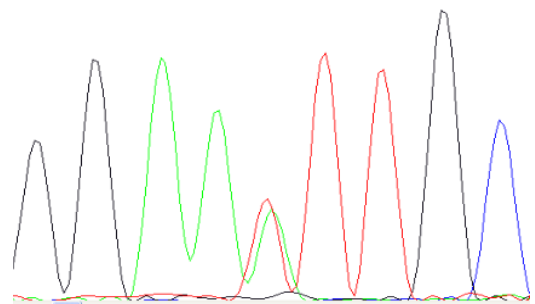
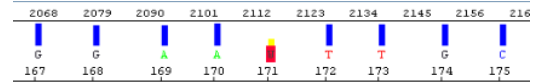
### AURKA MM17



### AURKA MM18

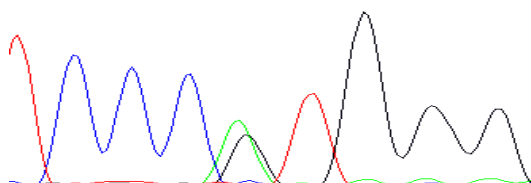
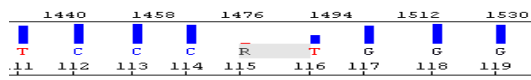


### AURKA MM19

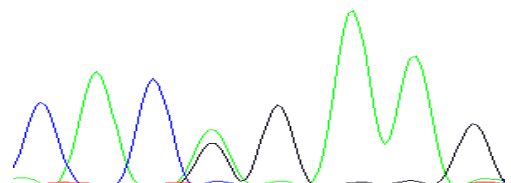
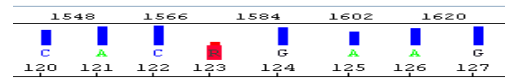


## AURORA B SECUENCIAS

### AURKB MM1 POL2



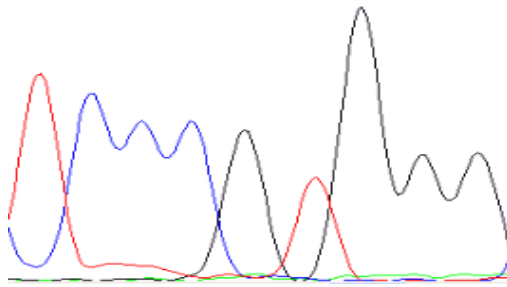
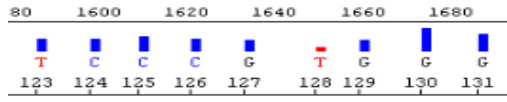
### AURKB MM1 POL1



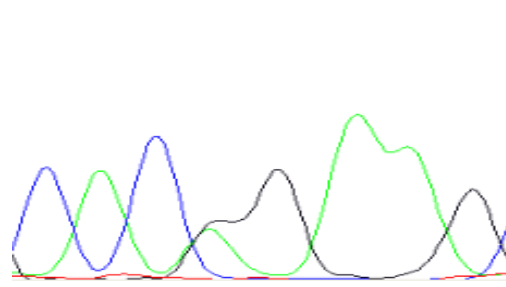
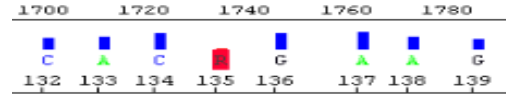




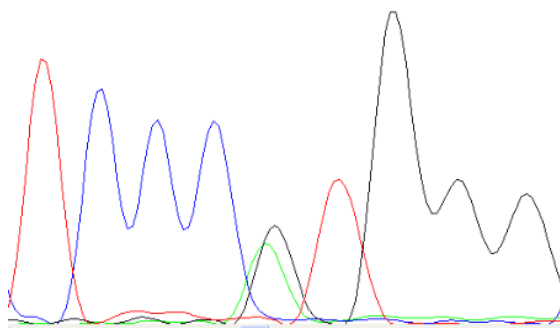
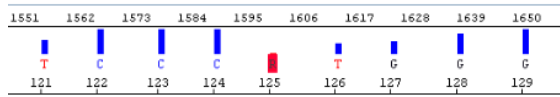
AURKB MM6 POL2



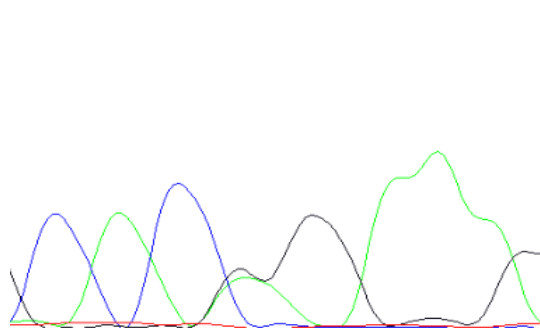
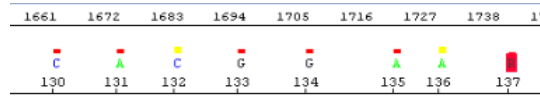
AURKB MM6 POL1



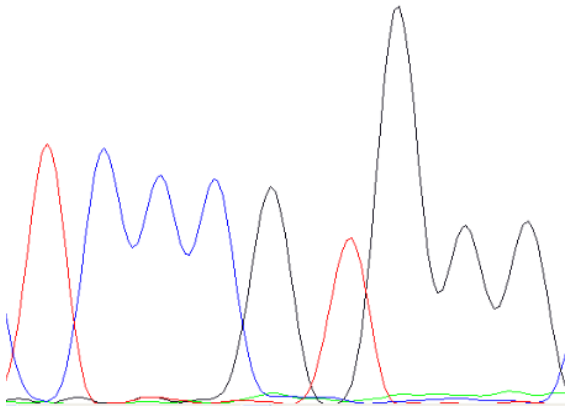
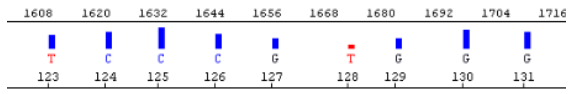
AURKB MM7 POL2



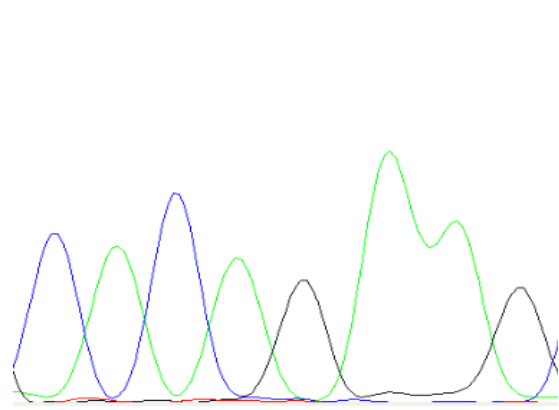
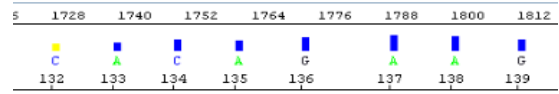
AURKB MM7 POL1



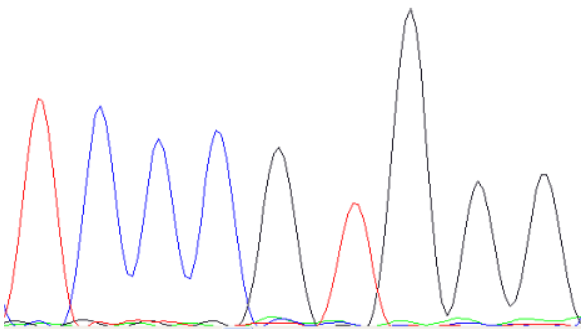
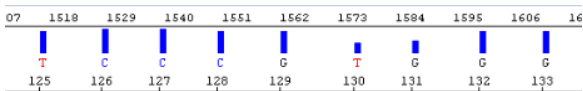
### AURKB MM8 POL2



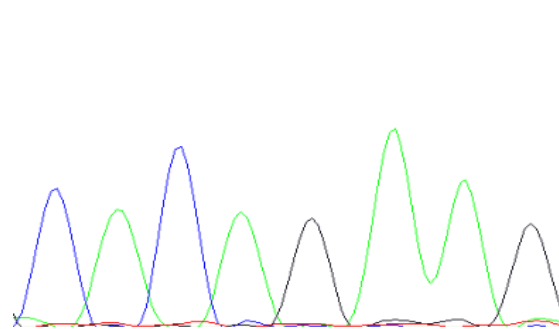
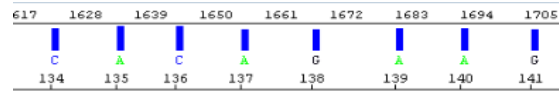
### AURKB MM8 POL1



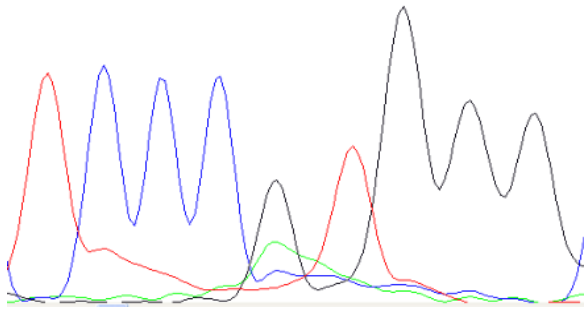
### AURKB MM8.SP POL2



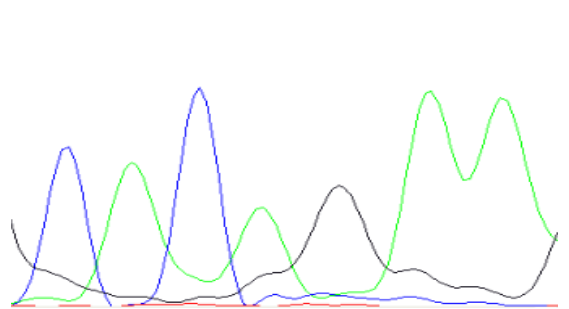
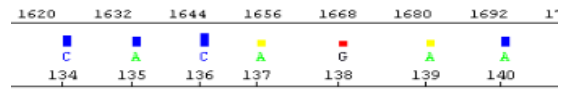
### AURKB MM8.SP POL1



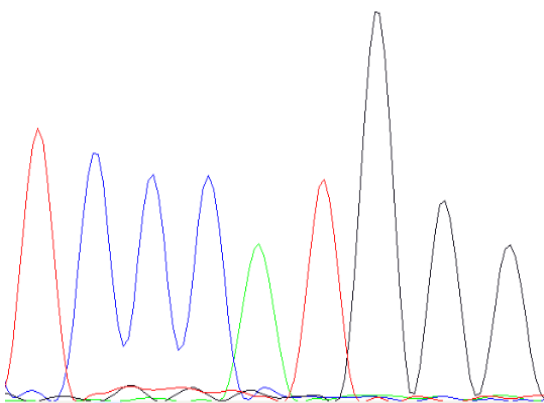
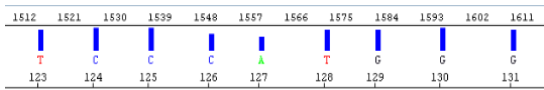
### AURKB MM9 POL2



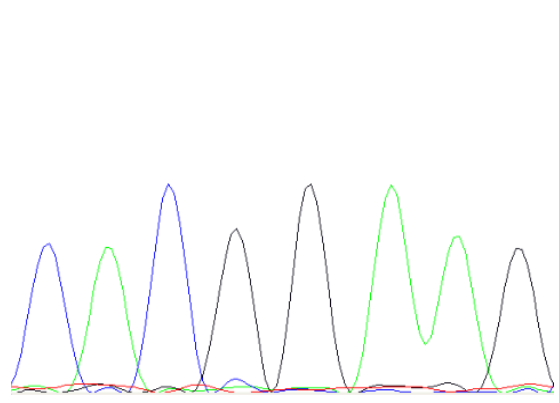
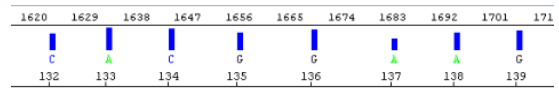
### AURKB MM9 POL1



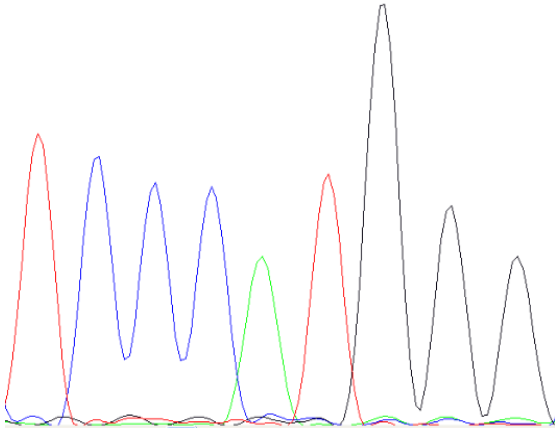
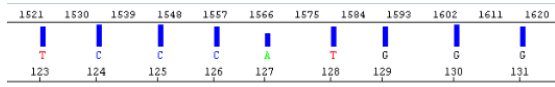
### AURKB MM 10 POL2



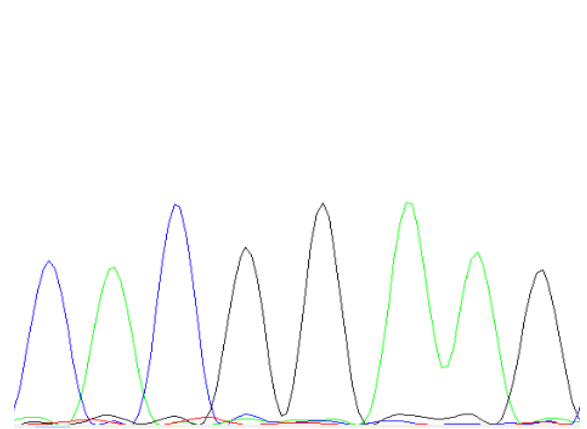
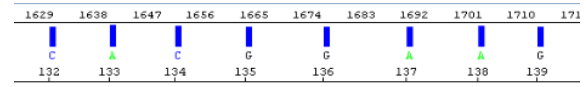
### AURKB MM10 POL1



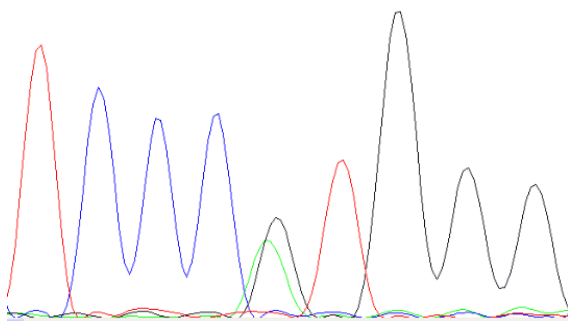
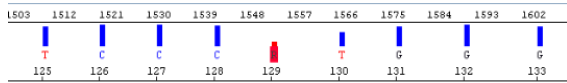
### AURKB MM 10 SP POL2



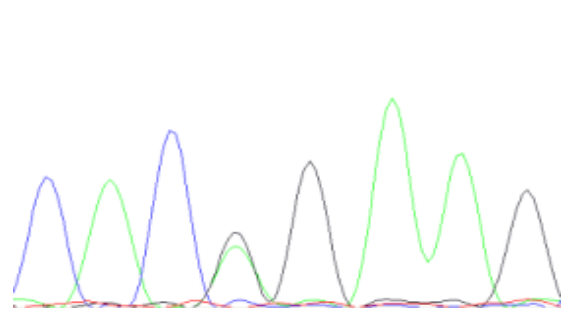
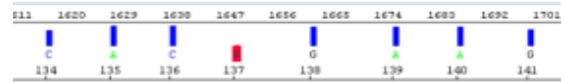
### AURKB MM10 SP POL1



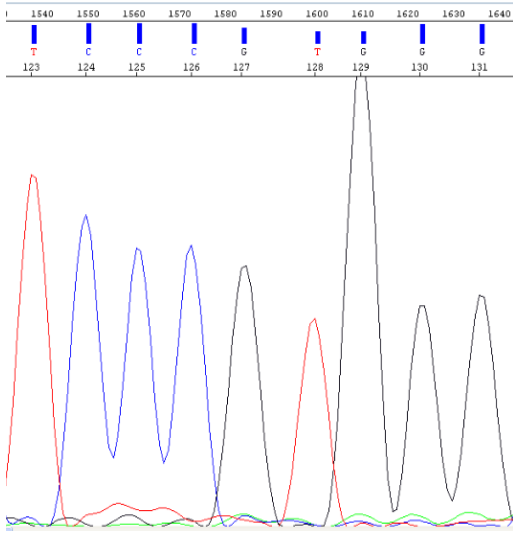
### AURKB MM 11 POL2



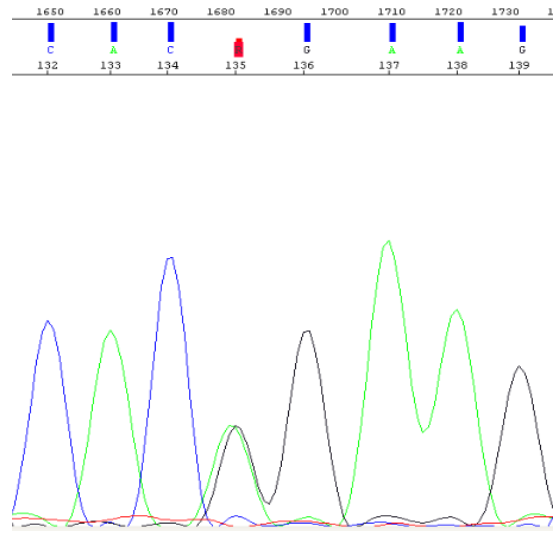
### AURKB MM11 POL1



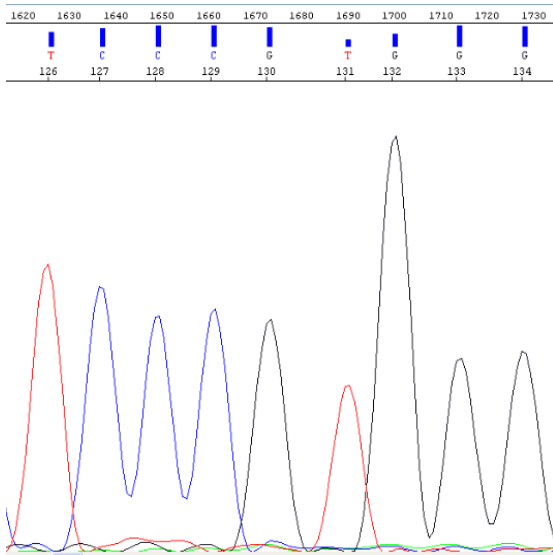
### AURKB MM12 POL2



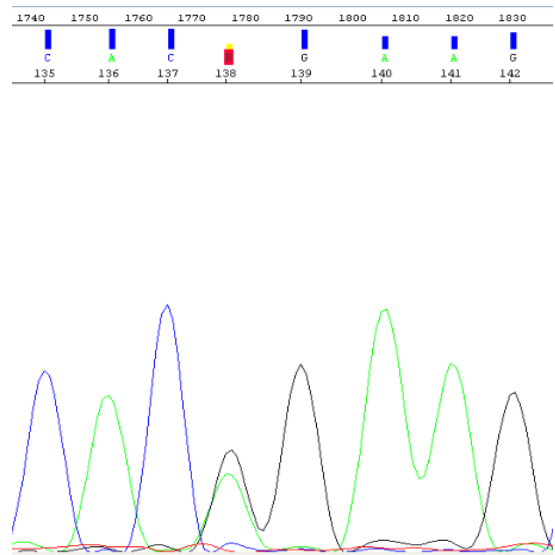
### AURKB MM12 POL1



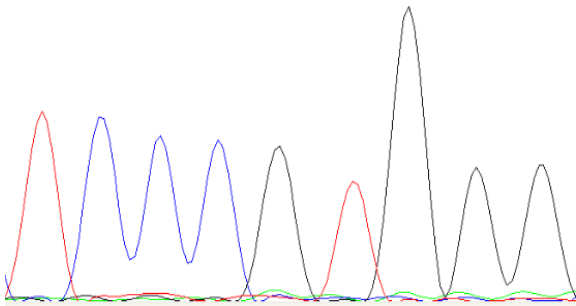
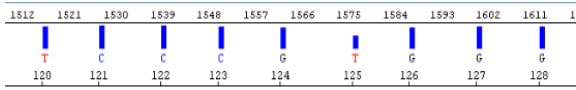
### AURKB MM12.SP POL2



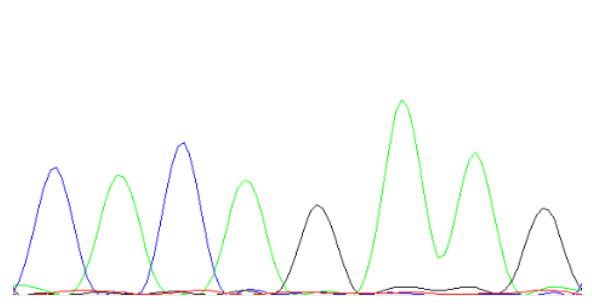
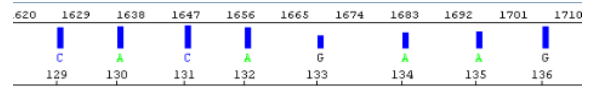
### AURKB MM12.SP POL1



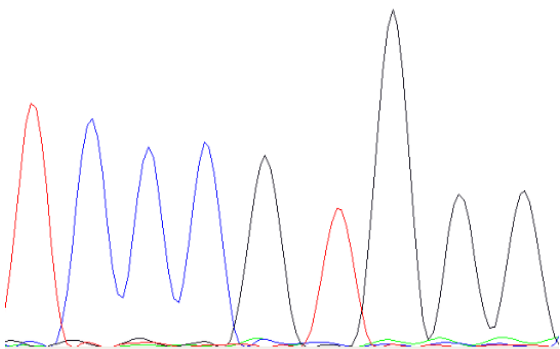
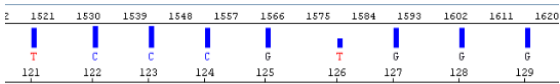
### AURKB MM13 POL 2



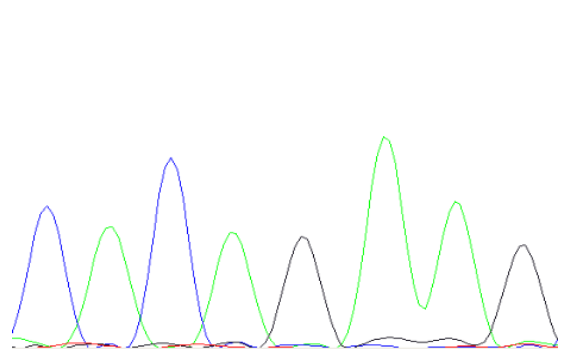
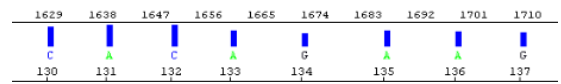
### AURKB MM13 POL1



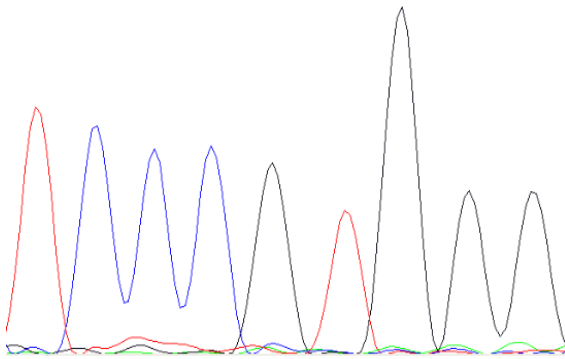
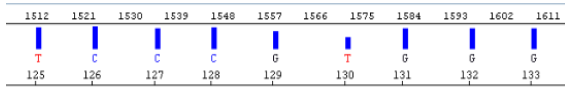
### AURKB MM13.SP POL2



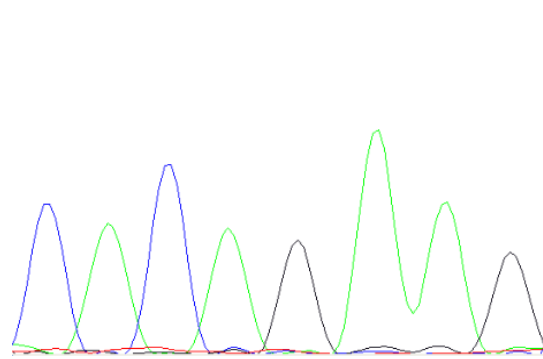
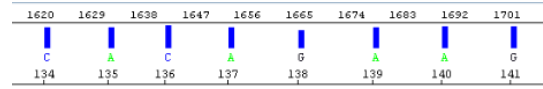
### AURKB MM13.SP POL1



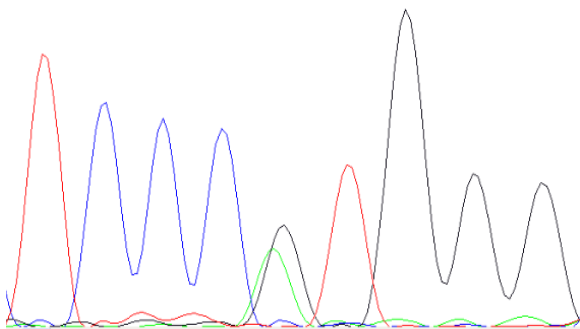
### AURKB MM14 POL2



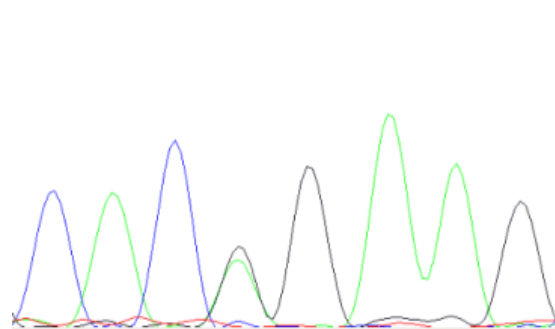
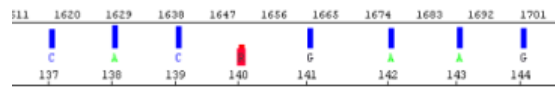
### AURKB MM14 POL1



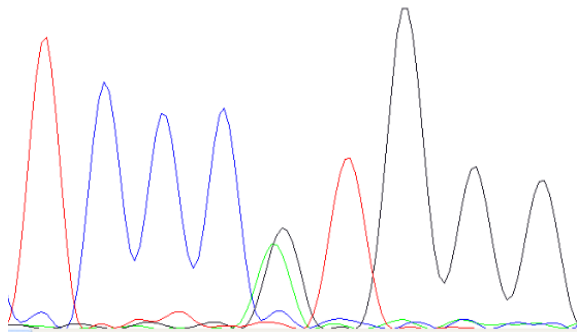
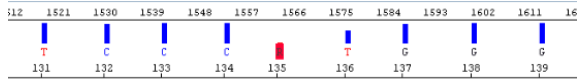
### AURKB MM15 SP POL2



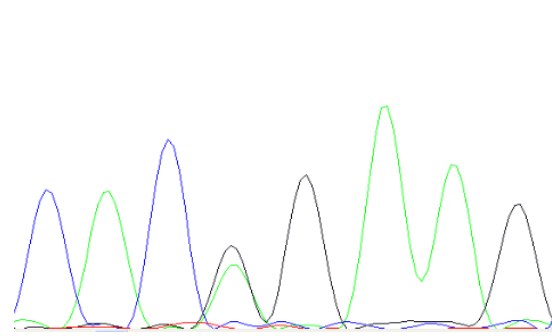
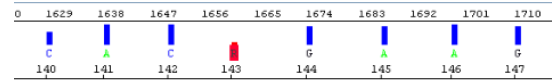
### AURKB MM15 SP POL1



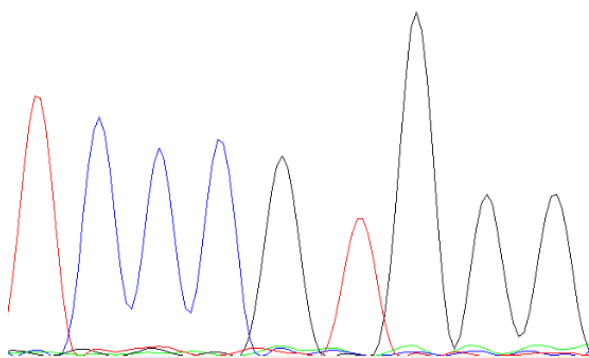
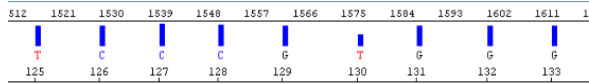
### AURKB MM16 POL2



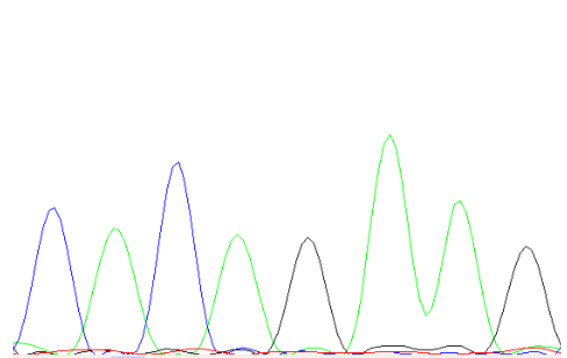
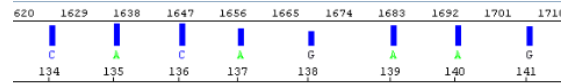
### AURKB MM16 POL1



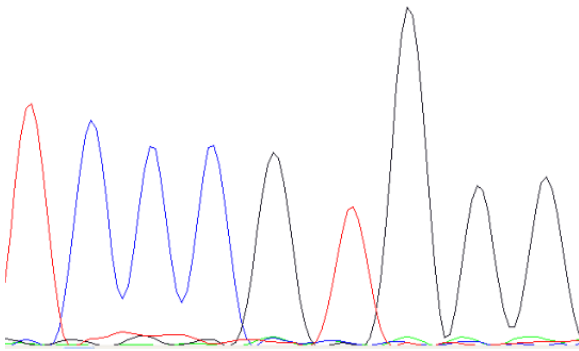
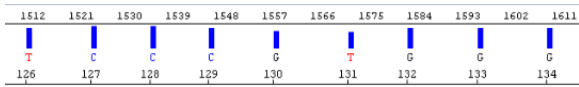
### AURKB MM17 POL2



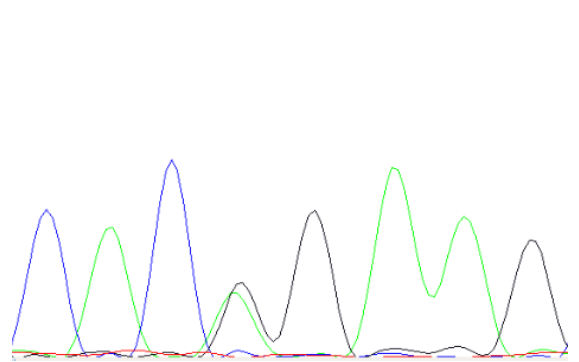
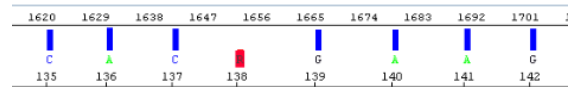
### AURKB MM17 POL1



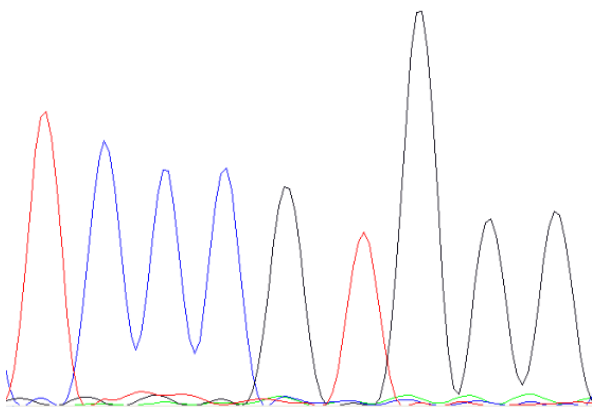
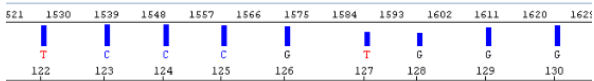
### AURKB MM18 POL2



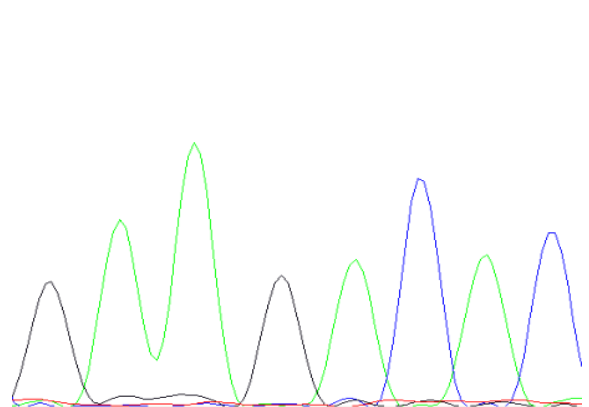
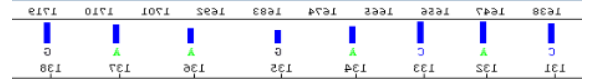
### AURKB MM18 POL1



### AURKB MM19 POL2



### AURKB MM19 POL1



## Anexo 4. Protocolo de trabajo establecido entre el IIB y el HCAM.

### PROTOCOLO PARA EL ESTUDIO DE MGUS-SM-MM-LCP

Como parte de la colaboración establecida entre el Laboratorio Clínico - Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) y el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad de las Américas (UDLA), se realizará la investigación sobre el *GENOMA DEL MIELOMA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DE LA CÉLULA PLASMÁTICA NORMAL A LA CÉLULA PLASMÁTICA TUMORAL*.

#### Objetivo

Caracterizar mecanismos y genes implicados en la patogénesis de Mieloma Múltiple utilizando un análisis integrado de Citogenética y Biología Molecular. Se necesitan las muestras y datos clínicos de pacientes y el IIB realizará los estudios genéticos con los siguientes análisis:

1. Área de Citogenética: Citogenética convencional y FISH.
2. Área de Biología Molecular: Arrays de mapeo.

#### Preparación de muestras

#### Consentimiento

Las muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes diagnosticados con Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (GMSI, en inglés: MGUS), mieloma quiescente (en inglés: smoldering mieloma), mieloma múltiple y leucemia de células plasmáticas serán obtenidas después del consentimiento informado de los pacientes.

#### Toma de la muestra

Las muestras serán obtenidas al momento del diagnóstico (antes de comenzar el tratamiento). También se tomarán las muestras en recaída de pacientes que tengamos la muestra al diagnóstico.

#### Sangre periférica

Se tomará **2-5 ml** de sangre periférica en **heparina** para los estudios citogenéticos y **2-5 ml** de sangre periférica en **EDTA** para los estudios moleculares. Se empleará una solución de lisis y se conservarán las células blancas a -80°C hasta la extracción de ADN.

#### Médula ósea

Se tomará **2-5 ml** de médula ósea en **heparina** para los estudios citogenéticos y **2-5 ml** de médula ósea en **EDTA** para los estudios moleculares. Se seleccionarán las células CD138+.

#### Forma de envío de la muestra

Una vez recogidas las muestras de sangre periférica y médula ósea (ambas recogidas con heparina y EDTA) comunicarse con el IIB (tel. 2397000). Los envíos de muestras obtenidas en el mismo día deberán hacerse a temperatura ambiente. En casos excepcionales, si el envío se realizara al día siguiente, la muestra se mantendrá refrigerada y el envío se hará en hielo (4°C). ¡NO CONGELAR!

#### Protocolo en el IIB

##### Selección de células

Las células plasmáticas serán seleccionadas con una pureza mayor al 90% utilizando las perlas magnéticas CD138+ o el separador magnético (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Germany).

##### Estudios genéticos

Se realizarán los análisis de citogenética y biología molecular según metodología estándar.

##### FISH

Los análisis de FISH se realizarán en células plasmáticas CD138+ seleccionadas. Los casos se clasificarán de acuerdo a las siguientes alteraciones: presencia de alguna translocación *IgH* e hiperdiploidía, además se determinará el estado de *RB* y *p53*.

#### Almacenamiento de ADN y ARN

Las células seleccionadas, de las que se extraerá ADN y ARN, se pondrán en buffer RLT según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA) inmediatamente después de la selección.

#### Extracción de ADN y ARN

El ADN y el ARN se extraerán utilizando kits comerciales (RNA/DNA mini kit or Allprep kit, Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

#### ADN constitucional

El ADN constitucional de cada paciente se extraerá de sangre periférica, muestra tomada en el momento de la punción de médula ósea, utilizando Flexigene kit (Qiagen).

#### Medida de la calidad del ADN y ARN

La calidad y la cantidad de ADN y ARN será determinada empleando un espectrofotómetro ND-1000 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE) y un 2100 Bioanalyser (Agilent, Palo Alto, CA), respectivamente.

#### *Arrays de Mapeo genómico y de Expresión*

El ADN y el ARN se prepararán según el protocolo de Agilent para la hibridación en el array según las instrucciones del fabricante. Los arrays de mapeo y de expresión se escanearán en el Scanner de microarrays de Agilent.

#### Análisis de Datos

Los datos de los arrays de mapeo y de expresión serán extraídos con el software de Agilent Feature Extraction versión 8.5.

#### *Análisis del número de copias*

El análisis del número de copias cromosómicas se realizará con el programa Agilent's CGH analytics software. Se empleará como muestra control la muestra de sangre periférica correspondiente a cada paciente, la que servirá como referencia para calcular el número de copias en la muestra de tumor.

#### *Análisis de expresión*

El análisis de expresión se realizará con el programa GeneSpring versión 7.3.

#### Resultados

Los resultados de los estudios genéticos realizados en el IIB se discutirán periódicamente con el personal del HCAM y SOLCA con el fin de correlacionar los hallazgos genéticos con los datos clínicos. En toda publicación o comunicación de los resultados participará el personal de las tres instituciones participantes en este estudio.

**Anexo 5. Modelo del formulario de petición de realización de estudio genético.**

**FORMULARIO DE PETICION DE ESTUDIO GENETICO**

<b>DATOS PETICIONARIO</b>			
Hospital		Servicio	Fecha de envío
Nombre	Apellidos		Correo electrónico
Dirección			Ciudad
Provincia	Código Postal	Teléfono	Fax
<b>DATOS PACIENTE</b>			
Nombre	Apellidos		Sexo
			<input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> M
Fecha de nacimiento	No. Historia Clínica	No. Seguridad Social	
<b>DATOS MUESTRAS</b>			
Fecha de extracción	Hora de extracción	Tipo de muestra	
		Heparina sódica	<input type="checkbox"/> SP <input type="checkbox"/> MO
Observaciones sobre la extracción		EDTA	<input type="checkbox"/> SP <input type="checkbox"/> MO
<b>DATOS CLINICOS DEL PACIENTE</b>			
Diagnóstico	Otras pruebas realizadas		
Resumen Historia Clínica			

SP = sangre periférica, MO = médula ósea

## **Anexo 6. Documento explicativo con las condiciones de envío de muestras para la realización de los estudios de genética y biología molecular.**

### **ESTUDIO GENETICO**

#### **CONDICIONES GENERALES DE ENVÍO DE MUESTRAS**

La calidad y la exactitud de los resultados de las pruebas de laboratorio dependen altamente de la extracción apropiada, manejo y transporte de las muestras. En caso de no estar disponible, un sistema de recogida y transporte apropiado se puede proporcionar al Servicio que así lo requiera.

Las muestras deben ir acompañadas por una copia impresa del formulario de petición debidamente cumplimentado, y enviadas a:

Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad de las Américas, Calle José Queri S/N y Av. Granados, Bloque 5, 2º piso, Quito.

Las pautas siguientes ayudarán a asegurar la integridad de cada muestra recogida y remitida al BACM para su análisis:

#### **Contenedores**

Las muestras deben enviarse en contenedores adecuados que aseguren su integridad durante el transporte. El envío de muestras para diagnóstico debe cumplir el sistema de triple contenedor:

La muestra debe incluirse en un contenedor primario que debe ser hermético y a prueba de rotura. Debe rotularse correctamente, señalando el tipo de muestra, la procedencia anatómica si es preciso, el nombre y apellidos del paciente, su número de identificación, y la fecha y hora de la toma. No deben incluirse elementos punzantes o cortantes (por ejemplo, Agujas).

El contenedor primario debe ir envuelto en un protector físico adecuado (papel o papel de burbujas).

El contenedor primario debe incluirse en un contenedor secundario que podrá ser de cartón, plástico, etc., el cual debe rotularse correctamente con los datos del peticionario (remitente) y del destinatario (IIB).

Incluir el formulario de petición y el resto de la información que se considere necesaria.

En caso de no disponer de contenedores, el IIB puede proporcionárselos al Servicio.

## **Criterio para el Rechazo de Muestras**

Las muestras serán inspeccionadas a su llegada para comprobar su adecuación a los requisitos especificados en este documento. El Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) contactará al remitente, bien para corregir las deficiencias de información o en su caso descartar la muestra y solicitar una nueva.

Las causas más comunes de rechazo de muestras son las siguientes:

Paciente sin identificar (Nombre/ N° de Identificación).

Muestra inapropiada para el estudio requerido.

Día y hora de extracción de muestra no especificada.

Origen de la muestra sin especificar.

Volante de petición ilegible o incorrectamente cumplimentado.

Muestras de tejido fresco / fijado congeladas.

Muestras no enviadas en las condiciones requeridas.

Rotura de tubos / contenedores.

Contaminación externa evidente.

Sangre periférica coagulada.

Volumen insuficiente. Si no hay suficiente para varias peticiones se pedirá al clínico que especifique la prioridad de las mismas.

## **Formulario de Petición**

En el formulario de petición deben aparecer todos los datos necesarios para la identificación de la muestra y acompañada de información completa sobre el paciente, el espécimen y los estudios que se desean. Resumiendo, el formulario de petición debe incluir, con letra legible, la siguiente información:

Datos del médico solicitante / peticionario:

Nombre

Dos apellidos

Teléfono de Contacto

Dirección a la que enviar el informe

Correo electrónico

Hospital / clínica de procedencia

Servicio / Departamento

Datos del Paciente

Nombre

Dos apellidos

Sexo

Edad o preferentemente fecha de nacimiento

Nº Seguridad Social

Nº historia clínica

Datos de la Muestra

Tipo de muestra

Lugar anatómico de procedencia de las muestras

Fecha y hora de la toma

Datos Clínicos

Diagnóstico (no utilizar siglas)

Otros datos clínicos de interés

Otras pruebas realizadas (Citometría, FISH) que apoyan al diagnóstico

### **Requisitos y Condiciones de Envío de Muestras**

La entrega a tiempo y la notificación del envío son esenciales. Si necesita información adicional, por favor llame al teléfono +593 23970000.

## **Anexo 7. Modelo de Consentimiento Informado para este estudio.**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE**

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

#### **Importancia:**

El mieloma es una forma de cáncer de la médula ósea, en el que existe una proliferación anormal de células plasmáticas. Dichas células de la sangre producen los anticuerpos que nos defienden de infecciones y otras sustancias extrañas. Es una enfermedad relativamente frecuente que incide principalmente en personas mayores de 50 años y es responsable del 10% de los cánceres hematológicos.

El estudio de pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto, mieloma quiescente, mieloma múltiple y leucemia de células plasmáticas, que representan diferentes grados de malignidad, nos permitirá entender genéticamente la transformación de la célula plasmática normal a la célula plasmática tumoral. Correlacionaremos los resultados genéticos con la información clínica de los pacientes para identificar posibles factores de pronóstico, que nos permitan poder predecir el desarrollo de su enfermedad y la respuesta a diferentes tratamientos.

#### **Implicaciones para el donante/paciente:**

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente debe ser mayor de edad. En casos en que el donante/paciente es menor de edad, los padres/tutores legales actuarán como personas responsables.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- El estudio derivado carece de carácter lucrativo y será financiado con fondos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad de las Américas (UDLA).

- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

**Procedimiento para la obtención de muestra:**

Debido a la enfermedad que padece será necesario efectuarle unos análisis de médula ósea y de sangre periférica en función de su evolución, para conocer su respuesta al tratamiento y diagnosticar cualquier tipo de complicación que pudiera sucederle. Para poder llevar a cabo este estudio, necesitamos muestras de médula ósea y de sangre, y sería de gran utilidad que nos permitiera emplear una mínima parte de la médula y sangre que se le extraerá en los diferentes controles realizados. En ningún caso se le realizarán punciones específicamente para este estudio. Como le mencionamos, las muestras que utilizaremos para este estudio se obtendrán de los controles que usted necesita para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

**Riesgos de la investigación para el donante/paciente:**

El estudio para el que se solicita la donación voluntaria no acarrea ningún riesgo para donante/paciente.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de BACM en el teléfono: 23970000 o en el correo electrónico: [iib-udla@udla.edu.ec](mailto:iib-udla@udla.edu.ec)

**CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL  
PACIENTE**

Yo (Nombre y Apellidos).....

C.I.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
  
- He podido hacer preguntas sobre el estudio *GENOMA DEL MIELOMA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DE LA CÉLULA PLASMÁTICA NORMAL A LA CÉLULA PLASMÁTICA TUMORAL*.
  
- He recibido suficiente información sobre el estudio, *GENOMA DEL MIELOMA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DE LA CÉLULA PLASMÁTICA NORMAL A LA CÉLULA PLASMÁTICA TUMORAL*, he hablado con el profesional sanitario informador: .....

.....

- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
  
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales.

Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.

Deseo ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si                      No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

Cuando quiera

Sin tener que dar explicaciones

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

- Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado GENOMA DEL MIELOMA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DE LA CÉLULA PLASMÁTICA NORMAL A LA CÉLULA PLASMÁTICA TUMORAL.*

Paciente (o representante legal en su caso)  
informador

Profesional sanitario

Fdo: Nombre y apellidos: .....

Fdo: Nombre y apellidos: .....

.....

.....

Fecha: .....

Fecha: .....

**Anexo 8.** Inseto PureLink™ Genomic DNA Mini Kit.

# PureLink™ Genomic DNA Mini Kit

**Catalog No.**  
K1820-00

**Quantity**  
10 Preps

**Store at room temperature**

## Contents and Storage

The components included with the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit are listed below. Sufficient reagents are included to process 10 samples. Upon receipt, **store all components at room temperature.**

Component	Quantity
PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer	2 ml
PureLink™ Genomic Digestion Buffer	1.8 ml
PureLink™ Genomic Wash Buffer 1	2 ml
PureLink™ Genomic Wash Buffer 2	1.5 ml
PureLink™ Genomic Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA)	2 ml
RNase A (20 mg/ml) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA	0.4 ml
Proteinase K (20 mg/ml) in storage buffer (proprietary)	0.2 ml
PureLink™ Spin Columns with Collection Tubes	10
PureLink™ Collection Tubes (2.0 ml)	20

## Description

The PureLink™ Genomic DNA Kits allow rapid and efficient purification of genomic DNA (gDNA). The kit is designed to efficiently isolate genomic DNA from mammalian cells and tissues, mouse/rat tail, blood samples, and bacteria. The kit includes robust buffers that allow simple lysis of cells and tissues with Proteinase K without the need for any mechanical lysis as well as allow efficient DNA binding to silica membrane. After preparing the lysate, genomic DNA is rapidly purified using a spin column based centrifugation procedure.

The isolated DNA is 20-50 kb in size and is suitable for PCR, restriction enzyme digestion, and Southern blotting.

## System Overview

The PureLink™ Genomic DNA Mini Kit is based on the selective binding of DNA to silica-based membrane in the presence of chaotropic salts. The lysate is prepared from a variety of starting materials such as tissues, cells, or blood. The cells or tissues are digested with Proteinase K at 55°C using an optimized digestion buffer formulation that aids in protein denaturation and enhances Proteinase K activity. Residual RNA is removed by RNase digestion prior to sample binding to the silica membrane.

The lysate is mixed with ethanol and PureLink™ Genomic Binding Buffer that allows high DNA binding to the silica-based membrane in the column. Impurities are removed by thorough washing with Wash Buffers 1 and 2. The genomic DNA is then eluted in low salt Elution Buffer.

## Specifications

Starting Material:	Varies (see individual protocols)
Binding Capacity:	~0.5 mg nucleic acid
Column Reservoir Capacity:	800 µl
Collection Tube Capacity:	2.0 ml (~700 µl without contacting column)
Centrifuge Compatibility:	Capable of centrifuging >10,000 x g
Elution Volume:	25-200 µl
DNA Yield and Size:	DNA yield varies; DNA size is 20-50 kb

## Caution

The Lysis/Binding Buffer and Wash Buffer 1 contain guanidine hydrochloride. Always wear a laboratory coat, disposable gloves, and eye protection when handling buffers. Do not add bleach or acidic solutions directly to solutions containing guanidine hydrochloride or sample preparation waste as it forms reactive compounds and toxic gases when mixed with bleach or acids.

## Product Qualification

The PureLink™ Genomic DNA Kit is functionally qualified by isolating DNA from 1 ml overnight bacterial culture as described in this manual. The purified gDNA must have an  $A_{260/280} \geq 1.70$  and agarose gel electrophoresis of the purified DNA must produce a single band above 12 kb. The protocol must yield >4 µg purified gDNA.

Part no. K1820.pps

Rev. Date: 12 Feb 2007

## Important Guidelines

- Maintain a sterile environment when handling DNA to avoid any contamination from DNases
- Ensure that no DNases are introduced into the sterile solutions of the kit
- Make sure all equipment that comes in contact with DNA is sterile including pipette tips and microcentrifuge tubes
- Do not vortex the samples for more than 5-10 seconds at each vortexing step to avoid extensive shearing of DNA
- To minimize DNA degradation, perform lysate preparation steps quickly, and avoid repeated freezing and thawing of DNA samples
- Perform all centrifugation steps at room temperature
- Be sure to perform the recommended wash steps to obtain the best results
- Handle all blood and tissue samples in compliance with established institutional guidelines and take the appropriate precautions (wear a laboratory coat, disposable gloves, and eye protection) when handling blood and tissue samples. When processing blood and tissue samples, the eluates collected during wash steps contain biohazardous waste. Dispose the eluate and collection tubes appropriately as biohazardous waste.

## Elution Parameters

### Elution Buffer Volume

The genomic DNA is eluted in 25-200  $\mu$ l of PureLink™ Genomic Elution Buffer. You can change the volume of elution buffer to obtain genomic DNA in the desired final concentration. For increased DNA yield, use a higher volume of elution buffer. For increased DNA concentration, use a lower volume of elution buffer.

### Elution Buffer

The genomic DNA is eluted using PureLink™ Genomic Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA). Alternatively, Tris Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0) or sterile water can be used, if EDTA inhibits downstream reactions.

### Number of Elutions

Using 50  $\mu$ l and 100  $\mu$ l elution buffer volume, the first elution recovers ~80% and 90% of bound genomic DNA, respectively. To maximize genomic DNA recovery, you may perform a second elution to recover the remaining 10-15% gDNA. Perform the second elution using the same volume of buffer used for first elution. To prevent dilution of the gDNA sample and also avoid contact of the spin column with the eluate, perform the two-elution steps using different tubes.

**Note:** Sufficient PureLink™ Genomic Elution Buffer is included to perform 2 x 100  $\mu$ l elution per sample. If you wish to perform >2 x 100  $\mu$ l elution per sample, you need to purchase additional PureLink™ Genomic Elution Buffer (catalog no. K1823-05) available separately.

## Materials Needed

- 96-100% ethanol
- Sample for DNA isolation (see appropriate protocol for recommended starting amount)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) for mammalian cell lysate
- Lysozyme and Lysozyme Digestion Buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100) for bacterial lysate
- Sterile, DNase-free microcentrifuge tubes
- Water baths or heat blocks and a microcentrifuge capable of centrifuging >10,000 x g

### *Components supplied with the kit*

- PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer
- PureLink™ Genomic Digestion Buffer
- Proteinase K (20 mg/ml) and RNase A (20 mg/ml)
- PureLink™ Genomic Wash Buffers 1 and 2
- PureLink™ Genomic Elution Buffer
- PureLink™ Spin Columns in Collection Tubes
- PureLink™ Collection Tubes

## Before Starting

- Make sure there is no precipitate visible in PureLink™ Genomic Digestion Buffer or PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer. If any precipitate is visible in the buffers, warm the buffers at 37°C for 3-5 minutes and mix well to dissolve the precipitate before use.
- Add 96-100% ethanol to PureLink™ Genomic Wash Buffer 1 and PureLink™ Genomic Wash Buffer 2 according to instructions on each label. Mix well. Mark on the labels that ethanol is added. Store both wash buffers with ethanol at room temperature.

## Lysate Preparations

Protocols for preparing lysate from mammalian cells and tissues, mouse/rat tail, blood samples, and bacteria are described on pages 3-4. For additional lysate preparation protocols from yeast cells, FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) tissue, buccal swabs, and Oragene™ preserved saliva, refer to the PureLink™ Genomic DNA Kit manual available at [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) or contact Technical Support.

## Notes

- While processing multiple samples, you may prepare a master Digestion Buffer Mix when appropriate in the protocol by mixing 180 µl Digestion Buffer and 20 µl Proteinase K, and using 200 µl Digestion Buffer Mix per sample.
- While processing multiple samples, you may prepare a master Buffer/ethanol Mix when appropriate in the protocol by mixing 200 µl Lysis/Binding Buffer and 200 µl 96-100% ethanol, and using 400 µl Buffer/ethanol Mix per sample.

## Mammalian Cells and Blood Lysate Protocol

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. Add 20 µl Proteinase K to a sterile microcentrifuge tube.
3. Process cells or blood samples:
  - For adherent cells (up to  $5 \times 10^6$  cells), remove the growth medium and harvest cells by trypsinization or a method of choice. Resuspend cells in 200 µl PBS.
  - For suspension cells (up to  $5 \times 10^6$  cells), harvest cells by centrifugation. Remove the growth medium. Resuspend cells in 200 µl PBS.
  - To a sterile microcentrifuge tube, add up to 200 µl fresh or frozen blood sample (if using <200 µl blood sample, adjust the sample volume to 200 µl using PBS). To process blood samples >200 µl and up to 1 ml, scale up all reagent volumes accordingly.

**Note:** If you are processing >200 µl blood sample, you need to purchase additional PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer (catalog no. K1823-02) and Proteinase K (catalog no. 25530-049) available separately. Visit [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) for details.
4. Transfer 200 µl cells or blood in PBS to the tube containing Proteinase K from Step 2.
5. Add 20 µl RNase A to the sample. Mix well by brief vortexing and incubate at room temperature for 2 minutes.
6. Add 200 µl PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
7. Incubate at 55°C for 10 minutes to promote protein digestion.
8. Add 200 µl 96-100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing to yield a homogenous solution.
9. Proceed immediately to **Purification Protocol**, next page.

## Mammalian Tissue and Mouse/Rat Tail Lysate Protocol

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. Place up to 25 mg of minced mammalian tissue (up to 10 mg minced spleen tissue), or tail clip (1 cm mouse or 0.5 cm rat tail clips) into a sterile microcentrifuge tube:
3. Add 180 µl PureLink™ Genomic Digestion Buffer and 20 µl Proteinase K to the tube. Ensure the tissue is completely immersed in the buffer mix.
4. Incubate at 55°C with occasional vortexing until lysis is complete (1-4 hours). For mouse tails or larger tissue pieces, you may perform overnight digestion.
5. To remove any particulate materials, centrifuge the lysate at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Transfer supernatant to a new, sterile microcentrifuge tube.
6. Add 20 µl RNase A to lysate, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
7. Add 200 µl PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to yield a homogenous solution.
8. Add 200 µl 96-100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing to yield a homogenous solution.
9. Proceed immediately to **Purification Protocol**, next page.

## Blood Spots Protocol

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. Place 2-5 punches of dried blood spot (2-3 mm in size) collected on paper such as FTA® card (Whatman) or S&S 903 in a sterile microcentrifuge tube.
3. Add 180 µl PureLink™ Genomic Digestion Buffer and 20 µl Proteinase K to the tube. Mix well by vortexing. Ensure the pieces are completely immersed in buffer.
4. Incubate at 55°C with occasional vortexing for 30 minutes.
5. Centrifuge the sample at maximum speed for 2-3 minutes at room temperature to pellet paper fibers. Transfer the sample to a new, sterile microcentrifuge tube.
6. Add 20 µl RNase A to lysate, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
7. Add 200 µl PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
8. Add 200 µl 96-100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing to yield a homogenous solution.
9. Proceed immediately to **Purification Protocol**, next page.

### Gram Negative Bacterial Cell Lysate Protocol

1. Set a water bath or heat block at 55°C.
2. Harvest up to  $2 \times 10^9$  Gram negative (~1 ml of overnight *E. coli* culture) by centrifugation.
3. Resuspend the cell pellet in 180  $\mu$ l PureLink™ Genomic Digestion Buffer. Add 20  $\mu$ l Proteinase K to lyse the cells. Mix well by brief vortexing.
4. Incubate the tube at 55°C with occasional vortexing until lysis is complete (30 minutes to up to 4 hours).
5. Add 20  $\mu$ l RNase A to lysate, mix well by brief vortexing, and incubate at room temperature for 2 minutes.
6. Add 200  $\mu$ l PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to obtain a homogenous solution.
7. Add 200  $\mu$ l 96-100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution.
8. Proceed immediately to **Purification Protocol**, below.

### Gram Positive Bacterial Cell Lysate Protocol

1. Set two water baths or heat blocks at 55°C and 37°C, respectively.
2. Prepare Lysozyme Digestion Buffer (see recipe on page 2). To ~200  $\mu$ l Lysozyme Digestion Buffer/sample, add **fresh** Lysozyme to obtain a final Lysozyme concentration of 20 mg/ml.
3. Harvest up to  $2 \times 10^9$  Gram positive cells by centrifugation.
4. Resuspend the cell pellet in 180  $\mu$ l Lysozyme Digestion Buffer containing Lysozyme from Step 2. Mix well by brief vortexing.
5. Incubate at 37°C for 30 minutes.
6. Add 20  $\mu$ l Proteinase K. Mix well by brief vortexing.
7. Add 200  $\mu$ l PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by vortexing to yield a homogenous solution.
8. Incubate at 55°C for 30 minutes.
9. Add 200  $\mu$ l 96-100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing to yield a homogenous solution.
10. Proceed immediately to **Purification Protocol**, below.

### Purification Protocol

The purification procedure is designed for purifying genomic DNA using a spin column-based centrifugation procedure in a total time of **10-15 minutes**.

1. Remove a PureLink™ Spin Column in a Collection Tube from the package.
2. Add the lysate (~640  $\mu$ l) prepared with PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer and ethanol to the spin column.
3. Centrifuge the column at  $10,000 \times g$  for 1 minute at room temperature.  
**Note:** If you are processing >200  $\mu$ l starting material such as blood, you need to perform multiple loading of the lysate by transferring any remaining lysate to the same PureLink™ Spin Column (above) and centrifuge at  $10,000 \times g$  for 1 minute.
4. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink™ Collection Tube supplied with the kit.
5. Add 500  $\mu$ l Wash Buffer 1 prepared with ethanol (page 2) to the column.
6. Centrifuge column at  $10,000 \times g$  for 1 minute at room temperature.
7. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink™ collection tube supplied with the kit.
8. Add 500  $\mu$ l Wash Buffer 2 prepared with ethanol (page 2) to the column.
9. Centrifuge the column at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Discard collection tube.
10. Place the spin column in a sterile 1.5-ml microcentrifuge tube.
11. Add 25-200  $\mu$ l of PureLink™ Genomic Elution Buffer to the column. Choose the suitable elution volume for your needs.
12. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature.  
*The tube contains purified genomic DNA.*
13. To recover more DNA, perform a second elution step using the same elution buffer volume as first elution.
14. Centrifuge the column at maximum speed for 1.5 minutes at room temperature.  
*The tube contains purified DNA. Remove and discard the column.*
15. Use DNA for the desired downstream application or store the purified DNA at 4°C (short-term) or -20°C (long-term).

### DNA Quantitation

Perform DNA quantitation using UV absorbance at 260 nm or Quant-iT™ Kits (visit [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) for details).

©2007 Invitrogen Corporation. All rights reserved.

For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Oragene™ is a trademark of DNA Genotek. FTA® is a registered trademark of Whatman plc.

**Anexo 9.** Especificaciones técnicas NanoDrop 2000.



Thermo Scientific NanoDrop Products



**Revolutionary technology.**  
**Elegant simplicity.**

Instruments for microvolume analysis of biomolecules

**Thermo**  
SCIENTIFIC

Thermo Scientific NanoDrop instruments have pre-programmed methods for simple nucleic acid and protein quantitation

## NanoDrop™ technology in a class by itself

### Thermo Scientific NanoDrop Instruments

NanoDrop™ instruments were the first microvolume UV-Vis spectrophotometers and fluorospectrometers designed specifically for the life science market. The patented sample-retention system\* enables direct measurement of 0.5 – 2  $\mu$ L samples without wasteful dilutions and expensive consumables. The innovative pedestal design and pre-programmed methods make the process as simple as pipette, measure, and wipe clean. Highly polished stainless steel pedestals ensure no sample carryover. By reducing sample waste and providing accurate results in seconds, NanoDrop instruments have fundamentally changed the way scientists analyze DNA, RNA and proteins.

With over 30,000 instruments in labs worldwide, NanoDrop instruments have become the recognized standard for microvolume instrumentation. Today, thousands of scientists rely on NanoDrop instruments to deliver accurate sample concentration and purity assessment for everything — from routine quality checks to evaluation of precious samples for demanding, downstream applications.

With a full range of innovative, simple, and powerful instruments — no matter what your application or throughput needs — there is a NanoDrop instrument that is right for you.

Pipetting 1  $\mu$ L onto pedestal



Measuring 1  $\mu$ L sample



### Realize the difference. Try any NanoDrop instrument for FREE.

Our trial program allows you to try an instrument in your lab with your own samples, completely free of charge. Once you have used a NanoDrop instrument, we are confident you will quickly realize the benefits of our revolutionary technology.

Visit [www.thermoscientific.com/nanodrop](http://www.thermoscientific.com/nanodrop) to request your free trial instrument or contact your local authorized NanoDrop dealer.

Our patented sample-retention system remains a groundbreaking technology in microvolume measurements. Only NanoDrop instruments use surface tension to contain a 1  $\mu$ L of sample between two optical fibers. With the instrument arm open, a sample is pipetted directly onto the pedestal. When the arm is lowered a column is formed, thus eliminating the need for cuvettes or other containment devices.

\*Patents US6628382 and US6809826



## Innovative design, maximum performance

### Thermo Scientific NanoDrop 2000c Spectrophotometer

#### Full-spectrum microvolume and cuvette measurements in a single instrument

The NanoDrop 2000c is a full-spectrum UV-Vis spectrophotometer, offering a complete solution by integrating both a patented sample-retention system for microvolume samples and a cuvette option. Dual sampling modes accommodate very low and very high-concentration samples. Our straightforward software displays a full-spectrum and tabulates results for easy data interpretation.

- Superior accuracy and reproducibility
- Microvolume sample size (0.5 – 2.0 μL)
- Pipette directly onto the pedestal, measure and wipe clean
- Measurements take less than 5 seconds
- Cuvette position includes temperature control (37° C) and stirring for kinetics measurements
- Use quartz or disposable cuvettes
- Cell culture (OD600) measurements
- Customize methods, design reports and export data

### Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer

#### Full-spectrum microvolume measurements

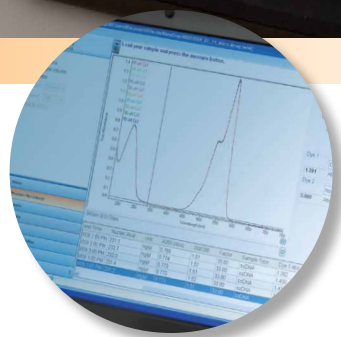
The NanoDrop 2000 is an alternate choice for labs that only need microvolume measurement capability. Using the same sample-retention system, the NanoDrop 2000 provides the same accuracy, full-spectrum analysis, and benefits as the NanoDrop 2000c, without the added flexibility and sensitivity of the cuvette option.



Pedestal measurements



Cuvette measurements



Instant results

# Efficiency and unmatched accuracy

## Thermo Scientific NanoDrop 8000 Spectrophotometer

### Higher throughput, full-spectrum microvolume measurements

The NanoDrop 8000 Spectrophotometer delivers full-spectrum UV-Visible absorbance measurements for up to eight samples at one time. Use an eight-channel pipette to dispense samples from tubes or plates onto a linear array of pedestals, measure and wipe clean. The sample position illuminator visually indicates the current measurement row facilitating accurate and efficient pipetting to the pedestals. Displaying a full-spectrum for all samples, the NanoDrop 8000 is designed for higher throughput evaluation of precious samples when downstream requirements for sample QC are critical.

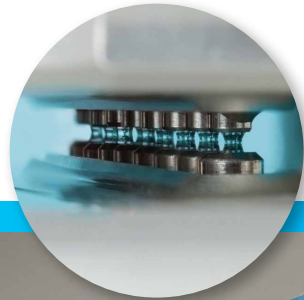
Sample position illuminator



Multi-sample loading



Multi-sample measurement



Full-spectral data for each sample

### The NanoDrop 8000 offers all the benefits of the trusted NanoDrop pedestal technology in a higher-throughput format for researchers working from tubes or plates

- Analyzes from one to eight samples at a time
- Full-spectral data is displayed for each sample (220 – 750 nm)
- Measures nucleic acid concentration and purity (2.5 – 3,700 ng/μL for dsDNA)
- Measures protein concentration and purity (0.15 – 100 mg/mL for BSA)
- User-friendly software that is easy to configure
- Pre-configured methods for colorimetric protein analysis
- Flexible options for exporting data and producing customized reports
- Custom method capability

NEW

## Thermo Scientific NanoDrop Lite Spectrophotometer

### Basic microvolume measurements

Meet the newest member of the NanoDrop instrument family. The NanoDrop Lite is a basic microvolume instrument which uses our patented sample-retention system to deliver the same exceptional accuracy and reproducibility as other NanoDrop instruments. Its compact design, with built-in controls and software, makes the NanoDrop Lite small enough to fit on any benchtop. It is designed for labs that already have a NanoDrop instrument or that share a NanoDrop instrument with other labs. The NanoDrop Lite is also ideal for labs that want the trusted NanoDrop technology, but don't need the full performance or spectral data of the NanoDrop 2000/2000c or NanoDrop 8000.

## Simple analysis, compact delivery

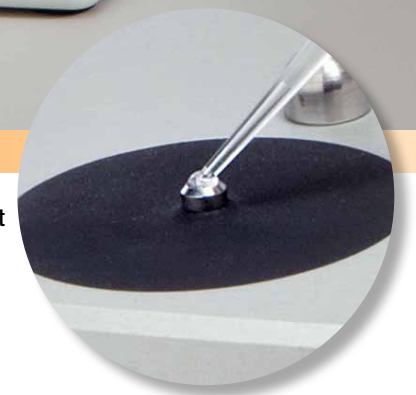
NanoDrop Lite shown  
docked to its equally  
compact printer



- Employs the unique NanoDrop microvolume sampling technology
- Delivers the accuracy and reproducibility expected from NanoDrop instruments
- Uses built-in controls and software — no computer required
- Offers an optional printer for cryogenic labels
- Measures nucleic acid concentration at 260 nm and purity using the 260/280 ratio
- Measures purified protein concentration at 280 nm



Pedestal measurement



# Fluorescence made compact and simple



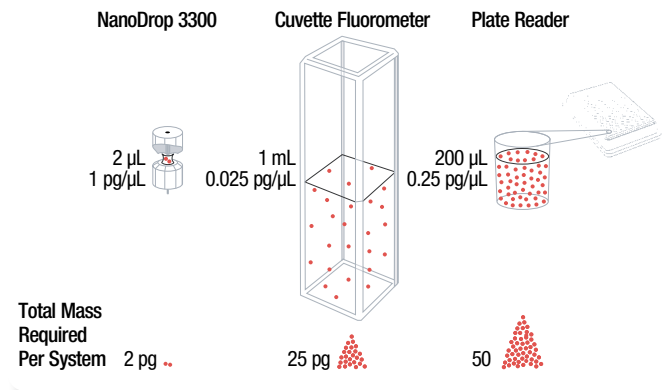
## Thermo Scientific NanoDrop 3300 Fluorospectrometer

### Full-spectrum microvolume fluorescence measurements

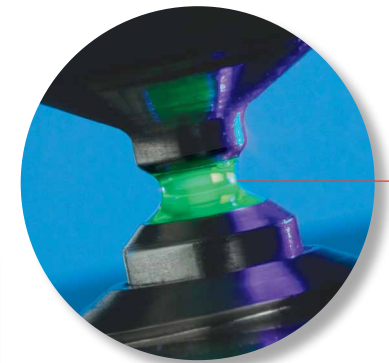
The NanoDrop 3300 Fluorospectrometer brings the sensitivity and selectivity of fluorescence spectroscopy to microvolume samples. Using our patented sample-retention system, the NanoDrop 3300 performs broad-spectrum fluorescence analysis in a versatile, high-performance instrument. The NanoDrop 3300 significantly lowers the mass detection limit more than an order of magnitude, compared to conventional fluorometers. It's a powerful instrument offering many benefits:

- Sample size as small as 1  $\mu\text{L}$ , conserves precious samples
- High performance LEDs replace filters for excitation
- Multiplex emission from multiple probes using the broad excitation white LED
- Easy-to-use software guides the novice fluorescence researcher with minimal training required
- Advanced instrument control for experienced spectroscopists

The NanoDrop 3300 lowers the mass detection limit more than an order of magnitude over conventional fluorometers. This capability is often more important than the ability to measure samples of low concentration.



dsDNA detection limits using fluorescence assay



Microvolume fluorescence analysis

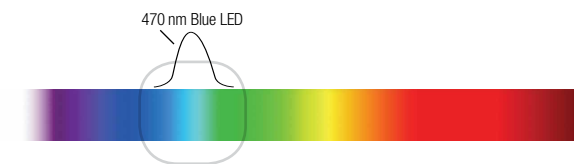
### UV LED max = 365 nm; Long pass filter at 400 nm

Example Applications:  
wt GFP and BFP mutants  
Hoechst  
4-MU  
Quantum Dots  
OPA



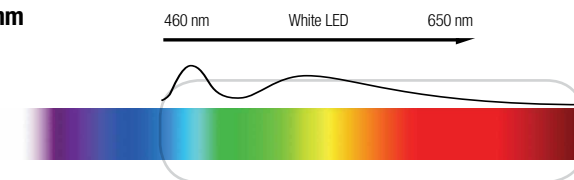
### Blue LED max = 470 nm

Example Applications:  
GFP mutants  
Fluorescein (FITC-FAM)  
DyLite 488<sup>®</sup> | AlexaFluor 488<sup>®</sup>  
PicoGreen<sup>®</sup> and RiboGreen<sup>®</sup>  
DyLite 550<sup>®</sup> | AlexaFluor 555<sup>®</sup>  
Quantum Dots  
SybrGreen  
FRET experiments



### White LED range = 460 – 650 nm

Example Applications:  
DyLite 550<sup>®</sup> | AlexaFluor 555<sup>®</sup>  
Cy3<sup>®</sup>, Cy 5<sup>®</sup>  
DyLite 550<sup>®</sup> | AlexaFluor 555<sup>®</sup>  
DyLite 650<sup>®</sup> | Alexa 647<sup>®</sup>  
Rhodamine  
Quantum Dots  
Molecular beacons



## Choose the NanoDrop instrument that's right for you

		Full-Spectral Data	Pre-Programmed Methods for Nucleic Acids	Measures Nucleic Acid 260/280 Ratio	Measures Nucleic Acid 260/230 Ratio	Pre-Programmed Methods for Protein	Measures Purified Protein A280	Pre-Programmed Methods for Colorimetric Assays (i.e. BCA)	Measures Fluorescently-Labeled Samples	Custom Methods Editor	PC Based	Built-in Cuvette Mode	Qualification Procedures IQ/OQ	User Calibration Verification
UV-Vis	NanoDrop 2000c	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
UV-Vis	NanoDrop 2000	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
UV-Vis	NanoDrop Lite		✓	✓		✓	✓							✓
UV-Vis	NanoDrop 8000	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
Fluorescence	NanoDrop 3300	✓	✓			✓			✓	✓	✓			

Still cannot decide? See more detailed product information at [www.thermoscientific.com/nanodrop](http://www.thermoscientific.com/nanodrop) or contact your local authorized NanoDrop dealer.



## Why do thousands of scientists consider NanoDrop instruments essential to their work?

**Microvolumes:** NanoDrop instruments allow you to analyze samples as small as 0.5  $\mu$ L.

**Superior Technology:** The NanoDrop patented sample-retention system is one of a kind with proven performance in thousands of instruments.

**Fast and Easy:** Pipet your sample onto the pedestal, measure, then wipe clean. Highly polished stainless steel pedestals ensure no sample carryover. Yes, it really is that simple.

**Low Cost of Ownership:** No specialty wipes, expensive plates, cuvettes, caps or custom tips required.

**Small Footprint:** Ultra-compact instrument design saves laboratory space. Portability combined with superior performance allows the introduction of this technology to new workflows and applications.

**User-friendly Software:** Packed with features, but easy to use. Minimal training is needed. Software updates available on our website.

**Outstanding Technical Support:** Our technical support experts are life science specialists with extensive experience in microvolume analysis. Detailed technical information and advice is also available on our website.

# The specifications

	NanoDrop 2000   2000c	NanoDrop Lite	NanoDrop 8000
<b>Instrument Type</b>	Spectrophotometer	Spectrophotometer	Spectrophotometer
<b>Instrument Control</b>	Computer software	Local control	Computer software
<b>Minimum Sample Size</b>	0.5 µL	1 µL	1 µL
<b>Sample Number</b>	1	1	up to 8
<b>Pathlength(s)</b>	0.05, 0.1, 0.2 and 1.0 mm, auto-ranging	0.5 mm	0.1, 0.2 and 1.0 mm, auto-ranging
<b>Light Source(s)</b>	Xenon flash lamp	Light emitting diodes	Xenon flash lamp
<b>Excitation Maxima of LEDs</b>		N/A	
<b>Detector Type</b>	2048-element linear silicon CCD array	Silicon photodiode	2048-element linear silicon CCD array
<b>Wavelength Range</b>	190 – 840 nm	260 and 280 nm	220 – 750 nm
<b>Wavelength Accuracy</b>	±1 nm	N/A	±1 nm
<b>Spectral Resolution</b>	≤ 1.8 nm (FWHM at Hg 253.7 nm)	< 8.0 nm	≤ 3 nm (FWHM at Hg 546.1 nm)
<b>Typical Measurement Reproducibility</b>	0.002*	0.002*	0.003*
<b>Absorbance Accuracy**</b>	3% (at 0.74 Abs at 350 nm)	3% (at 1.05 Abs at 260 nm)	3% (at 0.74 Abs at 350 nm)
<b>Absorbance Range (10 mm equivalent)</b>	Pedestal: 0 – 300 Abs Cuvette: 0 – 1.5 Abs	0 – 30 Abs	0 – 75 Abs
<b>Fluorescence Range</b>		N/A	
<b>Lower Limit of Detection</b>	Pedestal: 2 ng/µL (dsDNA) 0.10 mg/mL (BSA) Cuvette: 0.4 ng/µL (dsDNA) 0.01 (BSA)	4 ng/µL (dsDNA) 0.12 mg/mL (BSA)	2.5 ng/µL (dsDNA) 0.15 mg/mL (BSA)
<b>Maximum Concentration</b>	Pedestal: 15,000 ng/µL (dsDNA) 400 mg/mL (BSA)	1,500 ng/µL (dsDNA) 45 mg/mL (BSA)	3,700 ng/µL (dsDNA) 100 mg/mL (BSA)
<b>Measurement Time</b>	< 5 seconds	< 5 seconds	< 20 seconds
<b>Footprint</b>	14 x 20 cm	16 x 11.5 cm	24 x 32 cm
<b>Weight</b>	2000: 2.0 kg 2000c: 2.1 kg	0.8 kg	3.4 kg
<b>Sample Pedestal Material of Construction</b>		303 stainless steel and quartz fiber	
<b>Cuvette Position</b>	Optional stirring: 150 – 850 rpm Heating: 37 ± 0.5°C z-height: 8.5 mm	N/A	N/A
<b>Operating Voltage</b>	12 V (DC)	6 V (DC)	12 V (DC)
<b>Operating Power Consumption</b>	12 – 18 W	18 W	30 W
<b>Standby Power Consumption</b>	5 W	< 2.5 W	6 W
<b>Software Compatibility</b>	Professional versions of Windows® XP (32 bit) Service Pack 2 or later; Windows® Vista™ (32 bit); Windows® 7 (32 bit and 64 bit)	Local control only	Professional versions of Windows® XP (32 bit) Service Pack 2 or later; Windows® Vista™ (32 bit); Windows® 7 (32 bit and 64 bit)

\* SD of 10 individual measurements at 0.74 Abs

\*\* Absorbance expressed at Abs/mm measured at 25°C

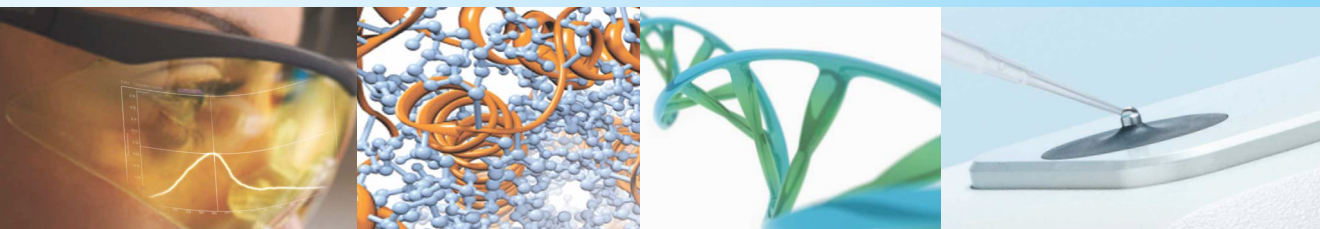
All NanoDrop instruments are approved to CE and UL/CSA standards.

NanoDrop 3300
Fluorospectrometer
Computer software
1 µL
1
N/A
Light emitting diodes
UV: 365 nm, Blue: 470 nm, White: 460 – 650 nm
2048-element linear silicon CCD array
400 – 750 nm
±1 nm
≤ 8.0nm (FWHM at Hg 546.1 nm)
< 5% CV (10 nM fluorescein)
N/A
N/A
> 4 orders of magnitude fluorescein
< 1 fmol fluorescein
N/A
2 – 10 seconds
14 x 20 cm
1.5 kg
303 stainless steel and quartz fiber
N/A
5 V (DC)
2 W
1 W
Professional versions of Windows® XP (32 bit) Service Pack 2 or later; Windows® Vista™ (32 bit); Windows® 7 (32 bit and 64 bit)



## Thermo Scientific NanoDrop Products

Instruments for microvolume analysis of biomolecules



©2011 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Windows is a registered trademark of Microsoft Corporation in United States and other countries. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details.

Thermo Fisher Scientific | NanoDrop Products

3411 Silverside Road  
Wilmington, DE 19810 USA

Toll-free in US and Canada: 1.877.724.7690  
1.302.479.7707

[www.thermoscientific.com/nanodrop](http://www.thermoscientific.com/nanodrop)

MS001 12/11

**Thermo**  
S C I E N T I F I C

Part of Thermo Fisher Scientific