

Artículo Original

Evaluación de polimorfismos de los genes AURK-A, AURK-B y CCND1 en la población ecuatoriana con mieloma múltipleBelén Gutiérrez,^{1,2} Belén Montesdeoca,¹ Grace Zavala,^{1,2} Catherine Carrera,³ César Paz-y-Miño,¹ Paola E. Leone.¹¹ Centro de Investigación Genética y Genómica, Universidad Tecnológica Equinoccial. ² Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias, Ingeniería en Biotecnología, Universidad de las Américas, ³ Laboratorio de Genética, SOLCA, Quito/Ecuador.

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: Paola E. Leone, Ph.D. Acad. Centro de Investigación Genética y Genómica, Universidad Tecnológica Equinoccial. Av. Mariscal Sucre S/N y Mariana de Jesús, Bloque I, piso 2. T. 2990800 Ext. 2569, E-mail: paola.leone@ute.edu.ec, Quito-Ecuador.

RESUMEN

En un estudio previo realizado en líneas celulares de mieloma múltiple, se evidenció alteraciones en el grupo de proteínas quinasas, entre ellos el pathway PI3K/AKT, Cdk (quinasa dependiente de ciclina), NF-κB y aurora quinasa. Las auroras quinasas A y B desempeñan un papel importante durante la división celular y ciclina se encarga de la correcta coordinación de la mitosis. Estos tres genes se han visto relacionados con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer entre ellos el mieloma múltiple.

En el presente estudio se evaluó la presencia de polimorfismos de los genes AURK-A, AURK-B y CCND1 en la población ecuatoriana con mieloma múltiple. Sin embargo, se encontró que únicamente el SNP rs2273535 del gen AURK-A presentó un valor significativo en cuanto a la distribución del mismo entre pacientes y controles. Asimismo, se evidenció que solo este polimorfismo se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg dentro de la población investigada. No obstante, al aplicar la prueba de odds ratio ninguno de los polimorfismos de los genes analizados arrojó un valor significativo. Los resultados del presente estudio sirven de base para poder profundizar sobre estos genes y comprender su rol en el desarrollo y progresión del mieloma múltiple.

Palabras clave: Mieloma múltiple, AURK-A, AURK-B, CCND1, polimorfismos, población ecuatoriana.

ABSTRACT

In a previous study conducted in cell lines with multiple myeloma, alterations in the protein kinase group were evidenced, including pathway PI3K/AKT, Cdk (cyclin-dependent kinase), NF-κB and aurora kinase. Aurora kinases A and B play an important role during cell division, and cyclin is responsible for the correct coordination of mitosis. These three genes have been linked to the development of different types of cancer including multiple myeloma.

This is why the present study evaluated the presence of polymorphisms of the AURK-A, AURK-B and CCND1 genes in the Ecuadorian population with multiple myeloma. However, only the rs2273535 SNP of the AURK-A gene was found to have a significant value in the distribution between patients and controls. As well, it was evidenced that only this polymorphism is found in Hardy-Weinberg equilibrium within the investigated population. Meanwhile, when analyzing the odds ratio test none of the polymorphisms of the analyzed genes showed a significant value.

The results of the present study serve as a basis to be able to delve into these genes and to understand their role in the development and progression of multiple myeloma.

Keywords: Multiple myeloma, AURK-A, AURK-B, CCND1, polymorphisms, Ecuadorian population

INTRODUCCIÓN

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad causada por la proliferación excesiva de células plasmáticas que se han degenerado en malignas por alteraciones microambientales o genéticas.¹ Esta neoplasia afecta principalmente a la población adulta entre los 65 y 70 años de edad y se ha observado una mayor frecuencia en pacientes del sexo masculino del grupo étnico afroamericano.²

Hay pocos estudios en el Ecuador sobre la genética del mieloma múltiple.³⁻⁵ Durante los últimos 30 años se ha podido determinar que algunas alteraciones cromosómicas se ven relacionadas directamente con el pronóstico de la enfermedad.⁶ Según Leone y cols.⁷⁻⁹ en estudios desde 2008 se ha identificado en pacientes con MM alteraciones genéticas que afectan a genes pertenecientes a ciertas rutas metabólicas entre las que se encuentran PI3K/AKT, Cdk (quinasa dependiente de ciclina), NF-κB y aurora quinasa.

Las auroras quinasas A y B cumplen un rol fundamental durante la división celular ya que regula el paso de la fase S a la fase M, así como la maduración y separación del centrosoma y la alineación cromosómica en la mitosis. Es por ello que se ha asociado la sobreexpresión de estas proteínas con la formación de tumores.¹⁰ Por otro lado, las quinasas dependientes de ciclinas están involucradas en la coordinación correcta de los eventos mitóticos en el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular y se ha observado que en varios cánceres humanos este gen es alterado desencadenando una expresión anormal de su proteína.¹¹

Existen varios polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) para cada gen: AURK-A, AURK-B y CCND1. Sin embargo, para este estudio se han seleccionado algunos que están relacionados con un peor pronóstico de vida y progresión de la enfermedad.¹²⁻¹⁴ Para el gen AURK-A se estudió rs2273535, que se ha visto correlacionado con la susceptibilidad de desarrollo tumoral; en AURK-B se investigaron 2 polimorfismos: rs1059476 y rs2241909; y para CCND1 se analizó el SNP rs9344. A pesar que existe a nivel mundial estudios de los polimorfismos en los genes AURK-A, AURK-B y CCND1, en el Ecuador solo existe un estudio realizado en el 2015 del gen AURK-A.¹⁵

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras. Se recolectaron muestras de médula ósea de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple de los hospitales Carlos Andrade Marín y SOLCA en la ciudad Quito. Asimismo, se analizaron muestras de sangre periférica de personas sanas que se autodenominaron en dos diferentes grupos étnicos: mestizos y negros.

Extracción y cuantificación de ADN. Se extrajo el ADN de las muestras con MM y control mediante el uso de 2 kits comerciales: PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen, USA) y High pure PCR template preparation (Roche, USA). La cuantificación del ADN extraído fue realizada en el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific, USA).

Amplificación de ADN. Se amplificó el ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron cebadores específicos para el análisis de cada uno de los polimorfismos de interés mediante la herramienta bioinformática de National Center for Biotechnology (NCBI). Los cebadores usados para el polimorfismo del gen AURK-A (rs2273535) fueron: forward 5' CTTCATGAATGCCAGAAAGTT 3' y reverse 5' CTGGGAAGAATTTGAAGGACA 3'. En el caso del gen AURK-B estos fueron: forward 5' CTTCATGAATGCCAGAAAGTT 3' y reverse 5' CTGGGAAGAATTTGAAGGACA 3'. Y para el SNP del gen CCND1 los cebadores fueron: forward 5' GCCTCACGTTGGTCCACATC 3' y reverse 5' CGCACGTCTGTAGGGGAGTA 3'.

La reacción de PCR fue llevada a cabo para cada uno de los polimorfismos de los genes AURK-A, AURK-B y CCND1. Para AURK-A se utilizó el programa de PCR compuesto por 13 µl de agua Milli-Q, 5 µl de Green Go Taq™ Flexi Buffer 5X (Promega, USA), 0,8 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl de dNTPs cada uno a 200 mM (Invitrogen, USA), 1,5 µl de cebador forward y reverse respectivamente (10 mM), 0,2 µl de Taq DNA polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen) y 2 µl de ADN genómico (10 ng/µl).

Por otro lado, para AURK-B se utilizó el programa de PCR descrito a continuación: 16,9 µl de agua Milli-Q, 2,5 µl de Green Go Taq™ Flexi Buffer 5X (Promega, USA), 1 µl de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dNTPs cada uno a 200 mM (Invitrogen, USA), 1 µl de cebador forward y reverse respectivamente (10 mM), 0,2 µl de Taq DNA polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen) y 3 µl de ADN genómico (10 ng/µl).

El programa de PCR usado para CCND1 fue el siguiente: 14 µl de agua Milli-Q, 5 µl de Green Go Taq[®] Flexi Buffer 5X (Promega, USA), 0,7 µl de MgCl₂ (50mM), 1,1 µl de dNTPs cada uno a 200 mM (Invitrogen, USA), 1 µl de cebador forward y reverse respectivamente (10 mM), 0,2 µl de Taq DNA polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen) y 2 µl de ADN genómico (10 ng/µl).

El programa utilizado para la amplificación de cada polimorfismo varió de acuerdo a la temperatura de hibridación de los cebadores, siendo 50,5°C para AURK-A y CCND1 y 63°C para AURK-B. De forma general las condiciones de PCR fueron 38 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación por 30 segundos a la temperatura óptima según el par de cebadores usados, elongación a 72°C por 45 segundos. El primer paso de desnaturalización inicial y elongación final fueron de 94°C por 5 minutos y 72°C por 3 minutos, respectivamente. Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA). Después de la amplificación de cada fragmento se comprobó la efectividad de la amplificación mediante electroforesis convencional en geles de agarosa al 2%. Secuenciación de ADN. Una vez confirmada la amplificación de ADN se procedió a purificar la misma mediante el kit Agencourt AMPureXP[®] (Beckman Coulter, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se hizo una PCR de secuencia empleando reactivos del kit comercial BigDye[®] Terminator 3,1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), no obstante, las condiciones del fabricante fueron modificadas para tener un mayor rendimiento. Para la amplificación de AURK-A, AURK-B y CCND1 se ajustó a un volumen de final de reacción de 6 µl, la cual estuvo compuesta de 0,5 µl de Big Dye Terminator 3,1 Mix, 1 µl BigDye Terminator Sequencing Buffer 5X, 1,5 µl del cebador forward/reverse según corresponda (1 µM) y 3 µl de ADN previamente purificado. La reacción de PCR de secuencia fue llevada a cabo con 25 ciclos de duración: desnaturalización a 96°C por 10 segundos, hibridación por 5 segundos a 50,5°C independientemente del cebador usado y elongación a 60°C por 4 minutos. El primer paso de desnaturalización inicial fue a 96°C por 3 minutos y el enfriamiento fue a 4°C por 10 minutos. Al igual que la PCR convencional éstas también fueron realizadas en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent, USA). Este producto de PCR se sometió a una segunda

purificación con el kit Agencourt CleanSEQ[®] Dye Terminator Removal (Beckman Coulter, USA) para acto seguido cargar el purificado en el secuenciador ABI PRISM[®] 3130 Genetic Analyzer.

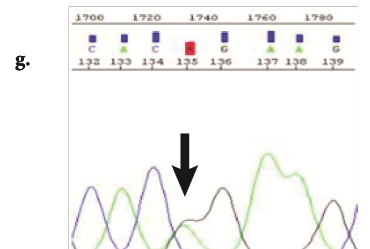
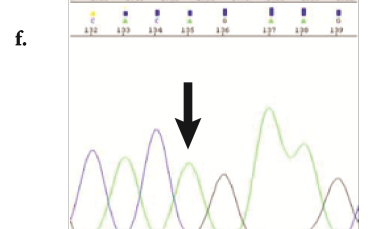
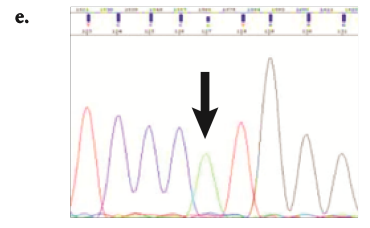
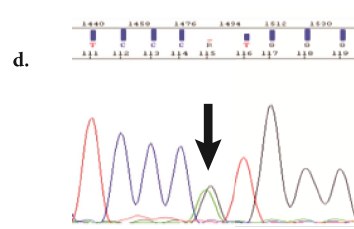
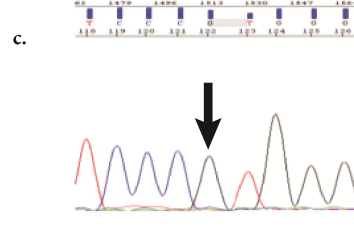
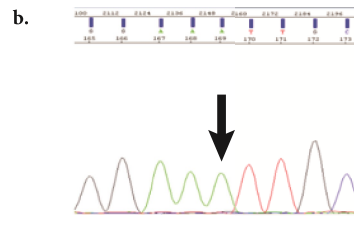
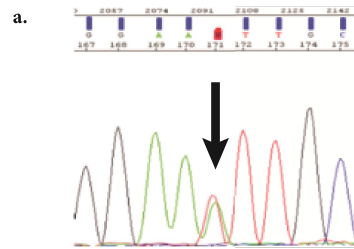
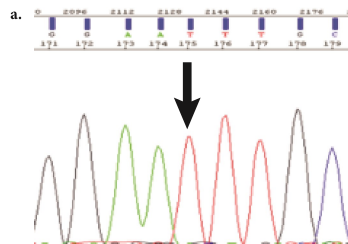
Análisis estadístico. Después de identificar los genotipos de cada individuo para cada uno de los polimorfismos estudiados, se hicieron varias pruebas estadísticas con el fin de analizar los resultados obtenidos. Estas fueron equilibrio de Hardy-Weingber, Odds-Ratio y chi-cuadrado.

RESULTADOS

Se recolectó, extrajo y cuantificó el ADN proveniente de las muestras de pacientes con MM y controles, se realizó una dilución para estandarizar la concentración de ADN a 10 ng/µl. Mediante la técnica de PCR se amplificaron las tres regiones de interés en muestras de controles y afectos. Posteriormente, se empleó la técnica de electroforesis para comprobar la eficiencia de la PCR, los amplificados de cada polimorfismo tuvo un peso molecular específico: 163pb AURK-A, 216 pb AURK-B y 136 pb CCND1.

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

Posterior al alineamiento se pasó a comprobar la presencia de estos polimorfismos en los electroferogramas, comprobando la existencia de las variantes genotípicas (Figura 1).



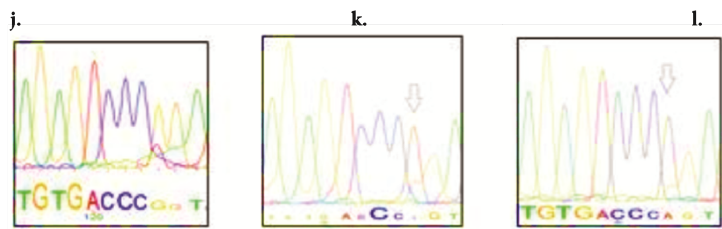


Figura 1. Electroferogramas de los polimorfismos analizados en este estudio. Polimorfismo rs2273535: a) Homocigoto dominante TT b) Heterocigoto TA y c) Homocigoto recesivo AA. Polimorfismo rs1059476: d) Homocigoto dominante GG e) Heterocigoto GA y f) Homocigoto recesivo AA. Polimorfismo rs2241909: g) Homocigoto dominante AA h) Heterocigoto AG y i) Homocigoto recesivo GG. Polimorfismo rs9344: j) Homocigoto dominante AA k) Heterocigoto AG y l) Homocigoto recesivo GG.

Se realizó un análisis estadístico de los polimorfismos de los tres genes de interés: AURK-A, AURK-B y CCND1. De tal manera que primero se analizó las frecuencias genotípicas de los SNPs y se calculó el valor de p aplicando la prueba estadística de chi-cuadrado (Tabla 1). Se encontró que únicamente el SNP rs2273535 del gen AURK-A tiene una distribución distinta entre casos y controles.

Tabla 1. Distribución general de los polimorfismos en la población estudiada.

SNP	GENOTIPOS	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS		VALOR P
		CASOS	CONTROL	
AURK-A rs2273535	TT	19	70	0,037
	TA	46	90	
	AA	19	28	
CCND1 rs9344	AA	53	32	0,832
	AG	14	7	
	GG	3	1	
AURK-B rs10594976	GG	11	33	0,6726
	GA	7	23	
	AA	1	2	
AURK-B rs2241909	AA	9	27	0,6013
	AG	9	27	
	GG	1	4	

Por otro lado, se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos estudiados en el presente trabajo. Se determinó que todos los polimorfismos estudiados se encuentran en el equilibrio ya que $p > 0,05$, con la excepción del polimorfismo del gen AURK-A (rs2273535), que no se encuentra en equilibrio dentro de la población total ya que el valor de p es de 0,00 (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg de los polimorfismos estudiados.

SNP	GENOTIPOS	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS			FRECUENCIAS ALÉLICAS			HARDY WEINBERG VALOR P
		CASOS	CONTROL	TOTAL	CASOS	CONTROL	TOTAL	
AURK-A rs2273535	TT	22,6	37,2	32,7	77,4	85,1	96,4	0,00
	TA	54,8	47,9	50,0				
	AA	22,6	14,9	17,3	22,6	14,9	3,6	
CCND1 rs9344	AA	75,7	80,0	77,3	95,7	97,5	96,4	0,08
	AG	20,0	17,5	19,1				
	GG	4,3	2,5	3,6	4,3	2,5	3,6	
AURK-B rs10594976	GG	57,89	57,89	57,1	94,7	96,6	96,1	0,44
	GA	36,84	36,84	39,0				
	AA	5,26	5,26	3,9	5,3	3,4	3,9	
AURK-B rs2241909	AA	47,37	46,55	46,8	94,7	93,1	93,5	0,30
	AG	47,37	46,55	46,8				
	GG	5,26	6,9	6,5	5,3	6,9	6,5	

La prueba estadística odds-ratio fue llevada a cabo para todos los polimorfismos. En la Tabla 3 se presenta el riesgo de cada genotipo en función de los polimorfismos analizados. Lastimosamente ninguno de ellos arrojó un valor p significativo mayor a 0,05.

Tabla 3. Asociación entre los polimorfismos estudiados y el riesgo genotípico de desarrollar mieloma múltiple entre casos y controles.

SNP	GENOTIPOS	CASOS	CONTROL	TOTAL	ODDS RATIO	IC 95%	VALOR P
AURK-A rs2273535	TT	19	70	89	1,000		
	TA	46	90	136	1,883	1,014-3,497	0,062
	AA	19	28	47	1,328	0,671-2,627	0,523
CCND1 rs9344	TT+TC	65	160	225	0,599	0,313-1,147	0,167
	AA	53	32	85	1,000		
	AG	14	7	21	1,208	0,441-3,308	0,909
	GG	3	1	4	1,500	0,131-17,180	1,000
	AA+AG	67	39	106	0,573	0,058-5,697	1,000

AURK-B rs10594976	GG	11	33	44	1,000		
	GA	7	23	30	0,913	0,308-2,707	1,000
	AA	1	2	3	1,643	0,129-20,939	1,000
	GG+GA	18	56	74	0,643	0,55-7,513	1,000
AURK-B rs2241909	AA	9	27	36	1,000		
	AG	9	27	36	1,000	0,344-2,906	1,000
	GG	1	4	5	0,750	0,074-7,613	1,000
	AA+AG	18	54	72	1,333	0,140-12,718	1,000

DISCUSIÓN

El mieloma múltiple es un cáncer de células plasmáticas que presenta una proteína monoclonal en suero o en orina. Esta enfermedad representa al 1,5% del total de neoplasias y el 10% de neoplasias hematológicas está en segundo lugar después del linfoma.¹⁶ El diagnóstico de la enfermedad es en la mayoría de veces tardío, razón por la cual su tasa de supervivencia no supera los tres años.¹⁷

Las auroras quinasas A y B desempeñan papeles esenciales durante la división celular. Tanto AURK-A como AURK-B se encuentran sobre-expresados en distintos tipos de cánceres humanos y son de gran importancia en el desarrollo de la inestabilidad cromosómica y transformación oncogénica, además de que presentan variaciones en los genes supresores de tumores y las vías reguladoras de oncoproteínas.^{13,18} En un estudio pre-clínico realizado en el departamento de medicina clínica y experimental de la Universidad de Parma se identificó una actividad antimieloma potente y específica que se da debido a la combinación de inhibidores de la AURK con TRAIL. Este es un fármaco miembro de la familia del factor de necrosis tumoral, de esta manera la inhibición de AURK aumenta el efecto terapéutico del fármaco TRAIL en células plasmáticas.¹⁹

La proteína codificante de CCND1 pertenece a una familia de proteínas encargadas de la regulación de enzimas quinasas dependientes de ciclinas. Estas enzimas están involucradas en el paso de la fase G1 a

la fase S del ciclo celular durante la mitosis. Por lo que las proteínas ciclinas contribuyen a la coordinación correcta de los eventos mitóticos. La inhibición de ciclina D1 detiene el ciclo celular, entretanto que su sobreexpresión acelera la transición a la fase S. Este gen se ha visto relacionado con enfermedades como la leucemia linfocítica crónica y el mieloma múltiple.²⁰ Debido a la importancia de los genes previamente mencionados, se decidió realizar el presente estudio en pacientes ecuatorianos con mieloma múltiple. Para el gen AURK-A se investigó el polimorfismo rs2273535 por el cambio Phe311Ile, para el gen de AURK-B se examinaron dos polimorfismos importantes rs1059476 que se ve ligado con el cambio Thr298Met y también se encontró el polimorfismo rs2241909 durante la amplificación anterior; asimismo se analizó el polimorfismo rs9344 del gen CCND1. Todos estos polimorfismos podrían estar asociados con el riesgo de desarrollar MM.

Con respecto al polimorfismo Phe311Ile del gen AURK-A se observa que el 50% de la población estudiada, es decir tanto pacientes como controles presentan el genotipo heterocigoto; el 32,7% exhibe el genotipo homocigoto dominante y tan solo el 17,3% presenta el alelo recesivo. Debido al comportamiento de los resultados encontrados se realizó la prueba estadística de chi-cuadrado arrojando un valor p significativo, estableciendo así que existen diferencias significativas entre pacientes y controles. El comportamiento de los polimorfismos del gen

AURK-B fue muy similar. En el cambio rs1059476, se observó que en la población total el 57,1% presentó el genotipo homocigoto dominante, el 39% heterocigoto y solamente el 3,9% homocigoto recesivo. Sin embargo, al realizar el análisis de chi-cuadrado, no se encontraron diferencias significativas entre casos y controles ya que el valor p fue 0,67. El segundo polimorfismo rs2241909, tuvo la misma cantidad de homocigotos dominantes y heterocigotos y tan solo el 6,5% fueron heterocigotos recesivos. Al igual que el anterior polimorfismo no se obtuvo un valor p significativo ya que no existieron diferencias significativas en pacientes ni controles.

En un estudio realizado en población alemana con pacientes que padecían cáncer de mama, se encontró que los mismos polimorfismos de AURK-A y AURK-B no tuvieron significancia estadística entre afectos y controles por lo que se pudo verificar que en la población alemana estos polimorfismos no tienen relación con desarrollo de cáncer familiar.²¹

Ahora bien, el SNP del gen CCND1 muestra un comportamiento similar tanto en la población afectada como en la población control. Siendo el genotipo homocigoto dominante el que presenta un mayor porcentaje con respecto al alelo heterocigoto y el alelo recesivo. El valor de p en el equilibrio de Hardy Weinberg fue de 0,08 acercándose a la significancia estadística ($p < 0,05$), indicando que esta población tiende a no cumplir la condición de equilibrio.

En cuanto a la prueba Odds-ratio, se identificó que ninguno de los polimorfismos estudiados presenta un valor p significativo, es decir que no representarían un riesgo para contraer la enfermedad. A pesar de que existen estudios que demuestran la relación de estos polimorfismos con diferentes neoplasias, este resultado pudo deberse a que el tamaño muestral utilizado para cada polimorfismo fue variable por la disponibilidad de las muestras en los diferentes hospitales de la ciudad de Quito.

La ley de Hardy-Weinberg establece que una población se mantiene en equilibrio cuando sus frecuencias genotípicas y alélicas son constantes con el paso de generaciones, sin embargo, este se romperá cuando se incorporen factores perturbadores.²² En esta investigación se encontró que únicamente el polimorfismo de AURK-A rs2273535 tuvo un valor p significativo de 0,00, y el resto de polimorfismos demostraron un valor p superior a 0,05. Por lo que se puede intuir que los polimorfismos rs9344, rs rs2241909 y rs1059476 no se encuentra en equilibrio

debido a la generación de mutaciones, migración, deriva génica o consanguinidad entre individuos.

CONCLUSIONES

El polimorfismo rs227353 del gen AURK-A presentó una distribución heterogénea entre pacientes y controles, al igual que exhibió un desequilibrio dentro de la población mediante la prueba de Hardy-Weinberg. Razón por la cual se puede intuir que este SNP estaría asociado con el desarrollo y progresión del mieloma múltiple.

Ninguno de los polimorfismos estudiados representaría un riesgo de desarrollar la enfermedad, de acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba odds-ratio.

Los polimorfismos del gen AURK-B y CCND1 no muestran valores significativos en las pruebas estadísticas de chi-cuadrado y equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que se debería aumentar y equiparar el tamaño muestral tanto de pacientes y controles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Estrada, N.W. (2012). Revisión de fisiopatología, clínica y diagnóstico de mieloma múltiple. *Rev Med Cos Cen*, 69(603), 343-349.
2. Ries, L., Eisner M. y Kosary, C. (2005). SEER Cancer statistics review, 1975-2002. Recuperado el 31 de agosto del 2015 de http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/
3. Paz-y-Miño, C., Sánchez, M.E., Araujo, S., Ocampo, L., Espín, V.H., Leone, P.E. (2013) Cytogenetic and Molecular Characterization of Hematological Neoplasm in an Ecuadorian population. *Open J Blood Dis*, 3(4), 108-115.
4. Leone, P.E., Montesdeoca, B., Chiluiza, D., Morales, I., Sánchez, M.E., Buenano, M.E., Cevallos, F. Espín, V.H., Ocampo, L., Paz-y-Miño, C. (2013) Datos de Ecuador en la Red Iberoamericana para la Investigación de Mieloma Múltiple. *Rev Oncología*, 23(1), 7-16.
5. Zavala, G., Montesdeoca, B., Paz-y-Miño, C., Leone, P.E. (2016) Evaluación de polimorfismos del gen AKT1 en la población ecuatoriana con mieloma múltiple. *Rev Ecuat Med Eugenio Espejo*, 5(6), 24-35.
6. Sabin, P. (2013). Mieloma múltiple. Recuperado el 6 de abril del 2015 de <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer>

/info-tipos-cancer/linfomas-y-mieloma/mieloma?art=1

7. Leone, P.E., Walker, B.A., Jenner, M., Chiechio, L., Dagrada, G., Protheroe, R., Johnson, D., Brito, J., Else, M., Gonzalez, D., Ross, F., Chen-Kiang, S., Davies, F.E. y Morgan, G.J. (2008). Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: Biological and clinical implications. *Clin Cancer Res*, 14(19), 6033-6041.
8. Elosua, C., Catalina, P., Walker, B.A., Dickens, N.J., Avramidou, A., Brito, L., Davenport, E., Jenner, M.J., Gonzalez, D., Davies, F.E., Morgan, G.J., Leone, P.E. (2008) Molecular characterization of Human Multiple Myeloma Cell Lines by Genome-Wide Profiling identifies Kinase Pathway alterations. *Blood*, 112(11), 1694.
9. Leone, P.E., Elosua, C., Catalina, P., Palma, C., Walker, B.A., Dickens, N.J., Avramidou, A., Brito, L., Davenport, E., Jenner, M.J., David Gonzalez, D., Davies, F.E., Morgan, G.J. (2009) Human Multiple Myeloma Cell Lines: Molecular characterization by genome-wide profiling identifies alterations involving key enzymatic proteins. *Proceedings ASHG 59th Annual Meeting* (1284/W/Poster Board #942). Available at <http://www.ashg.org/2009meeting/abstracts/fulltext/>.
10. Tomotoshi, M., Dongwei, Z. y Hideyuki, S. (2005). Aurora-A - A guardian of poles. *Nature Reviews Cancer*. Recuperado el 20 de Junio del 2017, de <http://www.nature.com/nrc/journal/v5/n1/full/nrc1526.html>
11. Globocan. (2012). Population Fact Sheets. Recuperado el 23 de mayo del 2015 de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
12. Dar, A.A., Goff, L.W., Majid, S., Berlin, J. y El-Rifai, W. (2010). Aurora Kinase Inhibitors - Rising Stars in Cancer Therapeutics? *Mol Cancer Ther*, 9(2), 268-278.
13. Solomon, D., Wang, Y., Fox, S., Lambeck, T., Giesting, S., Lan, Z. y Knudsen, E. (2003). Cyclin D1 Splice Variants Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem*, 278(32), 30339-30347.
14. Braggio, E. y Albarracín, F. (2013). El uso de alteraciones genéticas en la estratificación por riesgo del Mieloma Múltiple. *Medicina*, 73, 369-375.
15. Montesdeoca, B. (2015). Estado del Mieloma Múltiple, diagnóstico clínico, medicina de laboratorio e identificación de alteraciones genéticas asociadas con la patogénesis en el Hospital Carlos Andrade Marín en un periodo de tiempo comprendido entre 1986 a 2012. Recuperado el 29 de junio del 2017 de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/2200/0/9177/Estado%20del%20mieloma%20m%C3%BAltiple%20diagn%C3%B3stico%20cl%C3%ADnico%20de%20laboratorio%20e%20de%20nificaci%C3%B3n%20de%20alteraciones%20gen%C3%A9ticas%20asoc-1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. American Cancer Society. (2014). Multiple myeloma. Recuperado el 30 de agosto del 2015 de <http://www.cancer.org/cancer/multiplemyeloma/detaileguide/multiple-myeloma-staging>
17. Kyle, R. y Rajkumar, S. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23, 3-9.
18. Mazzeri L., Lombardi G., Abeltino M., Ricca M., Donofrio G., Giuliani N., Cantoni A.M., Corradi A., Bonati A., Lunghi P. (2013). Aurora and IKK kinases cooperatively interact to protect multiple myeloma cells from Apo2L/TRAIL. *Blood*, 122(15), 2641-53.
19. Genecards (2017). CCND1. Recuperado el 29 de Junio del 2017 de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1>
20. Wang, S., Huang, Y., Su, R., Fang, Z. y Han, M. (2015). Cyclin D1 G870A polymorphism is associated with an increased risk of multiple myeloma. *Genet Mol Res*, 14(2), 5856-5861.
21. Tchatchou, S., Wirtenberger, M., Hemminki, K., Sutter, C., Meindl, A., Wappenschmidt, B. y Burwinkel, B. (2007). Aurora kinases A and B and familial breast cancer risk. *Cancer Lett*, 247(2), 266-272.
22. Paz-y-Miño, C. y López, A. (2014). Genética molecular y citogenética humana. Fundamentos, aplicaciones e investigaciones en el Ecuador. Quito, Ecuador: Yachay EP.

Artículo Original

Expresión y Función del Receptor de la Leptina (OBR) en Células Periféricas Mononucleares aisladas de personas con peso normal u Obesidad

Funes Salome,¹ Santander Stephanie,² Marcelo Grijalva,^{1,3} Marco Fornasini,^{2,4} Manuel Eduardo Baldeón.^{2,4}

¹ Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

² Centro de Investigación Traslacional, Universidad de las Américas, ³ Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ⁴ Centro de Investigación Biomédica, Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito Ecuador.

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: Manuel E. Baldeón, Av. Occidental y Av. Mariana de Jesús. Bloque "T". Cuarto piso, Oficina I-32, Teléfono: 593 1-800-101020 ext 2115, manuel.baldeon@ute.edu.ec

RESUMEN

Antecedentes: La hormona leptina tiene funciones importantes en el control del balance energético y en la respuesta inmunológica. En las personas con obesidad existe resistencia del receptor de leptina (OBR) en el hipotálamo y además tienen altos niveles séricos de la hormona. El riesgo incrementado a infecciones en personas con obesidad podría estar relacionado a la resistencia de OBR en células inmunes. Pocos estudios han comparado la respuesta inmune entre personas con obesidad y controles de peso normal. Este estudio comparó la expresión y respuesta del OBR en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) aisladas de personas con obesidad y peso normal.

Métodos: Quince sujetos con obesidad fueron emparejados por edad y sexo con controles de peso normal. Células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas después de ayunar durante la noche. La expresión de OBR en la superficie de los PBMCs recientemente aisladas fue medida por citometría de flujo. Se midió además la respuesta de PBMCs a la estimulación con leptina, LPS, o fitohemaglutinina mediante la cuantificación de IL-6, TNF- α y proliferación celular in vitro.

Resultados: Se observó una mayor expresión de OBR en PBMCs de hombres con peso normal en comparación con hombres con obesidad, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. La estimulación con leptina provocó la proliferación de PBMCs de forma dosis dependiente, similar al resultado que se obtuvo con la estimulación de LPS y fitohemaglutinina. Además, el tratamiento con leptina provocó una mayor liberación de IL-6 de las células aisladas de hombres con peso normal que de hombres con obesidad, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. No se observó un patrón similar de la expresión de OBR o en la liberación de citoquinas en las mujeres participantes.

Conclusiones: Aunque las diferencias de la expresión de OBR y liberación de citoquinas por parte de PBMCs no fueron estadísticamente significativas, la baja expresión del receptor y la baja respuesta a la estimulación con leptina en hombres con obesidad podrían indicar una resistencia del receptor en estas células inmunes. Al parecer existen diferencias en la respuesta del OBR entre mujeres que hombres. Son necesarios más estudios para evaluar la resistencia del OBR en células inmunes en sujetos con obesidad.

Palabras clave: Resistencia al receptor de leptina, obesidad, células mononucleares de sangre periférica, leptina.